

GMD

Facultad Cs. Médicas
Biblioteca



TDM 2323



**“BACTERIÓFAGOS COMO
HERRAMIENTAS DE INTERVENCIÓN
ANTI-BACTERIANA: AISLAMIENTO,
CARACTERIZACIÓN Y USOS
BIOMÉDICOS”**

**Tesis para optar el título de “Doctora en Ciencias
Biomédicas”**

***Carina A. Boncompain
Médica Especialista en Dermatología***

***Director: Dr. Héctor Morbidoni
Lugar de trabajo: Laboratorio de
Microbiología Molecular, Fac. de
Ciencias Médicas, UNR.***

INDICE

INDICE.....	1
Abreviaturas.....	7
RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN.....	11
<i>Staphylococcus aureus</i> : generalidades y contexto histórico.....	12
<i>S. aureus</i> : factores de virulencia.....	15
Sistemas reguladores: <i>agr</i>	16
Producción de biopelículas (biofilms).....	17
Estudio del casete de resistencia a meticilina (SCC <i>mec</i>)	18
Portación nasal de <i>S. aureus</i>	21
Portación nasal en la población	22
Portación nasal en personal de salud	23
Rol de <i>S. aureus</i> en las dermatosis crónicas.....	23
Bacteriófagos.....	24
Generalidades	24
Historia de la terapia fágica	25
Morfología y clasificación de los bacteriófagos.....	26
Bacteriófagos de <i>Staphylococcus</i>	29
Organización genómica	30
Interacciones fago-bacteria.....	32
Endolisinas	33
Ciclo de producción de endolisinas en los bacteriófagos	34
Estructura de las endolisinas.....	36

Retomando y reformulando viejas terapéuticas, en la era de la resistencia	37
OBJETIVOS.....	40
Objetivo general	41
Objetivos específicos:.....	41
MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
Cepas utilizadas como control.....	44
Medios de cultivos y conservación de microorganismos	45
Medios de cultivo y soluciones para bacteriófagos de <i>S. aureus</i>	45
Aislamiento y caracterización de cepas de <i>S. aureus</i> a partir de hisopados nasales ..	45
Obtención de los hisopados nasales	45
Aislamiento, tipificación y caracterización fenotípica de <i>Staphylococcus aureus</i> . 47	
Caracterización molecular de las cepas aisladas	48
Extracción de ADN de las cepas aisladas.....	48
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	49
Electroforesis en gel de agarosa	49
Tipificación mediante PCR múltiple	49
Locus <i>agr</i>	51
Funcionalidad del locus <i>agr</i>	51
Producción de biofilms: <i>ica</i>	52
Funcionalidad del gen <i>ica</i>	52
Toxina: <i>sei</i>	52
Leucocidina de Panton-Valentine (PVL)	52
Estudio del casete de resistencia a meticilina (<i>SCCmec</i>)	52
Presencia del trasposon Tnp20	54
Ensayos con bacteriófagos.....	54
Procesamiento de muestras para el aislamiento de fagos	54
Búsqueda de fagos ambientales	54

Inducción de fagos lisógenos en cepas de <i>S. aureus</i> por tratamiento con mitomicina C	55
Búsqueda de bacteriófagos a partir de hisopados nasales	55
Detección de fagos.....	55
Amplificación de los bacteriófagos en TS agar.....	56
Titulación de los bacteriófagos.....	56
Amplificación en medio líquido	57
Optimización de la amplificación en medio líquido.....	57
Caracterización de los bacteriófagos	57
Temperatura de amplificación y morfología de placa	57
Determinación de los tamaños genómicos aproximados de los fagos aislados.....	57
Análisis de los viriones por microscopía electrónica de transmisión	58
Determinación del rango de hospedador de los bacteriófagos	58
Extracción de ADN fágico y secuenciación genómica	59
Anotación genómica.....	59
Búsqueda bioinformática de endolisinas	60
Clonado y expresión de las endolisinas.....	60
RF clonng	61
Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	62
Purificación de las endolisinas	63
Dosaje de proteínas.....	63
Ensayos de actividad de endolisinas.....	64
Zimogramas.....	64
Lisis en placas.....	64
Lisis en TS líquido.....	64
Rango de lisis de las endolisinas Mat_N y 320	65

Análisis estadísticos.....	65
RESULTADOS Y DISCUSIONES	66
Capítulo 1: Aislamiento y caracterización de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> en portadores nasales.....	67
Perfil de resistencia a antibiótico en las cepas aisladas	68
Caracterización molecular de las cepas aisladas	69
<i>Agr</i>	69
Producción de Biofilms	69
Leucocidina de Panton-Valentine (PVL)	71
<i>Sei</i>	71
Estudio del casete de resistencia a meticilina (SCC <i>mec</i>)	71
Potación nasal de <i>S. aureus</i> en personal de salud.....	73
Distribución de la portación nasal según el sexo y la edad	74
Análisis multivariado.....	74
Comparación entre ambos efectores de salud.....	75
Rol de <i>Staphylococcus aureus</i> en dermatosis crónicas	76
Análisis multivariado.....	77
Discusión del Capítulo 1	78
Portación nasal de <i>S. aureus</i>	80
Análisis de la portación en psoriasis.....	82
Capítulo 2: Aislamiento y caracterización de bacteriófagos de <i>Staphylococcus aureus</i>	83
Búsqueda de bacteriófagos	83
Aislamiento a partir de muestras de tierra	83
Inducción con mitomicina C.....	83
Búsqueda espontanea a partir de hisopados nasales.....	84
Caracterización de los bacteriófagos aislados	84
Morfología de la placa de lisis a diferentes temperaturas	84

Determinación del tamaño genómico mediante Electroforesis en campo pulsante (PFGE).....	85
Análisis morfológico de los viriones mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM)	86
Rango de hospedador de los bacteriófagos.....	87
Amplificación en medio líquido	91
Optimización de la amplificación en medio líquido.....	91
Amplificación en medio líquido de los fagos Mat_T, K y CG.....	93
Análisis Bioinformático.....	94
Secuenciación genómica.....	94
Anotación genómica	94
Características genómicas generales	96
Genómica comparativa	96
Conclusiones y discusión del Capítulo 2.....	99
Capítulo 3: endolisinas	102
Búsqueda bioinformática de endolisinas	102
Clonado y expresión de las endolisinas I74, Mat_N, 320 y CG.....	104
Purificación de las endolisinas	104
Ensayos de actividad de endolisinas	105
Análisis de la actividad mediante el uso de zimogramas	105
Lisis en placas.....	106
Lisis en TS líquido.....	107
Rango de lisis en placa de las endolisinas Mat_N y 320.....	107
Discusión del Capítulo 3	110
CONCLUSIONES.....	113
Capítulo 1: Aislamiento y caracterización de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	114
Capítulo 2: Aislamiento y caracterización de bacteriófagos de <i>S. aureus</i>	115

Capítulo 3: Endolisinas.....	116
ANEXO	118
BIBLIOGRAFÍA	125

ABREVIATURAS

- **ADNdh:** ácido desoxirribonucleico doble hebra
- **ADNsh:** ácido desoxirribonucleico simple hebra
- **AIP:** (del inglés autoinducing peptide) péptido autoinductor
- **AMI-2:** amidase 2 domain
- **AMI-3:** amidase 3 domain
- **ARNdh:** ácido ribonucleico doble hebra
- **ARNsh:** ácido ribonucleico simple hebra
- **ARNt:** ácido ribonucleico de transferencia
- **ATCC:** American Type Culture Collection
- **BF:** buffer de fagos (BF).
- **CBD:** dominios de unión a pared
- **ccr:** del inglés cassette chromosome recombinase
- **CDC:** Centers for Disease Control and Prevention
- **CHAP:** cysteine- and histidine-dependent amidohydrolase/peptidase
- **CLSI:** del inglés Clinical Laboratory Standards Institute
- **CRISPR:** del inglés, **C**lusters of **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**egions
- **DO:** densidad óptica
- **EAD:** dominio enzimáticamente activo
- **ECDC:** European Centre for Disease Prevention and Control
- **EGM:** elementos genéticos móviles
- **FDA:** Food and Drug Administration de EE. UU
- **FOX:** cefoxitina
- **hdl:** hemolisina δ
- **HEEP:** Hospital Escuela Eva Perón
- **HPC:** Hospital Provincial del Centenario
- **HVR:** región hipervariable
- **LB:** medio de cultivo Luria Bertani
- **LYSO:** del inglés phage lysozyme domain
- **MCA:** análisis de las correspondencias múltiples

- **MDR:** multirresistentes
- **MH:** Caldo Mueller Hinton
- **MHA:** Agar Mueller Hinton
- **MLST:** del inglés Multilocus sequence typing
- **MOI:** multiplicidad de infección
- **MSA:** Agar Manitol Salado
- **NARSA:** Network on antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **ORF:** del inglés, Open Reading Frame, marcos abiertos de lectura
- **pb:** pares de base
- **PBP2a:** proteína alternativa de unión a penicilina
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- **PET-M23:** peptidase domain M23
- **PFGE:** del inglés Pulse Field Gel Electrophoresis, Electroforesis en gel de agarosa por campo pulsante
- **PIA:** polisacárido de adhesión intercelular
- **PM:** marcador de peso molecular
- **Ps:** Psoriasis
- **PSM:** modulinas solubles en fenol
- **PVL:** Leucocidina de Pantón-Valentine
- ***S. aureus:*** *Staphylococcus aureus*
- ***S. epidermidis:*** *Staphylococcus epidermidis*
- **SAMR:** *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina
- **SAMR-CA:** *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina de origen comunitario
- **SAMR-HA:** *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina asociadas al medio hospitalario
- **SAMS:** *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina
- **SAPIs:** (del inglés *Staphylococcus aureus* Pathogenicity Islands) islas de patogenicidad
- **SCCmec:** casete de resistencia a meticilina
- **SDS-PAGE:** Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

- **SH3:** del inglés, src Homology-3
- **SN:** sobrenadantes
- **ST:** sequence type
- **TEM:** microscopía electrónica de transmisión
- **TLR2:** toll like receptor tipo 2
- **TMS:** trimetoprima – sulfametoxazol
- **TS:** Caldo de Tripteína-Soya
- **TSA:** Agar Tripteína-Soya
- **VISA:** *S. aureus* con susceptibilidad reducida a la vancomicina
- **VRSA:** *S. aureus* con resistencia completa a Vancomicina

RESUMEN

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) tiene gran importancia como agente infeccioso tanto en humanos como en animales, provocando una serie de infecciones de distinto grado de severidad, que pueden tener implícito un riesgo a la vida. Debido al aumento de resistencia a antibióticos -especialmente a β -lactámicos- estas infecciones pueden requerir cambios de los mismos, no existiendo demasiadas opciones terapéuticas. Por ello, el uso de bacteriófagos (fagos) y enzimas codificadas por los mismos (endolisinas) como agentes antibacterianos, día a día recobra mayor interés.

Durante el desarrollo de esta tesis se aislaron 148 cepas de *S. aureus* de dos orígenes: hisopados nasales de personal de salud del Hospital Provincial del Centenario (HPC) y del Hospital Escuela Eva Perón (HEEP) y de pacientes con psoriasis (Ps). Estas cepas fueron tipificadas fenotípicamente y genotípicamente.

De las muestras tomadas se aislaron 33 bacteriófagos específicos contra *S. aureus*, tanto directamente como por la inducción de profagos; de ellos se caracterizaron 7 en detalle. También se clonaron, y purificaron tres endolisinas (lisinas) codificadas por bacteriófagos, a dos de las cuales se les probó actividad.

En conclusión, la realización de este trabajo de tesis permitió la caracterización parcial de cepas de *S. aureus* circulantes en el ámbito hospitalario y en pacientes con psoriasis. El aislamiento y caracterización de bacteriófagos específicos con actividad lítica contra esta bacteria es de importancia por su rol como agentes de biocontrol y además el conocimiento de los genes codificados por los mismos nos revelan su potencial rol como agentes de transferencia de genes patogénicos. Por último, la obtención de enzimas líticas con capacidad de destruir numerosas cepas de *S. aureus* tiene un alto interés académico y comercial.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El comienzo del uso terapéutico de la penicilina, “la droga maravilla” reportada por A. Fleming en 1928, comenzó la era de los antibióticos en 1944 y desde entonces el gran desarrollo de la medicina moderna. Sin embargo, el uso persistente de antibióticos, la automedicación y la exposición a la adquisición de infecciones dentro de los hospitales han provocado la aparición de bacterias multirresistentes (MDR), que son las responsables del 15,5% de las infecciones hospitalarias adquiridas en el mundo. El término "ESKAPE" abarca seis de estos patógenos con creciente resistencia a múltiples fármacos y virulencia: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacter spp.* Los patógenos agrupados bajo este acrónimo son responsables de la mayoría de las infecciones nosocomiales. y son capaces de "escapar" de la acción biocida de los agentes antimicrobianos (1, 2).

Founou y col, publicaron una revisión sistemática sobre el impacto clínico y económico de la resistencia a los antibióticos en 2017, reportando que los patógenos ESKAPE son asociado con un mayor riesgo de mortalidad, lo que resulta en un aumento de los costos de la atención médica (3). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en el año 2050 la resistencia bacteriana ocasionara 10 millones de muertes (4). Dicha organización publicó, recientemente una lista en la que se incluyen a los microorganismos ESKAPE, dentro de las 12 bacterias que necesitan urgentemente de nuevas terapéuticas, clasificándolos en 3 categorías de prioridades: crítica, alta y media; *S. aureus* se ubica dentro de la categoría de prioridad alta (5).

Por lo tanto, es importante encontrar formas alternativas de tratar infecciones, especialmente las causadas por los patógenos ESKAPE. Una alternativa que fue utilizada por casi 25 años y luego dejada de lado por el surgimiento de los antibióticos, la constituyen los bacteriófagos, depredadores naturales de las bacterias, descubiertos al principio de 1900; otra opción la constituye utilizar una enzima lítica derivada de los fagos llamada “endolisina” (6, 7).

***Staphylococcus aureus*: generalidades y contexto histórico**

S. aureus es una bacteria Gram positiva, catalasa y coagulasa positiva, que puede ser considerado tanto un comensal como un patógeno y se encuentra presente en las fosas

nasales en un cuarto de la población general sin causar aparentemente enfermedad. Dada su capacidad de interactuar con el sistema inmune y de ser considerado tanto un comensal como un patógeno, *S. aureus* puede ser etiquetado como “patobionte”, un microorganismo que normalmente es comensal pero que bajo ciertas circunstancias puede tornarse patogénico (8, 9). La fuente usual de la infección es la colonización de las fosas nasales. La diseminación del microorganismo en el contexto nosocomial ocurre por aerosoles y por contacto persona-persona entre el personal hospitalario y los pacientes, también esta diseminación ocurriría en la comunidad y entre los miembros de la familia (10). Este microorganismo puede generar desde infecciones localizadas como impétigo, celulitis, absceso, neumonía; hasta infecciones severas como endocarditis, osteomielitis y sepsis que pueden conducir al paciente a la muerte. Particularmente los pacientes quemados presentan un gran riesgo de infección por este patógeno debido al daño de la barrera cutánea. *S. aureus* es la bacteria que más frecuentemente se encuentra en los aislados de pacientes internados y la segunda en frecuencia en pacientes ambulatorios (8).

S. aureus está equipado con un repertorio de factores de virulencia, que le permiten adaptarse a las diferentes condiciones ambientales; dentro de estos se encuentran las toxinas, mediante las cuales puede generar el síndrome de shock tóxico, las enfermedades estafilocócicas transmitidas por alimentos y el síndrome de piel escaldada (11).

Un problema importante asociado con este patógeno es el notable nivel de adquisición de resistencia contra múltiples clases de antibióticos, lo que complica el tratamiento. La historia del conocimiento de *S. aureus* se remonta a 1880, cuando Alexander Ogston lo aisló de una infección de herida quirúrgica. Antes de la introducción de la penicilina a principios de 1940, la mortalidad por infecciones por *S. aureus* era de casi un 80%, disminuyendo drásticamente luego de la introducción de este fármaco, sin embargo, tan solo a 2 años de estar en el mercado comienzan a aparecer cepas penicilino - resistentes, y ya en 1945 el 80% de los aislados en muestras clínicas lo era. Esta resistencia se debe a la adquisición de un plásmido que contiene al gen *blaZ*, el cual codifica una enzima con actividad penicilinasas. Esta enzima codificada por el plásmido es fácilmente transferible a través de transducción o conjugación por lo que actualmente entre el 90 al 95% de las cepas de *S. aureus* en todo el mundo son resistentes a la penicilina (11, 12).

La meticilina se dispuso para uso clínico en 1959 como la primera penicilina semisintética resistente a β -lactamasa. Sin embargo, dentro del año de su introducción surge *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SAMR). Estas cepas se informaron por primera vez en 1961 en el Reino Unido y adquirieron resistencia mediante la incorporación del gen *mecA*. Dicho gen codifica una proteína alternativa de unión a penicilina (PBP2a) que tiene baja afinidad para la familia de antibiótico β -lactámicos. La presencia de PBP2a implica resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes) excepto ceftarolina. Esta última es una cefalosporina de “quinta generación” que posee un amplio espectro de acción y es activa frente a SAMR y fue aprobada para su uso en Estados Unidos en el 2010 por la Food and Drug Administration de EE.UU (FDA), pero ya están surgiendo reportes de cepas resistentes a esta droga (11, 13, 14).

El gen *mecA* está ampliamente disperso entre muchas especies de estafilococos y se transporta en un elemento genético móvil llamado casete de resistencia a meticilina (*SCCmec*). Los brotes generados por cepas SAMR fueron reportado en todo el mundo, en un primer momento asociadas al medio hospitalario (SAMR-HA) y ya en la década del 90 comienza a aparecer cepas SAMR de origen comunitario (SAMR-CA) en pacientes más jóvenes, sanos y sin previo contacto con el hospital (11, 15). Estos clones, se acompañan de muchos factores de virulencia como la toxina exfoliativa y la toxina Pantón-Valentine (PVL); por lo que se considera que la patogenicidad de las cepas SAMR-CA es mayor que las de las cepas SAMR-HA. Estas cepas de SAMR-CA tienen menos resistencia a otras familias de antibióticos; sobre todos los clones que son PVL (+) (16). Esta cepas se extendieron rápidamente por todo el mundo, primero en la comunidad, pero luego también en los centros de salud (12). D'Agata y colaboradores estimaron en el 2009 a través de un modelo matemático que las cepas SAMR-CA se transformarían en los SAMR predominantes en los hospitales y centros de salud (17).

El aumento de infecciones severas por cepas SAMR condujo a un mayor uso de la vancomicina. Y esto trajo como consecuencia que ya en 1996, en Japón se reporte el primer aislado clínico de *S. aureus* con susceptibilidad reducida a la vancomicina (VISA), en el 2002 el CDC (Centers for Disease Control and Prevention) reporta en Michigan, Estados Unidos casos de *S. aureus* con resistencia completa a Vancomicina (VRSA).

Estas cepas están mediadas por un grupo de genes *vanA* que provienen de cepas de enterococos resistentes a vancomicina (18, 19).

Kourtis y col reportan que en el año 2017 en EE. UU ocurrieron casi 120.000 casos de infecciones del torrente sanguíneo por *S. aureus* y de estas, 20.000 implicaron la defunción de los pacientes (20). Esta alta morbilidad y mortalidad asociada a la alta frecuencia de cepas resistente a antibióticos, además de ser un serio problema para la salud, genera una alta carga económica al sistema sanitario (8). Las cepas SAMR son un problema creciente en América Latina, las frecuencias de infecciones nosocomiales superan al 50% en más de la mitad de Sudamérica (11). La resistencia a múltiples fármacos se encuentra entre las tres principales amenazas para la salud pública mundial y generalmente son causadas por el uso excesivo y/o incorrecto de antimicrobianos y productos farmacéuticos de baja calidad (21).

***S. aureus*: factores de virulencia**

S. aureus puede ser la causa de un amplio espectro de enfermedades infecciosas debido a los múltiples factores de virulencia que posee y que facilitan su propagación en los tejidos del huésped y su escape de las respuestas inmune. Cuenta con el polisacárido capsular, la coagulasa plasmática, componentes de la matriz extracelular, proteína A, fibronectina, adhesinas, numerosas enzimas bacterianas y toxinas (proteínas extracelulares), como las enterotoxinas estafilocócicas que pertenecen a un grupo de toxinas conocidas como superantígenos de toxinas pirógenas. La mayoría de los factores de resistencia y virulencia de este patógeno se encuentran codificados en elementos genéticos móviles (EGM) que incluyen bacteriófagos e islas genómicas. La transducción a través de bacteriófagos se considera el modo principal de transferencia horizontal de EGM en *S. aureus*, estos virus también están implicados en la movilización de islas de patogenicidad (SAPIs, del inglés *Staphylococcus aureus* Pathogenicity Islands) (22).

Un ejemplo de toxina codificada por un bacteriófago lo constituye la PVL que es una toxina de dos componentes capaz de formar poros en la membrana, especialmente en neutrófilos. La mayoría de las cepas de *S. aureus* resistentes metilina aisladas en infecciones de origen comunitario producen PVL, por lo que, en general, se la considera un marcador molecular de este tipo de cepas. Se la asocia a infecciones de piel y partes blandas y también a neumonía necrotizante en niños y adultos jóvenes (11, 23).

La regulación de los factores de virulencia de *S. aureus* está sujeta a una red compleja e intrincada de factores que integran procesos fisiológicos en respuesta a señales ambientales y del huésped. Esta compleja red permite que se adapte fácilmente a las condiciones cambiantes del entorno y se establezca en los nichos disponibles a través de su ciclo de vida comensal y/o patógeno (24).

Sistemas reguladores: agr

S. aureus cuenta con sistemas reguladores que censan las condiciones ambientales y responden a ellas mediante la regulación de la expresión de diferentes determinantes metabólicos y de virulencia (25). Uno de ellos es el “sistema *agr*” que es un sistema de detección de “quorum sensing” que reacciona frente a la densidad bacteriana facilitando la expresión de adhesinas (proteínas de superficie) durante la fase de crecimiento exponencial (densidad celular baja) y durante la transición de la fase de crecimiento exponencial a la estacionaria (densidad celular alta) regula positivamente la transcripción de genes codificantes de exotoxinas, que no solo se relacionan con la producción de determinadas enfermedades sino que también con la propagación bacteriana, regulando negativamente en este momento la transcripción de genes codificantes de adhesinas. (26-28).

En la Figura 1 se representa la organización de este sistema. Se ha demostrado la existencia de al menos 4 grupos de *agr* en *S. aureus* caracterizados por variaciones específicas, cada uno de ellos codifica un tipo de péptido autoinductor (AIP del inglés autoinducing peptide) (26). La señal del AIP está codificada dentro del péptido AgrD, el cual es procesado y transportado al medio ambiente por AgrB. Cuando la concentración de AIP extracelular alcanza un nivel crítico, la señal es detectada por la histidina quinasa AgrC, que sufre autofosforilación. Luego, el fosfato se transfiere a AgrA, que a su vez puede unirse a los promotores P2 y P3, activando la expresión de RNAII y RNAPIII, respectivamente. El AgrA fosforilado también se une a los promotores de los genes de las modulinas solubles en fenol (PSM), lo que conduce a su expresión. El transcripto de RNAII alberga el operón *agrBDCA*, que codifica la maquinaria primaria para la biosíntesis y detección de AIP. El RNAPIII es la principal molécula efectora del sistema *agr* e activa la expresión de genes diana posteriores (24).

El gen de la hemolisina δ (*hld*) se transcribe junto con RNAPIII, por lo que se ha propuesto que la detección de la actividad de esta toxina sirve como marcador de la

funcionalidad del locus *agr* (4). Singh y Ray (29) refieren que las cepas que presentan *agr* tipo I y II presentan una forma funcional del mismo y las de tipo III en general una forma no funcional.

