



Aislamiento y caracterización de fagos virulentos de bacterias uropatógenas multirresistentes y formadoras de biofilms

María Victoria Gutiérrez Acevedo

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

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

**Montevideo, Uruguay
2025**



Aislamiento y caracterización de fagos virulentos de bacterias uropatógenas multirresistentes y formadoras de biofilms

María Victoria Gutiérrez Acevedo

Tesis presentada con el objetivo de obtener el título de Magíster en Ciencias Biológicas, subárea Microbiología, en el marco del Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

Orientadora: Dra. Natalia Echeverría Chagas, Asistente, Laboratorio de Virología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Co-orientadora: Dra. Martha Josefina Vives Florez, Profesora Titular, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes

**Montevideo, Uruguay
2025**

Resumen

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son de las más frecuentes a nivel mundial, y la creciente resistencia a antibióticos ha dificultado su tratamiento. En este contexto, la fagoterapia, que utiliza bacteriófagos (o fagos), ha resurgido como alternativa terapéutica. Los fagos son virus que infectan de forma selectiva a las bacterias, y son útiles para combatir infecciones. Este trabajo se enfocó en el aislamiento y caracterización de fagos virulentos con potencial uso clínico. Se generó una colección de 17 fagos aislados en Uruguay a partir de aguas residuales, activos frente a cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, agentes etiológicos de las ITU. Los fagos fueron capaces de lisar la mitad de las cepas clínicas ensayadas, incluidas uropatógenas. Cuatro fagos candidatos (KP4, KP9, KP13 y EP1) fueron seleccionados para estudios más detallados. Todos mostraron estabilidad térmica entre 4°C y 42°C, y en un rango de pH de 5 a 9. Además, lograron controlar el crecimiento bacteriano en cultivos líquidos, con distintas eficiencias. Mediante microscopía electrónica se constató que todos presentan morfología myovirus (simetría binaria cabeza-cola contráctil) y mediante análisis genómicos, se confirmó que todos pertenecen a la clase *Caudoviricetes*. Ninguno de los fagos cuenta con genes de resistencia, virulencia o lisogenia, lo cual respalda su uso terapéutico. Además, se evaluó su actividad frente a biofilms, donde EP1 y otros fagos con morfología de placa de lisis con halo lograron reducir significativamente la biomasa de biofilms preformados, sugiriendo la presencia de enzimas depolimerasas. Estos resultados destacan el potencial de la colección no solo para terapia fágica, sino también para otras aplicaciones como biocontrol en superficies. Este trabajo constituye el primer estudio académico público en Uruguay en aislar y caracterizar fagos locales con fines terapéuticos, y establece bases metodológicas, y científicas para el desarrollo futuro del área, promoviendo la investigación abierta en un campo con alto valor biotecnológico.

Palabras clave: bacteriófagos; fagoterapia; uropatógenos; biofilm; multirresistencia.

Abstract

Urinary tract infections (UTI) are among the most common worldwide, and the increasing antibiotic resistance has hindered their treatment. In this context, phage therapy, which uses bacteriophages (or phages), has re-emerged as a therapeutic alternative. Phages are viruses that selectively infect bacteria and are useful in combating infections. This study focused on the isolation and characterization of virulent phages with potential clinical use. A biobank of 17 phages isolated in Uruguay from wastewater was generated; these phages are active against strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, etiological agents of UTI. The phages were able to lyse half of the clinical strains tested, including uropathogenic strains. Four candidate phages (KP4, KP9, KP13, and EP1) were selected for detailed studies. All showed thermal stability between 4°C and 42°C and within a pH range of 5 to 9. Additionally, they were able to control bacterial growth in liquid cultures, with varying levels of efficiency. Electron microscopy revealed that all exhibit myovirus morphology (icosahedral head and contractile tail), and genomic analyses confirmed that they all belong to the class *Caudoviricetes*. None of the phages carry resistance, virulence, or lysogeny genes, supporting their therapeutic potential. Their activity against biofilms was also evaluated, where only EP1 and phages producing lysis plaques with halos significantly reduced the biomass of preformed biofilms, suggesting the presence of depolymerase enzymes. These results highlight the potential of the biobank not only for phage therapy but also for other applications such as biocontrol on surfaces. This work represents the first academic study in Uruguay to isolate and characterize local phages for therapeutic purposes, establishing methodological and scientific foundations for future development in the field, and promoting open research in an area with high biotechnological value.

Keywords: bacteriophages; phage therapy; uropathogens; biofilm; antibiotic resistance.

Tabla de contenido

Resumen	3
Abstract	4
1. Antecedentes	7
1.1 “La Pandemia Silenciosa”: el impacto de la resistencia antimicrobiana	7
1.2 Resistencia a los antibióticos	8
1.2.1 Grupo ESKAPEE y patógenos bacterianos prioritarios	14
1.2.2 Situación en Uruguay	16
1.3 Infecciones del tracto urinario (ITU)	17
1.4 Los bacteriófagos: “enemigos” naturales de las bacterias	22
1.4.1 Los bacteriófagos y su descubrimiento	22
1.4.2 Biología de los fagos, clasificación filogenética y ciclos de infección	22
1.4.3 Los fagos como alternativa terapéutica	26
1.4.4 Situación actual de la fagoterapia	28
2. Objetivos	31
2.1 Objetivo general	31
2.2 Objetivos específicos	31
3. Materiales y métodos	32
3.1 Transferencia de cepas bacterianas al laboratorio y almacenamiento	32
3.3 Aislamiento y purificación de bacteriófagos	37
3.4 Generación de stocks virales	38
3.5 Rango de hospedero y eficiencia de plaqueo	39
3.6 Ensayos de estabilidad	40
3.6.1 Estabilidad térmica	40
3.6.2 Estabilidad frente a distintos pH	40
3.7 Curvas de infección viral	41
3.8 Microscopía electrónica de transmisión	41
3.9 Ensayo de erradicación de biofilms	42

3.10 Caracterización genómica	42
3.10.1 Extracción de ácidos nucleicos	42
3.10.2 Secuenciación masiva por Oxford Nanopore	43
4. Resultados y Discusión	45
4.1 Aislamiento de bacteriófagos a partir de muestras de agua de plantas de tratamiento de nuestro país	45
4.2 Rango de hospedero y eficiencia de plaqueo (EOP) de los fagos aislados	48
4.3 Estabilidad térmica y a diferentes pH de los fagos seleccionados	55
4.4 Curvas de infección viral de los fagos seleccionados	59
4.5 Microscopía electrónica de transmisión de los fagos seleccionados	63
4.6 Capacidad de erradicación de biofilms de los fagos aislados	65
4.7 Caracterización genómica de los fagos aislados	68
5. Conclusiones y Perspectivas	74
Referencias bibliográficas	79
Apéndice 1: Curvas de crecimiento de las cepas hospederas	88
Anexo 1: Secuenciación de los aislamientos bacterianos empleados	89
Anexo 2: Características fenotípicas de resistencias a antimicrobianos de los aislamientos de <i>Klebsiella</i> spp.	91
Anexo 3: Características genotípicas de resistencias a antimicrobianos de los aislamientos de <i>Klebsiella</i> spp.	93
Anexo 4: Características fenotípicas de resistencias a antimicrobianos de los aislamientos de <i>Escherichia coli</i>	95
Anexo 5: Identificación de depolimerasas en los genomas de los fagos aislados	97
Anexo 6: Mapas genómicos de los fagos candidatos	99
Anexo 7: Análisis filogenético de los fagos del género <i>Slopekvirus</i>	101

1. Antecedentes

1.1 “La Pandemia Silenciosa”: el impacto de la resistencia antimicrobiana

La resistencia antimicrobiana (RAM) se refiere a la capacidad adquirida por microorganismos como bacterias, virus, hongos y parásitos para sobrevivir y multiplicarse a pesar de la presencia de fármacos que anteriormente eran efectivos para inhibir su crecimiento o eliminarlos (1). La RAM es una de las causas líder de mortalidad en el mundo, que contribuye al 9% de las muertes globales (2,3). En 2021 se reportaron aproximadamente 21,36 millones de muertes por sepsis como causa inmediata, o con una sepsis en la cadena de eventos que desencadenó en la muerte. De estas muertes, se estima que 1,14 millones fueron directamente atribuibles a la RAM, es decir que ocurrieron como consecuencia directa de una infección por patógenos resistentes. Además, 4,71 millones de muertes estuvieron asociadas a la RAM, lo que implica que la resistencia estuvo presente y contribuyó a complicar el cuadro clínico, aunque no haya sido la causa principal del fallecimiento (4). Si no se toma control sobre esta situación, los reportes oficiales estiman que la resistencia antimicrobiana será la primera causa de muerte para el 2050, cobrándose aproximadamente 10 millones de vidas cada año (5). Además del impacto en la mortalidad, la RAM representa una carga económica significativa para los sistemas de salud, no solo en los países en desarrollo, sino a nivel global (6). Desde el año 2020, se ha registrado un aumento del 45% en los costos médicos asociados a esta problemática (7). Esta situación se debe principalmente a tres factores: en primer lugar, las infecciones causadas por microorganismos resistentes derivan en enfermedades graves, lo que conlleva hospitalizaciones prolongadas y un mayor número de ingresos a unidades de cuidados intensivos. De hecho, los pacientes con infecciones por microorganismos resistentes permanecen hospitalizados, en promedio, 13 días más que su contraparte con infecciones por microorganismos susceptibles (7). En segundo lugar, el uso de tratamientos de segunda línea, necesarios cuando fallan las terapias iniciales, incrementa los costos del tratamiento (7). Finalmente, la RAM también ocasiona pérdidas económicas anuales significativas debido a la disminución en la productividad laboral. Según los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, *Centers for Disease Control and Prevention*, por sus siglas en inglés), la resistencia antimicrobiana supone anualmente un aumento de 20 billones en costos médicos directos en los Estados Unidos, y un aumento de 35 billones en pérdida de productividad (6).

1.2 Resistencia a los antibióticos

La introducción de los antibióticos en la práctica clínica fue, sin duda, uno de los mayores avances médicos del siglo XX. Además de permitir el tratamiento de enfermedades infecciosas, los antibióticos hicieron posibles muchos procedimientos médicos modernos, como el tratamiento del cáncer, los trasplantes de órganos y la cirugía a corazón abierto (8). Tradicionalmente, el término antibiótico se refiere a compuestos producidos por microorganismos que matan o inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Sin embargo, en la práctica clínica actual, el término se ha ampliado para incluir también compuestos sintéticos y semisintéticos con actividad antimicrobiana (9).

El primer compuesto antimicrobiano utilizado terapéuticamente fue el Salvarsán, desarrollado en el año 1910 por Paul Ehrlich para tratar *Treponema pallidum*, agente causal de la sífilis (10). Años más tarde, en 1928, Alexander Fleming descubrió la penicilina, producida por hongos del género *Penicillium*. Este hallazgo impulsó el estudio sistemático de microorganismos como productores de antibióticos por parte de Selman Waksman, que marcó el inicio de la “época dorada”, el período más prolífico en el desarrollo de antibióticos, que tuvo su pico en los años 1950. De todos los antibióticos descubiertos en esta época, el 55% derivaron del género *Streptomyces* (11). Estas bacterias del suelo son grandes productoras de antibióticos debido a que los utilizan como armas químicas para matar o inhibir el crecimiento de competidores, además de utilizar estas moléculas como señalizadoras (12).

Desde la época dorada ha habido una disminución en la tasa de descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas antimicrobianas (13). Esto se debe en parte a las barreras que encuentran las farmacéuticas a la hora de desarrollar nuevos productos, teniendo que pasar por largos procesos para la aprobación, con altos costos y bajas tasas de éxito. También es atribuible a la falta de incentivo, ya que no es rentable para estas empresas pasar por un complejo proceso de desarrollo y que al poco tiempo el antibiótico pierda efectividad debido al surgimiento de resistencia (7,14,15). A lo largo de la historia, a medida que se fueron desarrollando y comercializando nuevos antibióticos, poco tiempo después aparecieron mecanismos de resistencia (16). Incluso, para algunas clases de antibióticos, el período de desarrollo del mismo es más largo que el período comprendido entre el primer uso clínico y la aparición de resistencia (17) (**Figura 1**).

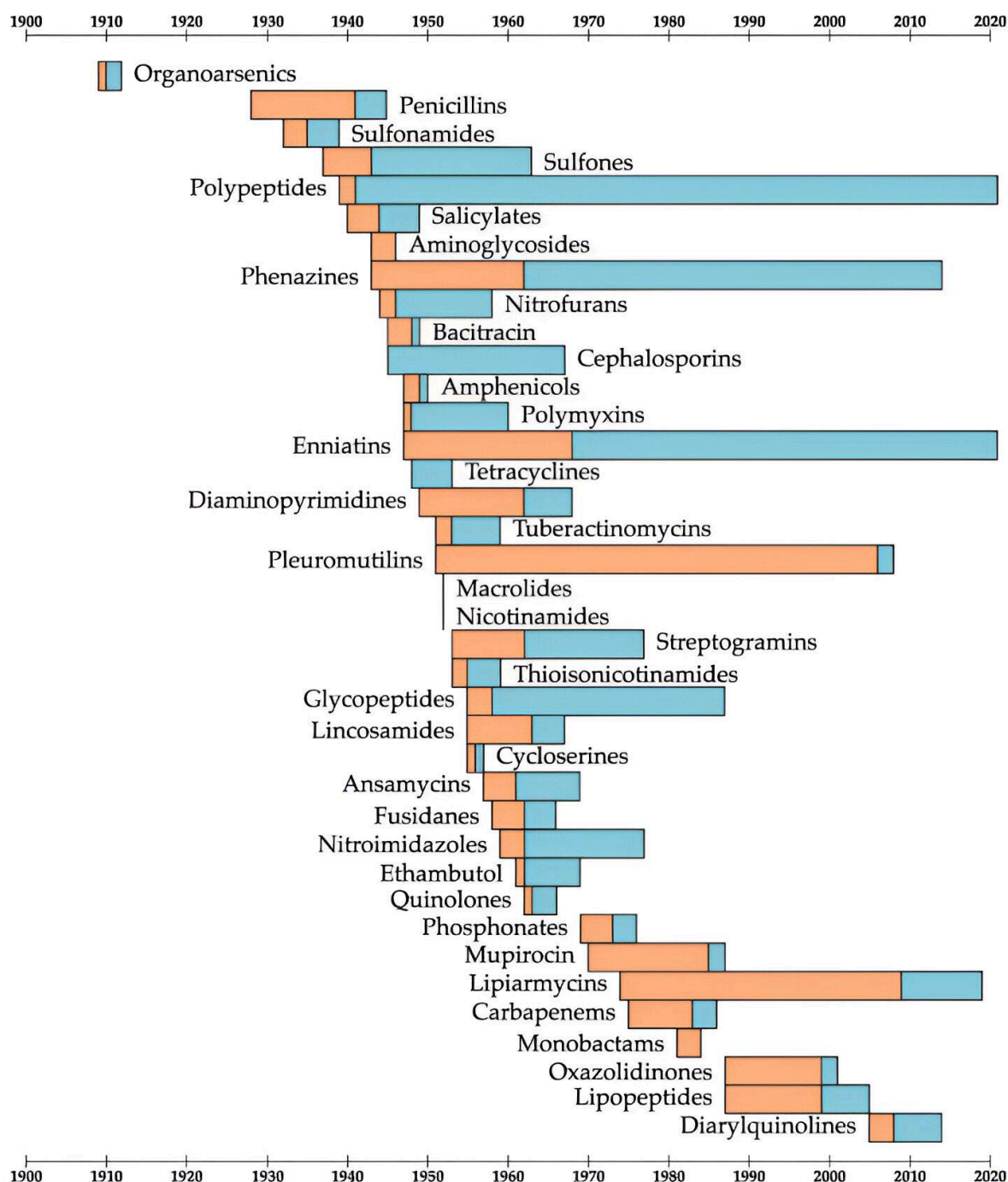


Figura 1: Línea del tiempo para el descubrimiento, primer uso clínico y primer reporte clínico de resistencia de las 38 clases de antibióticos. Se representan antibióticos tradicionales (derivados de fuentes naturales), además de compuestos sintéticos y semisintéticos. Para cada uno, las barras naranjas indican la “ventana de desarrollo”, período comprendido entre el desarrollo y el primer uso clínico. Las barras azules indican la “ventana de resistencia”, período de tiempo comprendido entre el primer uso clínico y el primer reporte clínico de resistencia al mismo. Tomada de (17).

La resistencia a antibióticos por parte de las bacterias se ha convertido en una amenaza global, poniendo en juego la eficacia de algunos tratamientos, y la prevención de infecciones. La aparición y propagación de organismos resistentes a múltiples familias de antimicrobianos, llamados organismos multidrogorresistentes (MDROs, del inglés *multidrug-resistant organisms*) a paso acelerado en las últimas décadas ha generado una crisis de salud a nivel mundial. Algunos reportes recientes indican que en algunas regiones del mundo, hasta el 40% de las infecciones más comunes son resistentes a los antibióticos de primera línea (2,7). Es importante señalar que la resistencia a antibióticos existe desde antes que éstos fueran identificados, sintetizados o comercializados. De hecho, se han identificado aislamientos bacterianos en el permafrost con más de 30.000 años que ya poseían resistencia a antibióticos (3). Para facilitar el entendimiento, resulta necesario diferenciar entre distintos tipos de resistencia: la resistencia intrínseca, adquirida y adaptativa (2,18).

La resistencia intrínseca es un fenómeno que ocurre naturalmente, independiente de la exposición a antibióticos, y se encuentra universalmente distribuida en el genoma de un grupo de bacterias, o de una especie bacteriana. Típicamente la resistencia intrínseca es cromosómica y se puede predecir a partir de la identidad del microorganismo. Los mecanismos tradicionales de resistencia intrínseca son propiedades inherentes a la bacteria en cuestión, e incluyen la falta de permeabilidad, lo que impide el ingreso o acumulación del antibiótico dentro de la célula bacteriana; la presencia de bombas de eflujo no específicas, que expulsan los antibióticos y otras sustancias del interior bacteriano; la presencia de enzimas que degradan el antibiótico; o la falta del sitio blanco del antibiótico, necesario para que este pueda ejercer su acción (2,18,19) (**Figura 2, panel superior**).

Por su parte, la resistencia adquirida es el fenómeno por el cual bacterias que eran inicialmente susceptibles a antibióticos, se vuelven resistentes, y este es el tipo de resistencia preocupante al que se refiere la RAM. Muchos fenómenos juegan un rol en la resistencia adquirida, pero el principal es el uso incorrecto e indiscriminado de antibióticos. Además, la globalización ha tenido un gran impacto en la diseminación de la resistencia antibiótica. La resistencia adquirida ocurre de una de dos maneras, por mutación o por la adquisición de material genético foráneo que codifica para genes de resistencia. Las bacterias se reproducen rápidamente, lo que lleva a cambios evolutivos a través de mutaciones aleatorias. La exposición a antibióticos genera una presión selectiva que le confiere una ventaja a la bacteria que ha adquirido resistencia a través de mutaciones. Algunos mecanismos de resistencia que

pueden ser desarrollados de esta manera incluyen la modificación del blanco del antibiótico, lo que impide que la unión del antibiótico a su blanco; la modificación o eliminación del antibiótico, que impiden que el antibiótico ejerza su efecto; modificación de la pared celular para disminuir la permeabilidad; o presencia de bombas de eflujo que impiden que el antibiótico se acumule en el interior bacteriano (**Figura 2, panel del medio**). Alternativamente, las bacterias pueden adquirir estas resistencias mediante la transferencia de material genético desde otras bacterias, a través de la transferencia horizontal de genes (THG). Esta transferencia permite no solo que las bacterias adquieran rápidamente cambios en su material genético, sino que rápidamente pueden compartirlos con otras bacterias. Los tres procesos tradicionales de THG son la transducción, transformación y conjugación (2,18). Muchos genes de resistencia se encuentran codificados en plásmidos, pequeñas moléculas de ADN circular móviles que pueden participar en la THG, concretamente en la conjugación. Existen genes de resistencia codificados en los cromosomas bacterianos, pero son los plásmidos los que tienen la capacidad de diseminarse rápidamente entre bacterias e incluso entre distintas especies. Asimismo, también pueden contener otros elementos genéticos móviles como transposones e integrones. Los elementos transponibles son secuencias de ADN que pueden integrarse en plásmidos o cromosomas y que usualmente codifican para genes de resistencia. Los integrones son secuencias de ADN que también se localizan en plásmidos o cromosomas, generalmente asociados a transposones y que tienen la capacidad de integrar genes libres en el citoplasma bacteriano y por ende estas plataformas pueden portar varios genes de resistencia (20).

Por último, existe otra forma de resistencia particular, también de preocupación, denominada resistencia adaptativa. Podría definirse la resistencia adaptativa como el aumento temporal de la habilidad de una bacteria para sobrevivir a un antibiótico gracias a alteraciones en la expresión génica o de proteínas, como resultado de la exposición a un detonante ambiental o la presencia de antibióticos (21). Estos mecanismos típicamente requieren de cambios epigenéticos, y están asociados a la sobreexpresión de bombas de eflujo y a una disminución en la producción de porinas, dos estrategias que disminuyen la concentración intracelular del antibiótico. Otro mecanismo de resistencia adaptativa es la formación de biofilms (2,22) (**Figura 2, panel inferior**). Los biofilms son comunidades microbianas que se encuentran irreversiblemente adheridas a una superficie, o a sí mismas, rodeadas de una matriz polisacárida de producción propia que les brinda un ambiente protegido frente a estrés ambiental como radiación ultravioleta, cambios en la salinidad, pH, entre otros (23,24). En el

ambiente clínico, la formación de biofilms supone un desafío para los antibióticos, ya que generan infecciones difíciles de resolver, típicamente crónicas. Gracias a la matriz de polisacáridos, la penetración del antibiótico se ve reducida, impidiendo su acceso a las bacterias ubicadas en las capas más internas del biofilm (21). Además, se secretan de forma continua péptidos que contrarrestan su actividad, disminuyendo notoriamente su efecto tóxico (25). Por otra parte, los nutrientes tienen una distribución desigual a lo largo de la estructura del biofilm, generando que las células de las capas más externas crezcan más rápido que las internas, estas últimas incluso pudiendo alcanzar un estado dormante o persistente (26). Esto es relevante ya que las distintas fases del crecimiento poseen una expresión génica diferencial, y también distintas susceptibilidades a antibióticos. Finalmente, las células en un biofilm se encuentran en estrecho contacto entre ellas, lo que vuelve al biofilm un excelente ambiente para la THG, y por lo tanto, para la transferencia de genes de RAM (27).

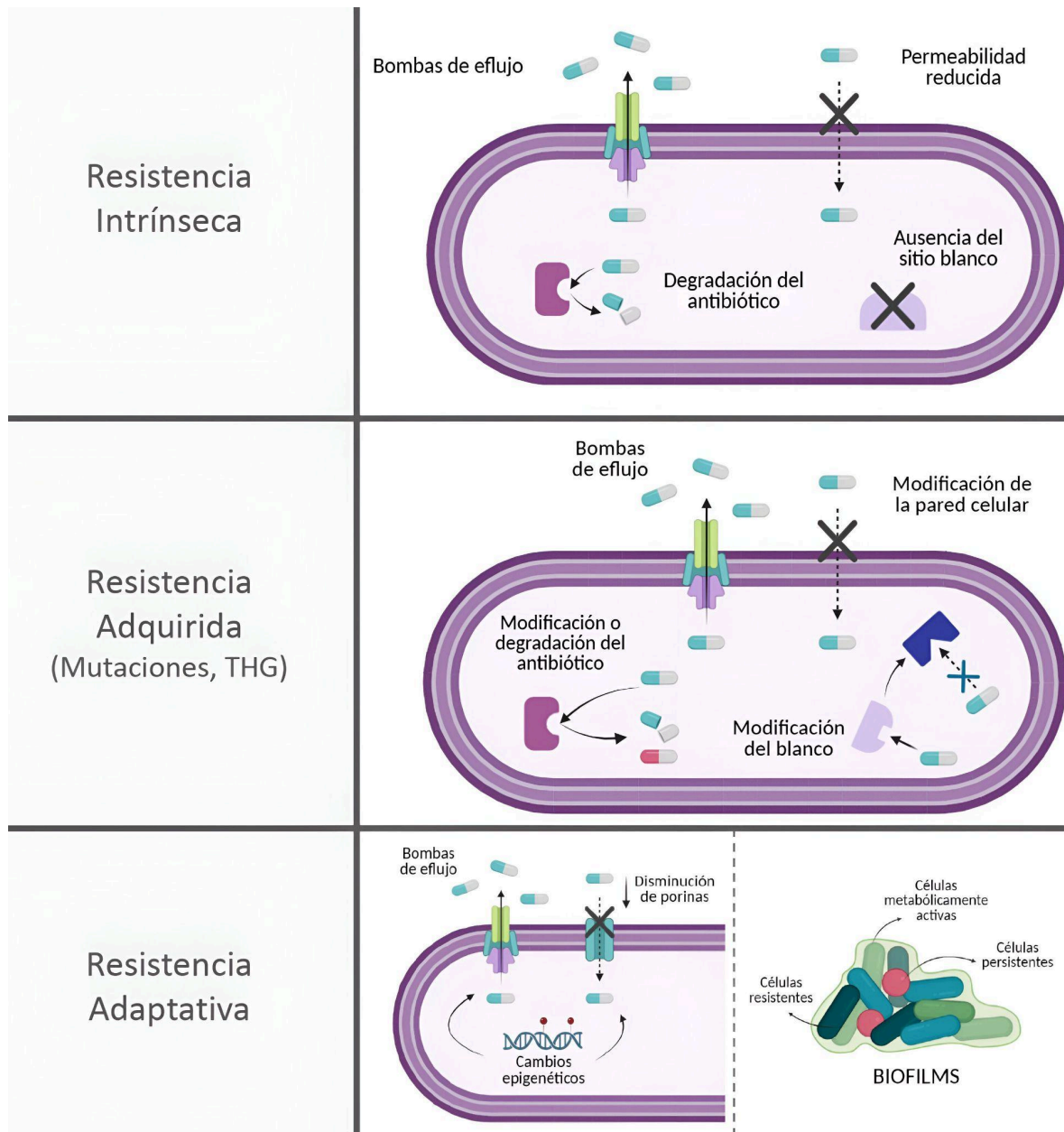


Figura 2: Mecanismos de resistencia a antibióticos. Se distingue entre los mecanismos de resistencia intrínseca (bombas de eflujo inespecíficas, permeabilidad reducida, degradación del antibiótico y ausencia del sitio blanco), resistencia adquirida (bombas de eflujo, modificación de la pared celular, modificación o degradación del antibiótico y modificación del sitio blanco) y resistencia adaptativa (aumento en la expresión de bombas de eflujo, disminución de porinas y formación de biofilms). THG: Transferencia horizontal de genes. Adaptada de (2).

1.2.1 Grupo ESKAPEE y patógenos bacterianos prioritarios

El estudio GBD (*Global Burden of Disease*, por sus siglas en inglés) identificó a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, y *Pseudomonas aeruginosa* como las seis causas de muerte (73%) que lideran las muertes asociadas y atribuibles a la RAM bacteriana en 2019, tendencia que se mantuvo en 2021 (**Figura 3**) según el IHME (*Institute for Health Metrics and Evaluation*, por sus siglas en inglés) (28). Estos patógenos se solapan con otro grupo de patógenos, considerados dentro del acrónimo ESKAPEE, que abarcan *Enterococcus spp.*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter spp.* y *E. coli*, conocidos por causar infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad resistentes a antibióticos (2). Los integrantes del grupo ESKAPEE son especialmente desafiantes a la hora de tratar, debido a su habilidad intrínseca y adquirida de desarrollar mecanismos de resistencia a antibióticos rápidamente en respuesta a estímulos ambientales (29).

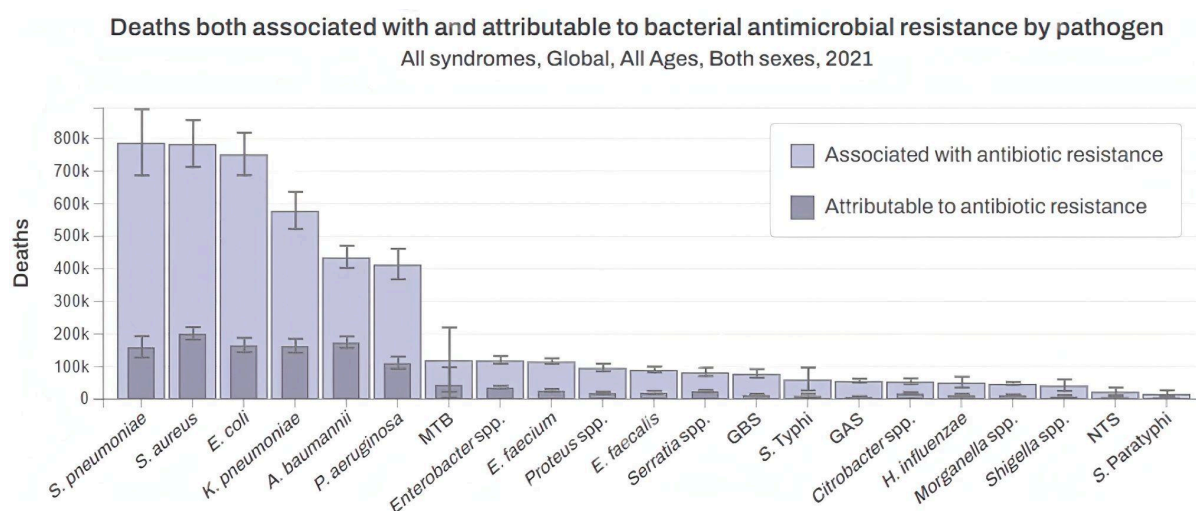


Figura 3: Muertes globales asociadas y atribuibles a la resistencia antimicrobiana (RAM) por parte de bacterias en 2021. Se muestra el número de muertes asociadas a la RAM (violeta claro) y el número de muertes atribuibles a la RAM (violeta oscuro) para los patógenos bacterianos más influyentes, considerando todas las infecciones a nivel global, para todas las edades y ambos sexos. MTB: *Mycobacterium tuberculosis*; GBS: *Streptococo grupo B*; NTS: *Salmonella no tifoidea*. Tomado de (28).

Además de los patógenos del grupo ESKAPEE, en 2024 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una lista de patógenos que definió como prioritarios, según los criterios de: mortalidad, incidencia, transmisibilidad, opciones de tratamiento disponibles, tendencia a la resistencia, capacidad para la prevención y carga (no fatal) para el sistema de salud. Con este enfoque, se identificaron 24 combinaciones de patógenos y antibióticos, las cuales fueron clasificadas, y definidas como prioridad media, alta o crítica (**Figura 4**) (30).

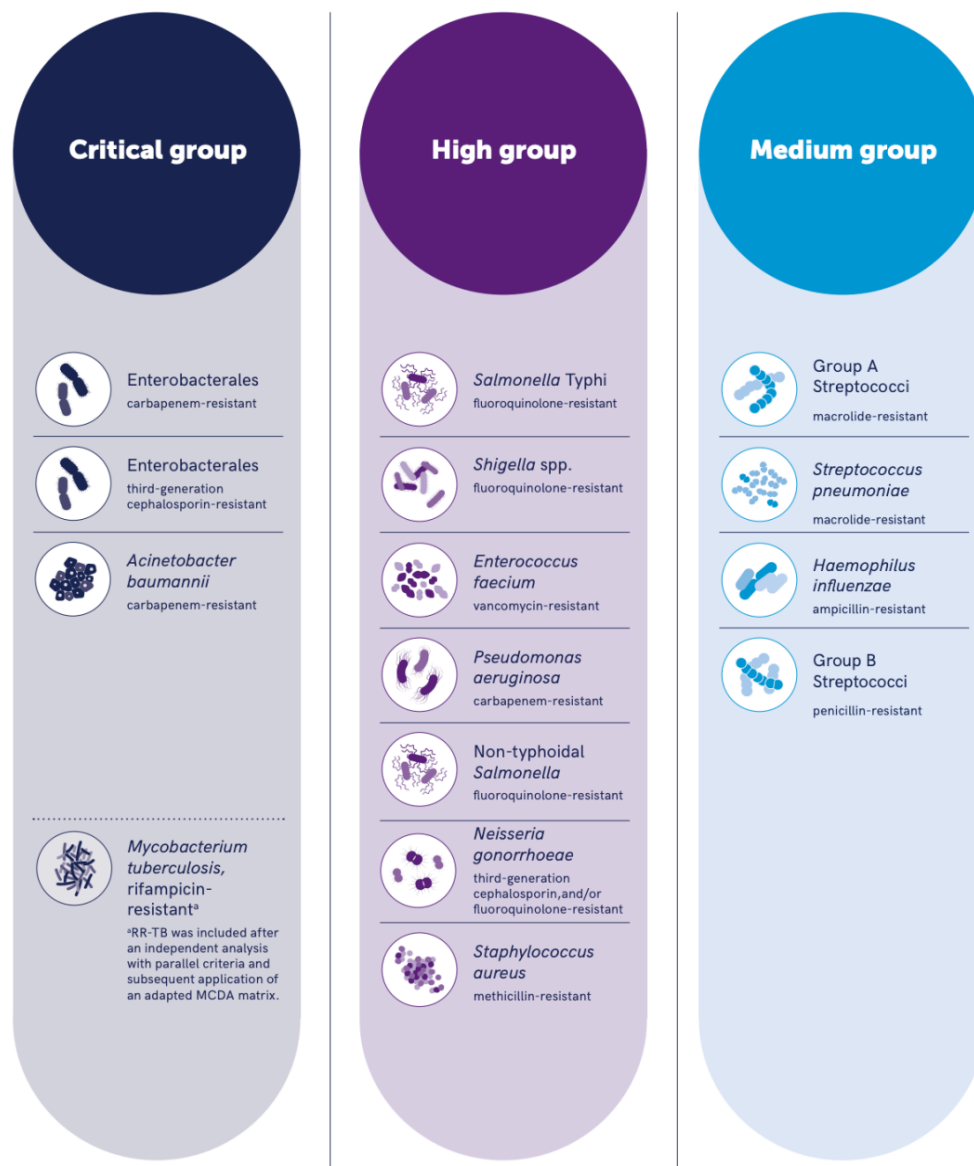


Figura 4: Lista de patógenos prioritarios para la Organización Mundial de la Salud (2024). Se identificaron 24 combinaciones de patógeno-antibiótico que fueron declaradas prioridad, y que entran en uno de los siguientes grupos: prioridad media, alta o crítica, según criterios de mortalidad, incidencia, transmisibilidad, opciones de tratamiento disponibles, tendencia a la resistencia, capacidad para la prevención y carga (no fatal) para el sistema de salud. Tomada de (30).

