



**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
CON ÉNFASIS EN MICROBIOLOGÍA**

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIOFAGOS PROVENIENTES DE AGUAS
RESIDUALES DE RÍO ABAJO, CIUDAD DE PANAMÁ, CON ACTIVIDAD AN-
TIMICROBIANA CONTRA EL COMPLEJO *Enterobacter cloacae***

**LIC. EDNNER EMMANUEL VICTORIA BLANCO
8-746-1058**

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. EVELIA QUIROZ RODRÍGUEZ
ASESOR DE TESIS:
DR. ALEX O. MARTÍNEZ-TORRES**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA
OPTAR AL TÍTULO DE MÁSTER EN
CIENCIAS BIOMÉDICAS CON ÉNFASIS
EN MICROBIOLOGÍA**

PANAMÁ, REPUBLICA DE PANAMÁ

2021

DEDICATORIA

Dedico esta tesis en Primer lugar a Dios Todopoderoso por todas las bendiciones que me ha dado en la vida, por darme la paciencia y la fortaleza para llevar a éxito este proyecto.

También dedico este trabajo a mi madre Oderay Blanco y a mi hermana Luz Hannela, ya que me enseñaron a ser perseverante y paciente en las alegrías y las penas. Sin su apoyo incondicional esta obra no se hubiera podido lograr.

A mi Padre Lorenzo Victoria, que se encuentra en el Cielo, una dedicación especial.

AGRADECIMIENTO

Agradezco en Primer Lugar a la Dra. Evelia Quiroz Rodríguez, profesora Titular de Virología del Departamento de Microbiología Humana de la Facultad de Medicina, por la confianza depositada en mí para conferirme este delicado e importante tema. Su inteligencia, sabiduría y en principio darme un espacio físico donde pude desarrollar en primera instancia esta investigación.

Agradezco también la asesoría técnica y científica del Dr. Alex O. Martínez-Torres, Profesor Titular II TC de la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, especialista en virus ambientales y fagos, por ayudarme a continuar los experimentos en el Laboratorio de Microbiología Experimental y Aplicada y Laboratorio de Microbiología de Aguas (LAMEXA y LAMA). También, en gran parte, por sus consejos y otorgarme la habilidad de trabajar en grupo en estos laboratorios.

Además, agradezco a la Vicerrectoría de Investigación y Post-Grado-VIP, de la Universidad de Panamá, por haberme financiado el curso de biología molecular de bacteriófagos en la Universidad de Buenos Aires, Argentina.

En especial, agradezco a los profesores del Departamento de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina, el Dr. Melquíades Concepción y a la Lic. Malixenia Fajardo; a la Profesora y amiga Leandra Gómez del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina, que sin su ayuda en los temas de bioética, impulso y motivación no hubiera terminado esta titánica labor, y al igual que a la Dra. Griselda Arteaga, Profesora de Inmunología del Departamento de Microbiología Humana de la Facultad de Medicina, cuyos consejos me han motivado a terminar mi proyecto y continuar en el área de la Investigación.

Además, agradezco la oportunidad brindada en los laboratorios de LAMEXA y LAMA, por el Prof. Humberto Cornejo, Coordinador de estos Laboratorios y Director del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología.

Siempre conservaré un especial agradecimiento, a la Dra. Nora de Moreno, Mgter. Carmen Indira Espino (Departamento de Microbiología Humana, Facultad de Medicina), al Dr. Jordi Querol-Audi (LAMEXA y LAMA/SNI Nacional I), mi tutor Dr. Gerald Moncayo (Departamento de Microbiología Humana/Inmunología/SNI Nacional I), a la Dra. Carmenza Spadafora y al CDr. Ricardo Correa (INDICASAT-AIP), a la Dra. Mariana Piuri (Departamento de Química Biológica, UBA, Argentina), y al Dr. Cristóbal Chaídez, la Dra. Nohelia Castro del Campo, al Mgter. Jean Pierre González (CIAD, México), a la Dra. Elva Arechiga y Juan Martínez (Universidad Autónoma de Nuevo León, México), al Dr. Moisés Espino (CHMDrAAM), y al Dr. Alexander Martínez, Mgter. Juan A. Castillo M. y Lic. Margie Rodríguez, Mgter. José Moreno (ICGES), que, sin su apoyo técnico y científico, no hubiese podido culminar este trabajo, que ha sido de gran calidad.

En especial, un agradecimiento a la Secretaría Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación-SENACYT, que por medio del de la Primera Convocatoria para Nuevos Miembros del Sistema Nacional de Investigación-SNI, año 2019, me pudo brindar los fondos necesarios a través del Grant 87-2019 para ejecutar y finalizar este trabajo.

A todos ellos, mil gracias.

ÍNDICE

DEDICATORIA	<i>ii</i>
AGRADECIMIENTO	<i>iii</i>
ÍNDICE DE TABLAS	<i>viii</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>ix</i>
GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS	<i>xi</i>
RESUMEN	2
ABSTRACT	5
1 MARCO CONCEPTUAL	7
1.1 INTRODUCCIÓN	8
1.2 JUSTIFICACIÓN	9
2 GENERALIDADES ACERCA DE LOS VIRUS	10
3 BACTERIÓFAGOS. ESTADO DEL ARTE	12
3.1 Generalidades e Historia	12
3.2 Morfología	15
3.3 Genoma	16
3.4 Taxonomía	17
3.4.1 Fagos con cola, Orden Caudovirales (ADNdc).....	21
3.4.2 Fagos Polihédricos, filamentosos y fagos pleomórficos.....	24
3.5 Ciclo de replicación de los bacteriófagos	29
3.5.1 El ciclo lítico.....	29
3.5.2 Ciclo Lisogénico.....	31
3.6 Aplicaciones de los bacteriófagos en Biomedicina y Biotecnología	31
3.6.1 Fagoterapia.....	31
3.6.2 Fagos en el diagnóstico bacteriano.....	35
3.6.3 Presentación de fagos (phage display).....	35
3.6.4 Futuras aplicaciones de la tecnología de los Bacteriófagos.....	35
3.7 Caracterización Biológica y Molecular de aislados de bacteriófagos del Complejo <i>E. cloacae</i>	36
3.7.1 Titulación de bacteriófagos.....	36
3.7.2 Ensayo de placa por medio de la técnica de doble capa de agar.....	36
3.7.3 Ensayo de especificidad del bacteriófago y Eficiencia de plaqueo.....	37
3.7.4 Electroforesis de ADN en gel de agarosa.....	37
3.8 Situación de la resistencia a los antimicrobianos en América Latina y el resto del mundo.	37
3.9 Complejo <i>E. cloacae</i>	40
3.9.1 Aspectos taxonómicos.....	40
3.9.2 Epidemiología, transmisión y significado clínico.....	40
3.9.3 Aspectos patogénicos.....	41

3.9.4	Sensibilidad a los antibióticos	41
3.9.5	Mecanismos de resistencia a los antibióticos	41
3.9.6	Mecanismos de resistencia de <i>E. cloacae</i> complex	42
3.9.7	Especies dentro del Complejo <i>E. cloacae</i>	42
3.10	Calidad de agua de los ríos de la ciudad de Panamá.....	43
4	OBJETIVOS.....	44
4.1	Objetivo General:	44
4.2	Objetivos Específicos:.....	44
5	HIPÓTESIS DE TRABAJO	44
6	Marco Metodológico	46
6.1	Tipo de estudio	46
6.2	Población	46
6.3	Criterios de inclusión y exclusión.....	46
6.3.1	Criterios de inclusión.....	46
6.3.2	Criterios de exclusión.....	46
6.3.3	Variables.....	46
6.4	Descripción del área de muestreo.....	47
6.4.1	Descripción de la Cuenca del Río Abajo.....	47
6.4.2	División de la cuenca del Río Abajo en Regiones.....	48
6.4.3	Ubicación de los puntos de muestreo	48
6.5	PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS.	49
6.5.1	Procedimiento de la Recolección de las muestras de agua.....	49
6.5.2	Identificación y control de las muestras	50
6.5.3	Información sobre las cepas	51
6.5.4	Preparación de un stock del Complejo <i>Enterobacter cloacae</i>	52
6.5.5	Aislamiento por el método de enriquecimiento de bacteriófagos.....	52
6.5.6	Preparación de las diluciones seriadas.....	52
6.5.7	Protocolo de la Técnica de doble capa de agar.....	52
6.5.8	Descripción de las placas.....	54
6.5.9	Procedimiento de purificación de los bacteriófagos aislados	54
6.5.10	Preparación de ministock.....	54
6.5.11	Cosecha y Concentración por Polietilenglicol PEG 8000.....	54
6.5.12	Spot test para la determinación rápida del título de una suspensión de fagos.....	54
6.6	Ensayo de la Especificidad del Bacteriófago y eficiencia de plaqueo.....	55
6.6.1	Cálculo de la eficiencia de plaqueo	55
7	Caracterización biológica	55
7.1	Estabilidad a diferentes temperaturas.....	55
7.2	Viabilidad de los bacteriófagos a luz ultravioleta.....	55
7.3	Viabilidad de los bacteriófagos en función del pH	56
7.4	Ensayo de resistencia al cloroformo.....	56
8	Caracterización Molecular	56
8.1	Extracción de material genético	56

8.1.1	Protocolo de preparación del Gel de Agarosa	56
8.2	Determinación de la presencia de proteínas de fagos mediante SDS-PAGE	57
8.3	Secuenciación y Análisis Bioinformático	57
8.4	Análisis Estadístico	59
9	Resultados.....	61
	<i>Caracterización biológica</i>	<i>61</i>
9.1	Aislamiento y características del fago vB_EcRAM-01	61
9.2	Ensayo de reducción bacteriana.....	61
9.3	Especificidad del huésped (Rango de huésped).....	62
9.4	Estabilidad a diferentes temperaturas.....	64
9.5	Estabilidad a la Luz Ultravioleta UV.....	65
9.6	Estabilidad a diferentes pH	65
9.7	Estabilidad frente al cloroformo	66
10	Caracterización Molecular	68
10.1	Determinación de la presencia de proteínas de fagos mediante SDS-PAGE	68
	Extracción de material genético y su visualización en gel de agarosa.	70
10.2	Análisis <i>in silico</i> de la secuencia nucleótida del fago vB_EcRAM-01	70
10.2.1	Análisis genómico estructural	70
10.2.2	Taxonomía	73
10.2.3	Análisis genómico comparativo.....	73
10.2.4	Ubicación geográfica	74
10.2.5	Análisis Filogenético y de identidad de nucleótidos	75
	DISCUSION.....	78
11	Conclusiones:.....	85
	Recomendaciones.....	86
	Anexos	102
	ANOTACION DEL GENOMA DEL FAGO	102
	SECUENCIA FASTA vB_EcRAM-01	112
	ANTIBIOGRAMAS DE LAS CEPAS CLÍNICAS USADAS PARA EL RANGO DE HUÉSPED.....	113

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Recuento Histórico de los bacteriófagos.....	12
Tabla 2. Virus que infectan bacterias según ICTV	18
Tabla 3. Principales lugares donde se pueden encontrar bacteriófagos: la naturaleza lugares urbanizados, y el cuerpo humano.	32
Tabla 4. Ventajas y Desventajas del uso de los bacteriófagos en biotecnología	33
Tabla 5. Mecanismos de Resistencia del Complejo <i>E. cloacae</i>	42
Tabla 6. Variables independientes y dependientes usadas en este estudio	47
Tabla 7. Materiales y Métodos usados en este estudio	50
Tabla 8. Patrón de sensibilidad a los antibióticos del Complejo <i>E. cloacae</i> usado en este estudio.	51
Tabla 9. Especificidad del fago vB_EcRAM-01 a diferentes cepas clínicas (Rango de Huésped).	63
Tabla 10. Aproximación teórica de las bandas observadas del gel SDS-PAGE del fago vB_EcRA-01.....	69
Tabla 11. Anotación genómica del fago de Enterobacter vB_EcRAM-01.....	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Línea de tiempo que muestra el descubrimiento de los antibióticos y su correspondiente surgimiento de las resistencias a los mismos.....	10
Figura 2. Estructura básica de los virus. Se observa virus envueltos, desnudos y de morfología compleja cada una con sus propias estructuras..	11
Figura 3. Cronología de los principales eventos en la historia de la investigación sobre fagos, terapia con fagos y antibióticos.....	14
Figura 4. Estructura morfológica de los bacteriófagos.....	15
Figura 5. Morfotipos de bacteriófagos relacionados con su familia y célula hospedera..	16
Figura 6. Clasificación de los fagos.....	17
Figura 7. Número de genomas de fagos secuenciadas a lo largo de los años ..	21
Figura 8. Fago T4 de Enterobacteria ..	22
Figura 9. Fago T7 de enterobacteria.....	23
Figura 10. Fago λ de Enterobacteria ..	23
Figura 11. Microfotografía de ϕ MH2K virus de <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> ..	24
Figura 12. <i>Pseudoalteromonas</i> PM2 ..	25
Figura 13. Fago de enterobacteria PRD1.....	25
Figura 14. Fago MS2 de <i>E. coli</i> ..	26
Figura 15. Fago de <i>Pseudomonas</i> ϕ i6 ..	27
Figura 16. Fago de <i>E. coli</i> M13. <i>Lipothrixviridae</i> (dsDNA). ..	27
Figura 17. <i>Acheloplasma</i> virus L2 ..	28
Figura 18. Ciclo de Replicación de los fagos.....	29
Figura 19. Pasos comunes del ciclo lítico del bacteriófago.....	30
Figura 20. Ejemplos de los bacteriófagos y sus múltiples aplicaciones.....	31
Figura 21. Vías de diseminación de antibióticos por el medio ambiente..	38
Figura 22. Muertes atribuibles a resistencia antimicrobiana hasta el 2050 ..	39
Figura 23. Ubicación de las zonas de muestreos en la Cuenca del Río Abajo..	49
Figura 24. Método de doble placa de agar.....	53
Figura 25. Procedimiento de SDS-PAGE para el fago vB_EcRAM-01.....	57
Figura 26. Preparación de las librerías para la secuenciación mediante miSeq Illumina..	58
Figura 27. Césped bacteriano del Complejo <i>E. cloacae</i> infectado por bacteriófagos según el método de doble placa de agar.....	61
Figura 28. Efecto de vB_EcRAM-01 sobre el crecimiento del complejo <i>E. cloacae</i>	62
Figura 29. Estabilidad del fago vB_EcRAM-01 en diferentes temperaturas.....	64
Figura 30. Estabilidad de vB_EcRAM-01 frente a la luz UV.....	65
Figura 31. Estabilidad de vB_EcRAM-01 a diferentes pH.....	66
Figura 32. Estabilidad de vB_EcRAM-01 frente al Cloroformo.....	67
Figura 33. Resultado de SDS-PAGE del fago vB_EcRAM-01.....	68
Figura 34. Análisis de secuencia FASTA del vB_EcRAM-01 usando ARAGRON.....	70
Figura 35. Análisis de secuencia FASTA del vB_EcRAM-01 usando ARAGORN.....	71
Figura 36. Distribución genómica de vB_EcRAM-01.....	72
Figura 37. Mapa genómico de vB_EcRAM-01.....	73
Figura 38. Múltiples alineamientos del fago vB_EcRAM-01 con fagos obtenidos de la plataforma NCBI usando el alineamiento progresivo de Mauve.....	74
Figura 39. Relaciones filogenéticas de Enterobacter phage vB_EcRAM-01.....	75
Figura 40. Análisis de identidad de nucleótidos de vB_EcRAM-01.....	76

Figura 41. Parte de la secuencia de genoma completo en formato fasta del vB_ECRAM-01.....	113
Figura 42. Sensibilidad a los antibióticos de cepa clínica de <i>E. cloacae</i> utilizada en este estudio.	113
Figura 43. Sensibilidad a los antibióticos de cepa clínica de <i>E. coli</i> utilizada en este estudio	113
Figura 44. Sensibilidad a los antibióticos de cepa clínica de <i>E. coli</i> utilizada en este estudio	114
Figura 45. Sensibilidad a los antibióticos de cepa clínica de <i>E. cloacae</i> utilizada en este estudio	114
Figura 46. Sensibilidad a los antibióticos de cepa clínica de <i>S. aureus</i> utilizada en este estudio	114
Figura 47. Sensibilidad a los antibióticos de cepa clínica de <i>P. aeruginosa</i> utilizada en este estudio	115
Figura 48. Sensibilidad a los antibióticos de cepa clínica de <i>S. aureus</i> utilizada en este estudio	115
Figura 49. Sensibilidad a los antibióticos de cepa clínica de <i>E. cloacae</i> complex utilizada en este estudio .	115
Figura 50. Sensibilidad a los antibióticos de cepa clínica de <i>A. baumannii</i> complex utilizada en este estudio	116

GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS

1	APHA:	American Public Health Association
2	AmpC:	Serin betalactamasas tipo 1
3	ADN	Ácido desoxirribonucleico
4	ADNdc	Ácido desoxirribonucleico doble cadena
5	ADNcs	Ácido desoxirribonucleico de cadena simple
6	ARN	Ácido ribonucleico
7	ARNcs	Ácido ribonucleico de cadena simple
8	ARN dc	Ácido ribonucleico de doble cadena
9	BLEE:	Betalactamasas de espectro extendido
10	CDC:	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades
11	C3G:	Cefalosporinas de tercera generación
12	C4G	Cefalosporinas de cuarta generación
13	CTX-M:	Cefotaximasas mediadas por plásmidos
14	CRISPR:	Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats
15	DNA	Ácido desoxirribonucleico
16	dsDNA:	Ácido desoxirribonucleico bicatenario
17	ESKAPE:	<i>Enterococcus</i> spp, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella</i> spp, <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter</i> spp.
18	Fago PM2:	Alteromonas fago PM2.
19	g. l	Grados de libertad
20	ICVT:	Comité Internacional de Taxonomía de Virus.
21	ICGES:	Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud.
22	LB:	Medio de lisogenia Luria Bertani
23	MINSA:	Ministerio de Salud
24	mL:	Mililitro
25	NGS	Next Generation Sequencing
26	OD:	Densidad óptica
27	OMS:	Organización Mundial de la Salud
28	ON:	Overnight/ toda la noche
29	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
30	rpm:	Revoluciones por minuto
31	SDS	Dodecil sulfato de sodio
30	ssRNA:	Ácido ribonucleico monocatenario.
31	SM:	Tampón de sodio y magnesio
32	TSA	Tripticasa soya agar
33	TBE	TRIS Borato EDTA
34	UFP	Unidades formadoras de placas
35	UV	Ultravioleta

RESUMEN

RESUMEN

Bacteriófagos (fagos) son los virus que infectan bacterias. Estos virus son de gran interés debido a su habilidad de atacar específicamente a las bacterias. Los fagos en algunas regiones del mundo (por ejemplo, el Fagolac® en Chile, SalmoFree® en Colombia) suelen ser usados en la industria alimentaria para el control de patógenos y también, han sido propuestos para el tratamiento de enfermedades bacterianas (*PYO Bacteriophage Tbilisi, Georgia*), como fagoterapia. El *Enterobacter cloacae*, patógeno oportunista, es una de las principales bacterias que causan muchas infecciones extraintestinales en los hospitales. El objetivo de este estudio fue caracterizar bacteriófagos aislados en aguas residuales de Río Abajo con actividad antimicrobiana contra el Complejo *E. cloacae*, de acuerdo con sus propiedades biológicas y moleculares. En este estudio se utilizó una muestra de agua del Río Abajo para aislar los fagos, usando los métodos de enriquecimiento y ensayo de doble capa de agar. Una morfología de las Unidades Formadoras de Placa (UFP) en el agar, que fue la más grande y predominante, y por esta razón, fue seleccionada para realizar su caracterización. Se realizaron tres rondas de purificación para asegurar la homogeneidad del fago, basándose en las características morfológicas de las placas. También, se realizaron ensayos de caracterización biológica (estabilidad frente a rangos de pH, temperatura, sensibilidad a la luz ultravioleta (UV) y al cloroformo) y, además, la especificidad de huésped. Se aisló un fago cuya UFP es clara, redonda, de 6 x 9 mm de diámetro y con una concentración en stock de 4.7×10^7 UFP/mL. También, se observó que en las diluciones de 10^{-4} y 10^{-5} fue donde se obtuvo el mejor rendimiento de fagos, los cuales fueron capaces de lisar el 86% de la bacteria huésped. La especificidad del huésped frente a diferentes especies bacterianas (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. aerogenes* y *E. coli*) fue negativa, en comparación con la *E. cloacae*, para la cual la lisis fue completa. En la curva de pH, se observó que hay una mejor estabilidad del fago entre pH 7 a 10. En cuanto a la temperatura, se observó que los fagos son más estables 37° y 50°C y, además, se observó que arriba de esta temperatura, hubo una notable disminución del título viral. En la sensibilidad a la luz UV, se observó que en los primeros 15 minutos frente a está la tasa de replicación se reduce a cero. Incluso, se observó que el fago aislado denominado *Enterobacter phage vB_EcRAM-01*, presenta estabilidad a temperaturas entre 25° y 50°C y pH alcalinos entre 7- 11. El fago aislado contra el complejo *E. cloacae*, produce UFP claras, lo cual es indicador que es un fago lítico. Además, se pudo observar una estrecha especificidad de huésped, es decir solo infecta al *E. cloacae*. En cuanto a la caracterización molecular, se reveló que el fago vB_EcRAM-01, es un miofago de 178477 pb con un contenido de 45.8% de G+C y con aproximadamente 294 genes presentes, incluyendo genes que codifican proteínas estructurales, inactivación, adsorción a las células, inyección de ADN y caracterización de enzimas líticas. Adicionalmente, este genoma posee 2 ARNt en su genoma, el ARNt-Met (cat) el cual posee 77 bases y 55.8% de G+C, y el ARNt-Gly (tcc) con 76 bases y 47.4% de G+C. Además de sus genes que codifican proteínas estructurales, de modificación y replicación del ADN, también posee genes de holinas y endolisinas, que son propios de un bacteriófago lítico.

Palabras clave: bacteriófagos, Complejo *E. cloacae*, caracterización biológica, caracterización molecular, ensamblado “de novo”, secuenciación masiva.

ABSTRACT

ABSTRACT

Bacteriophages (phages) are viruses that infect bacteria. These viruses are of great interest due to their ability to specifically attack bacteria. Phages in some regions of the world (e.g. Fagolac® in Chile, SalmoFree® in Colombia) are often used in the food industry for pathogen control and have also been proposed for the treatment of bacterial diseases (PYO Bacteriophage Tbilisi, Georgia), as phage therapy. *Enterobacter cloacae*, an opportunistic pathogen, is one of the main bacteria causing many extraintestinal infections in hospitals. The objective of this study was to characterize isolated bacteriophages in wastewater from Río Abajo with antimicrobial activity against the *E. cloacae* Complex, according to their biological and molecular properties. In this study, a water sample from the Río Abajo was used to isolate the phages using the enrichment and double-layer agar assay methods. One morphology of the Plaque Forming Units (PFU) in the agar, was the largest and predominant than the others. For this reason, it was selected to perform its characterization. Three rounds of purification were performed to ensure homogeneity of the phage based on the morphological characteristics of the PFU. Biological characterization tests were also carried out (stability against ranges of pH, temperature, sensitivity to ultraviolet-UV light and chloroform), as well as host specificity. Was isolated a phage whose PFU is clear, round, of 6 x 9 mm in diameter and with a stock concentration of 4.7×10^7 PFU/mL. In addition, it was observed that in the 10^{-4} and 10^{-5} dilutions, was where the best performance of obtaining phages, which were capable of lysing 86% of the host bacteria. The host specificity against different bacteria (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. aerogenes* and *E. coli*) was negative compared to *E. cloacae*, for which the lysis was complete. In the pH curve, was observed that the more stability of the phage was between pH 7 and 10. Regarding the temperature, was observed that the phages are stable between 37° and 50°C, observing that above of this temperature, there was a notable decrease in the viral title. About sensitivity to UV light, in the first min (first 15 min) in front of it, the replication rate is reduced to zero. The phage isolated against the *E. cloacae* complex called Enterobacter phage vB_EcRAM-01, produces clear PFU which is indicative of a lytic phage. It was also observed that it presents stability at temperatures between 25° and 50°C and pH 7 and 11. What's more, was observed an important host specificity because it only infects, *E. cloacae*. Regarding a molecular characterization, we discovered that the isolated phage vB_EcRAM-01, is a miophage of 178477bp with a content of 45.8% of G-C and with approximately, 294 genes present, with genes that encode proteins of morphology, inactivation, adsorption to cells, DNA injection and characterization of lytic enzymes. Additionally, this genome has 2 tRNAs in its genome, a tRNA-Met (cat) which has 77 bases and 55.8% of G-C, and a tRNA-Gly (tcc) with 76 bases and 47.4% of G-C. Apart from its genes that encode structural proteins, modification and DNA replication, it has genes for holins and endolysins, that are typical of a lytic bacteriophage.

Keywords: Bacteriophages, *E. cloacae* Complex, biological characterization, molecular characterization, “de novo” assembly, massive sequencing.

CAPÍTULO I
MARCO CONCEPTUAL

1 MARCO CONCEPTUAL

1.1 INTRODUCCIÓN

Durante el siglo XX (descubrimiento de la Penicilina en 1941, estreptomycinas en 1943, Cefalosporinas en 1945, Trimetoprim 1962, Oxazolidinonas en 2000) (Hutchings *et al.*, 2019; Nicolaou y Rigol, 2018) los antibióticos han sido la defensa primaria contra las enfermedades bacterianas. Desafortunadamente, su uso inapropiado en hombres animales y plantas en términos de abuso tanto en cantidad y tiempo y el no cumplimiento de las normas de control de infecciones han disminuido su eficacia (Cisternas, 2016). Se calcula que la mitad de la producción mundial de los antibióticos se destina con fines de alimentación para uso animal o vegetal (Cisternas, 2016; Golkar, 2013).

Una consecuencia considerable del uso indiscriminado de los antibióticos ha sido la adquisición y evolución de resistencia de los microorganismos (Fig. N° 1), debido a la gran plasticidad que muestran las bacterias, su capacidad de sobrevivir en condiciones selectivas les ha conferido la habilidad de ser resistentes a la acción de los antimicrobianos (Lewis, 2013).

La resistencia a los antimicrobianos es un problema de Salud Pública. Esto lo ha manifestado la OMS al declarar que es una de las grandes amenazas a la humanidad (WHO, 2017). Mientras, que el CDC aseguró que el mundo se encuentra en la era post antibióticos (CDC, 2013). Estos hechos nos permiten deducir que es necesario desarrollar nuevos agentes antimicrobianos. Sin embargo, la investigación y el desarrollo de estos fármacos ha avanzado lentamente debido a la aprobación de los entes reguladores (Knoll y Mylonakis, 2014).

Cada año a nivel mundial 700,000 personas mueren se estima que para 2050 esta cifra suba a 10 millones, de los cuales en los Estados Unidos (EE. UU.), más de 2.8 millones de personas son afectadas por bacterias resistentes a los antibióticos y más de 35000 personas mueren al año como resultado de esto. De las 700,000 personas que mueren anualmente como resultado directo de esas infecciones, incluyendo 230,000 personas debido a la tuberculosis multidrogo-resistente (CDC, 2019). El problema se extiende alrededor del mundo, en China el 89% de los hogares utilizan indiscriminadamente antibióticos, en Túnez 69% y en India el 19%, el número de muertes por bacterias resistentes a antibióticos duplica el número de muertes por malaria (World Economic Forum, and Risk Response Network 2013).

En Panamá, con relación a la evolución de la resistencia a nivel hospitalario, se han identificado siete tipos de bacterias (ESKAPEE) que se encontraban entre los ocho patógenos responsables del 80% de las infecciones reportadas: *S. aureus* (16%), *Enterococcus* spp. (14.4%), *E. coli* (12%), *Staphylococcus coagulasa negativa* (11%), *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* (8%), *P. aeruginosa* (8%) y *Enterobacter* spp. (5%). En este estudio la resistencia estaba presente en estos microorganismos (Moreno, 2018).

Una de las principales preocupaciones con estas bacterias es su capacidad de contaminación y colonización de sitios que deberían permanecer estériles en los hospitales. Causan graves enfermedades en los pacientes internados, principalmente en aquellos que se encuentran en la unidad de cuidados intensivos (López, 2015).

Dentro de este grupo, se encuentra *E. cloacae*, patógeno oportunista, que en conjunto con la *E. coli*, son una de las causas de muchas infecciones extraintestinales en los hospitales (Madigan, 2012; Bornet *et al.*, 2000). El *E. cloacae* representa casi un 100% de infecciones en diferentes sitios anatómicos. Estos microorganismos son difíciles de tratar debido, a sus múltiples mecanismos de resistencia (Khawaja *et al.*, 2016; Madigan, 2012).

Estas bacterias han ocasionado brotes infecciosos y provocado la muerte de varias personas en cuidados intensivos en todo el mundo, por ejemplo, en Grecia las bacterias multi-drogo resistentes y extensivamente resistentes se les considera endémicas. Por lo que se les considera de alto riesgo y que requieren de una verificación eficaz para su eliminación. Por ello, es fundamental desarrollar técnicas de control (Khawaja *et al.*, 2016).

El tratamiento convencional para eliminar infecciones en instrumentos por *E. cloacae* resistente consta de la desinfección de material con agentes antimicrobianos. En pacientes, el tratamiento consiste en suministrar cócteles de antibióticos que puedan actuar de manera sinérgica favoreciendo su eliminación. Estas alternativas no son completamente efectivas debido a la resistencia a los desinfectantes y, además, la combinación de estos ejerce una presión selectiva que genera cepas resistentes a un número cada vez mayor de antibióticos. Es por ello, por lo que los controles típicos solamente detienen su crecimiento, pero no las eliminan (Madigan, 2012).

1.2 JUSTIFICACIÓN

Es por esto, que es fundamental que la Ciencia genere alternativas al uso de antibióticos que permitan un control adecuado y de igual manera, logren brindar una buena calidad de vida. Una de las nuevas propuestas para reducir el uso de antimicrobianos, es la terapia con bacteriófagos o fagoterapia (Abedon, 2017a; 2017b). Esta técnica ha tenido gran interés y acogida en los últimos años, principalmente debido a su especificidad y eficacia tanto en países de Europa del Este entre los que están Rusia, Polonia, Georgia (Stone, 2002) como en los EEUU, para su uso en terapia contra infecciones y también, como aditivos alimentarios, para prevenir enfermedades transmitidas por alimentos (Howard *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2010).

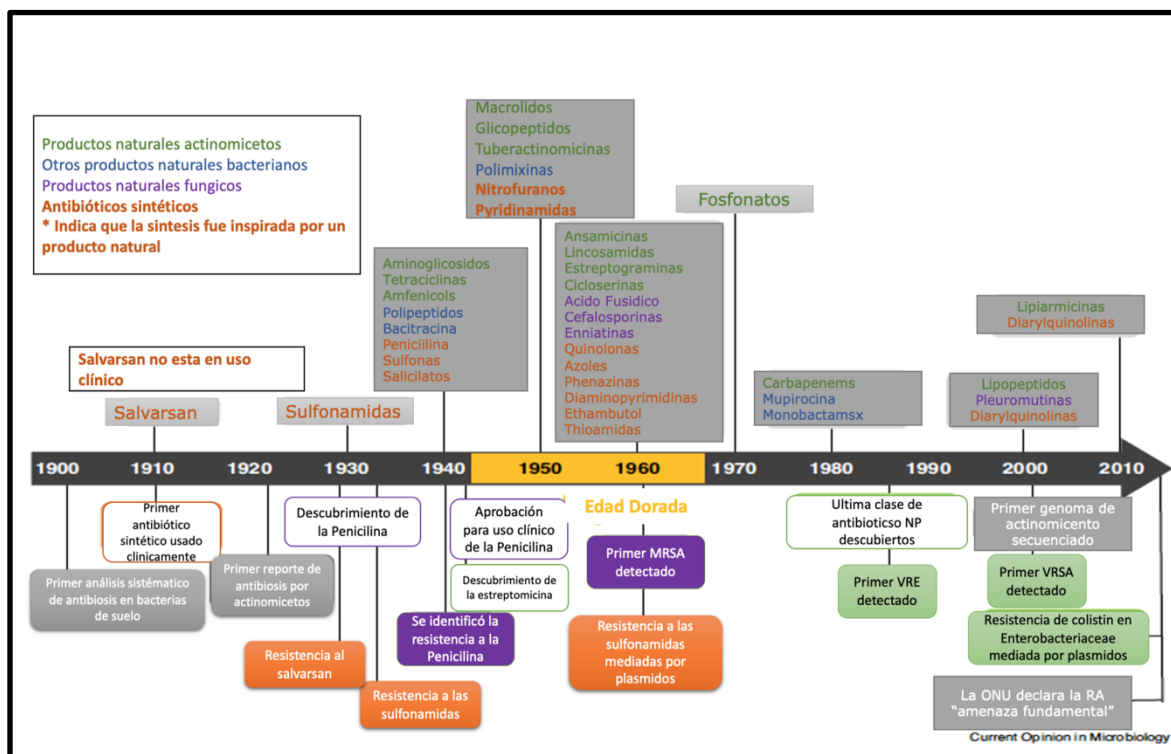


Figura 1. Línea de tiempo que muestra el descubrimiento de los antibióticos y su correspondiente surgimiento de las resistencias a los mismos. (Hutchings *et al.*, 2019)

2 GENERALIDADES ACERCA DE LOS VIRUS

Los virus (Fig. N° 2), se definen como un biosistema elemental con algunas propiedades de los seres vivos poseen genoma y la capacidad de adaptarse a un ambiente cambiante. Poseen genes, se replican, se desarrollan y se adaptan a un huésped, en particular en nichos biológicos. Fuera de estos nichos biológicos, los virus son bioquímicamente inertes porque no producen ni almacenan energía. Adicionalmente, los virus han sido considerados agentes filtrables menor de 0.45 micras muy pequeños (Pietilä *et al.*, 2014). Además, los virus son ubicuos cuya presencia fue demostrada en cualquier ambiente en el que la vida está presente. Sin embargo, desde 1992 se conocen virus gigantes (familia *Mimiviridae*), que han desafiado esta definición, y también, los recientemente descubiertos, Tupanvirus (Cisternas, 2016; Golkar, 2013). Los virus de acuerdo con el Sistema Baltimore de Taxonomía pueden ser divididos en 7 clases: de ADN, ARN y retro-transcriptores. Los virus no tienen capacidad de metabolizar por sí mismo. Tienen la facultad de convertirse en parásitos de las células hospederas que infectan. Una vez adentro, obtienen el control del hospedero, se replican y liberan nuevos viriones que lideran la disrupción de las funciones celulares.

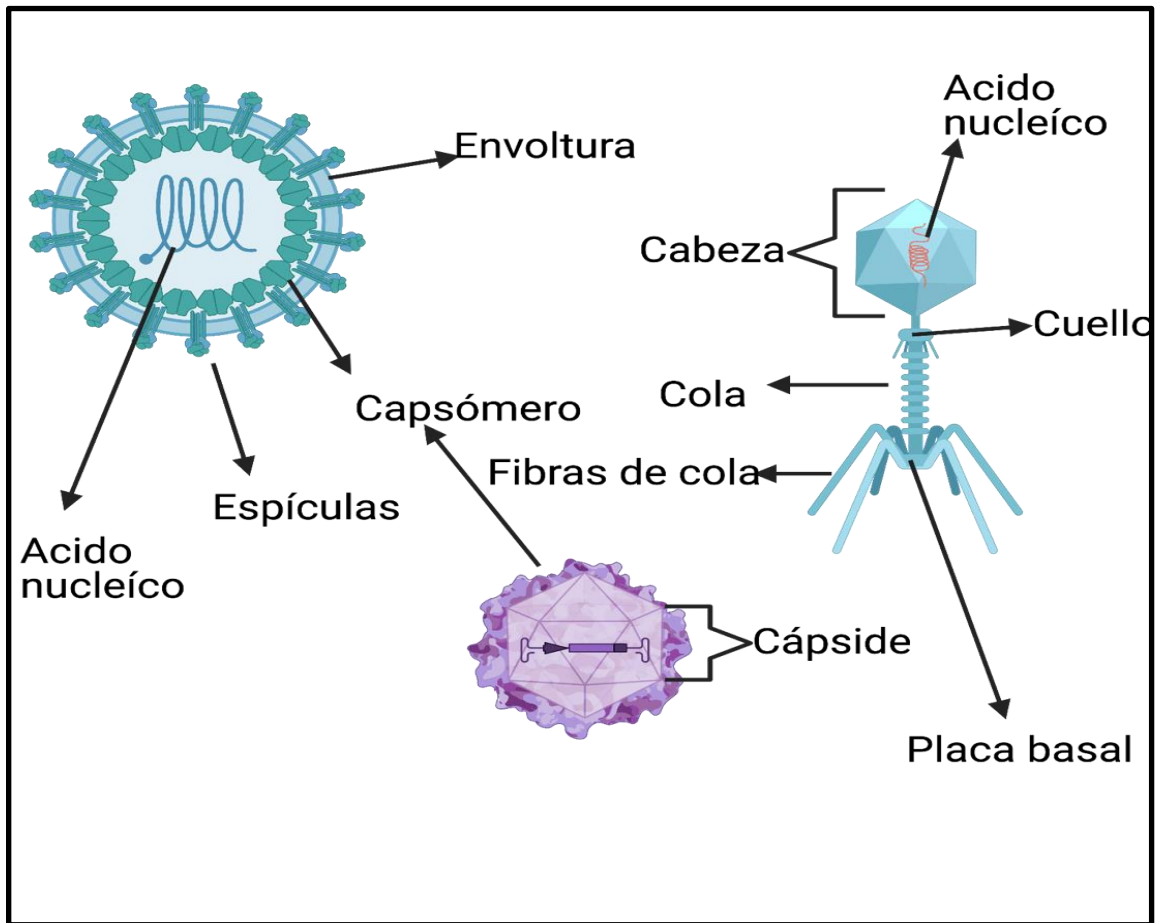


Figura 2. Estructura básica de los virus. Se observa virus envueltos, desnudos y de morfología compleja cada una con sus propias estructuras. Creado por el autor.

Hasta la fecha, todos los virus conocidos poseen genomas de ADN o ARN, incluyendo ADN circular de cadena doble (dc) o cadena simple (cs), ADN dc lineal, ARN cs lineal polaridad positiva o polaridad negativa, ARN cs segmentado o ARN dc.

Los fagos son partículas víricas extraordinariamente robustas y estables, que utilizan células bacterianas como huéspedes para la replicación. Los bacteriófagos con genoma lineal ADN dc forman el grupo más grande. La mayoría de los virus también tienen genomas de ADN dc, ya sea lineales o circulares y solo son unos pocos virus que han sido aislados con ADN cs circular (Mochizuki *et al.*, 2012; Qing, 2012).

Los virus pueden ser categorizados en base en términos de los tipos de organismos celulares que ellos infectan. Existen 3 tipos de células: miembros del dominio *Eukarya*, *Archaea* y *Bacteria*. Los virus que infectan bacterias por razones históricas se les ha denominado bacteriófagos del griego “que come bacterias” (Hyman y Abedon, 2019).

3 BACTERIÓFAGOS. ESTADO DEL ARTE

3.1 Generalidades e Historia

Los bacteriófagos son los entes biológicos más abundantes de la tierra, pero inofensivos para los humanos. Estimados en un total de 10^{30} a 10^{32} en todo el planeta, jugando un rol determinante en el balance de los ecosistemas bacterianos (Piuri, 2019; Clokie *et al.*, 2011). Incluso forman parte de nuestro cuerpo (viroma) (Hyman y Abedon, 2019; Brown, 2018) Mucho de los estudios sobre los fagos y sus aplicaciones en la terapia y la biología molecular se encuentran resumidos en la Tabla 1 y Figura N° 3.

Tabla 1. Recuento Histórico de los bacteriófagos (Keen, 2015; Salmond y Fineran, 2015; Abedon, 2008).

PREHISTORIA DE LOS BACTERIOFAGOS		
Año	Investigador(es)	Hallazgo
1896	Hankin	Acción bactericida de una sustancia indefinida en las aguas de los ríos Jumma y Ganges sobre la bacteria del cólera
1898	Gamaleya	Iguales observaciones sobre <i>B. subtilis</i>
HISTORIA DE LOS BACTERIOFAGOS		
1915	Twort	Observó “aguda infección de micrococos”
1917	D’Herelle	Identificó los bacteriófagos
1917	D’Herelle	Experimentos de fagoterapia
1921	Bruynoghe & Maisin	Uso de fagos contra <i>S. aureus</i>
1939	Ellis & Delbrück	Experimento de crecimiento en un solo paso
1940		Visualización por microscopía electrónica
1943	Luria y Delbrück	Mutaciones son espontáneas y aleatorias (pre adaptativa), no dirigidas (post adaptativa).
1946	Hershey y Delbrück	Dos virus pueden genéticamente recombinarse cuando coinfectan la misma célula.
1952	Hershey, Chase, Zinder, Lederberg, Luria y Human	DNA, no proteína es el material indiscutible de la vida. Los virus pueden transferir ADN entre células (transducción). Una vez adaptado a un hospedero particular, los virus la habilidad de infectar otros hospederos es disminuida (debido a enzimas de restricción)

1955	Benzer	La secuencia de un gen es lineal; la recombinación puede ocurrir entre nucleótidos adyacentes.
1962 1967-1968	Lwof, Horne y Tournier Gellert, y otros	Clasificación de los virus Aislamiento de enzimas de restricción
1976	Fiers	Secuencia ssRNA del fago MS2
1977	Sanger	Secuencia del genoma ADNcs del fago Φ X174
1985-1988	Smith	Desarrollo de presentación de fagos
1989	Berg y Borsheim	Los fagos son abundantes en el agua Fagos involucrados en la producción de anticuerpos.
1989	Lerner y Winter	Rol de los fagos en el cambio de los microbios es demostrado
1990	Bratbark, Proctor	
1996	Waldor	Conversión Lisogénica de <i>Vibrio cholerae</i> es demostrada
1999-2012	Breibart, Hendrix, Brussow	Diversidad de los fagos, ecología y virómica. Primer genoma sintético Φ X174. Sistema inmunitario bacteriano es demostrado (CRISPR-Cas)
2013	Instituto Eliava, Georgia	PhagoBurn: inició la fase clínica I y II.
2018	Arnold, Smith y Winter	Premio Nobel de Química (presentación de fagos y la evolución dirigida de las enzimas.

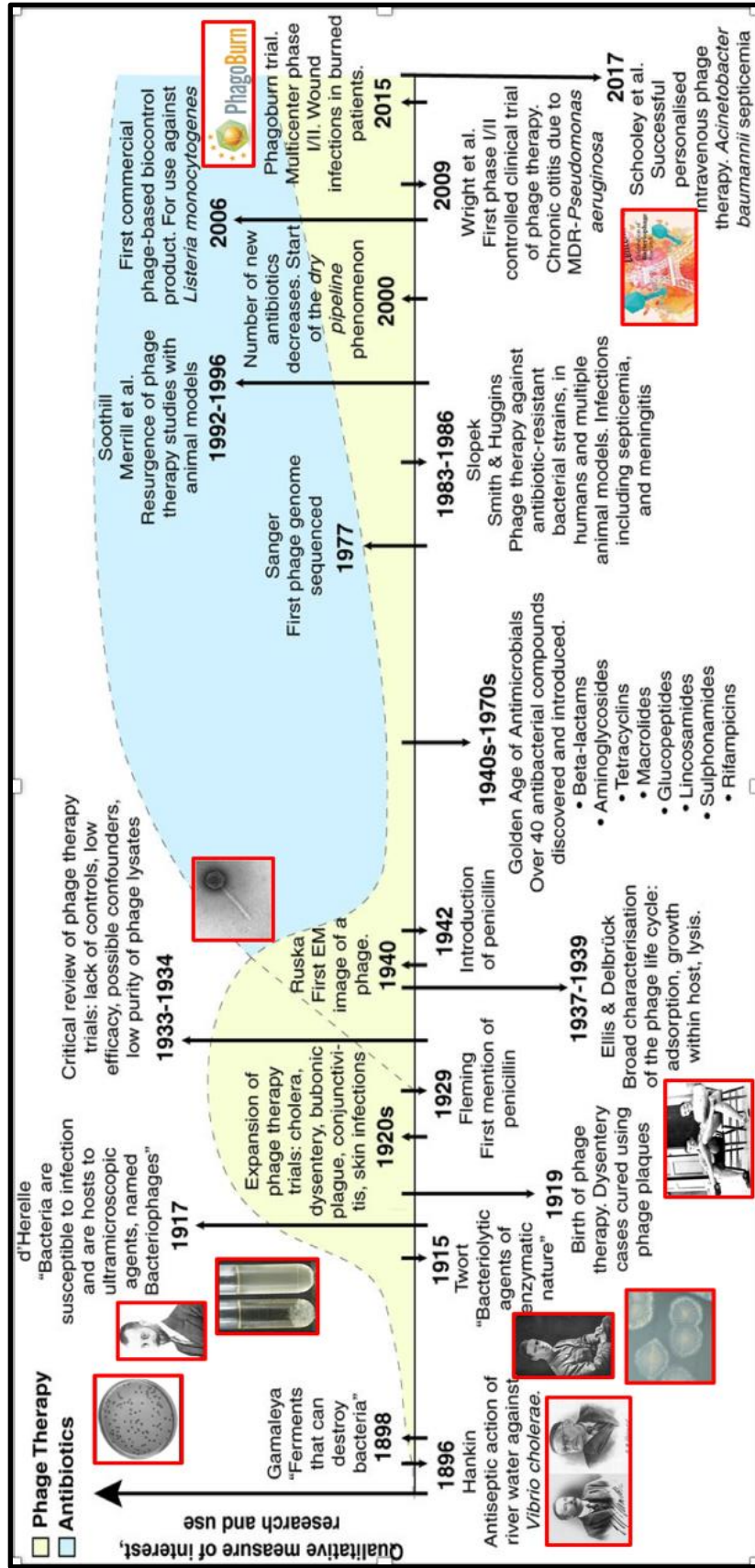


Figura 3. Cronología de los principales eventos en la historia de la investigación sobre fagos, terapia con fagos y antibióticos. Las curvas de fondo representan una medida cualitativa del interés general, investigación y uso de la terapia con fagos (Piuri 2019).