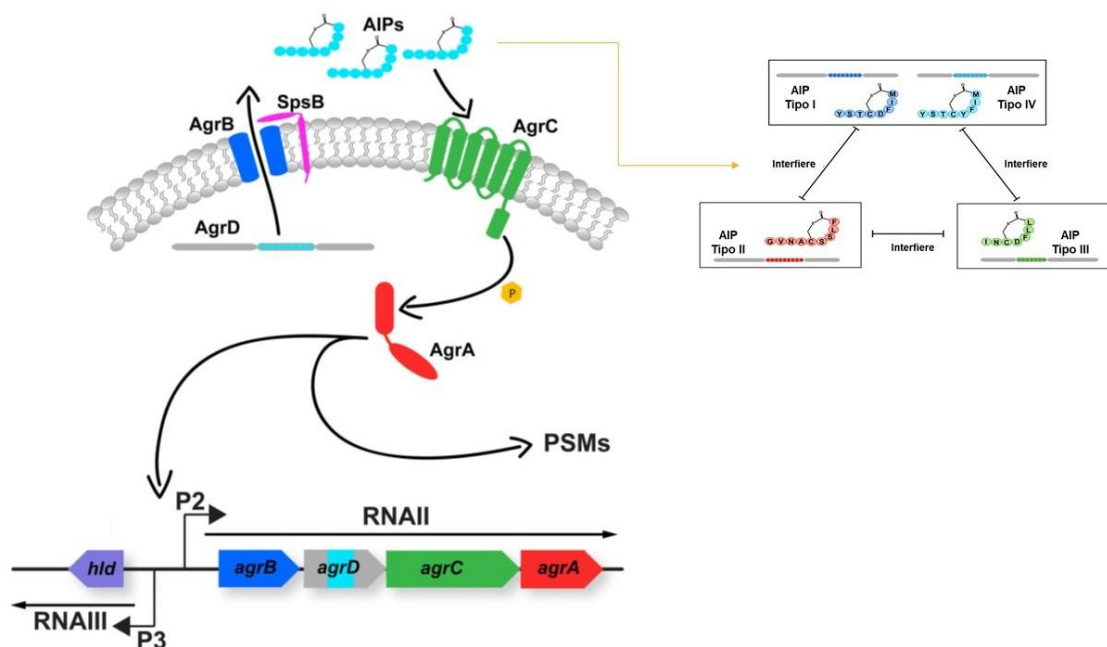


Figura 1: Representación esquemática de la organización molecular, la biosíntesis de señales y la cascada de transducción del sistema de quorum-sensing *agr*. Tomada y adaptada de Jenul y col. (24).

Como referimos previamente, cada cepa de *S. aureus* tiene un tipo de *agr* que puede producir una de cuatro estructuras de AIP diferentes. Cada uno de los AIP tiene un anillo de tiolactona cíclico de cinco residuos, pero los aminoácidos dentro del anillo y la extensión N-terminal son variables. Los AIP de tipo I y de tipo IV se diferencian sólo en un aminoácido y pueden funcionar de manera intercambiable, mientras que los AIP de tipo II y III son más divergentes, por lo que se observa interferencia entre los tres grupos diferentes de AIP como se muestra en la Figura 1. En cada caso, la señal AIP análoga de una cepa productora inhibirá de forma cruzada el receptor AgrC y, a su vez, inhibirá la función *agr*, en una cepa de *S. aureus* que representa un grupo *agr* diferente (24).

Producción de biopelículas (biofilms)

Las biopelículas están formadas por un entramado de polisacáridos y proteínas, que conforman una estructura cohesiva en cuyo interior se encuentran las bacterias en fase latente de crecimiento, y así son fenotípicamente tolerantes a la destrucción inducida por antibióticos, representando un importante problema terapéutico (30). Por otro lado es

probable que la matriz de biopelículas proporcione un escudo mecánico y bioquímico, que genera las condiciones necesarias para atenuar la actividad de las drogas (por ejemplo, bajo nivel de O₂, bajo pH, alto nivel de CO₂ y baja disponibilidad de agua) (31).

El componente de la matriz más estudiado en *S. aureus* es el polisacárido de adhesión intercelular (PIA) codificado en el operón *icaADBC* (Figura 2), que posee un gen regulador (*icaR*), aunque también *S. aureus* puede formar biopelículas independientes de PIA.

La habilidad de *S. aureus* para formar biopelículas, favorece el desarrollo de infecciones persistentes, especialmente en pacientes con dispositivos externos como prótesis o catéteres (30).

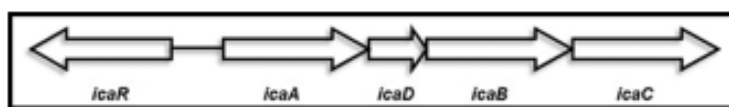


Figura 2 – Representación esquemática del operón *ica*

Estudio del casete de resistencia a meticilina (*SCCmec*)

La resistencia a meticilina se debe a la adquisición de un elemento genético móvil (isla de resistencia), llamado *SCCmec* que contiene varios genes y entre ellos al gen *mecA*. El *SCCmec* se incorpora al cromosoma bacteriano en una región específica, en el extremo 3' de un marco abierto de lectura con función desconocida (*orfX*). El gen *mecA* está precedido o no por *mecRI*, que codifica un receptor de membrana, y *mecI* que codifica un represor genético (32). Las clases de complejos *mec* se definen según la organización y presencia o ausencia de los genes *mecRI/mecI*, secuencias de inserción y otros genes como *blaZ* (33-35).

Los genes principales de *SCCmec* son el gen *mecA* citado previamente y los genes codificantes de recombinasas, que son esenciales para la integración/escisión del casete en el cromosoma bacteriano y están codificados en el complejo *ccr* (cassette chromosome recombinase) por la combinación de los genes *ccrA* y *ccrB* de los cuales existen distintos alotipos, o por el gen *ccrC* (33). El resto del *SCCmec* contiene diversos determinantes adicionales y se denomina J (*joining*= unión).

Existen 3 regiones J (J1-J3), que en los diferentes tipos de *SCCmec* se encuentran generalmente ordenadas del siguiente modo: (*orfX*) J3-*mec*-J2-*ccr*-J1. La región J1 se

encuentra a la derecha del casete, la región J2 entre los complejos *ccr* y *mec*; y, la región J3 a la izquierda. Excepciones a este orden pueden ser los SCC*mec* tipo VII y IX que poseen el complejo de genes *ccr* posicionado entre las regiones J3 y J2 y el complejo del gen *mec* entre las regiones J2 y J1 (Figura 3). Aunque esta región tiene poca importancia desde el punto de vista funcional del SCC*mec* tiene mucha relevancia epidemiológica ya que es el sitio donde se insertan plásmidos y transposones que cargan genes de resistencia a diferentes antibióticos (33).

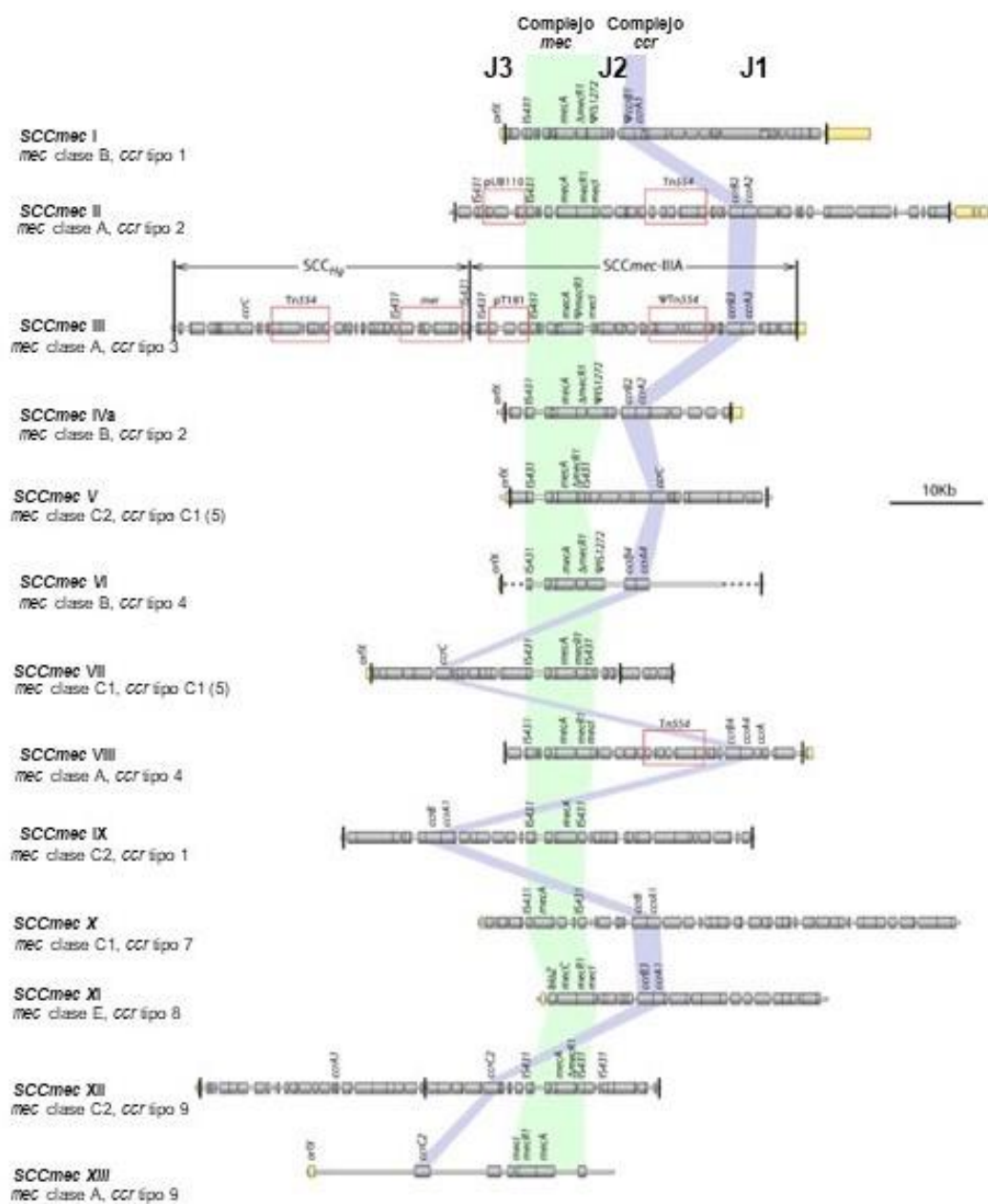


Figura 3: Representación esquemática de los diferentes tipos de SCC*mec* reportados. Imagen tomada y adaptada de Lakhundi y col. (11)

Los SCC*mec* pueden ser clasificados según el tipo de complejo *mec* y *ccr*. Los tipos I, II y III pertenecen a clones asociados a cepas hospitalarias, poseen múltiples resistencias a antibióticos y son de tamaño relativamente grande y, por lo tanto, su movilización es difícil. En contraposición los asociados a cepas comunitarias como el SCC*mec* tipo IV, por ejemplo, tienen un tamaño mucho más pequeño que sus congéneres hospitalarios y no son portadores de múltiples genes de resistencia antibiótica (51). El gran número relativo de variantes SCC*mec* tipo IV en comparación con las variantes de los otros tipos de SCC*mec* podría deberse a la alta frecuencia relativa de transferencia horizontal de SCC*mec* tipo IV, y la plasticidad genética de los linajes de SAMR que llevan este elemento (12)

La epidemiología molecular de SAMR en Argentina fue cambiando a lo largo de los años. Las cepas SAMR aisladas en hospitales durante los años 1994-1996 confirmaron la presencia y el dominio del clon brasileño (sequence type [ST] 239-SCC*mec* tipo III) (36, 37). En 1999 surge un nuevo clon epidémico en Argentina llamado “clon Córdoba/ Chileno” (ST5-SCC*mec* tipo I) el cual co-domina con el pandémico clon brasileño en el entorno hospitalario. El clon Córdoba / Chileno tuvo una prevalencia del 53% en las cepas aisladas en Córdoba durante el año 2001. Sola y col. reportaron en el 2006 que el clon pediátrico aislado de la mayoría de las infecciones adquiridas en la comunidad en Córdoba, se caracterizó por ST100, una variante de locus único de ST5 y una nueva variante de tipo SCC*mec* relacionada con SCC*mec* tipo IVc (38). López Furst y col. publicaron en el 2013, que la causa más frecuente de infecciones de piel y partes blandas en adultos sin previo contacto con el medio hospitalario es el clon ST30, SCC*mec* IV, PVL+, en Buenos Aires (39) mientras que Fernández y col. reportan en el mismo año que el principal clon en infecciones invasivas adquiridas en la comunidad es el ST30-SCC*mec* IVc (40). En el 2014 Egea y col. publican un trabajo que se realiza con cepas recolectadas en 20 provincias de la Argentina y la ciudad de Buenos Aires en el cual reportan que el clon predominante dentro de los SAMR-HA es el clon ST5-SCC*mec* tipo I y en los SAMR-AC predominan los clones ST30-SCC*mec*IVc-PVL+ y ST5-IV-SCC*mec*IVa-PVL+. La proporción de SAMR aislados de infecciones difiere significativamente en las distintas regiones del país, siendo del 81% en el norte, 53% en el centro y 29% en el sur. La diferencia se debería a las cepas SAMR-AC donde se registra una prevalencia del 72% en el norte vs 16% en el sur; la proporción de infecciones por cepas SAMR-AH es similar (41).

La emergencia y propagación de cepas resistentes a los antimicrobianos, como las cepas resistentes a meticilina han generado un gran problema de salud. Según el European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), SAMR es la bacteria resistente a los antimicrobianos más prevalente aislada en hospitales de Europa, América, África del Norte y el Medio y Lejano Oriente (42). La infección causada por SAMR es una amenaza global para la salud pública. La vancomicina sigue siendo uno de los medicamentos de primera línea para el tratamiento de las infecciones severas por SAMR. Sin embargo, desde que se recuperó el primer aislado de *S. aureus* resistente a Vancomicina (SARV), en 2002, 52 cepas han aisladas ya en todo el mundo. (43). Todo esto hace necesario la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, dentro de las cuales van cobrando fuerza los bacteriófagos y sus endolisinas.

Portación nasal de *S. aureus*

S. aureus puede colonizar la piel y las mucosas de los seres humanos y de varias especies animales. Aunque múltiples sitios del cuerpo pueden ser colonizados en el hombre, las fosas nasales son las que más frecuentemente se encuentran ocupadas por este microorganismo. Otros sitios donde puede encontrarse son: la piel, el perineo, la faringe, el tracto gastrointestinal, la vagina y las axilas. Dentro de las fosas nasales, la zona donde se lo aísla con más frecuencia es el vestíbulo nasal. Este se encuentra revestido por el mismo epitelio que la piel, epitelio estratificado queratinizado, y carece de cilios; además está prácticamente libre de secreciones mucosas que contienen inmunoglobulinas y péptidos antimicrobianos. En el vestíbulo nasal se realiza la transición a epitelio respiratorio que presenta cilios y una mayor cantidad de secreciones mucosas y es el que vamos a encontrar en la cavidad nasal propiamente dicha, en parte esto explicaría la preferencia de *S. aureus* por el vestíbulo nasal sobre la cavidad nasal (44).

Los estudios longitudinales permiten distinguir tres patrones de portación: portadores persistentes, portadores intermitentes y no portadores; esta distinción es importante porque los portadores persistentes tienen mayor carga de *S. aureus* y mayor riesgo de padecer infecciones por este patógeno. Dichos trabajos han permitido determinar que un 20-30% de las personas son colonizadas de manera persistente, un 30% de manera intermitente y un 50% raramente o nunca son colonizados. Porqué algunos individuos son resistentes a la colonización y por lo tanto presentan un menor riesgo de

infección, es una pregunta que aún no tiene totalmente una respuesta. Esto dependería tanto de factores del hospedador como factores propios de la bacteria y factores medioambientales (44, 45).

Cuando *S. aureus* coloniza las fosas nasales debe compartir dicho nicho con la microbiota presente (46). El microbioma nasal, al igual que el microbioma cutáneo e intestinal, se caracterizan por una baja diversidad a nivel de los *phylos* bacterianos y una alta diversidad a nivel de las especies. En adultos sanos la microbiota nasal está representada por las Actinobacterias que representan el grupo dominante (68%) y dentro de ellas se destaca la presencia de *Corynebacterium*, Firmicutes (27%) estando este grupo representado por los estafilococos, y Proteobacteria (4%) entre otros. En cambio, en pacientes hospitalizados estas proporciones se modifican con un predominio de los Firmicutes, y el aumento de este grupo se debe a dos especies predominantemente: *S. aureus* y *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*). Sin embargo existe una correlación negativa entre estos dos microorganismos, observándose una disminución de *S. epidermidis* en pacientes colonizados por *S. aureus* (46). La colonización humana con *S. aureus* en estudios epidemiológicos ha sido asociada con la pérdida relativa de microbios comensales, particularmente *S. epidermidis* los cuales inhiben y destruyen la formación de biopelículas formadas por *S. aureus* por la producción de serin-proteasas (47). La asociación entre la portación nasal de *S. aureus* y la enfermedad estafilocócica fue reportada por primera vez por Danbolt en 1931, quien estudió diferentes casos de forunculosis a repetición (44).

Portación nasal en la población

La tasa de portación nasal no es similar en toda la población siendo mayor en niños que en adultos y va disminuyendo a medida que transcurren los años, es diferente en distintos grupos étnicos siendo mayor en la raza blanca y también la prevalencia es mayor en hombres versus mujeres (48-50). Se ha demostrado que pacientes con diabetes (tanto requirentes como no requirentes de insulina), pacientes sometidos a hemodiálisis, pacientes con enfermedad hepática en etapa terminal, pacientes con HIV, obesos y pacientes con eccema tienen una tasa de prevalencia de la portación nasal de *S. aureus* mayor que la población general (44, 51, 52). Además, los portadores de *S. aureus* pueden esparcir estas cepas sobre otros miembros del hogar, volviéndolos también portadores. Se han encontrado estados de portadores concordantes entre las madres y sus hijos (53).

Portación nasal en personal de salud

La portación de *S. aureus* entre los trabajadores de la salud es una preocupación en los entornos hospitalarios, donde puede proporcionar un reservorio para infecciones posteriores tanto en pacientes como en el personal. La prevalencia de SAMR en los trabajadores sanitarios es muy variable, dependiendo principalmente del tipo de trabajo, características del hospital, sector del hospital en el cual desarrolle su labor el trabajador, la prevalencia de SAMR entre pacientes y tipo de contactos con pacientes, mientras más estrecho más posibilidades de colonización (54). Hay varios estudios que muestran que las enfermeras que trabajan en salas de hospital tienen incluso mayores tasas de portación que los pacientes que se encuentran internados (48).

Albrich y Habarth en el 2008 publicaron una revisión de los trabajos de portación nasal en trabajadores de la salud, refiriendo una portación de *S. aureus* sensible a meticilina (SAMS) de 23.7% y de SAMR de 4.6%. Por otro lado, estos trabajadores pueden actuar como vectores para otros trabajadores, para los pacientes y para los miembros de su familia. La implementación de exámenes de rutina de trabajadores de la salud no es factible en muchos entornos de atención médica debido al alto costo. Sin embargo, en regiones con baja prevalencia de SAMR como Escandinavia, los Países Bajos y Australia occidental, la vigilancia estrecha del personal sanitario se practica rutinariamente (55).

Rol de *S. aureus* en las dermatosis crónicas

Los factores que determinan el balance entre comensal y patogénico son poco claros. Hay evidencias que sugieren que *S. aureus* puede generar una respuesta pro-inflamatoria, y que tiene la capacidad de modular la respuesta inmune. En parte estos resultados se deben al reconocimiento de moléculas específicas que se encuentran embebidas en el peptidoglicano en la pared de dicha bacteria por los receptores TLR2 (toll like receptor tipo 2), generándose IL-10 que inhibe la respuesta adaptativa de las células T (8).

Los superantígenos son proteínas bacterianas y virales que inducen la proliferación policlonal de células T mediante la coligación entre las moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad en las células presentadoras de antígenos y la porción variable de la cadena β del receptor de antígeno de la célula T, lo que resulta en activación de células T y liberación de citoquinas. Algunas cepas de *S. aureus* producen toxinas

(tales como toxina del shock toxico “tst-1” y enterotoxina estafilocócica “se” por ejemplo) que son consideradas superantígenos ; y se cree que estos pueden estar involucrados en la inducción y/o agravamiento de la inflamación en enfermedades cutáneas como la psoriasis y la dermatitis atópica (56, 57).

Los desórdenes inflamatorios de la piel tales como dermatitis atópica, psoriasis, acné y rosácea son claramente asociados con un desbalance en el microbioma cutáneo (disbiosis). La expansión local de microbios con potencial pro-inflamatorio como *S. aureus*, describe un posible mecanismo inflamatorio en las enfermedades cutáneas (58).

Bacteriófagos

Generalidades

Los problemas de salud pública relacionados al incesante aumento de cepas resistentes a antibióticos, especialmente para los géneros englobados bajo el acrónimo ESKAPE: junto con *Mycobacterium tuberculosis*, han colaborado en la re-emergencia de la terapia fágica y el uso de bacteriófagos o sus derivados como antimicrobianos (59).

Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias y son las entidades más abundantes y diversificadas sobre la tierra, dada su condición de parásitos obligados de sus hospedadores bacterianos, se encuentran en todos los ecosistemas poblados por bacterias, alcanzando una cifra cercana a 10^{32} en la biosfera y se encuentran ampliamente distribuidos en aquellos lugares donde se encuentre su hospedador (60, 61) , se calculan entre diez a cientos millones de fagos por cada gramo de tierra o agua y miles de millones en el cuerpo humano (62, 63). Son capaces de infectar numerosos géneros de los dominios Eubacteria y Archaea, por lo que pueden definirse como “virus de procariotas” (61, 64).

Los fagos presentan una mayor variabilidad genética que sus huéspedes bacterianos (presa); sin embargo, estos virus solo infectan un rango estrecho de bacterias que están estrechamente relacionadas debido a la combinación de varios factores. Tales factores limitantes incluyen la especificidad de las proteínas de unión del virión con su huésped, interacciones bioquímicas durante la infección, la presencia de profagos relacionados o plásmidos en el huésped, y mecanismos de resistencia bacteriana a los fagos (su depredador) (65, 66).

De acuerdo a las características que presentan los fagos (principalmente su especificidad) poseen numerosas aplicaciones, entre las más destacadas podemos mencionar: 1)- como agentes de biocontrol, en el cual uno o múltiples bacteriófagos, son empleados para destruir una bacteria en particular o varias (cóctel). Para este caso se utilizan fagos estrictamente líticos que no posean genes patogénicos en su genoma (67, 68). 2)- como biosensores, principalmente mediante la modificación genética de los mismos de manera que podamos detectarlos, por ejemplo, incorporar un gen “reportero” como el gen de la luciferasa (69, 70). También se ha planteado la inmovilización física o química en superficies sólidas, para detectar la presencia de bacterias “infectables” a partir del cambio de propiedades físicas del sistema y así funcionar como detectores biológicos de la presencia de la bacteria hospedadora (71-73); y 3)- los bacteriófagos codifican enzimas (endolisinas), con actividad lítica sobre las bacterias, ya que son utilizadas por los bacteriófagos para su liberación post replicación. Estas endolisinas han sido propuestas para su uso como compuesto anti-bacteriano de aplicación tópica (74).

Historia de la terapia fágica

Frederick Twort, bacteriólogo inglés, reportó por primera vez evidencia de bacteriófagos (lisis de cultivos bacterianos) en 1915 y sugirió que el efecto podría deberse a la presencia de un virus o una enzima. Independientemente, en 1917, Felix d'Herelle, un microbiólogo francocanadiense en el Instituto Pasteur, hizo observaciones similares, atribuyendo rápidamente el efecto a un virus y denominó a estos microbios "bacteriófagos" o “comedores de bacterias”; y fue el primero en utilizar fagos como agentes antimicrobianos para tratar infecciones. En aquella época las enfermedades eran la principal causa de mortalidad y morbilidad en las poblaciones humanas. En 1919 d'Herelle trató a tres hermanos, cuya hermana acababa de morir de disentería, con fagos. los hermanos, estaban en estado grave, pero comenzaron a recuperarse en 24 horas (75).

Como se señaló anteriormente, la década de 1940 trajo una era dorada para la utilización de antibióticos como agentes antimicrobianos. La optimización de su uso, fue guiada rápidamente debido a la necesidad crucial de tratar a soldados enfermos o heridos en los EE. UU. y las fuerzas militares de los aliados durante la guerra

Los antibióticos eclipsaron rápidamente el uso de la terapia con fagos en la medicina occidental debido a la falta de comprensión tanto de la biología del fago como

de la microbiología de las enfermedades infecciosas y la falta de ensayos controlados. Esto a su vez, provocó controversias a nivel científico sobre el enfoque del tratamiento, lo que hizo que la terapia con fagos sea esencialmente obsoleta en la Medicina occidental durante casi cuatro décadas. Debido a la ocurrencia de la Segunda Guerra Mundial, ciertas regiones de la Unión Soviética y Europa del Este tenían acceso limitado a los antibióticos y, por lo tanto, se centraron en el desarrollo terapia con fagos (76, 77). La práctica de la terapia de fagos dentro de la Unión Soviética fue bien apoyada, y esto de hecho, todavía se practica en Rusia y en los países de Europa del Este, especialmente dentro del Instituto Eliava en Tbilisi, Georgia, co-establecido por el propio Félix d'Herelle (78).

El uso indiscriminado de antibióticos (tanto en la clínica como en la industria y la agricultura) alimentó la resistencia a los antibióticos a nivel mundial, y con esta amenaza de bacterias MDR, la visión de d'Herelle vuelve a cobrar vigencia.