1.2.2 Situación en Uruguay

Uruguay no es ajeno a la situación global, y en 2021 se reportaron aproximadamente 700 muertes directamente atribuibles a la resistencia a antibióticos, y 2.800 muertes asociadas a este fenómeno, según datos del IHME. Al igual que lo que sucede en el mundo, los patógenos líderes en muertes fueron *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *A. baumannii*, y *P. aeruginosa*, contribuyendo aproximadamente al 80% de las muertes por RAM en el año 2021 (**Figura 5**) (28).

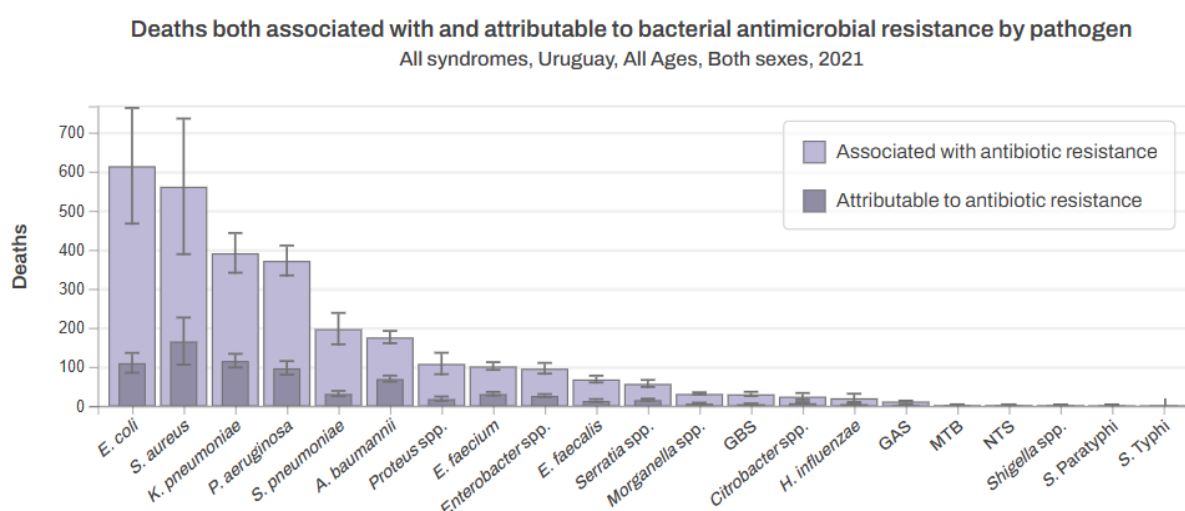


Figura 5: Muertes en Uruguay asociadas y atribuibles a la resistencia antimicrobiana (RAM) por parte de bacterias en 2021. Se muestra el número de muertes asociadas a la RAM (violeta claro) y el número de muertes atribuibles a la RAM (violeta oscuro) en Uruguay para los patógenos bacterianos más influyentes, considerando todas las infecciones, para todas las edades y ambos sexos. GBS: Estreptococo grupo B; GAS: Estreptococo grupo A; MTB: *Mycobacterium tuberculosis*; NTS: *Salmonella* no tifoidea. Tomado de (28).

Uruguay realiza vigilancia de la resistencia a los antibióticos a través del Departamento de Laboratorios de Salud Pública (DLSP), y envía datos a ReLAVRA (Red Latinoamericana y del Caribe de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos) y SIREVA (Sistema de Redes de Vigilancia de los Agentes Responsables de Neumonías y Meningitis Bacterianas). En el 2018, el Ministerio de Salud Pública (MSP) elaboró un Plan Nacional de Acción contra la Resistencia Antimicrobiana, con el objetivo de reducir el riesgo de selección y diseminación de microorganismos resistentes a los antimicrobianos utilizados en el

tratamiento de las infecciones en humanos (31). A pesar de la implementación de este plan, el problema de la resistencia viene en aumento en nuestro país. En particular, las infecciones hospitalarias causadas por bacilos Gram negativos (BGN) han constituido un problema creciente en la práctica clínica debido a la aparición de mecanismos de resistencia a casi la totalidad de antibióticos utilizados en la clínica diaria, lo que resulta un desafío terapéutico y para el control de infecciones (31).

En enterobacterias, el mecanismo de resistencia más común identificado en los aislamientos clínicos es la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), un grupo de enzimas capaz de hidrolizar la mayoría de antibióticos beta-lactámicos, con excepción de los carbapenémicos (considerados antibióticos de última línea o reservados) (31). En los últimos años, el aumento en el uso de los carbapenémicos para el tratamiento de infecciones causadas por MDROs ha derivado en resistencia a estos fármacos (31). A partir del primer brote hospitalario por un microorganismo productor de carbapenemasa (*K. pneumoniae*, patógeno de prioridad crítica para la OMS) en el 2011 (32), brotes esporádicos por estos microorganismos se han presentado tanto en instituciones públicas como privadas, con un sostenido aumento en su frecuencia. En el año 2017, se registraron un total de 10 brotes en todo el país (31), mientras que en los últimos cinco años (exceptuando el 2020 que no es representativo de la situación epidemiológica por las restricciones de la pandemia) se han registrado un promedio de 21 brotes anuales causados por microorganismos productores de carbapenemasas, según datos del MSP (33).

1.3 Infecciones del tracto urinario (ITU)

Los MDROs son responsables de una amplia variedad de síndromes infecciosos, tanto a nivel intrahospitalario como comunitario; entre los que se incluyen las infecciones del torrente sanguíneo, del tracto respiratorio, de la piel, intraabdominales y del tracto urinario (30).

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son unas de las infecciones más frecuentes a nivel mundial, habiendo afectado a 400 millones de personas en el año 2019 (34–36). Las ITU tienen mayor incidencia y prevalencia en mujeres, estimándose que el 50%-60% de las mujeres tendrán al menos una ITU a lo largo de su vida (34), y en niños, siendo las ITU la segunda infección bacteriana más común en esta población (37).

El diagnóstico de las ITU típicamente se realiza analizando una combinación de síntomas clínicos conjuntamente con un urocultivo positivo ($>10^5$ unidades formadoras de colonia/mL). Algunos síntomas incluyen: dolor o molestia al orinar (disuria); aumento de la frecuencia al orinar; dolor suprapúbico; presencia de sangre en la orina (hematuria); presencia de leucocitos en la orina (piuria); fiebre; dolor en el flanco, entre otros (36,38,39).

Las ITU pueden clasificarse según la condición clínica del paciente en ITU complicadas y no complicadas. Esta diferenciación tiene implicancias en la terapia, dado que los riesgos de complicaciones o fracaso del tratamiento son más probables para pacientes con una ITU complicada (38). En general, la definición que se utiliza es la siguiente: una ITU no complicada es un episodio de cistitis (infección de vejiga o tracto urinario bajo) en pacientes que no estén inmunocomprometidos, embarazadas, que no tienen anormalidades funcionales o anatómicas del tracto urinario, sin catéter permanente y sin historial de trasplante renal, que además no tengan síntomas de una infección del tracto urinario alto (pielonefritis) o de infección sistémica. Todas las ITU que no entran en esta definición, se catalogan como complicadas (35,38,39).

Generalmente, las ITU están causadas por un solo microorganismo, y el principal agente etiológico tanto en infecciones complicadas como no complicadas es *Escherichia coli* uropatógena (UPEC, *uropathogenic Escherichia coli*, por sus siglas en inglés). En menor medida pueden ser causadas también por varios patógenos como otras bacterias Gram-negativas (*K. pneumoniae*, *P. mirabilis* y *P. aeruginosa*); bacterias Gram-positivas (*S. saprophyticus*, *Enterococcus* spp., GBS y *S. aureus*); y levaduras (*Candida* spp.), que causan ITU oportunistas (35,39,40) (**Figura 6**).

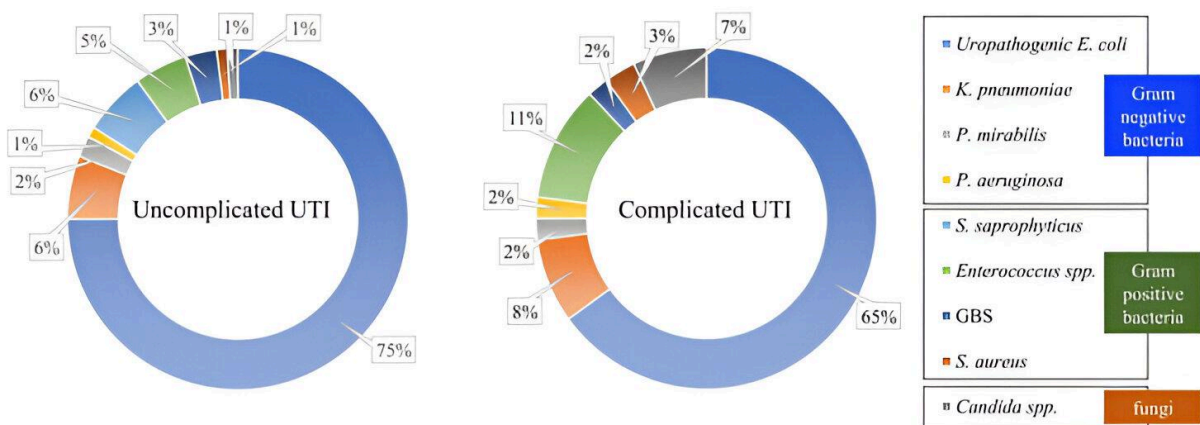


Figura 6: Epidemiología de las infecciones del tracto urinario (ITU). Las ITU son multiespecie; la infección puede estar causada por bacterias Gram-negativas, bacterias Gram-positivas, o levaduras. De todos los agentes etiológicos, *Escherichia coli* uropatógena es responsable del 75% de los casos de ITU no complicada, y del 65% en los casos de ITU complicada. Tomada de (40).

De manera preocupante, las ITU no solo son comunes, sino que tienen una alta tasa de recurrencia (40). Durante una infección del tracto urinario, *E. coli* UPEC puede adherirse e invadir las células epiteliales de la vejiga, formando estructuras en el citosol (llamadas comunidades bacterianas intracelulares, CBI) (41–43). Las CBI pueden proteger a las bacterias de la acción de los antibióticos y servir como un reservorio intracelular para ITU recurrentes (41–43).

Según donde se adquiera la infección, las ITU pueden clasificarse en adquiridas en la comunidad o adquiridas en el hospital (nosocomiales). Las cistitis que queden desatendidas o no sean resueltas, pueden progresar a una pielonefritis o incluso a una urosepsis (39). El riesgo de progresión es dependiente, en parte del lugar de donde la infección fue adquirida. Las ITU nosocomiales son generalmente ITU complicadas, donde se aíslan una mayor proporción de patógenos multirresistentes, en comparación a las infecciones comunitarias (38,39). El 80% de las ITU complicadas son ocasionadas por el uso de una sonda vesical o catéter (44). Además de la mayor presencia de MDROs en el ambiente hospitalario, la inserción de un catéter urinario en la uretra y la vejiga resulta en la liberación de fibrinógeno por parte del huésped, que cubre el catéter. Estos factores permiten que varios patógenos se puedan unir y formar biofilms en la superficie del catéter, lo que incrementa la mortalidad si la infección progresa a pielonefritis y urosepsis. En pacientes hospitalizados, la proporción de sepsis atribuibles a las ITU es 42% (39).

Según datos del IHME, las ITU son la sexta causa de muerte a nivel global cuando consideramos solamente los síndromes infecciosos, cobrándose medio millón de muertes en el año 2021 (**Figura 7**, panel superior izquierdo). En Uruguay ocurre algo similar, aunque las ITU ocupan el tercer puesto en causas de muertes por agentes infecciosos (**Figura 7**, panel superior derecho). En cuanto a la incidencia de la multirresistencia en este tipo de infecciones, tanto a nivel global como en nuestro país, las ITU son una de las principales responsables en muertes asociadas y atribuibles a la resistencia antibiótica (**Figura 7**, panel inferior) (28).

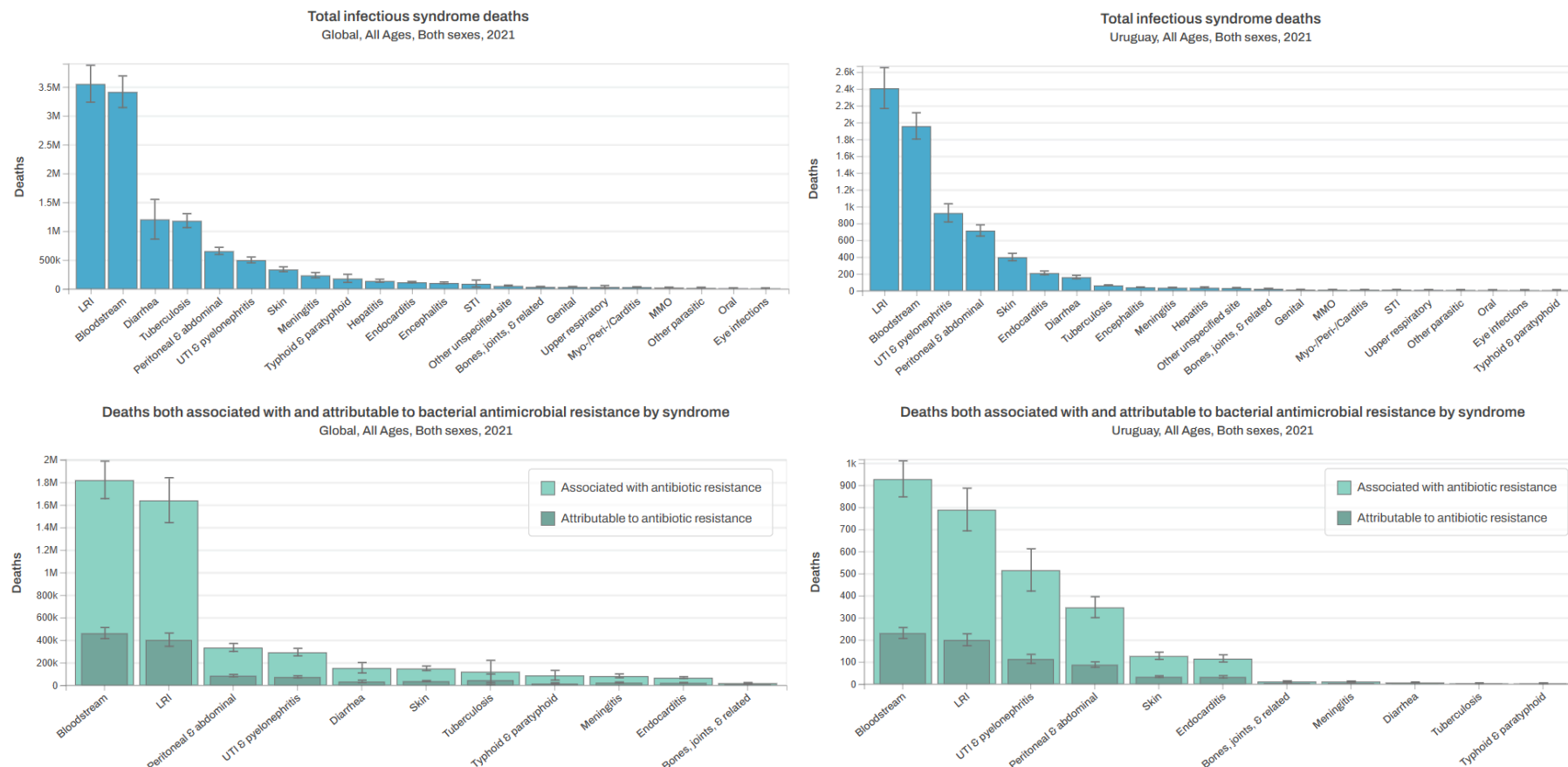


Figura 7: Muertes causadas por los síndromes infecciosos en el año 2021. Panel superior: muertes causadas por síndromes infecciosos en 2021 a nivel global (izquierda) y en Uruguay (derecha). **Panel inferior:** muertes asociadas (verde claro) y atribuibles (verde oscuro) a la resistencia antibiótica en 2021, por síndrome infeccioso a nivel global (izquierda) y en Uruguay (derecha). LRI: infecciones del tracto respiratorio inferior; STI: infecciones de transmisión sexual; MMO: mielitis, meningoencefalitis y otras infecciones del sistema nervioso central. Tomado de (28).

1.4 Los bacteriófagos: “enemigos” naturales de las bacterias

1.4.1 Los bacteriófagos y su descubrimiento

Los bacteriófagos, o fagos, son virus que infectan bacterias de forma específica y selectiva. Los fagos son las entidades biológicas más ubicuas y abundantes de la biosfera, y se estima que existen más de 10^{31} partículas fágicas en la Tierra (45,46). Se pueden encontrar fagos en todos los hábitats bacterianos, y tienen un rol clave en la ecología y evolución microbiana (47).

Las primeras observaciones que podrían relacionarse a la actividad de bacteriófagos se remontan a tiempos antiguos, con algunos reportes documentando que algunos ríos tenían la capacidad de curar enfermedades infecciosas. En 1896, el bacteriólogo británico Ernest Hankin observó que los ríos Ganges y Jumna en India tenían actividad antibacterial contra *Vibrio cholerae*. El sugirió que el fenómeno se debía a una sustancia no identificada que limitaba el surgimiento de epidemias de cólera (48). Sin embargo, no fue hasta 1915 que el microbiólogo británico Frederick Twort propuso que se trataba de un agente filtrable e infeccioso, sin llegar a definir su naturaleza. Por varias razones incluyendo dificultades financieras, Twort no continuó con esta investigación. Dos años después, el microbiólogo francocanadiense Felix d'Herelle descubrió de forma independiente estos mismos virus, y acuñó el término bacteriófago (48,49).

1.4.2 Biología de los fagos, clasificación filogenética y ciclos de infección

Un bacteriófago es una partícula compuesta por un solo tipo de ácido nucleico (ADN o ARN) y una cápside proteica que protege el material genético (50). Se han descrito fagos de ADN simple hebra (ADNss); ADN doble hebra (ADNds); ARN simple hebra (ARNss) y ARN doble hebra (ARNds), segmentado o no. La gran mayoría de los fagos descritos (arriba del 95%) también posee una cola proteica que le permite la adsorción específica al receptor bacteriano (50). Estos fagos componen la clase *Caudoviricetes*, que se caracterizan por poseer genoma ADNds y simetría binaria (cabeza icosaédrica y cola helicoidal) (50,51). Además de

esta morfología, existen fagos filamentosos, fagos con envoltura y otros con cápside y una membrana lipídica interna. Esta variabilidad de morfologías y de ácidos nucleicos refleja la gran diversidad con la que cuentan los bacteriófagos (50).

Antiguamente, los bacteriófagos se clasificaban según su morfología, tipo de material genético y hospedero, pero en 2022, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, *International Committee on Taxonomy of Viruses*, por sus siglas en inglés) abolió esta clasificación, e implementó una basada en análisis filogenéticos. Esto se tornó necesario debido a que las antiguas familias virales tenían orígenes polifiléticos, por lo que no representaban de manera fiel las historias evolutivas (51).

Los fagos presentan diferentes ciclos de infección, esto junto con su interacción con el ambiente, dicta el rol de estos virus en la biología bacteriana (45). Los fagos con cola pueden atravesar tres tipos de ciclos: ciclo lítico, lisogénico y pseudolisogénico (**Figura 8, panel A**). Para todos ellos, el primer paso de la infección es la adsorción (reversible) del fago a la superficie de la célula bacteriana. Cada cepa bacteriana tiene un número grande de moléculas de proteínas, carbohidratos y lipopolisacáridos (LPS) en su superficie que están involucradas en un número notable de actividades biológicas, y muchas de estas moléculas son utilizadas por los fagos como receptores específicos. Por tanto, la susceptibilidad de la bacteria al fago dependerá, al menos en parte, de la presencia de estos receptores en su superficie (47,50).

Luego de la adsorción, se da la inyección (irreversible) del material genético a la célula. A partir de este paso, muchos fagos entrarán al ciclo lítico, donde se produce un “secuestro” de la maquinaria celular para la producción de proteínas virales. Inicialmente se transcribe un set de genes tempranos que incluyen la protección del genoma viral y la reestructuración del hospedero según las necesidades de cada fago. Posteriormente, se expresan genes responsables de la replicación del genoma viral, y por último, genes tardíos, encargados de la producción de componentes de la cápside, la maquinaria para el empaquetamiento del material genético, las proteínas de la cola, y las proteínas responsables de la lisis bacteriana para liberar la progenie viral en el momento adecuado. Finalmente, se da la liberación de las partículas virales por proteínas que lisan la pared celular y que generan una diferencia de presión osmótica (45,47,50).

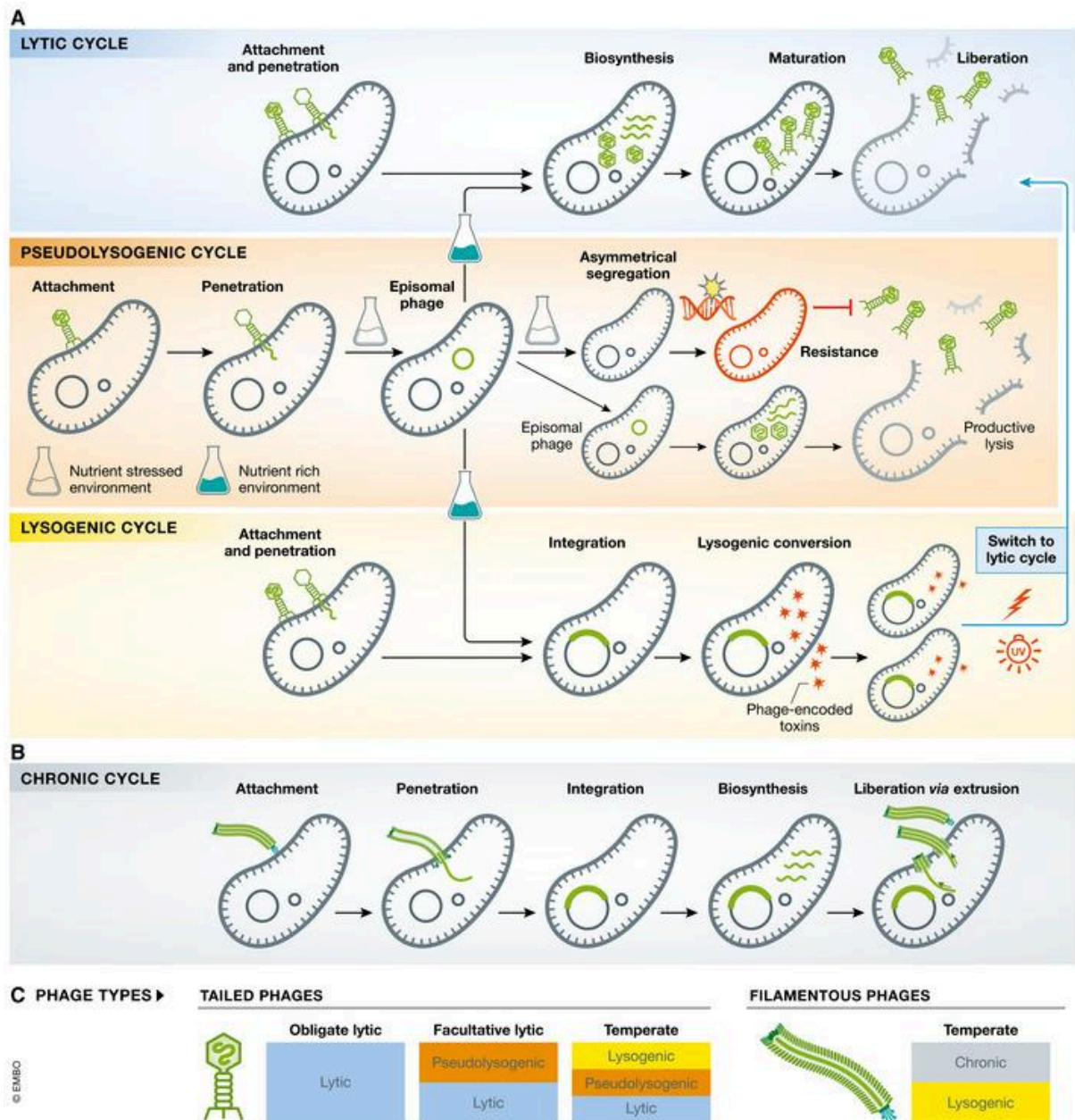


Figura 8: Ciclos replicativos de los bacteriófagos. Panel A: tipos de ciclos de infección de los fagos con cola. En el ciclo lítico, la replicación viral ocurre inmediatamente luego de la infección, eventualmente desencadenando la liberación de viriones tras la lisis bacteriana. En el ciclo lisogénico, los fagos se integran al genoma bacteriano como profagos, y se replican pasivamente hasta que se induce un ciclo lítico. En la pseudolisogenia, los genomas de los fagos persisten de manera episomal en el hospedero, antes de entrar a un ciclo lítico o lisogénico. El fago de forma episomal se segrega de manera asimétrica durante la división celular, y una subpoblación puede completar, bajo ciertas condiciones, un ciclo lítico productivo. **Panel B:** infección crónica típica de los fagos filamentosos, donde se produce progenie viral constantemente sin la lisis o muerte celular. **Panel C:** clasificación de los fagos según sus ciclos de replicación. Los fagos con cola que siempre lisan a su hospedero se denominan virulentos o líticos obligados, mientras que los líticos facultativos pueden realizar también

pseudolisogenia. Los fagos temperados, pueden tener un estilo de vida lisogénico o pseudolisogénico hasta que comiencen con un ciclo lítico, típicamente desencadenado por condiciones ambientales desfavorables o estrés bacteriano. Los fagos filamentosos suelen seguir un ciclo de vida crónico productivo, aunque también tienen la capacidad de entrar en un ciclo lisogénico. Tomada de (47).

Alternativamente, los fagos pueden atravesar el ciclo lisogénico (**Figura 8, panel A**), en el que se da la integración del genoma del fago al genoma de la bacteria hospedera en lugar de la biosíntesis que ocurre en el ciclo lítico. El material genético integrado, llamado profago, se replica pasivamente con cada división celular subsecuente. Frente a ciertas situaciones, el profago se puede inducir, escindiéndose del genoma bacteriano y generando la proliferación de una progenie viral vía ciclo lítico. La integración viral estable al cromosoma bacteriano es principalmente una función de cada fago, pero también depende de condiciones ambientales y de cambios en el hospedero. Frente a determinados cambios (estrés nutricional, daño en el ADN), los profagos pueden escindir del genoma bacteriano, entrando en un ciclo lítico que lleve a la muerte de la célula. Los mecanismos de *quorum sensing* también juegan un rol en la conversión de ciclo lisogénico a ciclo lítico (47). La presencia de profagos en el ADN de la bacteria puede protegerla de otras infecciones por fagos relacionados mediante la producción de represores (fenómeno conocido como inmunidad frente a la superinfección). También, pueden estar involucrados en la transferencia de material genético entre bacterias (transducción), y pueden causar cambios fenotípicos en el hospedero (conversión lisogénica). Estos cambios fenotípicos han hecho que algunos patógenos adquieran factores de virulencia, como por ejemplo la toxina Shiga en *E. coli* o las toxinas que posee *Vibrio cholerae* que causan los síntomas de cólera (45,47,50).

Se ha propuesto también un tercer ciclo de infección para los fagos con cola, la pseudolisogenia (**Figura 8, panel A**), cuya función e impacto en las poblaciones bacterianas aún no se encuentra bien estudiado. En la pseudolisogenia, el genoma del fago persiste en forma episomal, y no se integra al genoma bacteriano, ni tampoco se da la multiplicación o replicación sincronizada de los fagos en el hospedero, pero cuando las condiciones lo permiten, el fago entra a un ciclo lítico o lisogénico “normal”. La pseudolisogenia se ha observado principalmente en bacterias Gram-negativas, generalmente cuando las condiciones de crecimiento son limitadas, sugiriendo un rol en la supervivencia del fago a largo plazo en condiciones desfavorables, quizás otorgando ventajas del ciclo lisogénico, evitando la

integración del genoma. No se han establecido (al menos hasta el momento), marcadores genéticos de la capacidad pseudolisogénica por parte de los fagos (47).

Los bacteriófagos que realizan exclusivamente el ciclo lítico se conocen como virulentos, o líticos obligados. Aquellos que tienen la capacidad de realizar un ciclo pseudolisogénico además del lítico se denominan líticos facultativos. Los fagos temperados, pueden además experimentar un ciclo lisogénico, integrando su genoma al genoma bacteriano (**Figura 8, panel C**) (47).

Por su lado, los fagos filamentosos pueden realizar un ciclo lisogénico, y un ciclo crónico, característico de estos fagos (**Figura 8, paneles B y C**). A diferencia de los ciclos lítico y lisogénico, la infección crónica conduce a la producción continua de viriones sin causar la lisis bacteriana (47).

1.4.3 Los fagos como alternativa terapéutica

El fenómeno de la RAM ha escalado al punto de ser una amenaza seria para la salud pública a nivel global, y resulta obvio que es necesario buscar alternativas terapéuticas para los casos en los que los antibióticos ya no son eficaces. Con la escasez de nuevos medicamentos antimicrobianos, ha surgido (o resurgido) el interés por el uso de fagos para terapia, conocido como fagoterapia o terapia fágica (50).

La fagoterapia no es un concepto nuevo. Poco después del descubrimiento de los fagos, en 1919, d'Herelle comenzó a testear estos virus en pacientes humanos en el *Hôpital des Enfants-Malades*, en París. La preparación de fagos fue ingerida por el propio d'Herelle y otros internos del hospital, para confirmar su seguridad antes de ser administrada a un niño de 12 años con disentería severa. Los síntomas del paciente cesaron ante una sola administración de los fagos anti-disentería, y se recuperó completamente unos días después. La eficacia de esta preparación fue confirmada, cuando otros tres pacientes con disentería bacteriana fueron tratados con una única dosis de la preparación y comenzaron a recuperarse 24 horas post-tratamiento (52).

Desde 1919 hasta 1930, antes de la comercialización de la penicilina, d'Herelle y sus colaboradores (George Eliava, entre otros) emprendieron numerosas expediciones hacia países que tenían una epidemia de cólera, y aplicaron bacteriófagos contra estos patógenos. Según estimaciones de publicaciones de ese tiempo, gracias a la aplicación de bacteriófagos, se logró reducir la mortalidad del cólera en India en un 10%. Otros reportes de esa época también constataban la utilidad de los bacteriófagos para combatir infecciones de distintos tipos (48,52). Sin embargo, en los años 1930, comenzaron a surgir importantes cuestionamientos sobre la validez de los resultados presentados. El criticismo estaba dirigido hacia la falta de diseño metodológico, controles, producción estandarizada y caracterización de las preparaciones de fagos, al igual que algunos resultados contradictorios. Luego de la introducción de los antibióticos, parecía que la medicina contaba con una cura ideal, que curaba a los pacientes sin siquiera saber el verdadero agente causal, lo que la volvía una terapia fácil (48,53). Los esfuerzos por la fagoterapia se vieron reducidos a Europa del Este, y la barrera del lenguaje evitó la diseminación a nivel mundial de los resultados obtenidos en esa zona del mundo. Una revisión de la literatura de Polonia, Georgia y Rusia encontró tratamientos exitosos con fagos para neumonía, meningitis, osteomielitis, e infecciones postquirúrgicas en pacientes con cáncer, pero no fue hasta comienzos del nuevo milenio que occidente descubrió (o redescubrió) la fagoterapia en humanos (53).