3.2 Morfología

La morfología de los fagos varía según la especie, pero al observarlos al microscopio electrónico, todos presentan una estructura básica que puede ser poliédrica o filamentosa (Fig. N° 4). Los fagos están protegidos por una cubierta proteica denominada cápside, la cual está formada por subunidades llamadas capsómeros y esta cubierta, logra poseer una envoltura lipoproteica que en conjunto proporciona la especificidad y configuración de cada fago (Sillankorva *et al.*, 2008).

La morfología más simple de un fago es similar a la de otros virus (que poseen cápside protectora de los ácidos nucleicos). Como se ve en otros virus, ciertos fagos pueden tener protrusión de proteínas en la superficie. Aún estos fagos con largos tallos tienen apéndices. Su tamaño oscilaría entre 20- 200 nm de largo por 80-100 de ancho (Ackermann, 2009a; 2009b).

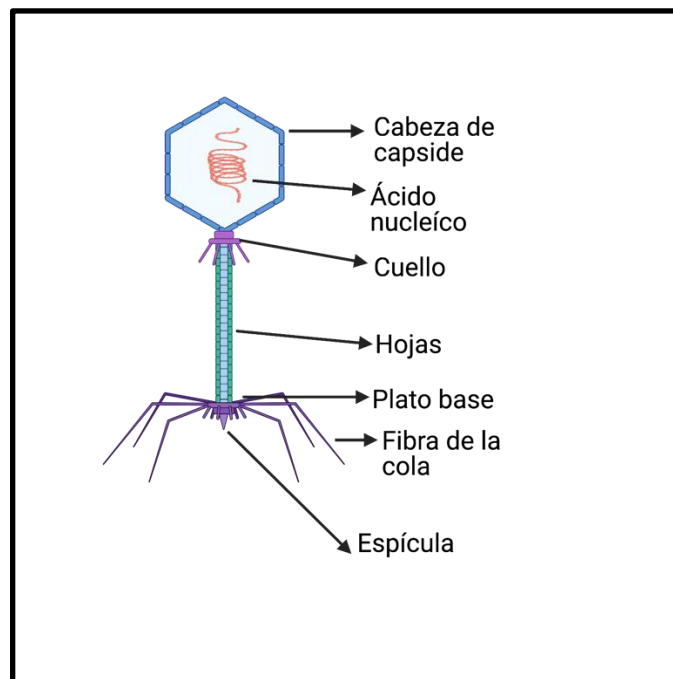


Figura 4. Estructura morfológica de los bacteriófagos. Los bacteriófagos tienen una organización específica constituida por una cabeza o cápside que contiene el ácido nucleico (ADN o ARN), cuello, hojas, plato base, fibras de la cola y espículas. Creado por el autor.

Los fagos presentan 6 diferentes morfotipos (Fig. N° 5):

1. Grupo 1: fagos compuestos, ya que poseen cabeza poliédrica, cola rígida con vaina contráctil y fibras caudales.
2. Grupo 2: carecen de vaina contráctil, su cola es flexible y pueden o no tener apéndices terminales.
3. Grupo 3: poseen cabeza poliédrica más larga que la cola, la cual no es contráctil y pueden tener o no apéndices.
4. Grupo 4: tienen una estructura poliédrica con un capsómero grande en cada vértice y algo muy característico es que no poseen cola.

5. Grupo 5: lo conforman fagos en forma de poliedro simple, sin los grandes capsómeros del grupo anterior.
6. Grupo 6: son los fagos más simples que existen, cuya estructura consiste únicamente en un filamento sencillo y largo, sin cabeza ni otra organización (Piuri, 2019; Ackermann, 2009a; 2009b).

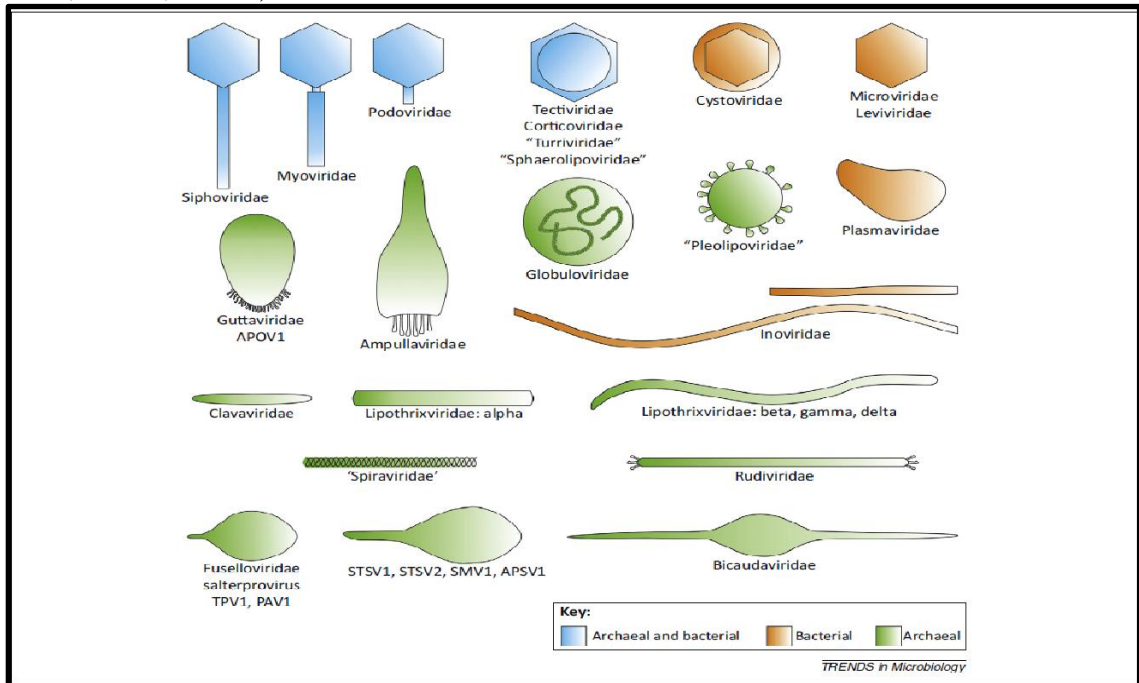


Figura 5. Morfortipos de bacteriófagos relacionados con su familia y célula hospedera. Cada uno de los morfortipos indica principalmente el tipo de taxonomía que representa cada uno de ellos (Pietilä *et al.*, 2009, 2014).

3.3 Genoma

Los fagos están distribuidos a lo largo de la corteza terrestre y tienen diferentes genomas. Estos pueden ser de ADN o ARN y de simple o doble cadena (Fig. N° 6). Debido a su pequeño tamaño, los genomas de los fagos fueron de los primeros en ser secuenciados completamente. El estudio de los genomas ha tenido dos principales objetivos, por un lado, la utilización de los fagos y sus derivados como herramientas biotecnológicas. Por el otro, conocer la adaptación de los fagos a su huésped y su evolución a nivel genómico (Lima-Mendez *et al.*, 2008; Bose y Barber, 2006; Fouts, 2006).

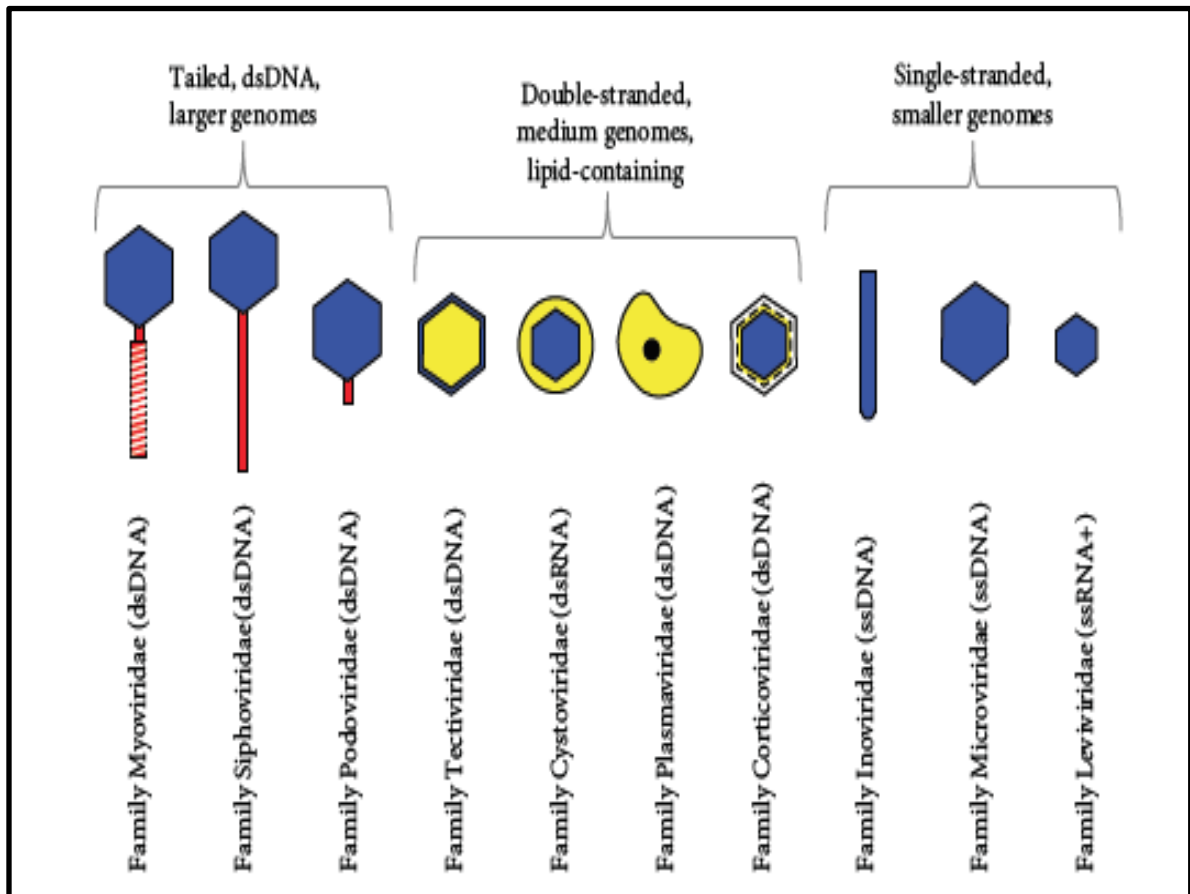


Figura 6. Clasificación de los fagos. En base al contenido genético ya sea de doble o simple cadena. (Lima-Mendez *et al.* 2008; Bose y Barber 2006; Fouts 2006). La principal característica de los genomas fágicos es su organización en mosaico, de manera que cada genoma está constituido por una combinación de módulos intercambiables dentro de una misma población mediante recombinación (Hendrix 2003). El rango de tamaño en el que se encuentran los genomas descritos es muy amplio, abarcando desde poco más de 2,000 a de 300,000 pb o superior. También, es muy amplia su diversidad en cuanto a las secuencias (Hatfull, 2008).

3.4 Taxonomía

La clasificación de los fagos ha sido asignada por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés), específicamente por el subcomité de virus bacterianos, la cual organiza estos virus en diferentes familias del Orden *Caudovirales* (Qing, 2012), *Ligamenvirales* y *Tubulavirales* (Tabla N° 2). La taxonomía está basada principalmente en el análisis morfológico, tipo de ácido nucleico y organismo huésped (Ackermann, 2009b; Pietilä *et al.*, 2009).

En la Tabla N° 2, se puede observar que existe 3 Órdenes y 15 familias de fagos que se clasifican de acuerdo con la naturaleza de su genoma y a sus características morfológicas de acuerdo con el 10^{mo} Reporte del año 2019.

Tabla 2. Virus que infectan bacterias según (Davidson, 2020).

ADN doble cadena (dc)			
Orden	<i>Ligamenvirales</i>	Orden Caudovirales	
Familia	<i>Corticoviridae</i>	Familia	<i>Ackermannviridae</i>
Género	<i>Corticovirus</i>	Subfamilia	<i>Aglimvirinae</i>
Familia	<i>Plasmaviridae</i>	Género	<i>Agtrevirus</i>
Género	<i>Plasmavirus</i>		<i>Limestonevirus</i>
Familia	<i>Sphaerolipoviridae</i>	Subfamilia	<i>Cvimirinae</i>
Género	<i>Gammasphaerolipovirus</i>	Género	<i>Kutternvirus</i>
Familia	<i>Tectiviridae</i>		<i>Viunavirus</i>
Género	<i>Alphatectivirus</i>	Familia	<i>Herelleviridae</i>
	<i>Betatectivirus</i>	Subfamilia	<i>Bastillevirinae</i>
	<i>Gammatectivirus</i>	Género	<i>Agatevirus</i>
			<i>Bastillevirus</i>
			<i>Bequatrovirus</i>
			<i>Caeruleovirus</i>
			<i>Nitunavirus</i>
			<i>Tsarbombavirus</i>
			<i>Wphvirus</i>
		Subfamilia	<i>Jasinkavirinae</i>
		Género	<i>Pecentumvirus</i>
		Subfamilia	<i>Twortvirinae</i>
		Género	<i>Kayvirus</i>
			<i>Silviavirus</i>
			<i>Twortvirus</i>
			<i>Sepunavirus</i>
		Subfamilia	<i>Spounavirinae</i>
		Género	<i>Okubovirus</i>
			<i>Siminovitchvirus</i>
		Familia	<i>Myoviridae</i>
		Subfamilia	<i>Ampvirinae</i>
			<i>Eucampyvirinae</i>
			<i>Ounavirinae</i>
			<i>Peduovirinae</i>

	<i>Tevenvirinae</i>
Género	<i>Karamvirus</i>
	<i>Jiaodavirus</i>
	<i>Dhakavirus</i>
	<i>Slopekvirus</i>
	<i>Moonvirus</i>
	<i>Krischvirus</i>
	<i>Mosigvirus</i>
	<i>Gelderlandvirus</i>
	<i>Schizotequatrovirus</i>
	<i>Gaprivervirus</i>
	<i>Tequatrovirus</i>
Subfamilia	<i>Vequintavirinae</i>
Subfamilia no asignada	
Familia	<i>Siphoviridae</i>
Subfamilia	
Subfamilia no asignada	<i>109 géneros</i>
Familia	<i>Autographiviridae</i>
Género	<i>10 géneros</i>
Familia	<i>Podoviridae</i>
Subfamilia	<i>Picovirinae</i>
Género	<i>Cepunavirus</i>
	<i>Negarvirus</i>
	<i>Rosenblumvirus</i>
	<i>Salasvirus</i>
Subfamilia	<i>Sepvirinae</i>
Género	<i>Traversvirus</i>
	<i>Diegovirus</i>
	<i>Oslovirus</i>
Subfamilia no asignada	<i>22 géneros sin asignar</i>

ADN cadena simple (cs)			
Orden Tubulavirales		Orden sin asignar	
Familia	<i>Inoviridae</i>	Familia	<i>Microviridae</i>
Género	<i>Affertcholeramvirus</i>	Subfamilia	<i>Bullavirinae</i>
	<i>Bifilivirus</i>	Género	<i>Alphatrevirus</i>
	<i>Capistrivirus</i>		<i>Gequatrovirus</i>
	<i>Coriovirus</i>		<i>Sinsheimervirus</i>
	<i>Fibrovirus</i>	Subfamilia	<i>Gokushovirinae</i>
	<i>Habenivirus</i>	Género	<i>Bdellomicrovirus</i>
	<i>Infulavirus</i>		<i>Chlamydiamicrovirus</i>
	<i>Inovirus</i>		<i>Spiromicrovirus</i>
	<i>Lineavirus</i>		
	<i>Parhipatevirus</i>		
	<i>Primolicivirus</i>		
	<i>Psecadovirus</i>		
	<i>Restivirus</i>		
	<i>Saetivirus</i>		
<i>Scuticavirus</i>			
<i>Staminivirus</i>			
<i>Subteminivirus</i>			
<i>Tertilicivirus</i>			
<i>Thomixvirus</i>			
<i>Versovirus</i>			
<i>Vicialiavirus</i>			
<i>Villovirus</i>			
<i>Xylivirus</i>			
Familia	<i>Plectroviridae</i>		
Género	<i>Plectrovirus</i>		
	<i>Suturavirus</i>		
	<i>Vespertilliovirus</i>		

ARNdc		ARNcs (+)	
Orden sin asignar		Orden sin asignar	
Familia	<i>Cystoviridae</i>	Familia	<i>Leviviridae</i>
Género	<i>Cystovirus</i>	Género	<i>Allolevivirus</i>
			<i>Levivirus</i>

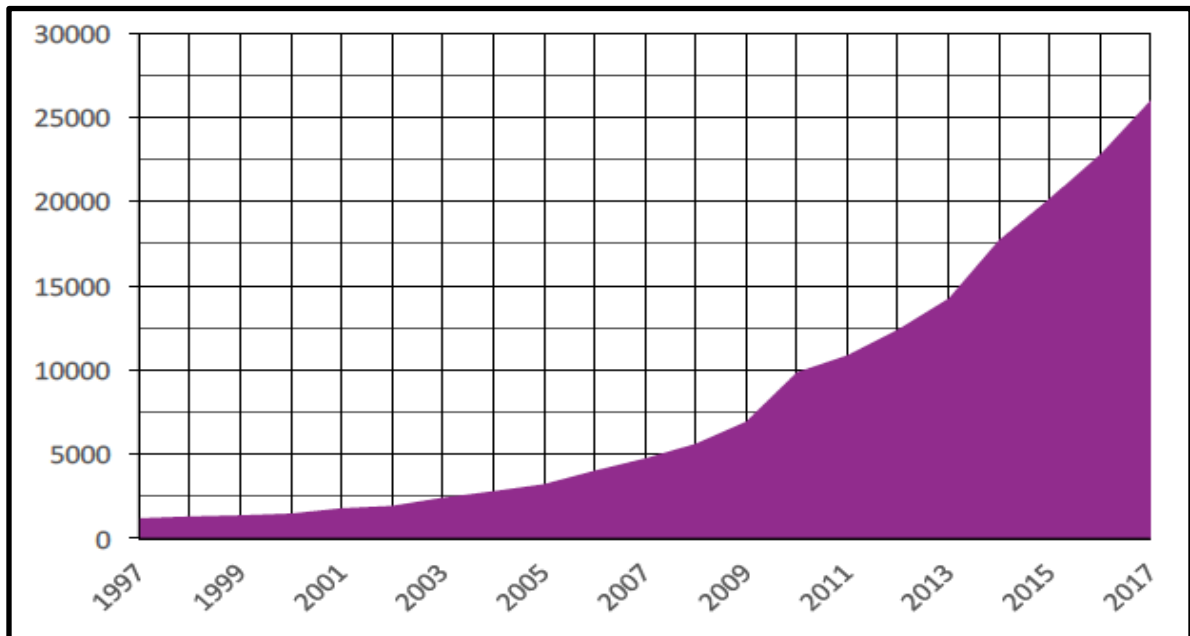


Figura 7. Número de genomas de fagos secuenciados a lo largo de los años (Adriaenssens y Brister, 2017).

Las nuevas técnicas de secuenciación de nucleótidos han permitido la publicación de una amplia cantidad de secuencias de fagos (Fig. N° 7). Los investigadores comenzaron a preguntarse qué sucede con este número de genomas que no han sido clasificados, lo cual ha tratado de explicarse por diferentes grupos de investigación y de taxonomía como el Phage Proteomic Tree (Rohwer y Edwards, 2002).

Aunque existen aproximadamente 40 criterios para la clasificación, no hay un criterio universal para el ICTV para género y especie. A partir del 10^{mo} Reporte de ICTV, el subcomité de taxonomía de virus bacterianos y arqueas ha clasificado los fagos en especies, géneros, familias y subfamilias, dando como resultado, 14 subfamilias, 702 géneros y 2015 especies, para el año 2019 (Adriaenssens *et al.*, 2020; Adriaenssens y Brister, 2017).

3.4.1 Fagos con cola, Orden Caudovirales (ADNdc)

Este grupo taxonómico constituye el más antiguo (3.5 billones de años) y amplio de virus bacterianos. Cerca del 95% de los fagos descritos actualmente están en este orden y consiste en 13 familias, 44 subfamilias, 671 géneros y 1967 especies (Davidson, 2020; Ackermann y Tiekotter, 2012). Los viriones consisten solamente de una cápside de proteína y un ADNdc lineal. Las partículas fágicas son desnudas y tienen morfología “binaria”, con cabezas de simetría icosaédrica constituida por 5-6 capsómeros (es difícil de observar por microscopía electrónica). Las colas de los fagos son verdaderas hélices o consisten en discos o sistemas de absorción como puntas y fibras. Los genomas pueden ser largos, complejos y usualmente organizados en módulos (Brussow y Desiere, 2001; Botstein, 1980) El genoma más grande conocido es el fago G del *Bacillus*, contiene 498 Kb y 684 genes, y están dentro de las cápsides. Los viriones se ensamblan por diferentes vías para la cabeza y fibras de cola (Davidson, 2020).

3.4.1.1 *Myoviridae* (*T4-like*)

Consisten en 5 subfamilias, 168 géneros y 434 especies (Davidson, 2020), con colas contráctiles de largo variable (Fig. N° 8). Son comunes en ambientes acuáticos. Poseen ciclos líticos y amplio rango de hospedadores infectando distintas especies de bacterias, constituyéndose en una ventaja competitiva.

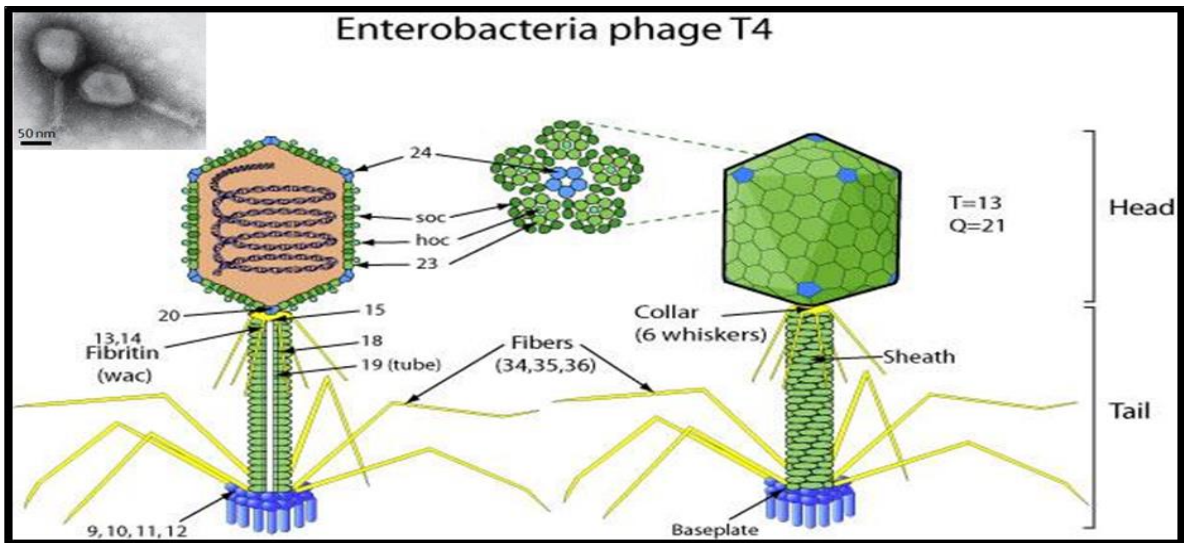


Figura 8. Fago T4 de Enterobacteria (Davidson 2020; Swiss Institute of Bioinformatics 2018)

3.4.1.2 *Podoviridae* (*T7-like*)

Consisten en 3 subfamilias, 45 géneros y 132 especies (Davidson, 2020). Poseen colas cortas no contráctiles (Fig. N° 9). Aislados con menor frecuencia del agua de mar. Tienen ciclo lítico. Rango estrecho de hospedadores (Davidson, 2020).

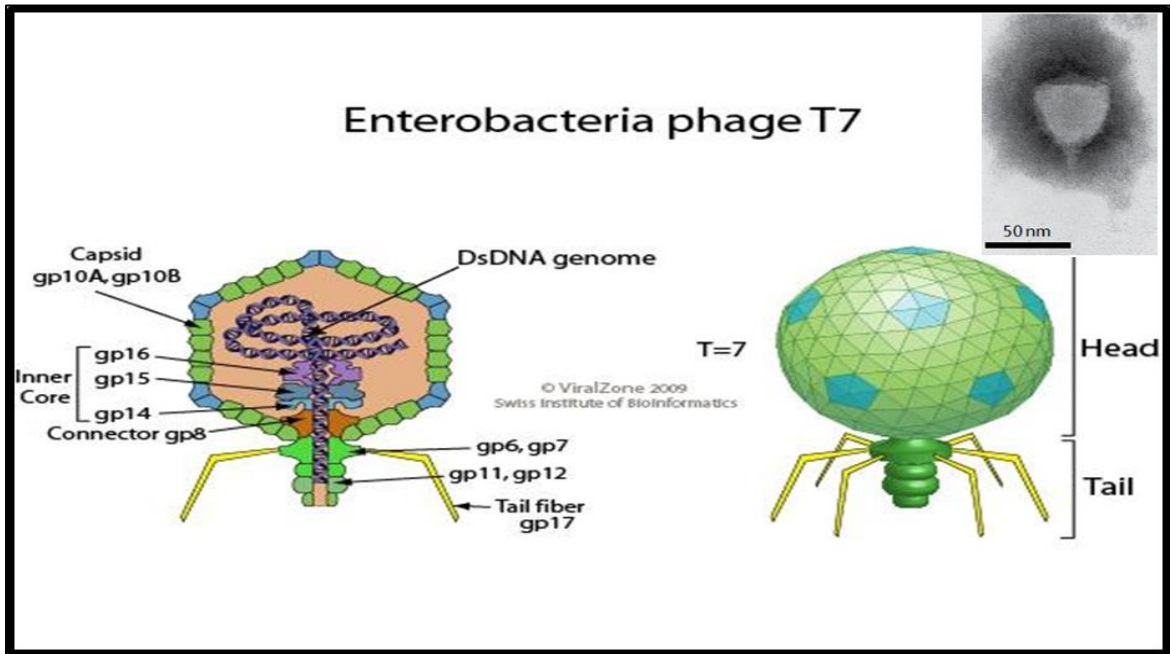


Figura 9. Fago T7 de enterobacteria (Swiss Institute of Bioinformatics, 2018).

3.4.1.3 Siphoviridae (fago lambda)

Consisten en 13 subfamilias, 265 géneros y 783 especies, poseen colas largas no contráctiles con integración al cromosoma bacteriano (Fig. N° 10). Frecuentemente aislados en agua de mar, tienen rango relativamente amplio de hospedadores. Son de baja tasa de replicación (Davidson, 2020).

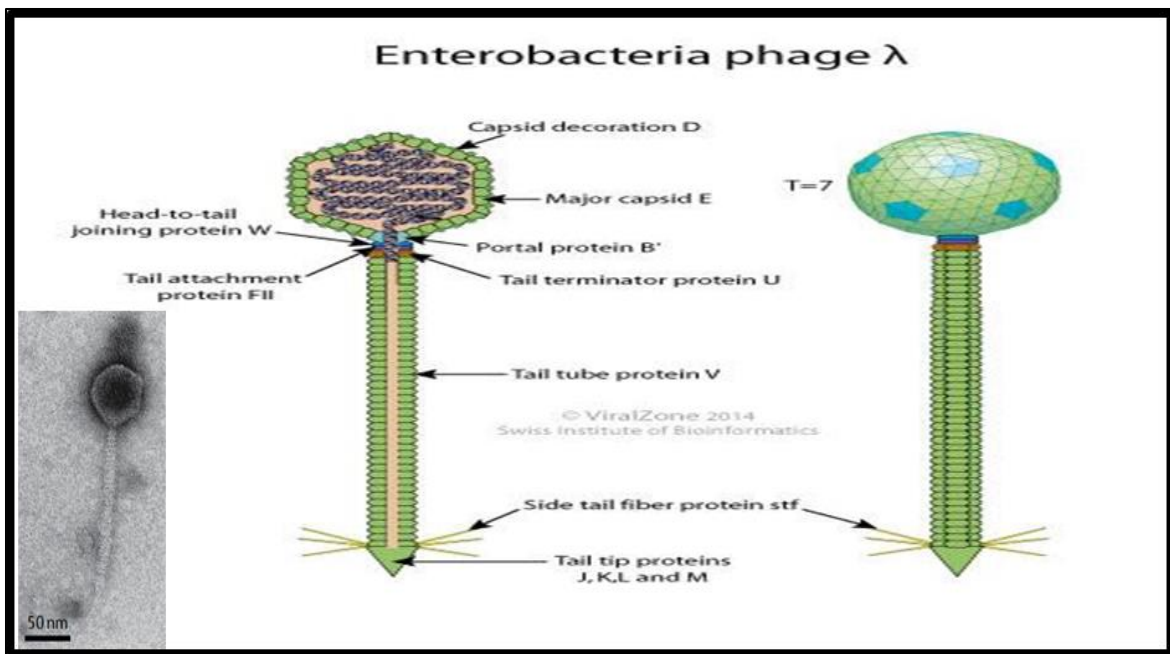


Figura 10. Fago λ de Enterobacteria (Swiss Institute of Bioinformatics, 2018).

3.4.2 Fagos Polihédricos, filamentosos y fagos pleomórficos.

Los fagos sin cola corresponden a menos del 4% de los virus bacterianos. Están clasificados en 10 familias pequeñas las cuales algunas veces incluyen solo un género y especie. Las familias difieren en propiedades fundamentales, pueden ser envueltos o desnudos. Hay 3 tipos: fagos poliédricos icosaédricos o con simetría tipo cúbica y fagos filamentosos con simetría helicoidal (Davidson, 2020).

Muchos o todos los fagos de las familias *Fuselloviridae*, *Inoviridae*, *Lipothrixviridae*, y *Plasmaviridae* son lisogénicos. No está completamente elucidado para *Lipothrixviridae* mientras que hay mecanismos mediados por integrasa en *Plasmaviridae* y por recombinasas de huésped en Inovirus (Davidson, 2020).

3.4.2.1 Fagos de ADN poliédrico

3.4.2.1.1 Microviridae (ADNcs)

Los viriones son icosaédricos desnudos, de 27 nm de diámetro, con 12 capsómeros y contiene ADNcs circular. Ellos infectan diversos huéspedes (Enterobacteria, Bdellovibrio, Chlamydia y Spiroplasma), son clasificados en 2 subfamilias 6 géneros y 21 especies (Fig. N° 11) (Davidson, 2020).

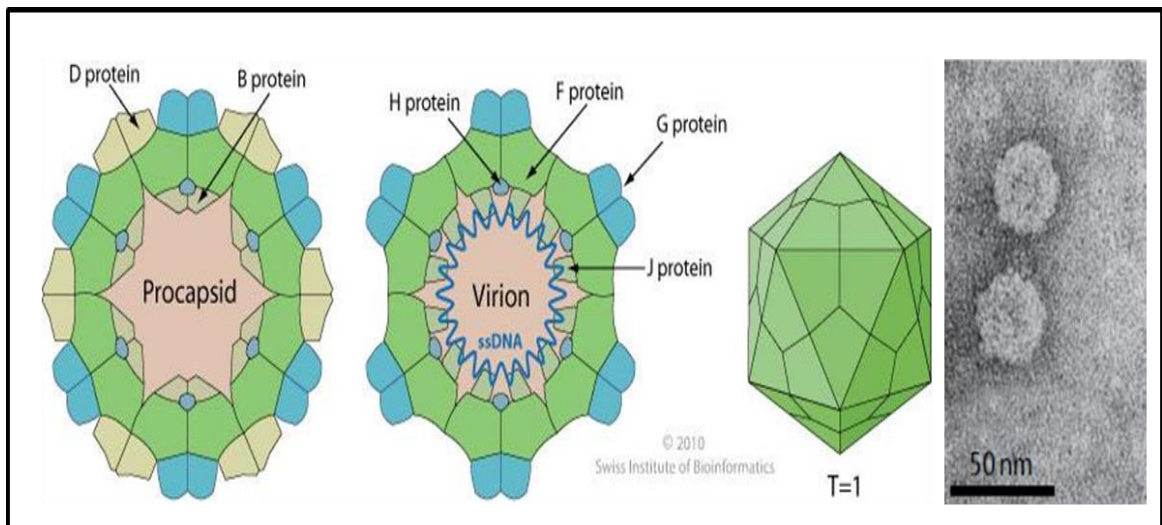


Figura 11. Microfotografía de ϕ MH2K virus de *Bdellovibrio bacteriovorus* (Swiss Institute of Bioinformatics, 2018).

3.4.2.1.2 Corticoviridae (ADNbc)

Esta familia posee dos especies, el fago PM2 y *Cr39582* (Fig. N° 12) ambos, aislado de aguas residuales y además los primeros bacteriófagos que tienen lípidos. Al igual que los tectivirus, tiene una cápside de proteínas con una vesícula interna de fosfolipoproteínas. Dos fagos pobremente caracterizados fueron aislados de agua de mar (Davidson, 2020).

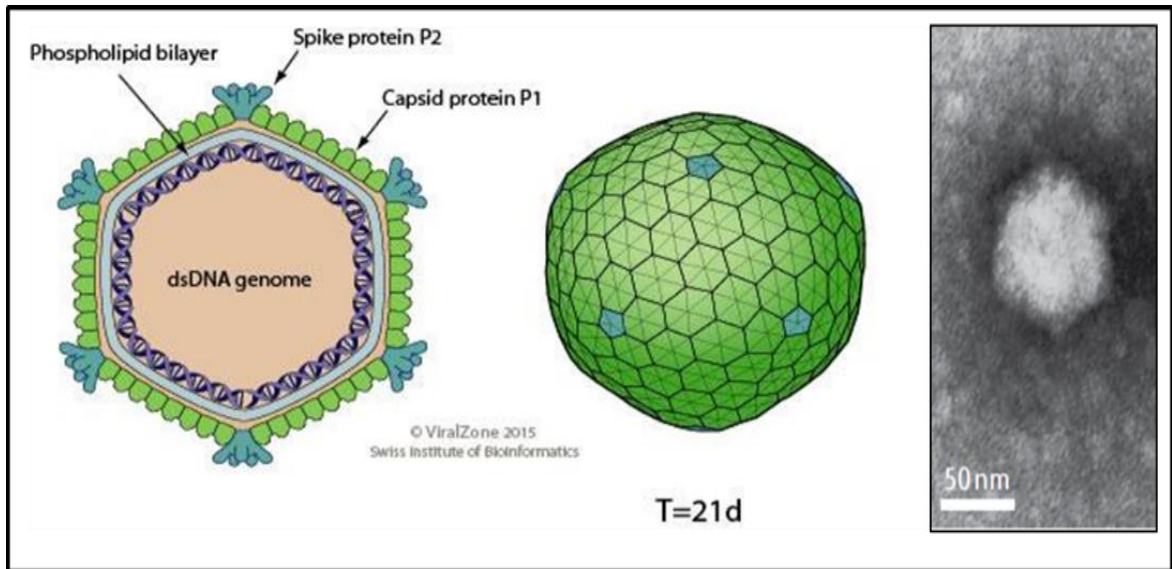


Figura 12. Pseudoalteromonas PM2 (Swiss Institute of Bioinformatics, 2018).

3.4.2.1.3 Tectiviridae (ADNbc)

Este grupo consiste en 3 géneros y 7 especies (Davidson, 2020). La partícula viral tiene una cápside rígida de proteínas que contiene una vesícula de lipoproteínas. En adición los tectivirus de *Bacillus* tienen espículas apicales (Fig. N° 13). Luego que el fago se adhiere a su bacteria huésped o de que son tratadas con cloroformo, la vesícula se transforma en sí en un tubo el cual sirve como dispositivo de eyección de ácido nucleico. A pesar de eso los tectivirus son de tamaño pequeño e infectan bacterias no relacionadas (Davidson, 2020).

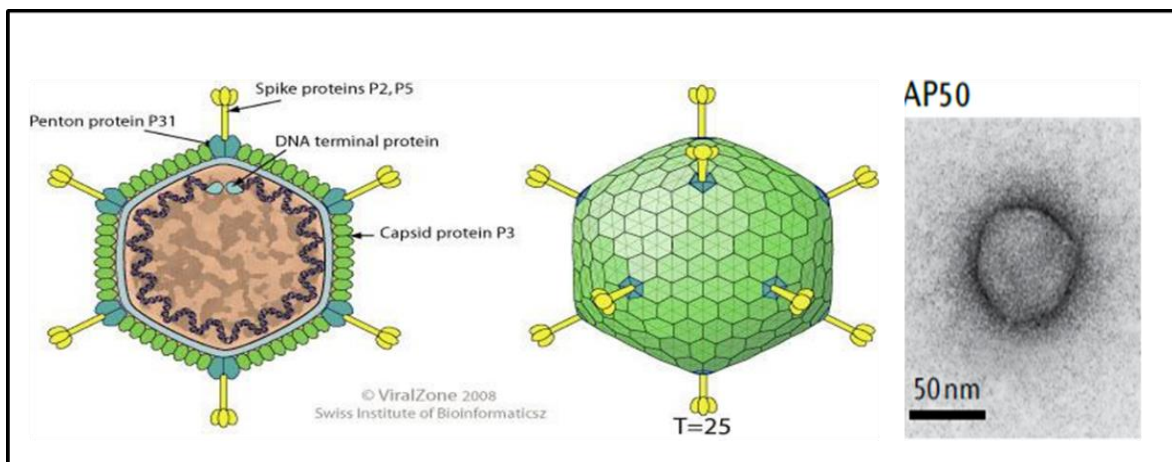


Figura 13. Fago de enterobacteria PRD1 (Swiss Institute of Bioinformatics, 2018).

3.4.2.2 Fagos de ARN poliédricos

3.4.2.2.1 Leviviridae (ARNmc)

Los levivirus son similares a los poliovirus (virus desnudos). Su genoma consiste en 4 genes superpuestos, y su ARN actúa como ARNm y por lo tanto positivo-enlazado. La mayoría de los levivirus conocidos son colífagos que adsorben al pili F. Ellos han sido divididos por serología y genoma estructural en dos géneros. Algunos levivirus infectan huéspedes y otras enterobacterias, consisten en 2 géneros y 4 especies (Fig. N° 14) (Davidson, 2020).

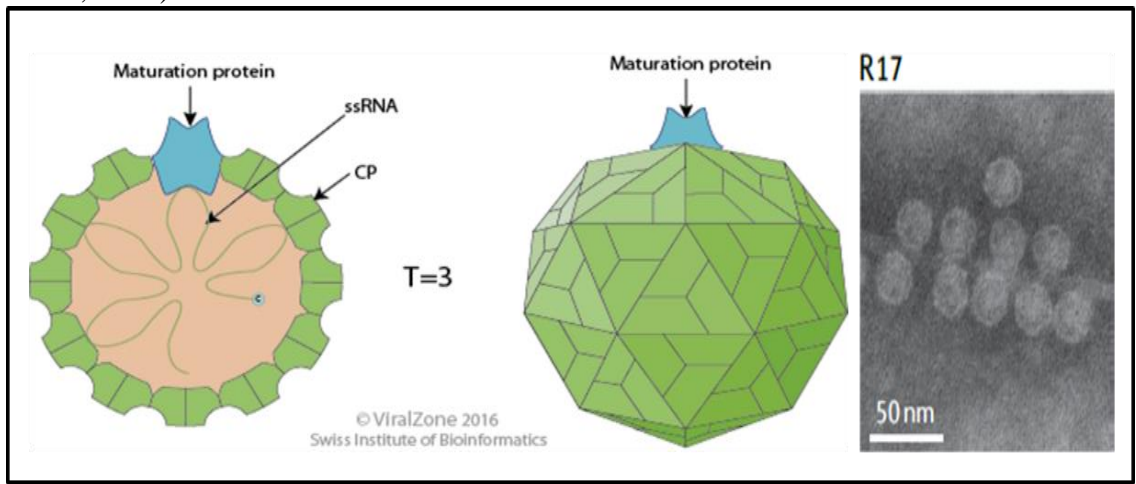


Figura 14. Fago MS2 de *E. coli* (Swiss Institute of Bioinformatics, 2018).

3.4.2.2.2 Cystoviridae (ARNbc)

Esta familia posee un género (*Cystovirus*) y 7 especies. Tiene una cápside icosaédrica rodeada de una envoltura de lípidos. Son bacteriófagos únicos, ya que contienen un complejo de ARN polimerasa dodecaedro y 3 moléculas de ARNbc. Las cápsides de cistovirus entran en el espacio entre la célula bacteriana y la membrana citoplasmática (Fig. N° 15) (Davidson, 2020).

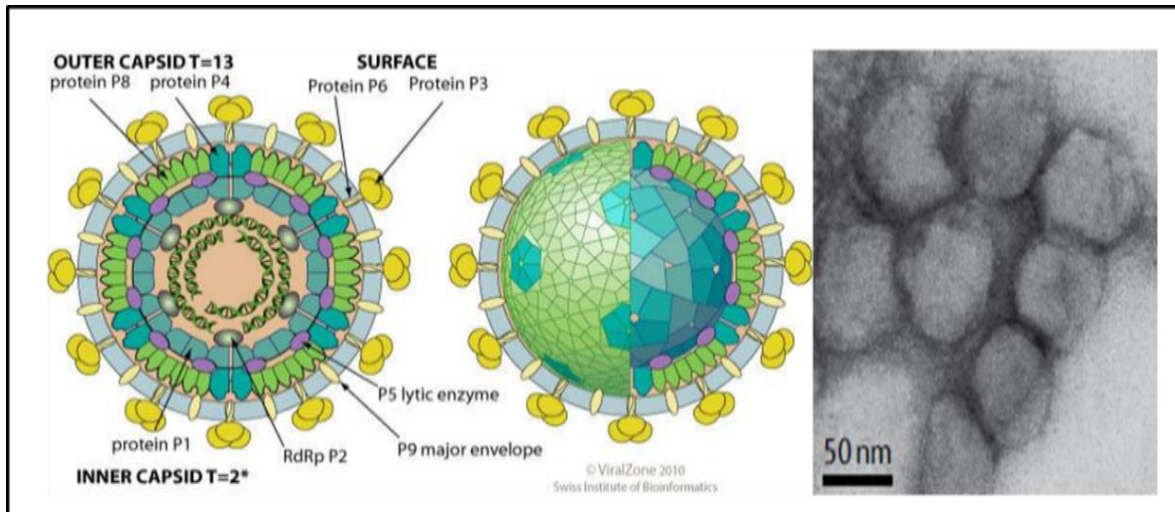


Figura 15. Fago de *Pseudomonas* phi6 (Swiss Institute of Bioinformatics, 2018).

3.4.2.3 Fagos filamentosos

3.4.2.3.1 Inoviridae (ADNmc)

Esta familia consiste en 23 géneros y 29 especies con diferentes morfologías (largos o filamentosos flexibles cuyas longitudes reflejan el tamaño de sus genomas) y rango de huéspedes. El fago de ADN replica como doble hebra.

Ellos infectan enterobacterias y relacionados, el género *Thermus*, clostridia y propionibacteria los viriones son sensibles a cloroformo y sonicación y son muy resistentes al calor. El género *plectrovirus*, cuyos viriones son cortos, bacilos derechos, incluyen 15 miembros que infectan mycoplasmas. Tienen capacidad de producir progenies indefinidamente (Davidson, 2020).