Morfología y clasificación de los bacteriófagos

Los bacteriófagos, como todos los virus, son partículas infecciosas que tienen al menos dos componentes: ácido nucleico y proteínas, siendo muy diversos en cuanto a sus propiedades estructurales, fisicoquímicas y biológicas; los viriones pueden presentar cola, ser poliédricos, filamentosos o pleomórficos. Las colas, están formadas por módulos proteicos repetitivos, que generan un canal a través del cual pasa el material genético. Las cápsides o cabezas tienen como función resguardar el material genético, que para la gran mayoría de los virus procariotas consiste de una única molécula de ADN doble hebra (ADNdh), aunque un grupo más reducido de fagos contienen en su lugar ADN simple hebra (ADNsh), ARN simple hebra (ARNsh) o ARN doble hebra (ARNdh) (79).

Los bacteriófagos pueden ser clasificados según su morfología y tamaño, y según el ciclo de vida que realizan:

-De acuerdo a su morfología y a su tamaño: han sido clasificados en diferentes categorías, que incluyen 1 orden, 13 familias y 31 géneros. Según Ackermann en cuanto a la morfología, se distinguen varios grupos: fagos filamentosos, icosaédricos, sin cola y con cola, entre otros. Los fagos con cola fueron clasificados dentro del orden Caudovirales y representan el 96% de todos los bacteriófagos conocidos, los mismos están compuestos de una cápside y una cola y presentan genomas lineales de ADNdh. El mismo está integrado por 3 familias filogenéticamente relacionadas que se diferencian

por las características que poseen las colas de los viriones, a) *Myoviridae*, que representan el 25%, cuyos miembros poseen colas largas y contráctiles; b) *Podoviridae*, son los menos abundantes (14%) y sus integrantes presentan colas cortas y no contráctiles; y c) *Siphoviridae* (61%), la familia más numerosa cuya particularidad es que tienen colas largas y no contráctiles (64). La representación esquemática de los miembros de las diferentes familias puede visualizarse en la Figura 4.

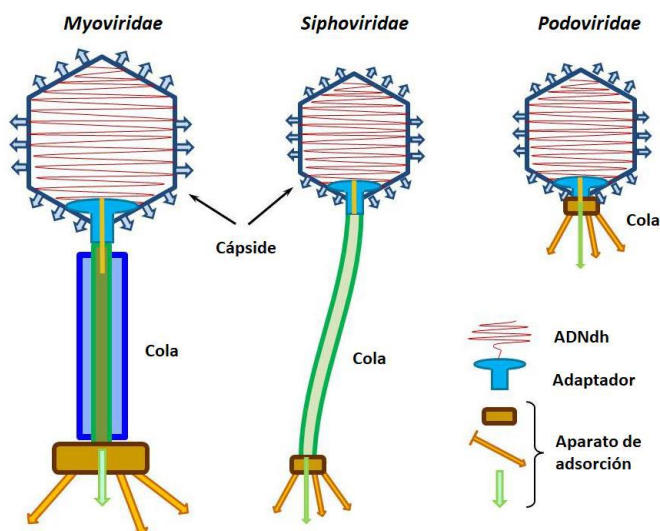


Figura 4: Representación esquemática de las 3 familias que integran el orden *Caudovirales*: *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*. Tomada y adaptada de White y col. (80)

-Según el ciclo de propagación (ciclo de vida): los fagos del orden *Caudovirales* pueden ser divididos en líticos o temperados (Figura 5). Independientemente del ciclo que realicen, el inicio de la infección para un dado bacteriófago requiere de la interacción específica entre la cola del mismo y receptores en la superficie de la célula hospedadora. Posteriormente esta unión altamente específica y reversible, se hace irreversible posibilitando la translocación del material genético al citoplasma bacteriano. Diferentes estructuras en la envoltura celular de bacterias Gram positivas y negativas han sido descritas como probables receptores, entre ellas cápsulas, flagelos y pilis celulares; la disponibilidad de las mismas es una de las principales limitaciones en la determinación del rango de hospedador (81).

El peptidoglicano (o mureína) y el ácido teicoico, son componentes importantes de la pared de las bacterias Gram positivas y a menudo están involucrados en la adsorción de los bacteriófagos. Probablemente la dificultad para identificar los receptores de fagos

en estas bacterias se deba a las paredes celulares complejas y densas que presentan y que están compuestas de varias moléculas diferentes que pueden contribuir o interferir con la adsorción de fagos (82).

Los fagos líticos, también conocidos como virulentos, sólo realizan el ciclo lítico, durante el cual el bacteriófago utiliza la maquinaria genética del hospedador para replicarse y ensamblar nuevas partículas fágicas. Una vez alcanzado un número umbral de viriones, éstos son liberados gracias a la acción de las endolisinas codificadas en el genoma del fago (81, 83).

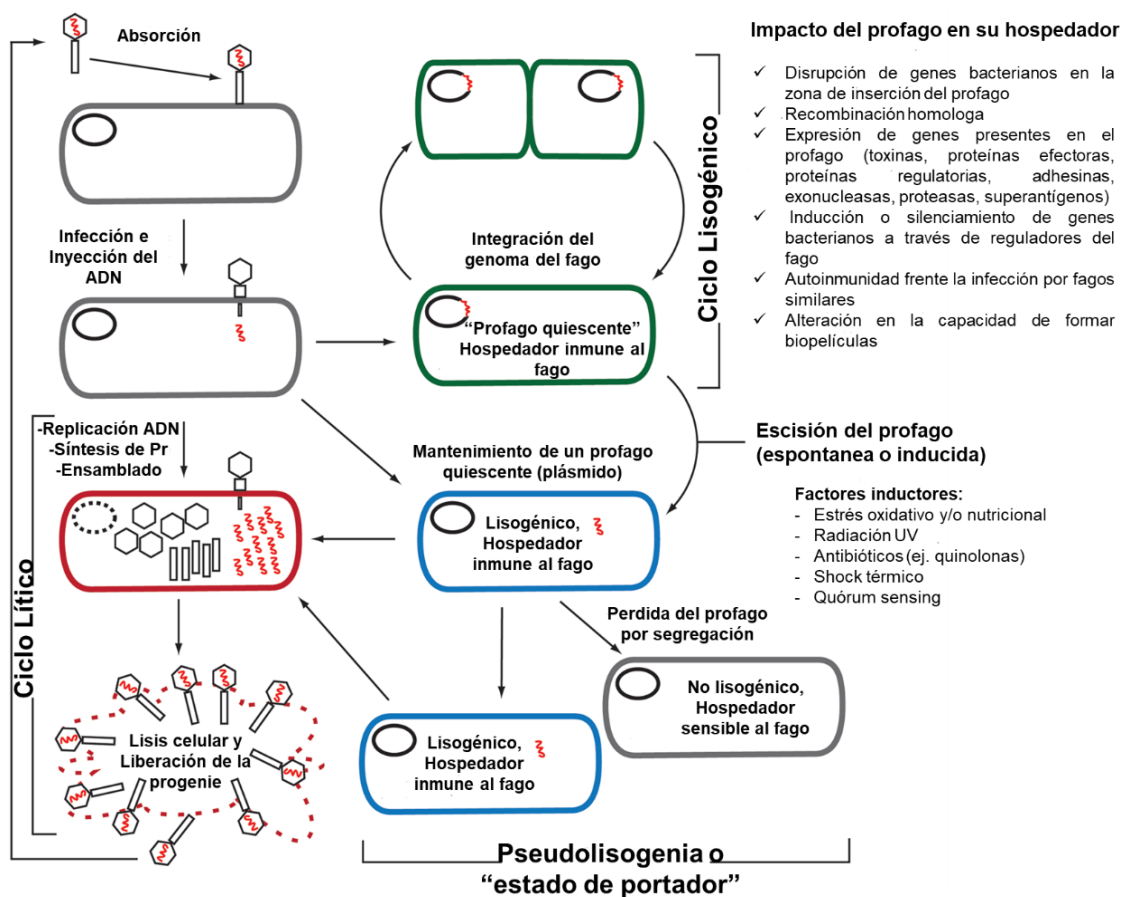


Figura 5: Ciclos de vida de los bacteriófagos. Imagen tomada y adaptada de Fortier y col.(84) Los fagos virulentos solo seguirán el ciclo lítico para su replicación y conducirán a la lisis de la célula huésped al final del ciclo. Los fagos templados tienen la opción de replicarse a través del ciclo lítico como los fagos virulentos, o pueden optar por el ciclo lisogénico.

Por otro lado, los fagos temperados pueden optar por otra vía que es la de establecerse como *lisógeno*, en la cual pueden integrar su genoma en el genoma

bacteriano o mantenerse como un episoma estable, amplificándose con cada ciclo de división de su hospedador. En este estado, los fagos solo expresan unos pocos genes necesarios para mantener esta condición, mientras que la expresión del resto de los genes del fago es reprimida. Los virus que pueden realizar este proceso son conocidos como fagos temperados y estos ante determinadas condiciones de estrés pueden escindir el genoma del hospedador y realizar un ciclo lítico. Se ha demostrado que la mayoría de los factores que estresan la célula huésped o causan daño al ADN inducen a los fagos temperados a realizar el ciclo lítico. Los bacteriófagos temperados, que constituyen más del 50% del orden *Caudovirales*, pueden conferirle propiedades nuevas a la bacteria infectada (81, 84, 85).

Bacteriófagos de Staphylococcus

Todos los bacteriófagos de *Staphylococcus* aislados y caracterizados morfológicamente hasta el momento pertenecen al orden *Caudovirales*. En contraste con los fagos de otras especies, como por ejemplo los de *Mycobacterium*, o los de *Pseudomonas* los tamaños genómicos de los fagos de *Staphylococcus* no están uniformemente distribuidos, y se establecieron tres categorías para clasificarlos: clase I: < 20 Kb, clase II: \approx 40 Kb, clase III: >125 Kb. Los fagos de tamaño intermedio (clase II) son los mayoritarios, y forman parte del grupo más diverso, pertenecen a la familia *Siphoviridae* y son temperados, los fagos pertenecientes a las categorías de mayor tamaño (clase III) pertenecen a la familia *Myoviridae* y se trata de fagos líticos, mientras que los de menor tamaño (clase I) también son estrictamente líticos y pertenecen a la familia *Podoviridae* (86, 87).

Los miembros de la familia *Podoviridae* son los menos abundantes y presentan un amplio rango de hospedador. La familia *Myoviridae* presenta el rango de hospedador más amplio, ya que infectan la mayoría de las cepas de *S. aureus* de diversas fuentes clínicas ensayadas y alguno de ellos también son activos contra cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativo, por ejemplo el fago K (86, 88).

En *Staphylococcus* la lisogenia es muy frecuente, siendo la mayoría de sus fagos temperados. La gran mayoría de las cepas de *S. aureus* estudiadas llevan entre uno a cinco profagos. Los fagos pueden actuar como transportadores de SAPIs y contribuir a la dispersión de las mismas (88, 89). Pueden impactar en la virulencia de la bacteria a través de conversión lisogénica positiva, lo que sucede cuando la integración en el cromosoma

bacteriano de un profago conteniendo un determinado gen, le proporciona a la bacteria nuevas funciones que antes no presentaba. Además, los profagos también pueden provocar la conversión lisogénica negativa, la cual se define como la disrupción de genes cromosómicos a través de la integración del genoma fágico dentro de los mismos, con su consecuente inactivación. En muchos casos, ambos fenómenos pueden ocurrir simultáneamente (23).

Organización genómica

Desde la publicación de la secuencia genómica del fago phiX174 en el año 1978 y a pesar de las nuevas tecnologías *high-throughput*, en la actualidad las secuencias completas de fagos no alcanzan un gran número, siendo mayoritarias las del género *Mycobacterium* y *Enterobacteriaceae* (90, 91). Sin embargo, en los últimos tiempos y con la llegada de la metagenómica este número ha aumentado, por ejemplo se han detectado virus que infectan organismos no cultivables, y como consecuencia del Proyecto de Microbioma Humano se han encontrado inesperadamente un número importante de fagos en muestras de materia fecal (92-94). La caracterización genómica de los fagos es muy importante para predecir su "seguridad" en aplicaciones terapéuticas (95).

Un rasgo sobresaliente en la genómica de fagos es la estructura en mosaico, es decir que cada genoma puede ser considerado una combinación única de módulos o mosaicos intercambiables entre la población de fagos. Si bien esta particularidad no es exclusiva de ellos, ya que las bacterias adquieren información genética mediante transferencia horizontal de genes (transformación, transducción y conjugación), podría decirse que el mosaicismo en fagos es excesivo, y puede ser alcanzado por diferentes vías entre ellas la recombinación ilegítima (96).

En general los fagos de la familia *Siphoviridae*, presentan características comunes en la arquitectura de sus genomas, ya que los genes se agrupan de acuerdo a sus funciones en bloques definidos (Figura 6). Esta organización modular, presenta los siguientes módulos: I- lisogenia, II-replicación del ADN, III- empaquetamiento de ADN y morfogénesis de cápside, IV- morfogénesis de cola y V- lisis (23, 89). El módulo de lisogenia se encuentra presente en los fagos temperados, los cuales tienen la capacidad de integrarse en la bacteria hospedadora y se mantienen integrados en el genoma de dicha bacteria (profagos) hasta que son estimulados para escindir y comenzar el ciclo lítico.

Las proteínas encargadas de esta función son las integrasas, que son proteínas que se encuentran conservadas y se las clasifica en dos familias: las serin-integrasas y tirosin-integras (97). El módulo de lisis está formado por dos proteínas, holina y endolisina, las cuales se expresan de forma tardía en el ciclo de replicación del virus, la holina genera poros en la membrana de la bacteria de manera de que la endolisina pueda acceder al péptidoglicano y lo degrade de manera de lisar la célula y permitir la liberación de la progenie fágica. Generalmente los genes de patogenicidad se encuentran después del módulo de lisis (97, 98).

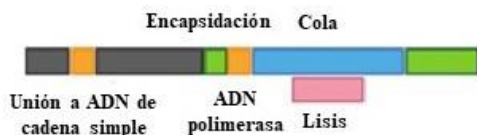
Siphoviridae

Tamaño del genoma: 40Kb



Podoviridae

Tamaño del genoma: < 20Kb



Myoviridae

Tamaño del genoma: > 125Kb

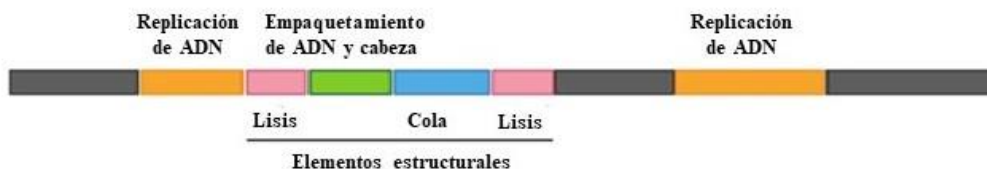


Figura 6: Organización modular de los *Caudovirales: Siphoviridae, Podoviridae y Myoviridae.*

Tomado y adaptado de Marie Deghorain (86)

Los genomas de los *Podoviridae* también presentan una estructura modular, aunque los módulos no están bien definidos como en el caso de los *Siphoviridae*, y los

que corresponden a morfogénesis de cola y lisis están solapados. Al igual que para los *Myoviridae*, como es de esperar para los fagos estrictamente líticos, los *Podoviridae* carecen del módulo de lisogenia. Por su parte, los fagos pertenecientes a la familia *Myoviridae* presentan una organización genómica similar a la del fago T4 de *Escherichia coli*, que es el paradigma de la familia *Myoviridae*. Sus genomas se organizan en módulos de genes conservados, interrumpidos por largas regiones que codifican principalmente genes con funciones desconocidas (Figura 6) (86).

Interacciones fago-bacteria

Se ha demostrado que los fagos son actores importantes en la evolución de las bacterias y, por lo tanto, en la configuración de la microbiota. Se sabe que gran parte de las bacterias están infectadas con bacteriófagos. Los fagos ejercen una presión significativa sobre su entorno controlando la densidad y la diversificación de sus hospedadores, principalmente mediante transferencia horizontal de genes, actuando como vehículo para los mismos (96, 99, 100). En la mayoría de los hábitats naturales una enorme cantidad de bacterias y sus fagos están en un ciclo constante de co-evolución, durante el cual aparecen clones insensibles a ellos lo que ayuda a mantener los distintos linajes bacterianos. Al mismo tiempo emergen nuevos fagos que intentan contrarrestar estos cambios e infectar a sus hospedadores modificados; así los bacteriófagos y los mecanismos de resistencia desarrollados por sus hospedadores juegan un rol clave en el control de las poblaciones bacterianas (101).

Las bacterias pueden inhibir la propagación de un determinado fago en diferentes puntos del ciclo, a) previniendo la adsorción; b) bloqueando la entrada de ADN mediante mecanismos de exclusión ; c) evitando la replicación y/o integración por mecanismos de inmunidad a la superinfección llevados a cabo por profagos; d) degradando el ADN fágico por acción de los sistemas de Restricción-Modificación (RM) y por un sistema, denominado CRISPR (del inglés, **C**lusters of **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**egions) que consiste en la presencia de fragmentos de ADN de fagos en el cromosoma bacteriano, estos fragmentos son utilizados para detectar fagos y destruir infectantes con homología de secuencia; y e) bloqueando la replicación, transcripción, traducción y/o ensamblado de las partículas víricas por la acción de sistemas abortivos toxina-antitoxinas. El mecanismo más común de resistencia a la infección por fagos es debido a

la pérdida o enmascaramiento de los receptores, bloqueando el primer paso requerido para iniciar la infección. (102-104). Esto puede visualizarse en la Figura 7.

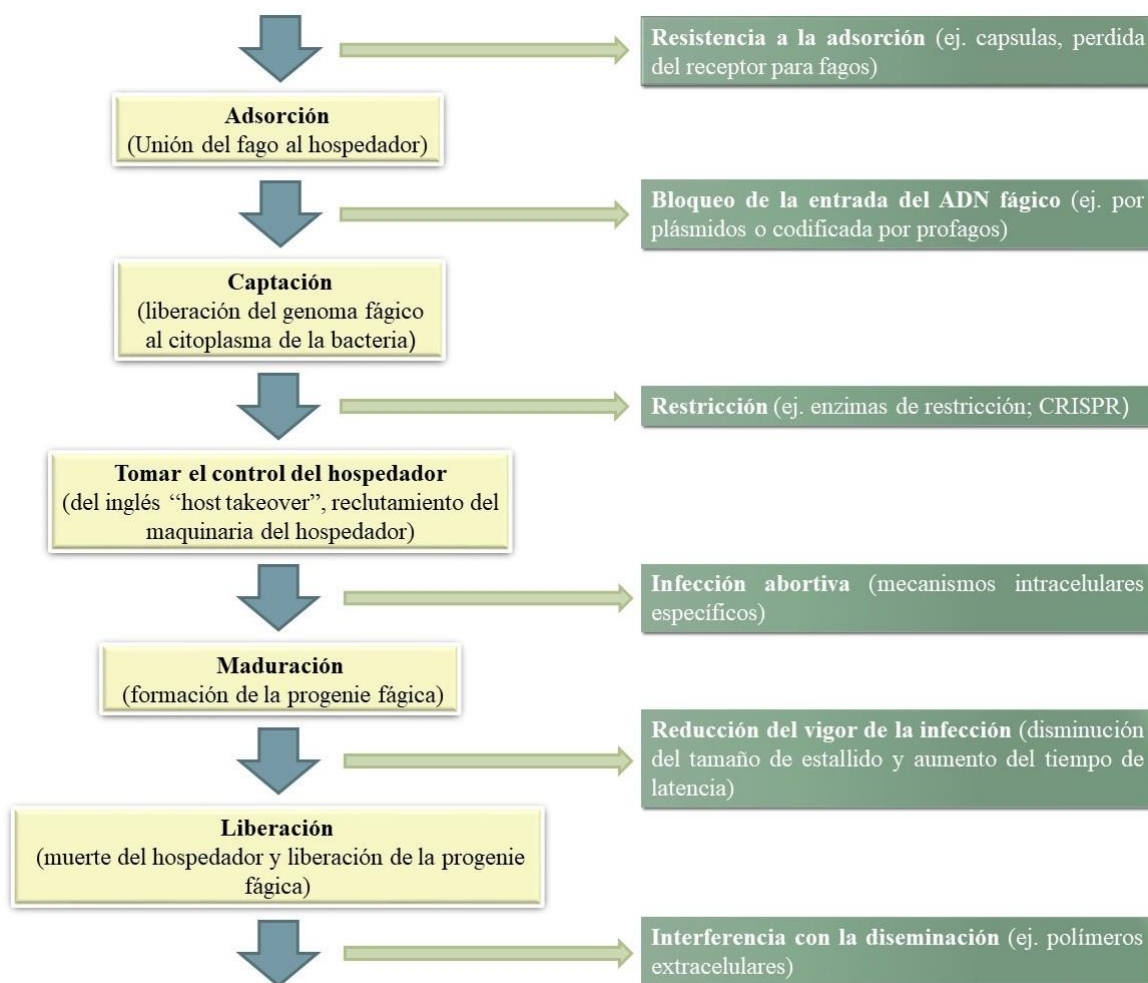


Figura 7: Mecanismos de resistencia bacteriana en función de las etapas de infección de los bacteriófagos. Adaptado de Hyman y Abedon, (104).

Endolisinas

Generalidades

El uso de endolisinas (enzimas con actividad de peptidoglicano hidrolasas presentes en los bacteriófagos) es una de las posibles soluciones al problema de la múltiple resistencia a antibióticos que presenta *S. aureus*. Estas proteínas son altamente específicas a diferencia de los antibióticos por lo cual no se afectaría la microbiota normal, evitándose la disbiosis bacteriana que conlleva otras consecuencias para la salud (105). La teoría de la higiene propone que el uso de antibióticos y alteraciones del estilo de la vida que

limitan la exposición microbiana predisponen a las poblaciones de países en desarrollo a padecer enfermedades autoinmunes. Por lo tanto se sugiere que, debido a la inhabilidad para diferenciar entre patógenos y comensales, los antibióticos causan disturbios en la estructura de la microbiota y, subsecuentemente, en la relación co-evolutiva entre nuestro sistema inmune y los simbioses que albergamos ; por lo que se requiere de terapéuticas más específicas para tratar los procesos infecciosos (9).

Debido a que las bacterias Gram-positivas carecen de membrana externa en su pared celular, las endolisinas pueden acceder al peptidoglicano y destruir estos organismos cuando se aplican externamente, haciéndolos potenciales agentes antimicrobianos. Las endolisinas se han utilizado con éxito en una variedad de modelos animales para controlar bacterias patógenas resistentes a los antibióticos que se encuentran en las superficies mucosas y en los tejidos infectados (105, 106).

Las endolisinas son efectivas sobre las bacterias independientemente de su fase de crecimiento o condiciones metabólicas, pudiendo actuar en células en estado planctónico y en algunos casos en bacterias embebidas en biopelículas (107, 108).

El estudio de las endolisinas y otras enzimas fágicas con actividad anti-bacteriana, llevó a acuñar el término “enzibiótico” para describirlas. Estas enzimas han co-evolucionado con las bacterias hospedadoras, manteniendo su capacidad para romper uniones esenciales en el peptidoglicano que conforma la pared celular de las bacterias. Los enzibióticos se caracterizan por ser de naturaleza proteica, por tener un modo de acción único y rápido, una alta especificidad para matar los patógenos, y una baja probabilidad de seleccionar resistencia bacteriana. Se ha demostrado que las endolisinas son efectivas en distintos modelos animales para combatir bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y han entrado en diferentes fases de ensayos preclínicos y clínicos. Además, las endolisinas codificadas por micobacteriófagos se han utilizado con éxito para inhibir las micobacterias in vitro (109).

Ciclo de producción de endolisinas en los bacteriófagos

Después de la replicación dentro de su hospedador, los fagos se enfrentan a la necesidad de tener que salir de la bacteria para diseminar su progenie. Para resolver este problema los fagos de ADN han desarrollado un sistema lítico que debilita la pared celular dando como resultado la lisis de la bacteria. Las endolisinas son moléculas altamente

eficientes que se han ido refinado durante millones de años de evolución para este propósito. Durante el desarrollo del fago en la bacteria infectada, la lisina se acumula en el citoplasma antes de la maduración del mismo. En un determinado momento, moléculas de holinas se insertan en la membrana citoplasmática de la bacteria formando parches que terminan generando la disrupción de la membrana, permitiendo que la endolisina citoplasmática acceda al peptidoglucano, lo que provoca la lisis celular y la liberación de la progenie fagica (Figura 8) (106).