Los beneficios de los bacteriófagos para su uso en terapia son variados. Los fagos son entidades dinámicas y se replican en el sitio de infección, lo que permite una amplificación de la dosis y una concentración en el sitio, algo que no ocurre con los antibióticos (53). Además, los bacteriófagos tienen actividad anti biofilm, cualidad que no poseen los antibióticos. En cuanto a la seguridad, no se han reportado efectos adversos durante o luego de la aplicación de bacteriófagos, y son aptos para aquellas personas con alergia a determinados antimicrobianos. Por último, aunque las bacterias podrían volverse resistentes a los fagos, esto no es de preocupación al mismo nivel que la RAM. Al igual que las bacterias, los fagos mutan y evolucionan, por lo que posibles resistencias podrían ser eludidas. Asimismo, podría utilizarse una mezcla o cóctel de distintos fagos, o fagos en combinación con antibióticos, que reduzcan la probabilidad de desarrollar o seleccionar resistencia por parte de las bacterias (48). Es de tener en cuenta que la fagoterapia es extremadamente amoldable ya que gracias a su abundancia y ubicuidad, existe una fuente virtualmente inagotable de fagos diferentes (53).

A diferencia de los antibióticos, los bacteriófagos son específicos de sus hospederos, por lo que mantienen la microbiota y minimizan las chances de infecciones secundarias. Esta especificidad es la mayor ventaja y desventaja del uso de la terapia fágica. Si bien se minimizan los efectos *off-target*, la alta especificidad requiere de un diagnóstico preciso del agente etiológico de la infección, lo cual podría ser difícil y más laborioso. Esta cualidad junto con el hecho de que el inicio temprano de una terapia con fagos podría ser crítica para su efectividad, hace que sea necesario contar con colecciones de fagos caracterizados, y listos para su uso (48,53).

La fagoterapia tradicionalmente utiliza fagos virulentos que puedan lisar a la bacteria inmediatamente luego de la infección, en lugar de fagos temperados que pueden realizar un ciclo lisogénico. La utilización de un fago temperado no solo podría disminuir la eficacia de la terapia (por la opción de lisogenia en lugar de lisis), sino que también se corre el riesgo de transferir genes de resistencia y virulencia, además de conferir inmunidad a la superinfección, pudiendo dificultar aún más el cuadro infeccioso inicial (47). Si no se dispone de fagos virulentos, es posible aplicar ingeniería genética sobre fagos temperados para eliminar los genes de lisogenia y hacerlos aptos para terapia fágica (54,55).

1.4.4 Situación actual de la fagoterapia

En Europa del este (Georgia, Polonia y Rusia), los fagos se usan de rutina en la práctica médica desde hace más de 70 años, y esta experiencia provee una rica fuente de datos empíricos (47). Existen numerosos reportes de casos de éxito para distintas infecciones en todo el mundo, incluyendo ITU; rinosinusitis y otitis media; infecciones de tejidos blandos y piel; infecciones respiratorias; infecciones óseas y de articulaciones; infecciones de prótesis; infecciones asociadas a dispositivos cardíacos y sepsis (56).

A pesar de la cantidad de estudios que demuestran la eficacia de los fagos en tratamientos personalizados, no hay hasta la fecha ensayos clínicos aleatorizados doble ciego que confirmen las observaciones promisorias de las terapias experimentales en humanos y animales (57,58). Es necesario adoptar una mirada crítica de los ensayos realizados para poder confirmar el valor terapéutico de la fagoterapia. Por ejemplo, no hay suficientes datos de la farmacocinética de los fagos, y de su biodisponibilidad tras la administración, información

clave para conocer la dosis óptima. Se ha acumulado evidencia que demuestra el efecto sinérgico de los antibióticos y los fagos, y a pesar de esto, la mayoría de los ensayos clínicos de fagoterapia no han optado por la estrategia de combinar ambos antimicrobianos (57,59). También, es de notar que la terapia personalizada es la que tiene mayor probabilidad de éxito, por lo que elegir el fago que tiene mejor actividad contra la cepa aislada del paciente es clave para poder combatir la infección. Sin embargo, las realidades de manufactura y los modelos farmacoeconómicos favorecen la utilización de fagos (o de cócteles de fagos) predeterminados. Por último, se cuenta con información muy limitada acerca del rol del sistema inmune en la fagoterapia, por lo que los futuros ensayos clínicos deberían tener en consideración esta variable (57).

En Uruguay, de forma novedosa, se ha aplicado la fagoterapia personalizada recientemente con éxito. El MSP en el año 2024 autorizó a la empresa Kinzbio a “realizar fagoterapia para el tratamiento y prevención de infecciones causadas por bacterias multirresistentes a los antibióticos”, siempre que lo solicite el médico tratante y el paciente suscriba un consentimiento informado sobre la técnica (Ordenanza N° 1.162/024, Ministerio de Salud Pública, Uruguay). La empresa ha documentado varios casos de éxito en los que ante la imposibilidad de resolver una infección bacteriana con antibióticos, los médicos tratantes y/o pacientes solicitaron la aplicación de esta tecnología. El primer caso describe la nebulización de fagos para tratamiento de una *P. aeruginosa* XDR (resistencia extensa a medicamentos) en un paciente oncológico con neumonía asociada a la ventilación mecánica (60). El segundo caso, se trató de una infección periprotésica asociada a la remoción de una prótesis de cadera, causada por múltiples microorganismos (*S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*), y con administración en el sitio quirúrgico de fagos para los agentes etiológicos identificados (60). El último caso fue un tratamiento ambulatorio mediante sonda intravesical de una paciente con ITU recurrente causada por *P. mirabilis* productor de BLEE. Para todos los casos, se logró una eliminación de la infección y de todos los síntomas asociados, sin recurrencia. Incluso para algunos de ellos se logró la erradicación del patógeno causante de la infección (60). Esta diversidad refleja la versatilidad de la fagoterapia, y el potencial de resolver infecciones que los antibióticos ya no son capaces de resolver.

En el ámbito académico uruguayo, esta tesis representa el primer trabajo público que aborda de manera sistemática el aislamiento y la caracterización de bacteriófagos locales con potencial uso bioterapéutico para el control de patógenos de relevancia clínica. Su valor

radica en inaugurar una línea de investigación aún inexplorada en la academia nacional, aportando conocimiento básico sobre la diversidad de bacteriófagos presente en nuestro entorno y su actividad bactericida frente a bacterias patógenas multirresistentes. De este modo, el trabajo sienta bases sólidas para el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en fagos, desde una perspectiva académica, colaborativa y de acceso público.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Aislar y caracterizar bacteriófagos virulentos (exclusivamente líticos) con actividad frente a bacterias uropatógenas multirresistentes y formadoras de biofilms.

2.2 Objetivos específicos

1. Aislar al menos dos fagos virulentos de *Klebsiella pneumoniae* y dos de *Escherichia coli*, principales agentes etiológicos de las infecciones del tracto urinario y generar stocks de alto título viral.
2. Caracterizar el rango de hospedero de los fagos aislados y su eficiencia de plaqueo en aislamientos bacterianos clínicos, y seleccionar un set de al menos 3 fagos que presenten actividad contra aislamientos de origen urinario para su estudio en mayor profundidad.
3. Caracterizar de forma más detallada los fagos seleccionados determinando:
 - a. la estructura de las partículas virales mediante microscopía electrónica;
 - b. la naturaleza de sus genomas (ADN o ARN) y sus secuencias;
 - c. su estabilidad térmica y a distintos pH;
 - d. la interacción fago-hospedero mediante curvas de infección;
 - e. su capacidad de erradicar biofilms bacterianos.

3. Materiales y métodos

3.1 Transferencia de cepas bacterianas al laboratorio y almacenamiento

A excepción de la cepa ATCC 700603 (*Klebsiella quasipneumoniae*, anteriormente denominada *Klebsiella pneumoniae* K6), todas las cepas utilizadas en este trabajo fueron transferidas desde otros laboratorios donde habían sido previamente identificadas y caracterizadas fenotípica y genotípicamente. Las cepas de *Klebsiella pneumoniae* (n = 25) y *Klebsiella oxytoca* (n = 1) fueron gentilmente cedidas por la Dra. Carolina Márquez (Cátedra de Microbiología Clínica, Facultad de Química, UdelaR); la Dra. Nadia Riera (Laboratorio de Genómica Microbiana, Institut Pasteur de Montevideo); y el Dr. Franklin L. Nobrega (The Microbial Interactions Lab, University of Southampton). Las cepas de *Escherichia coli* (n = 34) fueron gentilmente cedidas por las Dras. Fernanda Azpiroz y Eloisa Poey (Fisiología Bacteriana, Facultad de Ciencias, UdelaR); la Dra. Paola Scavone (Laboratorio de Biofilms, Instituto de Investigaciones Clemente Estable); y la Dra. Carolina Márquez (Cátedra de Microbiología Clínica, Facultad de Química, UdelaR).

Dichas cepas fueron subcultivadas utilizando el método de siembra por estrías en medio rico Triptona de Soya Agar (TSA, *Tryptic Soy Agar* por sus siglas en inglés) e incubadas a 37°C por 18 horas. Luego, el crecimiento bacteriano se resuspendió en medio Infusión Cerebro Corazón (BHI, *Brain-Heart Infusion* por sus siglas en inglés) con 20% (v/v) de glicerol y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

La mitad de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* se encontraban secuenciados previo a su utilización, y los restantes fueron secuenciados con la tecnología de Oxford Nanopore para determinar información de interés para este trabajo. Los detalles de la metodología empleada se detallan en el **Anexo 1** (Secuenciación de los aislamientos bacterianos empleados). Para todas las cepas, se determinaron los genes de resistencia y los secuenciotipos utilizando Kleborate v3 (61), y los K locus, tipos capsulares, O locus y antígenos O se determinaron utilizando Kaptive Web v1.3.0 (62). Los análisis bioinformáticos fueron realizados con asistencia técnica de la Dra. Daniela Megrian (Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur de

Montevideo) y el Bach. Sebastián Rey (Laboratorio de Virología Molecular, Universidad de la República).

Todos los aislamientos utilizados en este trabajo, junto con su origen, año de aislamiento, y otras características, se listan en las **Tabla 1** (*Klebsiella* spp.) y **Tabla 2** (*E. coli*). Además, los datos fenotípicos de resistencias a antibióticos y la información acerca de genes de resistencia se encuentran detallados en el **Anexo 2** (Características fenotípicas de resistencias a antimicrobianos de los aislamientos de *Klebsiella* spp.), **Anexo 3** (Características genotípicas de resistencias a antimicrobianos de los aislamientos de *Klebsiella* spp.) y **Anexo 4** (Características fenotípicas de resistencias a antimicrobianos de los aislamientos de *Escherichia coli*).

Tabla 1: Aislamientos de *Klebsiella* spp. utilizados en este trabajo. Se detalla para cada aislamiento: la especie, secuenciotipo, K locus, tipo capsular predicho (antígeno K), tipo O predicho (antígeno O), origen y año de aislamiento.

Aislamiento	Especie	Secuenciotipo	K locus	Tipo capsular predicho	O locus	Tipo O predicho	Muestra / origen	Año de aislamiento
ATCC 700603	<i>K. pneumoniae</i>	ST489	KL53	K53	OL3α/β	O3αβ	Urinario	1994
L0240*	<i>K. pneumoniae</i>	ST635	KL21	K21	S/D	ND	Hemocultivo	2018
164125A*	<i>K. pneumoniae</i>	ST35	KL22	K22	S/D	ND	S/D	S/D
164413U/2*	<i>K. oxytoca</i>	ST37	KL68	K68	S/D	ND	S/D	S/D
19/2	<i>K. pneumoniae</i>	ST437	KL36	K36	OL4	O4	Herida quirúrgica	2011
54/2	<i>K. pneumoniae</i>	ST437	KL36	Acapsular	OL4	O4	Herida quirúrgica	2011
Kp1111	<i>K. pneumoniae</i>	ST48	KL124	Acapsular	OL2α.1	O2α	Catéter urinario	2011
Kp1102	<i>K. pneumoniae</i>	ST48	KL124	Desconocido	OL2α.1	O2α	Secr. respiratoria	2011
Kp666	<i>K. pneumoniae</i>	ST258	KL106	Desconocido	OL2α.2	O2β	Urocultivo	2011
KpPRE	<i>K. pneumoniae</i>	ST258	KL106	Acapsular	OL2α.2	O2β	Aspirado traqueal	2011
KpPOST	<i>K. pneumoniae</i>	ST258	KL106	Desconocido	OL2α.2	O2β	Aspirado traqueal	2011
F312C	<i>K. pneumoniae</i>	ND	KL64	Acapsular	OL2α.1	O2α	S/D	S/D
F327C	<i>K. pneumoniae</i>	ND	KL64	Acapsular	OL2α.1	O2α	S/D	S/D
FQ38879	<i>K. pneumoniae</i>	ST11	KL64	Acapsular	OL2α.1	O2α	S/D	2017
FQ40565	<i>K. pneumoniae</i>	ST11	KL64	K64	OL2α.1	O2α	S/D	2017
F322	<i>K. pneumoniae</i>	ST20	KL28	K28	OL2α.2	O2β	Secr. respiratoria	S/D
04Kp21	<i>K. pneumoniae</i>	ST307	KL102	Desconocido	OL2α.2	O2β	Hueso	2023
04Kp27	<i>K. pneumoniae</i>	ST307	KL102	Desconocido	OL2α.2	O2β	S/D	S/D
F305	<i>K. pneumoniae</i>	ST1561	KL105	Desconocido	OL2α.2	O2β	Urocultivo	S/D
M1366	<i>K. pneumoniae</i>	ST258	KL107	Desconocido	OL2α.1	O2α	Urinario	2016
Kp1124	<i>K. pneumoniae</i>	ST258	KL107	Desconocido	S/D	S/D	Urocultivo	2011

F312B	<i>K. pneumoniae</i>	ST716	KL110	Desconocido	OL2α.1	O2α	S/D	S/D
F327B	<i>K. pneumoniae</i>	ST483	KL110	Desconocido	OL3γ	O3γ	S/D	S/D
F330	<i>K. pneumoniae</i>	ST716	KL110	Desconocido	OL2α.1	O2α	Catéter	S/D
F320	<i>K. pneumoniae</i>	ST17	KL122	Desconocido	OL2α.2	O2β	Urocultivo	S/D
M1443	<i>K. pneumoniae</i>	ST11	KL127	Desconocido	OL13	O13	Urocultivo	2017
04Kp29	<i>K. pneumoniae</i>	ST278	KL136	Desconocido	OL2α.2	O2β	S/D	S/D

*Todos los aislamientos bacterianos son de origen uruguayo, a excepción de L0240, 164125A y 164413U/2 que fueron aislados en el Reino Unido.

Los secuenciotipos se determinaron utilizando Kleborate v3 (61); Los K locus, O locus y los antígenos K y O se determinaron usando Kaptive Web v1.3.0 (62).

S/D: sin dato; ND: no determinado.

Tabla 2: Aislamientos de *Escherichia coli* utilizados en este trabajo. Todos los aislamientos de *E. coli* utilizados son de origen uruguayo. Se detalla para cada aislamiento: el grupo filogenético, perfil, origen y año de aislamiento.

Aislamiento	Grupo filogenético	Perfil	Muestra / origen	Año de aislamiento
144	B1	-	Urinario	2012
50 PW	A	-	Urinario	2007
94 PW	D	-	Urinario	2007
8P	D	-	Urinario	2009
73P1	B1	-	Urinario	2009
12P	D	III	Urinario	2009
20/2	ND	ND	Hisop. rectal	2011
21P	D	III	Urinario	2009
52PW	B1	III	Urinario	2007
74P1	B1	-	Urinario	2009
49P1	B2	-	Urinario	2009
45P2	A	III	Urinario	2009
63P1	A	III	Urinario	2009
87P1	B1	-	Urinario	2009
144PW	B2	I	Urinario	2007
32P3	A	-	Urinario	2009
33P4	B2	-	Urinario	2009
36P2	B2	IV	Urinario	2009
37P1	A	IV	Urinario	2009
39P5	A	III	Urinario	2009
42P3	D	IV	Urinario	2009
58P2	B1	III	Urinario	2009
21 PW	B1	-	Urinario	2007
40 PW	B2	IV	Urinario	2007
19P	B2	-	Urinario	2009
93PW	B2	-	Urinario	2007
33P1	B2	-	Urinario	2009
81P1	A	-	Urinario	2009
67P1	A	IV	Urinario	2009
28P	B1	-	Urinario	2009
46P1	B1	-	Urinario	2009
46PW	D	IV	Urinario	2007
67PW	D	V	Urinario	2007
126PW	D	IV	Urinario	2007

S/D: sin dato; ND: no determinado

3.2 Curvas de crecimiento de las cepas bacterianas

Una vez que se contó con los aislamientos bacterianos en el laboratorio, se realizaron las curvas de crecimiento de cada una de las cepas que iban a ser utilizadas para el aislamiento viral; ATCC 700603, 19/2, Kp666 (*K. pneumoniae*) y 144 (*E. coli*), de aquí en adelante denominadas cepas hospederas o *hosts*. Esto fue necesario debido a que es importante determinar cuál es la fase exponencial de crecimiento, para maximizar las posibilidades de aislar bacteriófagos. En esta fase, las bacterias se encuentran metabólicamente activas y más uniformes en su estado fisiológico, condiciones óptimas para la infección viral. Para ello, a un matraz Erlenmeyer conteniendo 250 mL de caldo Luria-Bertani (medio LB) se le agregó 100 µL de un cultivo *overnight* (O/N) de cada una de la cepas hospederas y se incubó a 37°C, 150 rpm. Se siguió la densidad óptica a 600 nm (D.O. 600 nm) del cultivo mediante espectrofotometría, y se tomaron medidas cada 30 minutos. Además, se estimó la cantidad de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), la cual es una medida de la cantidad de bacterias viables por unidad de volumen. Dicha medida se correlaciona con la D.O. 600 nm, que permite estimar la concentración celular en un cultivo exponencial. Cuando se alcanzaron los valores de D.O. a 600 nm 0,15, 0,25 y 0,50 en la curva, se tomó 1 mL del cultivo y se sembraron diluciones en placas de Petri con TSA por el método de siembra incorporada para obtener la equivalencia de D.O. a 600 nm a UFC/mL. Para cada ensayo se realizaron 2 réplicas biológicas.

3.3 Aislamiento y purificación de bacteriófagos

Para la búsqueda de bacteriófagos se utilizaron tres muestras provenientes de dos plantas de tratamiento de agua, previo al tratamiento de dichas aguas, y otras tres muestras de agua de origen hospitalario. Las muestras hospitalarias fueron tomadas desde desagües de distintos puntos del edificio de un Hospital Universitario, y fueron cedidas por el Profesor Dr. Julio Medina (Unidad Académica de Enfermedades Infecciosas, Hospital de Clínicas). En cuanto a las muestras de planta de tratamiento, una de ellas fue obtenida de una planta de tratamiento de Salto (cedida por el Dr. Matías Victoria, Laboratorio de Virología Molecular, Centro Universitario Litoral Norte, UdelaR) y las otras dos fueron obtenidas de una planta de tratamiento de Canelones, recogidas en fechas distintas (cedidas por la Dra. Mabel Berois, Sección Virología, Facultad de Ciencias, UdelaR). Dichas muestras se centrifugaron a 5.000 g por 15 minutos para remover sedimentos y detritos, y luego los sobrenadantes se filtraron por 0,22 µm (con filtro de polietersulfona - PES).

El aislamiento de bacteriófagos se realizó utilizando la técnica de enriquecimiento, donde 500 µL del filtrado de la muestra se mezclaron con 10 mL de medio LB suplementado con 2 mM de CaCl₂ y 100 µL de un cultivo exponencial temprano (D.O. a 600 nm ≈ 0,15) de cada una de las cepas hospederas. Los enriquecimientos se incubaron a 37°C, 100 rpm por 20 horas. Posterior a la incubación, se centrifugaron a 5.000 g por 15 minutos y luego los sobrenadantes se filtraron por 0,22 µm.

A modo de confirmar la presencia de fagos en los enriquecimientos, se empleó la técnica de agar de doble capa (DLA, *Double-layer agar* por sus siglas en inglés). Brevemente, un cultivo puro en fase exponencial de cada cepa hospedera fue mezclado con diluciones de los enriquecimientos y se agregó a un pequeño volumen de una matriz de agar fundido (*top* agar o *soft* agar 0,5% (p/v)) y se dispersó de forma uniforme sobre una placa de Petri con TSA, usando una placa por dilución (63). Después de ser incubadas a 37°C por 18 horas, las placas se inspeccionaron en búsqueda de lisis bacteriana. Cada una de las distintas morfologías de placas de lisis se picaron con una punta de micropipeta y se resuspendieron en 200 µL de Buffer SM (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgSO₄, 0,01% p/v gelatina) con la ayuda de un vortex. Se repitió la técnica de DLA para cada una de las suspensiones de fagos obtenidas en el paso anterior y sus cepas hospederas. Nuevamente, se volvieron a picar placas de lisis y resuspender en Buffer SM. Este proceso de purificación fue repetido entre 3 y 5 veces, o hasta observar placas de lisis homogéneas para cada caso.

3.4 Generación de stocks virales

Los stocks virales de todos los fagos fueron generados vía propagación en medio líquido. Las propagaciones fueron centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos, filtradas por 0,22 µm y almacenadas a 4°C hasta su uso.

Para los fagos de *Klebsiella*, se inoculó 0,1 volúmenes de un cultivo O/N de la cepa hospedera en un matraz conteniendo LB y se incubó a 37°C, 150 rpm hasta alcanzar D.O. a 600 nm ≈ 0,5. En este momento se agregaron los fagos a una multiplicidad de infección (MOI, *multiplicity of infection*, por sus siglas en inglés) de 0,01 y se volvió a incubar a 37°C, 100 rpm por 6 horas o hasta constatar una disminución en la turbidez del lisado. La MOI se calculó según la fórmula:

$$MOI = \frac{\text{número de partículas virales}}{\text{número de bacterias viables}}.$$

Para los fagos de *E. coli*, se siguió el protocolo descrito en (64), con algunas modificaciones. Se inoculó 0,1 volúmenes de un cultivo O/N de la cepa hospedera en un matraz conteniendo LB suplementado con 2 mM de CaCl₂, y se incubó a 37°C, 150 rpm por 1 hora. Luego se agregaron 50 µL de un lisado de fagos de alto título (>10⁸ UFP/mL). Los matraces se incubaron a 37°C, 100 rpm por 6 horas o hasta constatar una disminución en la turbidez del lisado.

Las propagaciones fueron cuantificadas mediante la técnica de *spot test* (63). Se agregó a un pequeño volumen de *soft agar* 100 µL de un cultivo puro de cada cepa hospedera, se dispersó de forma uniforme sobre una Placa de Petri con TSA y se dejó solidificar. En paralelo, se prepararon diluciones seriadas en base diez de las propagaciones, las cuales fueron sembradas en forma de gota sobre el *top agar*. Las placas fueron incubadas a 37°C por 18 horas. Pasado este tiempo, se contaron las placas de lisis dentro de un rango contable y se calculó el título viral de la siguiente manera:

$$\text{Título viral } \left(\frac{\text{UFP}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{nº de placas contadas} \times \text{factor de dilución}}{\text{volumen sembrado}}.$$

3.5 Rango de hospedero y eficiencia de plaqueo

Se ensayó el rango de hospedero de los fagos de la colección utilizando 27 aislamientos del género *Klebsiella* (**Tabla 1**), y 34 aislamientos clínicos de *E. coli* (**Tabla 2**) (aislamientos de prueba).

Para el rango de hospedero, se utilizó la técnica de *spot test*, donde gotas de los stocks virales se colocaron sobre un césped bacteriano de cada aislamiento y se evaluó la presencia de lisis. Con el fin de confirmar si los aislamientos de prueba que presentaban lisis por *spot test* eran realmente permisivos a la infección por fagos, se sembraron diluciones de los stocks virales en búsqueda de placas de lisis individuales (confirmación de una infección productiva) (65). Los casos donde se observó lisis o transparencia en el *spot test* inicial para un fago, pero no se visualizaron placas aisladas en ninguna dilución, no se consideraron como casos de infección productiva.

A partir de las diluciones sembradas descritas anteriormente, se calcularon los títulos virales en los aislamientos de prueba y fueron comparados con los títulos virales en los *hosts*, y se calculó la eficiencia de plaqueo (EOP, *efficiency of plating* por sus siglas en inglés) para cada fago de la siguiente manera: $EOP = \frac{\text{título fago en aislamientos de prueba}}{\text{título fago en host}}$. Para cada ensayo se realizaron 2 réplicas independientes.

3.6 Ensayos de estabilidad

3.6.1 Estabilidad térmica

Alicuotas de los stocks virales fueron incubados a 4°C (temperatura de almacenamiento), 25°C, 37°C, 42°C y 60°C por el período de 1 hora. La elección de estos valores se basó en temperaturas que podrían ser encontradas en diferentes condiciones, y se estudió un rango relativamente amplio con el objetivo de caracterizar la robustez de los fagos frente a altas temperaturas. Al finalizar la incubación, se realizaron diluciones en buffer SM de las distintas condiciones, y se tituló por *spot test* en la cepa hospedera correspondiente. Para este ensayo, se realizaron 3 réplicas independientes, cada una de ellas con 3 réplicas técnicas. Se analizó la normalidad de los datos obtenidos con el test de Shapiro-Wilk y se realizó el test estadístico de Kruskal-Wallis con un test *post hoc* de múltiples comparaciones de Dunn. Un *p* valor menor o igual a 0.05 fue considerado como estadísticamente significativo. Para los análisis de datos se utilizó el programa Graphpad Prism v10.4.2 (66).

3.6.2 Estabilidad frente a distintos pH

Alicuotas de los stocks virales fueron llevados a pH 5, 7, 9 y 11 e incubados a 37°C por el período de 1 hora. Estos valores de pH se eligieron para abarcar un amplio rango desde niveles de pH ácidos hasta básicos que pueden encontrarse en distintos compartimentos corporales. Con esto en mente, se eligió realizar la incubación a temperatura corporal. Los pH se ajustaron utilizando una solución de ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH) y se midieron con tiras de pH (pH-indicator strips pH 0 - 14, Sigma-Aldrich). Inmediatamente pasado el tiempo, se realizaron diluciones en buffer SM de las distintas condiciones, y se tituló por *spot test* en la cepa hospedera correspondiente. Para este ensayo, se realizaron 3 réplicas independientes, cada una de ellas con 3 réplicas técnicas. Se analizó la normalidad de los datos obtenidos con el test de Shapiro-Wilk y se realizó el test estadístico de Kruskal-Wallis con un test *post hoc* de múltiples comparaciones de Dunn. Un *p* valor menor a 0.05 fue considerado como estadísticamente significativo. Para los análisis de datos se utilizó el programa Graphpad Prism v10.4.2 (66).

3.7 Curvas de infección viral

Las curvas de infección se realizaron en una placa de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos. Cada una de las cepas bacterianas fue crecida a 37°C, 150 rpm en LB a partir de una sola colonia y se monitoreó la D.O. a 600 nm hasta alcanzar 0,15. En ese momento, 80 µL del cultivo se sembraron en la placa, y se le agregaron 20 µL de una dilución del stock viral (o del *cocktail* de fagos), a diferentes MOI (0,1 y 1 para *Klebsiella* spp.; y 0.1, 1 y 10 para *E. coli*). Pocillos sin el agregado de fago se utilizaron como control de crecimiento bacteriano, mientras que pocillos con medio LB se usaron como control negativo. La D.O. a 600 nm se midió por 10 horas en intervalos de 5 minutos, y con agitación previo a cada medida utilizando un lector de placas (Varioskan LUX Multimode Microplate Reader, Thermo Fisher Scientific) con incubadora a 37°C. Con el fin de evaluar la eficacia de cada fago, se calculó el Índice de Centroide de todas las curvas según la fórmula: $C_i = 1 - \frac{\overline{x_i y_i}}{\overline{x_{ctrl} y_{ctrl}}}$; siendo $\overline{x_i y_i}$ las coordenadas del centroide de la curva tratamiento y $\overline{x_{ctrl} y_{ctrl}}$ las coordenadas de la curva control (67). Para este ensayo, se realizaron 2 réplicas biológicas, cada una de ellas con 3 réplicas técnicas.

3.8 Microscopía electrónica de transmisión

Los lisados de fagos se ultrafiltraron por centrifugación a 20°C, 4.000g por 30 minutos, utilizando los filtros Amicon Ultra-15, 100 kDa (Millipore). Luego de la centrifugación, los fagos retenidos en la membrana se resuspendieron en agua ultrapura Milli-Q en un volumen final idéntico al de partida. Una gota de cada muestra se colocó sobre una grilla de cobre con film de carbono (previamente tratada con UV por 3 minutos para modificar la hidrofiliidad del film) y se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos. Pasado ese tiempo, las grillas se drenaron con ayuda de un papel de filtro y se realizaron dos rondas de tratamiento con acetato de uranilo por 30 segundos, drenando las grillas entre cada ronda.

Los preparados se observaron con el microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HR-TEM) Jeol Jem-2100 de 200 kV de voltaje de aceleración, con asistencia técnica del Lic. Álvaro Olivera (Laboratorio de Alta Resolución, Centro Universitario Regional del Este en la sede Rocha). Las imágenes se capturaron con la cámara Gatan Orius 1000. El análisis de las imágenes se realizó con el programa Fiji v2.16.0 (68).

3.9 Ensayo de erradicación de biofilms

La capacidad de los fagos para erradicar biofilms se evaluó en un ensayo en condiciones estáticas, según descrito en (69), con algunas modificaciones. Brevemente, las cepas bacterianas se crecieron en LB a 37°C, 180 rpm por 24 horas. Pasado ese tiempo, se sembraron placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos con una dilución al décimo en LB de los cultivos O/N y se incubaron a 37°C por 24 horas. Luego del tiempo de incubación, se retiraron las bacterias planctónicas y las placas se lavaron 3 veces con buffer fosfato salino (PBS, *Phosphate Buffered Saline* por sus siglas en inglés). Se agregaron los stocks de fagos (10^6 UFP/pocillo para *Klebsiella* spp; y 10^6 o 10^8 UFP/pocillo para *E. coli*) y las placas se incubaron a 37°C por 20 horas. Pocillos sin el agregado de fago se utilizaron como control de formación de *biofilm*, mientras que pocillos sin el agregado de la suspensión bacteriana fueron utilizados como control negativo. Las placas se lavaron nuevamente tres veces con PBS y se tiñeron con cristal violeta 0,1% a temperatura ambiente por 15 minutos. Se repitieron los lavados con PBS y luego el cristal violeta fue solubilizado con etanol 95% e incubado por 2 minutos en agitación. Las D.O. se midieron a $\lambda = 590$ nm utilizando un lector de placas (Varioskan LUX Multimode Microplate Reader, Thermo Fisher Scientific). Se normalizaron los valores de D.O. promedio de cada tratamiento restando el promedio del control negativo. La biomasa del biofilm (%) se calculó en cada caso según la ecuación
$$biomasa\ biofilm\ (\%) = \left(\frac{A_{590\ nm}\ biofilm\ tratado}{A_{590\ nm}\ biofilm\ control} \right) \times 100 \quad (70).$$
 Para este ensayo, se realizaron 3 réplicas independientes, cada una de ellas con 3 réplicas técnicas. Se analizó la normalidad de los datos obtenidos con el test de Shapiro-Wilk y se realizó el test estadístico t-test no pareado, o ANOVA de una vía según correspondiera, con un test *post hoc* de múltiples comparaciones de Dunnett. Un *p* valor menor a 0.05 fue considerado como estadísticamente significativo. Para los análisis de datos se utilizó el programa Graphpad Prism v10.4.2 (66).

3.10 Caracterización genómica

3.10.1 Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ácidos nucleicos de los fagos seleccionados se realizó mediante el kit comercial Phage DNA Isolation kit (Norgen Biotek) siguiendo el protocolo provisto por el fabricante. Previo a la extracción se le hizo un tratamiento con 20 U de Turbo DNasa (Invitrogen) durante 1 hora a 37°C

para remover ADN del hospedero. La DNasa se inactivó a 75° C por 10 minutos previo al agregado del *buffer* de lisis. Además, se añadieron 80 µg de Proteinasa K (Quick-RNA™ Miniprep Plus Kit, Zymo Research) y se incubó a 55°C durante 30 minutos para aumentar el rendimiento de la extracción. La concentración del material extraído fue confirmada mediante fluorometría, utilizando el equipo Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen), y el kit comercial Qubit™ dsDNA Quantification Assay Kit (Invitrogen). La integridad de los ácidos nucleicos se visualizó por electroforesis en geles de agarosa al 0,7% (p/v) empleando como colorante fluorescente SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) y el marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). El material genético fue almacenado a -80°C hasta su uso.

3.10.2 Secuenciación masiva por Oxford Nanopore

Al desconocer el tamaño genético de cada fago, se tomó la decisión de fragmentar los ADNs virales previo a la secuenciación con el fin de obtener una cobertura similar para todos ellos. 3 µg de ADN de cada fago fueron fragmentados a 8 kb usando un dispositivo g (g-tube, Covaris) y centrifugando a 7200 rpm por 1 minuto en una centrífuga 5424R (Eppendorf). La calidad de la fragmentación se visualizó a través de electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v), utilizando SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) como colorante, y el marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). La preparación de librerías se realizó con el kit Rapid sequencing gDNA - barcoding (SQK-RBK110.96) (Oxford Nanopore Technologies), usando 150 ng del material genético fragmentado de cada fago. Por último, las lecturas de las secuencias se obtuvieron con el equipo GridION (Oxford Nanopore Technologies) con la celda de flujo FLO-MIN106 (Spot-ON Flow Cell, R9 Version, Oxford Nanopore Technologies). Para la preparación de librerías y secuenciación se contó con la asistencia técnica de la MSc. Paula Perbolianachis (Laboratorio de Evolución Experimental de Virus, Institut Pasteur de Montevideo).