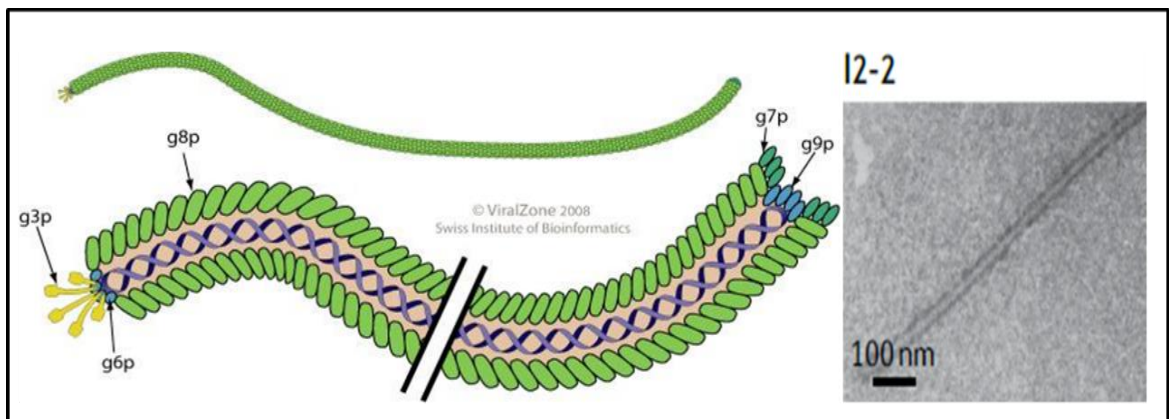


Figura 16. Fago de *E. coli* M13. Lipothrixviridae (dsDNA) (Swiss Institute of Bioinformatics, 2018).

3.4.2.3.2 Lipothrixviridae

Esta familia incluye 4 géneros y 11 especies de virus de arqueobacterias termofílicas (Fig. N° 16).. Las partículas virales están caracterizadas por una envoltura de lipoproteínas y un núcleo tipo nucleosoma. En contraste con los inovirus las progenies son

liberadas por lisis. Lipothrixvirus pueden ser heterogéneos y forman dos subfamilias incluidas en 4 géneros (Davidson, 2020).

3.4.2.3.3 Rudiviridae (ADNbc)

Esta familia incluye 1 género y 3 especies y dos virus de diferentes longitudes, las cuales fueron aisladas de *Sulfolobus* (Archea termofílica). Estas partículas virales son rígidas, alargadas sin envolturas. Ruduvirus y Lipothrixvirus tienen homologías en sus genomas lo cual sugiere que forman una superfamilia (Davidson, 2020).

3.4.2.4 Fagos pleomórficos

3.4.2.4.1 Plasmaviridae (ADN)

Solo hay un miembro definitivo en esta familia, el virus Acheloplasma MVL2 o L2 (Fig. N° 17). Otros aislados parecidos a *plasmavirus* pueden ser encontrados, mas no logran ser clasificados con certeza en la actualidad. Los viriones no tienen cápsides, pero poseen una envoltura y un gránulo de nucleoproteínas. Los *plasmavirus* infectan a sus huéspedes por fusión de la envoltura viral con la membrana celular y la progenie se libera en ciernes (Davidson, 2020).

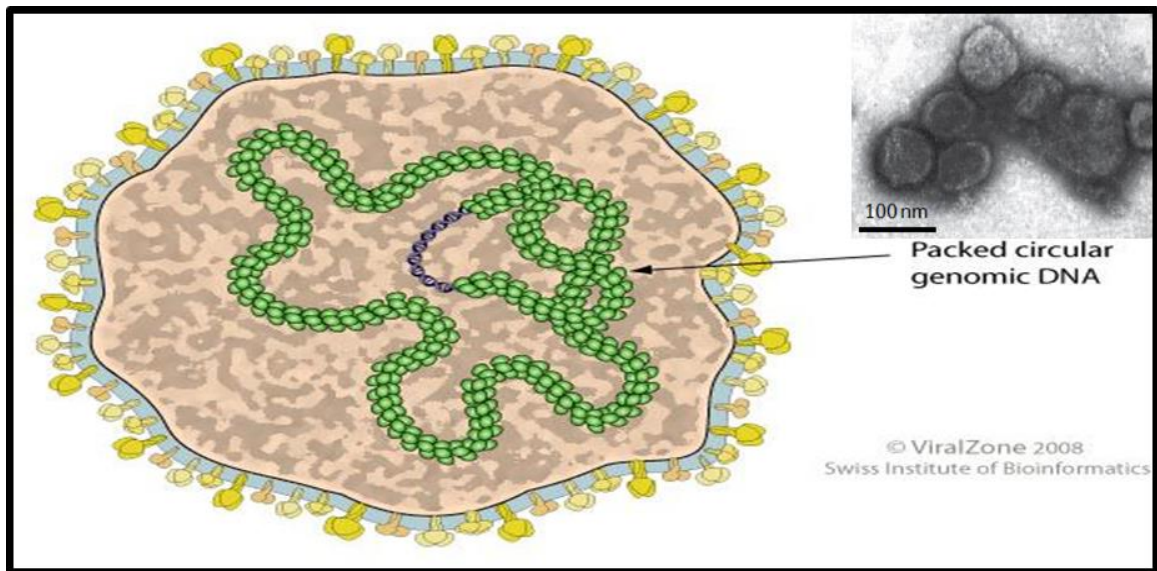


Figura 17. Acheloplasma virus L2 (Swiss Institute of Bioinformatics, 2018).

3.4.2.4.2 Fuselloviridae (ADNdc)

Esta familia consiste en 2 géneros y 9 especies. Son virus que consisten en una envoltura y núcleo cápside. Esta última está envuelta. Los viriones tienen apariencia de hoja, son flexibles y disponen de protrusiones que se extienden a lo largo de toda la envoltura. Un polo mediante el cual el virus se adhiere a la pared celular del huésped. El *Fuselloviridae* infectan el archeonte *Sulfolobus* (el cual habita en ambientes con temperaturas mayores a 70°C y pH menores a 4.0) (Davidson, 2020).

3.5 Ciclo de replicación de los bacteriófagos

Los fagos, como todos los otros virus requieren un huésped específico. Fuera de un huésped, las partículas de los fagos son solo paquetes inertes que protegen el genoma del daño físico, químico y enzimático hasta que el ácido nucleico viral es liberado a un huésped susceptible (Jing, 2012).

El ciclo de vida de un fago se aprecia en la Figura 18. Este inicia con la infección de la bacteria susceptible. La infección ocurre cuando el bacteriófago reconoce receptores específicos de la superficie bacteriana e inyecta su material genético en la célula. Una vez en el citoplasma, dependiendo del tipo de virus, de las condiciones ambientales y de la célula hospedera, los bacteriófagos pueden llevar a cabo un ciclo lítico o uno lisogénico (Gómez y Vives Flórez, 2009).

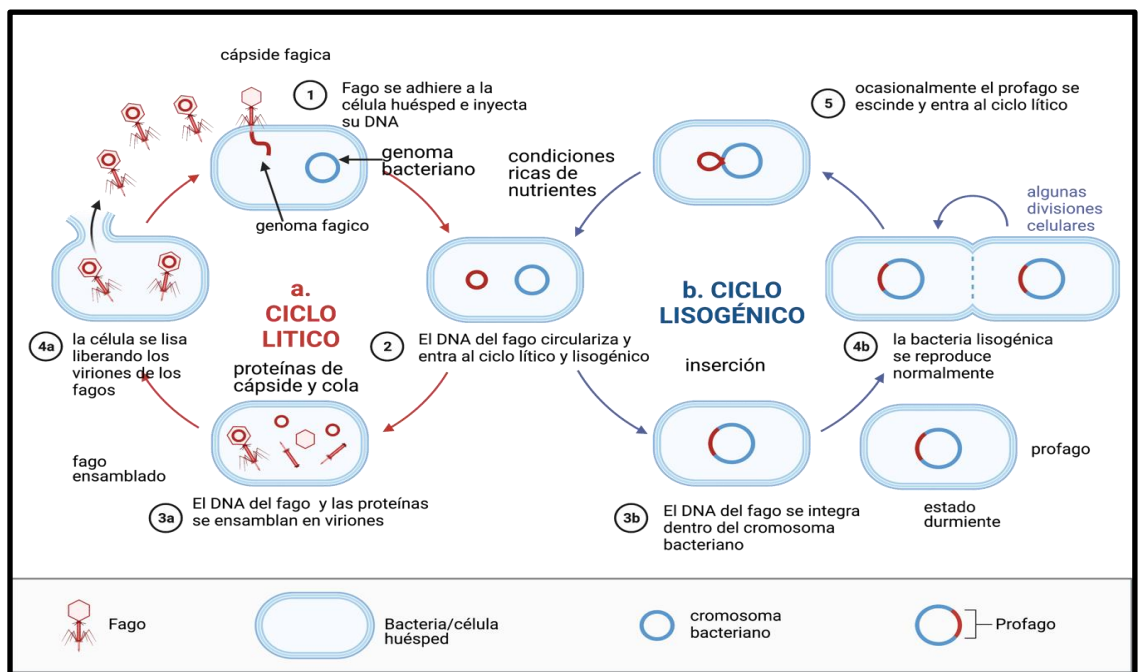


Figura 18. Ciclo de Replicación de los fagos. Ciclo lítico (a) Se dan los procesos de adhesión, inyección del material genético integración del genoma del fago al bacteriano, transcripción y traducción de las proteínas estructurales y de lisis o que permite la liberación de los viriones y lisogénico (b) en la cual el genoma viral se integra al cromosoma bacteriano posteriormente la bacteria lisogénica se replica normalmente. Sin embargo, durante procesos o cambios ambientales (Temperatura, PH, luz ultravioleta, presencia de nutrientes) (Erez *et al.* 2017) el fago entra en fase de replicación viral terminando en un ciclo lítico lisando finalmente la bacteria. Creado por el autor.

3.5.1 El ciclo lítico

Cada uno de los pasos implicados en el ciclo lítico del fago (Fig. N° 18) desempeña un rol en el predominio de un fago específico por sobre otros que poseen el o los mismos huéspedes en un ecosistema determinado. En líneas generales predominarán los fagos capaces de infectar el mayor número de huéspedes infectados, y la mayor cantidad de viriones por célula en el menor tiempo posible. Los parámetros del ciclo lítico se determinan a través de un ensayo de lisis en un ciclo, donde se analiza el número de partículas

de fago liberadas en un ciclo lítico (Hyman and Abedon, 2019). La figura N° 19 muestra una curva típica obtenida en este tipo de ensayo y cómo se determinan los parámetros del ciclo lítico a través de estas curvas.

La adsorción es el primer paso del ciclo de infección del fago a la célula huésped y está mediada por estructuras o receptores específicos (Proteínas o lipopolisácaridos). Sigue la penetración en donde el material genético del fago ingresa. La punta de la cola penetra la capa de peptidoglicano y la membrana interna para poder liberar el genoma del fago. Sigue la replicación del material genético en donde el ADN se recirculariza evitando la degradación de exonucleasas de la bacteria, iniciándose su proceso de multiplicación. Aquí se expresan los genes tempranos, medios y tardíos los cuales, codifican material genético, proteínas estructurales y se sintetizan lisinas. Todo esto se da simultáneamente mientras se da la morfogénesis y el ensamblado de los elementos estructurales. Cabeza, embalaje de ADN, morfogénesis de la cola y termina con la lisis y liberación (Feiner *et al.*, 2015).

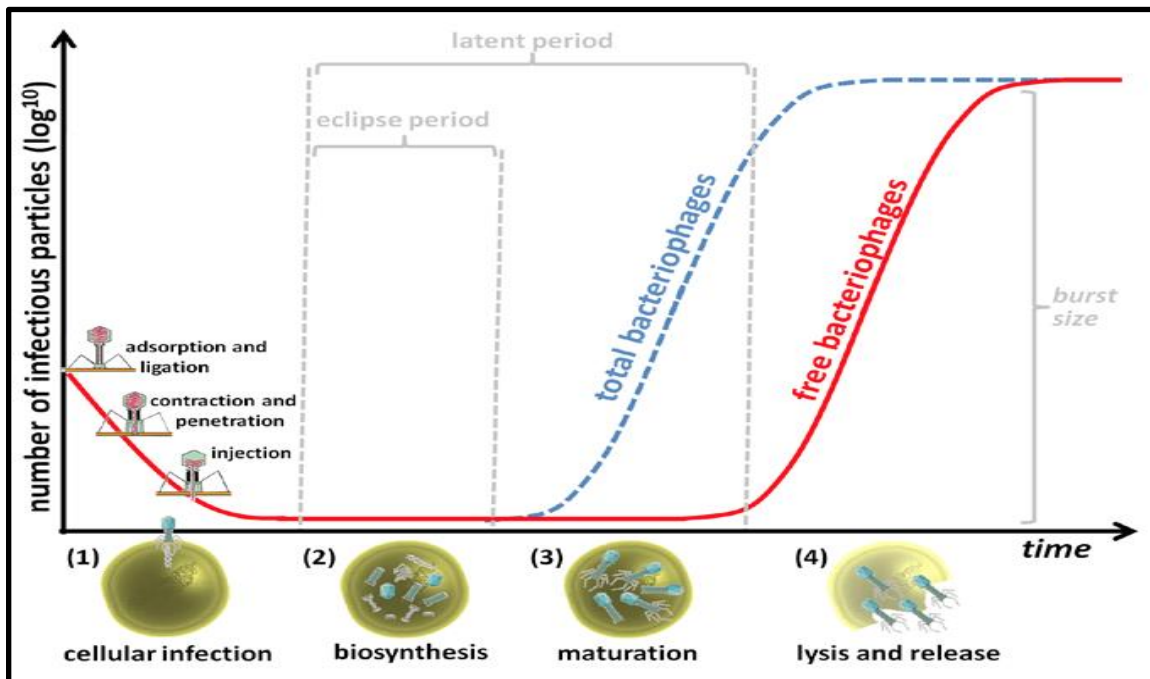


Figura 19. Pasos comunes del ciclo lítico del bacteriófago. Esta gráfica está correlacionada con la representación gráfica de una curva de crecimiento. Los pasos comunes del proceso de replicación lítica de bacteriófagos se correlacionan adecuadamente con representación gráfica de la curva de crecimiento de un paso (aquí se utiliza un miovirus como ejemplo). Una vez el bacteriófago se encuentra con una bacteria diana, se lleva a cabo el proceso de replicación del bacteriófago: (1) el bacteriófago se adsorbe y se liga a los receptores de la superficie bacteriana, y luego, la vaina se contrae y se cree que el tubo de la cola hueca penetra a través de la membrana citoplásmica de la célula, inyectando el ácido nucleico del bacteriófago en el citoplasma bacteriano; (2) el material genético del bacteriófago, controla la maquinaria biosintética del huésped, y durante el período del eclipse, la expresión del ARNm ocurre dando como resultado una biosíntesis macromolecular dirigida; (3) durante la maduración, las proteínas estructurales de bacteriófagos sintetizados se ensamblan y las partículas de bacteriófagos se acumulan dentro de la celda; (4) al final del período latente, la acumulación de proteínas líticas da como resultado la lisis celular y la liberación de bacteriófagos. El tamaño de la ráfaga corresponde al número medio de partículas de bacteriófago de la progenie producidas por bacteria infectada (Yang *et al.*, 2019)

3.5.2 Ciclo Lisogénico

El Ciclo lisogénico (Fig. N° 18) a diferencia del lítico, no destruye a la célula hospedera, después de la adsorción del fago y penetración del material genético, es integrado al cromosoma del huésped, replicándose como parte del genoma bacteriano, logrando permanecer en estado de latencia o de profago, por periodos indeterminados pudiendo inducirse el ciclo lítico debido a factores ambientales. Los fagos que son capaces de realizar este ciclo son llamados temperados y las bacterias infectadas por estos fagos continúan reproduciéndose por varias generaciones, llevando consigo la información genética del fago, creando resistencia a ser re infectada por el mismo fago e inclusive por otros fagos similares al original (Erez *et al.*, 2017).

3.6 Aplicaciones de los bacteriófagos en Biomedicina y Biotecnología

Muchas de las aplicaciones de los fagos se muestran en la Figura N° 20. Existen numerosos productos comerciales disponibles para el tratamiento de infecciones bacterianas, especialmente dentro de la industria alimentaria. Listex, es un producto producido por EBI Seguridad alimentaria para *Listeria monocytogenes* en productos alimenticios (Prada-Peñaranda *et al.*, 2014; Dini, 2011). Livestock ha sido tratado para un amplio rango de infecciones bacterianas, incluyendo *Staphylococcus* causando mastitis en el ganado, septicemia y meningitis causadas por *E. coli* en patos y pollos (Nelson *et al.*, 2001; Barrow y Soothill, 1997) y en neumonías (Nelson *et al.*, 2001).

Las pruebas de toxicidad “*in vivo*” son requeridas después del uso de la terapia de bacteriófagos. A la fecha, sin embargo, no se han observado efectos secundarios en pollos (Oliveira *et al.*, 2006) o en humanos (Kutateladze y Adamia, 2010; Bruttin y Brüssow, 2005).



Figura 20. Ejemplos de los bacteriófagos y sus múltiples aplicaciones. Creado por el autor.

3.6.1 Fagoterapia

El uso de los fagos como agentes terapéuticos comenzó hace 100 años. Entre los ejemplos más destacados y recientes de la utilización exitosa de la fagoterapia cabe citar el uso de bacteriófagos específicos en el control biológico de *E. coli* O157:H7, productora de colitis hemorrágica (transmitida por alimentos). También, se ha estudiado el uso de fagos

en el tratamiento de infecciones peritoneales, otitis externa, en la erradicación de *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística, en el tratamiento de infecciones urinarias y osteomielitis por *S. aureus*, y en la descolonización intestinal para combatir las infecciones por *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, entre otros. Los efectos favorables de la fagoterapia podrían exceder incluso su actividad antibacteriana. Hay datos sorprendentes acerca de la actividad *in vivo* de los fagos: el conocido bacteriófago T4 de *E. coli*, podría inhibir la adsorción y la replicación de adenovirus en sus células blanco. Asimismo, el fago Pf4 de *P. aeruginosa*, habría sido capaz de inhibir el desarrollo de cepas de *Aspergillus* por secuestro de hierro (Casto *et al.*, 2016).

El estudio y desarrollo de nuevos tratamientos alternativos es de particular interés en la lucha contra la resistencia bacteriana. Los bacteriófagos presentan características que los hacen una excelente herramienta contra las bacterias patógenas debido a su especificidad y seguridad ecológica. Los fagos no solo son atractivos desde un punto de vista clínico. Se han utilizado en otras áreas como la agricultura, el control de alimentos o la industria (García-Salazar y Porras, 2018; Colom, 2016), como a continuación se describe en la tabla N° 3.

Tabla 3. Principales lugares donde se pueden encontrar bacteriófagos: la naturaleza (Clokic *et al.*, 2011) lugares urbanizados, y el cuerpo humano (Brown, 2018).

Fuente	Sitio encontrado
Lugares artificiales	Suelo
	Superficie terrestre
	Agua fresca
	Océano
	Superficie oceánica
	Ambientes extremos: hielo marino, pared de algas, zonas hipersalinas, etc.
	Hospitales y zonas similares
	Planta de tratamiento de aguas negras
	Algunas zonas bajo el impacto humano
	Cuerpo de animales
Cuerpo de animales	Tracto digestivo
	Vagina
	Tracto respiratorio y oral
	Piel
	Epitelio mucoso

3.6.1.1 Ventajas y desventajas del uso de fagos en la terapia contra infecciones bacterianas.

Las ventajas y desventajas se muestran en la Tabla N° 4, principalmente su ubicuidad en la naturaleza, versatilidad e innata resiliencia ha elevado su estatus de simples organismos de investigación a herramientas potencialmente viables y necesarias en la lucha contra el aumento de la resistencia a los antimicrobianos. Sin embargo, la transferencia de resistencia, virulencia y otros genes asociados negativamente vía bacteriófagos, es un área fundamental de investigación y entendimiento necesario que permiten la reducción de potenciales impactos negativos (Hassan *et al.*, 2021).

Tabla 4. *Ventajas y Desventajas del uso de los bacteriófagos en biotecnología (Häusler, 2006).*

Ventajas	Comentarios	Desventajas	Comentarios
1. Los fagos son específicos y no afectan al resto de las bacterias acompañantes	No hay efectos secundarios como diarrea o infecciones secundarias que ocurren con el tratamiento con antibióticos.	1. Aún faltan ensayos clínicos internacionales que prueben la eficacia de los fagos en los humanos.	Han aumentado el número de ensayos en animales, pero aún faltan ensayos en humanos
2. Debido a su especificidad no seleccionan bacterias comensales resistentes como los antibióticos.		2. La falta de especificidad de los fagos es una desventaja ya que se debe conocer con exactitud que bacteria/s están provocando la infección.	Para óptimos resultados los fagos deben ser testeados contra la bacteria antes de su uso. Difícil de implementar en infecciones agudas. Mezclas de fagos pueden combatir infecciones mixtas.
3. En principio son ino-cuos, consumimos fagos todo el tiempo. Si las preparaciones están bien purificadas (libres de toxinas y de LPS) no hay efectos secundarios descritos	Como son ino-cuos pueden utilizarse para combatir patógenos en animales de consumo humano y alimentos. (ver desv. 8)	3. También pueden seleccionarse bacterias resistentes a los fagos.	Ver vent. 5, 6, 7 y 8.
4. Los fagos son una droga “inteligente” se multiplican en el sitio de infección hasta que no hay más bacterias y luego son excretados.	Ver desv. 5	Las bacterias poseen un sistema inmune que pueden destruir los fagos.	La eficacia de los fagos debe ser testada en el laboratorio.

5. Las bacterias resistentes a un tipo de fagos pueden ser destruidas por otros fagos		5. En comparación con las moléculas químicas los fagos son de mayor tamaño y deben alcanzar el blanco del cuerpo donde ocurre la infección	Hay pocos estudios farmacológicos que respondan a estas preguntas. Como los fagos se multiplican mientras haya bacterias, un bajo número de fagos inicial en sitios poco accesibles sería suficiente.
6. Los fagos se encuentran en la naturaleza y es fácil aislar nuevos fagos en cuando las bacterias se han vuelto resistentes.	Si cada nuevo fago debe ser probado este procedimiento puede ser muy costoso.	6. las infecciones por patógenos intracelulares pueden no ser accesibles a los fagos.	Existen ciertas excepciones (Mycobacterium y Listeria)
7. La coevolución fago-bacteria permite la selección de nuevos fagos cuando las bacterias se han vuelto resistentes.	El desarrollo de nuevos antibióticos para bacterias resistentes conlleva muchos años y es muy costoso.	7. Los fagos inyectados en el torrente sanguíneo pueden ser reconocidos por el sistema inmune. Algunos son excretados rápidamente pero luego de un tiempo pueden aparecer anticuerpos que los neutralicen.	No todos los fagos se excretan rápidamente. La aparición de anticuerpos puede llevar semanas.
8. Algunas bacterias resistentes que se seleccionan durante el tratamiento con fagos son menos virulentas y pueden ser combatidas por el sistema inmune.	Las bacterias resistentes a antibióticos no suelen ser menos virulentas.	8. Conversión lisogénica. Transferencia de material genético incluidos genes tóxicos o de virulencia.	Empleo de fagos líticos, secuenciación para la detección de genes de toxinas, resistencia o virulencia. No previene el intercambio de material genético mediado por los fagos (transducción).
9. Los fagos son efectivos contra bacterias resistentes a los antibióticos.		9. La vida media de las suspensiones de fagos varía y debe ser evaluada y monitoreada.	
10. Los fagos pueden ser modificados genéticamente para compensar, corregir algunas desventajas		10. Los fagos son más difíciles de administrar que los antibióticos. Un médico con entrenamiento especial debe prescribirlos.	
11. Componentes indivi-			

duales de los fagos (como las lisinas) pueden ser usados como antimicrobianos.			
--------------------------------------------------------------------------------	--	--	--

3.6.2 Fagos en el diagnóstico bacteriano

Este es otro campo de desarrollo de los bacteriófagos. Estos métodos pueden ser específicos y económicos (Riley, 2006). Hoy en día la biotipificación a través de fagos y otros ensayos de amplificación son utilizados en conjunto con métodos de tipificación molecular. Se han utilizado métodos basados en fagos reporteros (Rondon, 2017; Piuri y Hatfull, 2009; Piuri *et al.*, 2013; Piuri y Hatfull, 2009) que poseen en sus genes marcadores fluorescentes (luciferasa), para la detección y pruebas de susceptibilidad a micobacterias (Banaiee *et al.*, 2001), así como la identificación de Salmonella y *E. coli* O157:H7 (Meile *et al.*, 2020; Wei *et al.*, 2019).

3.6.3 Presentación de fagos (phage display)

Los bacteriófagos filamentosos suelen ser fácilmente manipulados genéticamente. El *phage display* o presentación de fagos, es una metodología biotecnológica a escala nanométrica, desarrollado por Smith y Winter en 1985 (Barderas y Benito-Peña, 2019), líder en la selección de péptidos con afinidad por dianas específicas. Consiste en la modificación de la superficie del virión mediante ingeniería genética para conseguir decorar al fago con péptidos o proteínas foráneas de interés en fusión con las proteínas estructurales del virus silvestre que pueden ser tamizados dada su afinidad por una molécula específica (Schirrmann *et al.*, 2011).

Entre una amplia variedad de aplicaciones, la presentación de fagos logra encontrar interacciones entre proteína-proteína que permite el estudio de patógenos y sus hospederos, el descubrimiento de antígenos y epítomos protectores, péptidos antimicrobiales, virales, así como la selección de anticuerpos capaces de detectar o neutralizar patógenos. Además, se ha demostrado que puede ser un ventajoso vehículo de administración de péptidos anti-génicos (De la Guardia, 2018).

3.6.4 Futuras aplicaciones de la tecnología de los Bacteriófagos.

Una de las terapias prometedoras en el uso de los bacteriófagos, es el uso de endolisinas de bacteriófago líticos (Borysowski *et al.*, 2006) o fagos genéticamente modificados que no lisan bacterias, pero reparten ADN codificante de antibacterianos (Zavascki *et al.*, 2010). Recientemente se ha encontrado que ciertos fagos muestran actividad antimetastásica e inhibición de tumores. Se ha visto que puede estar relacionada con la presencia de **motivos de aminoácidos** (Lys-Gly-Asp) presentes en las proteínas de la cápside (Gorski *et al.*, 2003). Este triplete bloquea la actividad de la integrina β -3 en células cancerosas, que está involucrada en la motilidad de la célula cancerosa y la adhesión, promoviendo la metástasis. Esta integrina es producida en grandes cantidades en células cancerosas y desempeña un rol fundamental en el campo de la terapéutica del cáncer.

También, se ha visto la aplicación de los fagos para la determinación de la susceptibilidad a los antibióticos y un caso muy especial, es sobre *Mycobacterium tuberculosis* (Rondón *et al.*, 2018; Rondon, 2017; Urdániz *et al.*, 2016; Piuri y Hatfull, 2009; Banaiee *et al.*,

2001). Estas metodologías basadas en el empleo de fagos se fundamentan en la habilidad que presentan de infectar y replicarse en bacilos de *Mycobacterium* spp viables, y algunas de estas metodologías, se basan en el empleo de micobacteriófagos termosensibles, es decir que infectan a 37°C, pero solo lisan a las bacterias a 30°C. En la actualidad se ha descrito tres métodos basados en el uso de fagos para la detección de *M. tuberculosis*, algunas de ellas han demostrado su utilidad en el ámbito hospitalario: ensayo de amplificación de fagos, fagos reporteros de luciferasa y fagos reporteros de genes (Rondon, 2017).

Este método se emplea además directamente en aislados de *M. tuberculosis* para realizar pruebas de susceptibilidad a fármacos, de tal forma, que después de la exposición a un fármaco, las bacterias sensibles no sobreviven inhibiendo la replicación del bacteriófago. Por el contrario, bacterias resistentes al fármaco, favorecen la replicación del fago, visualizándose a simple vista la aparición de placas líticas (Rondon, 2017; Piuri *et al.*, 2013).

3.7 Caracterización Biológica y Molecular de aislados de bacteriófagos del Complejo *E. cloacae*

Los bacteriófagos son un grupo diverso encontrado en una variedad de ambientes, los cuales incluyen océanos, suelo, agua potable y alimentos, e incluso, en el ser humano (Kutter y Sulakvelidze 2005). La biosfera es especialmente rica en fagos con cola del Orden de los *Caudovirales*, de las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*, entre otras que son familias de fagos de ADN. Se sabe que el 95% de estos fagos son de ADN. (Rohwer, 2014; Davidson, 2020; Breitbart *et al.*, 2004).

La caracterización de los fagos usualmente involucra La estabilidad del fago a diferentes condiciones ambientales como lo es la temperatura, pH, luz UV, cloroformo (Basdew y Laing, 2014), el análisis del material genético, genómica estructural y comparativa (Brusow y Desiere, 2001), filogenia, análisis de parámetros biológicos de los fagos aislados, análisis de proteínas (Lavigne *et al.*, 2009) y microscopía electrónica (Giuseppe *et al.*, 2015; Clokie y Kropinski, 2009; Ackermann, 2009b), Los métodos actuales incluyen electroforesis en gel de campo pulsado y RFLP (Abril *et al.*, 2021; Sangha *et al.*, 2014), los cuales permiten una clasificación inicial, mientras que la PCR, secuenciación y clonación, producen información más clara (Kutter y Sulakvelidze, 2005). Antes de realizar estos procesos se necesitó realizar algunos procesos.

3.7.1 Titulación de bacteriófagos

La dilución en serie es una técnica vital en muchas áreas de la biología experimental y el trabajo con los fagos, no es una excepción. Debido a que los fagos se encuentran en el ambiente muy concentrado, es necesario que la dilución se realice con precisión para dispersar los fagos o realizar otros experimentos como ensayo de eficiencia de lisogenia o pruebas de rango de hospederero.

3.7.2 Ensayo de placa por medio de la técnica de doble capa de agar.

El ensayo de placa es originalmente un ensayo virológico empleado para contar y medir el nivel de infectividad de los bacteriófagos. Este ensayo es la técnica más utilizada para el aislamiento viral y su purificación, para optimizar los títulos virales. La base del ensayo de placa es medir la capacidad de un solo virus infeccioso para formar una “placa” en una monocapa de células confluentes. Una placa se desarrolla como parte de la infección

por una sola partícula de virus que es seguida por la replicación y finalmente, la muerte de la célula. Las partículas de virus recién replicadas infectarán y luego, matarán las células circundantes (Adams *et al.*, 1959).

Para esta técnica, se utilizó el stock de fagos virulentos y un cultivo de células huésped susceptible. Se prepararon diluciones seriadas de base 10 a partir del stock de fagos. El procedimiento requiere el uso de una técnica de doble capa de agar, en la que el agar sirve como capa base y una mezcla de pocas partículas de fago en un material diluido, y una gran cantidad de células hospedadoras en un agar blando para formar la capa superior (Adams *et al.*, 1959).

Cuando las placas se incubaron, las células huésped susceptibles se multiplicaron y produjeron una alfombra de crecimiento confluyente en el medio. Cuando una partícula de fago se adsorbió en una célula susceptible, penetró la célula, se replicó y liberó nuevas partículas de fago que infectaron a otras bacterias en las proximidades de la célula anfitriona inicial. El crecimiento o propagación de los nuevos virus está restringido o limitado a las células vecinas por el agar. Este ciclo se repitió hasta que se destruyeron grandes cantidades de bacterias y formaron la Unidad Formadora de Placa (UFP) (Adams *et al.*, 1959).

Las células destruidas producen áreas circulares no turbias, llamadas UFP en el césped bacteriano, donde solamente hay presencia de fagos. Finalmente, la UFP se volvió demasiado grande para ser visible a simple vista. Cada UFP representó la lisis de un cultivo bacteriano infectado con fagos y se usa para cuantificar el número de partículas de fagos infectivos en el cultivo (Adams *et al.*, 1959).

3.7.3 Ensayo de especificidad del bacteriófago y Eficiencia de plaqueo

El rango de huéspedes se refiere al espectro de células en el cual se puede multiplicar un virus. Como todos los virus, los fagos deben encontrar e infectar con éxito la bacteria adecuada para replicarse. Esta elevada especificidad se basa en el reconocimiento de proteínas específicas en la membrana celular, a través de las fibras presentes en el tallo del fago (Poxleitner *et al.*, 2017).

3.7.4 Electroforesis de ADN en gel de agarosa

La electroforesis en gel es una técnica muy utilizada para separar moléculas. Los materiales más comunes para separar moléculas de ácidos nucleicos son polímeros como la poli-acrilamida o la agarosa. Estos geles se colocaron en la cámara de electroforesis, sumergidos en un tampón de TBE pH alrededor de 8. De esta forma, el ADN o ARN sometido a electroforesis se desplazaron al polo positivo, ya que a pH superiores a 5 poseen carga negativa. Así, moléculas de ADN de diferente tamaño, emigraron de forma distinta en un gel de electroforesis.

La distancia recorrida por cada fragmento de ADN va a ser inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Es conveniente la utilización de marcadores de tamaño conocido porque nos permitieron calcular los pesos moleculares de las muestras de ADN problema (Nelson y Cox, 2018; Berg *et al.*, 2003).

3.8 Situación de la resistencia a los antimicrobianos en América Latina y el resto del mundo.

El tratamiento de las enfermedades infecciosas con antibióticos está cambiando drásticamente desde los primeros años en que se usaron los mismos. El surgimiento de la resis-

tencia de las bacterias a los antibióticos, es un resultado inequívoco del mal uso de estos por parte de los médicos, pacientes, veterinarios y la industria (Fig. N° 21) , el pobre entendimiento del rol natural de los antibióticos en las comunidades bacterianas (Michael *et al.*, 2014).

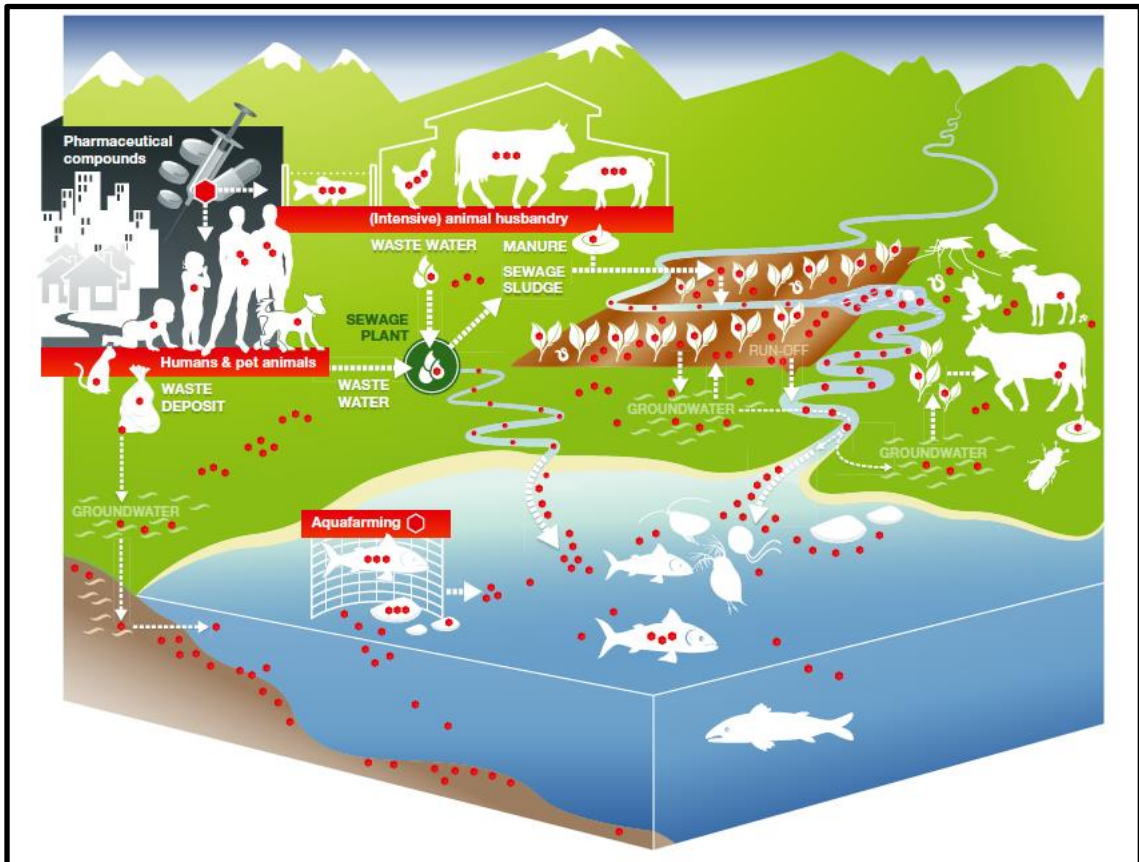


Figura 21. Vías de diseminación de antibióticos por el medio ambiente. Los residuos de antibióticos se representan simbólicamente como puntos rojos (Berkner *et al.* 2014).

La resistencia de las enterobacterias es de gran importancia en la región. Esto se da principalmente por la gran difusión de betalactamasas de espectro extendido de tipo Ambler (CTX-M), algunas de las cuales se originan en América Latina. Ya se ha descrito la resistencia a aminoglicósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, trimetropin/sulfametoxazol, carba-penémicos, así como la resistencia a ciertas especies de enterobacterias a colistina entre ellos Argentina, Ecuador, Paraguay y Uruguay. Se ha mencionado el aumento de la resistencia a quinolonas, cuyo mecanismo es similar al descrito para microorganismos Gram positivos. En el caso de las bacterias Gram negativas, debe sumarse la posibilidad de la mutación en las porinas, por las que penetran las fluoroquinolonas a través de la membrana externa (Moreno, 2018; MINSA, 2015).

Las enfermedades infecciosas están catalogadas entre las primeras causas de muerte en el mundo y, por lo tanto, son consideradas un problema de salud pública importante. Las infecciones bacterianas causan gran preocupación, dado que las bacterias adquieren día a día mayor resistencia a los antibióticos. Esto ocurre por medio de diversos mecanismos

fisiológicos y moleculares, que les permiten a estos microorganismos adaptarse rápidamente a condiciones adversas (MINSA, 2015).

El problema se extiende alrededor del mundo, por ej., en China 89% de los hogares utilizan indiscriminadamente antibióticos, (Yadav y Kapley, 2021) en Tanzania y África Subsahariana, el número de muertes por bacterias resistentes a antibióticos, duplica al número de muertes por malaria. En Panamá, durante el periodo 2007-2013, se observó en un estudio que los grupos de antibióticos con mayor resistencia bacteriana son los β -lactámicos, las cefalosporinas y las quinolonas. Las bacterias con mayor resistencia a nivel nacional son *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter spp* y *P. aeruginosa*. Además, la prevalencia de *S. aureus* resistente a la meticilina osciló entre un 25 a 35%. Este es un comportamiento similar al resto del mundo, de aumento paulatino pero constante (MINSA, 2015).

La diseminación de la resistencia podría llegar a generar problemas de grandes dimensiones, como aumentos en la mortalidad, morbilidad y los costos de atención médica. El reporte de riesgos globales emitido por el Foro Económico Mundial resaltó el problema de la resistencia bacteriana en 2013 y la OMS lo enfatizó en uno de sus últimos reportes. Solo en Estados Unidos, se presentan 99,000 muertes al año por infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos adquiridas en hospitales y el costo de cuidados médicos asociados a ellas, oscila entre 21 y 34 billones de dólares anualmente (Fig. N° 21) (WHO, 2017; Howell, World Economic Forum, and Risk Response Network, 2013).

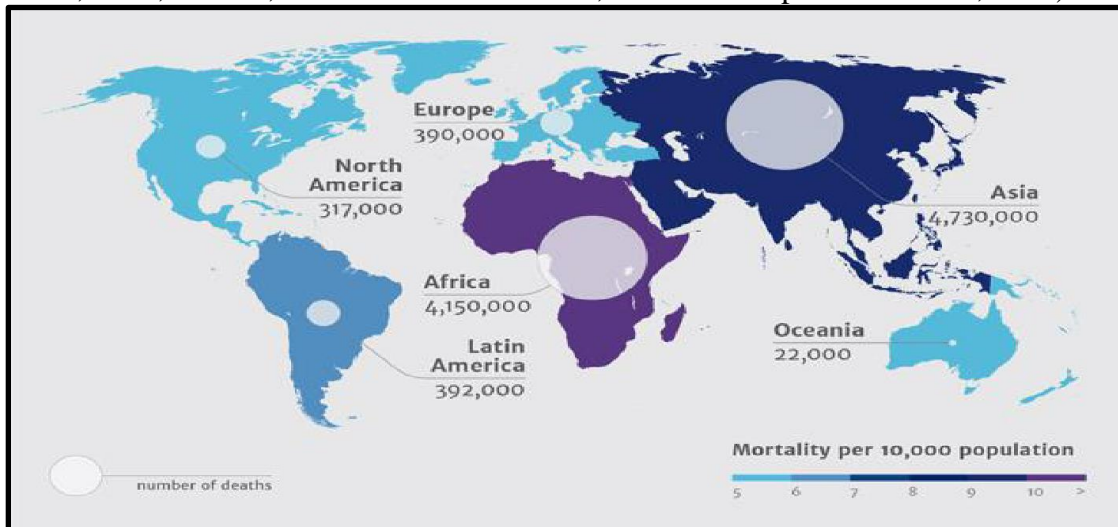


Figura 22. Muertes atribuibles a resistencia antimicrobiana hasta el 2050 (Sugden, Kelly, and Davies, 2016)

Se sabe que el incremento en la resistencia bacteriana se debe al uso inapropiado de los antibióticos, entre las cuales se encuentra el no completar las dosis dadas por el médico o prescripciones innecesarias que han hecho que hoy en día existan infecciones bacterianas para las cuales ya no existe un antibiótico eficaz. Este panorama ha llevado recientemente a que gobiernos y agencias de salud, manifiesten la necesidad de un uso más apropiado de los antimicrobianos y la importancia de desarrollar nuevos agentes (Litt y Jaroni, 2017). También, hay que tomar en cuenta que la resistencia a los antibióticos se extiende más allá del uso inadecuado en humanos, ya que existe también un manejo indiscrimina-

do de estas sustancias por parte de las industrias alimenticias. En los sectores industriales de producción animal para consumo humano, los antibióticos permitidos son escasos y en ocasiones, no se encuentra un tratamiento eficiente para el control y prevención de las bacterias patógenas (Litt y Jaroni, 2017).

No obstante, hay estudios que indican que más del 80% de los antibióticos vendidos en los Estados Unidos y por lo menos, el 50% de aquellos producidos en China, van dirigidos como promotores de crecimiento a animales de consumo humano tales como cerdos, pollos y vacas. La inclusión de dichos promotores reduce la cantidad de alimento que se suministra e induce un aumento en el peso del animal y, en consecuencia, mayor rendimiento económico para los productores (Litt y Jaroni, 2017). Lo anterior representa una situación bastante delicada y peligrosa, dado a ser utilizados estos antibióticos en productos destinados al consumo humano, las bacterias que viven en los animales adquieren resistencia a los antibióticos y esta resistencia puede ser transferida a las bacterias patógenas humanas (Donado-Godoy *et al.*, 2015).

3.9 Complejo *E. cloacae*

3.9.1 Aspectos taxonómicos

Desde finales del siglo XIX (1885), se llevaron a cabo numerosos estudios taxonómicos para ubicar cepas que producían cantidades de gas y que dieron lugar al género *Aerobacter*, con *Aerobacter aerogenes* como cepa tipo (Mezzatesta *et al.*, 2012). En 1960, Hormaeche y Edwards, propusieron un nuevo género “*Enterobacter*” para sustituir al género *Aerobacter*, donde se ubicaba la especie *Aerobacter cloacae*, y se reconoció entonces a *E. cloacae*, como la cepa tipo, de acuerdo con la primera edición del Manual Bergey (1923). Dada la heterogeneidad genética de las especies del género *Enterobacter* y otros géneros relacionados, la clasificación taxonómica sigue en permanente revisión. Hasta el año 2012 dentro del género *Enterobacter* se incluían las siguientes especies: *E. aerogenes*, *E. asburiae*, *E. amnigenus* biogrupo 1, *E. amnigenus* biogrupo 2, *E. cancerogenus*, *E. cloacae*, *E. cowanii*, *E. dissolvens*, *E. gergoviae*, *E. ludwigii*, *E. hormaechei*, *E. intermedium*, *E. kobei*, *E. nimipressuralis* y *E. pyrinus* (Mezzatesta *et al.*, 2012).

3.9.2 Epidemiología, transmisión y significado clínico

Las especies que integran los géneros *Enterobacter*, *Cronobacter* y *Pantoea* se encuentran como comensales en el medio ambiente, en fórmulas alimentarias, en la piel y en el tracto intestinal de humanos y animales. Antes del uso generalizado de los antibióticos eran raramente encontradas como patógenos (Nelson *et al.*, 2013; Nevondo y Cloete, 1999).