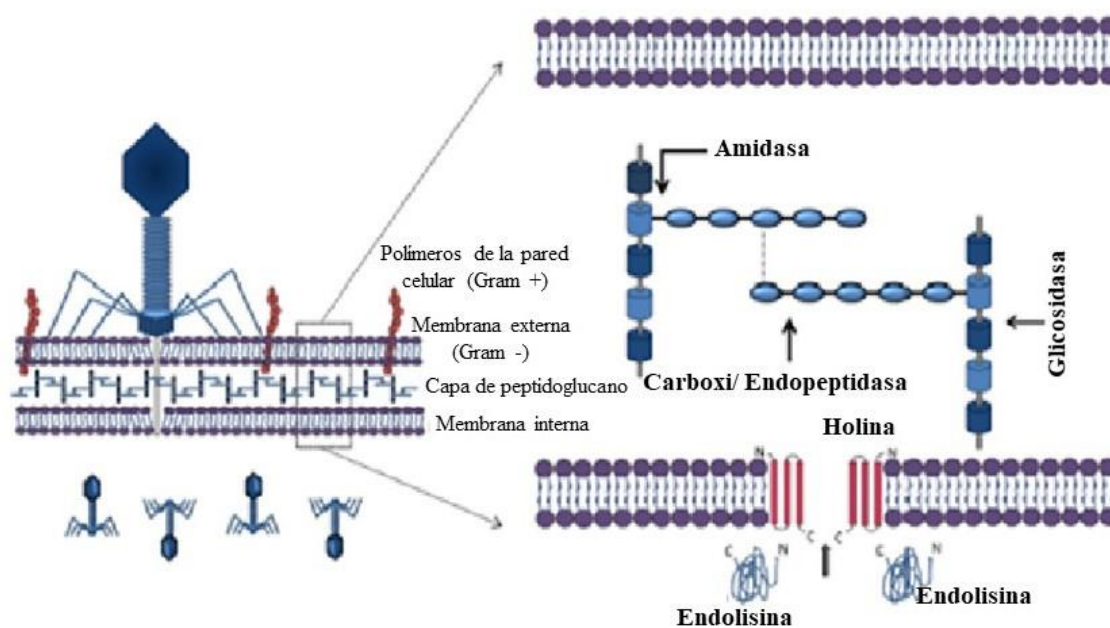


Figura 8: Representación esquemática de cómo la endolisina del fago obtiene acceso al peptidoglucano de la pared, a través del sistema holina-endolisina. Tomada y adaptada de Oliveira y col (110)

La pared celular bacteriana le provee rigidez estructural y forma a la bacteria, y a su vez constituye una barrera física contra el ambiente exterior. el componente rígido de la pared celular de las bacterias se compone de peptidoglucano que es un heteropolímero que forma el exoesqueleto y resiste la presión osmótica citoplasmática interna, proporcionando integridad estructural a la célula., el cual se encuentra en todas las especies bacterianas excepto los micoplasmas y los ureoplasmas. Esta estructura consta de un esqueleto de hidratos de carbonos alternados de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico que forman un enlace β -1,4. A los residuos de N-acetilmurámico se unen, mediante enlaces peptídicos en el C3, tetrapéptidos cortos, por lo general compuestos de cadenas cortas idénticas de D- y L-aminoácidos poco usuales que no se encuentran en las

proteínas, incluidos los isómeros D de alanina y el D-ácido glutámico (bacterias grampositivas). Algunos de estos tetrapéptidos están, a su vez unidos entre sí por péptidos cortos que forman entrecruzamientos entre las hebras de peptidoglucano adyacentes (Figura 9). Los tipos de aminoácidos encontrados y los grados de entrecruzamiento son componentes variables de la estructura de peptidoglucano, en el caso de *S. aureus*, la mayoría de los residuos están entrecruzados con las hebras adyacentes por 5 residuos glicina, lo que le proporciona a la pared celular una estructura rígida (111, 112).

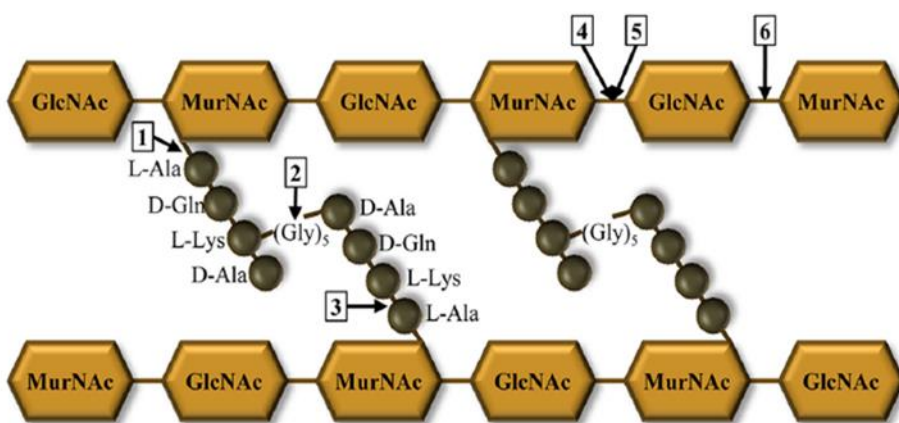


Figura 9: Estructura del PG. Referenciado con numero los diferentes puntos de actividad de las endolisinas, 1) N-acetilmuramoyl-L-alanina amidasa, 2) puente interpeptídico endopeptidasa, 3) L-alanoyl-D-glutamato endopeptidasa, 4) N-acetil-β-D-muramidasa, 5) transglucosidasa, 6) N-acetil-β-D-glucosaminidasa. Tomada y adaptada de Gutiérrez y col (112)

En consecuencia, las endolisinas al actuar sobre el peptidoglucano y comprometer su integridad conducen a una presión osmótica interna insostenible, que desencadena el estallido celular. La actividad de las endolisinas sobre uno de los cuatro enlaces principales del PG permite dividirla en 4 grupos: (I) lisozimas (II) transglucosidasas que actúan sobre el enlace glucosídico que une el amino a azúcares en la pared celular, (III) amidasas y (IV) endopeptidasas que actúan sobre los enlaces de amida y peptídico de los oligopéptidos entrecruzantes y los puentes inter-peptídicos (110). Esto se puede observar en la Figura 9 citada previamente.

Estructura de las endolisinas

Las endolisinas de bacterias Gram positivas en general tienen un tamaño que oscila entre los 25 y los 40 kDa, con excepción de PlyC (estreptococo) que tiene un tamaño de 114kDa (106).

Las endolisinas son enzimas modulares en la cual la actividad catalítica y el reconocimiento de sustrato están separados en dos tipos diferentes de dominios funcionales llamados dominios de unión a pared (CBD) y dominio enzimáticamente activo (EAD). Las endolisinas de fagos de *S. aureus* presentan 1 o 2 dominios catalíticos y 1 dominio de unión. Los principales EAD presentes son: LYSO (del inglés phage lysozyme domain), PET-M23 (peptidase domain M23), AMI-2 (amidase 2 domain), AMI-3 (amidase 3 domain), and CHAP (cysteine- and histidine-dependent amidohydrolase/peptidase), siendo este último el más frecuente (74%); y el CBD contiene dominios relacionados a SH3 (del inglés, src Homology-3, encontrado en proteínas intracelulares o de unión a membrana), siendo los más frecuentemente hallados SH3_5 y SH3b (110, 112, 113). La organización modular de las endolisinas puede observarse en la Figura 10.

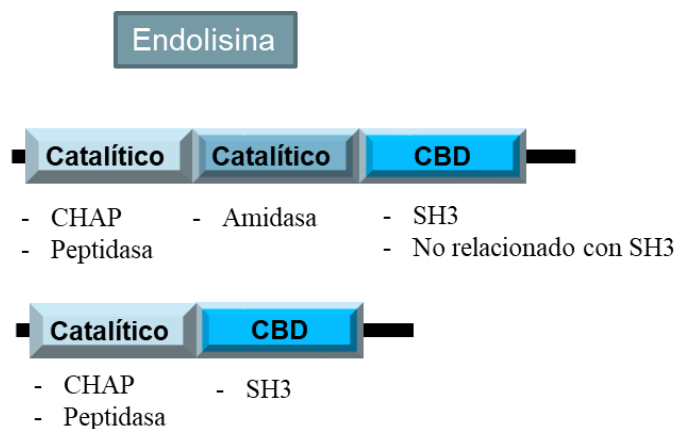


Figura 10: A) Representación esquemática de los principales dominios presentes en la endolisinas de fagos de *S. aureus*. Tomada y adaptada de Gutiérrez y col (112).

Retomando y reformulando viejas terapéuticas, en la era de la resistencia

Los antibióticos fueron descubiertos en un momento en que las infecciones bacterianas tenían una alta tasa de mortalidad; y fueron altamente atractivo debido a su actividad de amplio espectro que les permitió ser utilizados contra una amplia gama de bacterias sin necesariamente identificar o caracterizar la bacteria infecciosa exacta. Sin embargo, esta ventaja es también una gran desventaja, debido a su relativa no especificidad, los antibióticos generan disbiosis. Sin embargo, el uso de fagos líticos podría eludir este problema, la terapéutica de fagos podría diseñarse para tratar una infección sin dañar la microbiota. Sin embargo, esta especificidad podría convertirse en

un gran desafío porque muchas infecciones son polimicrobianas. Esto podría solucionarse utilizando cocteles de fagos. Otro problema que podría solucionarse con el uso de cocteles también es la aparición de cepas resistentes a bacteriófagos, en infecciones ocasionadas por una única cepa (114, 115). Los expertos creen que un cóctel de fago ideal debería estar preparado utilizando fagos pertenecientes a diferentes familias o grupos de fagos con un amplio rango de huéspedes y alta capacidad de adsorción, uniéndose a las estructuras que son altamente conservadas de la pared bacteriana. Sin embargo, otros son defensores de estrategias en donde los fagos activos individuales se aplican secuencialmente al paciente, aunque, esto en la práctica clínica puede ser difícil de cumplir (116).

Entre las preparaciones comerciales de fagos que pueden utilizarse contra las bacterias agrupadas en el acrónimo ESKAPE se encuentran: "Stafal", "Sextaphage", "PhagoBioDerm" y "Pyophage". Stafal (Bohemia, Eslovaquia) que son preparaciones que contienen fagos con acción antiestofilocócica, que tienen acción frente a cepas SAMR y se aplican de manera tópica, Sextaphage (Microgen, ImBio Nizhny Novgorod, Rusia) es un cóctel contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* mientras, Pyophage (Instituto Georgiano Eliava de Bacteriófagos, Microbiología y Virología) contiene bacteriófagos que actúan contra los agentes de enfermedades entéricas (95). También se encuentra en forma de vendaje PhagoBioDerm (licenciado en Georgia, Unión Soviética), que consiste en un polímero biodegradable impregnado con un cóctel de fagos, ciprofloxacina y otros ingredientes activos; que se utiliza para la liberación sostenida de fagos para tratar úlceras o heridas infectadas por *S. aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (117).

Otra opción sería el uso de endolisinas, que se pueden usar como agentes antibacterianos solas o combinadas con antibióticos para mejorar la eficacia del tratamiento (95, 105). El uso de estas proteínas para el tratamiento de infecciones humanas es por lejos el campo con mayor interés de todas las aplicaciones posibles para estas lisinas. Microcos, una empresa holandesa, ha desarrollado el primer producto que contiene endolisinas para uso humano, Microcos Staphsefekt 100 (Gladskin), el cual es específico contra *S. aureus*, incluyendo cepas SAMR. Este producto es recomendado para las infecciones de piel ocasionadas por *S. aureus* en las etapas tempranas, tales como eccema, acné y rosácea lo cual reduce los síntomas inflamatorios (112, 118).

Uno de los puntos críticos de esta terapéutica es la búsqueda y la caracterización de nuevos bacteriófagos para los diferentes patógenos, lo que conlleva también a la identificación de nuevas enzimas fágicas con potencial uso terapéutico.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo general

La disminución en la creación de drogas antibacterianas, el gran aumento de bacterias resistentes a una o más drogas y los incrementos en los costos de Salud Pública para el control de infecciones intra-hospitalarias y de la comunidad, instalan la necesidad de nuevas alternativas no antibióticas para el control de las bacterias productoras de infecciones. El uso de bacteriófagos tiene ventajas sobre los antibióticos tales como su especificidad (no afectan la microbiota), su bajo costo, facilidad de producción, estabilidad física, escasos efectos adversos y simplicidad para su modificación (aumento en el espectro de acción mediante incorporación de nuevos bacteriófagos), por lo que constituye una alternativa a explorar y desarrollar para su uso como agentes antibacterianos en ambientes y superficies. La síntesis de enzimas líticas fágicas con potente acción anti-bacteriana (lisinas), ha promovido el uso de las mismas con fines terapéuticos para tratar infecciones de manera específica.

En base a esta descripción, este proyecto tiene como **objetivo general** el aislamiento y caracterización físico-química y genética de bacteriófagos capaces de infectar *Staphylococcus aureus*. En una segunda etapa de esta Tesis Doctoral se plantea la identificación de genes codificantes de endolisinas para su clonado y expresión. Simultáneamente, se realizará el aislamiento y la caracterización microbiológica y molecular de cepas de *S. aureus*, así como la determinación de la sensibilidad a meticilina.

Objetivos específicos:

- a) Aislar y caracterizar cepas de *Staphylococcus aureus*, lo que nos permitirá conocer los tipos prevalentes en nuestro medio, en grupos específicos, y armar un cepario que será utilizado para análisis de rango de hospedador de fagos.
- b) Estudiar la portación nasal en diferentes grupos de interés: trabajadores de la salud y pacientes con psoriasis.
- c) Aislar bacteriófagos de muestras del medio ambiente (agua, suelo) con capacidad de infectar *S. aureus*; de cepas inducidas mediante el uso de mitomicina C y de muestras clínicas.
- d) Establecer el rango de hospedador y caracterizar los fagos aislados.

- e) Secuenciar los genomas de los bacteriófagos elegidos y realizar el análisis bioinformático de los mismos.
- f) Identificar mediante bioinformática genes que codifiquen para endolisinas en los genomas de los bacteriófagos.
- g) Clonar, expresar y purificar las endolisinas seleccionadas. Determinar su actividad biológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas utilizadas como control

Se utilizaron cepas de *S. aureus* de colecciones de cultivo microbianas: ATCC (American Type Culture Collection) y NARSA (Network on antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*) y otras de origen clínico o proporcionadas por otros investigadores como control de los ensayos realizados. Las características relevantes y su origen se detallan en la Tabla 1 (119-123).

Tabla 1: Cepas utilizadas como controles, características relevantes y origen

Cepa	Características relevantes	Origen
ATCC 25923	SAMS, <i>mecA</i> (-)	ATCC
ATCC 43300	SAMR, <i>mecA</i> (+)	ATCC
ATCC 12228	<i>S. epidermidis</i> , <i>mec</i> (-), <i>ica</i> (-)	ATCC
ATCC 14990	<i>S. epidermidis</i> <i>mec</i> (+), <i>ica</i> (+)	ATCC
ATCC 29740	<i>Newbould</i> , mastitis bovina	ATCC
NRS 144 (RN 4220)	Productor de β -hemolisina, libre de profagos	NARSA
NRS 158	<i>agr</i> I	NARSA
NRS 70 (NRS 315)	<i>agr</i> II; SCC <i>mec</i> II (<i>ccr</i> 2 + <i>mecA</i>)	NARSA
NRS 123	<i>agr</i> III	NARSA
NRS 153	<i>agr</i> IV	NARSA
M 1	SAMR, PVL (+), <i>sei</i> (+)	Clínico
V329	<i>S. aureus</i> productor de biopelículas	Dr. Calvino [#]
SCC <i>mec</i> I	SCC <i>mec</i> I (<i>ccr</i> 1 + <i>mecB</i>)	Dra.Mollerach [#]
SCC <i>mec</i> III	SCC <i>mec</i> III (<i>ccr</i> 3 + <i>mecA</i>)	Dra.Mollerach [#]
Newman Δ <i>ica</i>	No productor de biopelícula <i>ica</i> -dependiente	Dra. Mollerach [#]
NRS 101	<i>S. epidermidis</i> . Productor prototipo de biopelícula	NARSA

Nota: Dr. Calvino, Estación Experimental Agropecuaria del INTA (Rafaela) y Dra. Mollerach, Cátedra de Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA)

Medios de cultivos y conservación de microorganismos

Los medios de cultivos utilizados para *S. aureus* fueron los siguientes: Agar Manitol Salado (medio de Chapman), Agar Tripteína-Soya (TSA), Caldo de Tripteína-Soya (TS), Agar Mueller Hinton (MHA), Caldo Mueller Hinton (MH), todos estos de laboratorio Britania y Agar Sangre de Cordero (Columbia).

En el caso de la cepa *Escherichia. coli* BL21 (DE3) pLys se utilizó el medio de cultivo Luria Bertani (LB) Para prepararlo se disolvieron los siguientes componentes por litro de agua destilada: 10 g de NaCl, 10 g de triptona y 5 g de extracto de levadura. En los casos que fue necesario utilizar medio solido se agregó 15g de agar por litro de cultivo. Luego se esterilizó en autoclave.

Los microorganismos fueron conservados a -20°C y a -80°C en TS suplementado con glicerol al 20%. Al momento de utilizarse se descongelaron y se sembraron en los medios de cultivo correspondientes, la incubación se realizó a 37°C.

Medios de cultivo y soluciones para bacteriófagos de *S. aureus*

Para la propagación de los bacteriófagos se utilizó el medio TS adicionándole agar o agarosa (según corresponda) a concentraciones finales de 1,2 y 0,4 % P/V, para el armado de la base y el top, respectivamente. En los experimentos donde se utilizaron fagos, el medio fue suplementado con CaCl₂ (2mM) y MgSO₄ (10mM). Con esta composición fueron armadas todas las placas de TS base y el TS top.

Para la elución de los bacteriófagos se utilizó buffer de fagos (BF). Para preparar un litro de BF se mezclaron los siguientes componentes: 790 ml de agua destilada, 150 ml de NaCl 1 M, 10 ml de MgSO₄ 1 M, 50 ml de Tris HCl 1 M pH 7,6 y 2 ml de CaCl₂ 1M. A continuación, se procedió a esterilizar dicha solución en autoclave.

Aislamiento y caracterización de cepas de *S. aureus* a partir de hisopados nasales

Obtención de los hisopados nasales

Los hisopados nasales fueron tomados en el marco de 3 proyectos realizados en nuestro laboratorio:

- 1- Búsqueda de portadores asintomáticos de *Staphylococcus aureus* en trabajadores de la salud del Hospital Provincial del Centenario (HPC), Rosario (Santa Fe-Argentina)

2- Búsqueda de portadores asintomáticos de *Staphylococcus aureus* en trabajadores de la salud del Hospital Escuela Eva Perón (HEEP), Granadero Baigorria (Santa Fe-Argentina)

3- Rol de *Staphylococcus aureus* en dermatosis crónicas

En el caso de los trabajos de “Búsqueda de portadores asintomáticos de *S. aureus* en trabajadores de la salud” se realizó un estudio de corte transversal para cada hospital.

Se realizó a cada uno de los trabajadores un cuestionario (edad, sexo, ocupación, uso de antibióticos en los últimos 6 meses e historia previa de colonización o infección por el patógeno de interés en este trabajo). Los criterios de exclusión fueron: enfermedad compatible con *S. aureus* en el momento de la toma (infecciones de piel y partes blandas, sinusitis, rinitis, otitis, etc) y uso de antibióticos en los 3 meses previos.

El protocolo de trabajo para cada hospital fue evaluado y aprobado por el comité de ética correspondiente a cada institución.

Las muestras fueron tomadas de agosto a diciembre del 2014 en el HPC, y en el HEEP de octubre a diciembre del 2015. Los hisopados nasales fueron tomados durante la jornada laboral por lo que concurrimos a los hospitales en diferentes horarios para poder tener una muestra más representativa de la población, la participación del personal fue voluntaria.

En lo que respecta al trabajo “Rol de *S. aureus* en dermatosis crónicas” se utilizó como modelo de enfermedad la “psoriasis en placa”, tomándose muestras de pacientes que la padecen y son atendidos en el Departamento de psoriasis, en el HPC. Para dicho trabajo se requirió de un grupo control que fue formado por pacientes que se atienden en el mismo hospital por otro motivo y que no presentan antecedentes de alteración de la barrera cutánea. Las muestras fueron tomadas desde octubre al 2016 a octubre del 2017. Los criterios de exclusión fueron los mismos que se aplicaron en los otros dos trabajos de portación nasal además de tener en cuenta la afectación de la barrera cutánea.

En todos los trabajos de portación nasal se tomaron hisopados nasales (por duplicado) con la firma previa del consentimiento informado. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio dentro de las dos horas posteriores a la toma de la misma, en medio de transporte Stuart (Britania).

Aislamiento, tipificación y caracterización fenotípica de Staphylococcus aureus

Tipificación de Staphylococcus aureus

La tipificación se realizó de la siguiente manera: uno de los hisopos se utilizó para la siembra de la muestra en Agar Manitol Salado (Britania) y se cultivó durante 48 horas a 37°C. Las colonias que resultaron manitol positivas (viraje del color del medio del rojo al amarillo) se repicaron en MHA (Britania) a 37°C por 24 horas, al término de las cuales se realizaron extendidos que fueron coloreados con tinción de Gram Nicolle y las colonias que presentaron morfología microscópica de cocos Gram-positivos se sometieron a la prueba de catalasa (formación de burbujas de O₂ en presencia de peróxido de hidrogeno), que permite diferenciar *Staphylococcus* (catalasa positivo) de *Streptococcus* (catalasa negativo). Aquellas muestras que resultaron catalasas positivas fueron sometidas a la prueba de la coagulasa en tubo. La positividad de dicha prueba se evidencia por la formación de un coágulo cuando se incuban colonias en plasma y permite diferenciar *S. aureus* (prueba positiva) de los estafilococos coagulasa negativa (prueba negativa). Los cocos Gram-positivos, catalasa y coagulasa positivos fueron identificados como *S. aureus* (124).

Antibiograma en disco mediante técnica de Kirby-Bauer

Se empleó el método de antibiograma por difusión, para lo cual se colocaron los discos de los diferentes antibióticos a estudiar sobre una placa de MHA de 4mm de espesor que previamente fue inoculada con una suspensión (0,5 Mc Farland) perteneciente a la cepa de *S. aureus* en estudio. Después de 24 horas de incubación a 37°C, se procedió a la lectura e interpretación de los halos de inhibición de acuerdo a las normas aprobadas por el CLSI (del inglés, Clinical Laboratory Standards Institute) (125).

Para determinar la resistencia a meticilina se utilizó un disco de FOX (cefoxitina 30 µg) y dicha prueba se interpretó según el punto de corte del CLSI tomando como cepas sensibles aquellas que presentaron halos ≥ 22 mm y como resistentes a aquellas que tuvieron halos ≤ 21 mm (125).

Los otros antibióticos que también fueron evaluados mediante esta técnica junto con su respectivas concentraciones son: ciprofloxacina (5 µg), eritromicina (15 µg), clindamicina (2 µg), rifampicina (5 µg), trimetoprima-sulfametoxazol (TMS) (25 µg), gentamicina (10 µg), tobramicina (10 µg), kanamicina (30 µg), amicacina (30 µg), estreptomycin (10 µg), vancomicina (30 µg), teicoplanina (30 µg) y mupirocina (10 µg).

Ensayo por Difusión en agar, D-Test

En los aislamientos que fueron resistentes a eritromicina, se evaluó además el fenotipo de resistencia a macrólidos mediante la prueba de D-Test según recomendaciones del CLSI. Una suspensión del microorganismo a ensayar (correspondiente a 0,5 de McFarland) se sembró con hisopo en placa de MHA de 4 mm de espesor. Posteriormente se colocaron los discos de antibiograma de eritromicina (15 µg) y clindamicina (2 µg) a una distancia de aproximadamente 20 mm. Las placas se incubaron a 37°C durante 18 hs. Si el aislamiento posee un fenotipo inducible (iMLSB) debido a la expresión del gen *erm*, eritromicina actúa como inductor, y se produce achatamiento del halo alrededor del disco de clindamicina (halo con forma de D); mientras que si no se observa el achatamiento del halo de clindamicina posee un fenotipo M (eflujo). Si el aislamiento presenta resistencia a eritromicina y clindamicina posee un fenotipo constitutivo (cMLSB).

Caracterización molecular de las cepas aisladas

Extracción de ADN de las cepas aisladas

Se realizó la extracción de ADN según el protocolo de MLST (del inglés Multilocus sequence typing) (<http://saureus.mlst.net/misc/info.asp>) tanto de las cepas aisladas en esta tesis como las que fueron utilizadas para control.