Una vez obtenidas las lecturas de la secuenciación, las mismas fueron filtradas usando Fitlong v0.2.1 (71), dejando fuera aquellas con un valor de calidad menor a $Q = 7$. Las lecturas filtradas fueron ensambladas *de novo* con la herramienta Flye v2.9 (72) y dicho ensamblaje fue pulido usando Medaka v1.7.3 (73). La calidad de los *contigs* obtenidos se evaluó mediante Quast v5.2.0 (74). Los ensamblajes de los genomas virales fueron realizados por la Dra. Daniela Megrian (Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur de Montevideo) y el Bach. Sebastián Rey (Laboratorio de Virología Molecular, Universidad de la República).

Todos los fagos fueron anotados con Pharokka v1.2.0 (75). Concretamente, las secuencias codificantes (CDS, *Coding DNA sequences* por sus siglas en inglés) se predijeron con PHANOTATE (76), los ARNt se predijeron con tRNAscan-SE 2.0 (77), los ARNtm se predijeron con Aragorn (78) y los CRISPRs se predijeron con CRT (79). La anotación funcional se generó comparando cada CDS a las bases de datos PHROG (80), VFDB (81) y CARD (82) usando MMseqs2 (83) y PyHMMER (84). Los contigs fueron emparejados con su coincidencia más cercana en la base de datos INPHARED (85) usando mash (86). Los diagramas fueron creados con pyCirclize (87). Las predicciones de Pharokka fueron mejoradas utilizando Phold (88). La calidad y la completitud de los genomas se evaluó con CheckV (89). Por último, la taxonomía de los bacteriófagos se asignó usando taxMyPhage (90). Todas estas herramientas se utilizaron con la asistencia técnica del Bach. Sebastián Rey (Laboratorio de Virología Molecular, Universidad de la República).

4. Resultados y Discusión

4.1 Aislamiento de bacteriófagos a partir de muestras de agua de plantas de tratamiento de nuestro país

Este proyecto dio inicio a la línea de investigación en bacteriófagos en nuestro laboratorio, por lo que se debió comenzar con el aislamiento viral, ya que no se contaba con fagos disponibles. Para este propósito, se obtuvieron muestras de dos plantas de tratamiento de aguas de nuestro país, y de efluentes hospitalarios del Hospital Universitario de Uruguay.

Además, para el aislamiento de bacteriófagos mediante enriquecimiento, fue necesario contar con cepas bacterianas que pudieran emplearse como cepas hospederas o *host*, que permitieran la amplificación de los fagos presentes en las muestras para luego facilitar su detección. En base a las cepas disponibles en el laboratorio al momento de comenzar con el aislamiento, se seleccionó un set de bacterias de *K. pneumoniae* y *E. coli* según distintos criterios. Se priorizó la utilización de cepas uropatógenas clínicas (Kp666, *K. pneumoniae* y 144, *E. coli*) y una cepa de referencia (ATCC 700603, *K. pneumoniae*). Además, se empleó otra cepa, la 19/2 (herida quirúrgica, *K. pneumoniae*) de otro secuenciotipo y tipo capsular con la idea de comenzar a generar una colección de fagos de mayor diversidad.

Previo al enriquecimiento, se realizaron las curvas de crecimiento de todas las cepas hospederas, como mencionado en el apartado anterior. La caracterización de los *host* resulta importante ya que cada vez hay más evidencia de que la replicación viral, al igual que el tamaño de progenie, se ve favorecido cuando las bacterias tienen una tasa de crecimiento alta (fase de crecimiento exponencial), aunque también existen fagos que tienen la capacidad de infectar células en fase estacionaria (91). A partir de las curvas de crecimiento, se decidió utilizar los cultivos de los *host* a D.O. 600 nm de 0,15-0,20 (**Apéndice 1**).

Como resultado de los distintos enriquecimientos y posteriores pasos de purificación, se lograron aislar 13 fagos que infectan *K. pneumoniae* (denominados KPs de aquí en adelante) y 4 fagos que infectan *E. coli* (denominados EPs de aquí en adelante). Todos los fagos fueron recuperados de las muestras de las plantas de tratamiento, y ninguno de las muestras de efluentes hospitalarios. Esto puede deberse, al menos en parte, a que algunas muestras que fueron cedidas por el personal del

hospital no tenían gran biomasa, e incluso una de ellas parecía provenir de un lugar donde las aguas ya estaban descontaminadas.

Entre todos los fagos aislados, se distinguieron claramente 5 morfologías distintas de placas de lisis en *soft agar* 0,5% (p/v), luego de 20 horas de incubación a 37°C (**Figura 9, Tabla 3**). La morfología más común fue una placa de lisis muy pequeña, puntiforme y sin halo (**Figura 9, panel a**). Las otras 4 morfologías fueron placas de lisis con halo y un centro claro (**Figura 9, panel b, d, e**), e incluso con doble halo (**Figura 9, panel c**).

Tabla 3: Descripción de las morfologías de placas de lisis de los fagos aislados. Para todos los fagos se detalla la cepa *host* y la descripción de cada placa de lisis.

Morfología	Descripción	Fago/s	Cepa <i>host</i>
a)	Placa de 1-2 mm de diámetro, redonda	KP1, KP2, KP3, KP4, KP9	ATCC 700603
		KP11 y KP12	19/2
		KP13	Kp666
b)	Placa de 2-3 mm de diámetro, de bordes irregulares, con un fino halo alrededor de un centro claro	KP5 y KP7	ATCC 700603
c)	Placa de 4-5 mm de diámetro, redonda, con doble halo alrededor de un centro claro	KP6 y KP8	ATCC 700603
d)	Placa de 4-5 mm de diámetro, redonda, con fino halo alrededor de un centro claro	KP10	ATCC 700603
e)	Placa de 1,5-2,5 mm de diámetro, de bordes irregulares, con un halo alrededor de un pequeño centro claro	EP1, EP5, EP7 y EP9	144

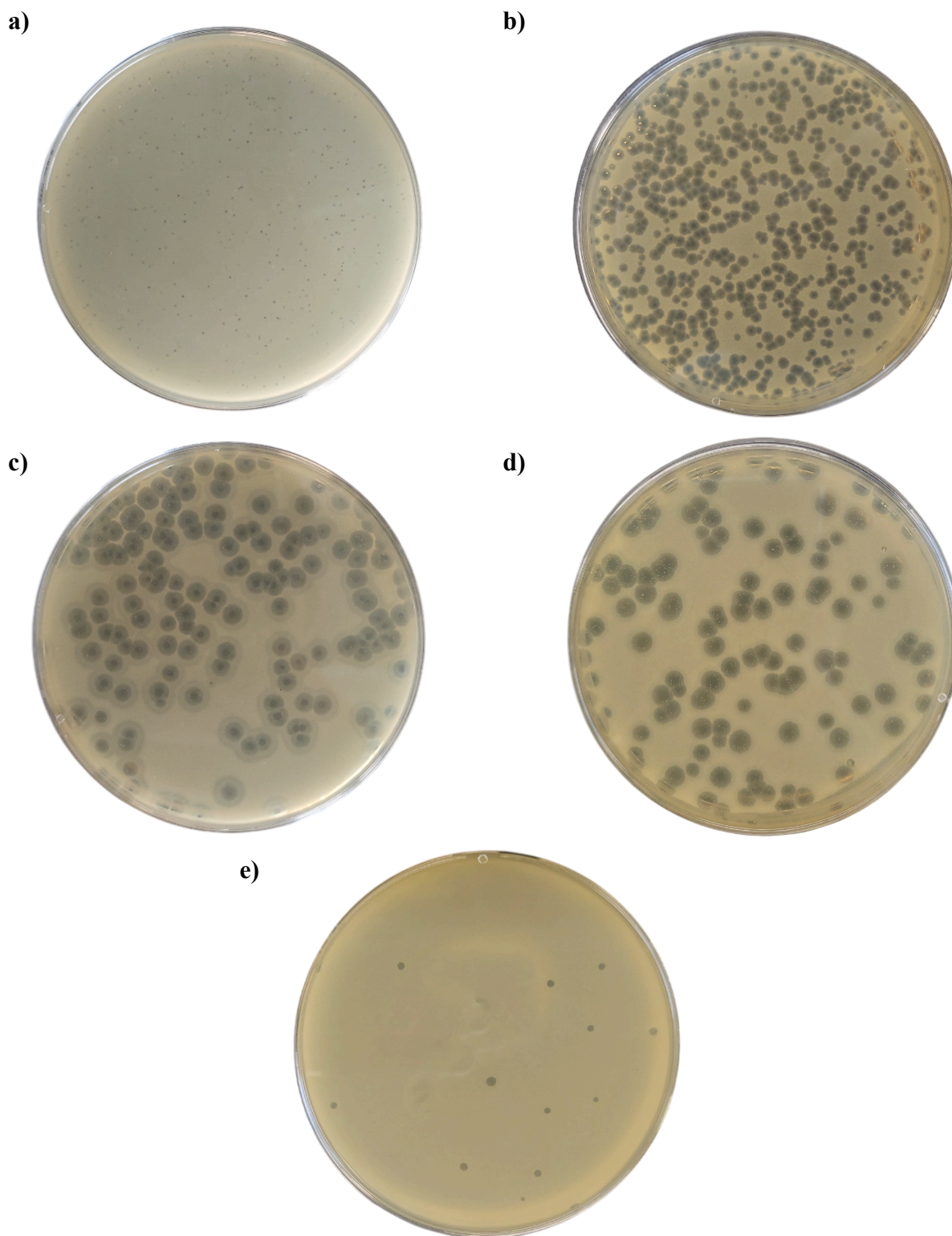


Figura 9: Morfologías de placas de lisis de los fagos aislados. Para los 13 fagos aislados, se identificaron 5 morfologías de placas de lisis diferentes luego de 20 horas de incubación a 37°C en *soft* agar 0,5% (p/v): a) pequeñas, redondas, sin halo; b) medianas, de bordes irregulares y halo con un centro claro; c) grandes, redondas, con doble halo y un centro claro; d) grandes, redondas, con halo y un centro claro; e) medianas, de bordes irregulares, con halo y un centro claro. Las morfologías a) a d) corresponden a fagos KPs en la cepa *K. pneumoniae* ATCC 700603, y la morfología e) corresponde a un fago EP en la cepa *E. coli* 144

Se encuentra reportado en la bibliografía que la presencia de halos en las placas de lisis son sugestivos de la expresión de depolimerasas (Dpos) (92–94). Las depolimerasas son enzimas que clivan los enlaces glicosídicos de los polisacáridos, incluyendo lipopolisacáridos (LPS) y polisacáridos capsulares (CPS), que son antígenos bacterianos de superficie (95,96). Éstas pueden encontrarse asociadas al virión, ya sea formando parte de la partícula viral o en forma soluble (97). El LPS es uno de los componentes principales de las membranas de las bacterias Gram-negativas, y los CPS forman la cápsula, uno de los principales factores de virulencia de muchos patógenos oportunistas como *K. pneumoniae* (95,96). Las Dpos pueden también clivar los polisacáridos que componen la matriz de los biofilms, lo que facilita las primeras etapas de la infección viral (96). Es por esta razón que los fagos que presentan placas de lisis con halo resultan interesantes para caracterizar su capacidad antibiofilm. Sobre todo, KP6, KP8 y KP10, cuyos halos incrementaron de forma notoria en tamaño a medida que se aumentó el tiempo de incubación, fenotipo característico de la presencia de este tipo de enzimas (92–94). No se descarta que los otros fagos con halo puedan contar también con estas enzimas, pero el comportamiento de difusión de las Dpos no fue tan notorio para los restantes.

Para todos los fagos se generaron stocks en medio líquido utilizando las cepas hospederas correspondientes, generando así una colección de 17 bacteriófagos. Se aseguró un alto título viral ($>10^9$ UFP/mL) para cada fago, y suficiente volumen para realizar todos los ensayos. Para los casos que fue necesario, se produjo una segunda generación a partir del stock original.

4.2 Rango de hospedero y eficiencia de plaqueo (EOP) de los fagos aislados

El primer paso en la caracterización de los fagos fue determinar su rango de hospedero. Para eso, se estudió la capacidad de los fagos aislados de lisar un panel de 27 aislamientos del género *Klebsiella* para los KPs, entre los cuales se incluyeron aislamientos uruguayos y algunos otros provenientes del Reino Unido; y 34 aislamientos uruguayos de *E. coli* para los EPs.

A las combinaciones de fago-bacteria para las que se observó lisis en el *spot assay* inicial del rango de hospedero, se las sometió al ensayo de eficiencia de plaqueo (EOP), donde se colocaron varias diluciones seriadas de los stocks virales sobre el césped bacteriano. Este ensayo permite confirmar las cepas que son infectadas por los fagos, debido a que en ocasiones, algunos fagos tienen la capacidad de lisar bacterias sin haber pasado por un ciclo de infección productivo. Esta “lisis indeterminada” puede ser causada por factores como una infección abortiva, o una lisis desde afuera

de la célula. Con el ensayo de EOP se puede diferenciar fácilmente entre lisis y lisis indeterminada, ya que para este último caso, se observa transparencia (o ligera turbidez) sobre el césped bacteriano cuando se siembra el stock viral sin diluir, pero a medida que se realizan diluciones, no se logran visualizar placas aisladas (65,98). Además de confirmar el rango de hospedero, el cálculo de EOP es una medida de qué tan bien infectan o se replican los fagos en una cepa de interés, en comparación con la cepa *host*. A efectos de comparar a los distintos fagos, se utilizaron las siguientes categorías ya descritas en la bibliografía: $EOP > 0,1$ para un fago altamente virulento; $0,001 < EOP < 0,1$ fago moderadamente virulento; $EOP < 0,001$ fago no virulento, pero activo (99).

Para determinar el rango de hospedero de los 13 fagos KPs, se evaluaron 351 combinaciones fago-bacteria (338 si se excluyen las combinaciones con las cepas hospederas, a fin de evitar sobrestimar el rango de infección de cada fago). De todas estas parejas, solamente 34 resultaron positivas y reproducibles, por lo que, en promedio los fagos son capaces de infectar al 10% del panel de bacterias (**Tabla 4**). En cuanto a las bacterias uropatógenas de la colección, los fagos KPs son capaces de lisar a aproximadamente un tercio de los aislamientos ensayados. A pesar de que cada fago, en promedio, puede lisar 1 de cada 10 bacterias de la colección, más de la mitad de las bacterias ensayadas son susceptibles a al menos 1 fago de la colección. Esta buena cobertura podría atribuirse en alguna medida, al número de fagos utilizados, los cuales fueron aislados empleando tres cepas hospedoras distintas. Probablemente esto le confirió una mayor diversidad a la colección en comparación con fagos aislados a partir de una única cepa bacteriana.

El fenómeno de rango estrecho de hospedero por parte de los fagos de *Klebsiella* mencionado anteriormente se encuentra ampliamente reportado (95,96,100). Dada la abundancia y la protrusión al espacio extracelular, con alta probabilidad la primera estructura bacteriana que interactúa con los fagos es el CPS, compuesto por unidades repetidas de oligosacáridos que forman el antígeno K, y que define el tipo capsular (96). La composición del CPS varía según las distintas cepas de *K. pneumoniae*, y se encuentra determinado por el K locus (KL). A la fecha existen más de 180 tipos de KL reportados (95). Dada esta gran variabilidad, se propone que el tipo capsular es el principal determinante del tropismo viral, y restringe el rango de hospedero de la mayoría de los fagos que infectan *K. pneumoniae* (95,100). Es por esta razón que la infectividad de un determinado fago suele encontrarse limitada a unas pocas cepas (96). Para ensayar esta hipótesis, se determinaron los K locus de todas las cepas utilizadas en el ensayo de rango de hospedero y, cuando fue posible, se identificó el antígeno K asociado a cada KL. En muchos casos, aún no se encuentra determinado el antígeno K correspondiente al K locus detectado, y en otros, el predictor clasificó a las cepas como acapsulares debido a la presencia de proteínas truncadas en el locus capsular (**Tabla 1**).

En este trabajo, se observó que los fagos fueron capaces de infectar únicamente cepas que presentaban determinados K locus, pero no la totalidad de los ensayados. En efecto, ninguno de los 13 fagos aislados fue capaz de infectar productivamente bacterias con los locus capsulares KL28, 102, 105, 107, 110, 122, 127 y 136 (**Tabla 4**). Además, algunos KL estuvieron representados por más de una cepa en la colección (KL36, 64, 106 y 124), y en esos casos, si una cepa con determinado KL era susceptible a la infección por algún fago, todas las cepas que compartían ese mismo KL también resultaron susceptibles a algún fago de la colección, lo cual refuerza la hipótesis de que el tipo capsular sería un determinante del tropismo viral. En un estudio reciente, se evaluó la habilidad de un panel de fagos de *K. pneumoniae* para infectar aislamientos bacterianos correspondientes a 59 tipos de K locus distintos. Como resultado del estudio, se obtuvo que si un fago era capaz de infectar una cepa, había 92% de probabilidad que pudiera infectar a otras cepas con el mismo KL (95). Sin embargo, en el presente trabajo se observó de forma frecuente, que no todos los fagos capaces de infectar a una cepa con un determinado KL consiguieron infectar a otras cepas con ese mismo KL. También es de notar que la totalidad de las cepas predichas como acapsulares resultaron susceptibles a algún fago (**Tabla 4**), sin embargo, con excepción de las cepas Kp1111 y F327C que fueron infectadas productivamente por 4 de los 13 fagos de la colección, las restantes no mostraron ser altamente susceptibles.

Estas dos observaciones podrían ser explicadas porque existen otras moléculas que podrían actuar como receptores, y por ende influir en el tropismo viral (96,101). Un ejemplo de ello, es el LPS, compuesto en parte por el antígeno O que también presenta variabilidad, aunque en menor medida que el antígeno K (96). Es de notar que tampoco se logró encontrar una asociación entre el rango de hospedero de los fagos de la colección y el antígeno O (**Tabla 1 y Tabla 4**). Además de estos dos antígenos, existe una variedad de proteínas de superficie que actúan como receptores para la infección viral (96,101). Asimismo, la presencia de receptores adecuados no garantiza una infección productiva, ya que varias bacterias codifican para sistemas de defensa que también determinan las cepas que pueden (o no) ser infectadas por determinados fagos. Algunos de estos mecanismos son los sistemas de restricción-modificación, mecanismos de infección abortiva, sistemas CRISPR-Cas (96,102), y se estima que en promedio, cada genoma de *K. pneumoniae* codifica para seis sistemas anti-fagos que frecuentemente son no redundantes (96). Otro factor limitante del tropismo de los fagos es la inmunidad a la superinfección, donde profagos presentes en el genoma bacteriano inhiben la coinfección de su célula hospedera por parte de fagos similares (103). De forma interesante, algunos de los fagos aislados en *K. pneumoniae* fueron capaces de infectar una cepa de *K. oxytoca* (164413U/2) (**Tabla 4**), bacteria que comparte el mismo género, pero no la misma especie.

Al examinar los fagos de manera individual, se observan distintos comportamientos en cuanto al rango. Por ejemplo, los fagos KP9 y KP12 presentaron el rango de hospedero más amplio, infectando cada uno a 6/26 cepas ensayadas (nuevamente excluyendo la cepa hospedera). Esto significa que dichos fagos son capaces de lisar al 23% de la colección, el doble que el promedio de los KPs. Además de lisar el mayor número de cepas, estos fagos (junto con KP4) comparten también que son capaces de lisar el mayor número de cepas con KL diferentes. Por otro lado, los fagos KP5, KP6, KP7, KP8 y KP10 fueron los que presentaron el rango de hospedero más estrecho, infectando solamente a 1 o ninguna cepa con excepción de su *host*. Estos fagos tienen en común que todos ellos presentan una morfología de placa de lisis con halo (**Tabla 3**). En particular, KP6, KP8 y KP10, sospechosos de contar con depolimerasas, podrían tener un rango estrecho de hospedero, al menos en parte, debido a la presencia de estas enzimas, específicas del tipo capsular (104,105). Cabe aclarar que las parejas de fagos KP5-KP6, y KP7-KP8 fueron aisladas de la misma planta de tratamiento de agua, pero en muestras tomadas con una semana de diferencia. Esto combinado con el hecho de que comparten las mismas morfologías de placa tan particulares (**Tabla 3**), hace que surja el cuestionamiento de si KP5 es el mismo fago que KP7, y KP6 el mismo fago que KP8. *A priori*, como no se pudo establecer una diferencia mediante el rango de hospedero, se consideró que se trataba de 4 fagos distintos. Para zanjar esta duda, sería necesario una confirmación mediante secuenciación u otros ensayos, como la digestión de los genomas con enzimas de restricción.

En cuanto a los resultados de EOP de los fagos KPs, aproximadamente dos tercios de estas 34 combinaciones positivas mencionadas anteriormente presentaron un valor de EOP > 0,1. Esto indica que una gran parte de las infecciones causadas por los fagos son capaces de generar un buen título viral (en comparación a la producción en el *host*), y que todos esos fagos podrían catalogarse como altamente virulentos para dichos aislamientos de prueba, según la clasificación adoptada en este trabajo.

Tabla 4: Rango de hospedero de los fagos KPs. Para cada fago, se ensayó su capacidad de lisar un panel de 27 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* (164413U/2). En blanco y tonalidades de verde y amarillo se marca la lisis según el valor de EOP, en gris lisis indeterminada (infección abortiva o lisis desde afuera, sin infección productiva) y en gris oscuro ausencia de lisis. h: cepa hospedera o *host*.

Aislamiento	K locus	Tipo capsular predicho	Origen	Bacteriófagos KPs												
				KP1	KP2	KP3	KP4	KP5	KP6	KP7	KP8	KP9	KP10	KP11	KP12	KP13
ATCC 700603	KL53	K53	Urinario	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h			
L0240	KL21	K21	Hemocultivo											+		
164125A	KL22	K22	S/D													
164413U/2	KL68	K68	S/D													
19/2	KL36	K36	Herida quirúrgica											h	h	
54/2	KL36	Acapsular	Herida quirúrgica													
Kp1111	KL124	Acapsular	Catéter urinario		+	+	+									
Kp1102	KL124	Desconocido	Secr. respiratoria													
Kp666	KL106	Desconocido	Urocultivo													h
KpPRE	KL106	Acapsular	Aspirado traqueal													
KpPOST	KL106	Desconocido	Aspirado traqueal													
F312C	KL64	Acapsular	S/D													
F327C	KL64	Acapsular	S/D													
FQ38879	KL64	Acapsular	S/D													
FQ40565	KL64	K64	S/D													
F322	KL28	K28	Secr. respiratoria													
04Kp21	KL102	Desconocido	Hueso													
04Kp27	KL102	Desconocido	S/D													
F305	KL105	Desconocido	Urocultivo													
M1366	KL107	Desconocido	Urinario													
Kp1124	KL107	Desconocido	Urocultivo													
F312B	KL110	Desconocido	S/D													
F327B	KL110	Desconocido	S/D													
F330	KL110	Desconocido	Catéter													
F320	KL122	Desconocido	Urocultivo													
M1443	KL127	Desconocido	Urocultivo													
04Kp29	KL136	Desconocido	S/D													

+ EOP > 1 EOP = 1 EOP > 0,1 0,1 > EOP > 0,001 EOP < 0,001 Sin lisis

Para el caso de los EPs, se ensayaron 136 combinaciones (132 excluyendo las combinaciones con las cepas *host*). De todas estas parejas, 25 resultaron positivas y reproducibles, por lo que en promedio los EPs son capaces de infectar al 19% del panel de bacterias (**Tabla 5**), la amplia mayoría siendo de origen urinario. Este porcentaje es superior al observado para los fagos KPs y, además, los EPs presentan rangos de hospedero notablemente similares tanto en cantidad de cepas como en las cepas específicas que logran lisar. No obstante, al considerar la cobertura total, es decir, el número de cepas únicas lisadas por al menos un fago, se observa una cobertura menor en comparación con la obtenida para los fagos de *Klebsiella*. En concreto, solo un tercio de las cepas de *E. coli* analizadas resultaron susceptibles a algún fago de esta colección. Esta baja cobertura, en relación con los KPs, podría atribuirse a la superposición en los rangos de hospedero entre los diferentes EPs, así como a la diferencia en el tamaño de las colecciones de fagos utilizadas. Cabe destacar además, que los fagos EPs fueron aislados utilizando una única cepa hospedera, a diferencia de lo que ocurrió con los fagos KPs, lo cual podría haber impactado en el rango de hospedero obtenido.

Más allá del número de cepas infectadas por los fagos, es de notar que con la colección de fagos de EPs se logra lisar a ejemplares de todos los grupos filogenéticos presentes en la colección bacteriana (A, B1, B2 y D). La mayoría de las cepas susceptibles correspondieron a los filogrupos B1 y D, los cuales comparten un tipo mayoritario del núcleo de LPS (al menos en cepas de referencia como *E. coli* K-12) (106). Este aspecto podría contribuir, al menos en parte, a explicar los resultados obtenidos, dado que el LPS y en particular el antígeno O, puede actuar como receptor primario para estos fagos (102). Por otra parte, las únicas tres cepas lisadas por todos los fagos (exceptuando la cepa *host*) pertenecen al filogrupo D. Sin embargo, no todas las cepas de este grupo fueron susceptibles, lo que sugiere que podrían intervenir otros mecanismos de selección, ya sea a nivel de receptores de superficie o de los sistemas de defensa bacterianos (102), tal como se discutió previamente en el caso de los fagos de *Klebsiella*.

Tabla 5: Rango de hospedero de los fagos EPs. Para cada fago, se ensayó su capacidad de lisar un panel de aislamientos clínicos de 33 *E. coli* (excluyendo a la cepa hospedera). En blanco y tonalidades de verde y amarillo se marca la lisis según el valor de EOP, en gris lisis indeterminada (infección abortiva o lisis desde afuera, sin infección productiva) y en gris oscuro ausencia de lisis. h: cepa hospedera o *host*

Aislamiento	Grupo filogenético	Muestra / Origen	Bacteriófagos EPs			
			EP1	EP5	EP7	EP9
144	B1	Urinario	h	h	h	h
50 PW	A	Urinario				
94 PW	D	Urinario				
8P	D	Urinario				
73P1	B1	Urinario				
12P	D	Urinario				
20/2	ND	Hisop. rectal				
21P	D	Urinario				
52PW	B1	Urinario				
74P1	B1	Urinario				
49P1	B2	Urinario				
45P2	A	Urinario				
63P1	A	Urinario				
87P1	B1	Urinario				
144PW	B2	Urinario				
32P3	A	Urinario				
33P4	B2	Urinario				
36P2	B2	Urinario				
37P1	A	Urinario				
39P5	A	Urinario				
42P3	D	Urinario				
58P2	B1	Urinario				
21 PW	B1	Urinario				
40 PW	B2	Urinario				
19P	B2	Urinario				
93PW	B2	Urinario				
33P1	B2	Urinario				
81P1	A	Urinario				
67P1	A	Urinario				
28P	B1	Urinario				
46P1	B1	Urinario				
46PW	D	Urinario				
67PW	D	Urinario				
126PW	D	Urinario				

EOP = 1
 EOP > 0,1
 0,1 > EOP > 0,001
 EOP < 0,001
 Lisis indeterminada
 Sin lisis

Con relación a los valores de EOP, para el caso de los fagos EPs, menos de la mitad de las combinaciones positivas estudiadas obtuvieron un valor de $EOP > 0,1$. Esto sugiere que los fagos de *E. coli* de la colección tienen un rango más amplio de hospedero que los fagos de *Klebsiella*, aunque su eficiencia para replicarse en dichas cepas sería menor.

A partir de la caracterización del rango de hospedero, se eligió un set de fagos para seguir caracterizando en profundidad (3 KP y 1 EP). Se seleccionaron los fagos KP4, KP9 y KP13 de *Klebsiella* porque con la suma de los tres, se logra infectar a todas las cepas uropatógenas que fueron lisadas con los fagos de la colección. Además, si bien no existe un consenso sobre la definición de rango amplio de hospedero (107), con estos fagos se cubre aproximadamente el 40% de las cepas ensayadas, porcentaje que se consideró apropiado. Entre los 3 fagos se logra cubrir también una gran variedad de secuenciotipos y tipos capsulares; y aunque la caracterización de los mismos se realizará por separado, estos fagos se consideró que podrían ser prometedores a la hora de pensar en formular un cóctel de bacteriófagos con capacidad de lisar un gran número de aislamientos clínicos relevantes de diversos orígenes. También se seleccionó EP1, por ser el fago de *E. coli* con rango más amplio y presentar los valores de EOP más altos.

4.3 Estabilidad térmica y a diferentes pH de los fagos seleccionados

Para estudiar el efecto de la temperatura sobre el título viral de KP4, KP9, KP13 y EP1, se incubaron los fagos durante 1 hora en un rango de temperaturas que varió desde 4°C hasta los 60°C. Se eligió un intervalo amplio, desde la temperatura de almacenamiento (4°C), temperatura ambiente (25°C), temperatura corporal humana (37°C) hasta temperaturas más elevadas para estudiar la robustez de los fagos frente a condiciones de estrés térmico (42°C) y temperaturas ambientales más extremas (60°C).

Como resultado del ensayo, se constató que todos los fagos son estables en un rango de 4°C-42°C, sin presentar disminución en el título viral luego del tratamiento (**Figura 10**). A 60°C, los fagos KP4 y EP1 son estables y no pierden título, o al menos no se constataron diferencias significativas con la cantidad de réplicas biológicas y el test estadístico utilizado (**Figura 10, paneles a y d**). Sin embargo, para los fagos KP9 y KP13 sí se constató una disminución en el título, de aproximadamente 6 órdenes de magnitud para KP9 (**Figura 10, panel b**), y para KP13 se observó un efecto aún más drástico, no pudiendo contar placas de lisis en la titulación posterior a la incubación (**Figura 10, panel c**).

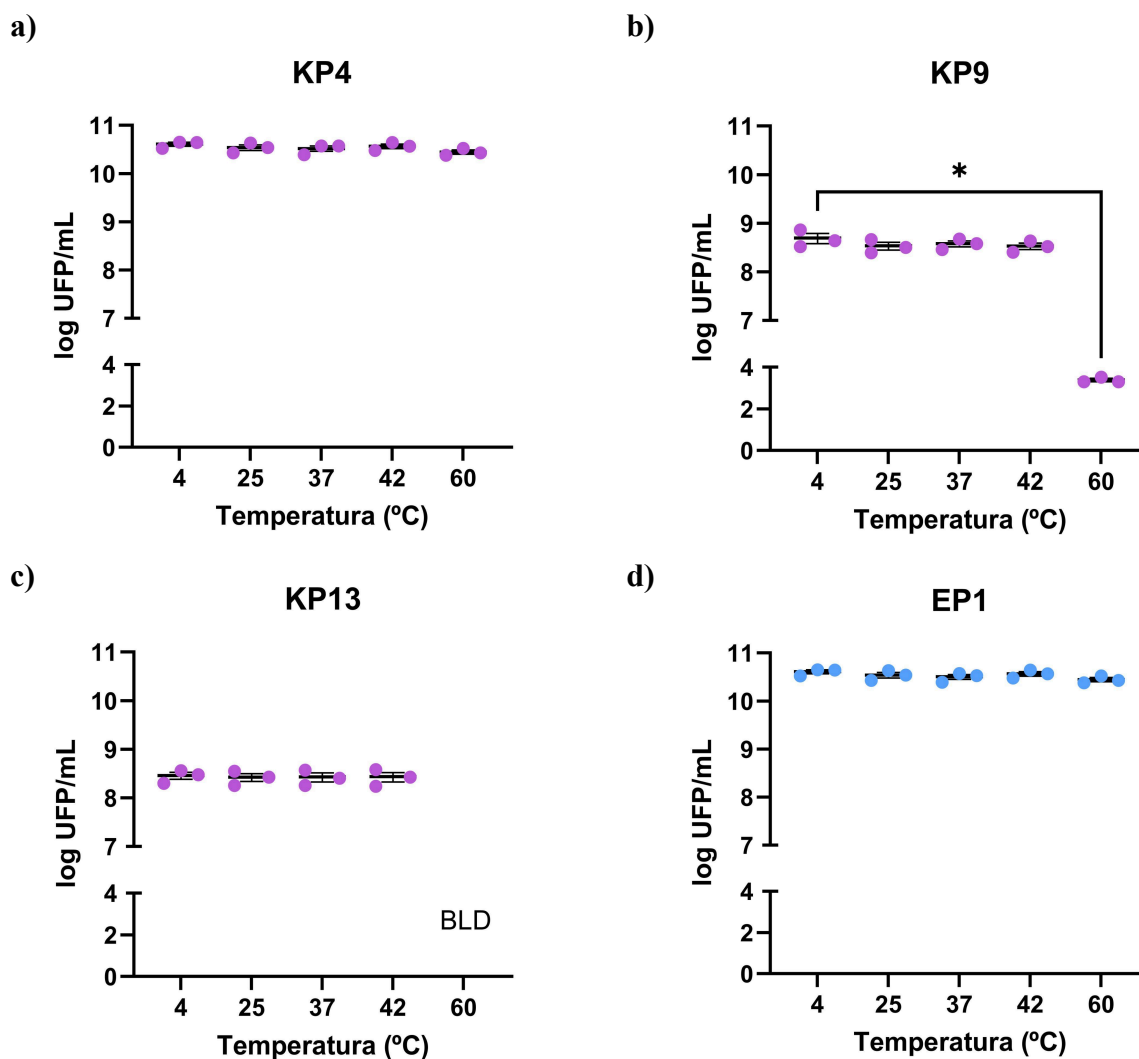


Figura 10: Estabilidad térmica de los fagos KP4, KP9, KP13 y EP1. En violeta se indican los resultados para los fagos de *K. pneumoniae*: **a)** KP4, **b)** KP9, **c)** KP13; y en celeste los del fago de *E. coli*: **d)** EP1. Los fagos fueron incubados en un rango de temperaturas desde 4°C a 60°C por 1 hora, y se calcularon los títulos virales luego del tratamiento. El título a 4°C representa el control, ya que es la temperatura de almacenamiento de los stocks. Para cada tratamiento se muestra el promedio de 3 réplicas independientes y el error estándar de la media (SEM). Las diferencias fueron analizadas mediante el test estadístico no paramétrico Kruskal-Wallis con un test *post hoc* de múltiples comparaciones de Dunn. **p*-valor < 0,05 con respecto a la condición control. BLD: Bajo el límite de detección.