Debido a su ubicuidad, la fuente de infección puede ser endógena o exógena. En numerosos estudios se ha responsabilizado a las manos del personal, a dispositivos médicos contaminados y a la instrumentación como fuentes de diseminación. En brotes nosocomiales se las ha encontrado en soluciones de nutrición parenteral, soluciones salinas, equipos de diálisis, aguas de hidroterapia, etc. Sin embargo, muchas infecciones tienen su origen en la flora endógena del paciente (Tato-Rodríguez *et al.*, 2016; Mezzatesta *et al.*, 2012).

E. cloacae, es una de las especies más frecuentemente aisladas. Como responsables de infecciones nosocomiales diversas incluyendo bacteriemia, infecciones del tracto respiratorio inferior, de piel y tejidos blandos, del tracto urinario, intraabdominales, endocardi-

tis, artritis séptica, osteomielitis, infecciones oftálmicas e infecciones posquirúrgicas en cualquier parte del cuerpo. Es uno de los agentes más agresivos en localización ocular (Jank *et al.*, 2015; Janda *et al.*, 2005). Periodos prolongados de hospitalización, uso de antimicrobianos, presencia de dispositivos extraños (catéteres intravenosos, sondas, entre otros.) y condiciones subyacentes (quemaduras, ventilación mecánica, inmunosupresión), constituyen factores de riesgo que aumentan el peligro de infecciones por *Enterobacter* spp. Las infecciones adquiridas en la comunidad incluyen infecciones urinarias, de la piel y tejidos blandos y de heridas, especialmente traumáticas (Davin-Regli *et al.*, 2019).

3.9.3 Aspectos patogénicos

Si bien las especies del género *Enterobacter* no se consideran agentes primarios causales de infecciones humanas, estudios epidemiológicos han demostrado que algunas de ellas son agentes etiológicos relevantes en infecciones nosocomiales. Entre los factores de virulencia identificados en distintas especies se encuentran, la presencia de polisacárido capsular y la producción de hemaglutininas manosa sensibles asociadas a fimbrias tipo 1 o tipo 3 y quelantes del hierro (aerobactina y enterochelin). En *E. cloacae* se ha demostrado la adhesión y penetración a las células epiteliales e inducción a la apoptosis (Nieradko y Kurlenda, 2004).

3.9.4 Sensibilidad a los antibióticos

Enterobacter spp, presenta resistencia natural a ampicilina, amoxicilina y cefalosporinas de primera generación e inhibidores de β -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) conferida por una β -lactamasa cromosómica. Esta es una enzima del tipo AmpC perteneciente al grupo 1 de Karen Bush (Clase C de Ambler). Hay algunas excepciones, especialmente, con sulbactams y tazobactam (Davin-Regli *et al.*, 2019).

3.9.5 Mecanismos de resistencia a los antibióticos

Al igual que en *Citrobacter freundii* en *Enterobacter* spp., casi exclusivamente, la resistencia a cefoxitina es considerada como el mejor marcador de la presencia de esta β -lactamasa del tipo AmpC (Mezzatesta *et al.*, 2012).

La producción de β -lactamasas, es el mecanismo más notable responsable de la resistencia en la mayoría de estas especies. Estas enzimas pueden inducirse frente a antibióticos β -lactámicos generando resistencia a cefalosporinas de tercera generación (C3G), pero lo de mayor importancia (en *Enterobacter* spp y *Serratia* spp) es la hiperproducción de AmpC por mutantes desreprimidas. Este mecanismo confiere resistencia a cefalosporinas de tercera generación, monobactamas, carboxi y ureidopenicilinas, y las combinaciones con inhibidores como clavulánico y sulbactams (Mezzatesta *et al.*, 2012).

La adquisición de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) les confiere resistencia a C3G, resistencia variable a cefalosporinas de cuarta generación (C4G) y a piperacilina-tazobactam, cuya presencia invalida su uso. El uso de C4G incluso puede provocar la selección de mutantes resistentes. Los aislamientos productores de AmpC son sensibles a tigeciclina y pueden ser sensibles a aminoglicósidos o trimetropin sulfametoxazol (Mezzatesta *et al.*, 2012).

En *Enterobacter*, como en otras enterobacterias, se ha observado un aumento de la resistencia a antibióticos β -lactámicos, aminoglicósidos, trimetropin-sulfa y quinolonas con

variaciones geográficas. Un problema de importancia epidemiológica, lo constituye la presencia de cepas productoras de AmpC junto a plásmidos codificadores de BLEE (Mezzatesta *et al.*, 2012).

3.9.6 Mecanismos de resistencia de *E. cloacae* complex

Los mecanismos de resistencia del Complejo *E. cloacae* complex están resumidos en la tabla N° 5.

Tabla 5. Mecanismos de Resistencia del Complejo *E. cloacae*.

Clase de anti-bióticos	Tipo de resistencia	Mecanismo de resistencia	Tipo de enzimas	Especie	
β- lactámicos	β-lactamasa	Ambler clase A	TEM, SHV, CTX-M	<i>E. cloacae</i> <i>E. hormaechei</i>	
			VEB, GES/IBC, KPC	<i>E. cloacae</i>	
		Ambler Clase B	NMC-A, IMI-1, IMI-2	<i>E. cloacae</i> <i>E. asburiae</i>	
			VIM	<i>E. cloacae</i> , <i>E. ludwigii</i>	
Fluoroquinolonas	resistencia de plásmidos mediado por quinolonas	Ambler Clase C	IMP, NDM-1 Amp-C, ACT-1	<i>E. cloacae</i> <i>E. cloacae</i> , <i>E. asburiae</i> <i>E. hormaechei</i> <i>E. kobei</i>	
			Ambler Clase D	OXA-48	<i>E. cloacae</i>
		Acetiltransferasas mediado por QNR	bomba de eflujo	AAC(6')-Ib-cr Qnr (A, B, C, D)	<i>E. cloacae</i> <i>E. cloacae</i> , <i>E. hormaechei</i>
			Acetiltransferasas	QepA AAC (6')-Ib	<i>E. cloacae</i> <i>E. cloacae</i>
Tigeciclina	sobreproducción del blanco	bomba de eflujo	AcrAB	<i>E. cloacae</i> , <i>E. hormaechei</i>	

3.9.7 Especies dentro del Complejo *E. cloacae*

E. cloacae es la más considerable dentro de este taxón debido a que es responsable de bacteremias, infecciones del tracto respiratorio bajo, intraabdominales, urinarias y piel de

tipo nosocomial. *E. asburiae* originalmente fue aislado del suelo, pero algunas cepas han sido aisladas de fuentes humanas. *E. hormaechei* consiste en tres subespecies: *E. hormaechei ssp oharae*, *E. hormaechei ssp hormaechei* y *E. hormaechei ssp steigerwalti* (Mezzatesta *et al.*, 2012).

Es un patógeno nosocomial aislado de salas de neonatología y de cuidados intensivos. *E. kobei* difiere de *E. cloacae* porque es negativo para la prueba de Voges-Proskauer. Hay pocos reportes clínicos acerca de esta especie. *E. ludwigii* es resistente al imipinem y han sido aisladas de aguas residuales hospitalarias. *E. nimipressuralis* fue aislado de fuentes no clínicas (Mezzatesta *et al.*, 2012).

3.10 Calidad de agua de los ríos de la ciudad de Panamá.

Según resultados del Estudio de Impacto Ambiental para la construcción del Sistema de saneamiento de la Bahía de Panamá, basados en muestreos de los ríos de la ciudad Capital (Río Abajo, Curundú, Juan Díaz, Matasnillo, Matías Hernández, Tapia y Tocumen), se analizaron los usos de suelo en las cuencas, las descargas de aguas residuales domésticas e industriales, y se realizaron muestreos en la parte baja de las cuencas incluyendo análisis de calidad física, química y bacteriológica. Sobre la base de estos análisis se concluyó, que los ríos con más altos grados de contaminación son los ríos Cárdenas, Curundú, Matasnillo, Matías Hernández, Río Abajo, Juan Díaz, Tapia y Tocumen, pues han sido condenados a ser drenajes y basureros, adquiriendo mal aspecto y olor, lo que dificulta su uso para el entorno urbano, convirtiéndose la basura en una represa que imposibilita la libre fluidez, generando inundaciones (Quinn, 2014).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General:

- 1.1.1. Caracterizar bacteriófagos aislados de aguas residuales de Río Abajo con actividad antimicrobiana contra el Complejo *E. cloacae*.

4.2 Objetivos Específicos:

- 1.1.2. Aislar bacteriófagos específicos contra el Complejo *E. cloacae* de aguas residuales de Río Abajo.
- 1.1.3. Determinar la concentración en stock de bacteriófagos aislados en la muestra de aguas residuales.
- 1.1.4. Purificar los bacteriófagos aislados para los ensayos de caracterización de las propiedades biológicas y moleculares de los mismos.
- 1.1.5. Evaluar la especificidad de los bacteriófagos purificados contra otras cepas bacterianas, determinando si poseen o no actividad antimicrobiana.

5 HIPÓTESIS DE TRABAJO

- 1.2. **Hi:** los bacteriófagos aislados de aguas del Río Abajo tienen actividad antimicrobiana frente a bacterias del Complejo *E. cloacae*.
- 1.3. **Ho:** los bacteriófagos aislados de aguas del Río Abajo no tienen actividad antimicrobiana frente a bacterias del Complejo *E. cloacae*.

CAPÍTULO II
MARCO METODOLÓGICO

6 Marco Metodológico

6.1 Tipo de estudio

El estudio fue de tipo descriptivo y experimental. La investigación fue descriptiva porque se buscó aislar fagos, describirlos y caracterizarlos y ver si poseen actividad contra el Complejo *E. cloacae* a partir de una fuente en donde no se ha reportado su presencia.

6.2 Población

El estudio fue realizado con los bacteriófagos recolectados de las aguas de Río Abajo, las cuales fueron analizadas en el Departamento de Microbiología Humana de la Facultad de Medicina, Laboratorios de Microbiología Experimental y Aplicada y Laboratorio de Aguas de la Vicerrectoría de Investigación y Post-Grado, Universidad de Panamá.

6.3 Criterios de inclusión y exclusión

6.3.1 Criterios de inclusión

Las muestras de aguas recolectadas en la Región Media y Baja del río donde se presentan fuentes potenciales de contaminación.

6.3.2 Criterios de exclusión

Las muestras de agua recolectadas en la Región Alta del río donde sufre pocas intervenciones por fuentes de contaminación.

6.3.3 Variables

Para los efectos de esta investigación se han tomado en cuenta las siguientes variables (Tabla 5):

Tabla 6. Variables independientes y dependientes usadas en este estudio

	Variable independiente	Variable dependiente
Definición conceptual:	Bacteriófago: se definen como virus capaces de infectar células bacterianas que se encuentran metabólicamente activas. Su genoma está compuesto por moléculas de ADN o ARN, y están rodeadas por una envoltura proteica. Pueden encontrarse en casi todos los lugares, pero se presentarán preferencialmente donde estén sus huéspedes específicos.	Actividad antimicrobiana: es el proceso en los cuales los antimicrobianos eliminan microorganismos inhiben su crecimiento, tales como bacterias, hongos o parásitos. Basado en ello, los siguientes pueden referirse los siguientes agentes antibióticos, antifúngicos (antimicóticos), antiparasitarios (antihelmínticos) antivirales, antisépticos (bactericidas)
Definición operacional:	Bacteriófagos: para efectos de este estudio son virus aislados de aguas residuales capaces de infectar y replicarse en cepas del Complejo <i>E. cloacae</i> . Poseen un genoma conformado por ADN o ARN y están rodeados por una envoltura proteica.	Actividad antimicrobiana: es el proceso por el cual los bacteriófagos elimina por medio de la lisis a bacterias específicas. En este caso son fagos contra el Complejo <i>E. cloacae</i> .

6.4 Descripción del área de muestreo

6.4.1 Descripción de la Cuenca del Río Abajo

La cuenca del Río Abajo está situada al noroeste de la Ciudad de Panamá, entre las coordenadas 9°00' de Latitud Norte y 79°29' y 79°33' de Longitud Oeste. Limita al Norte con las cuencas del río Las Lajas y de la Quebrada Santa Rita, al Sur con la Bahía de Panamá, al Este con la cuenca del Río Matías Hernández y al Oeste con las cuencas de los ríos Mocambo y Curundú. Sus principales afluentes son el Río Gallinero y la Quebrada Monte Oscuro (Ingemar Panamá, 2005).

La cuenca tiene una forma alargada, con un área de drenaje de 23.4 Km². El punto más alto de la cuenca está a 275 m sobre el nivel del mar. El relieve de la cuenca es variado, más accidentado en su parte alta y más plano en su parte baja (Ingemar Panamá, 2005).

En la parte alta del Río Abajo se encuentran urbanizaciones como Santa Bárbara, Altos de Panamá, Condado del Rey, Fuente del Fresno y otras, las cuales cuentan con sistemas de tratamiento primario de las aguas residuales, descargando sus efluentes al río. El grado de contaminación aumenta en su recorrido y en su parte media recibe descargas de aguas residuales tanto domésticas como industriales (Ingemar Panamá, 2005).

Algunas de las industrias existentes en la cuenca del río son: Barraza y Cía., conservas Panameñas Selectas, Empacadora Avícola S.A., Industrias Lácteas S.A. Pinturas Sur de Panamá, Plásticos Modernos, Productos Lux S.A., Productos Zimex. En el puente sobre la Vía Simón Bolívar, la coloración del río es oscura, existen problemas de malos olores y se evidencia la presencia de desechos sólidos en el cauce del río (Ingemar Panamá, 2005).

6.4.2 División de la cuenca del Río Abajo en Regiones

Debido a que el Río Abajo describe a lo largo de su cauce un amplio recorrido, fue necesario dividirlo por regiones para valorar la precisión y exactitud del muestreo a fin de recuperar los bacteriófagos. Con esto se facilitó la recolección, manejo, análisis y discusión de la información obtenida (Rice *et al.*, 2015; Acevedo, 2009).

Se dividió el río en tres regiones principales: la Región Alta en donde este ha sufrido pocas intervenciones por fuentes de contaminación; Región Media en donde se presenten fuentes potenciales de contaminación y así evidenciar posibles impactos; Región Baja donde se presentan fuentes con alto potencial de contaminación (Rice *et al.*, 2015; Acevedo, 2009).

Estos criterios obedecen a los siguientes aspectos: distribución de la población, la diversidad de las actividades agroindustriales desarrolladas en las regiones, los diferentes usos dados a la tierra y al agua, así como una similitud en el ecosistema circundante de cada región. Con esta división se garantizará la obtención de una muestra de agua compuesta que permita la obtención de bacteriófagos (Rice *et al.*, 2015; Acevedo, 2009).

6.4.3 Ubicación de los puntos de muestreo

Las muestras se recolectaron a lo largo del recorrido del Río Abajo, desde la región media hasta la región baja. Se establecieron 4 puntos de muestreo. Denominados M1, M2 (Región media) y B1 y B2 (región baja) en las coordenadas. La ubicación exacta de los puntos de muestreo será en el área de Parque Lefevre (Santa Elena) en las coordenadas 9°00'55.2"N 79°29'25.6"O y en el área de Puente del Rey 9°00'47.8"N 79°29'08.0"O (Fig. N° 22). La selección de los puntos de muestreo obedecerá a la aplicación de criterios técnicos, mientras que el número de muestras colectadas en cada punto de muestreo responderá a la disponibilidad del recurso económico con el cual se desarrolló esta investigación.

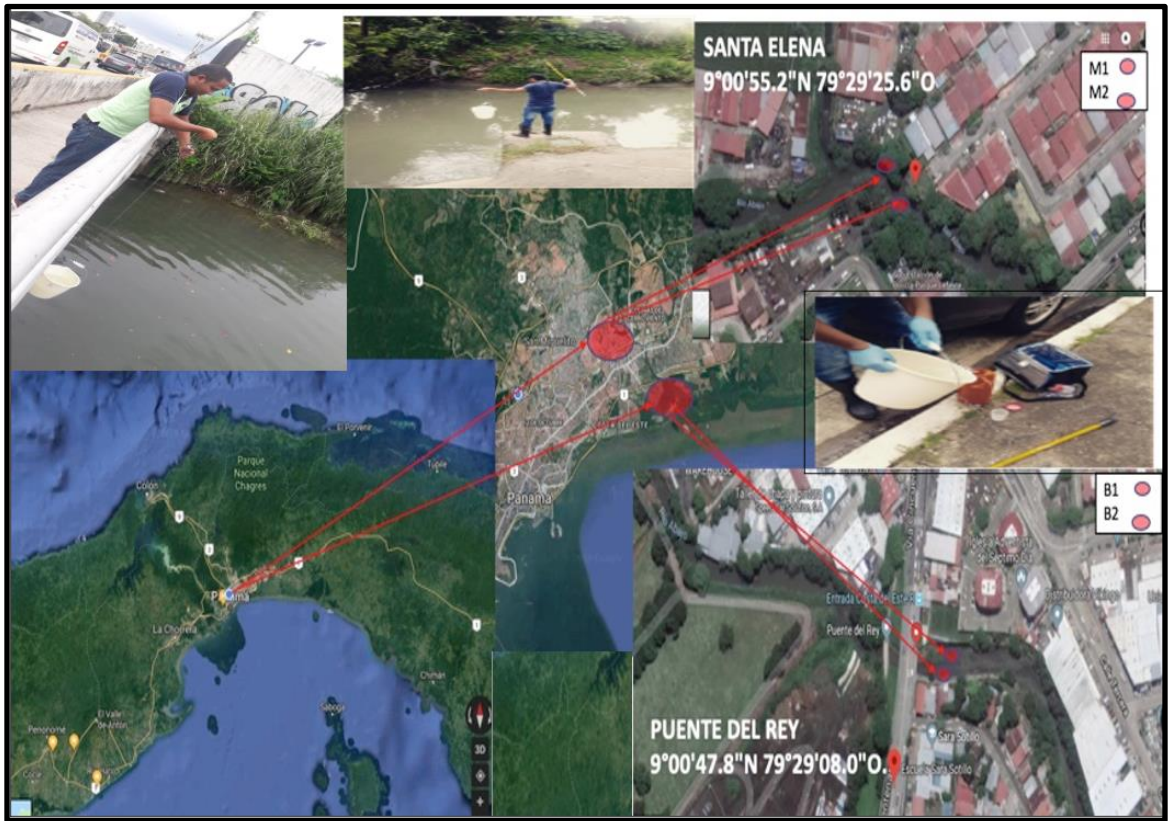


Figura 23. Ubicación de las zonas de muestreos en la Cuenca del Río Abajo. Las muestras se tomaron en 2 puntos del Río Abajo (Ciudad de Panamá) en la parte media (barrio de Santa Elena) y parte baja del río (Sector de Puente del Rey, Panamá Viejo).

6.5 PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

6.5.1 Procedimiento de la Recolección de las muestras de agua.

Las muestras utilizadas en el estudio fueron recolectadas en las aguas del río Abajo en el mes de mayo de 2018. Este río se caracteriza por tener altos niveles de contaminación, el río constituye un ambiente ideal para la proliferación de fagos por tal motivo se colectaron las muestras en 2 Regiones de Muestreo. Las muestras de agua fueron procesadas en el Departamento de Microbiología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá.

Se tomaron 2 muestras de agua al azar por cada sitio de muestreo. Estas muestras fueron colectadas con botellas desinfectadas a una profundidad de 30 cm del río para evitar los efectos de la luz (Acevedo, 2009). En total, se colectaron aproximadamente 1L de agua a lo largo del río por semana. Las muestras fueron transportadas en cadena de frío al laboratorio para su procesamiento (Gaviria *et al.*, 2012). En el campo se unieron las muestras de agua correspondientes por cada sitio de muestreo, formando una muestra compuesta a fin de minimizar la variabilidad de una muestra individual recogida en un mismo sitio.

6.5.2 Identificación y control de las muestras

Los frascos y envases fueron etiquetados con la siguiente información: “N° de Registro para identificar la muestra, y fecha y hora de muestreo”, “identificación del punto o sitio de muestreo”, “temperatura del ambiente (TA)”, “temperatura del agua”, “pH”, “tipo de análisis que se efectuó”, “técnica de preservación empleada”, “observaciones relativas a la toma de muestra”, “nombre del individuo que realizó el muestreo” (Rice *et al.*, 2015). El volumen total de muestra fue de aproximadamente 1L lo cual corresponde a la muestra del Estudio.

Tabla 7. Materiales y Métodos usados en este estudio

Reactivo	Modo de preparación
Buffer Fago	TrisHCl (pH7.5), NaCl 68.5mM, MgSO ₄ 10 mM, CaCl ₂ 1- 10 mM. Autoclavar (121°C, 15 min) y luego, mezclar
Buffer SM	5.8 g NaCl, 2 g MgSO ₄ .7H ₂ O, 50 mL TrisHCl 1M (pH 7.5), 5 mL gelatina 2 % (w/v), llevar volumen hasta 1 L con H ₂ O. Autoclavar.
Buffer PBS 10X	Para 500 mL: 40 g NaCl, 1.005 g KCl, 7.1 g Na ₂ HPO ₄ , 1.74 g de K ₂ HPO ₄ se disuelven en 400 mL de H ₂ O y después, se afora hasta 500 mL de H ₂ O. Autoclavar y guardar a TA.
FCI (fenol: cloroformo:isoamilico 25:24:1)	Fenol 25 mL Cloroformo 24 mL Alcohol isoamílico 1 mL
Acetato de sodio 3M	NaOAc. ₃ H ₂ O) 40.8 g/100 mL. Nota: disolver primero en 80 mL de H ₂ O, ajustar a pH 5.2 con ácido acético glacial y dH ₂ O hasta 100 mL. Esterilizar por filtración
Buffer TE pH8	10 mM TrisHCl pH 8, 1mM EDTA pH 8
Buffer TBE	Pesar 121.1 g de Tris Base, 61.8 g de Ácido bórico, 7.4 g NaEDTA.H ₂ O los disuelve en 800 mL de H ₂ O y luego afore hasta 1 L. (Almacenar a temperatura ambiente).
CaCl ₂ 1M	Disolver 88 g de CaCl ₂ .6H ₂ O en 320 mL de H ₂ O filtrar con filtro 0.22 µm (almacenar en alícuotas a -20 ° C)
Glycerol 40%	Para preparar 500 mL: mida 250 mL de H ₂ O y le agrega 200 mL de glicerol cuando este mezclado completamente llévelo a un cilindro graduado y afórelo hasta 500 mL. Autoclavar (guardar a TA)
Caldo LB	10 g de LB broth más 400 mL de H ₂ O autoclavar y guardar
Agar Nutritivo	16.8 g más 600 mL de H ₂ O autoclavar y servir (aprox. 40 platos)
Top Agar	10 g de LB broth 2.8 g de agar-agar en 400mL de H ₂ O. F
Acrilamida/bis 40%	Diluir a 30 %
SDS 10%	Disolver 1 g en 8 mL de H ₂ O y aforar hasta 10 mL. (guardar a Temperatura ambiente)
Tris buffer (tris base) pH 8.8	Para preparar 1 L: 181.7 g de TrisBase disueltas en 800 mL de H ₂ O, ajustar el pH a 8.8 con HCl, llevar el volumen con H ₂ O. Autoclavar y guardar a Temperatura ambiente.
TEMED	

Persulfato de amonio 10% (w/v)	Para preparar 10 mL: Disolver 1 g en 8 mL de H ₂ O y luego aforar hasta 10 mL. Congelar a -20 ° C
Buffer Tris Glicina	Para preparar 1 L: 15.1 g de TrisBase, 94 g de glicina, 900 mL de H ₂ O, 50 mL de SDS 10% (w/v), luego llevar todo a 1 L con H ₂ O. Almacenar a Temperatura ambiente.
Tampón de muestra no reductor 5X	Tris 0.5 M pH 6.8 10 mL, SDS 10 % (w/v) 16mL, azul de bromofenol 50 mg, glicerol 12 mL, H ₂ O 4 mL.
Tampón de muestra reductor	4.2 mL de tampón no reductor, 200 µL de β-mercaptoetanol. Alicuotar y congelar a -20 ° C.
Tris 0.5M pH 6.8	Trisma Base 3.027 g, 30 mL de H ₂ O ajustar pH a 6.8, luego completar hasta 50 mL de H ₂ O.
Azul brillante de Comassie	0.25 g de Azul de Comassie G250, metanol 225 mL, ácido acético 46 mL, y 230 mL de H ₂ O. Disolver durante 15 mL en agitador magnético. Filtrar y guardar a Temperatura ambiente.
Solución decolorante	Metanol 200 mL, etanol 100 mL, ácido acético 50 mL, H ₂ O 650 mL.

6.5.3 Información sobre las cepas

La cepa del Complejo *E. cloacae* utilizada como huésped fue proporcionada por la Sección de Microbiología del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES) porque es una cepa tipificada bioquímicamente a través de equipos de identificación y sensibilidad (Vitek 2, Biomerieux, Francia), ver tabla 8 y analizada fenotípicamente mediante el método de Difusión de Discos para saber exactamente a qué antibióticos presenta resistencia. Esta muestra fue previamente analizada y forma parte del cepario microbiológico del ICGES y conservada a -80°C hasta el momento de su utilización. Además, se utilizaron cocos Gram positivos (*S. aureus*, *E. faecium*), bacilos Gram negativos fermentadores (*E. coli*, *E. aerogenes*, *E. cloacae* ATCC 11403), bacilos Gram negativos no fermentadores (*P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp), proporcionadas por el Departamento de Microbiología Humana y cepas de *E. cloacae* de la Sección de Microbiología del Hospital Santo Tomás y del Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid.

Tabla 8. Patrón de sensibilidad a los antibióticos del Complejo *E. cloacae* usado en este estudio.

Antibiótico	CIM (conc. Min. Inh).	Interpretación	Método
Amikacina	4 ug/mL	SENSIBLE	VITEK
Cefazolina	>= 64 ug/mL	RESISTENTE	VITEK
Cefepime	>= 64 ug/mL	RESISTENTE	VITEK
Cefotaxima	>= 64 ug/mL	RESISTENTE	VITEK
Ceftazidima	>= 64 ug/mL	RESISTENTE	VITEK
Cefuroxima-acetil	>= 64 ug/mL	RESISTENTE	VITEK
Cefuroxima sódica	>= 64 ug/mL	RESISTENTE	VITEK
Ciprofloxacina	>=4 ug/mL	RESISTENTE	VITEK
Gentamicina	>=16 ug/mL	RESISTENTE	VITEK
Imipenem	>=16 ug/mL	RESISTENTE	VITEK
Meropenem	>=16 ug/mL	RESISTENTE	VITEK
Piperacilina tazobactam	>=128 ug/mL	RESISTENTE	VITEK
Trimetropin sulfametoxazol	>=320 ug/mL	RESISTENTE	VITEK

6.5.4 Preparación de un stock del Complejo *Enterobacter cloacae*

Con la finalidad de disponer de bacterias durante todo el trabajo experimental se preparó el stock de bacterias criopreservadas. Se usó la cepa *E. cloacae* como huésped para el aislamiento de bacteriófagos. La cepa fue sembrada en medio de Agar tripticasa de soya (ATS) para obtener colonias separadas y se dejó en la incubadora a 37°C por 18 h aproximadamente. Posteriormente con un asa se tomó una colonia, se colocó en medio de caldo tripticasa de soya, se dejó resuspendida en el medio a 37°C por 16-18 h (Clokier y Kropinski, 2009).

6.5.5 Aislamiento por el método de enriquecimiento de bacteriófagos

El objetivo de este método es enriquecer la muestra de fagos capaz de infectar el huésped deseado. Esto se logra añadiendo medio de cultivo, y un cultivo de la bacteria huésped en crecimiento, para luego incubarlos a 37 ° C toda la noche. Si hay un simple fago capaz de infectar la cepa bacteriana inoculada estará presente en la muestra y se replicará en niveles en los cuales serán detectados por ensayo de placa.

Para favorecer el crecimiento de los bacteriófagos se utilizaron 300 mL de las muestras de agua y se le adicionaron 1 mL de caldo con crecimiento de *E. cloacae* y se enriquecieron con 9 g de agar nutritivo y se incubaron a 37°C por 16 h (Meza 2016). Luego de la incubación, se tomaron 1.5 mL de la muestra y se colocaron en un nuevo microtubo. A este tubo se le centrifugó por 12,000 rpm por 2 min con la finalidad de formar un pellet y seguido de ello, se tomará 1 mL de sobrenadante y se filtró con filtros de 0.45 µm y centrifugó el filtrado a 8,000 rpm por 2 min. Este filtrado se conservó para las pruebas posteriores a 4 ° C (Meza, 2016).

6.5.6 Preparación de las diluciones seriadas

Para calcular el número de partículas virales, se mezcla una determinada dilución de la suspensión fágica con un cultivo bacteriano en fase exponencial y se coloca sobre la superficie de una placa de agar (Poxleitner *et al.*, 2017; Adams *et al.*, 1959). Se hicieron alícuotas en 8 tubos de microcentrifuga 900 µL PBS 1X y se le añadieron 100 µL de muestra de fagos en el primer tubo para obtener la primera concentración es de 10⁻¹. Los tubos se agitaron en el vórtex por 15 segundos. Se tomaron 100 µL de la mezcla y se colocarán en el siguiente tubo de dilución. Se repitió el mismo procedimiento de diluciones hasta que se completó la serie de 10⁻¹ hasta 10⁻⁸ (Fig. N° 23-1) (Poxleitner *et al.*, 2017).

6.5.7 Protocolo de la Técnica de doble capa de agar

En un plato de agar nutritivo al 1.5%, se rotuló en la parte trasera el nombre de la cepa que se probó y las diluciones del concentrado, 10⁻¹ hasta 10⁻⁸, y posteriormente, se atemperaron los platos de agar nutritivo a 37 ° C por 20 min en la incubadora antes del ensayo.

Se prepararon tubos de agar nutritivo al 0.6% del top agar y se repartió en tubos de 3 mL. Estos tubos se mantendrán en refrigeración a 4°C hasta el momento en el que se realizó el ensayo. Se calentaron los tubos con top agar hasta que se fundió y este en estado líquido,

para que el medio se conserve en este estado, se colocaron los tubos en baño María a $50^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, aproximadamente. Se hicieron alícuotas de $100 \mu\text{L}$ de agar nutritivo con crecimiento bacteriano en los tubos. Se inocularon los tubos alícuotados con crecimiento bacteriano con $10 \mu\text{L}$ de muestra de fagos diluida secuencialmente, se etiquetaron y se usó el vórtex para homogenizar. Inmediatamente se colocaron los tubos en la incubadora a 37°C por 20 min.

Transcurrido el tiempo, se colocará el contenido de los tubos que se encontraban en la incubadora c los 3 mL de agar nutritivo al 0.6% del top agar en los tubos. Se homogenizó el contenido de los tubos con la ayuda del vórtex por unos 5-10 seg. Se rotuló el plato de agar nutritivo con nombre de la cepa a utilizar y la dilución. Se colocó el contenido de los tubos en los platos de agar nutritivo al 1.5% correspondiente a la muestra de fago diluida. Asegurándose que la mezcla se extienda en toda la superficie haciendo unos pequeños movimientos a la placa. Se dejó secar por 10 min a TA. Se colocaron los platos a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, se contaron las UFP entre 30-300 (Fig. N° 24) Las pruebas se realizaron por triplicados (Fig. N° 23) (Poxleitner *et al.*, 2017; Meza ,2016; Adams *et al.*, 1959).

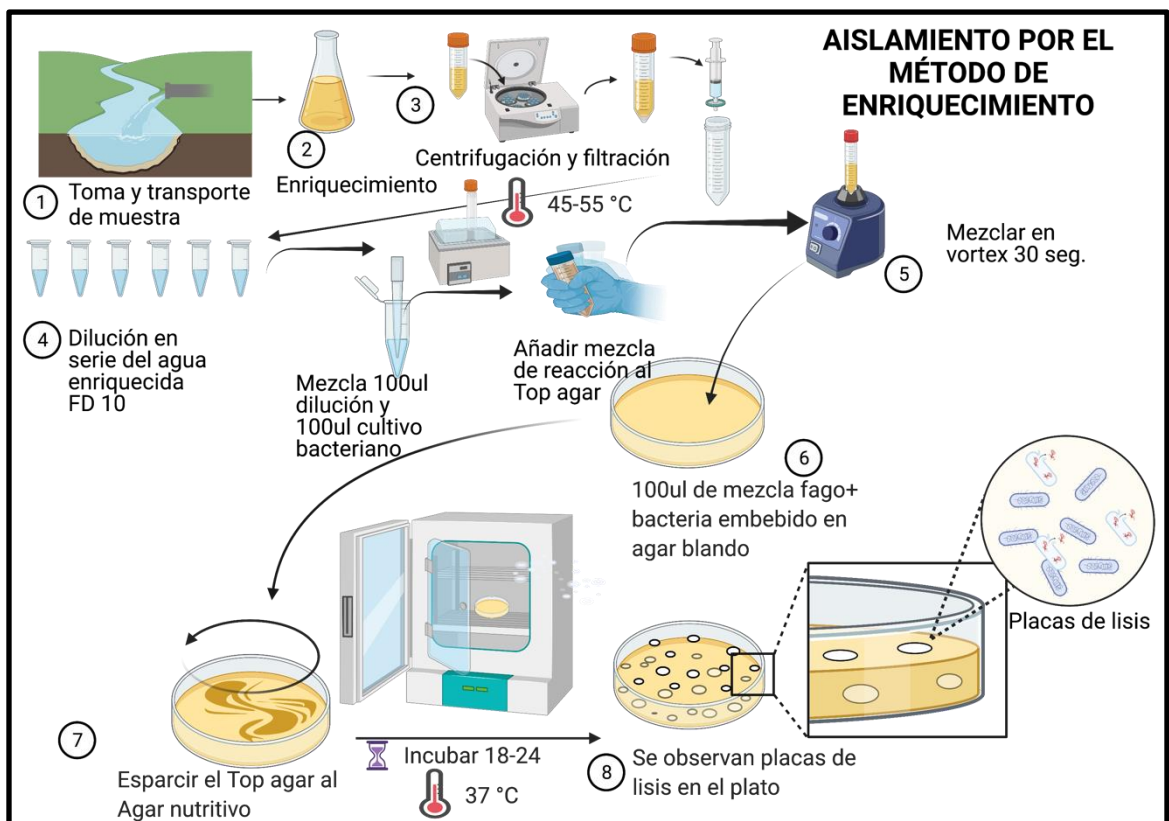


Figura 24. Método de doble placa de agar. Posterior a la muestra enriquecida se diluyó el lisado enriquecido con diferentes diluciones (FD: 10) y cada uno se mezcló con $100 \mu\text{L}$ de cultivo bacteriano. Posteriormente, se dejó incubar por 20 min a 37°C . Luego, se colocó los $200 \mu\text{L}$ en agar blando a 50°C y se colocó de una vez en el plato de agar. Se dejó incubar por 24 h a 37°C . Finalmente, se observaron las UFP. Creado por el autor.

6.5.8 Descripción de las placas.

Con la ayuda de un estereoscopio se evaluará la formación de las UFP basándose en: tamaño de la placa, presencia de halo, diámetro del halo obtenido de las placas aisladas.

6.5.9 Procedimiento de purificación de los bacteriófagos aislados

Cuando se obtuvieron las UFP, se demostró la presencia del bacteriófago específico a la cepa de *E. cloacae*. De aquellas UFP aisladas y sin presencia de unidades formadoras de colonias bacterianas (UFC) en los halos que se formaron, se tomaron con ayuda de una pipeta Pasteur descartable, que se usó para perforar el medio sólido, se depositaron en un tubo Eppendorf que contenía 200 μ L de PBS 1X y se dejó en reposo por un par de días a 4°C, para que los virus se liberaran del agar al PBS (Piuri, 2019; Meza, 2016). Con una micropipeta se tomó el PBS 1X y se filtró y se centrifugó a 12000 rpm por 2 min. Con la finalidad de eliminar cualquier presencia bacteriana. Luego, se almacenó a 4°C para su posterior cuantificación y utilización (Piuri, 2019; Meza, 2016).

6.5.10 Preparación de ministock

Se purificó un fago por lo menos 5 veces, hasta que se verificó que la morfología de las UFP fuera homogénea, para asegurarse que se trata de un único fago. Para esto, se determinó el título (UFP/mL) de la última purificación. Para obtener un ministock de fago, a partir de la primera purificación, se realizó diluciones seriadas de base 10, para obtener una suspensión de fagos conteniendo aproximadamente 5000 UFP/mL.

Se incubaron 100 μ L de la dilución apropiada (5000 UFP/mL) con 500 μ L del cultivo de *E. cloacae* en presencia de calcio 1 mM. Se hizo esto por quintuplicado o por 10. Agregamos a cada mezcla 3 mL del top agar y vertimos sobre una placa de agar nutritivo, se incubó durante 24 h a 37 ° C con las UFP/mL utilizadas, y obtuvimos un número de UFP tal que la lisis del césped bacteriano sea casi completa esto se conoce como lisis confluente (Piuri, 2019).

6.5.11 Cosecha y Concentración por Polietilenglicol PEG 8000

Se agregaron 5 mL de buffer de fago en cada UFP y se dejó 24 h a 4 ° C. Al día siguiente, se recuperó el buffer con una pipeta serológica de 10 mL y posteriormente, se raspó el top agar (esto mejora el rendimiento de recuperación). Se centrifugó a 4,000 rpm por 15 min. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante y se repitió la centrifugación. Se recuperó el sobrenadante nuevamente y se filtró empleando un filtro de 0.22 μ m. Se concentró el fago mediante polietilenglicol (PEG) 8% (v/v), tomando en partes iguales una solución precipitante de PEG al 16% con el lisado ya filtrado y se colocó en un mezclador de tubos automático a 4°C toda la noche. Al día siguiente, se procedió a centrifugar a 6,000 rpm por 15-30 min, se descartó el sobrenadante y el pellet, se re suspendió suavemente con 1 mL PBS 1X estéril. A este concentrado, se le realizó un ensayo de gota (spot test para verificar el título) (Yamamoto *et al.*, 1970).

6.5.12 Spot test para la determinación rápida del título de una suspensión de fagos

Se realizaron diluciones seriadas al décimo de la suspensión de fagos. Luego se mezclaron los 3 mL del top agar conteniendo calcio con 200-500 μ L del cultivo de *E. cloacae*,

preferentemente en fase exponencial de crecimiento. Después, se volcó la mezcla en un plato de agar nutritivo al 1.5%. Una vez solidificado, se colocó entre 5-10 µL de cada una de las diluciones (Piuri, 2019). Se eligió la dilución donde pueden observarse UFP aisladas y se calculó el título aproximado empleando la fórmula:

$$\text{UFP/mL} = \text{N}^\circ \text{ de UFP} \times \text{Factor de dilución} / \text{volumen de la alícuota}$$

6.6 Ensayo de la Especificidad del Bacteriófago y eficiencia de plaqueo

Se prepararon las cepas de *E. cloacae*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. aerogenes* y *E. cloacae* ATCC, y las cepas clínicas en fase exponencial, y luego, se mezcló 200 - 500 µL de este cultivo en 3 mL de top agar conteniendo calcio 10 mM. Después, se colocó en el plato de agar nutritivo al 1.5%. Una vez solidificado, se colocó una gota (5-10 µL) de cada una de las diluciones del fago (10^{-1} - 10^{-8}). Se usó el buffer de fago como control negativo (Khan *et al.*, 2015).

Se dejaron secar las gotas por 10 min en cámara de flujo, se invirtieron los platos para su incubación a 37 ° C durante 24 - 48 h. Después de este tiempo, se verificó si existen zonas de lisis. Se calculó el título en UFP/mL de los fagos capaz de infectar la cepa a probar, incluyendo el huésped.

6.6.1 Cálculo de la eficiencia de plaqueo

Para cada huésped y fago probado, se calculó la eficiencia de plaqueo de acuerdo con la siguiente fórmula:

Título de fago en especial a probar / Título del fago en huésped *E. cloacae* ATCC 23355 = EP

Se utilizó la bacteria control, ya que en esta se logró una mayor concentración de fagos en triplicado. Se usó una dilución estándar para homogenizar la infección en todas las cepas. La interpretación más sencilla de esta prueba es que si el fago infecta ambos tipos de bacterias de igual manera, (de 0.80 a 1) es reportado positivo (++ zona de lisis clara, + zona de lisis opaca) o si el fago no infecta (de 0.80 o menos) al huésped a probar, se reportó como negativo (-sin lisis) (Poxleitner *et al.*, 2017).

7 Caracterización biológica

7.1 Estabilidad a diferentes temperaturas

Viabilidad de los fagos a TA y calor: suspensiones de fagos en buffer PBS 1X, se colocaron en microtubos a TA, de calor a 37 ° C (± 0.5 ° C), a 50 ° C (± 0.5 ° C) y a 70°C (± 0.5 ° C) y 80°C (± 0.5 ° C), Se calculó la concentración en UFP/mL por medio del conteo del número de UFP de lisis en los platos (Zaburlin *et al.*, 2017; Flores, 2017).

7.2 Viabilidad de los bacteriófagos a luz ultravioleta

Suspensiones de fagos fueron expuestas a luz ultravioleta a una distancia de 50 cm, la estabilidad de los fagos fue verificada durante 10, 20, 40, 60, 70 y 90 segundos. Se calculó la concentración en UFP/mL por medio del conteo de placas de lisis en los platos (Flores, 2017; Basdew y Laing, 2014).

7.3 Viabilidad de los bacteriófagos en función del pH

La viabilidad del fago fue evaluada en buffer de fago para garantizar el equilibrio osmótico. El pH de las soluciones fue ajustado con HCl (1M) para pH finales de 2, 3, 4, 5, 6 y 7 (Silva *et al.*, 2014); y con NaOH (1M) para pH de 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14. Una suspensión conteniendo los fagos en buffer SM o fago fue adicionada a una solución de buffer ajustada, la determinación de la viabilidad de los fagos fue establecida mediante el conteo del número de UFP de lisis en los platos (Flores, 2017; Basdew y Laing, 2014).

7.4 Ensayo de resistencia al cloroformo

Se colocó el fago en agitación por 1 h con cloroformo 10% (dilución 1:2) y luego, se realizó el ensayo de doble placa de agar. El control negativo fue el fago sin este tratamiento (Basdew y Laing, 2014).

8 Caracterización Molecular

8.1 Extracción de material genético

La extracción se basó en cromatografía en columna giratoria del Kit QIAamp MinElute Virus Spin kit (QIAGEN, Valencia CA). El ADN del fago se purificó de otros componentes celulares como proteínas sin el uso de fenol, cloroformo o cloruro de cesio. El material de partida para este procedimiento es el sobrenadante del fago clarificado que fue separado de restos bacterianos en cultivos líquidos. Inicialmente, las partículas del fago se lisaron a través de un proceso de lisis térmica y química con un buffer de lisis. Se agregó isopropanol al lisado y la solución se cargó en una columna giratoria. Esta columna unió los ácidos nucleicos de una manera que depende de las concentraciones iónicas, por lo tanto, solo el ADN se unió a la columna mientras que la mayoría del ARN y las proteínas se eliminan a través del flujo. El ADN unido se lavó con la solución de lavado para eliminar las impurezas restantes y el ADN total purificado se eluyó con el tampón de elución. La pureza del ADN fágico se determinó por la metodología de la electroforesis en agarosa.

8.1.1 Protocolo de preparación del Gel de Agarosa

Se prepararon 80 mL de agarosa 1.0% en buffer TBE 1X en un Erlenmeyer de 250 mL. Para que se mezclara el TBE 1X con la agarosa en una microonda se calentó la mezcla y cuando bajó la temperatura a 50°C, se le añadió 1.5 µL de bromuro de etidio para una concentración de 0.5 µg/mL y teñir las bandas de ADN.

En el caso de los geles de agarosa, se le añadió bromuro de etidio a 0.5 µg/mL, sustancia que se intercala entre las bases del ADN y es fluorescente, cuando se ilumina con luz ultravioleta.

En microtubos, se añadió 8 µL del ácido nucleico y 2 µL de buffer de carga. Cuando el gel se solidificó, se colocó el marcador de peso molecular de 1 Kb (3 Kb) y las muestras en los pocillos, se corrieron las muestras a 110 V por 45 min y luego, se visualizaron las bandas correspondientes en un transiluminador de luz UV (Nelson y Cox, 2018; Berg *et al.*, 2003).

El TBE 1X fue preparado utilizando la fórmula $V_i \times C_i = V_f \times C_f$

8.2 Determinación de la presencia de proteínas de fagos mediante SDS-PAGE

Se prepararon geles de poliacrilamida, tampones de separación y transferencia de las proteínas. Se midió la concentración de las proteínas existentes utilizando el método de espectrofotometría y se añadió el tampón reductor para las proteínas. Se calentaron las muestras por 5 min a 95°C y posterior a esto, se introdujeron en cada pozo del gel de acrilamida previamente preparado. Se separaron las proteínas por 60 min a 20 mA y luego, se tiñeron los geles con azul de Comassie por 1 h, y después, se decoloró por 24 h a TA y con agitación suave (Fig. N° 24). Se cortaron las bandas para su determinación mediante espectrometría de masas) (Rasool *et al.*, 2016; Sambrook y Rusell, 2001).