Las cepas fueron repicadas en TSA (Britania) de manera de lograr un crecimiento confluyente de las mismas, las placas se incubaron durante 12hs a 37°C. Luego se levantó con ansa 1/8 de placa de bacterias y se resuspendió en 400 µl de solución de lisis (250 U/ml Lisozima, 25 U/ml Lisostafina, 0,01 M EDTA, 0,01 M Tris). A continuación, se incubó a 37°C durante 30 minutos, para luego calentar la mezcla durante 10 minutos a 95°C, luego de los cuales se colocó la muestra 1 minuto en hielo, pasado este tiempo la misma se centrifugó 5 minutos a 14.000 g para quedarnos con el sobrenadante. El tubo con el sobrenadante se transfirió a un recipiente con hielo y se le agregó 1 ml de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1 v/v), se mezcló por inversión y se centrifugó durante 20 minutos a 10.000 g. Posteriormente se transfirió la fase acuosa a un tubo, se precipitó el ADN con el agregado de 1 ml de etanol absoluto y se colocó el tubo en hielo durante 15 minutos, para luego centrifugarlo 20 minutos a 10.000 g, para descartar el sobrenadante y resuspender el pellet (ADN) en 100 µl de agua destilada.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Todas las reacciones de PCR se realizaron en termociclador Mastercycler personal (Eppendorf). Se utilizó la polimerasa Taq Pegasus y sus reactivos (Buffer de PCR 10X y Cloruro de Magnesio 50 mM) (Embiotec).

Electroforesis en gel de agarosa

La visualización de los productos de PCR se llevó a cabo siguiendo las indicaciones descritas por Sambrook y Russel (55). Se emplearon geles horizontales de concentraciones de agarosa variables entre 0,8% y 2,0% según el tamaño de las moléculas de ADN que se deseaba separar. Los geles se prepararon en solución reguladora TAE (40 mM Tris-acetato pH 8,0; 10 mM EDTA) y las separaciones electroforéticas se realizaron en la misma solución reguladora a una intensidad de corriente de 60 a 80 V. Previo a la siembra, las muestras se mezclaron con 0,1 volúmenes de solución de siembra (0,25% (p/v) de azul de bromofenol, 0,25% (p/v) de xilencianol, 30% (p/v) de glicerol. Las bandas de ADN teñidas con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) fueron visualizadas empleando un transiluminador de luz UV (255 nm). Como marcadores de peso molecular (PM) se emplearon Lambda Bst EII, Lambda HindIII o Ladder 100 pb (Embiotec).

Tipificación mediante PCR múltiple

La confirmación molecular de identidad y resistencia a metilina se efectuó por PCR múltiple según Louie, y col. (126), mediante la misma se amplifican los genes *16S rRNA* (identifica ADN bacteriano en la muestra), *nuc* (nucleasa presente en *S.aureus*) y *mecA* (resistencia a metilina), los oligonucleótidos se encuentran descritos en la Tabla 2. Como control positivo se utilizó la cepa ATCC 43300.

La mezcla de reacción se preparó con un volumen final de 25 µl conteniendo buffer de PCR (1X), ClMg2 (3mM), dNTPs (200 µM), cebadores (0,5 µM para *mecA* y 0,2 µM para *16SrRNA* y *nuc*), Taq polimerasa (2U), ADN 1µl, agua milliQ csp 25 µl. Las condiciones de ciclado utilizadas fueron: una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación (30 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C y 60 segundos a 72°C) y una fase de elongación final de 5 minutos a 72°C.

Tabla 2: Cebadores utilizados para la caracterización molecular de las cepas. RA: región amplificada, pb: pares de base (tamaño del amplicón)

PCR	R.A	Cebador	Secuencia (5'- 3')	pb	Cita
Múltiple: tipificación	<i>16S rRNA</i>	16S-F	AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG	798	(126)
		16S-R	GGA CTA CCA GGG TAT CTA AT		
	<i>mecA</i>	mecA-1	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C	533	
		mecA-2	AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C		
	<i>nuc</i>	nuc-1	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT	270	
		nuc-2	AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC		
Múltiple: agr	<i>agr</i> tipo 1	<i>agr1</i>	GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT	441	(26)
		<i>Pan agr</i>	ATGCACATGGTGCACATGC		
	<i>agr</i> tipo 2	<i>agr2</i>	TATTACTAATTGAAAAGTGGCCATAGC	575	
		<i>Pan agr</i>	ATGCACATGGTGCACATGC		
	<i>agr</i> tipo 3	<i>agr3</i>	GTAATGTAATAGCTTGTATAATAATACCCA ^A	323	
		<i>Pan agr</i>	ATGCACATGGTGCACATGC		
	<i>agr</i> tipo 4	<i>agr4</i>	CGATAATGCCGTAATACCCG	659	
		<i>Pan agr</i>	ATGCACATGGTGCACATGC		
<i>ica</i>	<i>ica</i>	Ica- F	GATTATGTAATGTGCTTGGA	770	(127)
		Ica-R	ACTACTGCTGCGTTAATAAT		
PVL	<i>lukS/F-PV</i>	luk-PV-1	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATA	433	(128)
		luk-PV-2	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC		
<i>sei</i>	<i>sei</i>	sei-F	CTCAAGGTGATATTGGTGTAGG	576	(129)
		sei-R	AAAAAACTTACAGGCAGTCCATCTC		
Complejo mec	Clase A	ml-1	AATGGCGAAAAAGCACAACA	480	(34)
		ml-2	GACTTGATTGTTTCTCTGTT		
		mcR-2	CGCTCAGAAATTTGTTGTGC		
		mcR-3	ATCTCCACGTTAATTCCATT		
	Clase B	IS1272	ATTTTGGGTTTCACTCGGAT	565	
		mecR1	CAAATATTAAGAACGTGTT		
	Clase C	mA7	ATATACCAAACCCGACAACACTACA	804	
		IS2	TGAGGTTATTCAGATATTTTCGATGT		
Recombinasa	A1B1	ccr-β2	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	700	(35)
		ccr-α2	AACCTATATCATCAATCAGTACGT		
	A2B2	ccr-β2	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	1000	
		ccr-α3	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT		
	A3B3	ccr-β2	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	1600	
		ccr-α3	GCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT		

Locus agr

La determinación de la presencia del locus *agr* se hizo mediante la PCR múltiple del gen *agr* (26). Se utilizaron como controles las siguientes cepas: para *agr* I NRS158, para *agr* II NRS 70, para *agr* III NRS123 y para *agr* IV NRS 153. Los cebadores utilizados y los tamaños de los segmentos amplificados se encuentran detallados en la Tabla 2.

La mezcla de reacción se preparó con un volumen final de 25 μ l conteniendo buffer de PCR (1X), ClMg_2 (3mM), dNTPs (200 μ M), cebadores (0,3 μ M cada uno), *Taq* polimerasa (1U), ADN 1 μ l, agua milliQ csp 25 μ l. Las condiciones de ciclado utilizadas fueron: una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación (30 segundos a 94°C, 30 segundos a 54°C y 60 segundos a 72°C) y una fase de elongación final de 4 minutos a 72°C.

Funcionalidad del locus agr

Para estudiar la funcionalidad del locus *agr* se evaluó la actividad hemolítica de la *hld* producida por *S. aureus*, ya que la misma actúa como marcador debido a que se transcribe junto con RNIII por la activación del mismo promotor. La actividad de la *hld* se mide a través de la interacción con la β -hemolisina producida por la cepa *S. aureus* RN4220 en agar sangre de carnero.

A partir de cepas obtenidas de cultivos de 24 hs en TSA se realizó una suspensión equivalente a la escala 0,5 de Mc Farland en solución fisiológica estéril de cada microorganismo a estudiar. Se realizó en el centro de una placa una estría de la suspensión de RN 4220, y perpendicularmente a ella se sembraron estrías de las suspensiones de los microorganismos a analizar, posteriormente las placas fueron incubadas durante 24 hs a 37°C. *S. aureus* puede producir distintos tipos de hemolisinas (α , β y δ -hemolisina). La producción de β -hemolisina por la cepa RN 4220 permite detectar la producción de *hld* debido a las interacciones entre ellas (la β -hemolisina aumenta la lisis producida por la *hld*, e inhibe la lisis producida por α -hemolisina). Se observa un efecto parecido a la “cabeza de un fósforo” o “punta de flecha” en la unión de las estrías de RN 4220 y el aislamiento productor *hld*. La intensidad de este efecto indica cualitativamente la actividad del locus *agr* (132).

Producción de biofilms: ica

Se determinó la presencia del gen *ica* (127). Mediante esta PCR se obtiene un segmento amplificado de 770pb (Tabla 2). Como control positivo se utilizó la cepa NRS 101. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μ l conteniendo buffer de PCR (1X), dNTPs (200 μ M), MgCl₂ (3 mM), cebadores (1 μ M de cada uno), Taq polimerasa (1 U), ADN 1 μ l, y agua milliQ csp 25 μ l.

Las condiciones de ciclado utilizadas fueron: una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación (60 segundos a 94°C, 60 segundos a 50°C y 60 segundos a 72°C) y una fase de elongación final de 5 minutos a 72°C.

Funcionalidad del gen ica

Para evaluar la funcionalidad del gen *ica*, se realizaron cultivos en tubos de hemolisis de las diferentes cepas en TS líquido suplementado con glucosa al 1%, y se incubaron a en forma estática a 37°C. Se evaluó la producción de biopelículas mediante inspección ocular a las 24, 48 y 72hs. Como control positivo se utilizó la cepa NRS 101 (*S. epidermidis*), que es prototipo en la producción de biofilms y como control negativo la cepa *Newman Δ ica*.

Toxina: sei

Se utilizaron los cebadores detallados en la Tabla 2 y se siguieron las especificaciones del autor para realizar esta PCR (129). Control positivo: cepa clínica M 1, proporcionada por la Catedra de Microbiología FCM.

Leucocidina de Panton-Valentine (PVL)

Para amplificar los genes *lukS/F-PV* se utilizaron los cebadores descriptos por Lina y col. (128), que amplifican un fragmento de 433pb (Tabla 2), y la PCR fue realizada según las especificaciones de los autores. Se utilizó como control positivo la cepa clínica M 1.

Estudio del casete de resistencia a meticilina (SCCmec)

Se realizó la clasificación de los tipos de SCCmec según los complejos *mec* y el tipo de recombinasa (*ccr*) de acuerdo a las recomendaciones del grupo internacional de trabajo para la clasificación de elementos SCCmec (IWG-SCC, <http://www.sccmec.org>). Esto puede visualizarse en la Tabla 3.

Complejo *mec*

El complejo *mec* puede dividirse en 3 clases: A, B y C

Clase A

Se utilizaron los cebadores descritos por Katayama y col. (34) que se encuentran detallados en la Tabla 2, y la PCR se llevó a cabo según las especificaciones de los autores. Los cebadores mI-1 y mI-2 amplifican el gen *mecI* (480pb), mientras que *mcR-2* y *mcR-3* amplifican *mecRI* (1597pb). El complejo *mec* de clase A contiene ambos genes completos. Como controles positivos se utilizaron las cepas NRS 70 y SCC*mec* III.

Tabla 3 - Clasificación de los tipos de SCC*mec* según los complejos *mec* y *ccr*

Tipos de SCC <i>mec</i>	Tipo de complejo <i>ccr</i>	Tipo de complejo <i>mec</i>
I	1(A1B1)	B
II	2 (A2B2)	A
III	3(A3B3)	A
IV	2 (A2B2)	B
V	5 (C1)	C2
VI	4 (A4B4)	B
VII	5 (C1)	C1
VIII	4 (A4B4)	A
IX	1 (A1B1)	C2
X	7 (A1B6)	C1
XI	8 (A1B3)	E

Clase B

Los cebadores utilizados se encuentran descritos en la Tabla 2 y amplifican un fragmento de 565pb (130). Las condiciones para la realización de esta PCR fueron modificadas en nuestro laboratorio. Las reacciones se llevaron a cabo con buffer de PCR (1X), ClMg₂ (1,5 mM), dNTPs (200 µM), cebadores (0,4 µM cada uno), Taq polimerasa (1U), agua milliQ csp 25 µl. Las condiciones empleadas para la reacción fueron una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, seguidos de 30 ciclos de amplificación

(94°C por 60 segundos, 48°C por 60 segundos, 72°C por 60 segundos) y una fase de amplificación final a 72°C por 10 minutos. La cepa SCC*mec* I fue utilizada como control positivo.

Clase C2

Para la identificación de este complejo se utilizaron los oligonucleótidos detallados en la Tabla 2, descriptos por Kondo y col. (131). La reacción se llevó a cabo según las especificaciones de los autores.

Complejos ccr 1, 2 y 3 (ccrAB):

La determinación del complejo *ccrAB* se realizó a través de la PCR múltiple descrita por Ito, T y col. siguiendo sus especificaciones (35), mediante la cual es posible identificar tres tipos de complejos *ccr*: *ccr* tipo 1 (A1B1), *ccr* tipo 2 (A2B2) y *ccr* tipo 3 (A3B3), los controles utilizados para cada tipo de *ccr* respectivamente fueron las cepas SCC*mec* I, NRS 70 (SCC*mec* II) y SCC*mec* III. Los cebadores utilizados se encuentran detallados en la Tabla 2.

Presencia del trasposon Tnp20

En las cepas que amplificaron la región de *mecB* pero con un tamaño mucho mayor al esperado (2000 pb en lugar de 565 pb) se investigó la inserción de un gen de la familia transposasa 20 (*tnp20*) (52). Mediante el análisis de la secuencia de *mecB* con la inserción de *tnp20* (código de acceso: EU437549.2), se observó que la misma posee dos sitios de cortes únicos para las enzimas HindIII y XbaI, lo cual genera un patrón de bandas de 1210, 787 y 129 pb y de 1115 y 1015 pb, respectivamente. Para confirmar la presencia de este transposon en dichas cepas, se realizó la amplificación de la región *mecB* mediante los cebadores IS1272 y *mecR1* y se purificó el fragmento de 2000 pb mediante el uso del Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up (Promega). Posteriormente se digirió tres horas a 37°C con las enzimas HindIII o XbaI del producto y se corrió en gel de agarosa 1% para su análisis.

Ensayos con bacteriófagos

Procesamiento de muestras para el aislamiento de fagos

Búsqueda de fagos ambientales

Muestras de tierra recolectadas de Centros de Salud de Rosario fueron incubadas con BF durante 12 horas a 4°C y centrifugadas 5 minutos a 6.500 rpm. A continuación,

sus sobrenadantes (SN) fueron filtrados a través de filtros esterilizantes de 0,45 μm de tamaño de poro y conservados a 4°C.

*Inducción de fagos lisógenos en cepas de *S. aureus* por tratamiento con mitomicina C*

Las cepas de origen clínico de *S. aureus* (proporcionadas por la Catedra de Microbiología de esta Facultad), provenientes en su mayoría de hemocultivos y de infecciones de piel y partes blandas, fueron tratadas con mitomicina C para inducir los potenciales profagos presentes. Para ello se inocularon 5 ml de TS con 50 μL de un cultivo saturado de cada cepa y se incubaron 30 minutos a 37°C con agitación, hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial temprana con una densidad óptica (DO) de 0,1-0,2. A continuación, se agregó mitomicina C a una concentración final de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se continuó la incubación a 37°C con agitación suave (60 rpm). Pasadas las 6 horas, se procedió a centrifugar las muestras a 3.000xg durante 12 minutos a 4°C, para luego neutralizar el sobrenadante correspondiente a cada cepa a pH 7 con NaOH 0,1 N y filtrarlos a través de filtros de tamaño de poro 0,45 μm (133).

Búsqueda de bacteriófagos a partir de hisopados nasales

Se agruparon de a diez los hisopos con los que se tomaron las muestras nasales, se los colocaron en tubos de centrifugas de 50 ml conteniendo 4 ml de BF y se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente.

Detección de fagos

Los fagos presentes tanto en las muestras ambientales como en los cultivos tratados con mitomicina C y los presentes en los hisopados nasales, fueron detectados mezclando 500 μl del sobrenadante de las muestras de tierra o 100 μl del sobrenadante proveniente del cultivo tratado con mitomicina C o 200 μl de las muestras provenientes de hisopados nasales, con 100 μl de un cultivo saturado de la cepa RN 4220 y se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se agregó el top agar (medio TS con 0.4% de agar fundido a 50°C) hasta un volumen final de 4 ml, se homogenizó y se vertió sobre una placa de petri con 15 ml del mismo medio solidificado (base, con una concentración de agar de 1.2%). Tanto el top como la base fueron previamente suplementados con CaCl_2 (2mM) y MgSO_4 (10mM). Luego de la incubación durante 12- 24 horas a 30°C se observó la presencia de placas de lisis.

Amplificación de los bacteriófagos en TS agar

En los casos en los que se observaron placas de lisis, se procedió a tomar cada una de ellas separadamente mediante repique y posterior amplificación en la cepa RN 4220. Para ello se tomó la placa de lisis con asa de puntura y se sumergió la misma en 50 µl de BF, se dejó a temperatura ambiente para eluir la placa durante 6-12 horas, para luego mezclarlo con 100 µl de un cultivo saturado de RN 4220. A continuación, se incubó 20 minutos en mesada y se agregó el top agar de TS fundido a 50°C hasta un volumen final de 4 ml, se homogenizó, se vertió sobre una placa de TS base. Se incubó a 30°C, durante 12 horas. Se repitió dicho protocolo 3 veces para obtener el fago puro.

Finalmente, para generar stocks en alto título de dichos bacteriófagos, se procedió a propagarlos mediante incubación de 10 µL de la dilución adecuada del fago en BF y 100 µl de un cultivo saturado de la cepa RN 4220. Luego de veinte minutos a temperatura ambiente, se agregaron 4 ml de top de TS, se mezcló suavemente por inversión del tubo y se volcó sobre la placa base de TS. Las placas fueron incubadas a 30°C por 24 horas. En aquellas placas que mostraron lisis cuasi-confluyente los fagos fueron eluidos mediante el agregado de 4 ml de BF por cada placa de Petri, dejándolos en contacto a temperatura ambiente con agitación suave por 12 horas; luego de este tiempo se removió el eluido y se filtró mediante filtros de esterilización de tamaño de poro 0,45 µm. En estas condiciones se alcanzan títulos de fagos de hasta 10¹³ UFP/ml. Dichas soluciones de fago concentradas fueron conservadas a 4°C.

Titulación de los bacteriófagos

Para poder determinar el título de una solución de un determinado fago, se realizó una placa indicadora de la cepa RN 4220, mezclando 100 µl de un cultivo saturado de dicha cepa con 4 ml de TS top agar fundido a 50°C, se mezcló suavemente por inversión, luego se volcó sobre una placa de TS base y se permitió la solidificación del medio. A continuación, se realizó la titulación por el método de “spot”. Se depositaron gotas de 5 µl correspondientes a las diluciones seriadas 1/10 V/V de la solución del fago sobre la placa indicadora, se permitió que se adsorban las gotas y se incubó la placa durante 12 horas a 30°C. Se calculó el título en UFP/ml de la solución original según la siguiente fórmula:

Título (UFP/ml) = N° placas de lisis en la dilución más alta x factor de dilución x 200

Amplificación en medio líquido

La misma se realizó con la cepa RN 4220 en TS líquido suplementado con CaCl_2 (2mM) y MgSO_4 (10mM), con un volumen final de 10 ml, a 37°C con agitación (180rpm). Se ensayaron 2 MOI (multiplicidad de infección) diferentes: 0.5 y 0.25. Se partió de una DO inicial de 0,23 que equivalen a $6,9 \times 10^7$ bacterias/ml, teniendo en cuenta que una DO de 1 representa en promedio 3×10^8 bacterias/ml.

Optimización de la amplificación en medio líquido

Para esto se realizó la amplificación en TS líquido del fago elegido, con la cepa RN 4220 con una MOI de 0,5 a 37°C , y se probaron las siguientes condiciones 1) solo TS, 2) TS y CaCl_2 (2mM), 3) TS y MgSO_4 (10mM), 4) TS con CaCl_2 (2 mM) y MgSO_4 (10mM) y 5) solo RN 4220 en TS líquido.

Posteriormente se optimizó el agregado de CaCl_2 para los ensayos en medio líquido, para ello realizamos una curva con diferentes concentraciones del mismo (0 mM, 1 mM, 2 mM y 4 mM).

Caracterización de los bacteriófagos

Temperatura de amplificación y morfología de placa

Se ensayaron 4 temperaturas para la comparación de la morfología de las placas: 25°C , 30°C , 37°C y 42°C siguiendo el protocolo de amplificación descrito previamente.

Determinación de los tamaños genómicos aproximados de los fagos aislados

La determinación del tamaño genómico de los bacteriófagos aislados se llevó a cabo mediante Electroforesis en gel de agarosa por campo pulsante, PFGE, (del inglés Pulse Field Gel Electrophoresis). Las muestras correspondientes a los distintos fagos fueron compactadas dentro de tacos de agarosa mezclando 400 μL de cada muestra con 400 μL de agarosa ultra pura fundida al 1,4% (P/V) en buffer TE 0,5X (5 mM Tris HCl; 0,5 mM EDTA a pH 8,0), en un baño termostaticado a 54°C . Luego, 80 μL de la mezcla fueron colocados dentro del molde para permitir la formación de los tacos, incubados 15 minutos a 25°C para su solidificación y luego removidos para su posterior tratamiento. Los mismos fueron incubados ON a 55°C en 2 ml de buffer de lisis (1% P/V N-lauril sarcosina, 0,2% P/V SDS, 0,1 mg/ml Proteínasa K) por cada taco. Se realizaron lavados sucesivos en buffer de lavado (20 mM Tris HCl; 50 mM EDTA a pH 8,0) y por último los tacos fueron resuspendidos en 2 ml de buffer TE (10 mM Tris HCl; 1 mM EDTA a

pH 8,0), y almacenados a 4°C hasta su utilización. Para preparar el gel se utilizó agarosa para PFGE de alto punto de fusión (BIO-RAD) al 1% P/V preparada en buffer TBE 0,5X (22,5 mM Tris borato, 0,5 mM EDTA, pH 8,0). Se colocaron los tacos en las calles correspondientes del gel y la corrida del mismo se realizó en buffer TBE 0,5X con los siguientes parámetros: 6 V/cm, 18 horas, 2 segundos de ST (“switch time”) inicial, 10 segundos de ST final, manteniendo la corriente en un valor menor a 300 mA. Esta técnica se llevó a cabo en la estación experimental INTA de Rafaela utilizando un equipo Chef-DR III (Biorad). Para su visualización, el gel se sumergió en una solución de Bromuro de Etidio, se incubó una hora en agitación suave y se destiñó en agua destilada por 30 minutos para luego ser visualizado bajo luz UV.

Análisis de los viriones por microscopía electrónica de transmisión

La morfología y el tamaño de 4 de los fagos aislados fueron analizados por microscopía electrónica de transmisión (TEM), utilizando un microscopio electrónico modelo JEOL JSM 100 CXII, perteneciente al servicio del centro Científico Tecnológico de Bahía Blanca (Conicet). Para ello, las suspensiones de los viriones fueron colocadas sobre grillas de nitrocelulosa recubiertas con carbono y teñidas con acetato de uranilo al 2% P/V. Las imágenes fueron obtenidas con una cámara CCD Gatan Erlangshen.

Determinación del rango de hospedador de los bacteriófagos

Se estudió la capacidad que poseen los bacteriófagos aislados de infectar y lisar distintas cepas de *S. aureus* por medio del ensayo de spot, para lo cual, se crecieron cultivos líquidos de las cepas a ensayar en medio TS y se utilizaron alícuotas de 100 µl de dichos cultivos para realizar las placas indicadoras correspondientes. Posteriormente realizamos sobre las placas indicadoras que contenían las diferentes cepas, 2 spot por cada fago (10^2 UFP/5 µl y 10^5 UFP/5 µl), las placas se incubaron durante 24 horas a 30°C. Este ensayo se realizó por duplicado.

Para evaluar la especificidad de nuestros bacteriófagos se utilizaron 96 cepas de las cuales, 4 no son *S. aureus* (1 *Staphylococcus saprofiticus* de origen clínico, 2 *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y ATCC 14990 y una cepa de *Escherichia coli* DH5α). De las 92 cepas de *S. aureus* 9 son cepas patrones o de colección (RN 4220, ATCC 25923, ATCC 43300, NRS 70, NRS 123, NRS 153, NRS 158, ATCC 29740, V329), 54 cepas de las utilizadas fueron aisladas y caracterizadas durante esta tesis en los trabajos de portación nasal en personal de salud del HPC (26 cepas), del HEEP (8 cepas)

y de pacientes con psoriasis (20 cepas). Las 29 cepas restantes provienen de INTA Rafaela (10 cepas), La Plata (Programa Carnicerías Saludables) (9 cepas) y aislamientos hospitalarios proporcionados por la Cátedra de Microbiología FCM (10 cepas). Para conocer más datos de estas 29 cepas que nos fueron proporcionadas realizamos antibiogramas y evaluamos la capacidad de las mismas de formar biopelículas, según las especificaciones realizadas anteriormente.