El efecto del pH sobre la viabilidad de los fagos se estudió de una manera similar, incubando los stocks virales en un rango de valores de pH desde ligeramente ácido (pH 5) hasta pH básico (pH 11), durante 1 hora a 37°C. La incubación se realizó a 37°C (temperatura corporal) debido al enfoque de este trabajo de utilizar fagos como alternativa terapéutica para infecciones en humanos. Se eligió un rango amplio que incluyera pH fisiológicos como el pH de la piel, del intestino, aparato urinario, sangre y otros fluidos corporales. También se ensayaron valores de pH básicos para estudiar la robustez de los fagos frente a condiciones de pH más extremas. Asimismo, valores altos de pH son característicos de algunas soluciones desinfectantes. Si bien el enfoque de esta tesis refería al potencial uso de los fagos aislados para controlar bacterias uropatógenicas en terapia fágica, dado que este trabajo representa el inicio de una línea de investigación, una caracterización más exhaustiva permitiría además determinar si estos fagos podrían emplearse en un futuro para otro tipo de biocontrol, como antimicrobianos en combinación (o no) con desinfectantes de uso. Es de tener en cuenta que los stocks virales de estos fagos tienen normalmente un pH ligeramente básico, entre 7,5 y 8.

Tras la incubación, los títulos virales se mantuvieron sin cambios en el rango de pH 5-9 para todos los fagos, según revelaron los tests estadísticos realizados (**Figura 11**). Sin embargo, a pH 11 parecería haber una tendencia a la disminución de los títulos virales para todos los fagos, siendo más marcada la disminución para el fago KP13 (**Figura 11, panel c**). Esta disminución de la viabilidad a pH 11 no representaría, en principio, un obstáculo a la hora de la terapia fágica, pero sí podría ser un factor importante a tener en cuenta si se quisiera elaborar algún desinfectante con el agregado de estos fagos.

Aunque los fagos evaluados exhibieron diferencias en su estabilidad térmica y frente a distintos valores de pH, siendo algunos más estables que otros, la reducción del título viral observada tras la exposición a temperaturas elevadas o condiciones extremas de pH era un resultado previsible. Este comportamiento concuerda con lo previamente reportado en la literatura, donde se ha documentado que tanto el calor como los valores de pH extremos afectan la infectividad de las partículas fágicas, al menos para fagos que infectan *E. coli* y *K. pneumoniae* (108,109).

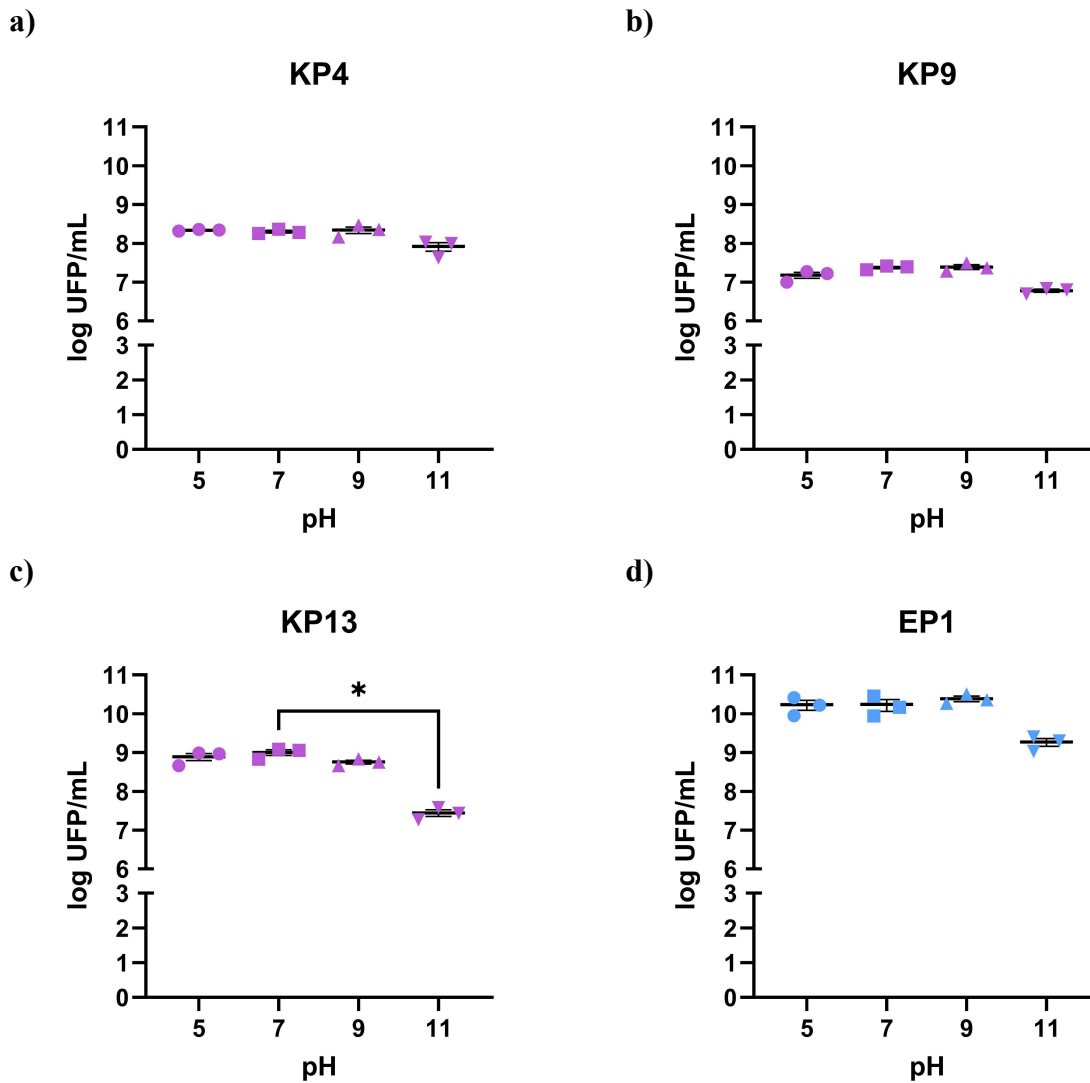


Figura 11: Estabilidad a distintos valores de pH de los fagos KP4, KP9, KP13 y EP1. En violeta se indican los resultados para los fagos de *K. pneumoniae*: **a)** KP4, **b)** KP9, **c)** KP13; y en celeste los del fago de *E. coli*: **d)** EP1. Los fagos fueron incubados en un rango de pH desde 5 a 11 por 1 hora a 37°C, y se calcularon los títulos virales luego del tratamiento. Para cada tratamiento se muestra el promedio de 3 réplicas independientes y el error estándar de la media (SEM). Las diferencias fueron analizadas mediante el test estadístico no paramétrico Kruskal-Wallis con un test *post hoc* de múltiples comparaciones de Dunn. **p*-valor < 0,05.

4.4 Curvas de infección viral de los fagos seleccionados

Con el objetivo de estudiar la dinámica de los fagos y sus cepas hospederas, se realizaron curvas de infección, y se siguió el crecimiento bacteriano a D.O. 600 nm durante 10 horas luego del agregado de fagos a distintas multiplicidades de infección (MOI) (**Figura 12**). Medir las variaciones de D.O. a lo largo del tiempo permite examinar la eficiencia de los fagos para reducir la población bacteriana, al comparar con el crecimiento de un control sin infectar. Estas curvas además, brindan información sobre un fenómeno que puede ser preocupante a la hora de pensar en la fagoterapia: el recrecimiento bacteriano y el surgimiento de bacterias resistentes a fagos (67). En este caso, las curvas se obtuvieron en un medio rico para el crecimiento bacteriano, sin embargo, dependiendo de la matriz empleada, pueden observarse variaciones en la eficiencia lítica de los fagos. Por ejemplo, en un estudio reciente se analizó el comportamiento de fagos de *E. coli* en medio rico y se comparó con su desempeño en orina artificial, observándose que los resultados dependieron de cada fago (110).

Al analizar las curvas de infección, se evidencian perfiles diferentes entre los distintos fagos evaluados. En particular, KP4 y KP9 parecen ser capaces de erradicar o mantener el crecimiento bacteriano en niveles mínimos durante varias horas. No obstante, a partir de las 6 horas post infección (p.i.), se observa un recrecimiento bacteriano (**Figura 12, paneles a y b**), posiblemente debido a la aparición de bacterias resistentes o a la selección de variantes resistentes ya existentes, que ocupan el nicho una vez que los bacteriófagos eliminan a las bacterias sensibles. Este surgimiento o selección de bacterias resistentes *in vitro*, como se mencionó anteriormente, representa una potencial limitación en el uso terapéutico de estos fagos. Si bien no existe un consenso en la literatura sobre si los resultados obtenidos *in vitro* reflejan con fidelidad lo que ocurriría *in vivo*, es posible adoptar estrategias para minimizar la resistencia bacteriana frente a fagos. Una de estas estrategias consiste en la formulación de cócteles de fagos, ya que la probabilidad de que una bacteria desarrolle espontáneamente resistencia o sea naturalmente resistente a dos o más fagos simultáneamente es considerablemente menor que frente a un único fago (111). Al momento de formular estos cócteles es importante considerar un diseño racional, ya que fagos que reconozcan receptores bacterianos distintos podría aumentar la eficacia de los cócteles. Asimismo, priorizar la diversidad de receptores en el diseño de cócteles terapéuticos podría contribuir a evitar combinaciones contraproducentes (112).

En cuanto al fago KP13, la D.O. 600 nm nunca alcanza valores muy cercanos a cero, lo que podría indicar una menor eficiencia lítica, aunque debe considerarse que la cepa hospedera en este caso es diferente. Además, el crecimiento bacteriano en presencia del fago se incrementa rápidamente antes de las 5 horas p.i., alcanzando a las 10 horas p.i. valores superiores al 50% de la la D.O. 600 nm registrada en la condición control (Figura 12, panel c).

Por último, el fago EP1 parece ser altamente eficiente en la eliminación de su cepa hospedera, ya que se registra un leve aumento inicial de la D.O. 600 nm al comienzo del experimento, seguido de una rápida disminución hasta valores cercanos a cero, sin evidencia de recrecimiento hasta la finalización del ensayo a las 10 horas p.i. (Figura 12, panel d).

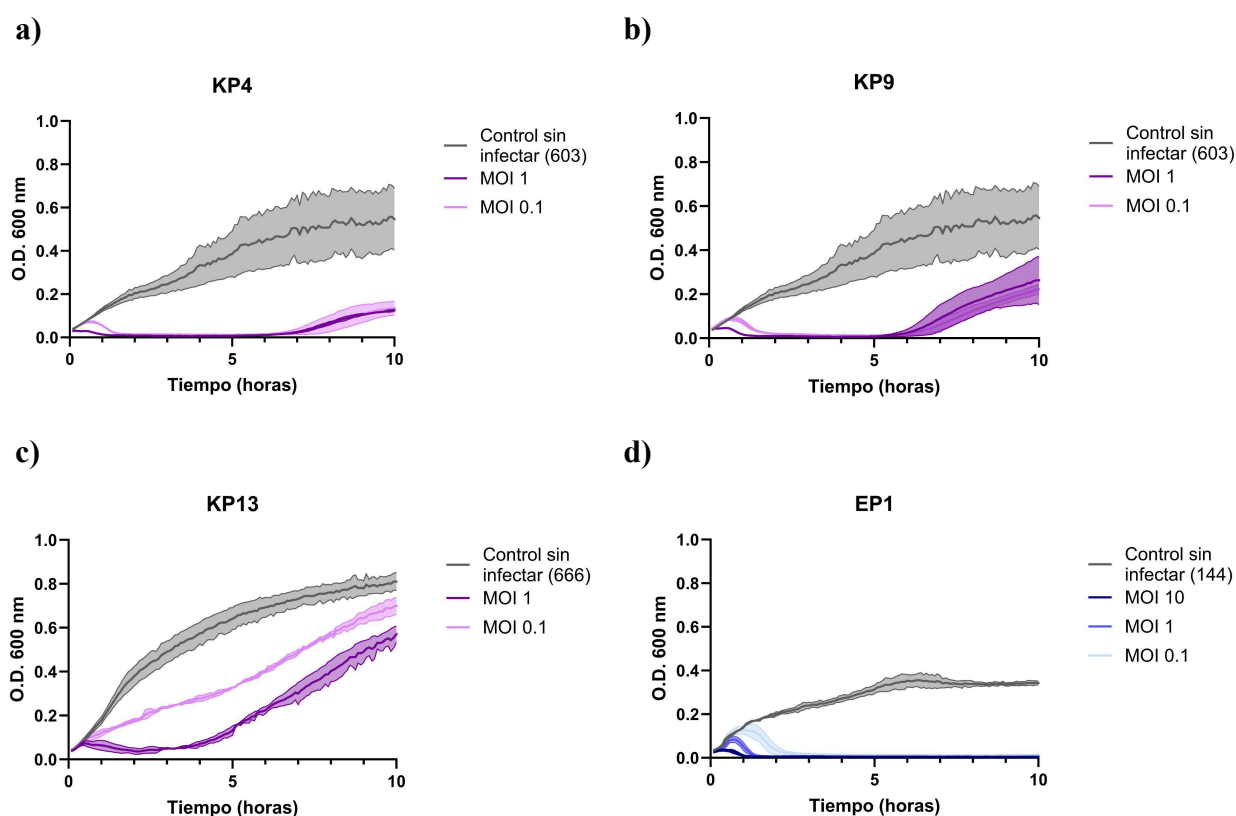


Figura 12: Curvas de infección para los fagos KP4, KP9, KP13 y EP1 en sus respectivas cepas hospederas. Se siguió el crecimiento bacteriano mediante la medición de O.D. 600 nm durante 10 horas. En gris se muestra el control de crecimiento bacteriano sin infectar para cada una de las cepas hospederas correspondientes (ATCC 700603 (a y b), Kp666 (c) y *E. coli* 144 (d)), y en tonos de violeta o azul las curvas de infección fago-bacteria. Para todos los fagos se ensayaron distintas multiplicidades de infección (MOI) que van desde 0.1-10. La curva muestra el promedio de 2 réplicas biológicas, y el sombreado representa el desvío estándar.

Si bien es posible identificar ciertos patrones generales a simple vista en las curvas correspondientes a los distintos fagos, en algunos casos resulta complejo establecer comparaciones precisas entre condiciones. Para facilitar el análisis, es necesario recurrir a métodos cuantitativos en lugar de una aproximación meramente cualitativa como la observación visual de las gráficas, la cual puede llevar a interpretaciones ambiguas o inconclusas.

Entre los métodos cuantitativos reportados se encuentran el índice de virulencia (IV), que se basa en la cuantificación del área bajo la curva, y la tasa máxima de crecimiento específico ($\mu_{\text{máx}}$), que representa la velocidad máxima de crecimiento en condiciones óptimas (67). Sin embargo, estos parámetros presentan limitaciones cuando se aplican a curvas no canónicas. En particular, $\mu_{\text{máx}}$ no resulta adecuado para curvas en las que se alcanzan diferentes niveles de crecimiento al finalizar el ensayo, y tampoco contempla fases de latencia ni patrones de crecimiento no exponenciales. Por su parte, el índice de virulencia se calcula como la relación entre el área bajo la curva de la condición control y la de la condición con infección por fago. Una de las dificultades asociadas a este método radica en la selección del punto final del ensayo, el cual idealmente, debería coincidir con el establecimiento de un estado estacionario. En el caso de curvas no canónicas, donde no se alcanza un *plateau*, el IV deja de ser un buen estimador de la eficiencia de los fagos. Además, este índice es independiente de la forma de la curva, lo que implica que dos condiciones con el mismo valor de IV pueden diferir en aspectos clave, como la presencia de recrecimiento bacteriano o el surgimiento de bacterias resistentes (67).

Dadas las limitaciones mencionadas anteriormente, en este trabajo se utilizó el Índice de Centroide (IC) como método cuantitativo. El centroide de una figura 2D o 3D se refiere al centro geométrico o centro de la figura, y representa la ubicación promedio de todos los puntos sobre la superficie de la misma. En este caso, el centroide representa el punto geométrico de la figura delimitada por cada curva y el eje x, y su posición indica dónde se concentra el crecimiento bacteriano a lo largo de la curva. El IC (calculado a partir de comparar el centroide de la curva control y el centroide de una curva tratamiento) es un valor que varía entre 0 y 1, donde un IC de 0 es indicador de un bacteriófago poco eficiente dada una cepa bacteriana, y un IC de 1 caracteriza a uno eficiente (67). Para cada condición utilizada en este ensayo, se calculó el IC, y los resultados se muestran en la **Tabla 6**.

El análisis de los valores del índice de centroide (IC) permite identificar qué valores de MOI resultan más eficientes para cada fago, además de facilitar la comparación entre fagos que comparten la misma cepa hospedera. Considerando el punto final del ensayo, KP4 mostró una

eficiencia similar para lisar la cepa *K. pneumoniae* ATCC 700603 independientemente de la MOI utilizada, ya que los valores de IC obtenidos a MOI 0,1 y 1 fueron prácticamente idénticos. En el caso de KP9, una MOI más baja parecería ser más efectiva. A MOI 1 se observó una mayor emergencia de resistencia hacia el final de las 10 horas, lo que se refleja en un menor valor de IC. Al comparar KP4 y KP9, KP4 demostró ser más eficiente en la lisis de la cepa hospedera, obteniendo valores de IC considerablemente más altos. Por su parte, KP13 presentó los valores de IC más bajos en ambas dosis evaluadas, lo que sugiere que este fago no es eficiente para lisar a su cepa hospedera Kp666. Finalmente, EP1 fue el fago que alcanzó los valores de IC más altos. En este caso, la eficiencia del fago para eliminar su cepa hospedera (*E. coli* 144) aumentó a medida que se incrementó la MOI, llegando a alcanzar un valor cercano a 1 cuando se utilizó una proporción de diez partículas virales por cada célula bacteriana.

Tabla 6: Índice de centroide (IC) para cada curva de infección, discriminando por fago y por multiplicidad de infección.

	Índice de centroide (IC)		
Fago	MOI 0,1	MOI 1	MOI 10
KP4	0,80	0,79	ND
KP9	0,66	0,50	ND
KP13	0,24	0,35	ND
EP1	0,89	0,94	0,97

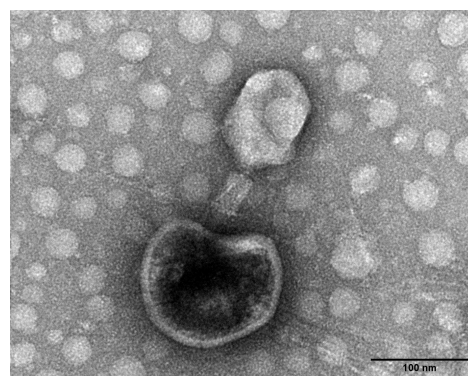
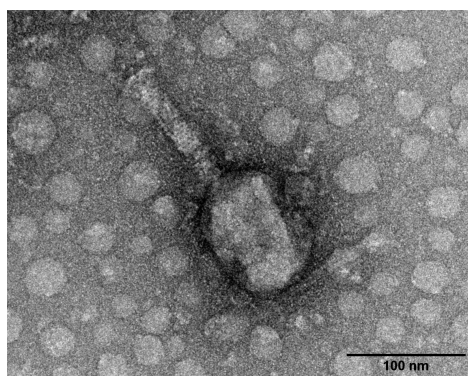
IC = 0 representa un fago ineficiente, mientras que IC = 1 representa un fago eficiente; ND: No determinado.

4.5 Microscopía electrónica de transmisión de los fagos seleccionados

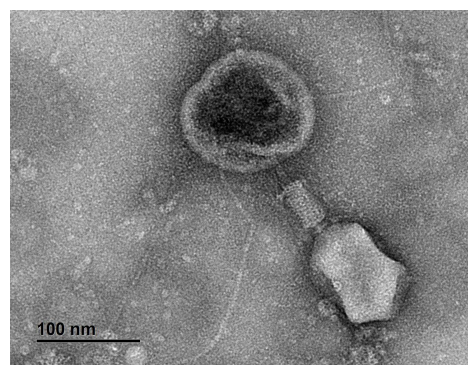
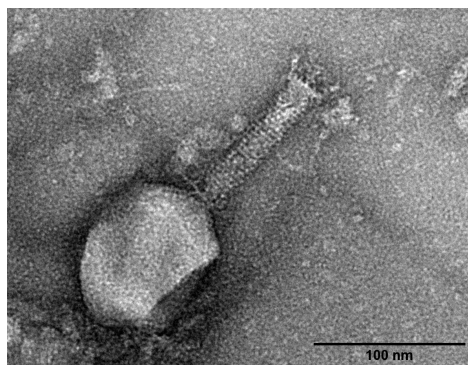
Para caracterizar la morfología de los cuatro fagos seleccionados, se utilizó microscopía electrónica de transmisión. Mediante esta técnica se comprobó que todos los fagos presentan una morfología compatible con la de los myovirus, es decir, viriones con cabeza icosaédrica y cola contráctil (**Figura 13**). Esta observación permite afirmar, con un alto grado de certeza, que los fagos pertenecen a la clase *Caudoviricetes* y que poseen un genoma constituido por ADN de doble cadena. En cuanto a sus características morfológicas, se distinguen claramente dos tipos de cápsides icosaédricas: una de cabeza prolata, de forma elongada a lo largo del eje longitudinal, compartida por los fagos KP4 y KP9; y otra de cabeza isométrica, de forma más esférica, presente en los fagos KP13 y EP1 (**Figura 13**).

Además de la descripción general de la morfología, se realizaron mediciones a partir de al menos cuatro imágenes por cada fago, con el objetivo de estimar el tamaño de las partículas virales, así como el de sus cápsides y colas (**Tabla 7**). KP4 y KP9 presentaron dimensiones similares, con viriones que superan los 200 nm de longitud. En contraste, KP13 y EP1 mostraron tamaños menores, siendo KP13 el fago con el menor promedio registrado entre los analizados. Dado que las longitudes de las colas fueron comparables en todos los fagos evaluados, las diferencias observadas en el tamaño total de las partículas podrían atribuirse principalmente a variaciones en el tamaño de las cápsides. Estas variaciones a su vez, podrían reflejar diferencias en el largo de los genomas, ya que se ha propuesto que los fagos con cola empaquetan sus genomas con una densidad similar; por lo que el aumento en la longitud del genoma se acompaña de un incremento en el volumen de las cápsides (113). Si bien no se dispone del genoma completo para todos los fagos, tal y como se detalla en la **sección 4.7** (Caracterización genómica de los fagos aislados), se observa que KP4, que presentó la cápside de mayor tamaño, también posee el genoma más largo. Por otro lado, EP1 que presenta una cápside de menores dimensiones, también cuenta con un genoma más pequeño.

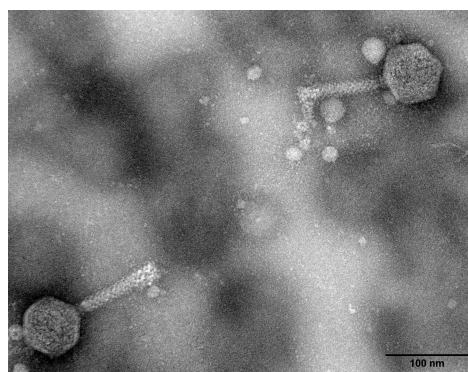
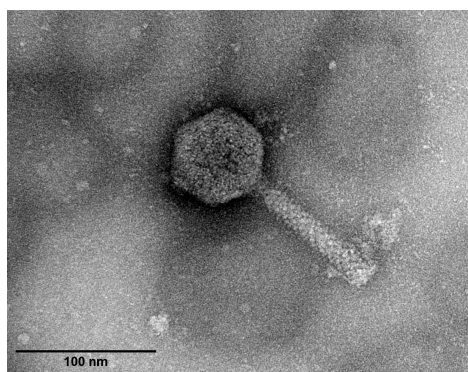
KP4



KP9



KP13



EP1

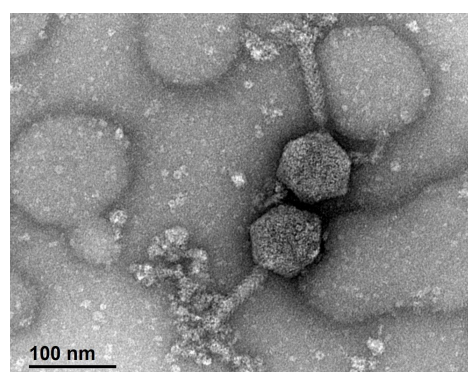
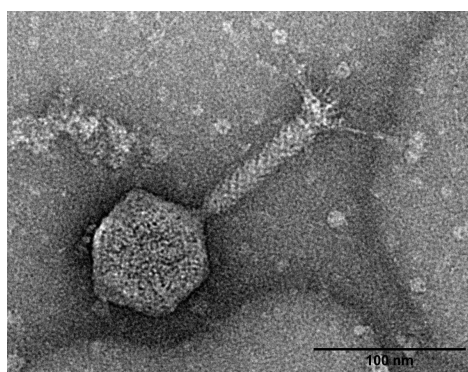


Figura 13: Micrografías electrónicas de transmisión para los fagos KP4, KP9, KP13 y EP1. Para todos los fagos se muestran 2 imágenes. Todos los fagos presentaron morfología tipo myovirus (fago con cabeza y con cola contráctil). Para el caso de KP4 y KP9, se muestran las formas contraídas de la partícula viral en los paneles derechos. La barra de escala para todas las imágenes es de 100 nm.

Tabla 7: Dimensiones de las partículas virales. Se midieron las dimensiones de las cabezas, el largo de las colas, y el tamaño de las partículas virales desde la cabeza hasta la placa basal. Para cada fago se representa el promedio, el desvío estándar (SD) correspondiente y el número de medidas empleadas.

	KP4	KP9	KP13	EP1
Morfología de la cápside	Cabeza prolata	Cabeza prolata	Cabeza isométrica	Cabeza isométrica
Dimensiones de la cápside (nm)	$111 \pm 5 \times 79 \pm 5$ [n = 4]	$109 \pm 7 \times 82 \pm 3$ [n = 7]	$71 \pm 3 \times 67 \pm 1$ [n = 5]	$85 \pm 1 \times 79 \pm 2$ [n = 6]
Largo de la cola (nm)	112 ± 2 [n = 4]	117 ± 7 [n = 7]	101 ± 4 [n = 5]	109 ± 4 [n = 6]
Tamaño de la partícula viral (nm)	220 ± 6 [n = 4]	216 ± 6 [n = 7]	168 ± 7 [n = 5]	197 ± 5 [n = 6]

4.6 Capacidad de erradicación de biofilms de los fagos aislados

Dado que la formación de biofilms representa un importante mecanismo de resistencia bacteriana, se consideró relevante evaluar si los fagos de la colección eran capaces de erradicar biofilms bacterianos preformados o disminuir su biomasa. En particular, se analizó la capacidad antibiofilm por parte de los cuatro fagos seleccionados (KP4, KP9, KP13 y EP1), así como de aquellos fagos que presentaban una morfología de placa de lisis con halo (KP5, KP6, KP7, KP8, KP10, EP5, EP7 y EP9), ya que las depolimerasas, comúnmente asociadas a dicha morfología, han sido ampliamente reportadas como agentes antimicrobianos con actividad antibiofilm (114). Para lograr este objetivo, se incubaron biofilms bacterianos de las cepas *host* con una suspensión de cada fago, con una cantidad de 10^6 UFP para los KPs, y 10^6 y 10^8 UFP para los fagos EPs.

En cuanto a los fagos que infectan *Klebsiella*, KP4, KP9 y KP13 no mostraron una reducción significativa de la biomasa del biofilm en comparación con la condición control. No obstante, los otros fagos evaluados (KP5, KP6, KP7, KP8 y KP10) sí evidenciaron actividad antibiofilm, logrando disminuir, en promedio, el 50 % de la biomasa inicial del biofilm formado por su cepa hospedera, cuando se aplicaron a una dosis de 10^6 UFP (**Figura 14, paneles a y b**). Estos resultados respaldan la hipótesis de que los fagos que producen placas de lisis con halo podrían portar depolimerasas asociadas al virión (97). En particular, el genoma del fago KP8 fue secuenciado, tal como se detalla en la **sección 4.7** (Caracterización genómica de los fagos aislados), y se analizó la presencia de enzimas con actividad depolimerasa mediante el uso de una base de datos y búsqueda por homología estructural. A partir de estos análisis, se identificaron dos proteínas hipotéticas como

enzimas depolimerasas candidatas (ver **Anexo 5: Identificación de depolimerasas en los genomas de los fagos aislados**).

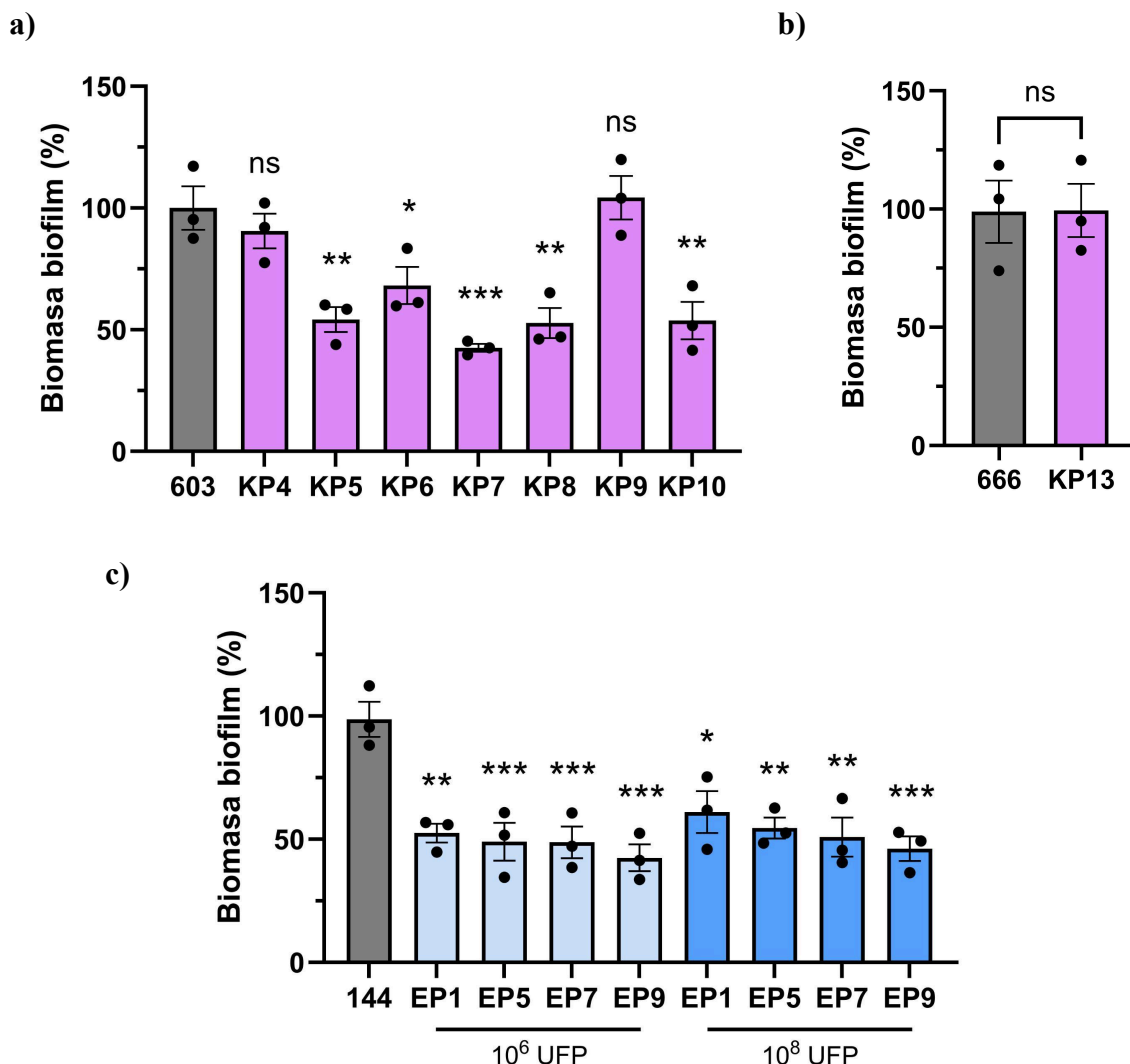


Figura 14: Ensayo de erradicación de biofilms bacterianos por parte de los fagos KPs y EPs en sus cepas hospederas. Para los fagos KPs (en violeta) se utilizó 10⁶ UFP para el ensayo, mientras que para los fagos EPs (en tonos de celeste) se utilizaron 10⁶ (celeste claro) o 10⁸ UFP (celeste oscuro). El control de biofilm bacteriano sin el agregado de fago se muestra en gris para cada una de las cepas hospederas (ATCC 700603 (a), Kp666 (b) y *E. coli* 144 (c)). Cada barra muestra el promedio de 3 réplicas independientes, y el error estándar de la media (SEM). Las diferencias fueron analizadas mediante el test estadístico ANOVA de una vía con un test *post hoc* de múltiples comparaciones de Dunnett (a y c) o t-test no pareado (b). Para todos los casos, las diferencias se analizaron con respecto al control. **p*-valor < 0,05; ***p*-valor < 0,01; ****p*-valor < 0,001; ns no significativo.