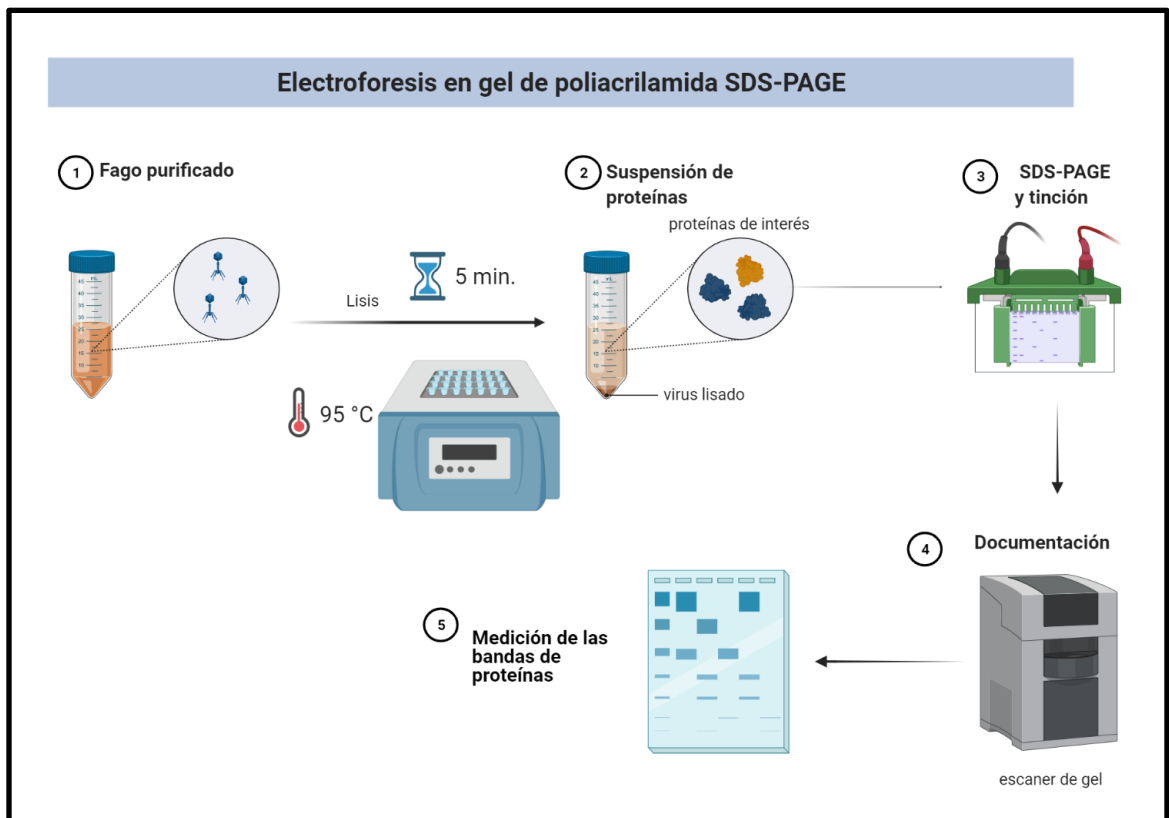


Figura 25. Procedimiento de SDS-PAGE para el fago vB_EcRAM-01. Se procedió a lisar la muestra con β -mercaptoetanol a 95°C por 5 min. Posteriormente, se cargan 25 μ L de muestra en el gel de poliacrilamida corriendo por 30 min en el gel discontinuo; se procedió a teñir con azul brillante de Comassie toda la noche y se destiñó con decolorante por 24 h; se reveló y se escaneó. Creado por el autor.

8.3 Secuenciación y Análisis Bioinformático

La muestra de ADN fue secuenciada en el Departamento de Investigación en Genómica y Proteómica del ICGES, utilizando el secuenciador MiSeq Illumina (ThermoFisher Scientific Waltham, Massachusetts EUA). Las librerías Nextera XT se elaboraron de acuerdo con los procesos de etiquetado a mano, amplificación por PCR, limpieza del PCR, nor-

malización de la librería y la secuenciación de los pools de librería por medio de MiSeq (Fig. N° 25). Luego de esto, las librerías preparadas se procedieron a secuenciar de acuerdo con el protocolo de Illumina.

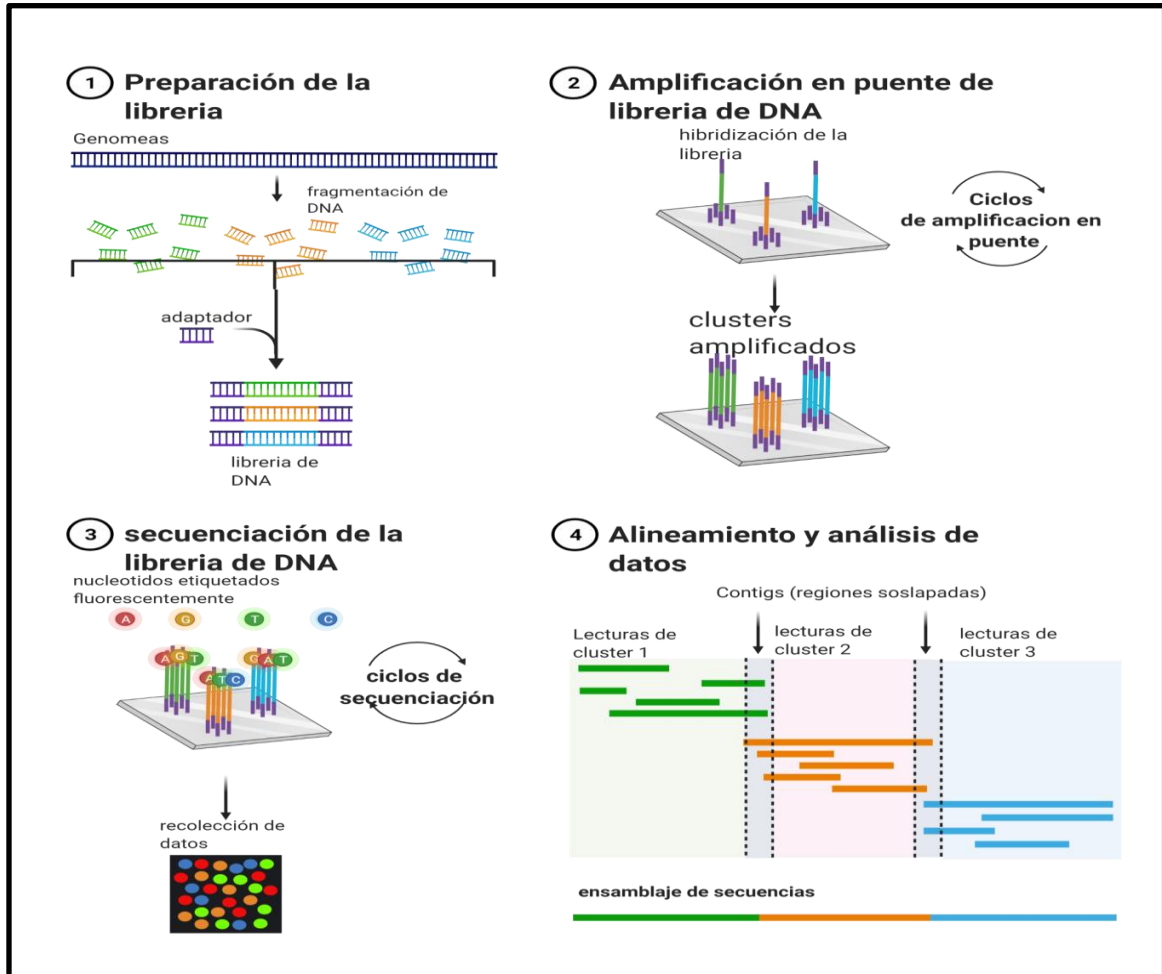


Figura 26. Preparación de las librerías para la secuenciación mediante miSeq Illumina. Creado por el autor.

El ensamblaje de las lecturas se realizó utilizando la opción de “novo assembly” del software SPAdes versión 3.15.1 (Bankevich *et al.*, 2012). Posteriormente, la secuencia ensamblada fue anotada automáticamente con el algoritmo de anotación rápida utilizando tecnología de subsistema RASTk v2.0 (Brettin *et al.*, 2015; Overbeek *et al.*, 2014; Aziz *et al.*, 2008). Los marcos abiertos de lectura obtenidos fueron verificados utilizando los algoritmos GeneMarkS v4.28 (Besemer *et al.*, 2001), Glimmer v3.02 (Delcher *et al.*, 2007) revisando el potencial de codificación.

El análisis de los genes fue curado manualmente mediante BLASTn (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Hhpred (Gabler *et al.*, 2020; Zimmermann *et al.*, 2018; Meier y Söding, 2015; Hildebrand *et al.*, 2009) y HMMER v2.41.1 (Potter *et al.*, 2018; Finn *et al.*, 2015) (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred>). Utilizando una matriz no redundante de proteínas, empleando los perfiles de los modelos ocultos de

Markov (Hofmann y Tashman 2020) en la plataforma de Geneious v9.1.8, solo se consideraron válidos los resultados cuyo valor de análisis estadístico “e” (e-value) fueron inferiores a 0.01, y cuyo porcentaje de cobertura e identidad fueron superiores al 30%, en caso contrario las comparaciones fueron consideradas válidas.

La determinación del ARN de transferencia se realizó empleando el software tRNA scan-SE v2.07 (Chan y Lowe, 2019; Lowe y Chan, 2016) (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) y ARAGORN v1.2.41(Laslett y Canback, 2004) (<http://www.ansikte.se/ARAGORN/>). El análisis comparativo entre genomas se realizó utilizando el alineamiento progresivo de Mauve v2.3.1(Darling *et al.*, 2004) (<http://darlinglab.org/mauve/mauve.html>).

La construcción del árbol filogenético: todas las comparaciones por pares de las secuencias de nucleótidos se realizaron utilizando el método Genome-BLAST Distance Phylogeny (GBDP) de la plataforma VICTOR (Virus Classification and Tree Building Online Resource) (Meier-Kolthoff y Göker, 2017) (<https://ggdc.dsmz.de/victor.php>), en los entornos recomendados para virus procarióticos (Meier-Kolthoff y Göker, 2017) Las distancias intergenómicas resultantes se utilizaron para inferir un árbol de evolución mínima equilibrada con soporte de rama mediante FASTME, incluido el post-procesamiento SPR (Lefort *et al.*, 2015) (para cada una de las fórmulas D0, D4 y D6, respectivamente. El soporte de rama se infirió a partir de 100 pseudo-bootstrap de réplicas cada uno. Los árboles se enraizaron en el punto medio (Farris, 1972), se visualizaron mediante FigTree (Rambaut, 2006) y personalizados con los límites de taxón a escala de especie, género y familia, se estimaron con el programa iTOL (Letunic y Bork, 2019) (<https://itol.embl.de/>). Los umbrales de agrupación recomendados (Meier-Kolthoff y Göker, 2017) y un valor F (fracción de enlaces necesarios para la fusión de grupos) de 0.5 (Meier-Kolthoff *et al.*, 2014).

Se realizó un análisis de porcentaje de identidad de nucleótidos (ANI) usando pyani v0.2.10 (Pritchard *et al.*, 2015) (<https://github.com/widdowquinn/pyani/tree/v0.2.10>). La determinación de la taxonomía y el tipo de ciclo de replicación se logró mediante el servidor PATRIC v3.6.9 (Davis *et al.*, 2020) (<https://patricbrc.org/>) y PhageAI (Tynecki *et al.* 2020) (<https://phage.ai/>)

8.4 Análisis Estadístico

Se utilizó el software Graphpad Prism v9.0.1 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, EUA) (<https://www.graphpad.com/>) para realizar las gráficas y tablas para describir la estabilidad del fago a las temperaturas, pH y cloroformo, y también, se usó Microsoft Excel 2019 para realizar las tablas de rango de hospedero.

Para el análisis estadístico inferencial los datos obtenidos en triplicado fueron analizados mediante el método ANOVA, la comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba de Tuskey HSD y Dunnet’ ss con un nivel de confianza del 95% y un nivel de significancia del 0.001.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

9 Resultados.

Caracterización biológica

9.1 Aislamiento y características del fago vB_EcRAM-01

Se obtuvieron tres muestras de agua que fueron unificadas (1 L) de la parte media y baja del Río Abajo en mayo de 2018. La misma fue enriquecida, plaqueada y posteriormente, se purificaron los fagos después de 3 rondas de pasajes. En todas estas fases se mantuvo consistente la morfología de las UFP de lisis (Fig. N° 26).

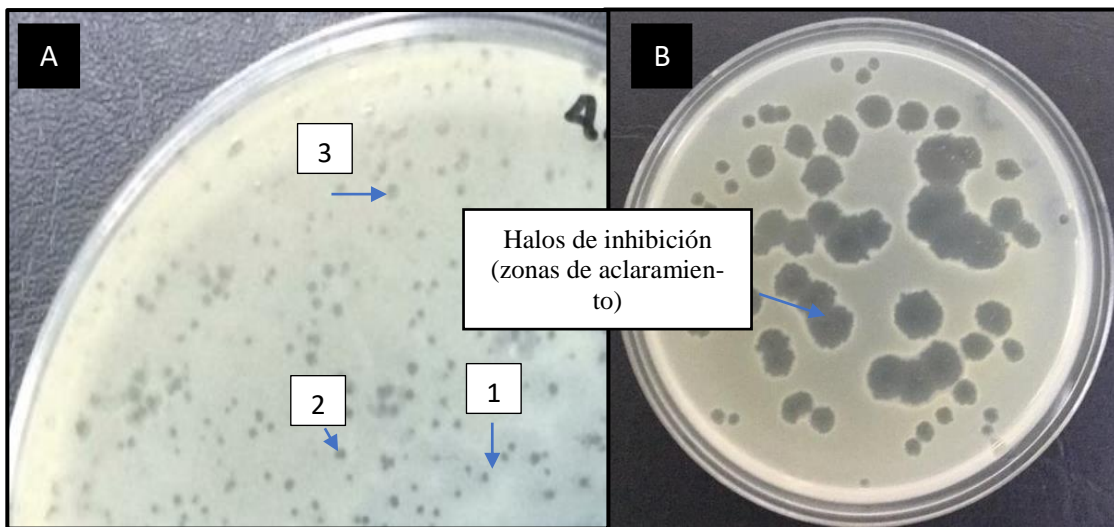


Figura 27. Césped bacteriano del Complejo *E. cloacae* infectado por bacteriófagos según el método de doble placa de agar. (A) Plato con halos de inhibición (1, 2, 3) de diferentes tamaños. (B) Luego de la purificación, se obtuvieron UFP de lisis que midieron aproximadamente 7 mm, de bordes rugosos y completamente claros

En la figura 26, se pueden observar los halos de inhibición en el césped confluyente del Complejo *E. cloacae* y al realizar la infección, se pueden observar los diferentes tamaños y formas de las UFP. Algunos halos formados por los bacteriófagos fueron claros.

Se aisló un fago denominado vB_EcRAM-01, el cual fue aislado del Río Abajo y posee la habilidad de infectar 23 de 27 cepas huéspedes con diferentes eficiencias (Tabla 8).

Una vez infecta la cepa tipo, forma UFP de lisis claras de aproximadamente entre 3 a 7 mm. El fago aislado contra el complejo *E. cloacae* es un fago que produce UFP claras con bordes lisos, lo cual indica probablemente que es un fago lítico. Este fago tiene una concentración en el stock preparado de 4.7×10^7 UFP/mL.

9.2 Ensayo de reducción bacteriana

Se realizó un ensayo de infección del Complejo *E. cloacae* con el fago vB_EcRAM-01 (título 4.7×10^7 UFP/mL), la cual fue monitoreada por 180 min. Se evidenció que este

fago es capaz de lisar a su huésped impidiendo su crecimiento normal (ANOVA $F = 613.62$. $g.l = 1$ y $p < 0.0001$) (Fig. N° 27).

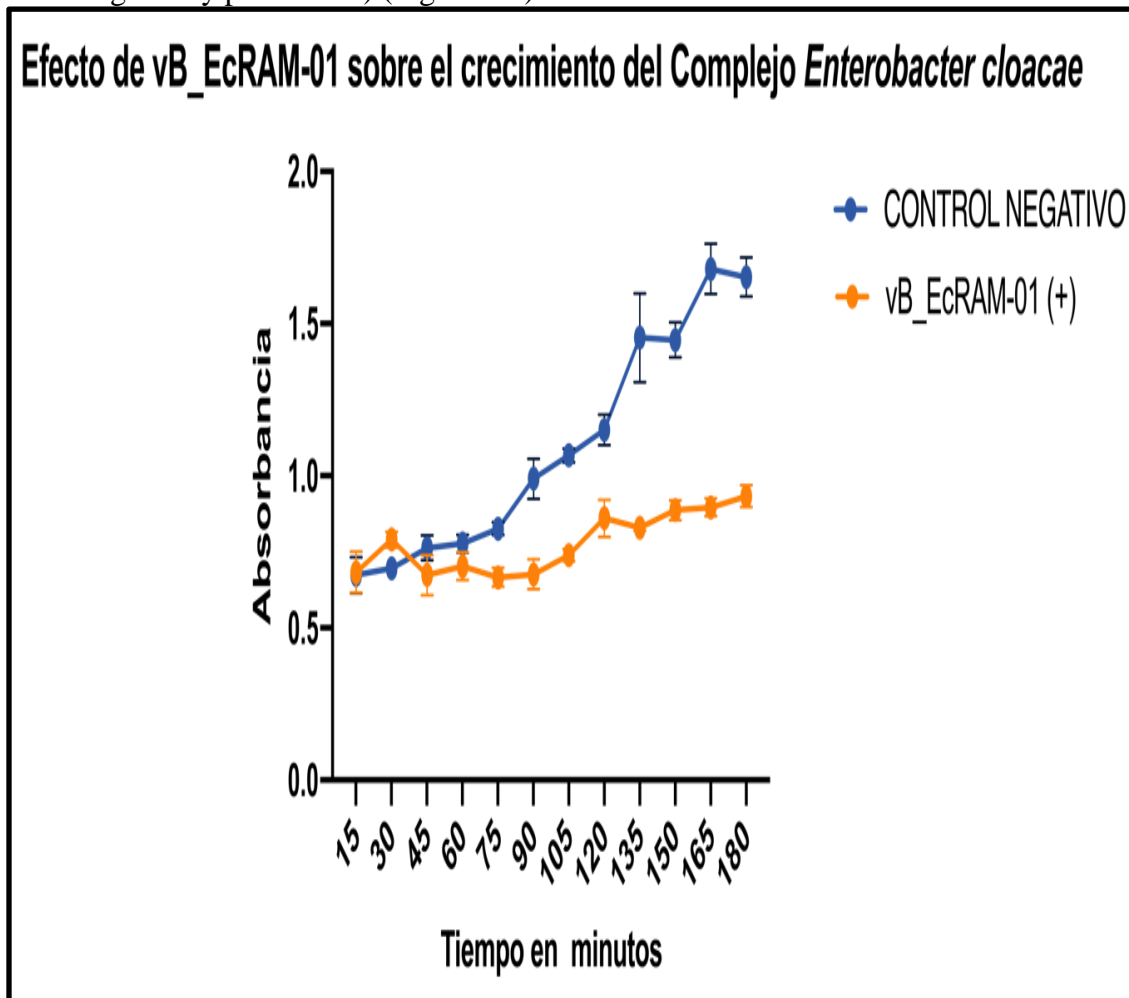


Figura 28. Efecto de vB_EcRAM-01 sobre el crecimiento del complejo *E. cloacae*. La línea celeste indica la concentración bacteriana sin ser infectada con el virus a 37°C, observándose una absorbancia de 1.6. En cambio, la línea naranja, se observa la concentración de la bacteria siendo infectada desde el inicio observándose una absorbancia reducida de hasta 0.77 (ANOVA $F = 613.62$. $g.l = 1$ y $p < 0.0001$).

9.3 Especificidad del huésped (Rango de huésped)

Uno de los ensayos más importantes para la caracterización de bacteriófagos es precisar la especificidad de bacterias huéspedes para el bacteriófago vB_EcRAM-01. Se evaluaron 30 cepas incluyendo 2 ATCC y diferentes cepas clínicas entre Gram negativas y Gram positivas observándose zonas de lisis en 16 de ellas. En la Tabla 9 se pudo apreciar que el vB_EcRAM-01 es capaz de lisar el 63 % de las cepas clínicas usadas en este estudio. Se estimó que hubo cepas de *E. cloacae* que no fueron lisadas por parte de vB_EcRAM-01 y esto puede explicarse porque el Complejo *E. cloacae* consiste en muchas subespecies dentro del complejo (Tabla 9). También se observó que hubo lisis en menor grado de dos cepas de *E. coli* que puede deberse a la presencia de bacteriocinas producidas durante el procesamiento del stock de fagos.

Tabla 9. Especificidad del fago vB_EcRAM-01 a diferentes cepas clínicas (Rango de Huésped).

	Cepas bacterianas	ID de muestra	Dilución	Eficiencia de plaqueo	Infección
1	<i>E. cloacae</i>	ATCC 23355	1.00E-04	1.00	++
2	<i>E. cloacae</i>	LCRSP-01	1.00E-04	1.00	++
3	<i>E. aerogenes</i>	ATCC 13048	1.00E-04	0.01	-
4	<i>E. cloacae</i>	Le 171200	1.00E-04	0.87	++
5	<i>E. cloacae</i>	236	1.00E-04	0.80	+
6	<i>E. cloacae</i>	246	1.00E-04	0.97	++
7	<i>E. cloacae</i>	154	1.00E-04	0.86	++
8	<i>E. cloacae</i>	164	1.00E-04	0.83	+
9	<i>E. cloacae</i>	241	1.00E-04	1.01	++
10	<i>E. cloacae</i>	232	1.00E-04	0.88	++
11	<i>E. cloacae</i>	120	1.00E-04	0.90	++
12	<i>E. cloacae</i>	250	1.00E-04	0.98	++
13	<i>E. cloacae</i>	147	1.00E-04	0.92	++
14	<i>E. coli</i>	111	1.00E-04	0.01	-
15	<i>P. aeruginosa</i>	389	1.00E-04	0.00	-
16	<i>E. aerogenes</i>	101	1.00E-04	0.01	-
17	<i>A. baumannii</i>	Le 171209	1.00E-04	0.01	-
18	<i>S. aureus</i>	456	1.00E-04	0.01	-
19	<i>E. cloacae</i>	373051	1.00E-04	0.89	++
20	<i>E. cloacae</i>	373372	1.00E-04	0.96	++
21	<i>E. cloacae</i>	373475	1.00E-04	0.96	++
22	<i>P. aeruginosa</i>	373131	1.00E-04	0.00	-
23	<i>E. cloacae</i>	373841	1.00E-04	1.02	++
24	<i>E. cloacae</i>	512024-40	1.00E-04	0.83	+
25	<i>E. coli</i>	190510503	1.00E-04	0.09	-
26	<i>E. cloacae</i>	190510303	1.00E-04	0.41	-
27	<i>E. cloacae</i>	190510328	1.00E-04	1.00	++
28	<i>E. coli</i>	190511286	1.00E-04	0.09	-
29	<i>S. aureus</i>	190512337	1.00E-04	0.00	-
30	<i>S. aureus</i>	DMH-SA-234	1.00E-04	0.01	-
31	<i>P. aeruginosa</i>	DMH-PA-888	1.00E-04	0.00	-
32	<i>E. coli</i>	DMH-EC-430	1.00E-04	0.00	-
33	<i>E. aerogenes</i>	DMH-EA-98	1.00E-04	0.00	-

El mapa de calor del rango de huésped fue producido con Microsoft Excel®. Sobre la base de la eficiencia de plaqueo se determinó si el fago tenía actividad antimicrobiana contra las cepas en este ensayo. Del color verde al amarillo representan la apariencia de la UFP de lisis. Del color rojo al salmón, representan la ausencia de placa de lisis. También se utilizaron signos para ejemplificar la apariencia de las placas, por ejemplo: (++) zona de lisis clara, (+) zona de lisis opaca y (-) ausencia de lisis.

9.4 Estabilidad a diferentes temperaturas

La estabilidad a diferentes temperaturas se puede observar en la Figura N° 28, donde el fago vB_EcRAM-01 es estable entre 37 a 50°C. La incubación a 70°C redujo 4 órdenes log y a 80°C, la población fue inhibida completamente (ANOVA $F = 33697.61$, $g.l = 15$ y $p < 0.0001$). En cuanto a la prueba post hoc de Tuskey, indica que la temperatura donde hubo mayor replicación del vB_EcRAM-01, fue a 37°C ($p < 0.001$).

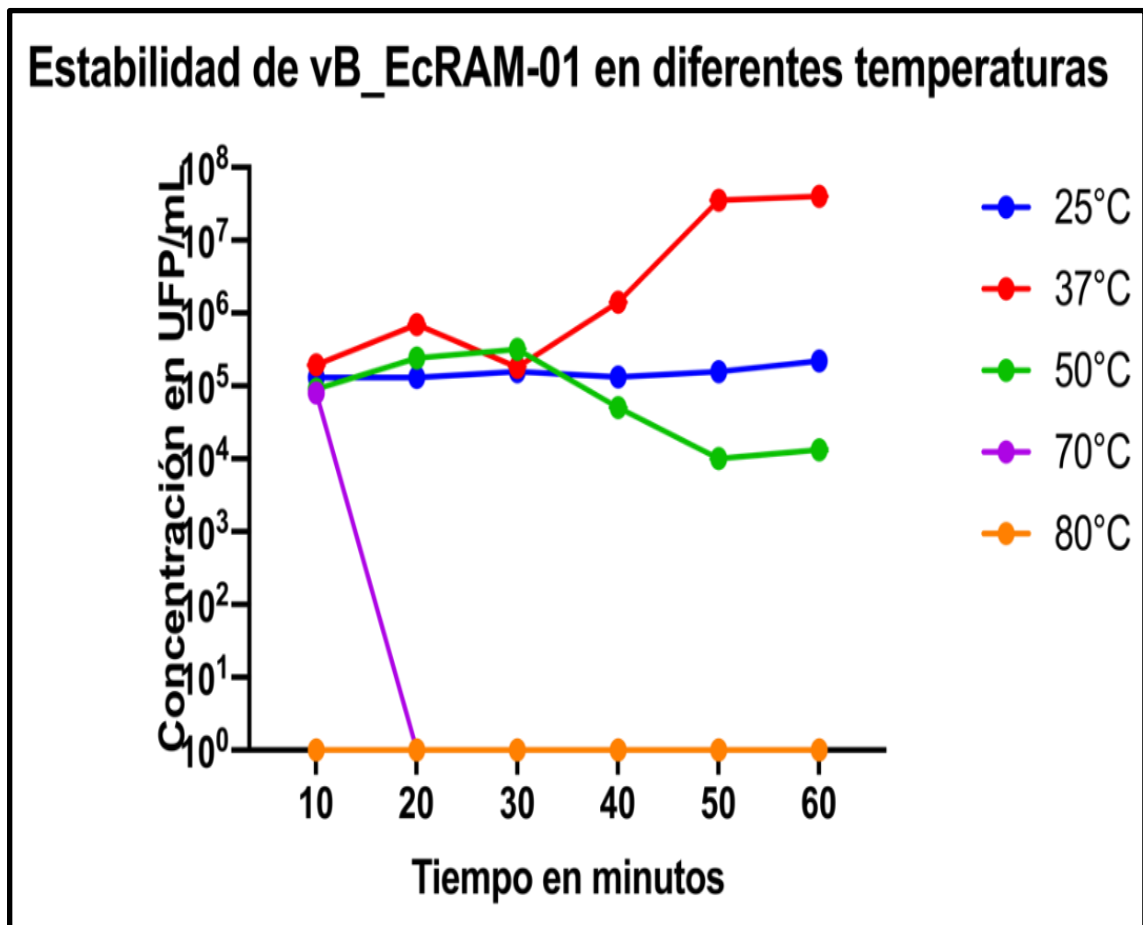


Figura 29. Estabilidad del fago vB_EcRAM-01 en diferentes temperaturas. En el eje de las x el tiempo en segundos y se encuentran las líneas con temperaturas 25°C (azul), 37°C (roja), 50°C (verde), 70°C (violeta), 80 ° C (naranja). Se observa que el fago vB_EcRAM-01 es estable a las temperaturas de 25, hasta 50 grados. Sin embargo, la viabilidad es casi nula después de los 10 s a 70°C. Análisis estadístico de ANOVA de una sola vía $p < 0.001$.

9.5 Estabilidad a la Luz Ultravioleta UV

La incubación del fago vB_ECRAM-01 a una intensidad de luz UV de 365 nm (Fig. N° 29) y expuesta a diferentes tiempos a lo largo de unos 90 s, demostró que los títulos se reducen a 1, 4 y 5 log en tiempos de 60, 70 y 90 s, respectivamente, y comparados con el control que no fue sometido a la luz UV. Esto confirma que este fago es sensible a la luz UV ($F = 1.35$ g.l. = 5, $p=0.278$).

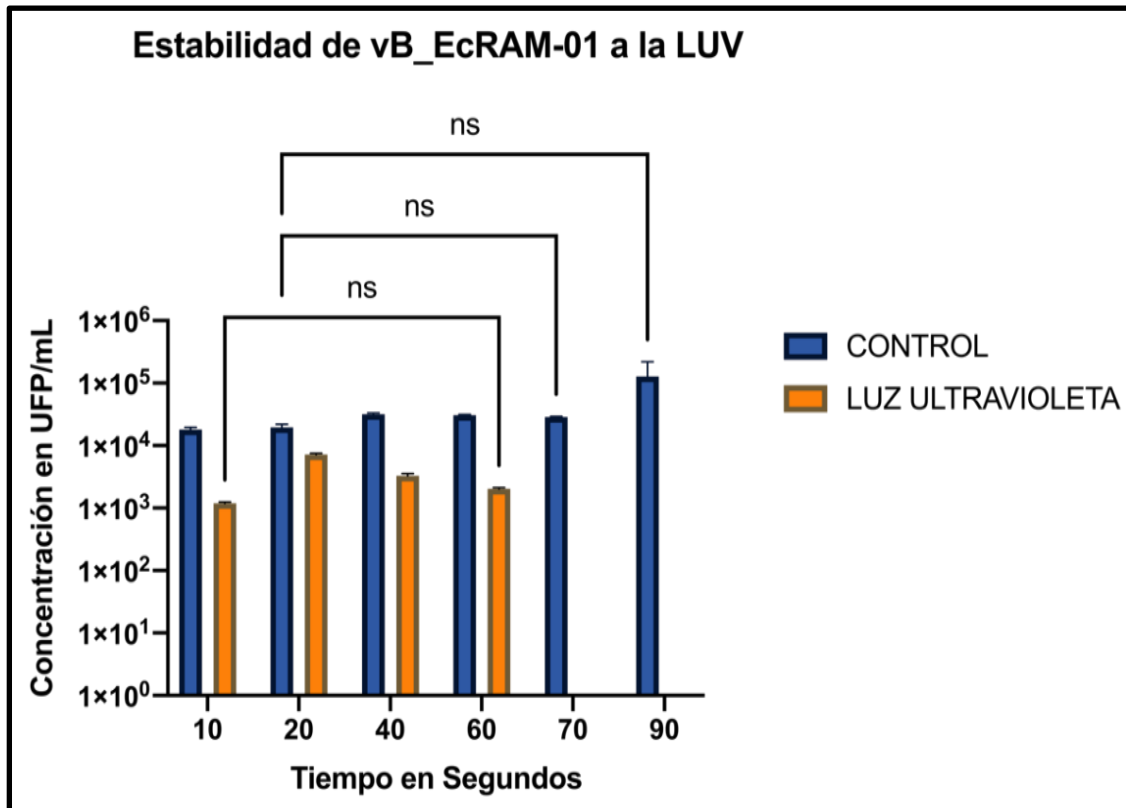


Figura 30. Estabilidad de vB_ECRAM-01 frente a la luz UV. Las barras de color azul corresponden al fago vB_EcRAM-01 en condiciones normales de luz (sin fuente de Luz UV), mientras que las barras naranjas corresponden al fago tratado con luz UV. Las diferencias estadísticamente significativas fueron evaluadas con ANOVA de dos vías. n.s. es no significante.

9.6 Estabilidad a diferentes pH

La estabilidad de vB_EcRAM-01 a diferentes concentraciones de pH comparadas con un control (pH=7.5). Se puede observar en la figura N° 30, que indica que el fago es estable entre los pH 7.5 - 11. La incubación a pH ácidos (1-6) redujo drásticamente la replicación viral. En cuanto a la incubación en pH alcalinos (8-10), mostró que este fago es estable. Sin embargo, entre los pH 11 y 12, la replicación viral disminuyó drásticamente ($F = 52.01$, g.l. = 11 y $p < 0.001$). En cuanto a la prueba post hoc de Dunnett's, nos determinó que la mayor replicación viral se da entre los pH 9 y 10 ($p < 0.001$).

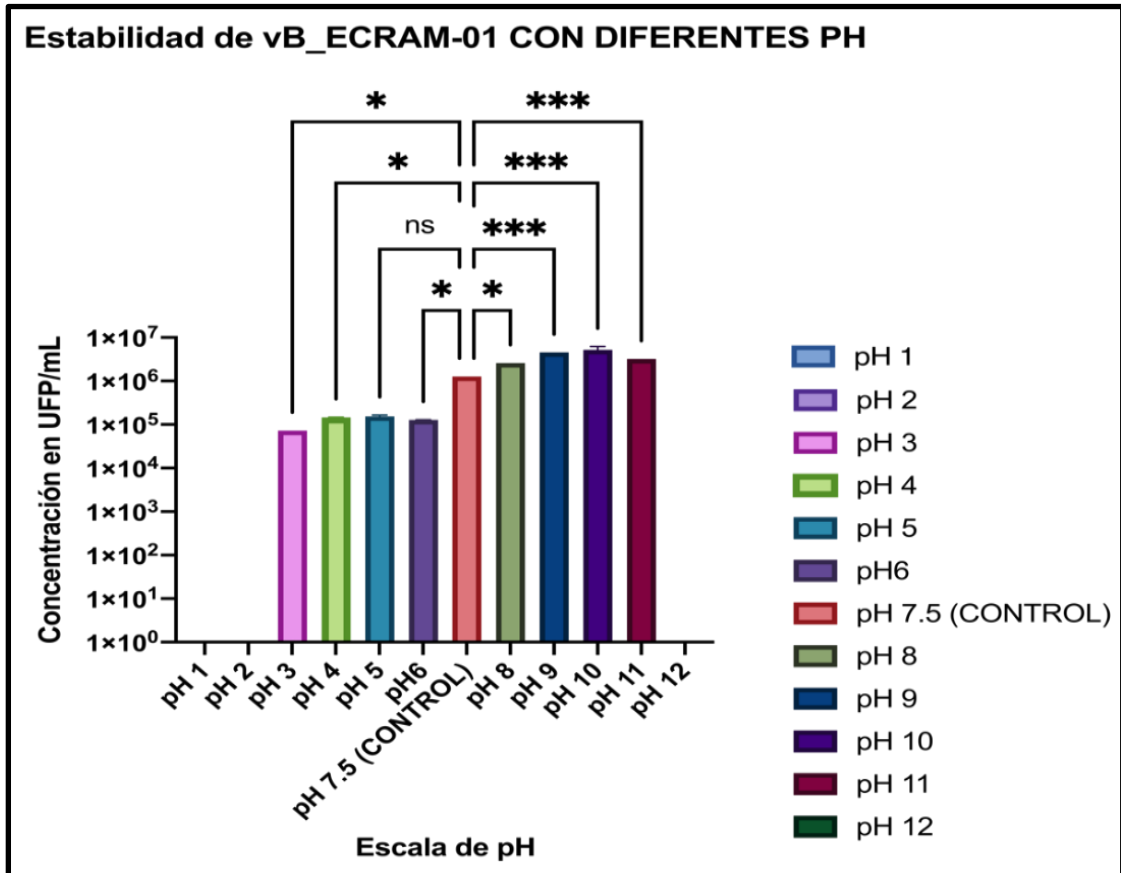


Figura 31. Estabilidad de vB_EcRAM-01 a diferentes pH. El eje de las X, se contempla el pH y el eje de la Y, es el título viral. Se puede apreciar que los títulos mayores corresponden a pH alcalinos entre 7.5 a 11. Mientras que no se dio títulos virales en pH menores a 7.5. Las diferencias estadísticamente significativas fueron evaluadas con ANOVA de una vía * $p = 0.032$, y 0.044 , *** $p < 0.001$, 0.016 .

9.7 Estabilidad frente al cloroformo

En cuanto a la estabilidad de vB_EcRAM-01 frente a un solvente orgánico (Fig. N° 31), el fago mostró una reducción significativa en su replicación a las concentraciones 1×10^{-2} UFP/mL y 1×10^{-3} UFP/mL del virus. En cambio, a la concentración de 1×10^{-4} UFP/mL se mostró resistencia a este tratamiento ($F = 382.38$. $g.l = 3$ y $p < 0.0001$).

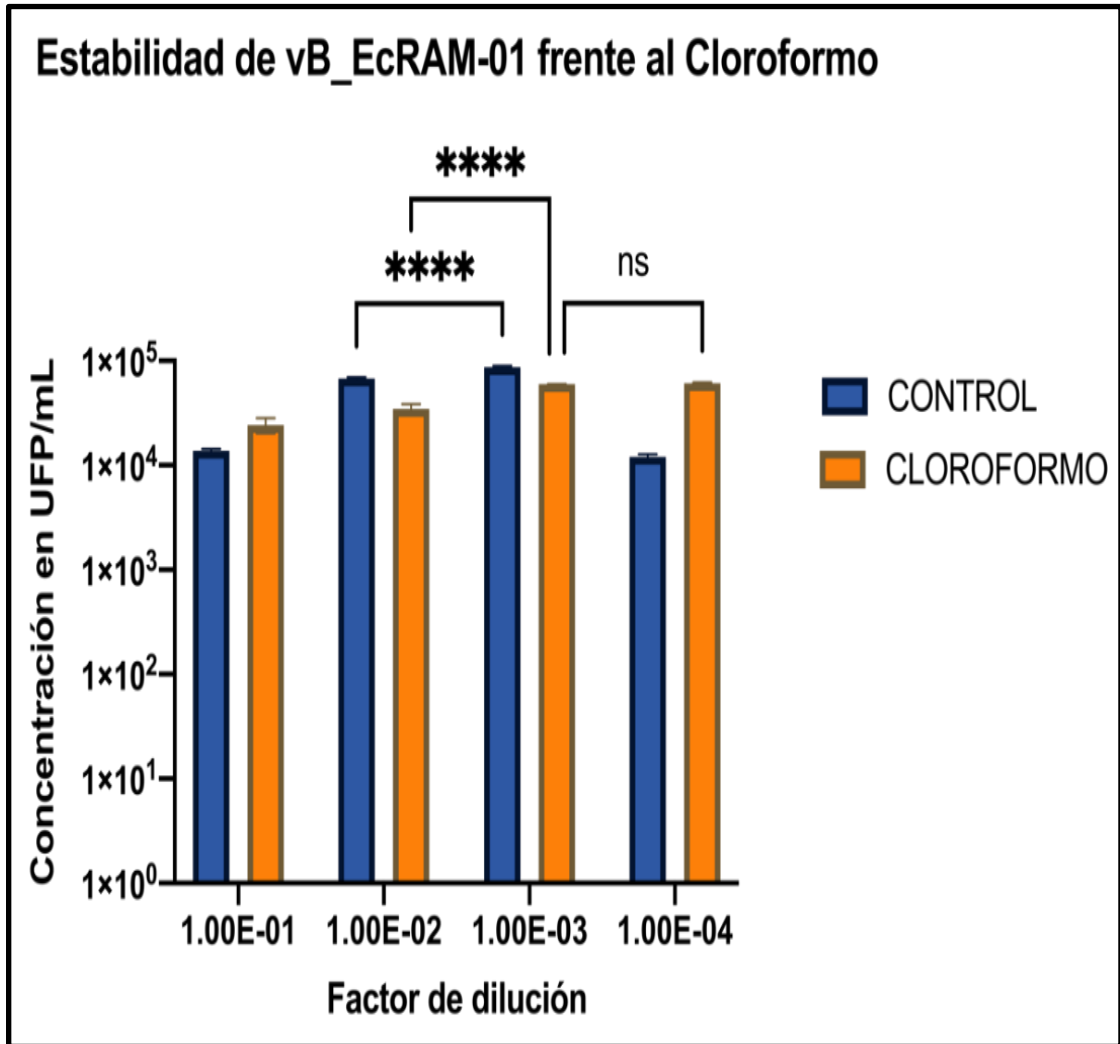


Figura 32. Estabilidad de vB_EcRAM-01 frente al Cloroformo. En el eje y se encuentran las concentraciones en UFP/mL mientras el eje x se observan los diferentes títulos de vB_EcRAM-01 en condiciones de control (barra azul) y con cloroformo (barra naranja). La data fue analizada con la prueba de ANOVA de dos vías. Las diferencias estadísticamente significativas están mostradas aquí: *** $p < 0.0001$, n.s. = 0.982.

10 Caracterización Molecular

10.1 Determinación de la presencia de proteínas de fagos mediante SDS-PAGE

El vB_EcRAM-01 al ser sometido a un proceso de reducción con el tampón reductor y posteriormente ser corridas las fracciones en un gel separador de poliacrilamida se observaron una serie de bandas de diferentes pesos moleculares (Fig. N° 32).

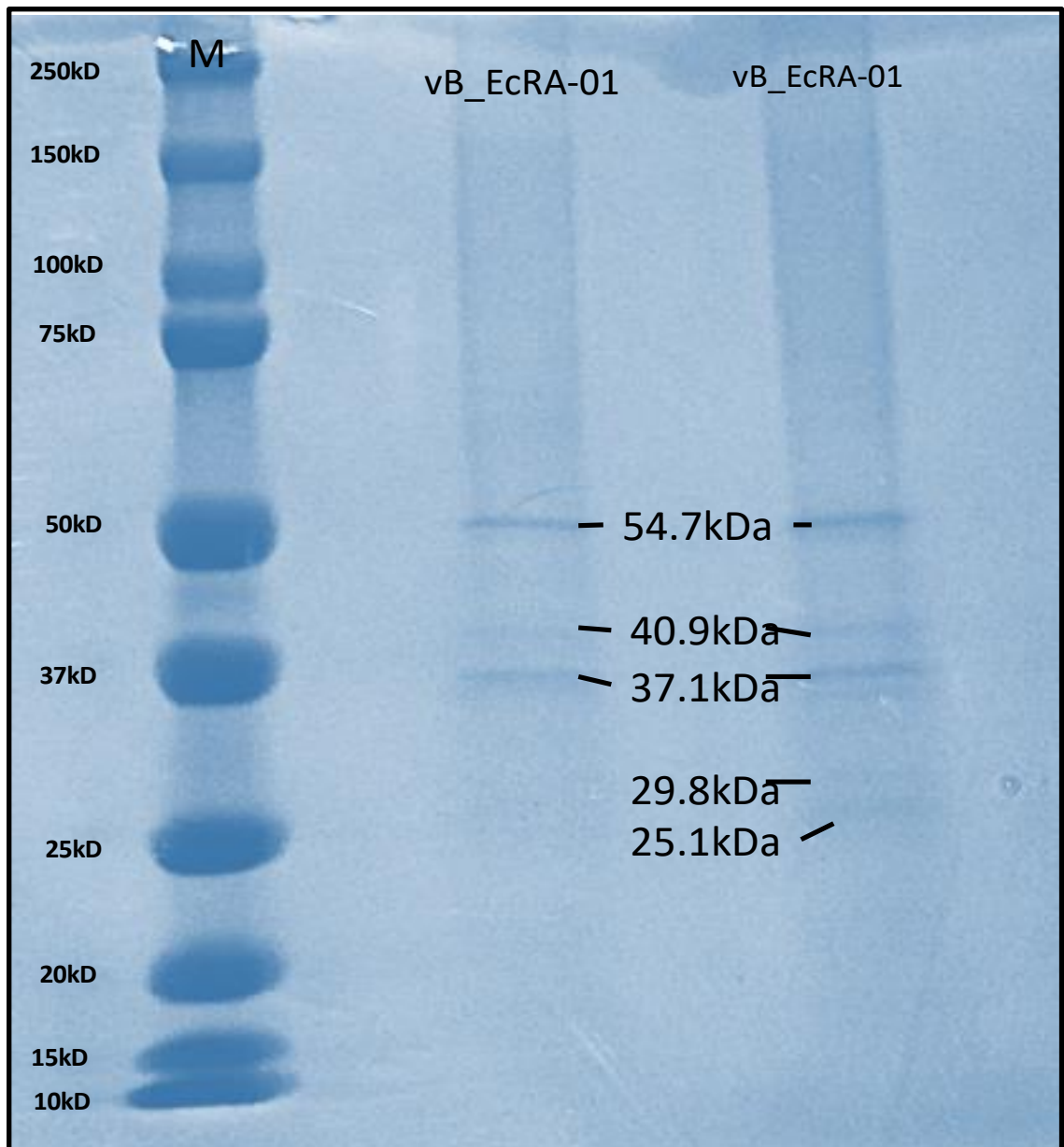


Figura 33. Resultado de SDS-PAGE del fago vB_EcRAM-01. Se puede apreciar las bandas correspondientes a pesos moleculares entre 25.1kDa a 54.7 kDa

Tabla 10. Aproximación teórica de las bandas observadas del gel SDS-PAGE del fago vB_EcRAM-01.

protein	function predicted	MW (KDa)	theoric	MW (KDa)	observed
gp24	hypothetic protein	54.918		54.7	
gp82	hypothetic protein	54.110			
gp72	hypothetic protein	57.296			
gp92	hypothetic protein	54.263			
gp108	hypothetic protein	52.936			
gp113	hypothetic protein	53.763			
gp86	hypothetic protein	45.016			
gp110	hypothetic protein	45.463			
gp243	hypothetic protein	44.192		40.9	
gp50	hypothetic protein	43.271		37.1	
gp57	hypothetic protein	43.291			
gp128	hypothetic protein	43.363			
gp75	hypothetic protein	30.643			
gp84	hypothetic protein	30.336			
gp85	hypothetic protein	29.372		29.8	
gp165	hypothetic protein	30.912			
gp33	hypothetic protein	29.701			
gp73	hypothetic protein	28.634		25.1	

La mayoría de las funciones predichas de acuerdo con el peso molecular en este ensayo son proteínas hipotéticas sin función definida u obtenida de manera experimental hasta el momento. No se llegó a observar en este ensayo proteínas estructurales de mayor peso molecular como la cápside, cuello o cola.