El rango de hospedador fue realizado para 9 bacteriófagos, de los cuales 7 fueron aislados en esta tesis (Mat_T, Mat_N, Mat_29, Mh_1, Mh_4, Mh_5 y Mh_15) y 2 fagos líticos para comparar: K, donado por el Dr. A. Coffey, Departamento de Ciencias Biológicas (Instituto de tecnología Cork, Irlanda) y CG (63), aislado en nuestro laboratorio durante las tesis de la Dra Peressutti Bacci y la Dra. Abatangelo.

Extracción de ADN fágico y secuenciación genómica

El ADN fágico se obtuvo por tratamiento de los lisados de alto título de los bacteriófagos (obtenidos a través de la amplificación de los mismos en medio TS preparados con agarosa) con DNAsaI (1 µg/mL) y RNasa (1 µg/mL) durante 1 h a 37°C seguido de filtración a través de filtros de acetato de celulosa de 0.2 µm. Luego, se adicionó a los lisados Tiocianato de Guanidina (concentración final: 800 mg/ml) y la mezcla se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 2 horas para la solubilización de dicha sal. A continuación, el ADN fágico fue extraído de dicha suspensión utilizando el kit comercial Wizard® DNA Clean-Up System (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm y su integridad se corroboró mediante electroforesis en geles de agarosa. Finalmente, las soluciones de los ADN de los distintos fagos se guardaron a -20°C hasta su uso.

La secuenciación genómica se realizó en las instalaciones del Instituto de Agro-Biotecnología de Rosario, Argentina (INDEAR) mediante la tecnología Illumina HiSeq 1500. Las bibliotecas fueron generadas utilizando la guía Illumina de preparación de muestras de ADN Nextera® XT (Octubre 2012, Illumina Inc, San Diego, CA, USA).

Anotación genómica

La anotación de los fagos fue realizada con la colaboración del Dr. Cristian Suárez, la misma se realizó mediante la utilización del programa DNAMaster

(<http://cobamide2.bio.pitt.edu/>), el cual utiliza los programas Glimmer3 y GeneMark para la predicción de los marcos abiertos de lectura (ORF, del inglés, Open Reading Frame). La presencia de ARNt se evaluó a través de tRNA Scan SE (<http://cobamide2.bio.pitt.edu/>) y ARAGORN (134). El análisis de las funciones probables de los diferentes ORF se realizó empleando BLASTP. La representación circular de los mapas genómicos de los fagos se llevó a cabo mediante el uso del script `cgview_xml_builder.pl` y el archivo XML generado se graficó mediante el programa CGView ejecutándolo en Linux (135). Para la genómica comparativa, se empleó un análisis de alineamiento fragmentado utilizando el programa Gegenees (136), utilizando las secuencias de ADN de nuestros fagos y de 128 fagos temperados de *S. aureus* descargados de la base de datos del NCBI. Los parámetros empleados en el alineamiento fueron 50 pb de “step size” y 25 pb de “sliding step size”. El alineamiento se exportó en formato Nexus y empleando el programa Splitstree 4.0, se aplicó el algoritmo de NeighborNet (137) para graficar la red filogenética. Por último, se empleó el programa Easyfig2.25 para realizar el alineamiento en base a la similitud de secuencia empleando tBLASTn. Las homologías de las secuencias se muestran a partir de 35% de similitud (<http://mjsull.github.io/Easyfig/files.html>).

Búsqueda bioinformática de endolisinas

La anotación de estos genomas y el análisis de los mismos, sumados a otros genomas de fagos aislados en el laboratorio, permitieron identificar 25 genes que codifican para endolisinas. Para el estudio filogenético de las mismas, se emplearon las secuencias de aminoácidos de éstas y de las endolisinas de los fagos PhiH5, Phi11 y K. Primero, se realizó un alineamiento mediante MAFFT v7 empleando el método iterativo G-INS-i (138) y posteriormente un árbol filogenético utilizando el método de máxima verosimilitud en el servidor web PhyML 3.0 (139), empleando sistema automático de selección del modelo de sustitución (140). Para la visualización del árbol se empleó Dendroscope 3.0 (137). La búsqueda de dominios se realizó mediante la herramienta Pfam (<https://pfam.xfam.org/>) (141). Este trabajo fue realizado por el Dr. Cristian Suárez.

Clonado y expresión de las endolisinas

Para el clonado y expresión de las diferentes endolisinas trabaje de manera conjunta con el Dr. Cristian Suarez.

Se amplificaron los genes de las endolisinas I74, Mat_N, y 320 utilizando cebadores con los sitios de restricción NdeI y BamHI (Tabla 4). Luego se clonaron en pGEM-T easy, y se transformó *E. coli* DH5 α . Posteriormente, se enviaron a secuenciar distintos clones conteniendo las endolisinas I74, Mat_N y 320. Se comprobó que la secuencia no tuviese mutaciones y se procedió al subclonado en el vector de expresión pET22b mediante corte con las enzimas NdeI y BamHI (Thermo Scientific). Los cortes se realizaron según indicaciones del fabricante. Con los plásmidos pET22-I74, pET22-Mat_N y pET22-320 se transformó la cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLys (142). La expresión de las diferentes endolisinas se realizó mediante el agregado de IPTG a diferentes tiempos y temperaturas.

Tabla 4 Cebadores utilizados para clonar las endolisinas I74, Mat_N, 320 y CG

Cebador	Secuencia (5' - 3')
I74_Fw	GCGCATATGCAAGCAAAATTGAC
I74_Rv	GGATCCGAGATTTCTCCCCATAAGTC
Mat_N: Fw	GCGCATATGCAAGCAAAACTAACTA
Mat_N_Rv	GGATCCGAGATTTCTCCCCATAAGTC
320_Fw	CATATGTTAATGACAAAAACCAAGCAG
320_Rv	GGATCCGTGCTAAACTTACCAAAC
RF_CG_Fw	GGATCGGAAAACCTGTATTTTCAGGGATCCGTAATGGCTAAGACTCAAGCAG
RF_CG_Rv	GTGGCTCCAGCTGCCGGATCCCTATTTGAATACTCCCCAGGCA

RF cloning

Los cebadores para la amplificación del gen de la endolisina CG fueron diseñados en la web <http://www.rf-cloning.org/>, utilizando como plásmido para clonarla un derivado del pET32a que expresa GFP como proteína de fusión a His-Tag (143) (Tabla 4).

La amplificación del megaprimer se llevó a cabo utilizando como molde ADN genómico del fago CG, 0.5 μ M de cada cebador, 200 μ M de cada dNTPs y 0.5 U de la enzima Phusion Hot Start, DNA polymerase (Thermo Scientific), Buffer Phusion 1X y 5% de DMSO. El ciclado fue el siguiente: desnaturalización inicial: 98°C 30 seg., y 30 ciclos de 98 °C 10 seg., 62 °C 30 seg. y 72 °C 75 seg., y un paso de extensión final de 72°C por 5 min. El megaprimer amplificado se purificó con el kit Wizard SV Gel and

PCR Clean-Up System según instrucciones del fabricante. Posteriormente, se realizó una amplificación utilizando como molde 1 μ l del vector pET32a y 2.5 μ l de megaprimer utilizando 0.5 U de la enzima Phusion Hot Start DNA polymerase, 200 μ M de dNTP, Buffer Phusion 1X en un volumen final de 20 μ l. El ciclado térmico fue el siguiente: desnaturalización inicial: 98°C 30 seg., y 30 ciclos de 98 °C 10 seg., 58 °C 60 seg. y 72 °C 5 min., y un paso de extensión final de 72°C por 7 min. Una alícuota de 5 μ l de la mezcla de reacción fue sometida a digestión con la enzima DpnI durante toda la noche a 37°C. Luego la enzima fue inactivada mediante incubación a 80°C durante 20 min. Se utilizaron 5 μ l para transformar la cepa *E. coli* DH5 α . Se analizó la presencia de clones positivos mediante PCR de colonia. A los clones positivos para el gen de la endolisina CG se les realizó una extracción de plásmidos mediante Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega) según indicación del fabricante. Se realizó transformación química con los plásmidos a la cepa de *E. coli* C43 (144). Las transformantes obtenidas fueron utilizadas para la inducción mediante el agregado de IPTG.

Expresión de endolisinas recombinantes en E. coli

Para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* se siguió el protocolo de rutina (Novagene), donde las células transformadas con los plásmidos correspondientes fueron cultivadas durante una noche en medio LB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente, a 37°C con agitación. El cultivo saturado así obtenido fue diluido a una DO₆₀₀ aproximada de 0.08 en el mismo medio fresco y se continuó la incubación hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.6-0.8. Luego se agregó IPTG a diferentes concentraciones fin de inducir la expresión de los genes clonados, las células fueron cultivadas a diferentes temperaturas con agitación. Posteriormente las células fueron cosechadas mediante centrifugación y almacenadas a -70°C hasta su uso.

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Las diferentes muestras proteicas fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida realizados en condiciones desnaturizantes (145) utilizando la celda Mini-PROTEAN III Cell (BioRad). El gel de concentración fue preparado al 5 % P/V del monómero de acrilamida en solución de 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,03 % V/V de TEMED; 0,12 % P/V de APS y 0,16 % P/V SDS. El gel de separación fue preparado al

15 % P/V de acrilamida en solución de 390 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,06 % V/V de TEMED, 0,12 % P/V de APS y 0,16 % P/V SDS. La relación acrilamida:bis-acrilamida utilizada fue de 30:0,8. Las muestras fueron tratadas a 100°C por 5 min con buffer de siembra 1X (glicerol 10%V/V, Tris-HCl 50mM pH6,8, SDS 2% P/V, azul de bromofenol 0.1%, β -mercaptoetanol 1% y EDTA 1mM). La electroforesis se realizó a 200 V con una fuente BioRad en buffer de corrida (0,3 % P/V Tris base, 1,44 % P/V Glicina y 0,1 % P/V SDS, pH 8,3). Como marcador de peso molecular se utilizó el marcador comercial Low range SDS-PAGE Standard (BioRad). Para detectar las proteínas los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 al 0,25% (disuelto en 50% metanol -10% ácido acético) durante 20 min y se destiñeron en agua a 100°C hasta eliminación del color de fondo.

Purificación de las endolisinas

Este protocolo fue llevado a cabo por la Dr Cecilia Balaban. Las células fueron resuspendidas en Buffer de lisis (BLE), 50 mM Tris-HCl, pH=8, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween-20, 1mM PMSF. La ruptura de las células se realizó por sonicación: 8 pulsos, potencia 40 % ciclos de 20 seg / 1 min de descanso. Se centrifugó el extracto total 1 h a 13000 rpm. De esta manera se separa el extracto soluble y pellet.

Para la purificación de las endolisinas mediante el uso de columnas de afinidad se procedió de la siguiente manera. Primero se empaquetó 1 ml de resina (His.Bind® Resin, Novagen) previamente cargada con Ni^{2+} y se lavó con 10 volúmenes de H₂O. Se equilibró la resina con 20 volúmenes Buffer equilibrio: 50 mM Tris-HCl pH=8, 150 mM NaCl. Se lavó la resina con 20 volúmenes de Buffer de lavado: Buffer de equilibrio suplementado con 20 mM imidazol. Se eluyó la proteína con 15 volúmenes de Buffer de elución: Buffer de equilibrio suplementado con 300 mM imidazol. Se dializaron los eluidos en 2 litros de Buffer de equilibrio suplementado con 5 mM CaCl₂. Se dejó toda la noche en heladera con agitación. Se agregó 30 % de glicerol a la solución de proteína dializada y se almacenó -80°C.

Dosaje de proteínas

La concentración de proteínas totales en las muestras fue determinada espectrofotométricamente mediante el método de Bradford. Para ello se cuantificó la unión de un colorante, el Azul de Coomassie G-250, a la proteína, y esto se comparó con la unión del mismo colorante con diferentes cantidades de una proteína de concentración

conocida. Se utilizó como estándar una solución de albumina sérica bovina (BSA) 1 mg/ml (146).

Ensayos de actividad de endolisinas

La actividad de las endolisinas fue evaluada mediante el uso de zimogramas, lisis en placa y en medio líquido

Zimogramas

Para ensayar la actividad de las endolisinas mediante la técnica de zimograma, se realizó un SDS-PAGE, al cual se le agrega en el gel de separación 5 ml de células de *S. aureus* RN 4220 muertas por calor y lavadas con agua destilada estéril (147). Luego se colocan las diferentes alícuotas de endolisinas a ensayar y se realiza la corrida electroforética. Después de la misma se procede al lavado del gel 30 min con agua destilada. La renaturalización de las proteínas se realiza mediante la incubación toda la noche en buffer Tris-HCl 25 mM pH 7.6 suplementado con 0.1% p/v de tritón X-100 a 37°C. Posteriormente, el gel se tiñe con una solución 0.1% p/v de azul de metileno en KOH durante 2 hs, luego se destiñe mediante la incubación con agua, la aparición de zonas claras es indicativo de la lisis de las células por acción de las endolisinas.

Lisis en placas

Para este ensayo se hicieron placas indicadoras de las cepas RN 4220 y RN 25923, con la misma técnica que se usó para la preparación de placas indicadoras para bacteriófagos y que fue descrita en esta sección previamente. Se ensayó la actividad de las diferentes endolisinas realizando spot de 5µl de cada una (5mg/ml) a 25, 30, 37 y 42°C.

Lisis en TS líquido

Se evaluó la capacidad de lisis de las 3 endolisinas purificadas a una concentración de 0.25mg/ml sobre la cepa RN 4220 en TS líquido suplementado con CaCl₂ (2mM) y MgSO₄ (10mM), a 37°C en placa de micropocillos, con un volumen final de 200 µl. Se partió de una DO inicial de 0,25. El crecimiento fue monitoreado automáticamente por medición de la DO₆₀₀ cada 15 minutos en lector de microplacas Synergy HT Multi-Mode (Biotek) durante un lapso de 4 horas. Este ensayo se realizó por triplicado.

Rango de lisis de las endolisinas Mat_N y 320

Para evaluar dicho rango se prepararon placas indicadoras de las diferentes cepas donde se realizaron spot de 5µl de cada endolisinas (5mg/ml), estas placas se incubaron por 24 hs a 30°C. A su vez en la misma placa se realizaron spot de 10³ fagos/5µl de los fagos Mat_N y 320. Este ensayo se llevó a cabo sobre las 96 cepas en las que se probaron los bacteriófagos, y los detalles de las mismas al igual que la descripción de la técnica se realizó ya en esta sección.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos fueron realizados en RStudio Version 1.1.463. Los análisis multivariados MCA fueron realizados mediante los paquetes FactoMineR (<http://factominer.free.fr>) y Factoextra (<https://cran.r-project.org/web/packages/factoextra/index.html>) mientras que el V test fue calculado mediante la función *catdes* en FactoMineR

RESULTADOS Y DISCUSIONES

CAPÍTULO 1: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN PORTADORES NASALES

El aislamiento y la caracterización de las cepas de *S. aureus* se realizó en el marco de tres proyectos, que nos permitieron a su vez estimar la tasa portación nasal en los diferentes grupos muestreados:

- 1- Búsqueda de portadores asintomáticos de *S. aureus* en trabajadores de la salud del HPC, Rosario (Santa Fe-Argentina). Parte de los resultados de este trabajo fueron publicados en la Revista Argentina de Microbiología (148).
- 2- Búsqueda de portadores asintomáticos de *S. aureus* en trabajadores de la salud del HEPP, Granadero Baigorria (Santa Fe-Argentina)
- 3- Rol de *S. aureus* en dermatosis crónicas.

Durante el desarrollo de los mismos se analizaron 548 hisopados nasales, los cuales fueron estudiados tanto por técnicas microbiológicas clásicas como de biología molecular (126), lo que nos permitió aislar y caracterizar 148 cepas de *S. aureus*, de las cuales 34 corresponden a SAMR y 114 a SAMS (Tabla 5).

Tabla 5: Muestras analizadas en el Capítulo 1. HPC: personal de salud Hospital Provincial del Centenario, HEPP: personal de salud Hospital Escuela Eva Perón, Pctes c/ Ps: pacientes con psoriasis que se atienden el Hospital Provincial del Centenario, Pctes s/Ps: pacientes sin psoriasis que se atienden en el Hospital Provincial Centenario (grupo control).

Origen	N° de muestras	N° de cepas identificadas		
		SAMS	SAMR	Total
HPC	320	76	20	96
HEEP	132	17	7	24
Pctes c/ Ps	50	14	6	20
Pctes s/ Ps	46	7	1	8
Total	548	114	34	148

Perfil de resistencia a antibiótico en las cepas aisladas

Se estudió el perfil de resistencia a las diferentes familias de antibióticos mediante la técnica de Kirby Bauer en todas las cepas aisladas que fueron identificadas como *S. aureus*. La resistencia a meticilina fue del 22.97% (34/148). Al evaluar la resistencia a otras familias de antibióticos nos encontramos con una resistencia global a macrólidos de 41.22% (61/148) que supera a la resistencia a meticilina, observándose una resistencia del 61.76% (21/34) en cepas SAMR vs 35.09% (40/114) en SAMS. La resistencia a aminoglucósidos fue del 20.27% (30/148), correspondiendo a SAMR 41.18% (14/34) y a SAMS 14.03% (16/114). En lo que respecta a fluorquinolonas la resistencia general fue del 15.54% (23/148) siendo del 32.35% (11/34) para SAMR y del 10.53% (12/114) para SAMS. En lo que concierne a la mupirocina solo se encontraron 3 cepas de SAMS (aisladas en el HPC) resistentes a esta droga. Ninguna de las cepas aisladas mostró resistencia a trimetroprima – sulfametoxazol (TMS) ni a vancomicina.

En la Figura 11 podemos observar de manera comparativa las prevalencias de las resistencias a las diferentes familias de antibióticos encontradas en cada trabajo realizado durante esta tesis, siendo la resistencia a macrólidos la de mayor jerarquía en los diferentes grupos, seguida por la resistencia a aminoglucósidos, salvo en los SAMR del HPC donde la segunda mayor resistencia está representada por la familia de las fluorquinolonas, ubicándose en tercer lugar los aminoglucósidos.

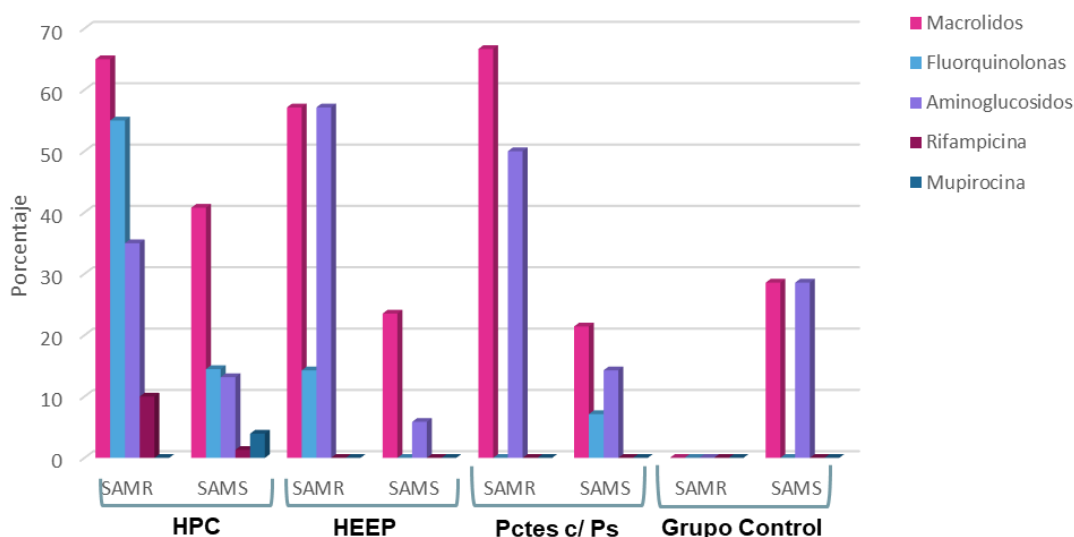


Figura 11: Comparación de la prevalencia de la resistencia a antibióticos según el origen de las cepas y si son SAMS o SAMR. HPC: Hospital Provincial del Centenario, HEEP: Hospital Escuela Eva Perón y Pctes c/Ps: pacientes con psoriasis.

Caracterización molecular de las cepas aisladas

Se realizó la tipificación molecular de las 148 cepas aisladas mediante PCR múltiple (126), para lo cual previamente se realizó la extracción de ADN según el protocolo de MLST (<http://saureus.mlst.net/misc/info.asp>). Con el objetivo de profundizar la caracterización de las cepas SAMR, y de los SAMS aislados en el HEEP y los de pacientes con y sin psoriasis, se procedió a la amplificación mediante PCR de los genes *agr*, *ica*, *PVL*, *sei* (solo en las cepas de pacientes con psoriasis y en las del grupo control) e identificación del *SCCmec*.

Agr

El locus *agr* (Figura 12 A) fue tipificado por PCR múltiple (26), siendo dentro de las cepas SAMR el más prevalente el tipo II con 41,18% (14/34), seguido del *agr* tipo I 35.29% (12/34) y el *agr* tipo III 20.59% (7/34); solamente una cepa presentó *agr* tipo I y II. Ningún SAMR presentó *agr* tipo IV. En cuanto a las cepas SAMS estudiadas, el *agr* más frecuente fue el tipo I 65.79% (25/38), seguido del tipo *agr* III 15.79% (6/38), el *agr* tipo IV 7.89% (3/38) y el tipo *agr* II 5.26% (2/38); 2 cepas de SAMS presentaron dos tipos de *agr* de manera simultánea, una presentó *agr* tipo I y II y la otra *agr* tipo I y III. La funcionalidad de *agr* se evidenció indirectamente a través de la expresión de la *hld* (4), medida semi-cuantitativamente a través de la interacción con la β hemolisina producida por la cepa *S. aureus* RN 4220, observándose como “cabeza de un fósforo” o “punta de flecha” en el cruce de las estrías (Figura 12 B) (45).

La actividad *hld* se evidenció en 32/37 cepas con *agr* de tipo I, en 12/17 de las de *agr* tipo II, en 2/13 de las de *agr* tipo III y en 1/2 de las cepas con *agr* tipo IV. En el caso de las cepas que poseían más de un *agr*, se observó la *hld* en 1/2 de las que presentan *agr* tipo I y II y en la única que presentó tipo I y III de manera simultánea no se comprobó la *hld*. Por lo tanto, podríamos interpretar que 49/72 cepas transcriben este gen.

Producción de Biofilms

El componente de la matriz más estudiado es el polisacárido de adhesión intercelular (PIA) codificado en el operón *icaADBC*. Debido a esto, se estudió la presencia del gen *ica*., detectándose el mismo en la totalidad de las cepas estudiadas. El amplificado correspondiente a este gen puede visualizar en la Figura 12 C.

Para evaluar la funcionalidad del gen *ica*, se realizaron cultivos en tubos de hemolisis de las diferentes cepas en TS liquido suplementado con glucosa al 1%. Cuando la biopelícula madura y alcanza una mayor densidad celular se disparan señales que involucran péptidos autoinducidos (AIP) que inducen la expresión de *agr* desencadenando la dispersión de la biopelícula, para evitar esto se agrega glucosa al 1% p/v que actuaría inhibiendo estas señales (149). Todas las cepas analizadas fueron capaces de desarrollar biopelículas a las 24 o 48 hs. Sin embargo, pudimos observar cualitativamente que algunas cepas presentan mayor capacidad de producir biopelículas que otras (Figura 12 D).