En relación a los fagos EPs, todos los ensayados demostraron capacidad para disminuir el biofilm preformado de su cepa hospedera, alcanzando en promedio, un 50 % de reducción (**Figura 14,**

panel c). Un hallazgo particular fue la ausencia de diferencias significativas entre los resultados observados a la dosis más baja y la más alta de fago, lo cual sugiere que, al menos dentro de este rango de concentración, la actividad antibiofilm es independiente de la cantidad de fagos aplicada. Cabe recordar, que la morfología de placas de lisis de los EPs mostraron halos discretos, potencialmente sugiriendo actividad depolimerasa.

Si bien se logró reducir a la mitad la biomasa de los biofilms analizados, sería de interés evaluar estrategias que permitan una mayor disminución. Una alternativa es el uso de cócteles de fagos en lugar de fagos individuales, por ejemplo, combinando un fago de amplio rango y alto EOP (como KP4 o KP9) con otro que presente actividad antibiofilm. Esta combinación podría potenciar la eficacia, ya que las depolimerasas degradan la matriz extrapolimérica, facilitando la disrupción del biofilm y exponiendo receptores bacterianos que favorecen la infección viral (97). Otra estrategia consiste en combinar fagos con antibióticos, dado que dosis subletales de estos últimos pueden potenciar la actividad fágica mediante sinergia fago-antibiótico (97). En ambos casos, la compatibilidad entre los agentes debe evaluarse previamente, ya que también pueden producirse efectos antagonistas (97).

Cabe señalar que el ensayo empleado no permite discernir con claridad si la reducción observada en la biomasa del biofilm se debe exclusivamente a la actividad antibiofilm de los fagos o si responde a una combinación con actividad antimicrobiana. Para resolver esta incertidumbre, sería suficiente realizar recuentos bacterianos de los biofilms tratados y no tratados (115), a fin de determinar si la disminución de la biomasa es atribuible únicamente a la degradación de los polisacáridos de la matriz o, en cambio, a una reducción en el número de células viables. Otra estrategia consiste en evaluar la proporción de bacterias vivas y muertas mediante ensayos de viabilidad (116), donde una disminución en este cociente sería indicador de actividad antimicrobiana asociada a la infección fágica.

4.7 Caracterización genómica de los fagos aislados

A modo de completar la caracterización de los fagos seleccionados, se decidió abordar un análisis genómico mediante secuenciación masiva. En primera instancia, se secuenciaron los fagos candidatos (KP4, KP9, KP13, EP1) y con las secuencias, se generaron los diagramas correspondientes en aquellos casos en los que fue posible (**Anexo 6: Mapas genómicos de los fagos candidatos**). También se secuenciaron otros fagos que resultaron de interés, por ejemplo KP12 por presentar el rango de hospedero más amplio, y KP8 por la sospecha de la presencia de depolimerasas. Se planea completar la caracterización genómica para todos los fagos aislados, pero al momento de escribir este trabajo, solamente se cuenta con la secuencia ensamblada de 7 fagos (**Tabla 8**). Si bien se secuenció el fago KP9, las lecturas no alcanzaron el umbral de calidad fijado y por ende este genoma no se encuentra disponible aún.

Salvo en el caso del fago KP13, todos los genomas se ensamblaron exitosamente en un único contig (**Tabla 8**). En el caso de este fago, la electroforesis realizada luego de la fragmentación previa a la secuenciación evidenció la presencia de fragmentos de tamaños diversos, y en general menores al esperado (8 kpb). Posiblemente la obtención de lecturas más cortas y de tamaños no uniformes dificultó el ensamblaje. La evidencia sugiere que los dos contigs son resultado de un ensamblado incompleto, y no de la presencia de dos fagos distintos ni de contaminación por profagos o material genético bacteriano. En ambos contigs analizados no se identificaron genes de origen bacteriano, lo que permite descartar esta última posibilidad. Asimismo, ninguno de los contigs contiene genes asociados a lisogenia ni fue clasificado como profago, por lo que esta hipótesis también resulta poco probable. Cabe destacar que uno de los contigs codifica genes estructurales, mientras que el otro no, lo que refuerza la interpretación de que ambos fragmentos pertenecen a un único genoma viral. Estos hallazgos, tomados en conjunto, respaldan la hipótesis de que se trata de un solo fago (KP13) cuyo genoma se encuentra dividido en dos contigs como consecuencia de limitaciones técnicas del ensamblado. No se descarta que aún considerando ambos contigs, el genoma se encuentre incompleto debido a lecturas sin suficiente homología con los contigs ensamblados.

Los tamaños de los genomas obtenidos varían entre 45 y 177 kpb. La mayoría de los fagos presentan genomas superiores a los 100 kpb, siendo el fago KP8 el único con un genoma considerablemente más pequeño. Esta diferencia en el tamaño también se ve reflejada en la cantidad de secuencias codificantes (CDS) que posee este fago (**Tabla 8**). Al examinar los CDS anotados para todos los fagos, resulta interesante notar que se observa una alta proporción, superior al 50%,

de genes de función desconocida que codificarían proteínas hipotéticas (**Tabla 8**). Esta observación concuerda con lo señalado por algunos autores, quienes describen que los genomas fágicos suelen estar “repletos” de genes de función desconocida (117). En el caso del fago KP8, dos de estas proteínas hipotéticas fueron modeladas tridimensionalmente, y sus estructuras mostraron una alta similitud con depolimerasas previamente registradas en bases de datos, como ya mencionado en la sección anterior.

El contenido GC de los distintos fagos KPs varía entre 41,7 y 51,8%, y el de EP1 se sitúa en 43,5% (**Tabla 8**). Para todos los fagos, este valor obtenido es menor que el promedio de *K. pneumoniae* (57%) (118) y el de *E. coli* (50%) (119). Esta observación es coherente con lo observado en otros trabajos, que demuestran que el contenido de GC no es preciso para predecir el rango de hospedero de un fago a niveles taxonómicos inferiores como especie o género (118).

Para todos los fagos, la completitud genómica fue estimada a partir de la comparación con genomas de referencia. En el caso de genomas cerrados, la presencia de extremos redundantes o secuencias repetidas constituye un indicador de que el genoma se encuentra completo. En cambio, cuando la secuencia viral no presenta redundancia terminal, la estimación de completitud se basa en la comparación con genomas disponibles en bases de datos. En estos casos, se calcula la identidad promedio de aminoácidos (AAI, por sus siglas en inglés: *average amino acid identity*) entre el genoma ensamblado y los genomas de referencia. Si el valor de AAI es suficientemente alto, se estima la completitud en función de la cobertura del genoma ensamblado respecto del genoma de referencia. Según el porcentaje de completitud obtenido, los genomas se clasifican como de alta calidad (>90% de completitud), calidad media (50–90%) o baja calidad (<50%) (89). Dado que ninguno de los genomas analizados presentó extremos con secuencias repetidas, la estimación de completitud se basó exclusivamente en el valor de AAI. Todos los fagos presentaron alta calidad, y un porcentaje de completitud alto (>98%), incluso alcanzando 100% para el fago KP8 (**Tabla 8**). Este parámetro valida que los ensamblajes fueron buenos, y se puede afirmar con un alto grado de certeza que se cuenta con las secuencias completas. La excepción fue KP13, con valores de completitud bajas dado que su genomas se encuentra fragmentado en 2 *contigs*.

De todas las CDS analizadas, todas corresponden a genes virales, y ninguna a genes bacterianos. Resulta importante destacar que ninguno de los fagos cuenta con genes de virulencia o resistencia (**Tabla 8**), característica esencial si se está considerando la aplicación de estos fagos en terapia fágica. La presencia de estos genes podría aumentar el riesgo de empeorar una infección, o hacerla más difícil de tratar (120).

En cuanto al estilo de vida o ciclo de infección de estos fagos, ninguno fue catalogado como profago, y todos, con excepción de EP1, carecen de genes de lisogenia (**Tabla 8**), un criterio excluyente en el contexto de la fagoterapia (120). En el caso de EP1, el anotador automático detectó un gen que catalogó como de lisogenia, que fue predicho como una transposasa de 102 aminoácidos. No obstante, a pesar de la presencia de dicha transposasa, no se identificaron genes que codifiquen integrasas, excisionasas ni proteínas represoras, lo que sugiere fuertemente que este fago sería un lítico obligado. Además, trabajos recientes que describen el aislamiento y caracterización de fagos pertenecientes a la subfamilia *Vequintavirinae* o al género *Vequintavirus* indican que sus genomas incluyen proteínas transposasas o “transposase-like”, sin que ello implique la capacidad de realizar un ciclo lisogénico. Por el contrario, estos fagos se consideran estrictamente líticos y promisorios para su aplicación en fagoterapia (119,121).

De manera interesante, todos los fagos con excepción de KP8, que tiene el genoma más pequeño, cuentan con genes que codifican para ARNs de transferencia (ARNt), cuyo número varía entre 2 y 27 genes según el fago (**Tabla 8**). Estos genes constituyen los únicos elementos asociados a la maquinaria de traducción que se encuentran de forma recurrente en los genomas de bacteriófagos (122), y hasta el momento no existe una explicación definitiva sobre las razones de su presencia (118). Algunos autores proponen que los fagos que codifican para ARNt presentan un sesgo en el uso de codones que difiere del de su hospedero bacteriano, por lo que utilizarían sus propios ARNt para compensar esta diferencia (118,122). Sin embargo, esta no sería una observación universal, lo que sugiere que el uso de codones no es la única explicación para la presencia de ARNt en los genomas fágicos (118). Un estudio reciente demostró que la expresión de ARNt por parte de los fagos puede contrarrestar las defensas antifago del hospedador (123). Si bien el contenido GC no se relaciona directamente con el sesgo en el uso de codones, se sabe que puede influir en la selección de codones más frecuentes (124). Curiosamente, el fago KP8, que presenta el contenido de GC más alto y más cercano al de su hospedero, no codifica genes de ARNt. En contraste, los fagos KP2, KP3 y KP4, con los contenidos de GC más bajos entre los analizados, sólo poseen dos genes de este tipo. Por su parte, KP12 y KP13 muestran un contenido de GC intermedio, pero codifican la mayor cantidad de genes de ARNt, con 25 y 27 respectivamente. Un análisis comparativo del sesgo en el uso de codones entre los fagos y sus respectivas cepas hospederas podría ayudar a evaluar si existe alguna relación entre la cantidad de ARNt codificados y el uso de codones, o si, en cambio, otras razones podrían explicar este fenómeno.

Por último, los fagos fueron asignados taxonómicamente de acuerdo con la clasificación vigente del ICTV. Todos pertenecen a la clase *Caudoviricetes*, caracterizada por fagos con morfología binaria

de cabeza y cola, y genomas de ADN de doble cadena. Esta morfología típica ya había sido constatada por microscopía electrónica en los fagos KP4, KP9, KP13 y EP1 (**Figura 13**). El género con mayor representación fue *Slopekvirus*, que incluye a los fagos KP2, KP3 y KP4. Los demás géneros identificados fueron *Kolesnikvirus* (KP13), *Vequintavirus* (EP1), *Gansuvirus* (KP8) y *Sugarlandvirus* (KP12) (**Tabla 8**).

Todos los fagos representan una nueva especie dentro del género al que corresponden, con excepción de EP1. EP1 fue asignado a una especie ya reportada, *Vequintavirus phiWec193*. Con respecto a KP2, KP3 y KP4, estos tres fagos corresponden al mismo género viral (*Slopekvirus*) determinado tanto empleando taxMyPhage como a través de un árbol filogenético a partir de genes compartidos concatenados. Este análisis evidenció una relación muy estrecha entre KP2 y KP3, mientras que KP4 se ubicó filogenéticamente más distante (**Figura 1, Anexo 7**). Para intentar determinar si cada uno representa una especie diferente dentro del género *Slopekvirus*, fue necesario analizar la identidad media de nucleótidos a nivel del genoma completo. Este análisis reveló que la identidad entre KP2 y KP3 es de 0,9998 y difieren en solo 41 SNPs, mientras que entre KP2 y KP4 es de 0,9892 (**Figura 2, Anexo 7**). Si bien, en general, se considera que un porcentaje de identidad nucleotídica superior al 95 % entre genomas completos es indicativo de pertenencia a una misma especie (125), en el caso de los fagos del género *Slopekvirus* este umbral no resulta un criterio confiable, debido a la alta similitud genómica que caracteriza a sus miembros (126). De hecho, la identidad más baja encontrada entre los genomas de las bases de datos correspondientes a los miembros del género *Slopekvirus* fue de 0,9699. Aunque no es posible asignar inequívocamente una especie a cada uno de los fagos estudiados, se puede inferir que KP2 y KP3 pertenecerían a la misma especie ya que, no solamente se pertenecen al mismo grupo filogenético, sino que además son 99.98% idénticos a nivel nucleotídico.

Tabla 8: Información genómica de los fagos KP4, KP13, EP1, KP2, KP3, KP8 y KP12. Para cada fago se describe el número de contigs obtenido posterior al ensamblaje; la profundidad media del contig; el largo de cada contig; el largo total (suma lineal de los contigs); el contenido GC; la cantidad de regiones codificantes (CDS); completitud estimada; si se trata de un profago; el número de genes bacterianos detectados; número de genes de virulencia o resistencia; número de genes de lisogenia; número de ARNt y taxonomía asignada.

	KP4	KP13	EP1	KP2	KP3	KP8	KP12
# contigs	1	2	1	1	1	1	1
Profundidad media del contig (X)	62	#1: 34 #2: 37	122	115	65	475	46
Largo contigs (pb)	177.457	#1: 29.783 #2: 56.199	137.523	176.085	176.074	45.860	113.267
Tamaño total (pb)	177.457	85.982	137.523	176.085	176.074	45.860	113.267
# CDS	312	#1: 58 #2: 83	285	303	302	70	203
# Proteínas hipotéticas / #CDS	166 / 312	#1: 44 / 58 #2: 40 / 83	187 / 285	162 / 303	164 / 302	38 / 70	128 / 203
Contenido GC (%)	41,7	43,8	43,5	41,7	41,7	51,8	45,3
Completitud estimada (%)	99,6 (alta calidad)	#1: 35,1 (baja calidad) #2: 66,5 (calidad media)	98,2 (alta calidad)	98,8 (alta calidad)	98,8 (alta calidad)	100 (alta calidad)	99,2 (alta calidad)
Profago	No	#1: No #2: No	No	No	No	No	No
# Genes bacterianos	0	#1: 0 #2: 0	0	0	0	0	0
# Genes de virulencia o resistencia	0	#1: 0 #2: 0	0	0	0	0	0

# Genes de lisogenia	0	#1: 0 #2: 0	1	0	0	0	0
# ARNt	2	27	5	2	2	0	25
Taxonomía (Clase, Familia, Subfamilia, Género, Especie)	<i>Caudoviricetes,</i> <i>Straboviridae,</i> Sin definir, <i>Slopekvirus,</i> <i>Slopekvirus</i> nueva especie	<i>Caudoviricetes,</i> <i>Andersonviridae,</i> <i>Ounavirinae,</i> <i>Kolesnikvirus,</i> <i>Kolesnikvirus</i> nueva especie*	<i>Caudoviricetes,</i> Sin definir, <i>Vequintavirinae,</i> <i>Vequintavirus,</i> <i>Vequintavirus</i> <i>phiWec193</i>	<i>Caudoviricetes,</i> <i>Straboviridae,</i> Sin definir, <i>Slopekvirus,</i> <i>Slopekvirus</i> nueva especie	<i>Caudoviricetes,</i> <i>Straboviridae,</i> Sin definir, <i>Slopekvirus,</i> <i>Slopekvirus</i> nueva especie	<i>Caudoviricetes,</i> <i>Autosignataviridae,</i> <i>Molineuxvirinae,</i> <i>Gansuvirus,</i> <i>Gansuvirus</i> nueva especie	<i>Caudoviricetes,</i> <i>Demereciviridae,</i> Sin definir, <i>Sugarlandvirus,</i> <i>Sugarlandvirus</i> nueva especie

*La clasificación taxonómica para el fago KP13 fue asignada únicamente por el contig #2

5. Conclusiones y Perspectivas

Dada la magnitud del problema que representa la resistencia a antibióticos, resulta necesario buscar alternativas terapéuticas que puedan reducir la carga a los sistemas de salud a nivel global, además de mitigar las muertes causadas por microorganismos resistentes. El surgimiento de mecanismos de resistencia como enzimas modificadoras de antibióticos y formación de biofilms dificulta en ocasiones la elección de un tratamiento efectivo. En este contexto, una estrategia que ha resurgido en las últimas décadas es la del uso de bacteriófagos para combatir infecciones. Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias de manera específica, y los bacteriófagos virulentos (cuyo ciclo de infección culmina siempre en la lisis bacteriana) son potencialmente útiles en terapia fágica. El presente trabajo constituye uno de los primeros proyectos en el país dedicados al aislamiento y caracterización de bacteriófagos líticos de bacterias patógenas de relevancia clínica.

Como consecuencia de este proyecto, se generó una colección de fagos capaces de lisar *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, principales agentes etiológicos de las infecciones del tracto urinario y responsables de centenas de miles de muertes al año. Se aislaron 13 fagos que infectan *K. pneumoniae* (KPs) y 4 que infectan *E. coli* (EPs) a partir de muestras de plantas de tratamiento de agua de nuestro país. Se detectaron 5 morfologías de placas de lisis diferentes, entre las cuales se destacan algunas que poseen halo. Este fenotipo resulta característico de la presencia de depolimerasas, enzimas capaces de lisar polisacáridos presentes en la superficie bacteriana como lipopolisacáridos, polisacáridos de la cápsula, hasta biofilms.

Para todos los fagos aislados se estudió el rango de hospedero y la eficiencia de plaqueo (EOP) sobre aislamientos clínicos uruguayos. En promedio, los fagos KPs infectaron al 10% de las cepas ensayadas, mientras que los EPs alcanzaron el 19%. No obstante, los KPs presentaron mayores valores de EOP, lo que sugiere que, si bien los EPs poseen un rango de hospedero más amplio, son menos eficientes a la hora de infectar otras cepas. El rango estrecho de hospedero por parte de los fagos de *Klebsiella* ya ha sido reportado, y se atribuye principalmente al tipo capsular, considerado un determinante clave del tropismo viral. En este trabajo se encontró una asociación entre el rango de hospedero y el K locus, pero esta asociación no fue suficiente para explicar por completo la susceptibilidad de todas las cepas

ensayadas. El rango de hospedero tampoco se logró explicar por el antígeno O, otro receptor de superficie de *K. pneumoniae*. Es probable que otros antígenos de superficie u otros factores como los mecanismos de defensa antifagos estén dictaminando el tropismo viral. De manera notable, a pesar de que los KPs solamente lisan a 1 de cada 10 cepas, fueron capaces de infectar a una cepa de *K. oxytoca*, bacteria del mismo género pero distinta especie. Aunque individualmente los fagos presentan un rango estrecho, en total, más de la mitad de las cepas clínicas fueron susceptibles a al menos uno de los fagos KPs de la colección, y un tercio de estas bacterias susceptibles eran de origen urinario. Esta cobertura se alcanzó probablemente gracias a la inclusión de una colección diversa y de gran tamaño. Para el caso de los EPs, solamente un tercio de la colección fue susceptible, entre las cuales se encontraban cepas uropatógenas de todos los filogrupos de *E. coli*. Se plantea que esta cobertura podría incrementar si se probara una colección de mayor tamaño y diversidad.

A partir de los resultados obtenidos sobre el rango de hospedero, se seleccionaron los fagos candidatos KP4, KP9, KP13 y EP1 para una caracterización más profunda. Se evaluó su estabilidad térmica y a distintos valores de pH. Todos los fagos resultaron ser estables tras una incubación de 1 hora en un rango de temperaturas entre 4 y 42°C. Además, KP4 y EP1 mantuvieron su título viral tras la incubación a 60°C, teniendo un rango de estabilidad térmica más amplio. También se estudió la estabilidad en un rango de valores de pH desde 5 a 11 durante el mismo tiempo de incubación. Todos los fagos se presentaron estables entre pH 5 y 9, mientras que a pH 11 se constató una tendencia a la disminución de todos los títulos virales. Estos resultados concuerdan con lo previamente reportado en la bibliografía, donde la incubación a temperaturas elevadas y valores de pH extremos causan una disminución del título viral.

Para esta selección de fagos también se estudió la dinámica de infección con sus respectivas cepas hospederas (o *host*). Al incubar los fagos con dichas cepas a distintas multiplicidades de infección (MOI), se observó que todos fueron capaces de controlar el crecimiento bacteriano en comparación con un control no infectado. Sin embargo, la eficiencia de cada fago fue diferente según la condición estudiada. Esta diferencia se analizó mediante el índice de centroide (IC), un método cuantitativo que permite evaluar la eficiencia de un fago para lisar una cepa determinada. Se determinó entonces, que el fago EP1 fue el más eficiente para lisar su *host* de manera dosis dependiente. Por el contrario, KP13 fue el fago menos eficiente, con valores de IC más cercanos a cero, presentando mayor eficiencia a MOI alta. En el caso de

KP4, el valor del IC se mantuvo idéntico independientemente de la MOI utilizada, mientras que para el caso de KP9, se observó una mayor eficiencia a una MOI más baja. Con el objetivo de comprender en mayor profundidad la dinámica de infección de cada fago, aún resta realizar ensayos de curvas de infección sobre cepas circulantes de relevancia clínica. Asimismo, para determinar parámetros clave del ciclo infeccioso, como el período de latencia, el período de eclipse y el tamaño de la progenie, se propone realizar curvas *one-step* para los cuatro fagos. La información obtenida a partir de estos ensayos permitirá caracterizar con mayor precisión los perfiles y comportamientos de los fagos en las curvas de infección previamente analizadas. Asimismo, resultaría de interés repetir las curvas de infección utilizando diferentes matrices. Dado que la eficiencia lítica de los fagos puede variar según el entorno en el que interactúan la bacteria y el fago, sería pertinente evaluar su dinámica en orina artificial, considerando que el objetivo es combatir infecciones urinarias y que dichas condiciones se asemejan más a las encontradas en el ámbito clínico.

Con el fin de conocer la morfología viral de los fagos candidatos, se llevó a cabo la microscopía electrónica de transmisión para cada uno de ellos. KP4, KP9, KP13 y EP1 presentan morfología tipo myovirus (fagos de simetría binaria, con cabeza icosaédrica y cola contráctil), típica de los fagos de la clase *Caudoviricetes*. KP4 y KP9 cuentan con cabezas prolatas, mientras que KP13 y EP1 cuentan con cabezas isométricas. En cuanto al tamaño de las partículas virales, KP4 y KP9 presentan viriones de aproximadamente 220 nm, mientras que KP13 y EP1 presentan viriones de tamaños cercanos a los 170 y 200 nm respectivamente.

Debido a que los biofilms dificultan la erradicación efectiva de ciertas infecciones, resultó de interés evaluar la capacidad de los fagos de la colección para eliminar biofilms bacterianos preformados. Los fagos KP4, KP9 y KP13 no lograron reducir la biomasa de los biofilms generados por sus respectivas cepas hospederas. En cambio, EP1 fue capaz de reducir la biomasa del biofilm de su cepa hospedera en aproximadamente un 50%. Además de estos cuatro fagos candidatos, se incluyeron en el ensayo otros fagos (KP5, KP6, KP7, KP8, KP10, EP5, EP7 y EP9), sospechosos de poseer depolimerasas debido a su morfología de placa de lisis con halo. Si bien estos fagos no fueron priorizados inicialmente por su estrecho rango de hospedero, se consideró relevante incorporarlos en este estudio. Tal como se esperaba, todos demostraron actividad antibiofilm, y la reducción fue en promedio, del 50% de la biomasa del biofilm formado por las cepas hospederas. En particular, el genoma del fago KP8 fue secuenciado, y se identificaron dos proteínas hipotéticas candidatas a poseer actividad

depolimerasa. Como consecuencia de estos resultados, la colección contiene ejemplares con actividad antibiofilm, lo cual resulta promisorio para su aplicación en biocontrol, ya sea mediante fagoterapia o, por ejemplo, en el tratamiento de superficies tales como dispositivos médicos. Para conferir mayor solidez a la evidencia sobre su capacidad antibiofilm, resta aún evaluar su actividad frente a cepas circulantes de relevancia clínica. En cuanto al fago EP1, es necesario determinar si las cepas clínicas susceptibles a este fago son capaces de formar biofilms. En caso afirmativo, se plantea estudiar su actividad antibiofilm y compararla con la observada frente a su cepa hospedera de referencia.

Por último, se realizó la caracterización genómica de los fagos seleccionados, aunque se prevé completar dicho análisis para la totalidad de la colección. Excepto en el caso de KP13, se logró ensamblar un único contig por fago, y se estimó la completitud de cada uno. Los genomas obtenidos presentaron alta calidad, con un porcentaje de completitud estimado superior al 98%, y tamaños que oscilan entre 45 y 177 kpb, siendo la mayoría superiores a los 100 kpb. A todos los fagos se les asignó una clasificación taxonómica, siendo *Slopekvirus* el género más representado. También se identificaron fagos pertenecientes a los géneros *Kolesnikvirus*, *Vequintavirus*, *Gansuvirus* y *Sugarlandvirus*. Todos los genomas corresponden a nuevas especies dentro de sus respectivos géneros, con excepción de EP1, que fue asignado a una especie previamente descrita, representada por un aislado reciente proveniente de Japón. Ninguno de los fagos analizados hasta el momento contiene genes asociados a resistencia antimicrobiana o factores de virulencia, lo cual es un criterio esencial para su potencial aplicación terapéutica. Asimismo, se examinó la presencia de genes relacionados con la lisogenia. Ninguno de los fagos cuenta con dichos genes, con excepción de EP1, que presentó una transposasa anotada automáticamente. No obstante, no se detectaron integrasas, excisionasas ni proteínas represoras, lo que sugiere fuertemente que se trata de un fago lítico estricto. En conjunto, el análisis genómico respalda que todos los fagos caracterizados constituyen buenos candidatos para su utilización en terapia fágica.

Además de la caracterización individual de cada bacteriófago, se plantea como próxima etapa la formulación de cócteles fágicos que maximicen el efecto antibacteriano de estos virus. Con la información obtenida en el presente trabajo, es posible evaluar combinaciones de fagos que puedan generar efectos sinérgicos, ya sea en formulaciones dirigidas a una especie bacteriana específica, o mediante la combinación de fagos activos contra *K. pneumoniae* y *E. coli*. Asimismo, se abre la posibilidad de explorar la interacción de estos fagos con otros agentes

antimicrobianos, como los antibióticos. En ciertos casos, los fagos pueden actuar de manera sinérgica con antibióticos, lo que podría potenciar la capacidad antibiofilm, o bien reducir la probabilidad de surgimiento de cepas resistentes durante la infección viral.

En suma, el presente trabajo constituye uno de los primeros estudios realizados en Uruguay enfocados en la investigación de bacteriófagos activos contra patógenos humanos, y representa el primer proyecto académico en aislar y caracterizar fagos locales como paso inicial en la identificación de potenciales agentes bioterapéuticos. Como resultado, se generó y caracterizó una colección diversa de fagos, con actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas humanas, con aplicación potencial no sólo en terapia fágica, sino también en otras estrategias de control bacteriano, como la desinfección de superficies.

Además de la conformación de la colección de fagos, se desarrollaron y estandarizaron numerosos protocolos fundamentales para la caracterización fenotípica y genotípica de fagos, lo cual sienta las bases para futuros estudios en el área.

El principal aporte de esta tesis de maestría radica en el avance del conocimiento básico sobre los bacteriófagos presentes en nuestro entorno y en la producción de información científica abierta, accesible y sujeta a evaluación rigurosa. De este modo, esta investigación contribuye significativamente al desarrollo de capacidades nacionales en un área emergente con alto potencial biotecnológico.

Referencias bibliográficas

1. Founou RC, Founou LL, Essack SY. Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis. Butaye P, editor. PLOS ONE. 2017;12(12):e0189621. DOI: 10.1371/journal.pone.0189621
2. Ho CS, Wong CTH, Aung TT, Lakshminarayanan R, Mehta JS, Rauz S, et al. Antimicrobial resistance: a concise update. Lancet Microbe. 2025;6(1):100947. DOI: 10.1016/j.lanmic.2024.07.010
3. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. Lancet Lond Engl. 2022;399(10325):629-55. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0
4. Tang KWK, Millar BC, Moore JE. Antimicrobial Resistance (AMR). Br J Biomed Sci. 2023;80:11387. DOI: 10.3389/bjbs.2023.11387
5. Chokshi A, Sifri Z, Cennimo D, Horng H. Global Contributors to Antibiotic Resistance. J Glob Infect Dis. 2019;11(1):36-42. DOI: 10.4103/jgid.jgid_110_18
6. Dadgostar P. Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. Infect Drug Resist. 2019;Volume 12:3903-10. DOI: 10.2147/IDR.S234610
7. Marino A, Maniaci A, Lentini M, Ronsivalle S, Nunnari G, Cocuzza S, et al. The Global Burden of Multidrug-Resistant Bacteria. Epidemiología. 2025;6(2):21. DOI: 10.3390/epidemiologia6020021
8. Katz L, Baltz RH. Natural product discovery: past, present, and future. J Ind Microbiol Biotechnol. 2016;43(2-3):155-76. DOI: 10.1007/s10295-015-1723-5
9. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. Curr Opin Microbiol. 2019;51:72-80. DOI: 10.1016/j.mib.2019.10.008
10. Gelpi A, Gilbertson A, Tucker JD. Magic bullet: Paul Ehrlich, Salvarsan and the birth of venereology. Sex Transm Infect. 2015;91(1):68.2-69. DOI: 10.1136/sextrans-2014-051779
11. Embley TM, Stackebrandt E. THE MOLECULAR PHYLOGENY AND SYSTEMATICS OF THE ACTINOMYCETES. Annu. Rev. Microbiol. 1994;48:257-89. DOI: 10.1146/annurev.mi.48.100194.001353
12. Traxler MF, Kolter R. Natural products in soil microbe interactions and evolution. Nat Prod Rep. 2015;32(7):956-70. DOI: 10.1039/C5NP00013K
13. Aminov RI. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. Front Microbiol. 2010;1. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00134
14. Lack of innovation set to undermine antibiotic performance and health gains. Organización Mundial de la Salud. 2022 [Internet]. [citado 11 de mayo de 2025]. Disponible en : <https://www.who.int/news/item/22-06-2022-22-06-2022-lack-of-innovation-set-to-undermine-antibiotic-performance-and-health-gains>
15. Lay K. Drug-resistant infections are on the rise – so why aren't we getting any new antibiotics? The Guardian. 2024 [Internet]. [citado 11 de mayo de 2025]. Disponible en: <https://www.theguardian.com/global-development/2024/sep/16/why-arent-we-getting-any-new-antibiotics-antimicrobial-resistance>

16. United Nations Environment Programme. Bracing for Superbugs: Strengthening Environmental Action in the One Health Response to Antimicrobial Resistance. United Nations; 2023.
17. Stennett HL, Back CR, Race PR. Derivation of a Precise and Consistent Timeline for Antibiotic Development. *Antibiotics*. 2022;11(9):1237. DOI: 10.3390/antibiotics11091237
18. Morrison L, Zembower TR. Antimicrobial Resistance. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2020;30(4):619-35. DOI: 10.1016/j.giec.2020.06.004
19. Intrinsic Resistance - an overview | ScienceDirect Topics. Science Direct [Internet]. [citado 15 de mayo de 2025]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/intrinsic-resistance>
20. Marston HD, Dixon DM, Knisely JM, Palmore TN, Fauci AS. Antimicrobial Resistance. *JAMA*. 2016;316(11):1193. DOI: 10.1001/jama.2016.11764
21. Sandoval-Motta S, Aldana M. Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. *WIREs Syst Biol Med*. 2016;8(3):253-67. DOI: 10.1002/wsbm.1335
22. Motta SS, Cluzel P, Aldana M. Adaptive Resistance in Bacteria Requires Epigenetic Inheritance, Genetic Noise, and Cost of Efflux Pumps. *PLoS ONE*. 2015;10(3):e0118464. DOI: 10.1371/journal.pone.0118464
23. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*. 2002. p. 167–193. DOI: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002
24. Costerton W, Lewandowski Z. Microbial Biofilms. *Annu. Rev. Microbiol*. 1995. 49:711-45. DOI: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431
25. Olsen I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34(5):877-86. DOI: 10.1007/s10096-015-2323-z
26. Wood TK, Knabel SJ, Kwan BW. Bacterial Persister Cell Formation and Dormancy. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(23):7116-21. DOI: 10.1128/AEM.02636-13
27. Liu HY, Prentice EL, Webber MA. Mechanisms of antimicrobial resistance in biofilms. *Npj Antimicrob Resist*. 2024;2(1):1-10. DOI: 10.1038/s44259-024-00046-3
28. Institute for Health Metrics and Evaluation [Internet]. [citado 3 de junio de 2025]. MICROBE. Disponible en: <https://vizhub.healthdata.org/microbe>
29. Reza A, Sutton JM, Rahman KM. Effectiveness of Efflux Pump Inhibitors as Biofilm Disruptors and Resistance Breakers in Gram-Negative (ESKAPEE) Bacteria. *Antibiotics*. 2019;8(4):229. DOI: 10.3390/antibiotics8040229
30. WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024: Bacterial Pathogens of Public Health Importance, to Guide Research, Development, and Strategies to Prevent and Control Antimicrobial Resistance. 1st ed. Geneva: World Health Organization; 2024. 1 p.
31. Alonso L, Gagliano G, González A, Grill F, Nabón A, Seija V. PLAN NACIONAL DE ACCIÓN CONTRA LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA: Abordaje desde la Salud Pública. Resistencia Antimicrobiana. 2018.