Extracción de material genético y su visualización en gel de agarosa.

El ácido nucleico aislado se le realizó un tratamiento preliminar con ARNasa, de tal manera que al ser sometido el ADN con la enzima ARNasa, el material genético no se degradó, caso contrario fue cuando se trató con ADNasa, donde ninguna banda fue visible cuando se corrieron las muestras en electroforesis, de esta manera se determinó cuál es la naturaleza del ácido nucleico (ADN).

10.2 Análisis *in silico* de la secuencia nucleótida del fago vB_EcRAM-01

10.2.1 Análisis genómico estructural

Los marcos abiertos de lectura (ORF) fueron analizados con el programa Geneious (<https://www.geneious.com/>) y fueron confirmados con el ORF-finder de la NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>), así como también con el GeneMarkS (Besemer *et al.*, 2001) (<http://exon.gatech.edu/GeneMark/>), utilizando en todos los casos el código genético para las bacterias. El vB_EcRAM-01 es un miofago de 178477 pb con contenido G+C % de 45.8% y con 294 genes, que codifican proteínas de morfología, inactivación, adsorción a las células, inyección de ADN y caracterización de enzimas líticas.

Las lecturas en crudo fueron ensambladas, anotadas automáticamente y curadas manualmente, determinando adicionalmente que este genoma posee 2 ARNt en su genoma, el ARNt-Met (cat) el cual posee 77 bases y 55.8% de GC y el ARNt-Gly (tcc) con 76 bases y 47.4% de GC (Fig. N° 33 y N° 34).

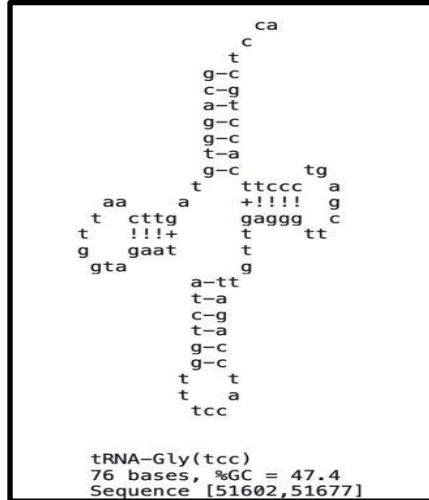


Figura 34. Análisis de secuencia FASTA del vB_EcRAM-01 usando ARAGRON resultando un ARNt-Gly.

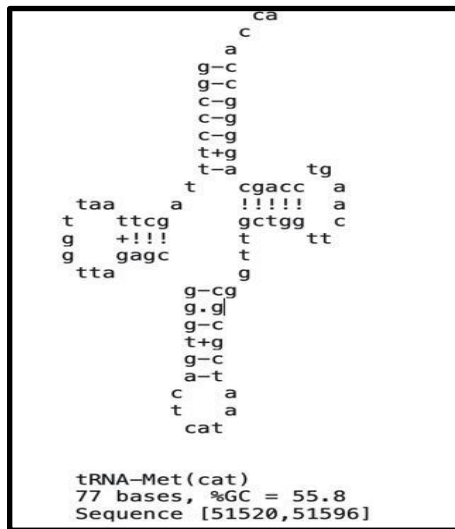
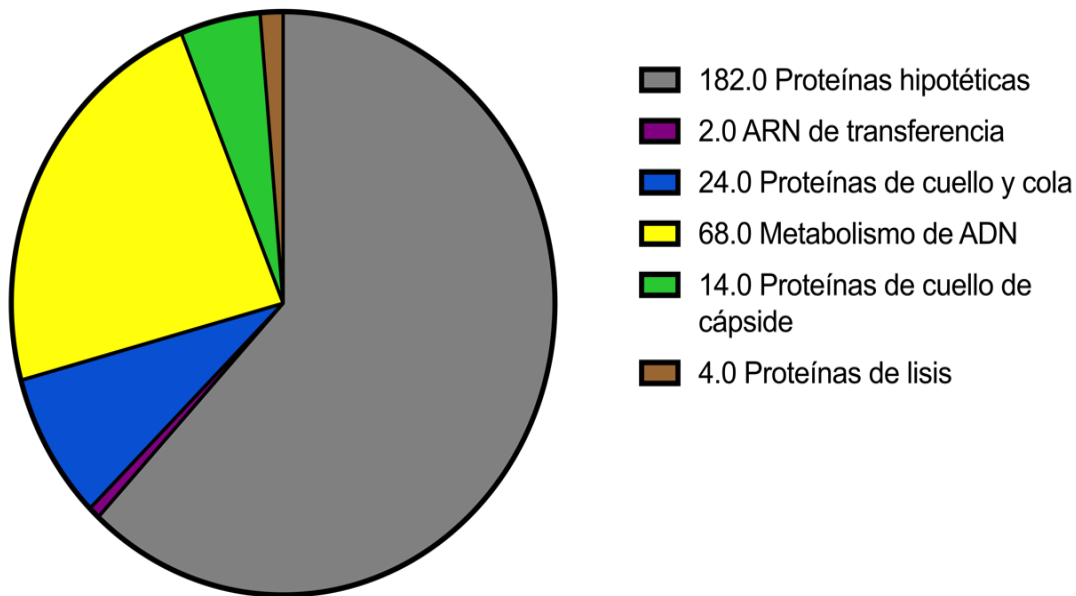


Figura 35. Análisis de secuencia FASTA del vB_EcRAM-01 usando ARAGORN resultando un ARNt-Met.

La anotación completa del genoma vB_EcRAM-01 se encuentra en el anexo 1. Principalmente, vamos a encontrar proteínas estructurales como subunidad de la base del plato, subunidad de la cuña de la placa base, proteínas de la cápside. Las proteínas relacionadas con la replicación, reparación y recombinación del ADN fueron identificadas como ribonucleasa, endonucleasa, ADN polimerasa, nucleasas, helicasas, glutaredoxina. También, se identificaron proteínas relacionadas con el metabolismo de nucleótidos y transcripción, además, de nucleotidil transferasas, acetilo transferasas, timidilato kinasa, timidilato sintasa. Adicionalmente, fueron identificadas enzimas relacionadas con la modificación de ADN como la polinucleótido kinasa, y proteínas de unión al ARN. También fueron identificadas, dos marcos abiertos de lectura que codifican factores de transcripción tipo II para la unión al ADN. Por otro lado, se identificaron algunas enzimas para la lisis de las bacterias huésped como las hidrolasas, cuyas funciones son degradar la pared celular previo a la explosión de los fagos. Finalmente, se identificaron holinas, endolisinas y espaninas que cumplen igual función (Figs. N° 35 y N° 36).

Constitución genómica de vB_EcRAM-01



Total=294 genes

Figura 36. Distribución genómica de vB_EcRAM-01. El gráfico de pastel muestra la constitución de los genes dividido por estructura o función.

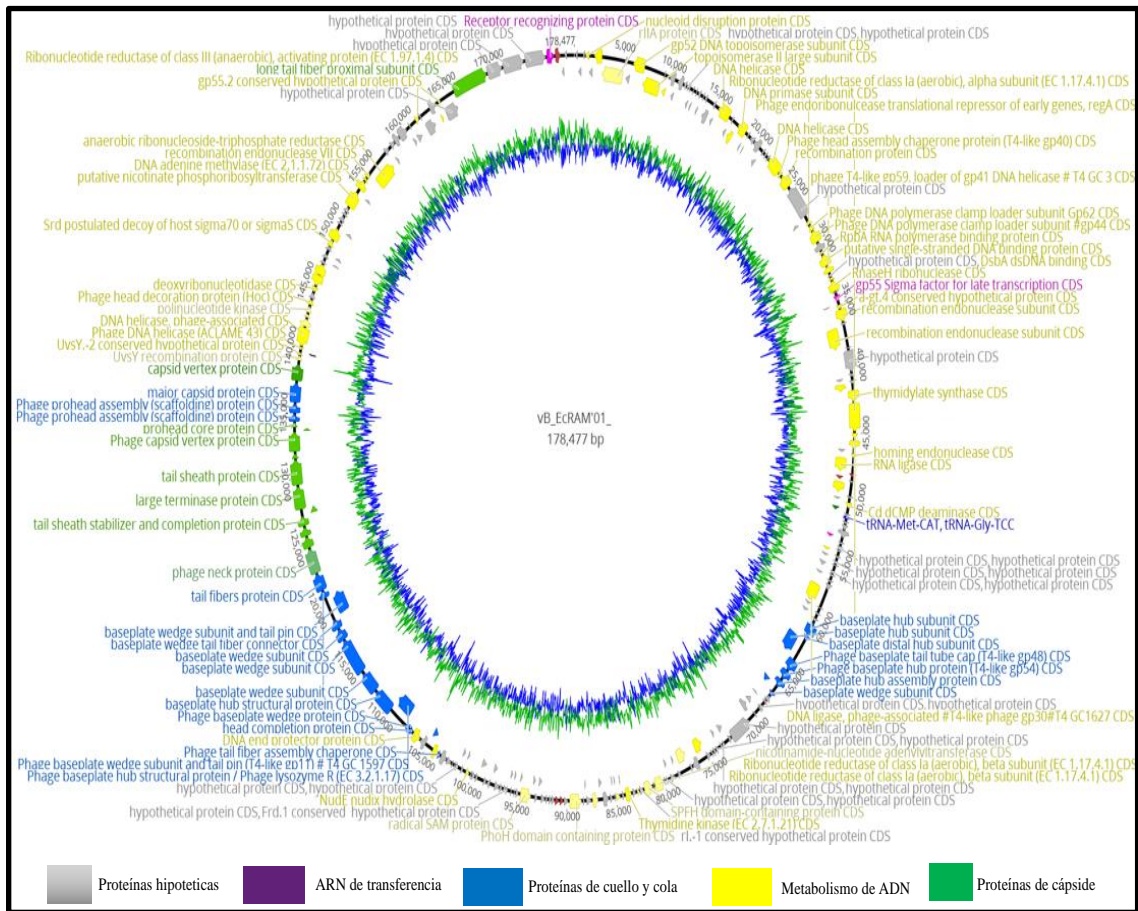


Figura 37. Mapa genómico de vB_EcRAM-01. Constituido por 294 genes codificantes de proteínas y 2 genes de ARNt se muestran en bloques de color. Las proteínas hipotéticas están de color gris, las proteínas codifican cápside están de color verde, cuello y cola (azul), metabolismo de ADN (amarillo) La dirección de la transcripción esta mostrado por las flechas. El contenido GC de la secuencia del genoma está indicado por el anillo verde azul mostrado en el diagrama interno. La anotación completa del genoma se encuentra en los anexos. Creado con Geneious software.

10.2.2 Taxonomía y Ciclo de Vida

En cuanto a taxonomía se determinó que mediante los análisis filogenéticos y de identidad de nucleótidos que el fago vB_EcRAM-01 pertenece al Dominio *Duplodnaviria*, Reino *Heunggongvirae*, Filo *Uroviricota*, Clase *Caudoviricetes*, Orden *Caudovirales*, Familia *Myoviridae* y Subfamilia *Tevenvirinae*. Su ciclo de vida según el servidor PhageAI v. 0.10 es de tipo lítico confirmado en un 99.52%.

10.2.3 Análisis genómico comparativo

El análisis comparativo mediante BLASTn del genoma completo de vB_EcRAM-01 contra los fagos que se encuentran en la base de datos de GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> accedida 30 de marzo de 2021) reveló que vB_EcRAM-01 tiene una alta cobertura e identidad con el fago Enterobacter phage EBPL (MT341500.1). En el análisis de Mauve, ambos fagos también comparten bloques colineales genes que comparten igual similitud entre un genoma y otro, y que poseen la mis-

ma longitud. El bloque colineal más largo tiene una secuencia parecida a pesar, de los arreglos genómicos En cambio, otros bloques mostraron muy baja similitud entre este y los otros fagos, ej. Cronobacter phage vB_CsaM_IeE ([NC_048646.1](#)), Cronobacter phage vB_CsaM_IeN ([KX431560.1](#)), Citrobacter phage Margaery ([KT381880.1](#)) y miembros myovirales de la subfamilia *Tevenvirinae* perteneciente a un género de virus tipo T4 (Fig. N° 37).

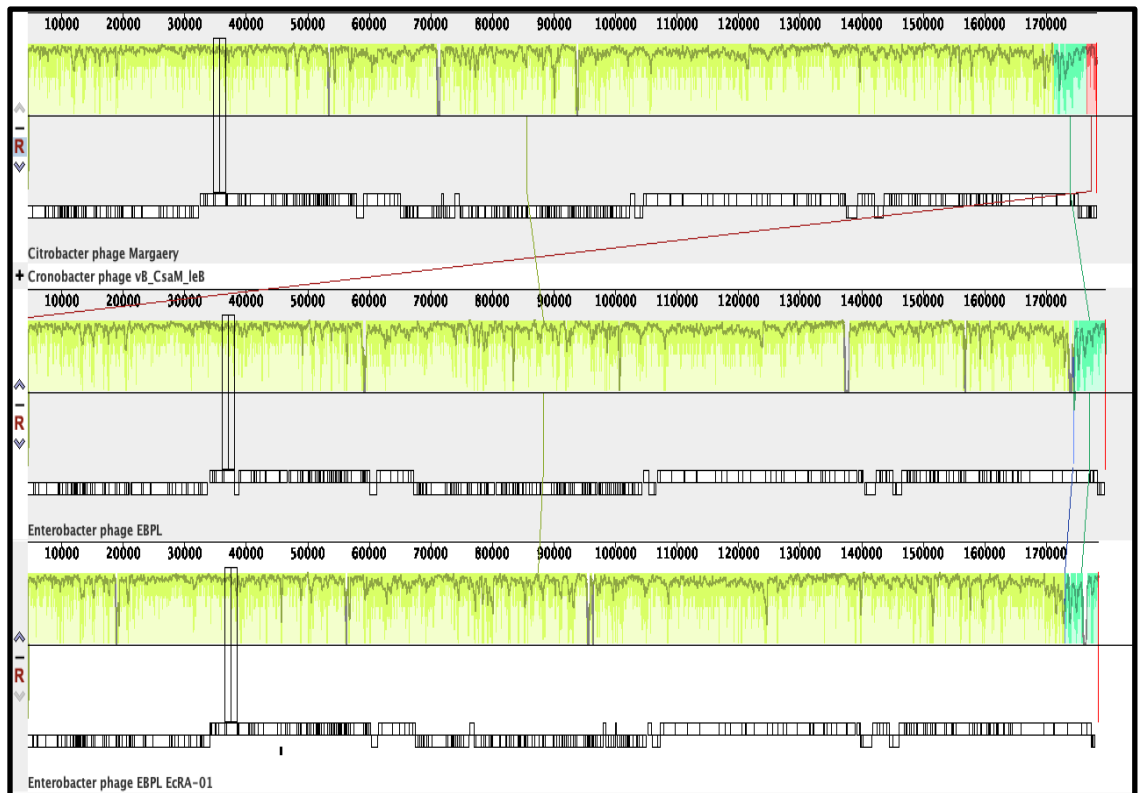


Figura 38. Múltiples alineamientos del fago vB_EcRAM-01 con fagos obtenidos de la plataforma NCBI usando el alineamiento progresivo de Mauve. El perfil de alta similitud (el cual se refleja de un color uniforme en gris) que posee vB_EcRAM-01 con Enterobacter phage EBPL y con el fago Margaery corresponde al nivel promedio de conservación en la región de la secuencia.

10.2.4 Ubicación geográfica

En cuanto al origen geográfico de estos fagos, se aislaron de 3 diferentes continentes: América (EE. UU. y Panamá), Europa (Irlanda), y Asia (Pakistán). Esto nos indica la amplia distribución geográfica de estos fagos. Proviene de diferentes fuentes para el aislamiento (aguas residuales, suelo, heces, entre otras). El tamaño del genoma de todos los fagos reportados es en promedio 179710pb en donde el genoma de fago ensamblado más pequeño corresponde a Citrobacter phage Margaery con 178182pb ([KT381880.1](#)) y el más grande corresponde a Cronobacter phage vB_CsaM_IeE ([NC_048646.1](#)) con 181570pb. De los genomas analizados se reveló que las cantidades de ARNt variaban entre 1 y 2 y las regiones codificantes oscilaron entre 250 a 300.

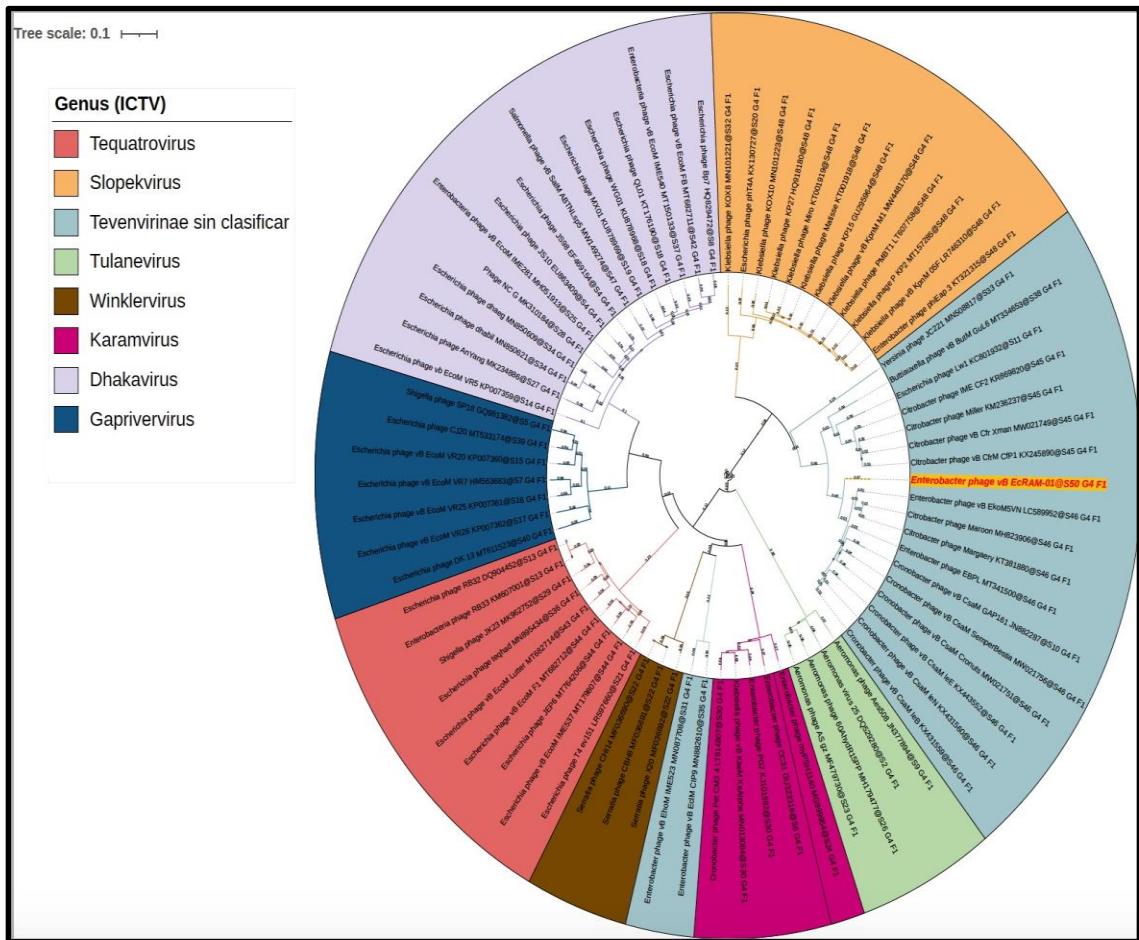


Figura 39. Relaciones filogenéticas de Enterobacter phage vB_EcRAM-01. Un árbol filogenético basado en las secuencias de genoma completo de las cepas de referencias fue generado por el método de filogenia a distancia del genoma en BLAST, usando la plataforma VICTOR. Se puede observar que las relaciones filogenéticas nos determinan que el Enterobacter phage vB_EcRAM-01 es una nueva especie de fago dentro de la subfamilia Tevenvirinae. El Árbol filogenético fue elaborado con el servidor iTOL y con modificaciones de la plataforma iTOL v6.0.

10.2.5 Análisis Filogenético y de identidad de nucleótidos

El análisis filogenético fue conducido con la plataforma de VICTOR y la personalización del árbol fue realizada con el servidor iTOL v6.0. Los árboles fueron construidos utilizando el método Genome BLAST Distance Phylogeny (GBDP) en los entornos recomendados para virus procarionticos. La Figura N° 38, muestra el árbol filogenético GBDP inferido usando la fórmula **D6** con un promedio de soporte de 31%, respectivamente. A escala de género, resultaron diez grupos y nueve grupos, respectivamente. El número de conglomerados determinados a nivel familiar fueron cinco y seis, respectivamente.

Se realizó un análisis de identidad de nucleótidos (ANI) utilizando pyani v0.2.10 (Pritchard *et al.*, 2015) utilizando los 25 genomas con mayor homología en la base de datos de GenBank. Los resultados se utilizaron para la elaboración de un mapa de calor, observándose que el fago vB_EcRAM-01 no comparte más del 95% de identidad de nu-

cleótidos con los genomas reportados, por lo que representa una nueva especie dentro de la subfamilia *Tevenvirinae* (Fig. N° 39).

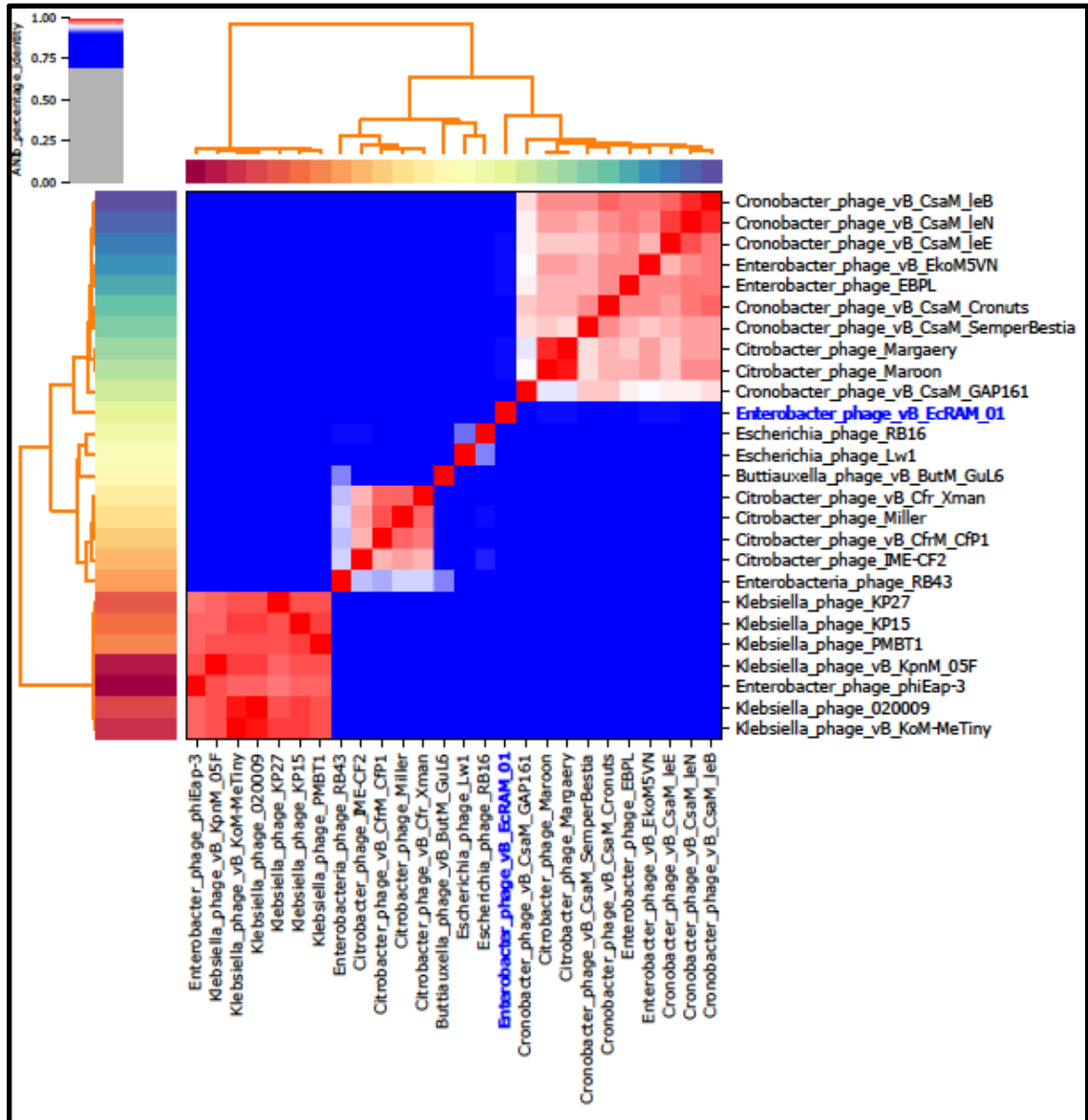


Figura 40. Análisis de identidad de nucleótidos de vB_EcRAM-01. Cada celda representa una comparación por pares entre los genomas nombrados en filas y columnas, y el color en la celda, representa el porcentaje de identidad de nucleótidos por pares de cada genoma por regiones alineadas en la comparación. Los dendrogramas son árboles de agrupación de un solo enlace generado a partir de la matriz de resultados de cobertura por pares. El esquema de color predeterminado colorea las celdas con identidad > 0.70 como azul, y aquellos con identidad de 0.90 hasta 1, en un rango de colores que va de blanco a rojo.

CAPÍTULO IV
DISCUSIÓN

DISCUSION

La fagoterapia es una alternativa prometedora comparada al uso de los antibióticos. Mientras que la publicación científica actual acerca del aislamiento se ha ido incrementando en los últimos años, solo un pequeño grupo de fagos se ha aplicado para el uso comercial (Abedon, 2017). Una de las principales razones de la falta de comercialización de los fagos es la insuficiente caracterización, la cual es un prerequisite para la fagoterapia (Abedon, 2017a). Estas caracterizaciones son necesarias para identificar y reducir los riesgos asociados con la terapia de fagos, los cuales cambiarán o apoyarán la aprobación regulatoria (Hyman y Abedon, 2019).

En Panamá, con relación a la evolución de la resistencia a nivel hospitalario se han identificado siete tipos de bacterias (ESKAPE) que se encontraban entre los ocho patógenos responsables del 80% de las infecciones reportadas: *S. aureus* (16%), *Enterococcus* spp. (14.4%), *E. coli* (12%), *Staphylococcus coagulasa negativa* (11%), *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* (8%), *P. aeruginosa* (8%) y *Enterobacter* spp. (5%). En ese estudio la resistencia a los antibióticos (piperacilina-tazobactam, cefalosporinas de 3 generación, sulfonamidas, nitrofuranos, carbapenémicos, entre otros) estaba presente en estos microorganismos (Moreno, 2018; MINSA, 2015).

Una de las principales preocupaciones con estas bacterias es su capacidad de contaminación y colonización de sitios que deberían permanecer estériles en los hospitales, causando graves enfermedades en los pacientes internados, principalmente en aquellos que se encuentran en la Unidad de Cuidados Intensivos (Soto, 2018; López, 2015).

Dentro de este grupo se encuentra *E. cloacae*, patógeno oportunista, que en conjunto con la *E. coli*, es una de las causas de muchas infecciones extraintestinales en los hospitales (Bornet, *et al.*, 2000; Brooks *et al.*, 2007). Esta bacteria representa casi un 100% de infecciones en diferentes sitios anatómicos. Estos microorganismos son difíciles de tratar debido, a sus múltiples mecanismos de resistencia (Madigan, 2012). Esta es la razón por la cual se eligió esta bacteria para este estudio.

Estas bacterias han ocasionado brotes infecciosos y provocado la muerte de varias personas en cuidados intensivos en todo el mundo, por lo que se les considera de alto riesgo y requieren de un control eficaz para su eliminación. Por ello es fundamental desarrollar esas técnicas de control (Ghosh *et al.*, 2019).

Los lugares elegidos para la recolección de muestras son similares a los reportados en la literatura, ya que regularmente para el aislamiento de bacteriófagos del ambiente se utilizan aguas residuales y establecimientos de manipulación y/o venta de alimentos (Leeuw *et al.*, 2017). En investigaciones previas se realizaron muestreos de diversos sitios como en la piel y heces de animales, manos de cuidadores, superficies quirúrgicas e instrumentos o utensilios usados en los establecimientos, hoteles y restaurantes (Yergeau *et al.*, 2016). También, los muestreos de aguas se pueden realizar en sitios cercanos a las salidas de drenaje de hospitales, siendo esto de gran importancia, porque donde hay bacterias posiblemente estén sus respectivos bacteriófagos (McShan y Nguyen, 2016; Mattila *et al.*, 2015; Tomat *et al.*, 2014). En esta investigación, se utilizó agua del Río abajo que

está contaminada por aguas residuales y aguas vertidas por diferentes industrias (Aghaei *et al.*, 2021).

Al realizar los ensayos de doble capa de agar para obtener los fagos, fue necesario tener un césped bacteriano uniforme entre dos capas de medio sólido, que puede ser agar-agar o agar agarosa (Sambrock y Rusell, 2001). En este trabajo, se realizó una técnica similar a lo sugerido por estos autores, pero con algunas modificaciones propias, empleando un volumen menor de agar y de agar blando, con el objetivo de abaratar costos y mejorar los resultados.

La mayoría de los fagos forman placas claras, típicas para los fagos líticos, mientras hay otras morfologías de placas turbias, que pueden indicar su capacidad de lisogenizar las células bacterianas. También, puede presentarse morfología de “ojo de buey”, es decir una mayor turbidez hacia las periferias de la placa. Esta morfología es consecuencia de la disminución de la eficacia de la actividad lítica causada por el envejecimiento de la monocapa de células bacterianas confluentes (Poxleitner *et al.*, 2017).

Además, pueden observarse halos, es decir, zonas semitransparentes alrededor de las placas. Los halos se originan por acción de enzimas solubles producidas por el fago que destruyen la envoltura celular. Mientras que en cuanto al tamaño de las placas depende del tamaño del fago, es decir, los fagos con cabezas más grandes tienden a formar placas más pequeñas en comparación con los fagos con cabezas más pequeñas. Esto es debido a que los viriones más grandes, se difunden más lentamente a través de la capa del top agar que los más pequeños (Poxleitner *et al.*, 2017).

Con el fin de desarrollar cócteles fágicos comerciales es necesario evaluar, entre otras cosas, la estabilidad de cada bacteriófago aislado en condiciones normales de almacenamiento. Para esto, en primera instancia, se llevaron a cabo ensayos de estrés ambiental como lo es la temperatura, luz UV, pH y el cloroformo, ya que, juegan roles importantes en la sobrevivencia de los fagos (Phothichaisri *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2014).

La temperatura también es un factor importante a la hora de aplicar un bacteriófago, ya que hay algunos que actúan mejor a temperaturas de refrigeración y otros que demuestran mayor efectividad con temperaturas más altas. De igual manera influye el tipo de alimento al cual se le está aplicando el bacteriófago ya que dependiendo de eso es la temperatura que se debe utilizar (Leiva Maripan, 2015).

La temperatura es un factor crucial para la sobrevivencia de los fagos y representa un rol vital en la adhesión, penetración, multiplicación y la longitud del periodo de latencia (en el caso de los fagos temperados). Con temperaturas más bajas de las óptimas, son pocos los fagos que pueden penetrar su material genético a las células huésped y temperaturas altas, pueden prolongar el periodo de latencia (Khawaja *et al.*, 2016).

El nivel de la reducción del título de los colifagos somáticos aislados en aguas residuales después de un tratamiento a 60 ° C y 1 h después, fue de 1.0 log, y a 80 ° C, fue de 2.5 log, (Ameh, 2016; Wong, 1994) a diferencia de lo observado en este trabajo, que se encontró la reducción del título a 70 ° C de 4 log y a 80 ° C, (Jończyk *et al.*, 2011) la población fue inhibida completamente (Lujan Capra, 2007). Se ha investigado el rol de los

puentes disulfuro en la protección de fagos contra la desnaturalización térmica. Por ejemplo, en el caso del fago PP7 de *Pseudomonas* empieza a desnaturalizarse después de calentarlo a 90 ° C durante 2 min, y pierde su estabilidad después de la adición de 1,4-ditiotreitol un agente reductor, el cual destruye los puentes de disulfuro entre los dímeros de proteínas con las cápsides (Caldeira y Peabody, 2011).

También, la temperatura es uno de los factores importantes que disminuye la infectividad de los fagos. Estudios han demostrado que las altas temperaturas (90 ° C) inactivan los fagos debido a la desnaturalización de las proteínas y de los ácidos nucleicos (Tomlinson, 2010; Larcom y Thaker, 1977), observando que los fagos *Myoviridae* drásticamente pierden viabilidad (3.5 log por UFP/mL, después de una incubación por 60 min (Ameh, 2016). Los resultados obtenidos en este trabajo, revelaron que vB_EcRAM-01 mostró su máxima estabilidad en un rango de temperatura entre 25-50°C, pero su mayor tasa de replicación fue a 37°C, similar a lo observado en los fagos *Myoviridae* (Litt y Jaroni, 2017; Yamaki *et al.*, 2015) pero diferente al fago EBP el cual es estable a temperaturas de 25 ° C, 37 ° C, 60 ° C y 80 ° C (Asif *et al.*, 2021). La temperatura puede influir en la eficiencia de los fagos y debió ser escogida cuidadosamente para su almacenamiento y utilización.

La luz UV representa una causa de muerte de los fagos que probablemente sea de importancia general en el entorno natural (Adams *et al.*, 1959). Se sabe que los rayos UV causan daños en el ADN y que son mutagénicos y letales, y que pueden alterar algunos enlaces peptídicos (Tomlinson, 2010; Larcom y Thaker, 1977; Greene y Babel, 1948). Los rayos UV son una de las principales causas de mortalidad de fagos en ambientes marinos, al menos cerca de la superficie (Regan *et al.*, 1992; Suttle y Chen, 1992) y presumiblemente en muchos otros ambientes que están expuestos a la luz solar.

EL pH es considerado para evaluar la efectividad de las aplicaciones con bacteriófagos ya que es posible que con ciertos cambios de pH se pierda un poco el efecto positivo. Es por ello que se necesita evaluar si es posible la aplicación de bacteriófagos específicos y en que rangos de pH pueden actuar de la forma más óptima posible (Leiva Maripan, 2015). Los ambientes ácidos afectan la infectividad de los fagos y se sugiere que esas condiciones resultan en la desnaturalización de las proteínas de los fagos y su consecuente pérdida de viabilidad (Hazem, 2002).

El pH influye en la adhesión a la pared bacteriana, la infectividad, la replicación y multiplicación de los fagos. Aunque estudios tempranos reflejan que un pH neutro favorece las condiciones de almacenaje a largo plazo de los fagos con cola, en este estudio la más alta habilidad de infección singular en varios valores de pH entre 5-10, indicando claramente que podría ser estable en el cuerpo humano. Estos resultados son parecidos a los obtenidos con el fago MJ2 (Jamal *et al.*, 2019). De los resultados observados en este trabajo, se puede observar que la eficiencia de los fagos no debe ser afectada ni por condiciones de almacenaje, ni por del pH del cuerpo humano.

La estabilidad de los fagos en diferentes solventes orgánicos es principalmente dependiente de la estabilidad de las proteínas la cual está influenciada por la habilidad o fortaleza de estos solventes para destruir las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. Esta competencia entre estabilización y desestabilización existe debido a la exposición a los solventes orgánicos (Ackermann, 2009b).

La sensibilidad de los fagos a través de diferentes solventes orgánicos (cloroformo) es otro factor importante. El vB_EcRAM-01 es un fago con sensibilidad mediada al cloroformo. Este solvente orgánico es utilizado como parte de los tratamientos de esterilización y conservación de los fagos, lo que hay que tener en cuenta si los fagos serán utilizados para diferentes preparaciones terapéuticas o como biocontroles, en donde estos solventes podrían estar involucrados. Sin embargo, existen fagos cuya envoltura posee lípidos en su estructura, siendo estos fagos sensibles al cloroformo o en una suspensión expuesta a este compuesto, puede reducirse significativamente su título. Además, a pesar de que los fagos poseen cola, normalmente no presentan lípidos en la estructura de su envoltura proteica. Aproximadamente un tercio de los fagos con cola y ausencia de lípidos, son sensibles al cloroformo, lo que nos indica que el fago vB_EcRAM-01 aislado en este trabajo, podría pertenecer en este grupo (Ackermann, 2009b).

Durante el aislamiento, purificación y preparación de stocks de fagos ciertos solventes químicos como el cloroformo, son incorporados al medio de cultivo para eliminar la contaminación bacteriana (Cotton y Lockingen, 1963). El vB_EcRAM-01 presenta inestabilidad en concentraciones o títulos bajos (1×10^{-1} , 1×10^{-2} y 1×10^{-3} UFP/mL) en comparación con las concentraciones de 1×10^{-4} UFP/mL, lo que nos indica que en preparaciones que se utilice cloroformo tanto para fagoterapia como en control biológico, se debe usar este fago a una concentración mínima de 1×10^{-4} UFP/mL.

Uno de los objetivos de este estudio, fue determinar la especificidad del fago (Rango de huésped) a diferentes aislados del Complejo *E. cloacae*, con la expectativa de que el vB_EcRAM-01 pudiera tener un amplio tropismo a otras especies bacterianas debido a la presencia o ausencia de moléculas receptoras o mecanismos de restricción intracelular. Sin embargo, esta fue muy estrecha porque solo fue sensible a su bacteria huésped. Esto coincide con los hallazgos del fago TSE1, TSE2, TSE3 (Khawaja *et al.*, 2016). Con alguna excepción *E. coli*, la cual resultó ligeramente sensible, pero no evidenció una lisis total o parcial, ya que, si la lisis hubiera sido total, podría considerarse que ambas bacterias reconocen estructuras idénticas o similares como receptores en su bacteria huésped. Otra razón podría deberse a condiciones fisiológicas particulares de cada cepa como el estrés bacteriano, presencia de mecanismos de resistencia o falta de receptores específicos en la superficie celular.

Está bien establecido que la estructura y composición de la superficie de la célula bacteriana se encuentra en un estado dinámico de flujo. El primer paso de la infección por los fagos requiere el reconocimiento de un receptor de superficie específico. Sin embargo, no se comprende bien como los cambios en la fisiología del hospedero pueden afectar la susceptibilidad de las células a la infección por fagos. (López Cuevas, 2011). Una razón podría deberse a condiciones fisiológicas particulares de cada cepa (estrés bacteriano,

presencia de mecanismos de resistencia o falta de receptores específicos en la superficie celular) (Khawaja *et al.*, 2016).

Se ha sugerido que la capacidad de los fagos para infectar diferentes cepas bacterianas es una herramienta de adaptación para la supervivencia (Khawaja *et al.*, 2016; Holmfeldt *et al.*, 2007). Esta diferencia radica en la variación de estructuras proteicas capsulares, las cuales actúan como sitio de reconocimiento de los fagos.

El hecho de que muchos fagos tienen un rango de hospedero estrecho, resulta útil para desarrollar métodos de fago tipificación bacteriana, como lo reportado en otras bacterias como *V. fluvialis*, donde se aislaron 6 fagos estables para el rastreo de las fuentes y vías de infección en los brotes originados por esta bacteria en el hombre (Lopez Cuevas, 2011), lo que se sugiere que se puede hacer con el fago vB_ECRAM-01. Los fagos que poseen un rango de huésped estrecho podrían también tener la desventaja para su aplicación en la fagoterapia, ya que un solo fago podría no ser efectivo contra todos los aislamientos (Vinod *et al.*, 2006) y así como, cuando se usa un solo fago para controlar a su bacteria huésped, podría ocurrir la aparición de resistencia al fago por parte de la bacteria (Phumkhachorn y Rattanachaikunsopon, 2010). Es por ello, que el fago vB_EcRAM-01 podría ser empleado en un coctel de fagos, junto con otros fagos aislados y caracterizados con características similares del vB_ECRAM-01. Cabe señalar, que este fago requiere ser enfrentado contra otros aislamientos incluyendo ambientales del Complejo *E. cloacae*, para poder determinar su rango real de hospederos para su aplicación en fagoterapia (Flores Dominick, 2017).

La naturaleza genómica del vB_EcRAM-01 fue determinada por los ensayos con ADNasa y ARNasa. Previamente, en el marco teórico se mencionó que cerca del 95% de las familias de los bacteriófagos consta de ADN, una característica del Orden de los *Caudovirales* (Ackermann, 2009b).

La aplicación terapéutica por cualquier vía, por ejemplo, oral aparte de cumplir con los requerimientos de inocuidad de la flora normal, implica el uso de fagos totalmente líticos, y no portar genes indeseables factores de virulencia o genes de resistencia a antibióticos (Soohey, 2017). El análisis molecular del fago vB_EcRAM-01 permitió comprobar que es un fago lítico estricto, ya que posee genes que codifican holinas y endolisinas, y, además, no se encontraron genes asociados a lisogenia como las integrasas, transposasas, o excisionasas (Ríos-Sandoval, 2019).

En cuanto a las relaciones filogenéticas, es un miofago tipo T4 de 178477pb. Los tamaños del genoma que se encuentran aquí reportados para la familia Moviridae, para la cual hay una amplia gama de tamaños que oscilan desde 50,000 a 150,000pb (Barron-Montenegro *et al.*, 2021), ADN bicatenario circular, haciéndolo parte de la gran mayoría de los fagos de esta clase de ácidos nucleicos. Sin embargo, hay que confirmar la morfología mediante microscopía electrónica. Según los análisis *in silico*, nos damos cuenta de que es un virus del Orden *Caudovirales*, familia *Myoviridae*, subfamilia *Tevenvirinae* los cuales son virus de ADN, de doble cadena lineal no envueltos de estructura de cabezocolas, típicas de los fagos T4 (Ríos-Sandoval, 2019).

Los fagos han sido asociados con la transferencia horizontal de genes (Quiroz, 2018) Sin embargo, es imperativo que cualquier fago considerado para la terapia sean investigados, por su potencial de transducción y lisogenia. Con la búsqueda de secuencias homólogas en la base de datos de GeneBank, se encontró el 92% de homología de secuencia con el miofago EBPL, el cual infecta *E. cloacae* (Asif *et al.*, 2021).

Por las características genotípicas (Hatfull, 2008), el vB_EcRAM-01 es un fago perteneciente a la familia *Myoviridae* al igual que el fago EBP (Asif *et al.*, 2021). El vB_EcRAM-01 Se le denominó de esta manera porque es un *virus que infecta bacterias*, aislado en aguas del Rio Abajo que inhibe a *E. cloacae*, que es un miofago y el aislamiento sería el número uno, según los descrito en las normas informales de nomenclatura de fagos (Adriaenssens y Brister, 2017).