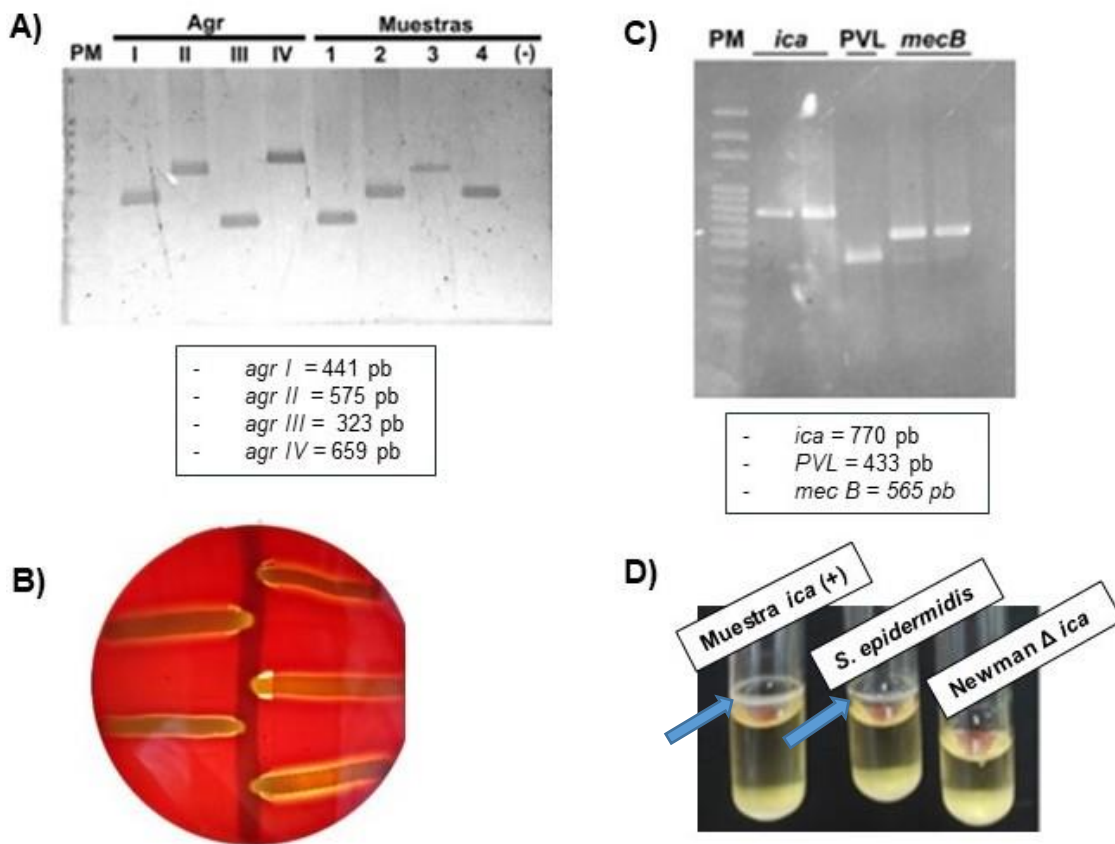


Figura 12: A) Detección de *agr* por PCR. Se observa en las calles 2: *agr* tipo I (441pb), calle 3: *agr* II (575 pb), calle 4 *agr* III (323pb) y calle 5: *agr* IV (659pb), todas las calles citadas previamente pertenecen a los controles. De la calle 6 a la 9: muestras analizadas, calle 10: control negativo. El marcador de peso molecular empleado fue Ladder 100 pb. (calle 1). **B) Identificación de la δ hemolisina (*hld*).** Estria vertical RN 4220 y estrías horizontales diferentes cepas evaluadas. **C) Reacción de PCR.** Calle 1: marcador de peso molecular Ladder 100 pb. Calle 2 y 3 amplificado del gen *ica* (770pb), calle 4: amplificado gen *PVL* (433pb), calle 5 y 6: *mecB* (565pb) y calle 7: control negativo. **D) Cultivos en TS suplementado con glucosa 1%**, imagen obtenida a las 24 hs, las flechas en azul marcan la formación de biopelículas.

Leucocidina de Panton-Valentine (PVL)

La PVL es una toxina de dos componentes capaz de formar poros en la membrana de las células, está codificada en los genes *lukS-PV* y *lukF-PV* (128). Se identificó la presencia de PVL en el 20.59% (7/34) de los SAMR (Figura 12 C).

Sei

Las enterotoxinas, forman parte del grupo llamado “superantígenos” (56, 57). Gocmen y col, refieren que dentro de la familia de enterotoxinas, *sei* es la que mayor prevalencia tiene en cepas aisladas en pacientes con psoriasis versus cepas aisladas en un grupo control (150). Los resultados obtenidos mostraron que, dentro del grupo de los pacientes con psoriasis, el 100% de los SAMR poseen el gen que codifica para esta toxina, mientras que sólo está presente en el 50% de los SAMS. Por otro lado, en el grupo control el único SAMR fue positivo para este gen y el 71.43% de los SAMS también lo poseen, por lo que no pudimos determinar una diferencia significativa en la prevalencia de dicha toxina entre el grupo de pacientes con psoriasis y sin psoriasis (grupo control).

Estudio del casete de resistencia a meticilina (SCC*mec*)

Se realizó la clasificación de los tipos de SCC*mec* según los complejos *mec* y *ccr* (Figura 13) de acuerdo a las recomendaciones del grupo internacional de trabajo para la clasificación de elementos SCC*mec* (IWG-SCC, <http://www.sccmec.org>).

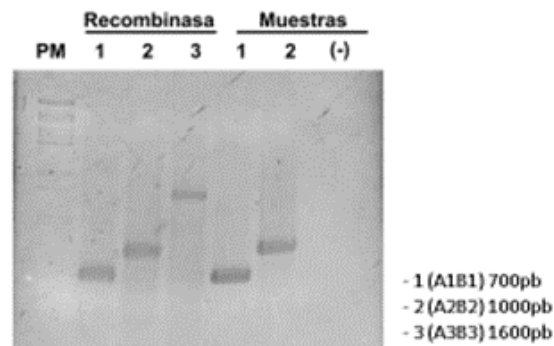


Figura 13: Reacción de PCR para identificación de tipo derecombinasa. Calle 1: marcador de peso molecular λ /BstEII. Calle 2 a 4 controles de recombinasa, 2 tipo 1 (700pb), 3 tipo 2 (1000pb) y: tipo 3 (1600pb) respectivamente. Calle 5 y 6 muestras analizadas y calle 7: control negativo.

Se logró identificar el tipo de SCC*mec* presente en 32 de los 34 SAMR aislados, siendo el tipo predominante SCC*mec* tipo IV (27/34), mientras el SCC*mec* tipo 1 fue identificado en 5/34 cepas. Las 2 cepas en la que no fue posible determinar el tipo de *mec*, presentan recombinasa tipo 2 y fueron aisladas en una enfermera y un enfermero que trabajan en el mismo sector del HPC, y ambas cepas presentan el mismo perfil de sensibilidad a los antibióticos ensayados y *agr* tipo I.

Tres de las cepas que presentan el SCC*mec* tipo IV, mostraron un amplificado del gen *mecB* de un tamaño mayor al esperado (2000 pb aprox. versus 565 pb); dos de estas cepas pertenecen al grupo aislado del HEEP y una a un paciente con psoriasis (Figura 14 B).

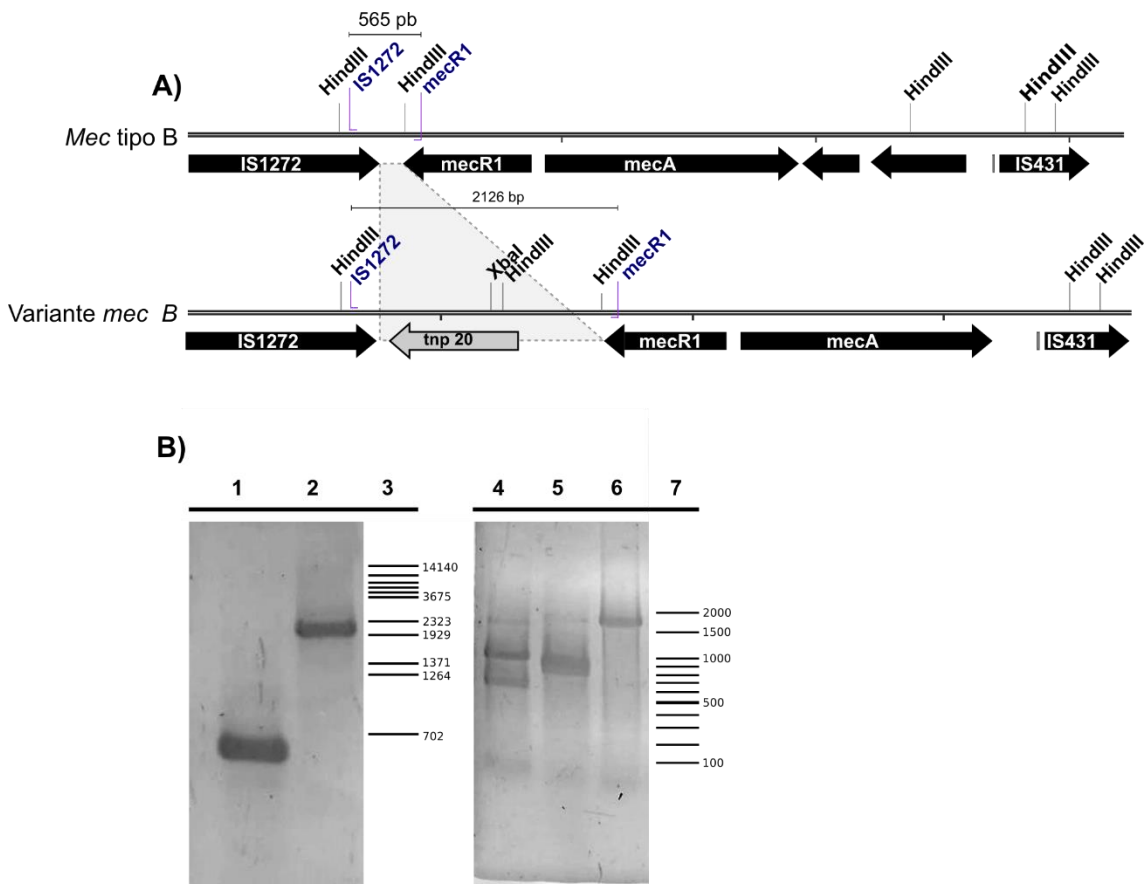


Figura 14- A) Representación esquemática de SCC*mec* tipo IV clase B y su variante. Se detallan la posición de los sitios de restricción y el tamaño de los amplicones (565 y 2126 pb) para ambas variantes **B) Gel de agarosa de los productos de PCR de *mecB*.** Calle 1, *mecB* (565pb); calle 2, variante de *mecB* con *tnp20*; calle 3, marcador de peso molecular λ /BstEII. Las calles 4 y 5 muestra los fragmentos obtenidos luego de realizar la digestión con *Xba*I y *Hind*III, respectivamente, calle 6: producto de PCR sin digerir. Se indica posición del marcador de peso molecular (Ladder de 100 pb).

Con respecto a esto, está reportado la presencia de la inserción de un gen de la familia transposasas 20 (*tnp20*), donde la región hipervariable (HVR) y el gen *ugpQ* se encontraban deletados (ausentes), cuando se compara con otros elementos *mec* de clase B (151). Para confirmar la presencia de este transposon en el gen *mec* de nuestras cepas, primero se descargó la secuencia del mismo (código de acceso: EU437549.2) y luego se analizó *in silico* el patrón de restricción de la región comprendida entre los cebadores IS1272 y *mecR1*. Este análisis mostró que el corte con las enzimas HindIII o XbaI de este amplicón, si contiene el transposon da un perfil de fragmentos característicos (1210, 787 y 129 pb y 1115 y 1015 pb, respectivamente) (Figura 14 B). De esta forma pudimos demostrar mediante los cortes individuales con estas enzimas de restricción del amplicón purificado, que los casetes SCC*mec* tipo IV de estas 3 cepas que contiene *mecB* poseen el transposon.

Potación nasal de *S. aureus* en personal de salud

La portación nasal de *S. aureus* es un evento de alto impacto, sobre todo si consideramos las cepas meticilino resistente en trabajadores de la salud, que pueden actuar como vectores favoreciendo la transmisión de dicho patógeno. En el presente capítulo estudiamos la portación nasal en trabajadores de la salud, en dos efectores de gran importancia: el HPC de la ciudad de Rosario (Santa Fe) y el HEEP, de Granadero Baigorria (Santa Fe), correspondiéndole una tasa de portación nasal del 30% y del 18.18%, respectivamente. En la Tabla 6 y en la Tabla 7 pueden observarse las características de ambas poblaciones estudiadas y la prevalencia de la portación nasal de *S. aureus* en cada efector de salud.

Tabla 6: Características de la población estudiada y prevalencia de *S. aureus* en el HPC

Hisopados nasales HPC	
Nº de muestras tomadas	320
Edad media	35.46 años
Rango etario	55
Nº de mujeres	224
Nº de hombres	96
Portadores	SAMS: 24% (76/320) SAMR: 6% (20/320)
No portadores	70%

Tabla 7: Características de la población estudiada y prevalencia de *S. aureus* en el HEEP

Hisopados nasales HEEP	
Nº de muestras tomadas	132
Edad media	37.23 años
Rango etario	51
Nº de mujeres	88
Nº de hombres	44
Portadores	SAMS: 12.88% SAMR: 5.3%
No portadores	81.81%

Distribución de la portación nasal según el sexo y la edad

La distribución de la portación nasal de *S. aureus* por sexo en el HPC fue mayor en el grupo de hombres que de mujeres 36.46% (35/96) vs 27.23% (61/224), con diferencia significativa a nivel estadístico (test de Fisher y Chi p <0.05). Sin embargo, la distribución de SAMR fue más homogénea en ambos sexos 7.29% (7/96) para hombres vs 5.8% (13/224) en mujeres, sin mostrar significancia estadística (test de Fisher y Chi p >0.05). Mientras que en el HEEP la distribución de la portación nasal de *S. aureus* por sexo fue igual en ambos grupos 18.18%, resultando portadores 8/44 hombres y 16/88 mujeres. En lo que respecta a la presencia de SAMR, la distribución no muestra diferencias significativas en ambos grupos, 5.68% (5/88) en mujeres y 4.54% (2/44) en hombres (Tabla 7). La edad media en hombres y mujeres muestreados fue igual para ambos sexos (37.23 años) por lo que la edad no estaría afectando estos resultados.

Análisis multivariado

Para este análisis se utilizaron los datos de edad, sexo y portación (no portadores, SAMR y SAMS). Se realizó el análisis de las correspondencias múltiples (MCA) mediante el uso de FactoMineR y Factoextra en RStudio. El análisis MCA muestra la distribución de los individuos en el espacio en función a la portación. La distribución espacial de los individuos depende de todas variables analizadas, en nuestro caso sexo y edad. Por ello, observando las flechas de las variables, se interpreta que cuanto más cercanas se hallan existe una mayor correlación entre ellas. En la Figura 15 A, que corresponde al HPC, se puede observar que los no portadores se relacionan más con el

sexo femenino y el grupo etario de adultos mayores a 40 años; los portadores de SAMS se relacionan más al grupo de jóvenes y los de SAMR están más asociados al grupo etario formado por adultos y sin verse afectado por el sexo.

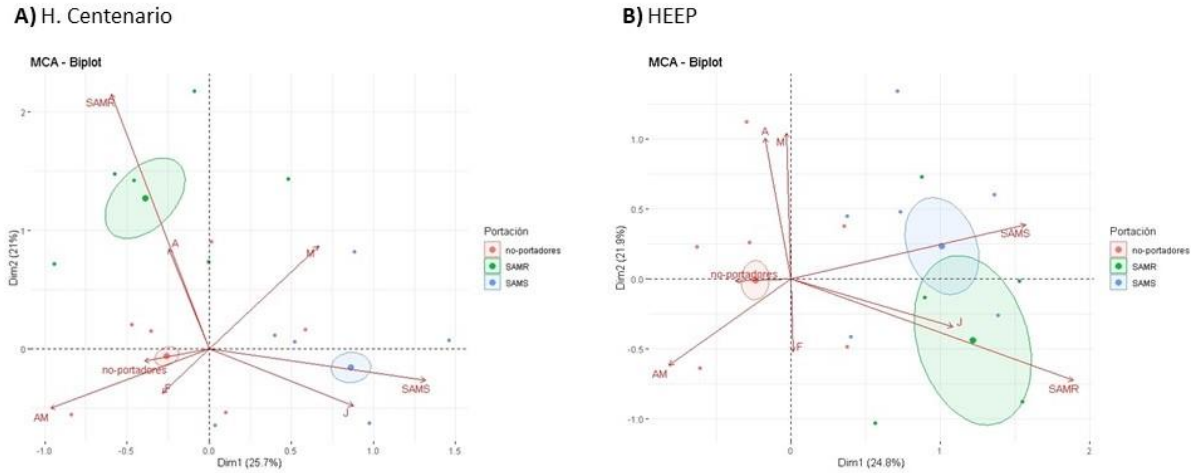


Figura 15: MCA-Biplot A)HPC. B) HEEP. Variables analizadas: Edad, le corresponden 3 categorías: J (jóvenes de 20 a 29 años), A (adultos de 30 a 39 años) y AM (adultos mayores de 40 o más años); Portación: No portadores, SAMS y SAMR y Sexo: F (mujeres) y M (hombres).

En el mismo análisis realizado para el HEEP (Figura 15 B), se observa una clara relación entre ser portador y pertenecer al grupo etario entre 20 a 29 años, relacionándose este grupo etario de manera más estrecha con los portadores de SAMR que con los de SAMS. Los no portadores se relacionan más con el grupo etario mayores de 40.

Comparación entre ambos efectores de salud

Cuando uno compara las tasas de prevalencia en dos poblaciones diferentes, en este caso la del HPC y la del HEEP, utilizar las tasas crudas puede conducir a errores, lo más adecuado ante diferencias poblacionales es realizarlo con las tasas corregidas. Para ello, aplicamos la corrección por método directo de las tasas de prevalencia de portación nasal de *S. aureus*, en función a la edad y el sexo, que son dos variables que como comentamos anteriormente influyen en el resultado (Tabla 8).

Tabla 8: Tasas de prevalencias crudas y corregidas por método directo.

Portación nasal	Tasa de prevalencia cruda		Tasa de prevalencia corregida	
	HPC	HEEP	HPC	HEEP
SAMS	23.75%	12.88%	23.34%	12.41%
SAMR	6.25%	5.30%	6.40%	6.97%
Total	30%	18.18%	29.74%	19.38%

La portación nasal a nivel general es mayor en el HPC que en HEPP, tanto si se comparan las tasas de prevalencias crudas como las ajustadas por método directo por edad y sexo (test de Fisher $p < 0.05$). Pero esta diferencia está dada por la tasa de portación nasal de SAMS ya que la portación de SAMR es similar en ambos hospitales, ya sea que los comparemos mediante las tasas crudas o corregidas, no existe diferencia significativa desde el punto de vista estadístico (test de Fisher $p > 0.05$). En ninguno de los efectores se observa la influencia del sexo en la portación de SAMR.

Rol de *Staphylococcus aureus* en dermatosis crónicas

Para estudiar el rol de *S. aureus* en las dermatosis crónicas se utilizó como modelo de enfermedad la psoriasis en placa, y se recurrió al estudio de casos y controles no pareados. La psoriasis es una enfermedad crónica, de base genética, mediada inmunológicamente, pudiendo ser desencadenada y/o agravada por múltiples factores. La prevalencia de esta patología en la población caucásica se encuentra entre un 2% y un 3%, en nuestro país no existen estadísticas de incidencia ni prevalencia de esta enfermedad, pudiendo afectar a todos los grupos etarios y ambos sexos por igual. La psoriasis en placa o vulgar es la forma más frecuente de presentación de esta patología (80-90% de los pacientes) (152).

Se tomaron hisopados nasales a ambos grupos con el objetivo de determinar la presencia de *S. aureus*. Las características de los grupos estudiados pueden observarse en la Tabla 9. Los resultados obtenidos en cuanto a la portación nasal de *S. aureus* mostraron que existe una diferencia significativa entre los pacientes con psoriasis y el grupo control (test de Fisher, $p = 0.024$). El *odd ratio* calculado implica que es 3.12 veces más probable ser portador de *S. aureus* para una persona con psoriasis que para las que no poseen la patología.

Teniendo en cuenta que la edad y el sexo son dos variables que influyen en la portación nasal de *S. aureus* y que nuestro muestreo no fue realizado de manera pareada (homologando sexo y edad) decidimos realizar el ajuste de las tasas de portación nasal por edad y sexo por método directo. A pesar de realizar dicho ajuste la prevalencia de la portación nasal de *S. aureus* en pacientes con psoriasis es mayor que en el grupo control siendo de 37.24% y de 22.98% respectivamente (test Fisher, $p < 0.05$).

Tabla 9: Características de la población estudiada

	Pacientes con psoriasis	Grupo control
Edad media	47.39	38.06
Rango (edad)	59	49
Sexo	25 hombres / 25 mujeres	12 hombre / 34 mujeres
Portación de <i>S. aureus</i>:		
- SAMR	12% (6/50)	2,17% (1/46)
- SAMS	28% (14/50)	15,22% (7/46)
- Total	40% (20/50)	17.39% (8/46)

Análisis multivariado

Para este análisis se utilizaron los datos de edad, sexo y portación. Los resultados pueden visualizarse en la Figura 16.

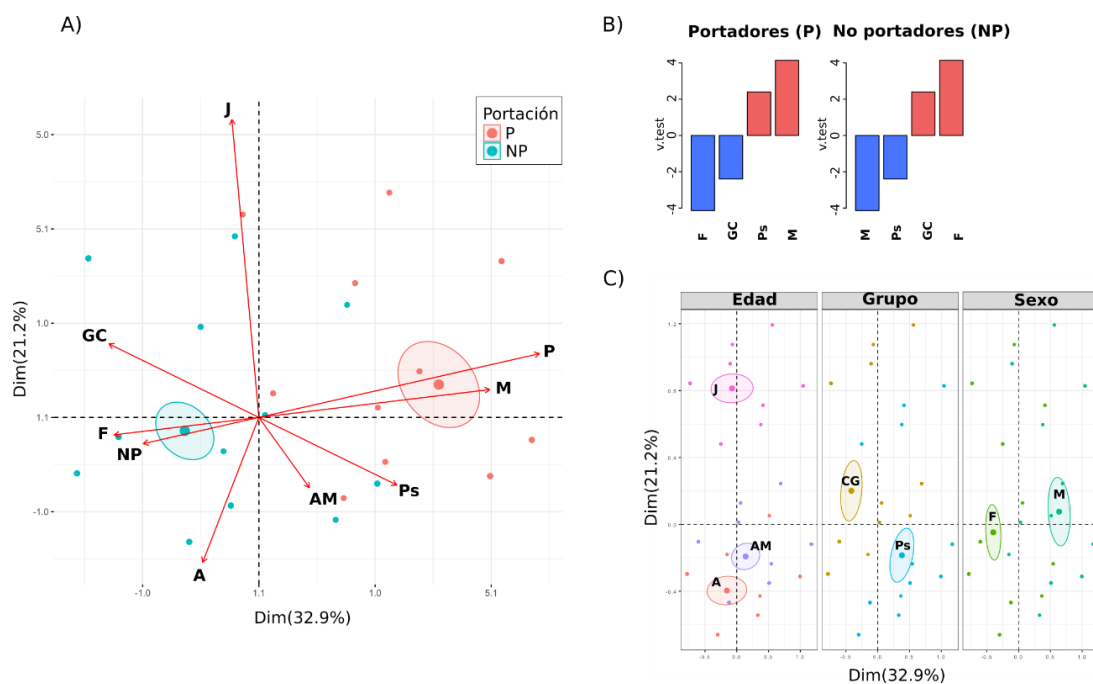


Figura 16: Análisis Multivariado. A) Gráfico MCA Biplot generado con FactoMineR y factoextra en RStudio. Las variables analizadas son indicadas con las siguientes letras; P= Portador, NP= No Portador, M= masculino, F= femenino, J= jóvenes, A= adultos, AM= adulto mayor, Ps=psoriasis y GC= Grupo control. Se dibujaron elipses de confianza alrededor de la variable portación ($p < 0,05$). B) La correlación de las variables se analizó con la función “catdes”, las variables expresadas hacia arriba y hacia abajo (barra roja y azul, respectivamente) se representaron para los grupos de portadores y no portadores. C) Elipses de confianza

El análisis MCA mostró una mayor relación entre ser portador de *S. aureus* y tener psoriasis y ser del sexo masculino, por otro lado, la no portación se correlaciona con los

integrantes del grupo control y de sexo femenino (Figura 16A). El análisis de las elipses de confianza nos permite corroborar que tanto las variables sexo como edad y grupo influye en la distribución de los individuos en el espacio (Figura 16 B). Este análisis se realizó con un nivel de significación de 0.95. Además, el v.test (Figura 16 C) confirma los resultados, observándose una expresión positiva de las variables psoriasis y sexo masculino en portadores en oposición a una sobreexpresión de la variable grupo control y sexo femenino en los no portadores.

Discusión del Capítulo 1

Durante este capítulo pudimos aislar y caracterizar 148 cepas de *S. aureus*, de las cuales 34 corresponden a SAMR y 114 a SAMS, por lo que hay una resistencia global a meticilina del 22.97% en las cepas estudiadas. Dentro de nuestros aislados se destaca la alta resistencia a la familia de macrólidos, siendo del 35,09% en cepas SAMS y del 61.76% en SAMR. En lo que concierne a la mupirocina solo se encontraron 3 cepas resistentes en los SAMS aislados de los hisopados correspondientes al HPC; esta droga es importante de estudiar porque forma parte de los protocolos de descolonización nasal para los casos que lo ameritan. En ninguna de las cepas aisladas se encontró resistencia a TMS ni a vancomicina. Diaz y col. en Texas y Benot y col. en Uruguay, en concordancia con nosotros, reportan que la mayoría de las cepas aisladas tanto en la comunidad como en el ámbito nosocomial, han incrementado la resistencia a clindamicina, pero preservan la sensibilidad a TMS por lo que esta droga podría considerarse una opción terapéutica. Además, observan un desplazamiento de las cepas SAMR-HA por las cepas SAMR-AC dentro del hospital (153, 154). Peng y col., en un trabajo realizado en China, reportan una mayor resistencia a clindamicina y mayor sensibilidad a TMS en cepas SAMR-AC, y una relación contraria en SAMR-AH (155).