32. Marquez C, Ingold A, Echeverría N, Acevedo A, Vignoli R, García-Fulgueiras V, et al. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Uruguay: infection control and molecular characterization. *New Microbes New Infect.* 2014;2(3):58-63. DOI: 10.1002/nmi2.40
33. Ministerio de Salud Pública. Infecciones asociadas a la atención en salud: Resistencia antimicrobiana. Resultados de la vigilancia: Informe Anual. 2024.
34. Al Lawati H, Blair BM, Larnard J. Urinary Tract Infections: Core Curriculum 2024. *Am J Kidney Dis.* 2024;83(1):90-100. DOI: 10.1053/j.ajkd.2023.08.009
35. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13(5):269-84. DOI: 10.1038/nrmicro3432
36. He Y, Zhao J, Wang L, Han C, Yan R, Zhu P, et al. Epidemiological trends and predictions of urinary tract infections in the global burden of disease study 2021. *Sci Rep.* 2025;15:4702. DOI: 10.1038/s41598-025-89240-5
37. Millner R, Becknell B. Urinary Tract Infections. *Pediatr Clin North Am.* 2019;66(1):1-13. DOI: 10.1016/j.pcl.2018.08.002
38. Geerlings S. Clinical Presentations and Epidemiology of Urinary Tract Infections. *Clinical Microbiology.* 2016;4(5). DOI: 10.1128/microbiolspec.uti-0002-2012
39. Klein RD, Hultgren SJ. Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host-pathogen interactions and new treatment strategies. *Nat Rev Microbiol.* 2020;18(4):211-26. DOI: 10.1038/s41579-020-0324-0
40. Zhou Y, Zhou Z, Zheng L, Gong Z, Li Y, Jin Y, et al. Urinary Tract Infections Caused by Uropathogenic *Escherichia coli*: Mechanisms of Infection and Treatment Options. *Int J Mol Sci.* 2023;24(13):10537. DOI: 10.3390/ijms241310537
41. Rosen DA, Hooton TM, Stamm WE, Humphrey PA, Hultgren SJ. Detection of Intracellular Bacterial Communities in Human Urinary Tract Infection. Opal SM, editor. *PLoS Med.* 2007;4(12):e329. DOI: 10.1371/journal.pmed.0040329
42. Robino L, Scavone P, Araujo L, Algorta G, Zunino P, Vignoli R. Detection of intracellular bacterial communities in a child with *Escherichia coli* recurrent urinary tract infections. *Pathog Dis.* 2013;68(3):78-81. DOI: 10.1111/2049-632X.12047
43. Robino L, Scavone P, Araujo L, Algorta G, Zunino P, Pérez MC, et al. Intracellular Bacteria in the Pathogenesis of *Escherichia coli* Urinary Tract Infection in Children. *Clin Infect Dis.* 2014;59(11):e158-64. DOI: 10.1093/cid/ciu634
44. Organización Mundial de la Salud. Prevención de las infecciones nosocomiales: Guía Práctica. Segunda Edición. 2003.
45. Clokie MRJ, Millard AD, Letarov AV, Heaphy S. Phages in nature. *Bacteriophage.* 2011;1(1):31-45. DOI: 10.4161/bact.1.1.14942
46. Hatfull GF, Hendrix RW. Bacteriophages and their genomes. *Curr Opin Virol.* 2011;1(4):298-303. DOI: 10.1016/j.coviro.2011.06.009
47. Venturini C, Petrovic Fabijan A, Fajardo Lubian A, Barbirz S, Iredell J. Biological foundations of successful bacteriophage therapy. *EMBO Mol Med.* 2022;14(7):e12435. DOI:

48. Golkar Z, Bagasra O, Pace DG. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *J Infect Dev Ctries*. 2014;8(02):129-36. DOI: 10.3855/jidc.3573
49. Duckworth DH. Who discovered bacteriophage? *Bacteriol Rev*. 1976;40(4):793-802. DOI: 10.1128/br.40.4.793-802.1976
50. Moineau S. Bacteriophage. En: *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. Elsevier; 2013. p. 280-3. DOI: 10.1016/B978-0-12-374984-0.00131-5
51. Turner D, Shkoporov AN, Lood C, Millard AD, Dutilh BE, Alfenas-Zerbini P, et al. Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee. *Arch Virol*. 2023;168(2):74. DOI: 10.1007/s00705-022-05694-2
52. Chanishvili N. Phage Therapy—History from Twort and d'Herelle Through Soviet Experience to Current Approaches. En: *Advances in Virus Research*. Elsevier; 2012. p. 3-40. DOI: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3
53. Gordillo Altamirano FL, Barr JJ. Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(2):e00066-18. DOI: 10.1128/CMR.00066-18
54. Dedrick RM, Guerrero Bustamante CA, Garlena RA, Pinches RS, Cornely K, Hatfull GF. Mycobacteriophage ZoeJ: A broad host-range close relative of mycobacteriophage TM4. *Tuberculosis*. 2019;115:14-23. DOI: 10.1016/j.tube.2019.01.002
55. Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garlena RA, Russell DA, Ford K, Harris K, et al. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat Med*. 2019;25(5):730-3. DOI: 10.1038/s41591-019-0437-z
56. Suh GA, Lodise TP, Tamma PD, Knisely JM, Alexander J, Aslam S, et al. Considerations for the Use of Phage Therapy in Clinical Practice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2022;66(3):e02071-21. DOI: 10.1128/aac.02071-21
57. Górski A, Borysowski J, Międzybrodzki R. Phage Therapy: Towards a Successful Clinical Trial. *Antibiotics*. 2020;9(11):827. DOI: 10.3390/antibiotics9110827
58. Górski A, Międzybrodzki R, Borysowski J, editores. *Phage Therapy: A Practical Approach*. Cham: Springer International Publishing; 2019. DOI: 10.1007/978-3-030-26736-0
59. Pirnay JP, Kutter E. Bacteriophages: it's a medicine, Jim, but not as we know it. *Lancet Infect Dis*. 2021;21(3):309-11. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30464-3
60. Primera Jornada Médica sobre Avances de la Fagoterapia en Uruguay [Internet]. 2025 [citado 12 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=ct6XcyteDIU>
61. Lam MMC, Wick RR, Watts SC, Cerdeira LT, Wyres KL, Holt KE. A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex. *Nat Commun*. 2021;12(1). DOI: 10.1038/s41467-021-24448-3
62. Wick RR, Heinz E, Holt KE, Wyres KL. Kaptive Web: User-Friendly Capsule and Lipopolysaccharide Serotype Prediction for *Klebsiella* Genomes. Diekema DJ, editor. *J Clin Microbiol*. 2018;56(6):e00197-18. DOI: 10.1128/JCM.00197-18

63. Daubie V, Chalhoub H, Blasdel B, Dahma H, Merabishvili M, Glonti T, et al. Determination of phage susceptibility as a clinical diagnostic tool: A routine perspective. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:1000721. DOI: 10.3389/fcimb.2022.1000721
64. Bonilla N, Barr JJ. Phage on Tap: A Quick and Efficient Protocol for the Preparation of Bacteriophage Laboratory Stocks. En: Moya A, Pérez Brocal V, editores. *The Human Virome*. New York, NY: Springer New York; 2018. p. 37-46. (Methods in Molecular Biology; vol. 1838). DOI: 10.1007/978-1-4939-8682-8_4
65. Kutter E. Phage Host Range and Efficiency of Plating. En: Clokie MRJ, Kropinski AM, editores. *Bacteriophages*. Totowa, NJ: Humana Press; 2009. p. 141-9. (Walker JM, ed. *Methods in Molecular Biology*; vol. 501). DOI: 10.1007/978-1-60327-164-6_14
66. Home - GraphPad [Internet]. [citado 9 de abril de 2025]. Disponible en: <https://www.graphpad.com/>
67. Hosseini N, Chehreghani M, Moineau S, Charette SJ. Centroid of the bacterial growth curves: a metric to assess phage efficiency. *Commun Biol.* 2024;7(1):673. DOI: 10.1038/s42003-024-06379-z
68. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):676-82. DOI: 10.1038/nmeth.2019
69. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods.* 2000;40(2):175-9. DOI: 10.1016/s0167-7012(00)00122-6
70. Cruz Jorge E, Navarro Martinez N, González MJ, Sánchez SV, Robino L, Morales JO, et al. Gold-, Silver- and Magnesium-Doped Zinc Oxide Nanoparticles Prevents The Formation of and Eradicates Bacterial Biofilms. *Nanomed.* 2023;18(10):803-18. DOI: 10.2217/nnm-2022-0239
71. Wick R. rrrwick/Filtlong [Internet]. 2025 [citado 7 de abril de 2025]. Disponible en: <https://github.com/rrwick/Filtlong>
72. Kolmogorov M. mikolmogorov/Flye [Internet]. 2025 [citado 7 de abril de 2025]. Disponible en: <https://github.com/mikolmogorov/Flye>
73. nanoporetech/medaka [Internet]. Oxford Nanopore Technologies; 2025 [citado 7 de abril de 2025]. Disponible en: <https://github.com/nanoporetech/medaka>
74. ablab/quast [Internet]. Ex Center for Algorithmic Biotechnology; 2025 [citado 7 de abril de 2025]. Disponible en: <https://github.com/ablab/quast>
75. Bouras G, Nepal R, Houtak G, Psaltis AJ, Wormald PJ, Vreugde S. Pharokka: a fast scalable bacteriophage annotation tool. Marschall T, editor. *Bioinformatics.* 2023;39(1):btac776. DOI: 10.1093/bioinformatics/btac776
76. McNair K, Zhou C, Dinsdale EA, Souza B, Edwards RA. PHANOTATE: a novel approach to gene identification in phage genomes. *Bioinformatics.* 2019;35(22):4537-42. DOI: 10.1093/bioinformatics/btz265
77. Chan PP, Lin BY, Mak AJ, Lowe TM. tRNAscan-SE 2.0: improved detection and functional classification of transfer RNA genes. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(16):9077-96. DOI: 10.1093/nar/gkab688

78. Laslett D, Canback B. ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(1):11-6. DOI: 10.1093/nar/gkh152
79. Bland C, Ramsey TL, Sabree F, Lowe M, Brown K, Kyrpides NC, et al. CRISPR recognition tool (CRT): a tool for automatic detection of clustered regularly interspaced palindromic repeats. *BMC Bioinformatics.* 2007;8:209. DOI: 10.1186/1471-2105-8-209
80. Terzian P, Olo Ndela E, Galiez C, Lossouarn J, Pérez Bucio RE, Mom R, et al. PHROG: families of prokaryotic virus proteins clustered using remote homology. *NAR Genomics Bioinforma.* 2021;3(3):lqab067. DOI: 10.1093/nargab/lqab067
81. Chen L, Yang J, Yu J, Yao Z, Sun L, Shen Y, et al. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(suppl_1):D325-8. DOI: 10.1093/nar/gki008
82. Alcock BP, Raphenya AR, Lau TTY, Tsang KK, Bouchard M, Edalatmand A, et al. CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1):D517-25. DOI: 10.1093/nar/gkz935
83. Steinegger M, Söding J. MMseqs2 enables sensitive protein sequence searching for the analysis of massive data sets. *Nat Biotechnol.* 2017;35(11):1026-8. DOI: 10.1038/nbt.3988
84. Larralde M, Zeller G. PyHMMER: a Python library binding to HMMER for efficient sequence analysis. *Bioinformatics.* 2023;39(5):btad214. DOI: 10.1093/bioinformatics/btad214
85. Cook R, Brown N, Redgwell T, Rihtman B, Barnes M, Clokie M, et al. INfrastructure for a PHAge REference Database: Identification of Large-Scale Biases in the Current Collection of Cultured Phage Genomes. *PHAGE New Rochelle N.* 2021;2(4):214-23. DOI: 10.1089/phage.2021.0007
86. Ondov B, Treangen T, Melsted P, Mallonee A, Bergman N, Koren S, et al. Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash. *Genome Biology.* 2016; 17:132. DOI: 10.1186/s13059-016-0997-x
87. Shimoyama Y. pyCirclize: Circular visualization in Python [Internet]. 2022 [citado 7 de abril de 2025]. Disponible en: <https://github.com/moshi4/pyCirclize>
88. Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M. ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods.* 2022;19(6):679-82. DOI: 10.1038/s41592-022-01488-1
89. Nayfach S, Camargo AP, Schulz F, Eloie-Fadrosch E, Roux S, Kyrpides NC. CheckV assesses the quality and completeness of metagenome-assembled viral genomes. *Nat Biotechnol.* 2021;39(5):578-85. DOI: 10.1038/s41587-020-00774-7
90. amillard. amillard/tax_myPHAGE [Internet]. 2025 [citado 7 de abril de 2025]. Disponible en: https://github.com/amillard/tax_myPHAGE
91. Attrill EL, Łapińska U, Westra ER, Harding SV, Pagliara S. Slow growing bacteria survive bacteriophage in isolation. *ISME Commun.* 2023;3(1):95. DOI: 10.1038/s43705-023-00299-5
92. Wu Y, Wang R, Xu M, Liu Y, Zhu X, Qiu J, et al. A Novel Polysaccharide Depolymerase Encoded by the Phage SH-KP152226 Confers Specific Activity Against Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* via Biofilm Degradation. *Front Microbiol.* 2019;10:2768. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02768

93. Cui X, Du B, Feng J, Feng Y, Fan Z, Chen J, et al. A novel phage carrying capsule depolymerase effectively relieves pneumonia caused by multidrug-resistant *Klebsiella aerogenes*. *J Biomed Sci*. 2023;30(1):75. DOI: 10.1186/s12929-023-00946-y
94. Pires DP, Oliveira H, Melo LDR, Sillankorva S, Azeredo J. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(5):2141-51. DOI: 10.1007/s00253-015-7247-0
95. Beamud B, García-González N, Gómez-Ortega M, González-Candelas F, Domingo-Calap P, Sanjuan R. Genetic determinants of host tropism in *Klebsiella* phages. *Cell Rep*. 2023;42(2):112048. DOI: 10.1016/j.celrep.2023.112048
96. Le Bris J, Chen N, Supandy A, Rendueles O, Van Tyne D. Phage therapy for *Klebsiella pneumoniae*: Understanding bacteria–phage interactions for therapeutic innovations. Criss AK, editor. *PLOS Pathog*. 2025;21(4):e1012971. DOI: 10.1371/journal.ppat.1012971
97. Ferriol-González C, Domingo-Calap P. Phages for Biofilm Removal. *Antibiotics*. 2020;9(5):268. DOI: 10.3390/antibiotics9050268
98. Rothschild-Rodriguez D, Lambon KS, Latka A, Costa AR, Mantzouratou A, King C, et al. *KlebPhaCol*: A community-driven resource for *Klebsiella* research identified a novel gut phage order associated with the human gut. *Microbiology*; 2024. DOI: 10.1101/2024.12.02.626457
99. Gibson SB, Green SI, Liu CG, Salazar KC, Clark JR, Terwilliger AL, et al. Constructing and Characterizing Bacteriophage Libraries for Phage Therapy of Human Infections. *Front Microbiol*. 2019;10:2537. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02537
100. Boeckaerts D, Stock M, Ferriol-González C, Oteo-Iglesias J, Sanjuán R, Domingo-Calap P, et al. Prediction of *Klebsiella* phage-host specificity at the strain level. *Nat Commun*. 2024;15(1):4355. DOI: 10.1038/s41467-024-48675-6
101. Chen H, Liu H, Gong Y, Dunstan RA, Ma Z, Zhou C, et al. A *Klebsiella*-phage cocktail to broaden the host range and delay bacteriophage resistance both in vitro and in vivo. *Npj Biofilms Microbiomes*. 2024;10(1):127. DOI: 10.1038/s41522-024-00603-8
102. Maffei E, Shaidullina A, Burkolter M, Heyer Y, Estermann F, Druelle V, et al. Systematic exploration of *Escherichia coli* phage–host interactions with the BASEL phage collection. Barr J, editor. *PLOS Biol*. 2021;19(11):e3001424. DOI: 10.1371/journal.pbio.3001424
103. Bucher MJ, Czyż DM. Phage against the Machine: The SIE-ence of Superinfection Exclusion. *Viruses*. 2024;16(9):1348. DOI: 10.3390/v16091348
104. Cheetham MJ, Huo Y, Stroyakovski M, Cheng L, Wan D, Dell A, et al. Specificity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* phage-encoded capsule depolymerases. Santini JM, editor. *Essays Biochem*. 2024;68(5):661-77. DOI: 10.1042/EBC20240015
105. Chegini Z, Khoshbayan A, Vesal S, Moradabadi A, Hashemi A, Shariati A. Bacteriophage therapy for inhibition of multi drug-resistant uropathogenic bacteria: a narrative review. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2021;20(1):30. DOI: 10.1186/s12941-021-00433-y
106. Leclercq SO, Branger M, Smith DGE, Germon P. Lipopolysaccharide core type diversity in the *Escherichia coli* species in association with phylogeny, virulence gene repertoire and distribution of type VI secretion systems. *Microb Genomics*. 2021;7(9). DOI: 10.1099/mgen.0.000652

107. Fong K, Wong CWY, Wang S, Delaquis P. How Broad Is Enough: The Host Range of Bacteriophages and Its Impact on the Agri-Food Sector. *PHAGE*. 2021;2(2):83-91. DOI: 10.1089/phage.2020.0036
108. Shamsuzzaman M, Kim S, Kim J. Bacteriophage as a novel therapeutic approach for killing multidrug-resistant *Escherichia coli* ST131 clone. *Front Microbiol*. 2024;15:1455710. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1455710
109. Zaki BM, Fahmy NA, Aziz RK, Samir R, El-Shibiny A. Characterization and comprehensive genome analysis of novel bacteriophage, vB_Kpn_ZCKp20p, with lytic and anti-biofilm potential against clinical multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13:1077995. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1077995
110. Markusková B, Elnwrani S, Andrezál M, Sedláčková T, Szemes T, Slobodníková L, et al. Characterization of bacteriophages infecting multidrug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Arch Virol*. 2024;169(7):142. DOI: 10.1007/s00705-024-06063-x
111. Yoo S, Lee KM, Kim N, Vu TN, Abadie R, Yong D. Designing phage cocktails to combat the emergence of bacteriophage-resistant mutants in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Van Tyne D, editor. *Microbiol Spectr*. 2024;12(1):e01258-23. DOI: 10.1128/spectrum.01258-23
112. Hesse S, Rajaure M, Wall E, Johnson J, Bliskovsky V, Gottesman S, et al. Phage Resistance in Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST258 Evolves via Diverse Mutations That Culminate in Impaired Adsorption. Hatfull GF, editor. *mBio*. 2020;11(1):e02530-19. DOI: 10.1128/mBio.02530-19
113. Luque A, Benler S, Lee DY, Brown C, White S. The Missing Tailed Phages: Prediction of Small Capsid Candidates. *Microorganisms*. 2020;8(12):1944. DOI: 10.3390/microorganisms8121944
114. Guo Z, Liu M, Zhang D. Potential of phage depolymerase for the treatment of bacterial biofilms. *Virulence*. 2023;14(1):2273567. DOI: 10.1080/21505594.2023.2273567
115. Vukotic G, Obradovic M, Novovic K, Di Luca M, Jovcic B, Fira D, et al. Characterization, Antibiofilm, and Depolymerizing Activity of Two Phages Active on Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Front Med*. 2020;7:426. DOI: 10.3389/fmed.2020.00426
116. Latka A, Drulis-Kawa Z. Advantages and limitations of microtiter biofilm assays in the model of antibiofilm activity of *Klebsiella* phage KP34 and its depolymerase. *Sci Rep*. 2020;10(1):20338. DOI: 10.1038/s41598-020-77198-5
117. Pope WH, Bowman CA, Russell DA, Jacobs-Sera D, Asai DJ, Cresawn SG, et al. Whole genome comparison of a large collection of mycobacteriophages reveals a continuum of phage genetic diversity. *eLife*. 2015;4. DOI: 10.7554/elife.06416
118. Estrada Bonilla B, Costa AR, Van Den Berg DF, Van Rossum T, Hagedoorn S, Walinga H, et al. Genomic characterization of four novel bacteriophages infecting the clinical pathogen *Klebsiella pneumoniae*. *DNA Res*. 2021;28(4). DOI: 10.1093/dnares/dsab013
119. Dalmaso M, Strain R, Neve H, Franz CMAP, Cousin FJ, Ross RP, et al. Three New *Escherichia coli* Phages from the Human Gut Show Promising Potential for Phage Therapy. Schuch R, editor. *PLOS ONE*. 2016;11(6):e0156773. DOI: 10.1371/journal.pone.0156773
120. Cook BW, Hynes AP. Re-evaluating what makes a phage unsuitable for therapy. *Npj Antimicrob Resist*. 2025;3(1):45. DOI: 10.1038/s44259-025-00117-z

121. Cortés-Martín A, Buttimer C, Pozhydaieva N, Hille F, Shareefdeen H, Bolocan AS, et al. Isolation and characterization of *Septuagintavirus* ; a novel clade of *Escherichia coli* phages within the subfamily *Vequintavirinae*. Denes TG, editor. Microbiol Spectr. 2024;12(9):e00592-24. DOI: 10.1128/spectrum.00592-24
122. Bailly-Bechet M, Vergassola M, Rocha E. Causes for the intriguing presence of tRNAs in phages. Genome Res. 2007;17(10):1486-95. DOI: 10.1101/gr.6649807
123. Azam AH, Kondo K, Chihara K, Nakamura T, Ojima S, Nie W, et al. Evasion of antiviral bacterial immunity by phage tRNAs. Nat Commun. 2024;15(1). DOI: 10.1038/s41467-024-53789-y
124. Li J, Zhou J, Wu Y, Yang S, Tian D. GC-Content of Synonymous Codons Profoundly Influences Amino Acid Usage. G3 GenesGenomesGenetics. 2015;5(10):2027-36. DOI: 10.1534/g3.115.019877
125. Turner D, Kropinski AM, Adriaenssens EM. A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. Viruses. 2021;13(3):506. DOI: 10.3390/v13030506
126. Smith-Zaitlik T, Shibu P, McCartney AL, Foster G, Hoyles L, Negus D. Extended genomic analyses of the broad-host-range phages vB_KmiM-2Di and vB_KmiM-4Dii reveal slopekviruses have highly conserved genomes. Microbiology. 2022. DOI: 10.1099/mic.0.001247

Apéndice 1: Curvas de crecimiento de las cepas hospederas

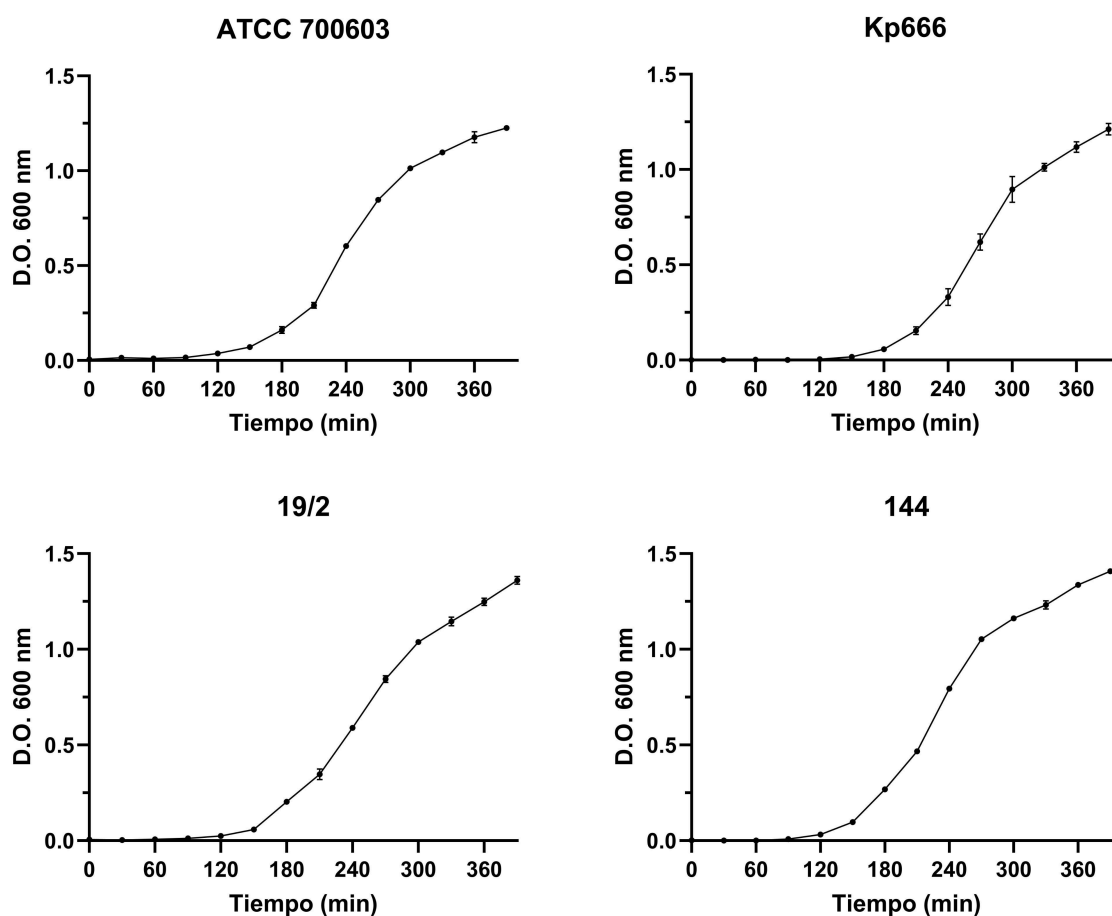


Figura Apéndice 1: Curvas de crecimiento bacteriano de las cepas hospederas (ATCC 700603, Kp666, 19/2 y 144). Se siguió el crecimiento bacteriano monitoreando la densidad óptica (OD) a 600 nm durante 6 horas y media. Para cada cepa, se muestra el promedio de dos réplicas biológicas y el desvío estándar.

Anexo 1: Secuenciación de los aislamientos bacterianos empleados

Las cepas Kp1102, Kp1111, M1443, FQ40565, F312B, F312C, F327B, F327C, Kp19/2, 04Kp29 y 04Kp27 fueron subcultivadas a partir de *criostocks* y se sometieron a un cultivo líquido en medio LB a 37°C, 200 rpm por 20 horas. Posteriormente, se extrajo el ADN genómico mediante el uso del kit comercial Quick-DNA Miniprep Plus Kit (Zymo Research). Este ADN se fragmentó a tamaños de 10 Kb aproximadamente mediante el uso de un dispositivo g (g-tube, Covaris), siguiendo las indicaciones del fabricante. La calidad de la fragmentación se visualizó a través de electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v), utilizando SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) como colorante, y el marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 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 preparación de librerías se realizó con el kit Ligation sequencing gDNA - Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24) (Oxford Nanopore Technologies). 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. Las librerías y la secuenciación fueron realizadas por la Dra. Natalia Echeverría, mi orientadora, con asistencia técnica de Cecilia Portela (Centro de Innovación en Vigilancia Epidemiológica, Institut Pasteur de Montevideo), y de los estudiantes Felipe Victorica y Julieta Gurméndez.

Las lecturas obtenidas por secuenciación fueron filtradas utilizando Filtlong v0.2.1 (1), dejando fuera aquellas con un valor de calidad menor a $Q = 7$. El ensamblaje *de novo* se realizó con Flye v2.9 (2), y dicho ensamblaje fue pulido usando Medaka v1.7.3 (3). La calidad de los contigs obtenidos se evaluó utilizando QUAST v5.2.0 (4). El ensamblado final fue anotado con Prokka v1.14.5 (5). Los ensamblajes de los genomas virales fueron realizados por la Dra. Daniela Megrian (Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur de Montevideo) y el Bach. Sebastián Rey (Laboratorio de Virología Molecular, Universidad de la República).

Referencias bibliográficas Anexo 1

1. Wick R. rrwick/Filtlong [Internet]. 2025 [citado 7 de abril de 2025]. Disponible en: <https://github.com/rrwick/Filtlong>
2. Kolmogorov M. mikolmogorov/Flye [Internet]. 2025 [citado 7 de abril de 2025]. Disponible en: <https://github.com/mikolmogorov/Flye>
3. nanoporetech/medaka [Internet]. Oxford Nanopore Technologies; 2025 [citado 7 de abril de 2025]. Disponible en: <https://github.com/nanoporetech/medaka>
4. ablab/quast [Internet]. Ex Center for Algorithmic Biotechnology; 2025 [citado 7 de abril de 2025]. Disponible en: <https://github.com/ablab/quast>
5. Seeman T. Prokka: a rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics. 15 de julio de 2014; 30(14):2068-9.

Anexo 2: Características fenotípicas de resistencias a antimicrobianos de los aislamientos de *Klebsiella* spp.

Tabla Anexo 2: Fenotipo de resistencia a antimicrobianos de los aislamientos de *Klebsiella* spp. Se describe para cada aislamiento utilizado en el presente trabajo, las resistencias frente a las principales familias de antibióticos: beta-lactámicos (penicilinas, cefalosporinas y carbapenems), aminoglucósidos, quinolonas, fluoroquinolonas y sulfonamidas. También se detalla entre paréntesis la concentración inhibitoria mínima ($\mu\text{g/mL}$), en caso de contar con esa información.