El análisis de la sintenia del genoma en este estudio reveló que ambos fagos comparten re-arreglos similares, pero con ligeras diferencias en la secuencia de nucleótidos. Adicionalmente, el análisis filogenético usando las secuencias del genoma completo, sugiere que ambos fagos pudieron divergir de un ancestro en común, pero desde entonces, han sufrido múltiples eventos de sustitución de nucleótidos (Leskinen *et al.*, 2016) Dado que el EBPL se describió previamente como un fago singleton en el árbol filogenético del miofago (Jacquemot *et al.*, 2018), los análisis filogenéticos y de identidad de nucleótidos indicaron que el vB_EcRAM-01 podría representar una especie e incluso un genero nuevo no reportada hasta el momento, por lo cual se ha sometido a la valoración del Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV: por sus siglas en inglés), a fin de que sea revisado y confirmado como una nueva especie.

Es esencial para el análisis de la interacción virus-huésped, la identificación de las proteínas/genes involucrados en la infección del virus. En el presente estudio, con fundamentos en los resultados del SDS-PAGE y sumado a la predicción y anotación de genes, no se pudo dilucidar las posibles funciones metabólicas de las proteínas encontradas en el vB_EcRAM-01. Esto puede deberse a la baja concentración de las partículas virales y también a la concentración del gel de poliacrilamida. Existen un gran número de secuencias de proteínas en las bases de datos no caracterizadas, y más del 20% de los dominios de las proteínas son anotados como dominios de función desconocidas o proteínas hipotéticas (Abril *et al.*, 2021). Para lograr esto, se requieren otras tecnologías más robustas y finas para encontrar posibles funciones, como lo es la espectrometría de masas y microscopía electrónica (Lavigne *et al.*, 2009). Estos métodos nos permiten identificar y caracterizar estas proteínas y su actividad.

Por lo tanto, tanto biológica como molecularmente vB_EcRAM-01 es un fago lítico con amplio rango de estabilidad térmica y de pH. Sin embargo, con un rango de huésped estrecho. Posee una buena actividad lítica contra el Complejo *E. cloacae*, no obstante, se considera que, para una erradicación mas eficiente, se requiere del aislamiento.

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES Y
RECOMENDACIONES

11 Conclusiones:

1. **Se logró aislar y caracterizar un bacteriófago** proveniente de las aguas residuales del Río Abajo, con actividad antimicrobiana frente a bacterias del Complejo *E. cloacae*.
2. **Se determinó la concentración de bacteriófagos** en un stock purificado proveniente de una muestra de aguas residuales a una concentración elevada.
3. Biológicamente, **el vB_EcRAM-01 posee una estrecha especificidad contra el Complejo *E. cloacae***. Estas características junto con la especificidad del huésped, las relaciones genéticas de este género y ante la ausencia de genes de lisogenia, hace que el vB_EcRAM-01 sea un excelente candidato potencial para aplicaciones clínicas o fagoterapia, así como posible agente descontaminante como biocontrol.
4. Se evaluó el rango de hospedero de los bacteriófagos purificados contra otras cepas bacterianas, determinándose que **posee actividad antimicrobiana contra las cepas ensayadas en este estudio del Complejo *E. cloacae***.
5. En este trabajo identificamos un bacteriófago lítico. La caracterización ayudó a ampliar los conocimientos de este nuevo fago y el análisis molecular mediante la **secuenciación de nueva generación** demostró que el vB_EcRAM-01 es un miembro de la familia *Myoviridae*, mientras que el análisis filogenético descrito previamente, confirma que es un nuevo miembro de la subfamilia *Tevenvirinae*.

Recomendaciones

1. Se recomienda proceder con la caracterización biológica, **molecular y análisis por genómica comparativa**, de los otros 2 fagos que fueron aislados, pero no fueron caracterizados.
2. La caracterización morfológica de los fagos mediante microscopia electrónica es de gran importancia y debe realizarse.
3. Se recomienda realizar la **caracterización proteómica** a fondo mediante la **espectrometría de masas MALDI-TOF** (*Matrix assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry*), **Zimografía, cinética enzimática, actividad proteolítica, crio microscopia electrónica** a fin de determinar experimentalmente funciones adicionales a las proteínas hipotéticas pendientes de determinar función.
4. Al tener los fagos ya caracterizados, tanto biológica como molecularmente, se recomienda la **preparación magistral de cócteles**, y los ensayos en “modelos *in vivo*” en animales previamente infectados con cepas del complejo *E. cloacae* y son necesarios y así, probar su efectividad y eficacia en estos modelos.
5. **Afianzar los conocimientos en biología computacional y genómica comparativa y estructural de los bacteriófagos.**

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abedon, Stephen T., ed. 2008. *Bacteriophage Ecology: Population Growth, Evolution, and Impact of Bacterial Viruses*. 1. ed. Advances in Molecular and Cellular Microbiology 15. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
- . 2017a. “Information Phage Therapy Research Should Report.” *Pharmaceuticals* 10 (4): 43. <https://doi.org/10.3390/ph10020043>.
- . 2017b. “Bacteriophage Clinical Use as Antibacterial ‘Drugs’: Utility and Precedent.” *Microbiology Spectrum* 5 (4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAD-0003-2016>.
- Abril, Ana G., Mónica Carrera, Karola Böhme, Jorge Barros-Velázquez, Benito Cañas, José-Luis R. Rama, Tomás G. Villa, and Pilar Calo-Mata. 2021. “Proteomic Characterization of Bacteriophage Peptides from the Mastitis Producer *Staphylococcus Aureus* by LC-ESI-MS/MS and the Bacteriophage Phylogenomic Analysis.” *Foods* 10 (4): 799. <https://doi.org/10.3390/foods10040799>.
- Acevedo, Maureen. 2009. “Análisis Microbiológico del Agua en el Rio Juan Díaz Distrito de Panamá.” Panama: Universidad de Panama.
- Ackermann, Hans-W. 2009a. “Basic Phage Electron Microscopy.” In *Bacteriophages*, edited by Martha R.J. Clokie and Andrew M. Kropinski, 501:113–26. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_12.
- . 2009b. “Phage Classification and Characterization.” *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 501: 127–40. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_13.
- Ackermann, Hans-W., and Kenneth L. Tiekotter. 2012. “Murphy’s Law—If Anything Can Go Wrong, It Will: Problems in Phage Electron Microscopy.” *Bacteriophage* 2 (2): 122–29. <https://doi.org/10.4161/bact.20693>.
- Adams, Mark H, E. S Anderson, and E Kellenberger. 1959. *Bacteriophages*. New York: Interscience Publishers.
- Adriaenssens, Evelien, and J. Rodney Brister. 2017. “How to Name and Classify Your Phage: An Informal Guide.” *Viruses* 9 (4): 70. <https://doi.org/10.3390/v9040070>.
- Adriaenssens, Evelien M., Matthew B. Sullivan, Petar Knezevic, Leonardo J. van Zyl, B. L. Sarkar, Bas E. Dutilh, Poliane Alfenas-Zerbini, et al. 2020. “Taxonomy of Prokaryotic Viruses: 2018-2019update from the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee.” *Archives of Virology* 165 (5): 1253–60. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04577-8>.
- Aghaee, Bahareh Lashtoo, Mohammadali Khan Mirzaei, Mohammad Yousef Alikhani, and Ali Mojtahedi. 2021. “Sewage and Sewage-Contaminated Environments Are the Most Prominent Sources to Isolate Phages against *Pseudomonas Aeruginosa*.” *BMC Microbiology* 21 (1): 132. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02197-z>.
- Ameh, Ekwu Mark. 2016. “The Use Of Bacteriophages As Natural Biocontrol Agents Against Bacterial Pathogens,” 169.
- Asif, Muhammad, Hafsa Naseem, Iqbal Ahmad Alvi, Abdul Basit, and Shafiq-ur- Rehman. 2021. “Characterization of a Lytic EBP Bacteriophage with Large Size Genome against *Enterobacter Cloacae*.” *APMIS* 129 (8): 461–69. <https://doi.org/10.1111/apm.13138>.

- Aziz, Ramy K., Daniela Bartels, Aaron A. Best, Matthew DeJongh, Terrence Disz, Robert A. Edwards, Kevin Formsma, et al. 2008. "The RAST Server: Rapid Annotations Using Subsystems Technology." *BMC Genomics* 9 (February): 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.
- Banaiee, N., M. Bobadilla-Del-Valle, S. Bardarov, P. F. Riska, P. M. Small, A. Ponce-De-Leon, W. R. Jacobs, G. F. Hatfull, and J. Sifuentes-Osornio. 2001. "Luciferase Reporter Mycobacteriophages for Detection, Identification, and Antibiotic Susceptibility Testing of Mycobacterium Tuberculosis in Mexico." *Journal of Clinical Microbiology* 39 (11): 3883–88. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.3883-3888.2001>.
- Bankevich, Anton, Sergey Nurk, Dmitry Antipov, Alexey A. Gurevich, Mikhail Dvorkin, Alexander S. Kulikov, Valery M. Lesin, et al. 2012. "SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing." *Journal of Computational Biology* 19 (5): 455–77. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
- Barderas, Rodrigo, and Elena Benito-Peña. 2019. "The 2018 Nobel Prize in Chemistry: Phage Display of Peptides and Antibodies." *Analytical and Bioanalytical Chemistry Volume*, 2019.
- Barron-Montenegro, Rocío, Rodrigo García, Fernando Dueñas, Dácil Rivera, Andrés Opazo-Capurro, Stephen Erickson, and Andrea I. Moreno-Switt. 2021. "Comparative Analysis of Felixounavirus Genomes Including Two New Members of the Genus That Infect Salmonella Infantis." *Antibiotics* 10 (7): 806. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10070806>.
- Barrow, P. A., and J. S. Soothill. 1997. "Bacteriophage Therapy and Prophylaxis: Rediscovery and Renewed Assessment of Potential." *Trends in Microbiology* 5 (7): 268–71. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(97\)01054-8](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)01054-8).
- Basdew, Iona H., and Mark D. Laing. 2014. "Stress Sensitivity Assays of Bacteriophages Associated with Staphylococcus Aureus, Causal Organism of Bovine Mastitis." *African Journal of Microbiology Research* 8 (2): 200–210. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5877>.
- Berg, Jeremy, John Tymoczko, and Lubert Stryr. 2003. *Biochemistry*. 5th ed. WH Freeman & Co.
- Berkner, Silvia, Sabine Konradi, and Jens Schönfeld. 2014. "Antibiotic Resistance and the Environment—There and Back Again." *EMBO Reports* 15 (7): 740–44. <https://doi.org/10.15252/embr.201438978>.
- Besemer, John, Alexandre Lomsadze, and Mark Borodovsky. 2001. "GeneMarkS: A Self-Training Method for Prediction of Gene Starts in Microbial Genomes. Implications for Finding Sequence Motifs in Regulatory Regions." *Nucleic Acids Research* 29 (12): 2607–18. <https://doi.org/10.1093/nar/29.12.2607>.
- Bornet, C., A. Davin-Regli, C. Bosi, J. M. Pages, and C. Bollet. 2000. "Imipenem Resistance of Enterobacter Aerogenes Mediated by Outer Membrane Permeability." *Journal of Clinical Microbiology* 38 (3): 1048–52.
- Borysowski, Jan, Beata Weber-Dabrowska, and Andrzej Górski. 2006. "Bacteriophage Endolysins as a Novel Class of Antibacterial Agents." *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 231 (4): 366–77. <https://doi.org/10.1177/153537020623100402>.
- Bose, M, and Robert D Barber. 2006. "Prophage Finder: A Prophage Loci Prediction Tool for Prokaryotic Genome Sequences." *In Silico Biology*, 2006.
- Botstein, David. 1980. "A Theory Of Modular Evolution For Bacteriophages." *Annals of the*

- New York Academy of Sciences* 354 (1 Genetic Varia): 484–91. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1980.tb27987.x>.
- Breitbart, Mya, Jon H Miyake, and Forest Rohwer. 2004. “Global Distribution of Nearly Identical Phage-Encoded DNA Sequences.” *FEMS Microbiology Letters* 236 (2): 249–56. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09654.x>.
- Brettin, Thomas, James J. Davis, Terry Disz, Robert A. Edwards, Svetlana Gerdes, Gary J. Olsen, Robert Olson, et al. 2015. “RASTtk: A Modular and Extensible Implementation of the RAST Algorithm for Building Custom Annotation Pipelines and Annotating Batches of Genomes.” *Scientific Reports* 5 (February): 8365. <https://doi.org/10.1038/srep08365>.
- Brown, Maryury. 2018. “Bacteriófagos En El Cuerpo Humano.” Barcelona: Universitat de Barcelona.
- Brussow, Harald, and Frank Desiere. 2001. “Comparative Phage Genomics and the Evolution of Siphoviridae: Insights from Dairy Phages.” *Molecular Microbiology* 39 (2): 213–23. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02228.x>.
- Bruttin, Anne, and Harald Brüssow. 2005. “Human Volunteers Receiving Escherichia Coli Phage T4 Orally: A Safety Test of Phage Therapy.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (7): 2874–78. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2874-2878.2005>.
- Caldeira, Jerri C., and David S. Peabody. 2011. “Thermal Stability of RNA Phage Virus-Like Particles Displaying Foreign Peptides | Journal of Nanobiotechnology | Full Text.” *Journal of Nanobiotechnology*, 2011.
- Casto, Allie, Adam Hurwitz, Kunny Kou, Gregory Mansour, Rachel Policke, Alexander Schmidt, Rowan Shartel, Augustus Snyder, and Allison Woolf. 2016. “Bacteriophages: The Answer to Antibiotic Resistance?” *James Madison Undergraduate Research Journal*, 2016.
- CDC. 2013. “Antibiotics Resistance Threats 2013.” 2013. <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.
- Chan, Patricia P., and Todd M. Lowe. 2019. “TRNAscan-SE: Searching for tRNA Genes in Genomic Sequences.” *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1962: 1–14. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0_1.
- Cisternas, Osvaldo. 2016. “Mecanismos de Acción de La Resistencia Bacteriana.” *Tecnomedica* 11 (1): 1–10.
- Clokie, Martha R. J., and Andrew M. Kropinski, eds. 2009. *Bacteriophages: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology, v. 501-502. New York: Humana Press.
- Clokie, Martha RJ, Andrew D Millard, Andrey V Letarov, and Shaun Heaphy. 2011. “Phages in Nature.” *Bacteriophage* 1 (1): 31–45. <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14942>.
- Colom, Joan. 2016. “Studies of The Molecular Features of Three Salmonella Phages for Use in Phage Therapy and of Encapsulation Methodologies to Improve Oral Phage Administration.” Barcelona: Universitat Autòma de Barcelona.
- Cotton, I. M., and L. S. Lockingen. 1963. “Inactivation of Bacteriophage by Chloroform and X Irradiation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 50 (2). <https://doi.org/10.1073/pnas.50.2.363>.
- Darling, Aaron C. E., Bob Mau, Frederick R. Blattner, and Nicole T. Perna. 2004. “Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements.” *Genome Research* 14 (7): 1394–1403. <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>.
- Davidson, Andrew J. 2020. “Virus Taxonomy: The ICTV Report on Virus Classification and

- Taxon Nomenclature.” *Journal of General Virology*. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/.
- Davin-Regli, Anne, Jean-Philippe Lavigne, and Jean-Marie Pagès. 2019. “Enterobacter Spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance.” *Clinical Microbiology Reviews* 32 (4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-19>.
- Davis, James J, Alice R Wattam, Ramy K Aziz, Thomas Brettin, Ralph Butler, Rory M Butler, Philippe Chlenski, et al. 2020. “The PATRIC Bioinformatics Resource Center: Expanding Data and Analysis Capabilities.” *Nucleic Acids Research* 48 (D1): D606–12. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz943>.
- De la Guardia, Carolina. 2018. “Identification of Novel Antiviral Synthetic Compounds against Dengue Virus.” Panama: Acharya Nagarjuna University.
- Delcher, Arthur L., Kirsten A. Bratke, Edwin C. Powers, and Steven L. Salzberg. 2007. “Identifying Bacterial Genes and Endosymbiont DNA with Glimmer.” *Bioinformatics (Oxford, England)* 23 (6): 673–79. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm009>.
- Dini, Cecilia. 2011. “Aislamiento y Caracterización Molecular de Bacteriófagos de Bacterias Enteropatógenas Para Biocontrol de Enfermedades Transmitidas Por Alimentos (ETA).” La Plata Uruguay: Universidad Nacional de La Plata.
- Donado-Godoy, Pilar, Barbara A. Byrne, Maribel León, Ricardo Castellanos, Consuelo Vanegas, Adriana Coral, Alejandra Arevalo, et al. 2015. “Prevalence, Resistance Patterns, and Risk Factors for Antimicrobial Resistance in Bacteria from Retail Chicken Meat in Colombia.” *Journal of Food Protection* 78 (4): 751–59. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-349>.
- Erez, Zohar, Ida Steinberger-Levy, Maya Shamir, Shany Doron, Avigail Stokar-Avihail, Yoav Peleg, Sarah Melamed, et al. 2017. “Communication between Viruses Guides Lysis–Lysogeny Decisions.” *Nature* 541 (7638): 488–93. <https://doi.org/10.1038/nature21049>.
- Farris, James S. 1972. “Estimating Phylogenetic Trees from Distance Matrices.” *The American Naturalist* 106 (951): 645–68.
- Feiner, Ron, Tal Argov, Lev Rabinovich, Nadejda Sigal, Ilya Borovok, and Anat A. Herskovits. 2015. “A New Perspective on Lysogeny: Prophages as Active Regulatory Switches of Bacteria.” *Nature Reviews Microbiology* 13 (September): 641.
- Finn, Robert D., Jody Clements, William Arndt, Benjamin L. Miller, Travis J. Wheeler, Fabian Schreiber, Alex Bateman, and Sean R. Eddy. 2015. “HMMER Web Server: 2015 Update.” *Nucleic Acids Research* 43 (W1): W30–38. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv397>.
- Flores Dominick, Violeta de Jesús. 2017. “Aislamiento y Caracterización de Un Bacteriófago Con Actividad Lítica Para Vibrio Fluvialis.” Lima – Perú: UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS. https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/7007/Flores_dv.pdf?sequence=1.
- Flores, Violeta. 2017. “Caracterización de bacteriófagos líticos de Salmonella enterica aislados de muestras de pollos.” Lima Peru: Universidad Mayor San Marcos.
- Fouts, Derrick E. 2006. “Phage_Finder: Automated Identification and Classification of Prophage Regions in Complete Bacterial Genome Sequences.” *Nucleic Acids Research* 34 (20): 5839–51. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl732>.
- Gabler, Felix, Seung-Zin Nam, Sebastian Till, Milot Mirdita, Martin Steinegger, Johannes Söding, Andrei N. Lupas, and Vikram Alva. 2020. “Protein Sequence Analysis Using the

- MPI Bioinformatics Toolkit.” *Current Protocols in Bioinformatics* 72 (1): e108. <https://doi.org/10.1002/cpbi.108>.
- Garcia-Salazar, Ivonne, and Mauricio Porras. 2018. “Aislamiento de Bacteriófagos de *Pseudomonas Aeruginosa* Multidrogo – Resistente En Aguas de Tres Ríos de La Provincia de Lima-Perú.” Lima Peru: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Gaviria A, Gabriel, María González de S, and Jhon Castaño O. 2012. “Técnica para aislamiento de bacteriófagos específicos para *E.coli* DH5 α a partir de aguas residuales.” *Revista MVZ Córdoba* 17 (1): 2852. <https://doi.org/10.21897/rmvz.253>.
- Ghosh, Chandradhish, Paramita Sarkar, Rahaf Issa, and Jayanta Haldar. 2019. “Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance.” *Trends in Microbiology* 27 (4): 323–38. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.12.010>.
- Giuseppe Aprea, Anna Rita D’Angelo, Vincenza Annunziata Prencipe, and Giacomo Migliorati. 2015. “Bacteriophage Morphological Characterization by Using Transmission Electron Microscopy.” *Journal of Life Sciences* 10 (5). <https://doi.org/10.17265/1934-7391/2015.05.004>.
- Golkar, Zhabiz. 2013. “Experimental Phage Therapy on Multiple Drug Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Infection in Mice.” *Journal of Antivirals & Antiretrovirals* 05 (06). <https://doi.org/10.4172/jaa.S10-005>.
- Gómez P., María Catalina, and Martha Josefina Vives Flórez. 2009. “Bacteriófagos - virus de bacterias que curan infecciones.” Bogota Colombia: UNiversidad de los Andes. <https://repositorio.uniandes.edu.co/handle/1992/4765>.
- Gorski, Andrzej, Krystyna Dabrowska, Kinga Switala-Jeleń, Maria Nowaczyk, Beata Weber-Dabrowska, Janusz Boratynski, Joanna Wietrzyk, and Adam Opolski. 2003. “New Insights into the Possible Role of Bacteriophages in Host Defense and Disease.” *Medical Immunology* 2 (February): 2. <https://doi.org/10.1186/1476-9433-2-2>.
- Greene, G.I., and F.J. Babel. 1948. “Effect of Ultraviolet Irradiation on Bacteriophage Active against *Streptococcus Lactis* | Elsevier Enhanced Reader.” *Journal of Dairy Science*, June 1948. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(48\)92234-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(48)92234-6).
- Hassan, Ahmad Y., Janet T. Lin, Nicole Ricker, and Hany Anany. 2021. “The Age of Phage: Friend or Foe in the New Dawn of Therapeutic and Biocontrol Applications?” *Pharmaceuticals* 14 (3): 199. <https://doi.org/10.3390/ph14030199>.
- Hatfull, Graham F. 2008. “Bacteriophage Genomics.” *Current Opinion in Microbiology* 11 (5): 447–53. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.004>.
- Häusler, Thomas. 2006. *Viruses vs. Superbugs*. Vol. 1. London: Palgrave Macmillan UK. <https://doi.org/10.1007/978-0-230-55228-9>.
- Hazem, A. 2002. “Effects of Temperatures, PH-Values, Ultra-Violet Light, Ethanol and Chloroform on the Growth of Isolated Thermophilic *Bacillus* Phages.” *The New Microbiologica* 25 (4): 469–76.
- Hendrix, Roger W. 2003. “Bacteriophage Genomics.” *Current Opinion in Microbiology* 6 (5): 506–11. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.09.004>.
- Hildebrand, Andrea, Michael Remmert, Andreas Biegert, and Johannes Söding. 2009. “Fast and Accurate Automatic Structure Prediction with HHpred.” *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 77 (S9): 128–32. <https://doi.org/10.1002/prot.22499>.
- Hofmann, Paul, and Zaid Tashman. 2020. “Hidden Markov Models and Their Application for Predicting Failure Events.” In *Computational Science – ICCS 2020*, edited by Valeria V.

- Krzyszczanovskaya, Gábor Závodszy, Michael H. Lees, Jack J. Dongarra, Peter M. A. Sloat, Sérgio Brissos, and João Teixeira, 464–77. *Lecture Notes in Computer Science*. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-50420-5_35.
- Holmfeldt, Karin, Mathias Middelboe, Ole Nybroe, and Lasse Riemann. 2007. “Large Variabilities in Host Strain Susceptibility and Phage Host Range Govern Interactions between Lytic Marine Phages and Their Flavobacterium Hosts.” *Applied and Environmental Microbiology* 73 (21): 6730–39. <https://doi.org/10.1128/AEM.01399-07>.
- Howard, Aoife, Michael O’Donoghue, Audrey Feeney, and Roy D. Sleator. 2012. “Acinetobacter Baumannii: An Emerging Opportunistic Pathogen.” *Virulence* 3 (3): 243–50. <https://doi.org/10.4161/viru.19700>.
- Howell, W. Lee, World Economic Forum, and Risk Response Network. 2013. *Global Risks 2013*. Cologny/Geneva, Switzerland: World Economic Forum.
- Hutchings, Mathew I., Andrew W. Truman, and Barrie Wilkinson. 2019. “Antibiotics: Past, Present and Future | Elsevier Enhanced Reader.” 2019. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>.
- Hyman, Paul, and Stephen T. Abedon. 2019. “Bacteriophage: Overview.” In *Reference Module in Biomedical Sciences*, B978012801238302506X. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02506-X>.
- Ingemar Panama. 2005. “Informe Final del Estudio de Impacto Ambiental Categoría III Del Saneamiento de la Ciudad de Panama y Bahía de Panama.” Panama: MINSA. <http://www.minsa.gob.pa/sites/default/files/proyectos/b.pdf>.
- Jacquemot, Loïc, Yvan Bettarel, Joanne Monjol, Erwan Corre, Sébastien Halary, Christelle Desnues, Thierry Bouvier, Christine Ferrier-Pagès, and Anne-Claire Baudoux. 2018. “Therapeutic Potential of a New Jumbo Phage That Infects *Vibrio Coralliilyticus*, a Widespread Coral Pathogen.” *Frontiers in Microbiology* 0. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02501>.
- Jamal, Muhsin, Saadia Andleeb, Fazal Jalil, Muhammad Imran, Muhammad Asif Nawaz, Tahir Hussain, Muhammad Ali, Sadeeq Ur Rahman, and Chythanya Rajanna Das. 2019. “Isolation, Characterization and Efficacy of Phage MJ2 against Biofilm Forming Multi-Drug Resistant Enterobacter Cloacae.” *Folia Microbiologica* 64 (1): 101–11. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0636-x>.
- Janda, J. Michael, Sharon L. Abbott, Sue Bystrom, and Will S. Probert. 2005. “Identification of Two Distinct Hybridization Groups in the Genus *Hafnia* by 16S rRNA Gene Sequencing and Phenotypic Methods.” *Journal of Clinical Microbiology* 43 (7): 3320–23. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3320-3323.2005>.
- Jank, Thomas, Christoph Trillhaase, Natalia Brozda, Marcus Steinemann, Carsten Schwan, Regine Süß, and Klaus Aktories. 2015. “Intracellular Plasma Membrane Guidance of Photorhabdus Asymbiotica Toxin Is Crucial for Cell Toxicity.” *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 29 (7): 2789–2802. <https://doi.org/10.1096/fj.14-269381>.
- Jing, Ran. 2012. “Bacteriophage-Based Biocontrol Of The Biofilm Formed By Antibiotic-Resistant Bacterium.” Utah USA: University of Utah.
- Jończyk, E., M. Kłak, R. Międzybrodzki, and A. Górski. 2011. “The Influence of External Factors on Bacteriophages—Review.” *Folia Microbiologica* 56 (3): 191–200. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0039-8>.

- Keen, Eric C. 2015. "A Century of Phage Research: Bacteriophages and the Shaping of Modern Biology: Cause to Reflect." *BioEssays* 37 (1): 6–9. <https://doi.org/10.1002/bies.201400152>.
- Khan Mirzaei, Mohammadali, and Anders S. Nilsson. 2015. "Isolation of Phages for Phage Therapy: A Comparison of Spot Tests and Efficiency of Plating Analyses for Determination of Host Range and Efficacy." Edited by Raymond Schuch. *PLOS ONE* 10 (3): e0118557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118557>.
- Khawaja, Komal Ameer, Zaigham Abbas, and Shafiq ur Rehman. 2016. "Isolation and Characterization of Lytic Phages TSE1-3 against Enterobacter Cloacae." *Open Life Sciences* 11 (1): 287–92. <https://doi.org/10.1515/biol-2016-0038>.
- Knoll, B. M., and E. Mylonakis. 2014. "Antibacterial Bioagents Based on Principles of Bacteriophage Biology: An Overview." *Clinical Infectious Diseases* 58 (4): 528–34. <https://doi.org/10.1093/cid/cit771>.
- Kutateladze, Mzia, and Revaz Adamia. 2010. "Bacteriophages as Potential New Therapeutics to Replace or Supplement Antibiotics." *Trends in Biotechnology* 28 (12): 591–95. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.08.001>.
- Kutter, Elizabeth, and Alexander Sulakvelidze, eds. 2005. *Bacteriophages: Biology and Applications*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Larcom, L L, and N H Thaker. 1977. "The Effects of Temperature and Ultraviolet Irradiation on Multiplication of Bacteriophage Phi29," 8.
- Laslett, Dean, and Bjorn Canback. 2004. "ARAGORN, a Program to Detect tRNA Genes and tmRNA Genes in Nucleotide Sequences." *Nucleic Acids Research* 32 (1): 11–16. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh152>.
- Lavigne, Rob, Pieter-Jan Ceysens, and J. Robben. 2009. "Phage Proteomics: Applications of Mass Spectrometry." In *Bacteriophages*, edited by Martha R.J. Clokie and Andrew M. Kropinski, 502:239–51. *Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-565-1_14.
- Leeuw, Marina de, Asher Brenner, and Ariel Kushmaro. 2017. "Modelling Phage–Bacteria Interaction in Micro-Bioreactors." *CLEAN – Soil, Air, Water* 45 (8): 1600702. <https://doi.org/10.1002/clen.201600702>.
- Lefort, Vincent, Richard Desper, and Olivier Gascuel. 2015. "FastME 2.0: A Comprehensive, Accurate, and Fast Distance-Based Phylogeny Inference Program." *Molecular Biology and Evolution* 32 (10): 2798–2800. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv150>.
- Leiva Maripan, Cindy Nicolle. 2015. "Fagoterapia, Una Alternativa a Los Antibióticos En La Industria Avícola." Santiago, Chile: Universidad De Santiago De Chile.
- Leskinen, Katarzyna, Bob G. Blasdel, Rob Lavigne, and Mikael Skurnik. 2016. "RNA-Sequencing Reveals the Progression of Phage-Host Interactions between ΦR1-37 and Yersinia Enterocolitica." *Viruses* 8 (4): 111. <https://doi.org/10.3390/v8040111>.
- Letunic, Ivica, and Peer Bork. 2019. "Interactive Tree Of Life (ITOL) v4: Recent Updates and New Developments." *Nucleic Acids Research* 47 (W1): W256–59. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>.
- Lewis, Kim. 2013. "Platforms for Antibiotic Discovery." *Nature Reviews. Drug Discovery* 12 (5): 371–87. <https://doi.org/10.1038/nrd3975>.
- Lima-Mendez, Gipsi, Jacques Van Helden, Ariane Toussaint, and Raphaël Leplae. 2008. "Prophinder: A Computational Tool for Prophage Prediction in Prokaryotic Genomes."

- Bioinformatics* 24 (6): 863–65. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn043>.
- Litt, Pushpinder Kaur, and Divya Jaroni. 2017. “Isolation and Physiomorphological Characterization of Escherichia Coli O157:H7-Infecting Bacteriophages Recovered from Beef Cattle Operations.” Research article. *International Journal of Microbiology*. 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7013236>.
- Lopez Cuevas, Osvaldo. 2011. “caracterización Biológica, Morfológica Y Molecular De Bacterio fagos Para El Control De Salmonella Spp. Y E. Coli O157:H7.” Culiacan, Sinaloa.: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.
- Lopez, Diana. 2015. “Bacteriófagos como alternativa para eliminar cepas de Acinetobacter baumannii resistente a antibióticos presentes en tres hospitales del Ecuador.” Quito: Universidad Internacional Sek. <http://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/1402/1/Bacteri%C3%B3fagos%20como%20alternativa%20para%20eliminar%20cepas%20de%20Acinetobacter%20baumannii%20resistente%20a%20antibi%C3%B3ticos%20presentes%20en%20tres%20hospitales%20del%20Ecuador.pdf>.
- Lowe, Todd M., and Patricia P. Chan. 2016. “TRNAscan-SE On-Line: Integrating Search and Context for Analysis of Transfer RNA Genes.” *Nucleic Acids Research* 44 (W1): W54–57. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw413>.
- Lujan Capra, Maria. 2007. “Bacteriófagos de Lactobacillus Casei/Paracasei. Caracterización y Estudio de La Fagorresistencia.” Santa Fe Argentina: UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL.
- Madigan, Michael T., ed. 2012. *Brock Biology of Microorganisms*. 13th ed. San Francisco: Benjamin Cummings.
- Mattila, Sari, Pilvi Ruotsalainen, and Matti Jalasvuori. 2015. “On-Demand Isolation of Bacteriophages Against Drug-Resistant Bacteria for Personalized Phage Therapy.” *Frontiers in Microbiology* 6 (November). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01271>.
- McShan, W. Michael, and Scott V. Nguyen. 2016. “The Bacteriophages of Streptococcus Pyogenes.” In *Streptococcus Pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations*, edited by Joseph J. Ferretti, Dennis L. Stevens, and Vincent A. Fischetti. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK333409/>.
- Meier, Armin, and Johannes Söding. 2015. “Automatic Prediction of Protein 3D Structures by Probabilistic Multi-Template Homology Modeling.” *PLOS Computational Biology* 11 (10): e1004343. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004343>.
- Meier-Kolthoff, Jan P., and Markus Göker. 2017. “VICTOR: Genome-Based Phylogeny and Classification of Prokaryotic Viruses.” *Bioinformatics (Oxford, England)* 33 (21): 3396–3404. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx440>.
- Meier-Kolthoff, Jan P, Richard L Hahnke, Jörn Petersen, Carmen Scheuner, Victoria Michael, Anne Fiebig, Christine Rohde, et al. 2014. “Complete Genome Sequence of DSM 30083T, the Type Strain (U5/41T) of Escherichia Coli, and a Proposal for Delineating Subspecies in Microbial Taxonomy.” *Standards in Genomic Sciences* 9 (December). <https://doi.org/10.1186/1944-3277-9-2>.
- Meile, Susanne, Samuel Kilcher, Martin J. Loessner, and Matthew Dunne. 2020. “Reporter Phage-Based Detection of Bacterial Pathogens: Design Guidelines and Recent Developments.” *Viruses* 12 (9). <https://doi.org/10.3390/v12090944>.

- Meza, Adriana. 2016. "Aislamiento Y Caracterización De Bacteriofagos Para Cepas Nosocomiales De *Acinetobacter Baumannii* De Lima E Iquitos, Perú 2014 - 2015". Lima Peru: Universidad Católica De Santa María.
- Mezzatesta, Maria Lina, Floriana Gona, and Stefania Stefani. 2012. "Enterobacter Cloacae Complex: Clinical Impact and Emerging Antibiotic Resistance." *Future Microbiology* 7 (7): 887–902. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.61>.
- Michael, Carolyn Anne, Dale Dominey-Howes, and Maurizio Labbate. 2014. "The Antimicrobial Resistance Crisis: Causes, Consequences, and Management." *Frontiers in Public Health* 2 (September). <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00145>.
- MINSa. 2015. "18400_2011_31657_Informe Resistencia Antibióticos-Uso Racional -036.pdf." Panama: ICGES.
- Mochizuki, Tomohiro, Mart Krupovic, Gérard Pehau-Arnaudet, Yoshihiko Sako, Patrick Forterre, and David Prangishvili. 2012. "Archaeal Virus with Exceptional Virion Architecture and the Largest Single-Stranded DNA Genome." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (33): 13386–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203668109>.
- Moreno, Jose. 2018. "Antibiotic Resistance Profiles in Panama: Trends from 2007 to 2013." *Pharmacy & Pharmacology International Journal* 6 (5). <https://doi.org/10.15406/ppij.2018.06.00200>.
- Nelson, D., L. Loomis, and V. A. Fischetti. 2001. "Prevention and Elimination of Upper Respiratory Colonization of Mice by Group A Streptococci by Using a Bacteriophage Lytic Enzyme." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (7): 4107–12. <https://doi.org/10.1073/pnas.061038398>.
- Nelson, David L, and Michael M Cox. 2018. *Lehninger - Principles of Biochemistry*.
- Nelson, M. U., Y. Maksimova, V. Schulz, M. J. Bizzarro, and P. G. Gallagher. 2013. "Late-Onset Leclercia Adecarboxylata Sepsis in a Premature Neonate." *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association* 33 (9): 740–42. <https://doi.org/10.1038/jp.2013.34>.
- Nevondo, T. S., and T. E. (Thomas Eugene) Cloete. 1999. "Bacterial and Chemical Quality of Water Supply in the Dertig Village Settlement," April. <https://repository.up.ac.za/handle/2263/3373>.
- Nicolaou, Kyriacos C., and Stephan Rigol. 2018. "A Brief History of Antibiotics and Select Advances in Their Synthesis." *The Journal of Antibiotics* 71 (2): 153–84. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.62>.
- Nieradko, Józef, and Juliana Kurlenda. 2004. "[Characteristics of selected virulence factors of Enterobacter cloacae strains isolated from clinical specimens]." *Medycyna Doswiadczalna I Mikrobiologia* 56 (4): 351–58.
- Overbeek, Ross, Robert Olson, Gordon D. Pusch, Gary J. Olsen, James J. Davis, Terry Disz, Robert A. Edwards, et al. 2014. "The SEED and the Rapid Annotation of Microbial Genomes Using Subsystems Technology (RAST)." *Nucleic Acids Research* 42 (Database issue): D206-214. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226>.
- Phothichaisri, Wichuda, Puey Ounjai, Tanaporn Phetruen, Tavan Janvilisri, Pongsak Khunrae, Sombat Singhakaew, Piyada Wangroongsarb, and Surang Chankhamhaengdech. 2018. "Characterization of Bacteriophages Infecting Clinical Isolates of Clostridium Difficile." *Frontiers in Microbiology* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01701>.

- Phumkhachorn, P., and P. Rattanachaikunsopon. 2010. "Isolation and Partial Characterization of a Bacteriophage Infecting the Shrimp Pathogen *Vibrio Harveyi*." *Undefined*. /paper/Isolation-and-partial-characterization-of-a-the-Phumkhachorn-Rattanachaikunsopon/0d7ba36edc64ffe5d839f229cc171237350d60e7.
- Pietilä, Maija K., Tatiana A. Demina, Nina S. Atanasova, Hanna M. Oksanen, and Dennis H. Bamford. 2014. "Archaeal Viruses and Bacteriophages: Comparisons and Contrasts." *Trends in Microbiology* 22 (6): 334–44. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.02.007>.
- Pietilä, Maija K., Elina Roine, Lars Paulin, Nisse Kalkkinen, and Dennis H. Bamford. 2009. "An SsDNA Virus Infecting Archaea: A New Lineage of Viruses with a Membrane Envelope." *Molecular Microbiology* 72 (2): 307–19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06642.x>.
- Piuri, Mariana. 2019. "Los bacteriófagos: del genoma al metagenoma." Departamento de Química Biológica UBA.
- Piuri, Mariana, William R. Jacobs Jr, and Graham F. Hatfull. 2009. "Fluoromycobacteriophages for Rapid, Specific, and Sensitive Antibiotic Susceptibility Testing of Mycobacterium Tuberculosis." *PLOS ONE* 4 (3): e4870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004870>.
- Piuri, Mariana, Liliana Rondón, Estefanía Urdániz, and Graham F. Hatfull. 2013. "Generation of Affinity-Tagged Fluoromycobacteriophages by Mixed Assembly of Phage Capsids." *Applied and Environmental Microbiology* 79 (18): 5608–15. <https://doi.org/10.1128/AEM.01016-13>.
- Potter, Simon C, Aurélien Luciani, Sean R Eddy, Youngmi Park, Rodrigo Lopez, and Robert D Finn. 2018. "HMMER Web Server: 2018 Update." *Nucleic Acids Research* 46 (W1): W200–204. <https://doi.org/10.1093/nar/gky448>.
- Poxleitner, Marianne, Welkin Pope, Deborah Jacobs-Sera, Viknesh Sivanathan, and Graham Hatfull. 2017. "Phage Discovery Guide." Howard Hughes Medical Institute.
- Prada-Peñaranda, Catalina, Angela-Victoria Holguin-Moreno, Andres-Fernando González-Barrios, and Martha-Josefina Vives-Florez. 2014. "Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. Perspectivas en Colombia." *Universitas Scientiarum* 20 (1): 43. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC20-1.faci>.
- Pritchard, Leighton, Rachel H. Glover, Sonia Humphris, John G. Elphinstone, and Ian K. Toth. 2015. "Genomics and Taxonomy in Diagnostics for Food Security: Soft-Rotting Enterobacterial Plant Pathogens." *Analytical Methods* 8 (1): 12–24. <https://doi.org/10.1039/C5AY02550H>.
- Qing, Andrew. 2012. "Caudovirales." In *Virus Taxonomy*, 39–45. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384684-6.00001-X>.
- Quinn, Annette. 2014. "Ocho ríos en la ciudad, focos de contaminación." *TVN NOTICIAS*. Panama. https://www.tvn-2.com/nacionales/rios-ciudad-focos-contaminacion_0_3976102480.html.
- Quiroz Fernández, Pablo. 2018. "Los bacteriofagos como elementos de transmisión genéticas horizontal de resistencias a antibióticos y toxinas stx." Barcelona: Universitat de Barcelona.
- Rambaut, A. 2006. "FigTree 1.4.3 - a Graphical Viewer of Phylogenetic Trees and a Program for Producing Publication-Ready Figures." 2006. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rasool, Muhammad Hidayat, Rukhsana Yousaf, Abu Baker Siddique, Muhammad Saqalein, and Mohsin Khurshid. 2016. "Isolation, Characterization, and Antibacterial Activity of Bacte-

- riophages Against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus in Pakistan.” *Jundishapur Journal of Microbiology* 9 (10). <https://doi.org/10.5812/jjm.36135>.
- Regan, J. D., W. L. Carrier, H. Gucinski, B. L. Olla, H. Yoshida, R. K. Fujimura, and R. I. Wicklund. 1992. “Dna as a Solar Dosimeter in the Ocean*.” *Photochemistry and Photobiology* 56 (1): 35–42. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1992.tb09599.x>.
- Rice, Eugene, Roger Baird, Andrew Eaton, and Lenori Clesceri. 2015. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater de American Public Health Association: American Water Works Assn 9780875530130 Hardcover, 22. - Books Express*. 22nd ed. Hardcover. <https://www.iberlibro.com/Standard-Methods-Examination-Water-Wastewater-American/22178529360/bd>.
- Riley, P A. 2006. “Phages: Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology.” *Journal of Clinical Pathology* 59 (9): 1003–4. <https://doi.org/10.1136/jcp.2005.035774>.
- Ríos-Sandoval, Marcela. 2019. “CARACTERIZACIÓN GENÓMICA, MORFOLÓGICA Y REPLICATIVA DEL BACTERIÓFAGO ΦXaF18 DE Xanthomonas Vesicatoria.” Zappopan, Jalisco: CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A. C.
- Rohwer, F., and R. Edwards. 2002. “The Phage Proteomic Tree: A Genome-Based Taxonomy for Phage.” *Journal of Bacteriology* 184 (16): 4529–35. <https://doi.org/10.1128/JB.184.16.4529-4535.2002>.
- Rohwer, Forest Lamont. 2014. *Life in Our Phage World: A Centennial Field Guide to the Earth’s Most Diverse Inhabitants*. 1st edition. San Diego, CA: Wholon.
- Rondon, Liliana. 2017. “FluoFagos de segunda generación para detección y determinación de susceptibilidad a antibióticos en Mycobacterium tuberculosis.” Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires. https://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n6198_RondonSalazar.pdf.
- Rondón, Liliana, Estefanía Urdániz, Cecilia Latini, Florencia Payaslian, Mario Matteo, Ezequiel J. Sosa, Darío F. Do Porto, et al. 2018. “Fluoromycobacteriophages Can Detect Viable Mycobacterium Tuberculosis and Determine Phenotypic Rifampicin Resistance in 3–5 Days From Sputum Collection.” *Frontiers in Microbiology* 9 (July). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01471>.
- Salmond, George P. C., and Peter C. Fineran. 2015. “A Century of the Phage: Past, Present and Future.” *Nature Reviews Microbiology* 13 (12): 777–86. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3564>.
- Sambrock, Joseph, and David W. Russell. 2001. *Molecular Cloning A Laboratory Manula*. 3th ed. New York, N.Y: CSHL Press.
- Sangha, Kamalpreet Kaur, B. V. Sunil Kumar, Ravi Kant Agrawal, Dipak Deka, and Ramneek Verma. 2014. “Proteomic Characterization of Lytic Bacteriophages of *Staphylococcus Aureus* Isolated from Sewage Affluent of India.” *International Scholarly Research Notices* 2014: 1–6. <https://doi.org/10.1155/2014/265298>.
- Schirrmann, Thomas, Torsten Meyer, Mark Schütte, André Frenzel, and Michael Hust. 2011. “Phage Display for the Generation of Antibodies for Proteome Research, Diagnostics and Therapy.” *Molecules (Basel, Switzerland)* 16 (1): 412–26. <https://doi.org/10.3390/molecules16010412>.
- Sillankorva, Sanna, Peter Neubauer, and Joana Azeredo. 2008. “Pseudomonas Fluorescens Biofilms Subjected to Phage PhiIBB-PF7A.” *BMC Biotechnology* 8 (1): 79.

- <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-79>.
- Silva, Yolanda J., Liliana Costa, Carla Pereira, Ângela Cunha, Ricardo Calado, Newton C. M. Gomes, and Adelaide Almeida. 2014. "Influence of Environmental Variables in the Efficiency of Phage Therapy in Aquaculture." *Microbial Biotechnology* 7 (5): 401–13. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12090>.
- Soohey, Robert L. 2017. "Identifying Genes Essential For Lysogeny In Cluster E Mycobacteriophage Ukulele." Maine, Fl: The University of Maine.
- Soto, Maryoris. 2018. "Maryoris Elisa Soto Lopez Caracterização Do Bacteriófago Ufv-Areg1: Potencial Para O Biocontrole De Escherichia Coli O157:H7 Viçosa Minas Gerais - Brasil 2018 Maryoris Elisa Soto Lopez Caracterização Do Bacteriófago Ufv-Areg1: Potencial Para O Biocontrole De Escherichia coli O157:H7." Universidade Federal Viscosa.
- Stone, Richard. 2002. "Bacteriophage Therapy. Stalin's Forgotten Cure." *Science (New York, N.Y.)* 298 (5594): 728–31. <https://doi.org/10.1126/science.298.5594.728>.
- Suttle, C. A., and F. Chen. 1992. "Mechanisms and Rates of Decay of Marine Viruses in Seawater." *Applied and Environmental Microbiology* 58 (11): 3721–29. <https://doi.org/10.1128/AEM.58.11.3721-3729.1992>.
- Swiss Institute of Bioinformatics). 2018. "Tectiviridae." 2018. https://viralzone.expasy.org/160?outline=all_by_species.
- Tato-Rodríguez, Rubén, Jesús Oteo-Iglesias, Patricia Álvarez-García, María José Zamora-López, Jesús Martínez-López, Ángeles Pallarés-González, María Victoria Pulián-Morais, Sara Fernández-Romero, Ana Vindel-Hernando, and Marta García-Campello. 2016. "Brote de Enterobacter cloacae complex multirresistente productor de CTX-M-9 en una unidad de cuidados intensivos." *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 34 (4): 237–42. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.05.009>.
- Tomat, David, Andrea Quiberoni, Diego Mercanti, and Claudia Balagué. 2014. "Hard Surfaces Decontamination of Enteropathogenic and Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli Using Bacteriophages." *Food Research International* 57 (March): 123–29. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.013>.
- Tomlinson, Sherri. 2010. "UV Irradiation on Bacteriophage Survival," 13.
- Tynecki P, Guziński A, Kazimierzczak J, Jadczyk M, Dastyh J, and Onisko A. 2020. "PhageAI - Bacteriophage Life Cycle Recognition with Machine Learning and Natural Language Processing," July. <https://doi.org/10.1101/2020.07.11.198606>.
- Urdániz, Estefanía, Liliana Rondón, Marcelo A. Martí, Graham F. Hatfull, and Mariana Piuri. 2016. "Rapid Whole-Cell Assay of Antitubercular Drugs Using Second-Generation Fluoromycobacteriophages." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60 (5): 3253–56. <https://doi.org/10.1128/AAC.03016-15>.
- Vinod, M. G., M. M. Shivu, K. R. Umesha, B. C. Rajeeva, G. Krohne, Indrani Karunasagar, and Iddya Karunasagar. 2006. "Isolation of Vibrio Harveyi Bacteriophage with a Potential for Biocontrol of Luminous Vibriosis in Hatchery Environments." *Aquaculture* 255 (1): 117–24. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.12.003>.
- Wei, Shuai, Ramachandran Chelliah, Momna Rubab, Deog-Hwan Oh, Md Jalal Uddin, and Juhee Ahn. 2019. "Bacteriophages as Potential Tools for Detection and Control of Salmonella Spp. in Food Systems." *Microorganisms* 7 (11). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110570>.
- WHO. 2017. "WHO | Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research,

- Discovery, and Development of New Antibiotics.” WHO. <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>.
- Wong Gonzalez, Alfredo. 1994. “Purificacion Y Caracterizacion Biologica Del Bacteriofago Nfi-19 Especifico De Bacillus Thuringiensis.” Nuevo Leon, Mexico: Universidad Autonoma de Nuevo Leon.
- Yadav, Shailendra, and Atya Kapley. 2021. “Antibiotic Resistance: Global Health Crisis and Metagenomics.” *Biotechnology Reports* 29 (March): e00604. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00604>.
- Yamaki, S., Y. Kawai, and K. Yamazaki. 2015. “Characterization of a Novel Bacteriophage, Phd1, Infecting the Histamine-Producing Photobacterium Damselae Subsp. Damselae.” *Journal of Applied Microbiology* 118 (6): 1541–50. <https://doi.org/10.1111/jam.12809>.
- Yamamoto, Keith R., Bruce M. Alberts, Rolf Benzinger, Larry Lawhorne, and Gerda Treiber. 1970. “Rapid Bacteriophage Sedimentation in the Presence of Polyethylene Glycol and Its Application to Large-Scale Virus Purification.” *Virology* 40 (3): 734–44. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(70\)90218-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(70)90218-7).
- Yang, Hongjiang, Li Liang, Shuxiang Lin, and Shiru Jia. 2010. “Isolation and Characterization of a Virulent Bacteriophage AB1 of Acinetobacter Baumannii.” *BMC Microbiology* 10 (April): 131. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-131>.
- Yang, Zichen, Supeng Yin, Gang Li, Jing Wang, Guangtao Huang, Bei Jiang, Bo You, et al. 2019. “Global Transcriptomic Analysis of the Interactions between Phage ΦAbp1 and Extensively Drug-Resistant Acinetobacter Baumannii.” *MSystems* 4 (2). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00068-19>.
- Yergeau, Etienne, Luke Masson, Miria Elias, Shurong Xiang, Ewa Madey, Hongsheng Huang, Brian Brooks, and Lee A. Beaudette. 2016. “Comparison of Methods to Identify Pathogens and Associated Virulence Functional Genes in Biosolids from Two Different Wastewater Treatment Facilities in Canada.” *PLOS ONE* 11 (4): e0153554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153554>.
- Zaburlin, Delfina, Andrea Quiberoni, and Diego Mercanti. 2017. “Changes in Environmental Conditions Modify Infection Kinetics of Dairy Phages.” *Food and Environmental Virology* 9 (3): 270–76. <https://doi.org/10.1007/s12560-017-9296-2>.
- Zavascki, Alexandre P., Cecília G. Carvalhaes, Renata C. Picão, and Ana C. Gales. 2010. “Multidrug-Resistant Pseudomonas Aeruginosa and Acinetobacter Baumannii: Resistance Mechanisms and Implications for Therapy.” *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 8 (1): 71–93. <https://doi.org/10.1586/eri.09.108>.
- Zimmermann, Lukas, Andrew Stephens, Seung-Zin Nam, David Rau, Jonas Kübler, Marko Lozajic, Felix Gabler, Johannes Söding, Andrei N. Lupas, and Vikram Alva. 2018. “A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at Its Core.” *Journal of Molecular Biology, Computation Resources for Molecular Biology*, 430 (15): 2237–43. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.12.007>.

ANEXOS

Anexos

ANOTACION DEL GENOMA DEL FAGO

Tabla 11. Anotación genómica del fago de *Enterobacter* vB_EcRAM-01.

Gen	Type	Start	Stop	Frame	Strand	Length (bp)	Function
1	CDS	2	709	2	+	708	Ribonucleotide reductase of class Ia (aerobic), beta subunit (EC 1.17.4.1)
2	CDS	681	992	3	+	312	hypothetical protein
3	CDS	992	1411	2	+	420	homing endonuclease
4	CDS	1398	2510	3	+	1113	RNA ligase
5	CDS	2507	2833	2	+	327	hypothetical protein
6	CDS	2830	3147	1	+	318	hypothetical protein
7	CDS	3132	3302	3	+	171	hypothetical protein
8	CDS	3299	4186	2	+	888	polynucleotide kinase
9	CDS	4247	4513	2	+	267	hypothetical protein
10	CDS	4510	4770	1	+	261	hypothetical protein
11	CDS	4767	5291	3	+	525	Cd dCMP deaminase
12	CDS	5296	5640	1	+	345	hypothetical protein
13	CDS	5644	5895	1	+	252	hypothetical protein
14	CDS	6210	6494	3	+	285	hypothetical protein
15	CDS	6506	6925	2	+	420	hypothetical protein
16	CDS	6968	7534	2	+	567	hypothetical protein
17	CDS	7534	7815	1	+	282	hypothetical protein
18	CDS	7936	8136	1	+	201	hypothetical protein
19	CDS	8206	8496	1	+	291	hypothetical protein
20	CDS	8499	8729	3	+	231	hypothetical protein
21	CDS	8732	8959	2	+	228	hypothetical protein
22	CDS	8959	9207	1	+	249	hypothetical protein
23	CDS	9204	9434	3	+	231	hypothetical protein
24	CDS	9434	9592	2	+	159	hypothetical protein
25	CDS	9589	9744	1	+	156	hypothetical protein
26	CDS	9820	10263	1	+	444	hypothetical protein
27	CDS	10260	10466	3	+	207	hypothetical protein
28	CDS	10477	10695	1	+	219	hypothetical protein
29	CDS	10692	10961	3	+	270	hypothetical protein

30	CDS	10964	11212	2	+	249	hypothetical protein
31	CDS	11209	11826	1	+	618	hypothetical protein
32	CDS	11804	13327	2	+	1524	DNA ligase, phage-associated
33	CDS	13420	13686	1	+	267	hypothetical protein
34	CDS	13765	14007	1	+	243	hypothetical protein
35	CDS	14000	14284	2	+	285	hypothetical protein
36	CDS	14281	14541	1	+	261	hypothetical protein
37	CDS	15708	14605	-3	-	1104	baseplate hub subunit
38	CDS	15772	16344	1	+	573	baseplate distal hub subunit
39	CDS	16341	18086	3	+	1746	hypothetical protein
40	CDS	18098	19183	2	+	1086	Phage baseplate tail tube cap (T4-like gp48)
41	CDS	19193	20056	2	+	864	Phage baseplate hub protein (T4-like gp54)
42	CDS	20084	20824	2	+	741	hypothetical protein
43	CDS	20817	21377	3	+	561	Phage baseplate hub subunit (T4-like gp26)
44	CDS	21378	21770	3	+	393	baseplate wedge subunit
45	CDS	22294	21797	-1	-	498	hypothetical protein
46	CDS	22535	22305	-2	-	231	hypothetical protein
47	CDS	22744	22532	-1	-	213	hypothetical protein
48	CDS	23115	22825	-3	-	291	hypothetical protein
49	CDS	23719	23249	-1	-	471	hypothetical protein
50	CDS	23907	23716	-3	-	192	hypothetical protein
51	CDS	24527	23904	-2	-	624	hypothetical protein
52	CDS	26814	24568	-3	-	2247	hypothetical protein
53	CDS	27150	26815	-3	-	336	hypothetical protein
54	CDS	27662	27150	-2	-	513	hypothetical protein
55	CDS	27892	27659	-1	-	234	hypothetical protein
56	CDS	28131	27889	-3	-	243	hypothetical protein
57	CDS	28400	28128	-2	-	273	hypothetical protein
58	CDS	28605	28411	-3	-	195	hypothetical protein
59	CDS	28935	28648	-3	-	288	hypothetical protein
60	CDS	29191	28976	-1	-	216	hypothetical protein
61	CDS	29670	29233	-3	-	438	hypothetical protein
62	CDS	30575	29667	-2	-	909	DNA-cytosine methyltransferase (EC 2.1.1.37)

63	CDS	30603	31301	3	+	699	hypothetical protein
64	CDS	31587	31324	-3	-	264	hypothetical protein
65	CDS	32564	31584	-2	-	981	hypothetical protein
66	CDS	32968	32573	-1	-	396	hypothetical protein
67	CDS	33216	32965	-3	-	252	hypothetical protein
68	CDS	33770	33213	-2	-	558	hypothetical protein
69	CDS	33982	33767	-1	-	216	hypothetical protein
70	CDS	34221	34036	-3	-	186	hypothetical protein
71	CDS	35445	34390	-3	-	1056	hypothetical protein
72	CDS	36536	35622	-2	-	915	hypothetical protein
73	CDS	36994	36611	-1	-	384	hypothetical protein
74	CDS	37288	37004	-1	-	285	hypothetical protein
75	CDS	37788	37396	-3	-	393	hypothetical protein
76	CDS	38403	37819	-3	-	585	Thymidine kinase (EC 2.7.1.21)
77	CDS	38611	38396	-1	-	216	hypothetical protein
78	CDS	38816	38604	-2	-	213	hypothetical protein
79	CDS	38989	38813	-1	-	177	hypothetical protein
80	CDS	39477	38986	-3	-	492	hypothetical protein
81	CDS	39565	39467	-1	-	99	hypothetical protein
82	CDS	39657	39562	-3	-	96	hypothetical protein
83	CDS	39800	39654	-2	-	147	hypothetical protein
84	CDS	40123	39800	-1	-	324	hypothetical protein
85	CDS	40744	40133	-1	-	612	hypothetical protein
86	CDS	41150	40746	-2	-	405	hypothetical protein
87	CDS	41865	41218	-3	-	648	hypothetical protein
88	CDS	42486	41917	-3	-	570	hypothetical protein
89	CDS	42659	42483	-2	-	177	hypothetical protein
90	CDS	42861	42667	-3	-	195	hypothetical protein
91	CDS	44243	42900	-2	-	1344	hypothetical protein
92	CDS	44767	44297	-1	-	471	hypothetical protein
93	CDS	45172	44777	-1	-	396	Phage endolysin
94	CDS	45647	45240	-2	-	408	hypothetical protein
95	CDS	46023	45703	-3	-	321	hypothetical protein
96	CDS	46323	46060	-3	-	264	hypothetical protein
97	CDS	46659	46396	-3	-	264	hypothetical protein
98	CDS	47103	46663	-3	-	441	hypothetical protein
99	CDS	47447	47100	-2	-	348	hypothetical protein

100	CDS	47764	47444	-1	-	321	hypothetical protein
101	CDS	48057	47764	-3	-	294	hypothetical protein
102	CDS	49208	48057	-2	-	1152	hypothetical protein
103	CDS	49425	49219	-3	-	207	hypothetical protein
104	CDS	49682	49422	-2	-	261	hypothetical protein
105	CDS	49912	49742	-1	-	171	hypothetical protein
106	CDS	50109	49909	-3	-	201	hypothetical protein
107	CDS	50252	50106	-2	-	147	hypothetical protein
108	CDS	50500	50249	-1	-	252	hypothetical protein
109	CDS	50728	50555	-1	-	174	hypothetical protein
110	CDS	51017	50739	-2	-	279	hypothetical protein
111	CDS	51355	51107	-1	-	249	hypothetical protein
112	CDS	51947	51357	-2	-	591	hypothetical protein
113	CDS	52348	51944	-1	-	405	hypothetical protein
114	CDS	52730	52527	-2	-	204	hypothetical protein
115	CDS	53128	52811	-1	-	318	hypothetical protein
116	CDS	53652	53125	-3	-	528	hypothetical protein
117	CDS	53983	53645	-1	-	339	hypothetical protein
118	CDS	54249	53989	-3	-	261	hypothetical protein
119	CDS	54631	54236	-1	-	396	hypothetical protein
120	CDS	55041	54628	-3	-	414	NudE nudix hydrolase
121	CDS	55280	55041	-2	-	240	hypothetical protein
122	CDS	55537	55277	-1	-	261	hypothetical protein
123	CDS	55841	55545	-2	-	297	hypothetical protein
124	CDS	56176	55838	-1	-	339	hypothetical protein
125	CDS	56327	56187	-2	-	141	hypothetical protein
126	CDS	56557	56417	-1	-	141	hypothetical protein
127	CDS	57163	56624	-1	-	540	hypothetical protein
128	CDS	57808	57185	-1	-	624	hypothetical protein
129	CDS	58133	57867	-2	-	267	Phage tail fiber assembly protein
130	CDS	58805	58137	-2	-	669	gp1 dNMP kinase
131	CDS	59347	58802	-1	-	546	Phage tail completion protein
132	CDS	59624	60232	2	+	609	hypothetical protein
133	CDS	61122	60268	-3	-	855	DNA end protector protein
134	CDS	61611	61144	-3	-	468	head completion protein
135	CDS	61656	62210	3	+	555	Phage baseplate wedge protein

136	CDS	62207	63967	2	+	1761	Phage baseplate hub structural protein / Phage lysozyme R (EC 3.2.1.17)
137	CDS	63970	66060	1	+	2091	hypothetical protein
138	CDS	66084	67994	3	+	1911	baseplate wedge subunit
139	CDS	68075	71158	2	+	3084	baseplate wedge subunit
140	CDS	71159	72151	2	+	993	baseplate wedge subunit
141	CDS	72162	73025	3	+	864	baseplate wedge tail fiber connector
142	CDS	73022	74839	2	+	1818	baseplate wedge subunit and tail pin
143	CDS	74839	75504	1	+	666	Phage baseplate wedge subunit and tail pin (T4-like gp11)
144	CDS	75514	76905	1	+	1392	tail fibers protein
145	CDS	76917	78947	3	+	2031	hypothetical protein
146	CDS	78982	79905	1	+	924	Phage neck protein
147	CDS	79915	80661	1	+	747	Phage neck protein
148	CDS	80743	81567	1	+	825	tail sheath stabilizer and completion protein
149	CDS	81567	82100	3	+	534	small terminase protein
150	CDS	82069	83898	1	+	1830	large terminase protein
151	CDS	83917	85908	1	+	1992	tail sheath protein
152	CDS	85955	86440	2	+	486	tail tube protein
153	CDS	86494	88068	1	+	1575	Phage portal vertex of the head
154	CDS	88068	88328	3	+	261	prohead core protein
155	CDS	88341	88748	3	+	408	prohead core protein
156	CDS	88751	89410	2	+	660	Phage prohead assembly (scaffolding) protein
157	CDS	89437	90231	1	+	795	Phage prohead assembly (scaffolding) protein
158	CDS	90253	91827	1	+	1575	major capsid protein
159	CDS	91921	93219	1	+	1299	capsid vertex protein
160	CDS	93486	93908	3	+	423	hypothetical protein
161	CDS	93910	94092	1	+	183	UvsY.-2 conserved hypothetical protein
162	CDS	94537	94307	-1	-	231	DNA helicase, phage-associated
163	CDS	96046	94547	-1	-	1500	DNA helicase, phage-associated

164	CDS	96117	96776	3	+	660	hypothetical protein
165	CDS	96846	97193	3	+	348	hypothetical protein
166	CDS	97233	97805	3	+	573	hypothetical protein
167	CDS	97833	98336	3	+	504	Phage capsid and scaffold
168	CDS	98357	98857	2	+	501	hypothetical protein
169	CDS	99356	98892	-2	-	465	hypothetical protein
170	CDS	100239	99406	-3	-	834	hypothetical protein
171	CDS	100354	101223	1	+	870	hypothetical protein
172	CDS	101260	101577	1	+	318	hypothetical protein
173	CDS	101574	101747	3	+	174	hypothetical protein
174	CDS	101740	102105	1	+	366	hypothetical protein
175	CDS	102102	102428	3	+	327	hypothetical protein
176	CDS	102431	102775	2	+	345	hypothetical protein
177	CDS	102786	103319	3	+	534	Srd postulated decoy of host sigma70 or sigmaS
178	CDS	103322	104368	2	+	1047	RnIB RNA ligase 2
179	CDS	104358	104717	3	+	360	hypothetical protein
180	CDS	104718	104939	3	+	222	hypothetical protein
181	CDS	105009	105467	3	+	459	hypothetical protein
182	CDS	105553	105822	1	+	270	hypothetical protein
183	CDS	105832	106296	1	+	465	hypothetical protein
184	CDS	106320	107753	3	+	1434	putative nicotinate phosphoribosyltransferase
185	CDS	107833	108042	1	+	210	hypothetical protein
186	CDS	108039	108890	3	+	852	DNA adenine methylase (EC 2.1.1.72)
187	CDS	108897	109166	3	+	270	thioredoxin
188	CDS	109199	109681	2	+	483	recombination endonuclease VII
189	CDS	109678	111801	1	+	2124	anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase
190	CDS	111872	112390	2	+	519	hypothetical protein
191	CDS	112387	112629	1	+	243	hypothetical protein
192	CDS	112626	113126	3	+	501	hypothetical protein
193	CDS	113136	113732	3	+	597	hypothetical protein
194	CDS	113762	114709	2	+	948	hypothetical protein
195	CDS	114703	114987	1	+	285	hypothetical protein
196	CDS	115033	115227	1	+	195	hypothetical protein

197	CDS	115224	115754	3	+	531	hypothetical protein
198	CDS	115754	116245	2	+	492	Ribonucleotide reductase of class III (anaerobic), activating protein (EC 1.97.1.4)
199	CDS	116302	116463	1	+	162	hypothetical protein
200	CDS	116468	117424	2	+	957	hypothetical protein
201	CDS	117472	118206	1	+	735	hypothetical protein
202	CDS	118166	118444	2	+	279	glutaredoxin
203	CDS	118445	118783	2	+	339	gp55.2 conserved hypothetical protein
204	CDS	118780	120207	1	+	1428	hypothetical protein
205	CDS	120264	123923	3	+	3660	long tail fiber proximal subunit
206	CDS	123929	125524	2	+	1596	hypothetical protein
207	CDS	125576	127780	2	+	2205	hypothetical protein
208	CDS	127843	130056	1	+	2214	hypothetical protein
209	CDS	130082	130894	2	+	813	Receptor recognizing protein
210	CDS	130947	131588	3	+	642	holin
211	CDS	132151	131861	-1	-	291	hypothetical protein
212	CDS	132948	132148	-3	-	801	hypothetical protein
213	CDS	133257	133030	-3	-	228	hypothetical protein
214	CDS	133583	133254	-2	-	330	hypothetical protein
215	CDS	133692	133558	-3	-	135	hypothetical protein
216	CDS	133988	133740	-2	-	249	hypothetical protein
217	CDS	134443	134003	-1	-	441	nucleoid disruption protein
218	CDS	134831	134415	-2	-	417	hypothetical protein
219	CDS	135779	134877	-2	-	903	rIIB protein
220	CDS	138028	135779	-1	-	2250	hypothetical protein
221	CDS	138275	138039	-2	-	237	hypothetical protein
222	CDS	138811	138272	-1	-	540	hypothetical protein
223	CDS	140169	138883	-3	-	1287	DNA topoisomerase, phage-associated
224	CDS	142064	140169	-2	-	1896	topoisomerase II large subunit
225	CDS	142298	142134	-2	-	165	hypothetical protein
226	CDS	142732	142298	-1	-	435	motB.2 hypothetical protein
227	CDS	143358	142753	-3	-	606	hypothetical protein

228	CDS	143644	143345	-1	-	300	hypothetical protein
229	CDS	144231	143641	-3	-	591	hypothetical protein
230	CDS	144596	144264	-2	-	333	hypothetical protein
231	CDS	144864	144643	-3	-	222	hypothetical protein
232	CDS	145023	144868	-3	-	156	hypothetical protein
233	CDS	145232	145020	-2	-	213	hypothetical protein
234	CDS	145475	145308	-2	-	168	hypothetical protein
235	CDS	145680	145468	-3	-	213	hypothetical protein
236	CDS	145829	145668	-2	-	162	hypothetical protein
237	CDS	146229	145918	-3	-	312	hypothetical protein
238	CDS	146435	146226	-2	-	210	hypothetical protein
239	CDS	146589	146446	-3	-	144	hypothetical protein
240	CDS	146939	146658	-2	-	282	hypothetical protein
241	CDS	147607	146936	-1	-	672	hypothetical protein
242	CDS	147900	147604	-3	-	297	hypothetical protein
243	CDS	148208	147897	-2	-	312	hypothetical protein
244	CDS	149566	148235	-1	-	1332	DNA helicase
245	CDS	149850	149563	-3	-	288	hypothetical protein
246	CDS	150562	150029	-1	-	534	dUTPase
247	CDS	151598	150570	-2	-	1029	DNA primase (EC 2.7.7.-) / DNA helicase (EC 3.6.1.-), phage-associated
248	CDS	151789	151598	-1	-	192	hypothetical protein
249	CDS	152007	151786	-3	-	222	hypothetical protein
250	CDS	152162	152004	-2	-	159	hypothetical protein
251	CDS	152646	152152	-3	-	495	hypothetical protein
252	CDS	153386	152652	-2	-	735	hypothetical protein
253	CDS	153762	153367	-3	-	396	hypothetical protein
254	CDS	153989	153759	-2	-	231	hypothetical protein
255	CDS	154339	154085	-1	-	255	hypothetical protein
256	CDS	154628	154419	-2	-	210	hypothetical protein
257	CDS	156103	154664	-1	-	1440	DNA helicase
258	CDS	156418	156113	-1	-	306	Phage head assembly chaperone protein (T4-like gp40)
259	CDS	157603	156458	-1	-	1146	recombination protein
260	CDS	160389	157684	-3	-	2706	hypothetical protein
261	CDS	160699	160382	-1	-	318	hypothetical protein
262	CDS	161130	160768	-3	-	363	Phage endoribonulcase

							translational repressor of early genes, regA
263	CDS	161712	161140	-3	-	573	Phage DNA polymerase clamp loader subunit Gp62
264	CDS	162712	161714	-1	-	999	Replication factor C small subunit / Phage DNA polymerase clamp loader subunit
265	CDS	163442	162777	-2	-	666	hypothetical protein
266	CDS	163747	163463	-1	-	285	RpbA RNA polymerase binding protein
267	CDS	164773	163793	-1	-	981	putative single-stranded DNA binding protein
268	CDS	165442	164777	-1	-	666	Phage DNA helicase loader
269	CDS	165690	165439	-3	-	252	hypothetical protein
270	CDS	165955	165692	-1	-	264	DsbA dsDNA binding
271	CDS	166900	165965	-1	-	936	Phage ribonuclease H (EC 3.1.26.4)
272	CDS	167217	167732	3	+	516	T4-like phage RNA polymerase sigma factor for late transcription
273	CDS	167729	167956	2	+	228	hypothetical protein
274	CDS	167940	168284	3	+	345	a-gt.4 conserved hypothetical protein
275	CDS	168311	169330	2	+	1020	recombination endonuclease subunit
276	CDS	169323	169613	3	+	291	hypothetical protein
277	CDS	169588	171291	1	+	1704	recombination endonuclease subunit
278	CDS	171354	171476	3	+	123	hypothetical protein
279	CDS	171548	173251	2	+	1704	hypothetical protein
280	CDS	173312	173644	2	+	333	hypothetical protein
281	CDS	173641	173868	1	+	228	hypothetical protein
282	CDS	173847	174122	3	+	276	hypothetical protein
283	CDS	174119	174700	2	+	582	dihydrofolate reductase
284	CDS	174702	175556	3	+	855	thymidylate synthase
285	CDS	175597	177846	1	+	2250	Ribonucleotide reductase of class Ia (aerobic), alpha subunit (EC 1.17.4.1)
286	CDS	179423	178506	-2	-	918	Malonate utilization trans-

							criptional regulator
287	CDS	181278	179581	-3	-	1698	Malate:quinone oxidoreductase (EC 1.1.5.4)
288	CDS	182401	181481	-1	-	921	Glucokinase regulatory protein
289	CDS	182707	184323	1	+	1617	Fumarate respiration sensor kinase protein DcuS
290	CDS	184320	185039	3	+	720	Fumarate respiration two-component response regulator DcuR
291	CDS	185970	185020	-3	-	951	FAD:protein FMN transferase (EC 2.7.1.180)
292	CDS	188810	186033	-2	-	2778	redox proteins related to the succinate dehydrogenases and fumarate reductases
293	CDS	189450	190955	3	+	1506	2-oxoglutarate/malate translocator
294	CDS	191011	192621	1	+	1611	Fumarate hydratase class I, anaerobic (EC 4.2.1.2)
	RE-PEAT	1	127	1	+	127	repeat region
	RE-PEAT	178351	178477	1	+	127	repeat region
tRNA	RNA	5903	5976	2	+	74	tRNA-Met-CAT
tRNA	RNA	5985	6057	3	+	73	tRNA-Gly-TCC

SECUENCIA FASTA vB_EcRAM-01

```
>Enterobacter phage vB_EcRAM-01
CACGACGCTCCACACGCAAGGTGTACATAGCATTTTTAGCGCCAGAAGAA-
ATGAAGTATGTCGCGGTAAC TTTAGTCAGGTTAGTCATGGTGAATCTCCT-
TAGTGTAGTGGTTTCGTTTCGACAAGGCCAATATAGCAAAAGCCCTCAAC-
CGAAGTCAAGGGCTTTTTATCATTCAATTCGAATCTTTCATAACTTTATGAA-
GATGAATGTCAAAAATTTCCAGTATGCCTTCCGCGAGGATAAATTTTT-
GCTTTTTCTATGTCCTCGT TACTACCCCATGTGTTATTTGGGTTTCTGCAA-
CGATTTTTTGTATAATCCGTGTGCCAAAACAATCGCTGAAC-
CGACGATTCTGTACCCAGTGGATCATCTTTGCTGAACAGAATTTGTGAACT-
CATAGGAAGAAACCTGTTTCGAACTACTAAATCGATCTGTTTTCCGGTATCA-
GTGGCGCTTTATCATCAACGTTGCACTGGTAATACATTCCGACATACT-
CATGAGGAATGTTGGACTCATTCGCCCATTTACAGGTTGT-
CATCTGTACGCGGCCCTAACATGAGGTTACAGATATT-
GACTGCATGATCCTGTTCTGGGGTGTGTGTCGCATCCGTTACATAATGAC-
CGTGAGCGGTTTTGAGGATTTCAATGATATCTTCGTCGGCTTCGACAAGATA-
CAGCCCCGTATTTTCGGGGATTTCTCAAGAATAATCAAAGCGGTTTTTCAT-
CACACTTACCTTTATGTTTCTGTTTACGTTTTGCTTCTTTAAGTGCTCGCTT-
GCGATCGCGGTGAGTAGAAGCGCGGTTGAAATCATGTTTAGCTACCAGGTT-
GTTCATTTTAAAGCCCCTCAAAAAGAAATATTTAAGGGGCTTTCGCCCTA-
GAATTAATCCAGCAGTTTGC GGATTTTATCTGCGATACGTCCGGCGCGGGTT-
GCGCTTGCGGTGTGGTCGCTTTCTTTGGTAGCCAGTTCAGCCAGCTT-
GCGCTGATGTTCTTCTTCCGCTGCTTTGCGGTCTGCGGCTACCTGCTCGAC-
CTGTTGCTGATCGTGCGCAATACGCGCTTCGAGTTCGGTCAGGGTTTT-
GTCGAAAGTTGCTACGATTTTATCTACAGAACGGATTTTGAAAACAGTTT-
CATATTCATTATCTCAATTAGTATGGTTGGAATTCAAAGTCAAACAGAT-
CATTTAGTGCGCGGTTGTATTCAGTGTAGTTCTCACCATCCCCGAAC-
CGCATCTGAATCGCGCTTTCGGCTATTGTACCAGTAAGATTTGAGAAACCAA-
AGAGGTTTTTTAATCTTATCGTGTGCAACGAAGTACAGAGAAGCACTATCCA-
GTAAAGCAACCATCGCTGATGGTTCGTGTTTCGCGGCGTTTGATACGTAACA-
GAGTACGTTTTGCGCCAGTCTTGC GGCGTTGATTTGGGGCTACGTAGAA-
TCGGAATACTACTTTACCCGTTTTGTCATCAACTACCAGGTAGAA-
GCCGTGTTCTTTCAGGTCAACCCCTTCGAACTTGGTGAAGTCACCGCGCTT-
CATGTCACCTATCTTAACAGCATATTTGTGGATGTCAAGCCTTGTCAGAA-
TTCTTTTTGTCATTTTCTTTTACCAGTTTATTTCCGAATTTTCGTGTTGATACCA-
GTATGGTGGTTTACAGTCATCGCTACAATGAAGATAGGAGACACTAAAACA-
AGCATCACTACCCCGAACAACAAGCGGATTATGCGAATAAACGCAA-
TGCCGAACCATTCCAGTGCTTTTTTCGATCCATTTCTGAACCGTTCCGAGTAC-
CAGCATAACATAACCCATGTTAAATACAAGTGCTACAGCGATAAAGCCGAA-
AGGTTTTTTGAAATATGTTTGTTCGCCGTCTTTTGACCATCCAGCAAGCG-
GATTGCCGTCATTCCATAGATTTTTTCGCGTCTTTAATAGCCGCTTTAC-
CGTTTTTTGATGTGTTCCCATGAATCGGGAACCCCTTCAAGGAATCTCATAAT-
CAAATCCTATGCGCCTGAATCGCTCCAGGCGCTGTTGTTGGGT-
TAGTAGTGAATAAATCCTACAGTCACATCGCGCATCACCTGATAACGGCA-
```

```
TACACGCATCTTAGCGTTATCGTAATCCGTGGGGATTGCTACAACAT-
CACGCGGGTTAACTTTAACCTGAATGACTTTGCCACGTCCGCCGCCA-
TAGTGAGGCAGATACGATTTAGCCGCAACGTGCAACCCGCATGAACA-
GGTTCGGTTTTTGTCTCTCGTCTACCTGGTTACGTGGCATTTC AACCAACA-
CCAGGGGAGTTATCGAACTTACCGGAAGCCAGATCGCGGAAGTCTT-
CACGAAC
```

Figura 41. Parte de la secuencia de genoma completo en formato fasta del vB_ECRAM-01.

12 ANTIBIOGRAMAS DE LAS CEPAS CLÍNICAS USADAS PARA EL RANGO DE HUÉSPED.

Antibiograma # 1 para: *Enterobacter cloacae complex*

Antibiótico	Valor	Interpretación	Método ATB
Acido nalidixico	>=32 ug/ml	Resistente	VITEK
Amikacina	8 ug/ml	Sensible	VITEK
Cefepime	>=64 ug/ml	Resistente	VITEK
Cefotaxima	>=64 ug/ml	Resistente	VITEK
Ceftazidima	>=64 ug/ml	Resistente	VITEK
Cefuroxima acetil	>=64 ug/ml	Resistente	VITEK
Ciprofloxacina	>=4 ug/ml	Resistente	VITEK
Gentamicina	>=16 ug/ml	Resistente	VITEK
Imipenem	>=16 ug/ml	Resistente	VITEK
Meropenem	>=16 ug/ml	Resistente	VITEK
Nitrofurantoina	32 ug/ml	Sensible	VITEK
Piperacilina tazobactam	>=128 ug/ml	Resistente	VITEK
Trimetoprima sulfametoxazol	>=320 ug/ml	Resistente	VITEK

Figura 42. Sensibilidad a los antibióticos de cepa clínica de *E. cloacae* utilizada en este estudio.

Antibiograma # 1 para: *Escherichia coli*

Antibiótico	Valor	Interpretación	Método ATB
Amikacina	<=2 ug/ml	Sensible	VITEK
Ampicilina/sulbactam	16 ug/ml	Sensible	VITEK
Ble		Positiva	VITEK
Cefazolina	>=64 ug/ml	Resistente	VITEK
Cefepime	4 ug/ml	Resistente	VITEK
Cefotaxima	>=64 ug/ml	Resistente	VITEK
Ceftazidima	8 ug/ml	Resistente	VITEK
Cefuroxima acetil	>=64 ug/ml	Resistente	VITEK
Cefuroxima sodica	>=64 ug/ml	Resistente	VITEK
Ciprofloxacina	>=4 ug/ml	Resistente	VITEK
Ertapenem	<=0.5 ug/ml	Sensible	VITEK
Gentamicina	<=1 ug/ml	Sensible	VITEK
Imipenem	<=0.25 ug/ml	Sensible	VITEK
Meropenem	<=0.25 ug/ml	Sensible	VITEK
Piperacilina tazobactam	<=4 ug/ml	Sensible	VITEK
Tigeciclina	<=0.5 ug/ml	Sensible	VITEK
Trimetoprima sulfametoxazol	>=320 ug/ml	Resistente	VITEK

Figura 43. Sensibilidad a los antibióticos de cepa clínica de *E. coli* utilizada en este estudio

Antibiograma # 1 para: <i>Escherichia coli</i>			
Antibiótico	Valor	Interpretación	Método ATB
Amikacina	<=2 ug/ml	Sensible	VITEK
Ampicilina/sulbactam	>=32 ug/ml	Resistente	VITEK
Blee		Negativa	VITEK
Cefazolina	<=4 ug/ml	Sensible	VITEK
Cefepime	<=1 ug/ml	Sensible	VITEK
Cefotaxima	<=1 ug/ml	Sensible	VITEK
Ceftazidima	<=1 ug/ml	Sensible	VITEK
Cefuroxima acetil	4 ug/ml	Sensible	VITEK
Cefuroxima sodica	4 ug/ml	Sensible	VITEK
Ciprofloxacina	>=4 ug/ml	Resistente	VITEK
Ertapenem	<=0.5 ug/ml	Sensible	VITEK
Gentamicina	<=1 ug/ml	Sensible	VITEK
Imipenem	<=0.25 ug/ml	Sensible	VITEK
Meropenem	<=0.25 ug/ml	Sensible	VITEK
Piperacilina tazobactam	<=4 ug/ml	Sensible	VITEK
Tigeciclina	<=0.5 ug/ml	Sensible	VITEK
Trimetoprima sulfametoxazol	<=20 ug/ml	Sensible	VITEK

Figura 44. Sensibilidad a los antibióticos de cepa clínica de *E. coli* utilizada en este estudio

Antibiograma # 1 para: <i>Enterobacter cloacae complex</i>			
Antibiótico	Valor	Interpretación	Método ATB
Amikacina	<=2 ug/ml	Sensible	VITEK
Cefepime	<=1 ug/ml	Sensible	VITEK
Cefotaxima	<=1 ug/ml	Sensible	VITEK
Ceftazidima	<=1 ug/ml	Sensible	VITEK
Cefuroxima acetil	16 ug/ml	Resistente	VITEK
Ciprofloxacina	<=0.25 ug/ml	Sensible	VITEK
Ertapenem	<=0.5 ug/ml	Sensible	VITEK
Gentamicina	<=1 ug/ml	Sensible	VITEK
Imipenem	0.5 ug/ml	Sensible	VITEK
Meropenem	<=0.25 ug/ml	Sensible	VITEK
Piperacilina tazobactam	<=4 ug/ml	Sensible	VITEK
Tigeciclina	1 ug/ml	Sensible	VITEK
Trimetoprima sulfametoxazol	<=20 ug/ml	Sensible	VITEK

Figura 45. Sensibilidad a los antibióticos de cepa clínica de *E. cloacae* utilizada en este estudio

Antibiograma # 1 para: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Antibiótico	Valor	Interpretación	Método ATB
B-lactamasa	Pos0 ug/ml	Positiva	VITEK
Ciprofloxacina	<=0.5 ug/ml	Sensible	VITEK
Clindamicina	<=0.25 ug/ml	Sensible	VITEK
Eritromicina	<=0.25 ug/ml	Sensible	VITEK
Gentamicina	<=0.5 ug/ml	Sensible	VITEK
Levofloxacina	0.25 ug/ml	Sensible	VITEK
Linezolid	2 ug/ml	Sensible	VITEK
Minociclina	<=0.5 ug/ml	Sensible	VITEK
Moxifloxacina	<=0.25 ug/ml	Sensible	VITEK
Nitrofurantoina	32 ug/ml	Sensible	VITEK
Oxacilina	>=4 ug/ml	Resistente	VITEK
Oxacilina cim	>=4 ug/ml	Resistente	VITEK
Quinupristin/dalfopristin	<=0.25 ug/ml	Sensible	VITEK
Resistencia inducible clindamicina	Neg0 ug/ml	Negativa	VITEK
Rifampicina	<=0.5 ug/ml	Sensible	VITEK
Screening cefoxitina	Pos0 ug/ml	Positiva	VITEK
Teicoplanina	<=0.5 ug/ml	Sensible	VITEK
Tetraciclina	>=16 ug/ml	Resistente	VITEK
Trimetoprima sulfametoxazol	<=10 ug/ml	Sensible	VITEK
Vancomicina	<=0.5 ug/ml	Sensible	VITEK

Figura 46. Sensibilidad a los antibióticos de cepa clínica de *S. aureus* utilizada en este estudio

Antibiograma # 1 para: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
Antibiótico	Valor	Interpretación	Método ATB
Amikacina	<=2 ug/ml	Sensible	VITEK
Cefazolina	>=64 ug/ml	Resistente	VITEK
Cefepime	4 ug/ml	Sensible	VITEK
Ceftazidima	4 ug/ml	Sensible	VITEK
Ciprofloxacina	<=0.25 ug/ml	Sensible	VITEK
Gentamicina	2 ug/ml	Sensible	VITEK
Imipenem	2 ug/ml	Sensible	VITEK
Meropenem	0.5 ug/ml	Sensible	VITEK
Piperacilina tazobactam	8 ug/ml	Sensible	VITEK

Figura 47. Sensibilidad a los antibióticos de cepa clínica de *P. aeruginosa* utilizada en este estudio

Antibiograma # 1 para: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Antibiótico	Valor	Interpretación	Método ATB
B-lactamasa	Pos0 ug/ml	Positiva	VITEK
Ciprofloxacina	<=0.5 ug/ml	Sensible	VITEK
Clindamicina	<=0.25 ug/ml	Sensible	VITEK
Eritromicina	<=0.25 ug/ml	Sensible	VITEK
Gentamicina	<=0.5 ug/ml	Sensible	VITEK
Levofloxacina	<=0.12 ug/ml	Sensible	VITEK
Linezolid	2 ug/ml	Sensible	VITEK
Minociclina	<=0.5 ug/ml	Sensible	VITEK
Moxifloxacina	<=0.25 ug/ml	Sensible	VITEK
Nitrofurantoina	<=16 ug/ml	Sensible	VITEK
Oxacilina	2 ug/ml	Sensible	VITEK
Oxacilina cim	2 ug/ml	Sensible	VITEK
Quinupristin/dalfopristin	<=0.25 ug/ml	Sensible	VITEK
Resistencia inducible clindamicina	Neg0 ug/ml	Negativa	VITEK
Rifampicina	<=0.5 ug/ml	Sensible	VITEK
Screening cefoxitina	Neg0 ug/ml	Negativa	VITEK
Teicoplanina	<=0.5 ug/ml	Sensible	VITEK
Tetraciclina	<=1 ug/ml	Sensible	VITEK
Trimetoprima sulfametoxazol	<=10 ug/ml	Sensible	VITEK
Vancomicina	1 ug/ml	Sensible	VITEK

Figura 48. Sensibilidad a los antibióticos de cepa clínica de *S. aureus* utilizada en este estudio

Antibiograma # 1 para: <i>Enterobacter cloacae complex</i>			
Antibiótico	Valor	Interpretación	Método ATB
Acido nalidixico	<=2 ug/ml	Sensible	VITEK
Amikacina	<=2 ug/ml	Sensible	VITEK
Cefepime	2 ug/ml	Sensible	VITEK
Cefotaxima	>=64 ug/ml	Resistente	VITEK
Ceftazidima	>=64 ug/ml	Resistente	VITEK
Cefuroxima acetil	>=64 ug/ml	Resistente	VITEK
Ciprofloxacina	<=0.25 ug/ml	Sensible	VITEK
Ertapenem	<=0.5 ug/ml	Sensible	VITEK
Gentamicina	<=1 ug/ml	Sensible	VITEK
Imipenem	<=0.25 ug/ml	Sensible	VITEK
Meropenem	<=0.25 ug/ml	Sensible	VITEK
Nitrofurantoina	<=16 ug/ml	Sensible	VITEK
Piperacilina tazobactam	>=128 ug/ml	Resistente	VITEK
Trimetoprima sulfametoxazol	<=20 ug/ml	Sensible	VITEK

Figura 49. Sensibilidad a los antibióticos de cepa clínica de *E. cloacae complex* utilizada en este estudio

Antibiograma # 1 para: <i>Acinetobacter baumannii</i> complex			
Antibiótico	Valor	Interpretación	Método ATB
Ampicilina/sulbactam	4 ug/ml	Resistente	VITEK
Cefazolina	>=64 ug/ml	Resistente	VITEK
Cefepime	>=64 ug/ml	Resistente	VITEK
Cefotaxima	>=64 ug/ml	Resistente	VITEK
Ceftazidima	>=64 ug/ml	Resistente	VITEK
Ciprofloxacina	>=4 ug/ml	Resistente	VITEK
Gentamicina	4 ug/ml	Sensible	VITEK
Imipenem	1 ug/ml	Sensible	VITEK
Meropenem	1 ug/ml	Sensible	VITEK
Piperacilina tazobactam	>=128 ug/ml	Resistente	VITEK
Tigeciclina	1 ug/ml	Sensible	VITEK
Trimetoprima sulfametoxazol	160 ug/ml	Resistente	VITEK

Figura 50. Sensibilidad a los antibióticos de cepa clínica de *A. baumannii* complex utilizada en este estudio