Aislamiento	TZP	CEP	FOX	CTX	CAZ	FEP	IPM	MEM	AMK	GEN	NAL	CIP	SXT
Kp1102	S (16)	R (≥ 64)	S (≤ 4)	R (≥ 64)	R (≥ 64)	R (16)*	S (≤ 1)	S ($\leq 0,25$)	S (≤ 2)	S (≤ 1)	R (≥ 32)	R (≥ 4)	R (≥ 320)
Kp1111	R (≥ 128)	R (≥ 64)	S (≤ 4)	R (≥ 64)	R (≥ 64)	R (16)*	S (≤ 1)	S ($\leq 0,25$)	S (≤ 2)	S (≤ 1)	R (≥ 32)	R (≥ 4)	R (≥ 320)
Kp666	R (≥ 128)	S/D	R (≥ 64)	R (16)	R (16)	S (8)	R (8)	R (4)	S (16)	R (> 16)	S/D	R (≥ 4)	S/D
KpPRE	R (≥ 128)	S/D	R (≥ 64)	R (16)	R (16)	S (8)	R (> 16)	R (4)	I (32)	R (> 16)	S/D	R (≥ 4)	S/D
KpPOST	R (≥ 128)	S/D	R (≥ 64)	R (≥ 64)	R (≥ 64)	R (> 16)	R (> 16)	R (> 16)	R (≥ 64)	R (> 16)	S/D	R (≥ 4)	S/D
FQ38879	R (≥ 128)	S/D	S/D	S/D	R (≥ 16)	S (4)	R (> 16)	R (> 16)	S/D	S (2)	S/D	R (≥ 4)	S/D
M1366	R (≥ 128)	S/D	S/D	S/D	R (≥ 64)	R (≥ 64)	I (2)	R (4)	S/D	S (4)	S/D	R (≥ 4)	S/D
19/2	R (≥ 128)	R (≥ 64)	R (16)*	R (≥ 64)	R (≥ 64)	R (≥ 64)	R (4)	S (1)	S (4)	R (> 16)	R (≥ 32)	R (≥ 4)	R (≥ 320)
M1443	R (≥ 128)	S/D	S/D	S/D	R (≥ 16)	S (8)	R (8)	R (> 16)	S/D	R (> 16)	S/D	R (≥ 4)	S/D
FQ40565	R (≥ 128)	S/D	S/D	S/D	R (≥ 64)	R (≥ 64)	R (> 16)	R (> 16)	S/D	R (> 16)	S/D	R (≥ 4)	S/D
54/2	R (≥ 128)	R (≥ 64)	R (16)*	R (≥ 64)	R (≥ 64)	R (≥ 64)	R (4)	S (1)	S (≤ 2)	R (> 16)	R (≥ 32)	R (≥ 4)	R (≥ 320)
04Kp21	R (≥ 128)	S/D	S/D	S/D	R (≥ 64)	S (4)	R (8)	R (> 16)	S (≤ 1)	S (≤ 1)	S/D	S ($< 0,06$)	S/D
Kp1124	R (≥ 128)	R (≥ 64)	S (8)	R (≥ 64)	R (≥ 64)	R (16)	S (≤ 1)	S ($\leq 0,25$)	S (≤ 2)	S (≤ 1)	R (≥ 32)	R (≥ 4)	R (≥ 320)
L0240	S	S/D	S/D	S/D	S	S/D	S	S	S	S	S/D	S	S/D
164125A	S	S/D	S/D	S/D	S	S/D	S	S	R	R	S/D	R	S/D
164413U/2	S	S/D	S/D	S/D	S	S/D	S	S	S	S	S/D	S	S/D

F305	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D
F320	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D
F322	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D
F312	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D
F312C	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D
F327	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D
F327C	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D
F330	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D
04Kp27	R (≥128)	S/D	S/D	S/D	R (≥64)	R (≥32)	R (>16)	R (8)	R (32)	R (>16)	S/D	S/D	S/D
04Kp29	R (≥128)	S/D	S/D	S/D	R (≥64)	R (≥32)	R (8)	R (>16)	S (4)	R (>16)	S/D	S/D	S/D

R: resistente; S: sensible; I: intermedio; S/D: sin dato; *Resistente modificado; TZP: piperacilina/tazobactam; CEP: cefalexina; FOX: cefoxitina; CTX: ceftriaxona; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepima; IPM: imipenem; MEM: meropenem; AMK: amikacina; GEN: gentamicina; NAL: ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacina; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol.

Anexo 3: Características genotípicas de resistencias a antimicrobianos de los aislamientos de *Klebsiella* spp.

Tabla Anexo 3: Genes de resistencia a antibióticos detectados para los aislamientos de *Klebsiella* spp. Se describe para cada aislamiento utilizado en el presente trabajo, los genes de resistencia frente a las principales familias de antibióticos: betalactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, macrólidos, tetraciclinas, y otros como sulfonamidas, fosfomicina, trimetoprim y colistin.

Aislamiento	Especie	Betalactámicos	Aminoglucósidos	Quinolonas	Macrólidos	Tetraciclinas	otros
ATCC 700603	<i>K. pneumoniae</i>	OKP-B-14; SHV-18; OXA-2	<i>ant(2'')-Ia</i>	OqxB, OqxA	nd	nd	<i>sul1; fosA6</i>
Kp1102	<i>K. pneumoniae</i>	SHV-172; TEM-1; OXA-1; CTX-M-15; SHV-11	<i>aac(6')-Ib-D181Y; aph(3'')-Ib;</i> <i>aph(6)-Id</i>	<i>qnrB1; oqxB10; oqxA6</i>	nd	<i>tet(A)</i>	<i>fosA_gen; dfrA14; sul2</i>
Kp1111	<i>K. pneumoniae</i>	SHV-172; TEM-1; CTX-M-15; OXA-1; SHV-11	<i>aac(6')-Ib-D181Y; aph(6)-Id;</i> <i>aph(3'')-Ib</i>	<i>oqxB10; oqxA6; qnrB1</i>	nd	<i>tet(A)</i>	<i>fosA_gen; dfrA14; sul2</i>
Kp666	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2; SHV-11	<i>aph(4)-Ia; aadA2; aac(3)-IV</i>	nd	nd	nd	nd
KpPOST	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2; SHV-11	<i>aph(4)-Ia; rmtG; aadA; aadA2;</i> <i>aac(3)-IV</i>	nd	nd	nd	<i>sul1</i>
FQ38879	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2; SHV-1	nd	nd	nd	<i>tet(A)</i>	<i>sul1; dfrA25</i>
M1366	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2; CTX-M-15;	<i>aadA2</i>	nd	nd	nd	<i>sul1; dfrA12</i>
19/2	<i>K. pneumoniae</i>	SHV-158; CTX-M-15; OXA-1; TEM-1; KPC-2; SHV-11	<i>aac(6')-Ib-D181Y; aph(3')-Ia;</i> <i>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>	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D
M1443	<i>K. pneumoniae</i>	SHV-182; TEM-1A; OXA-18; KPC-2; SHV-11	<i>aac(3)-IV; aadA1; aac(6')-Ib;</i> <i>aph(4)-Ia</i>	OqxB	nd	nd	<i>sul3; fosA6; cmlA1</i>
FQ40565	<i>K. pneumoniae</i>	SHV-158; NDM-1; KPC-2; SHV-11	<i>aadA2; aph(3')-Ia;</i> <i>aac(6')-Ib-AKT</i>	<i>qnrA1; qnrB2; oqxA;</i> <i>oqxB</i>	<i>mph(A)</i>	<i>tet(A)</i>	<i>fosA6; ble-MBL; dfrA12;</i> <i>dfrA25; catA1; cmlA5; sul1;</i> <i>sul2</i>
54/2	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-1; CTX-M-15; KPC-2; SHV-11	<i>aac(3)-IId; aph3-Ia;</i> <i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>qnrB1, aac(6')-Ib-cr</i>	nd	<i>tet(D)</i>	<i>dfrA30</i>
KpPRE	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2; SHV-11	<i>aph(4)-Ia; rmtG; aadA; aadA2;</i>	nd	nd	nd	nd

			<i>aac(3)-IV</i>				
04Kp21	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-5; SHV-28	<i>strB.v1; strA.v1; aadA2; aadA; rmtB</i>	nd	<i>Mrx; mphA; mphA; ermB.v1</i>	nd	<i>sul1; sul2; dfrA12; dfrA14</i>
L0240	<i>K. pneumoniae</i>	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D
164125A	<i>K. pneumoniae</i>	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D
164413U/2	<i>K. oxytoca</i>	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D
F305	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-1; SHV-11	<i>strB.v1; strA.v1; aac(6')-Ib-cr.v2</i>	<i>aac(6')-Ib-cr.v2</i>	nd	nd	<i>sul1; sul2</i>
F320	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1; SHV-11	<i>strB.v1; strA.v1</i>	nd	nd	nd	<i>sul1; sul2; dfrA14</i>
F322	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1; OXA-9; SHV-187	<i>strB.v1; strA.v1; aadA2; aadA; aac(6')-Ib'.v1</i>	<i>qnrE1</i>	nd	nd	<i>sul1; sul2; dfrA12</i>
F312B	<i>K. pneumoniae</i>	SHV-27; OXA-1; CTX-M-15; TEM-1; TEM-150; NDM-1	<i>aac(6')-Ib-D181Y; aph(6)-Id; aph(3'')-Ib; aadA2</i>	<i>oqxA6; oqxB26; qnrB1; qnrE1; qnrA1</i>	nd	tet(A)	<i>sul1; sul2; dfrA12; dfrA14; catA1; cmlA5; fosA_gen; ble-MBL</i>
F312C	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2; OmpK36:p.Ser109fs	<i>aph3-la; aadA2; aac(6')-Ib'</i>	<i>ParC:p.Ser80Ile</i>	nd	nd	<i>mgrb:p.Asp29fs; pmrb:p.Gln56fs; catA1; sul1; dfrA25</i>
F327B	<i>K. pneumoniae</i>	SHV-27; NDM-1; OXA-9; TEM-150	<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>	nd	<i>fosA6; ble-MBL; dfrA12; catA1; cmlA5; sul1; sul2</i>
F327C	<i>K. pneumoniae</i>	OmpK35:p.Gln68fs	<i>aph3-la; aadA2</i>	<i>GyrA:p.Ser83Ile; ParC:p.Ser80Ile</i>	nd	nd	<i>mgrb:p.Asp29fs; dfrA25</i>
F330	<i>K. pneumoniae</i>	SHV-27	nd	nd	nd	nd	<i>dfrA14</i>
04Kp27	<i>K. pneumoniae</i>	SHV-106; NDM-5; TEM-1; SHV-28	<i>aadA2; aph(3'')-Ib; aph(6)-Id; rmtB1</i>	<i>oqxA5; oqxB19</i>	<i>mph(A); erm(B)</i>	nd	<i>fosA6; ble-MBL; sul1; sul2; dfrA12; dfrA14</i>
04Kp29	<i>K. pneumoniae</i>	SHV-27	nd	<i>oqxA6; oqxB32</i>	nd	nd	<i>fosA6</i>

Los genes de resistencia se determinaron utilizando Kleborate v3. nd: no detectado; S/D: sin dato.

Anexo 4: Características fenotípicas de resistencias a antimicrobianos de los aislamientos de *Escherichia coli*

Tabla Anexo 4: Fenotipo de resistencia a antimicrobianos de los aislamientos de *Escherichia coli*. Se describe para cada aislamiento utilizado en el presente trabajo, las resistencias frente a las principales familias de antibióticos: beta-lactámicos (penicilinas, cefalosporinas y carbapenems), aminoglucósidos, quinolonas, fluoroquinolonas y sulfonamidas. También se detalla entre paréntesis la concentración inhibitoria mínima ($\mu\text{g/mL}$), en caso de contar con esa información.

Aislamiento	TZP	AMP	CEP	CTN	FOX	CXM	CTX	CAZ	FEP	IPM	MEM	AMK	GEN	NAL	CIP	SXT
144	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D
20/2	R (≥ 128)	S/D	R (≥ 64)	S/D	R (≤ 4)*	S/D	R (≥ 64)	R (16)	I (2)*	I (2)	S (1)	I (≤ 2)*	S (4)	R (16)*	S ($\leq 0,25$)	R (≥ 320)
21 PW	S/D	R	S/D	R	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S	S	S
40 PW	S/D	R	S/D	R	S/D	R	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	R	R	R
50 PW	S/D	R	S/D	S	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	R	R	R
94 PW	S/D	R	S/D	R	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S	S	R
8P	S/D	R	S/D	R	S/D	R	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	R	R	R
12P	S/D	R	S/D	R	S/D	R	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	R	R	S
19P	S/D	R	S/D	R	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	R	R	R
32P3	S/D	R	S/D	R	S/D	R	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S	S	S
33P4	S/D	R	S/D	S	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	R	R	R
36P2	S/D	R	S/D	R	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	R	S	R
37P1	S/D	R	S/D	S	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S	S	R
39P5	S/D	R	S/D	S	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S	S	R
42P3	S/D	R	S/D	R	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S	S	R
58P2	S/D	R	S/D	S	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S	S	R

73P1	S/D	S	S/D	R	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	R	R	R
87P1	S/D	S	S/D	S	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	R	R	R
144PW	S/D	R	S/D	S	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	R	S	S
49P1	S/D	R	S/D	S	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	R	R	R
93PW	S/D	R	S/D	R	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	R	R	S
33P1	S/D	R	S/D	S	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S	S	R
81P1	S/D	S	S/D	S	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	R	R	R
45P2	S/D	S	S/D	S	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	R	R	S
63P1	S/D	R	S/D	S	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S	S	S
67P1	S/D	R	S/D	S	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S	S	R
52PW	S/D	R	S/D	S	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S	S	R
28P	S/D	S	S/D	R	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	R	R	R
46P1	S/D	R	S/D	S	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S	S	R
74P1	S/D	R	S/D	S	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S	S	R
46PW	S/D	R	S/D	R	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S	S	R
67PW	S/D	R	S/D	R	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S	S	R
126PW	S/D	R	S/D	R	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S	S	R
21P	S/D	S	S/D	R	S/D	S	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	R	R	S

R: resistente; S: sensible; I: intermedio; S/D: sin dato; *Resistente modificado; TZP: piperacilina/tazobactam; AMP: ampicilina; CEP: cefalexina; CTN: cefalotina; FOX: ceftiofina; CXM: cefuroxima; CTX: ceftriaxona; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepima; IPM: imipenem; MEM: meropenem; AMK: amikacina; GEN: gentamicina; NAL: ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacina; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol.

Anexo 5: Identificación de depolimerasas en los genomas de los fagos aislados

Para identificar las secuencias codificantes de depolimerasas, se implementó una estrategia basada en similitud estructural. En primera instancia, se construyó una base de datos de dominios catalíticos de depolimerasas previamente reportadas en literatura científica (1). La estructura tridimensional de cada enzima fue predicha mediante AlphaFold (2) y, posteriormente, se realizó una curación manual para delimitar los dominios catalíticos, conservando únicamente esas regiones estructurales en la base de datos. Paralelamente, se seleccionaron todos los genes presentes en los genomas de los fagos secuenciados (KP2, KP3, KP4, KP8, KP12, KP13 y EP1) cuya longitud fuera igual o superior a 200 aminoácidos. Las proteínas codificadas por estos genes también fueron modeladas estructuralmente mediante AlphaFold (2), generando así una segunda base de datos que contiene las estructuras tridimensionales de las proteínas virales. Finalmente, se realizó una búsqueda basada en similitud estructural entre ambas bases de datos utilizando Foldseek (3). Para esto, se empleó el modo de búsqueda simplificada de la herramienta (easy-search) en formato de alineamiento estructural (modo 4). Como resultado, se identificaron dos depolimerasas candidatas, Dpo1 (de 743 residuos aminoácidos) y Dpo2 (de 533 residuos aminoácidos), ambas pertenecientes al bacteriófago KP8 (**Figura 1 Anexo 5**). Este análisis fue realizado con la asistencia técnica de la Dra. Daniela Megrian y la Bach. Guadalupe Liste (Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur de Montevideo), y forma parte de su tesis de Ingeniería en Biotecnología.

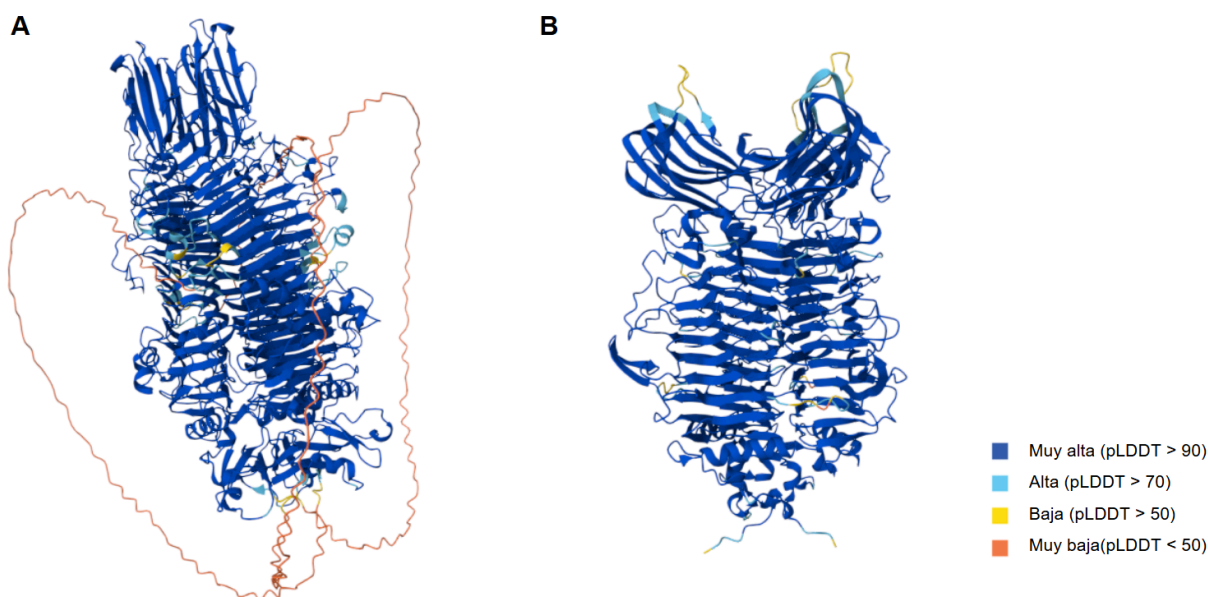


Figura 1 Anexo 5: Estructuras tridimensionales de las depolimerasas del bacteriófago KP8, coloreadas según el grado de confiabilidad de la predicción estructural (pLDDT). (A) Depolimerasa Dpo1 predicha como homotrímero, (B) Depolimerasa Dpo2 predicha como homotrímero.

Referencias bibliográficas Anexo 5

1. Knecht, L. E., Veljkovic, M., & Fieseler, L. (2020). Diversity and function of phage encoded depolymerases. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2949. DOI: [10.3389/fmicb.2019.02949](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02949)
2. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. DOI: [10.1038/s41586-021-03819-2](https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2)
3. van Kempen, M., Kim, S. S., Tumescheit, C., Mirdita, M., Lee, J., Gilchrist, C. L. M., Söding, J., & Steinegger, M. (2024). Fast and accurate protein structure search with Foldseek. *Nature Biotechnology*, 42(2), 243–246. DOI: [10.1038/s41587-023-01773-0](https://doi.org/10.1038/s41587-023-01773-0)

Anexo 6: Mapas genómicos de los fagos candidatos

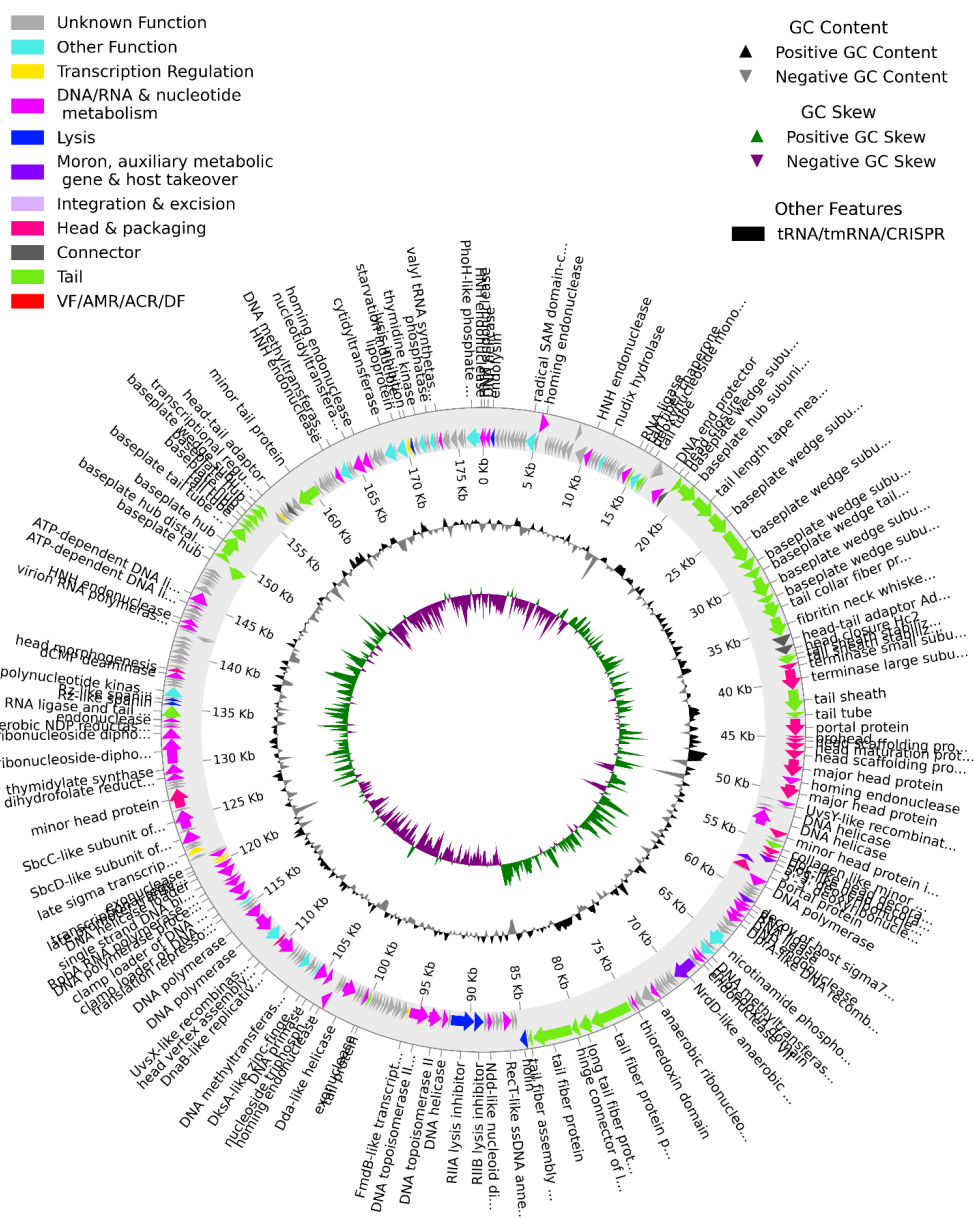


Figura 1 Anexo 6: Mapa genómico del fago KP4. Se representan en diferentes anillos concéntricos, desde afuera hacia adentro: Primer anillo - secuencias codificantes anotadas por Phold y marcadas en diferentes colores según la categoría (función desconocida en gris, otras funciones en celeste, regulación de la transcripción en amarillo, metabolismo de ácidos nucleicos en magenta, lisis en azul, genes auxiliares del metabolismo en violeta, integración y escisión en lila, cabeza y empaquetamiento en rosa, conector en gris oscuro, cabeza en verde claro y genes de virulencia y resistencia en rojo); segundo anillo - escala genómica; tercer anillo - contenido de GC (positivo en negro y negativo en gris); y cuarto anillo - el sesgo GC (positivo en verde y negativo en violeta).

Anexo 7: Análisis filogenético de los fagos del género *Slopekvirus*

Para el análisis filogenético de los fagos KP2, KP3 y KP4, se descargaron los 53 genomas completos correspondientes al género *Slopekvirus* disponibles en la base de datos GenBank del NCBI. A este conjunto se sumaron los tres genomas de este género que fueron secuenciados y ensamblados en el marco de esta tesis (KP2, KP3 y KP4) y otro en el marco de la tesis de grado del Bach. Sebastián Rey (Roth 23.2, KlebPhaCol). Se empleó la herramienta Orthofinder (1) para identificar las proteínas presentes en copia única en todos los genomas de *Slopekvirus*. Se detectaron 94 proteínas, cuyas secuencias génicas se recuperaron, alinearon con el algoritmo L-INS-i de MAFFT (2) y concatenaron, obteniendo una matriz de 53.984 columnas. Esta matriz se utilizó para reconstruir una filogenia por máxima verosimilitud utilizando IQ-TREE (3) (modelo GTR+G, 10.000 ultrafast bootstrap, coeficiente de correlación de bootstrap de 0,9999) (**Figura 1 Anexo 7**). Luego, se calcularon las identidades medias nucleotídicas por pares entre todos los genomas completos usando la herramienta MUMmer (4) y se generó un *heatmap* (**Figura 2 Anexo 7**) con la herramienta pyANI-plus (5). También se calculó la identidad utilizando BLAST+ (6), dnadiff (4) y fastANI (7), obteniendo exactamente los mismos resultados. Estos análisis fueron realizados con la asistencia técnica de la Dra. Daniela Megrian y la Bach. Guadalupe Liste (Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur de Montevideo).

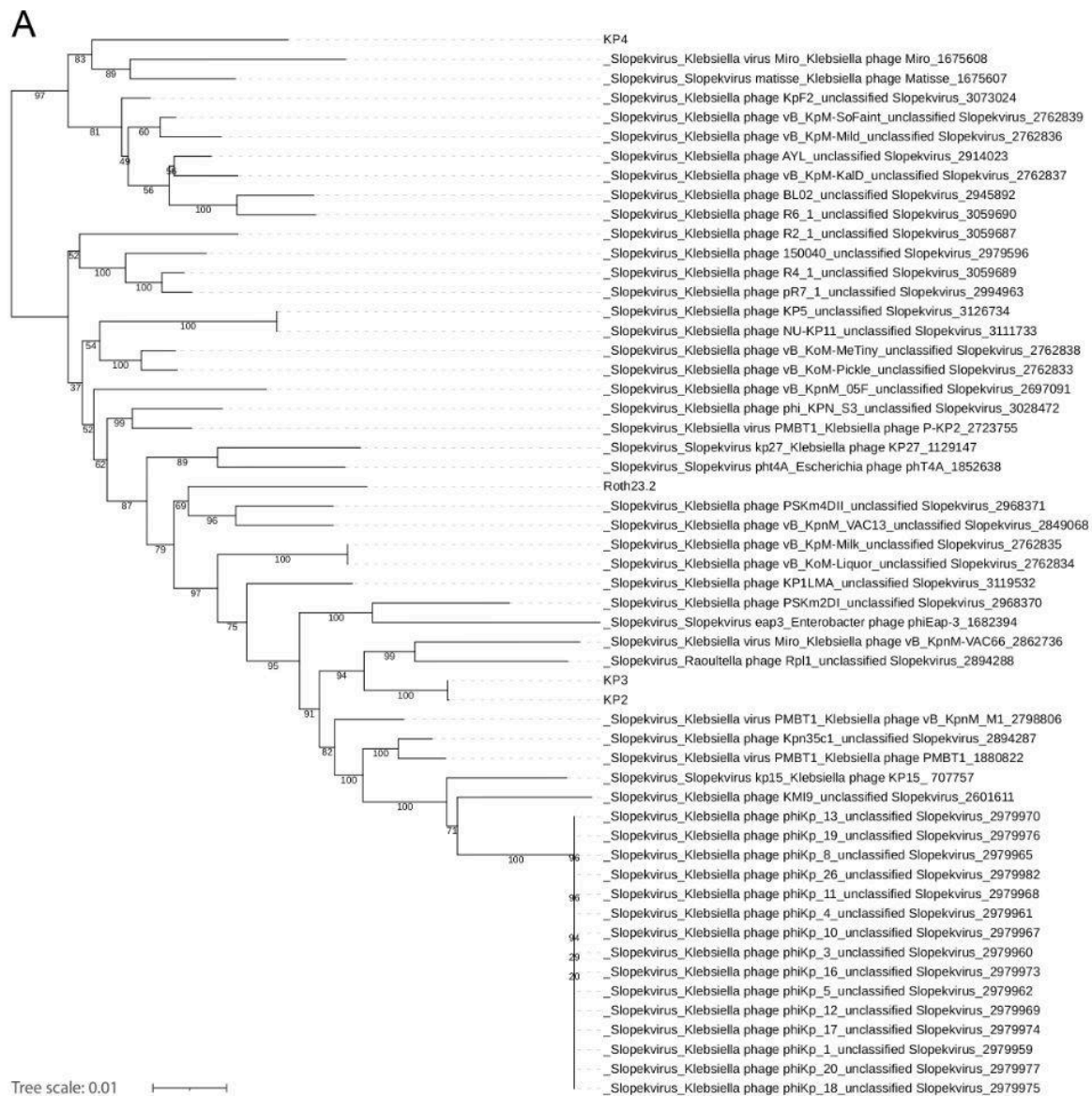


Figura 1 Anexo 7: Filogenia de las especies de bacteriófagos del género *Slopekvirus* en base a genes compartidos concatenados. La filogenia por máxima verosimilitud se realizó descargando 53 genomas completos de este género, y sumando los fagos KP2, KP3, KP4 (aislados en este trabajo) y Roth23.2 (de la colección abierta KlebPhaCol). En los nodos se indican los valores de bootstrap.

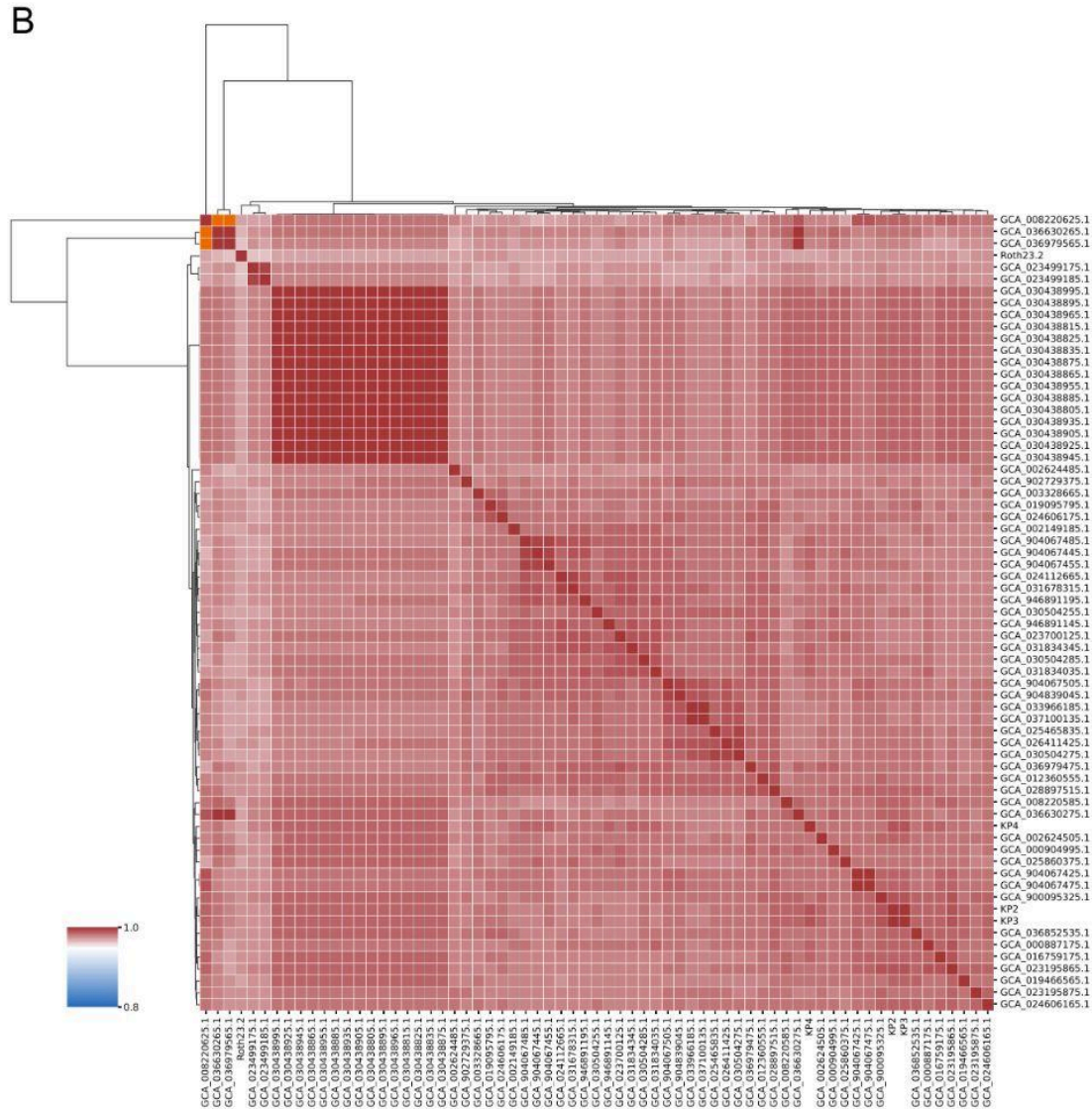


Figura 2 Anexo 7: Heatmap de las especies de bacteriófagos del género *Slopekvirus* en base a la identidad media de nucleótidos (ANI). La identidad entre KP2 y KP3 es de 0,9998 y difieren en solo 41 SNPs, mientras que entre KP2 y KP4 es de 0,9892. La identidad más baja encontrada entre miembros de *Slopekvirus* fue de 0,9699.

Referencias bibliográficas Anexo 7

1. Emms, D. M., & Kelly, S. (2019). OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics. *Genome biology*, 20(1), 238. DOI: [10.1186/s13059-019-1832-y](https://doi.org/10.1186/s13059-019-1832-y)
2. Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4), 772–780. DOI: [10.1093/molbev/mst010](https://doi.org/10.1093/molbev/mst010)
3. Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 32(1), 268–274. DOI: [10.1093/molbev/msu300](https://doi.org/10.1093/molbev/msu300)
4. Marçais, G., Delcher, A. L., Phillippy, A. M., Coston, R., Salzberg, S. L., & Zimin, A. (2018). MUMmer4: A fast and versatile genome alignment system. *PLoS computational biology*, 14(1), e1005944. DOI: [10.1371/journal.pcbi.1005944](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005944)
5. Pritchard, L., Glover, R. H., Humphris, S., Elphinstone, J. G., & Toth, I. K. (2016). Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: soft-rotting enterobacterial plant pathogens. *Analytical Methods*, 8(1), 12–24. DOI: [10.1039/C5AY02550H](https://doi.org/10.1039/C5AY02550H)
6. Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC bioinformatics*, 10, 421. DOI: [10.1186/1471-2105-10-421](https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421)
7. Jain, C., Rodriguez-R, L. M., Phillippy, A. M., Konstantinidis, K. T., & Aluru, S. (2018). High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nature communications*, 9(1), 5114. DOI: [10.1038/s41467-018-07641-9](https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9)