Considerando de manera global las cepas aisladas, dentro de las SAMR, el *agr* más prevalente fue el tipo II (41,18%), seguido del tipo I (35.29%) y el tipo III (20.59%). Ningún SAMR presento *agr* tipo IV. En cuanto a las cepas SAMS estudiadas, el *agr* más frecuente fue el tipo I (65.79%), seguido del tipo III (15.79%), el tipo IV (7.89%) y el tipo II (5.26%). El *agr* tipo II que fue el más prevalente dentro de las cepas SAMR, fue el menos frecuente dentro de las cepas SAMS. En concordancia con lo reportado por Singh y Ray (20), las cepas que presentan *agr* tipo I y II presentan una forma funcional

del mismo y las de tipo III en general una forma no funcional (se infiere que el mismo no se está transcribiendo porque no se observa la δ hemolisis en nuestros ensayos). Además, refieren que el tipo más frecuente de *agr* a nivel de la colonización nasal es el tipo III, pero no fue así para ninguno de nuestros trabajos realizados. La expresión de *agr* regula positivamente la transcripción de genes codificantes de exotoxinas (proteínas extracelulares), que no solo se relacionan con la producción de determinadas enfermedades, sino que también con la propagación bacteriana, y regula negativamente la transcripción de genes codificantes de adhesinas (proteínas de superficie).

Por otro lado, evaluamos la presencia del gen *ica* que forma parte del operón *icaADBC*, que es uno de los posibles mecanismos que presenta *S. aureus* para la formación de biopelículas. Detectamos la presencia de dicho gen en todas las cepas aisladas y estudiadas en este capítulo y evaluamos la funcionalidad del mismo mediante la observación de la formación de biopelículas, pudiéndose observar que aquellas cepas que no presentaban una forma funcional de su *agr*, cualitativamente producían una mayor cantidad de biopelícula comparadas con las que presentaban una forma funcional de su *agr*.

En lo que respecta a la PVL, la misma fue identificada en 7/34 SAMR, de los cuales 5 son de personal de salud del HPC, uno de un paciente con psoriasis y el otro es la única cepa SAMR aislada en el grupo control. La mayoría de las cepas de *S. aureus* resistentes metilicina aisladas en infecciones de origen comunitario producen PVL, generalmente considerada un marcador molecular de este tipo de cepas (22). Las 5 cepas del HPC que presentan PVL poseen *agr* tipo III y solo en una de ellas se detectó la *hdi* (forma funcional). En lo que respecta a la cepa PVL (+) aislada del paciente con psoriasis, presentó *agr* I y II (no funcional) y la cepa del grupo control *agr* tipo I también no funcional (no se detecta *hdi*).

Pudimos determinar el tipo de *SCCmec* presente en 32/34 SAMR analizados y el tipo predominante fue el tipo IV encontrándose en 27 cepas, y de estas, 3 presentaron la inserción de *tnp20*., las otras 5 cepas presentaron *SCCmec* tipo I. El tipo de *SCCmec* influye en otras características de las cepas, Collins y col. (156) demostraron que SAMR con *SCCmec* tipo II tenían menor producción de enzimas citolíticas versus aquellos que tenían *SCCmec* tipo IV, lo que indica que un tipo específico de *SCCmec* modula la producción de toxinas. Otros trabajos más recientes muestran que hay un vínculo directo

entre los niveles de meticilino resistencia y la actividad del locus *agr*, observándose que cuando hay una alta expresión de PBP2a hay bajos niveles de expresión de RNAlII. No está claro el mecanismo por el cual PBP2a inhibe la actividad de *agr*, se cree que podría deberse a cambios generados en la pared celular (157). Las cepas SAMR-CA que tienen SCC*mec* tipo IV presentan altos niveles de expresión de enzimas citolíticas y meticilino resistencia, y esto es porque en ausencia de antibióticos β -lactámicos hay niveles muy bajos de expresión de PBP2a; cuando dichas cepas se exponen a niveles mayores de esta droga decrece la actividad del locus *agr*. La flexibilidad de estas cepas explica por qué rápidamente se volvieron dominantes dentro del medio hospitalario en Estados Unidos (27). Esta plasticidad podría ser una de las causas de la alta frecuencia que encontramos del casete SCC*mec* Tipo IV en las cepas estudiadas. Además, las 7 cepas que poseen PVL tienen este tipo de casete.

Interesantemente, detectamos la inserción de *tnp20* dentro del complejo *mec* en 3 cepas (2 de personal de salud del HEEP y una de un paciente con psoriasis) que fueron PVL (-), *ica* (+), *agr* tipo I y *hdi* (+). En lo que respecta al antibiograma de estas cepas, presentan el mismo perfil: resistencia a macrólidos con resistencia inducible a clindamicina y resistente a aminoglucosidos (siendo por antibiograma sensible a gentamicina y resistente a tobramicina, kanamicina y amikacina), y sensibilidad a fluorquinolonas, rifampicina y TMS. La inserción de *tnp20* está reportada en uno de los clones predominantes en Corea del Sur (ST72 -SCC*mec* tipo IVa, PVL(-) que causa infecciones invasivas CA-SAMR (151, 158) El perfil de resistencia a antibióticos entre nuestras cepas y el clon coreano fue idéntico, también todas presentan *agr* de tipo I y la negatividad de la presencia de PVL, sugiriendo una relación entre ellas. Sin embargo, para confirmarlo, se requiere la secuenciación del casete SCC*mec* completo.

Portación nasal de S. aureus

Se estimó que la portación nasal de SAMS en trabajadores de la salud es de un 23.7% y de SAMR de 4.6% (55). Nosotros detectamos una portación de SAMS de 24% para el HPC y de 12.88% para el HEEP. En lo que respecta a la presencia de SAMR fue de 6% y de 5.3%, respectivamente. Como podemos observar, la presencia de SAMS en el HEEP es menor que la reportada en la literatura y que la que encontramos en el HPC; sin embargo, la presencia de SAMR en ambos efectores que estudiamos es un poco superior a la media de portación en trabajadores de la salud. Además, hay otros trabajos

reportados en la literatura donde se detectan mayor prevalencia de SAMR en los trabajadores de la salud como el de Legrand y col., donde determinaron una portación de SAMS del 27% y de SAMR del 10%, en un Centro Hospitalario de Rehabilitación de Francia(54). El estudio de García y col. (159) de portación nasal en Lima, Perú en trabajadores de la salud en un hospital del tercer nivel, reportaron una portación 27.7% de *S. aureus* y de ellos, 8.7% corresponden a SAMR.

En el trabajo citado de García y col. (159) realizaron además algunas caracterizaciones de las cepas SAMR aisladas. Todas las cepas SAMR fueron resistentes a macrólidos (clindamicina y eritromicina) y un 37.5% fue resistente a gentamicina. En nuestro caso detectamos en nuestras cepas SAMR aisladas en el HPC, una resistencia a macrólidos del 65%, a aminoglucósidos del 35% y a fluorquinolonas del 50%. En lo que respecta a los SAMR aislados en el HEEP, las resistencias fueron de 57.14% para macrólidos y aminoglucósidos, y de 4.16% para fluorquinolonas. Además, estos autores realizaron algunas caracterizaciones moleculares como PVL y SCC*mec*, no pudiendo demostrar la presencia de esta toxina en ninguno de los aislados. En nuestro caso tampoco detectamos PVL en las cepas provenientes del HEEP, pero si la pudimos detectar en el 25% de los SAMR provenientes del HPC. En lo que respecta al SCC*mec* el tipo más frecuente que reportaron fue el tipo I (33.33%), seguido del tipo II (4.16%), en el resto de los casos no pudieron determinar cuál era el que se encontraba (62.5%). En nuestro caso el tipo más prevalente en ambos hospitales fue el SCC*mec* tipo IV con una prevalencia de 80% para el HPC y de 83.33% para HEEP, seguido del tipo I 10% y 16.66% respectivamente; no detectamos ninguna cepa con SCC*mec* tipo II. Interesantemente, se observó la posible presencia de un transposon (*tnp20*) en 2 de las cepas con casete SCC*mec* tipo IV aisladas en el HEEP. En el H Centenario como dijimos previamente hubo dos cepas en la que no pudimos determinar el tipo de SCC*mec*.

Nuestros resultados mostraron que la edad y sexo influyen en la portación nasal de *S. aureus*, y esto está reportado tanto a nivel poblacional como en trabajadores de la salud, sin embargo, si hablamos de portación de SAMR no hay diferencia entre ambos sexos (49, 50).

Como se refirió previamente se ha observado la propagación de SAMR desde los trabajadores de salud hacia sus convivientes, por lo que solo descolonizar al personal sin testear su grupo familiar no resulta del todo efectivo, formándose un círculo vicioso para

la reintroducción de este patógeno al ambiente hospitalario (188). Presuntamente, los individuos que son portadores nasales de *S. aureus* llevan a este microorganismo a otros sitios de su cuerpo a través de sus manos y a los objetos que lo rodean (10, 189). Los portadores nasales ya sean intermitentes o permanentes constituyen un riesgo tanto para infecciones autógenas como para la transmisión a otros individuos (190). El CDC ha recomendado la detección de portación de SAMR de rutina para la admisión a áreas de alto riesgo de los pacientes, y la revisión general de todos los pacientes admitidos se debaten en los EE. UU (191).

Análisis de la portación en psoriasis

La prevalencia de la portación nasal en pacientes con psoriasis fue mayor que en el grupo control (40% vs 17.39%) con diferencia significativa desde el punto de vista estadístico (test de Fisher $p < 0.05$). En la revisión sistemática publicada por Totte y col. en 2016 (58), se analizaron 5 trabajos de portación nasal de pacientes con psoriasis versus un grupo control, y en 3 de ellos se encuentran diferencias significativas al igual que en nuestro trabajo. Otros trabajos similares que concuerdan con nuestros resultados son los de Balci y col. (56), y el de Gocmen y col. (150). La portación nasal de *S. aureus* fue mayor en hombres que en mujeres tanto en los pacientes con psoriasis como en el grupo control, pero al evaluar la presencia de cepas SAMR la prevalencia de las mismas no se encuentra vinculada con el sexo, esto concuerda con nuestros resultados de portación nasal en personal de salud antes referidos.

La alteración del microbioma cutáneo podría tener un rol en la patogenia de la psoriasis. Los investigadores consideran que para controlar esta patología es necesario mantener el equilibrio del microbioma (192). *S. aureus* se asocia a las exacerbaciones en la psoriasis con un mecanismo patogénico que incluiría la activación de las células Th1 y Th17, promoviendo la producción de interleuquina, TNF- α , e interferón γ y esto perpetuaría el daño al queratinocito. Además, las enterotoxinas de los estafilococos pueden activar a las células T induciendo una respuesta inmunológica sistémica y los peptidoglicanos de esta bacteria favorecerían la proliferación de los queratinocitos (42). Patologías como estas donde es necesario eliminar un patógeno sin generar aún más disbiosis, o aquellas generadas por bacterias multiresistentes hacen necesario el surgimiento de nuevas alternativas terapéuticas.

CAPITULO 2: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIÓFAGOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Como se comentó previamente, los bacteriófagos(fagos) son virus procarióticos y parásitos intracelulares obligados, siendo los organismos más abundantes de la biósfera y su distribución se basa en la de su hospedador bacteriano (160). En base a esto, se procedió a buscar fagos activos contra *S. aureus* en muestras de tierra de diferentes centros de salud de la ciudad de Rosario. Sin embargo, es sabido que la mayor parte de los bacteriófagos de *S. aureus* son temperados (86). En el estado de profago, los mismos se mantienen en el hospedador bacteriano sin provocar su lisis, pero en determinadas condiciones, pueden comenzar un ciclo lítico que conduce a la lisis de la célula hospedadora con la consecuente liberación de nuevos viriones. Dicha inducción puede producirse espontáneamente o por exposición a agentes que dañen a la bacteria. Teniendo en cuenta dicha abundancia de profagos en cepas de *S. aureus* se decidió inducir los potenciales profagos presentes en cepas clínicas y por otro lado la búsqueda de fagos que se encuentren libres de manera espontánea en las muestras de hisopados nasales (viroma nasal).

Búsqueda de bacteriófagos

Aislamiento a partir de muestras de tierra

Se analizaron 10 muestras de suelo, las cuales fueron agrupadas según su procedencia, y tratadas para la búsqueda de fagos. En ninguna de las muestras analizadas fue posible hallar bacteriófagos de *S. aureus*.

Inducción con mitomicina C

Se procedió al aislamiento de fagos temperados presentes como lisógenos en las cepas clínicas de *S. aureus* provenientes de hemocultivos e infecciones de piel y partes blandas, las cuales se trataron con Mitomicina C y se utilizó la cepa RN 4220, evidenciando la presencia de bacteriófagos (placas de lisis) en 10 de las 18 muestras; en la mayor parte de las mismas las placas de lisis fueron homogéneas en tamaño y morfología. Se tomó una única placa de lisis de cada muestra para su clonado y propagación. Mediante este ensayo logramos aislar

10 bacteriófagos que fueron nombrados con las letras Mh (Mahue) y el número de la cepa de la cual se obtuvieron (Mh_1 – Mh_5, Mh_8, Mh_10, Mh_11, Mh_14 y Mh_15).

Búsqueda espontánea a partir de hisopados nasales

Para esto se utilizaron las muestras tomadas durante un estudio de portación nasal de *S. aureus* en personal de salud del HPC (148). Se observaron placas de lisis en 23 de los 32 grupos formados con 10 muestras cada uno, en seis de ellos se observaron placas homogéneas en lo que respecta a su tamaño, mientras que en los restantes se vieron morfologías de placas heterogéneas; debido probablemente a la mezcla de bacteriófagos o a la presencia de un fago que genere diferentes morfologías de placas de lisis. Cada una de estas placas fue purificada mediante clonado de una única placa de lisis y posteriormente se realizó su propagación.

De este modo se aislaron 23 bacteriófagos provenientes de fosas nasales; los mismos fueron identificados con las letras Mat, seguidas del número o la letra que identificaba a la muestra (Mat_N, Mat_T, Mat_29, Mat_25, Mat_13, Mat_33, Mat_A, Mat_B, Mat_C, Mat_D, Mat_E, Mat_F, Mat_G, Mat_H, Mat_CB, Mat_I, Mat_J, Mat_K, Mat_L, Mat_Y, Mat_W, Mat_X, Mat_Z).

Caracterización de los bacteriófagos aislados

Morfología de la placa de lisis a diferentes temperaturas

Se lograron aislar 33 fagos, 10 provenientes de la inducción con Mitomicina C que son los identificados como Mh y 23 de manera espontánea de los hisopados nasales que son identificados como Mat. Decidimos para comenzar a caracterizarlos trabajar con 7 de ellos: Mat_T, Mat_N, Mat_29, Mh_1, Mh_4, Mh_5 y Mh_15

Se ensayaron 4 temperaturas para la comparación de la morfología de las placas: 25°C, 30°C, 37°C y 42°C. Los siete bacteriófagos seleccionados son capaces de amplificar a las 4 temperaturas ensayadas, observándose que a 25°C las placas son más claras y a 42 °C son más turbias y puntiformes, el tamaño de las mismas no muestra diferencias significativas entre 25°C y 37°C. A modo de ejemplo se muestran las placas de lisis del fago Mat_T a las diferentes temperaturas ensayadas (Figura 17).

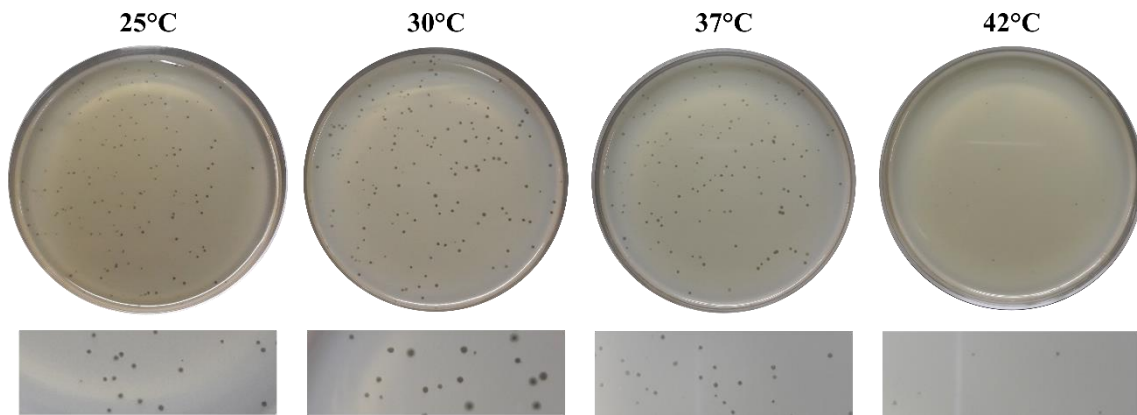


Figura 17: Efecto de la temperatura sobre la morfología de las placas de lisis para el fago Mat_T. Debajo de las placas se muestra una imagen ampliada para una mejor observación.

Determinación del tamaño genómico mediante Electroforesis en campo pulsante (PFGE)

Se determinaron los tamaños genómicos aproximados de siete de los fagos aislados mediante PFGE, técnica que permite separar fragmentos grandes de ADN en respuesta a la alteración en la dirección del vector campo eléctrico aplicado mientras migran a través de un gel de poliacrilamida. Como se mencionó anteriormente, los fagos de *Staphylococcus* caen en tres categorías según el tamaño genómico: clase I: < 20 Kb; clase II: \approx 40 Kb, clase III: >125 Kb (86). Se determinó que los genomas de los fagos aislados tienen un peso molecular aproximado de 50 Kb, por lo que pertenecerían a la Clase II (Figura 18).

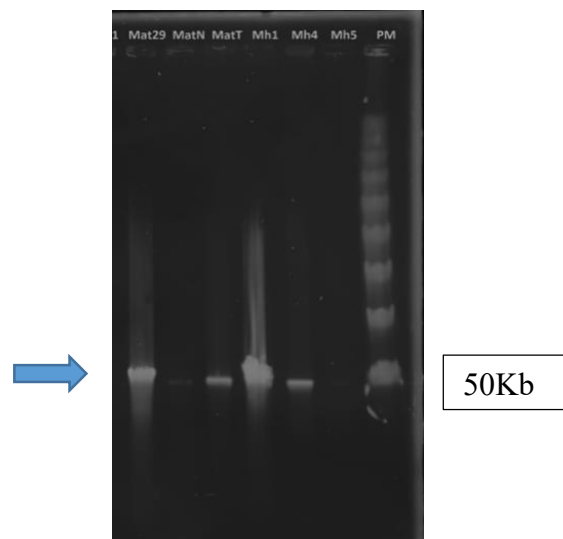


Figura 18: PFGE para los bacteriófagos Mat-29, Mat_N, Mat_T, Mh_1, Mh_4 y Mh_5. El marcador de peso molecular se encuentra a la derecha de la imagen

Análisis morfológico de los viriones mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Los fagos pueden ser visualizado efectivamente con microscopía electrónica; específicamente, con microscopía electrónica de transmisión (TEM)(161). Se analizaron mediante TEM cuatro de los bacteriófagos aislados Mh_1, Mh_15, Mat_T y Mat_29.

Mediante la observación de la morfología utilizando las imágenes provenientes del TEM, se pudo determinar que estos cuatro bacteriófagos muestran las características típicas de los miembros del orden: Caudovirales, familia *Siphoviridae*, los cuales poseen genomas de ADNdh, cápside icosaédrica y colas largas, flexibles y no contráctiles (Figura 19). La longitud de la cola de los *Siphoviridae* oscila según lo reportado en la bibliografía entre los 130 y los 400 nm (86). Se realizó la estimación de las longitudes de las colas y los diámetros de las cápsides como se detalla en la Tabla10.

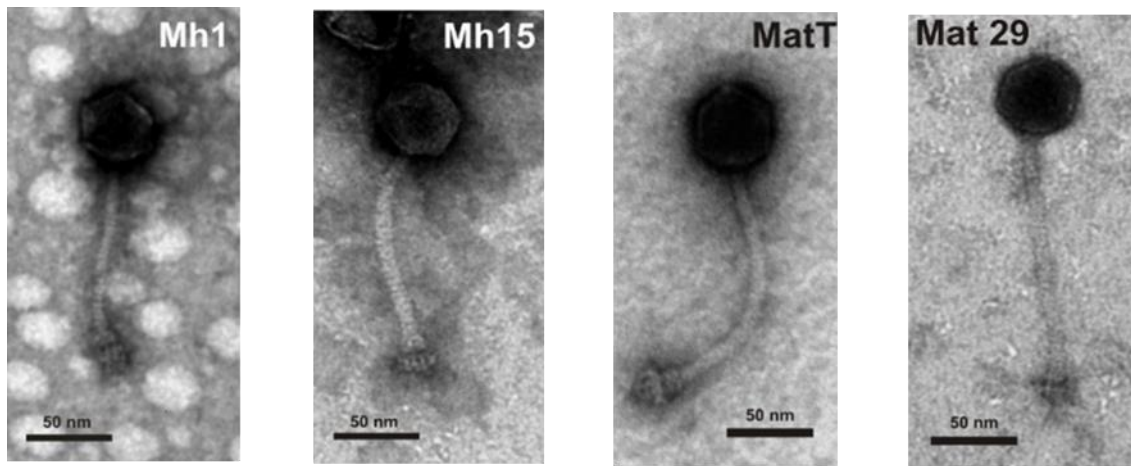


Figura 19: Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Tabla10: Estimación de la longitud de cola y diámetro de los fagos

Medidas	Bacteriófagos			
	Mh_1	Mh_15	Mat_T	Mat_29
Longitud de cola (nm)	116	130	166	155
Diámetro de la cápside (nm)	43	43	45	46

Rango de hospedador de los bacteriófagos

Para determinar la capacidad de los fagos de lisar cepas de diferentes orígenes se realizó la determinación del rango de hospedador. El rango de hospedador se define de manera general como aquellas bacterias que un fago puede infectar productivamente para llevar a cabo su ciclo de vida ya sea este lítico o lisogénico, cuyo límite puede estar dado tanto como por el bacteriófago en sí, como por el hospedador o las características ambientales. Por un lado, se pueden producir adaptaciones del fago para sobreponerse al hospedador o a las limitaciones ambientales, mientras que, por otro lado, el hospedador bacteriano también puede adaptarse para contrarrestar la infección por los fagos. Por lo que podríamos decir que el rango de hospedador de un bacteriófago está determinado tanto por la biología del fago como por los mecanismos bacterianos de resistencia a ellos.

El concepto de rango de hospedador es un ideal y puede resultar confuso, debido a que su determinación depende de la técnica y las condiciones que se utilicen (104). En este trabajo se determinó el rango de hospedador para los diferentes bacteriófagos ensayados mediante la técnica de “spot”. Fue realizado con 9 bacteriófagos, de los cuales 7 fueron aislados en esta tesis (Mat_T, Mat_N, Mat_29, Mh_1, Mh_4, Mh_5 y Mh_15) y 2 fagos líticos para comparar, el fago K, que se encuentra ampliamente reportado en la literatura y el fago Cg (162) aislado en nuestro laboratorio.

Este ensayo se llevó a cabo sobre 96 cepas de las cuales, 4 no son *S. aureus* para evaluar la especificidad de nuestros bacteriófagos. De las 92 cepas de *S. aureus* (49 SAMS y 43 SAMR): 9 son cepas patrones o de colección, 54 cepas de las utilizadas fueron aisladas y caracterizadas durante esta tesis y 29 cepas restantes fueron proporcionadas de diferentes lugares del país y en este último caso evaluamos resistencia a antimicrobianos y capacidad de formar biopelículas (Tabla 11).

Tabla 11: Resistencia a antibióticos y producción de biopelículas (I: INTA, LP: La Plata, H: hospital, Fox: cefoxitina, Eri: eritromicina, Cli: clindamicina, Ge: gentamicina, Ci: ciprofloxacina TS: trimetoprima sulfametoxazol, Mu: mupirocina, Rif: rifampicina, S: sensible, R: resistente). Las cepas que se encuentran resaltadas en negrita producen biopelículas en TS suplementado con glucosa 1%.

Cepas	Antibióticos							
	Fox	Eri	Cli	Ge	Ci	TS	Mu	Rif
I 1, I3, I5, I8, I9, I10, I11, I13, I23, LP 275, LP 280, LP 308, LP320, LP321, H1, H42, H45	S	S	S	S	S	S	S	S
LP 274, H 43, H 44	S	R	R	S	S	S	S	S
LP 277, LP 279	S	R	S	S	S	S	S	S
LP 281	S	S	S	R	S	S	S	S
H 2, H 5, H 6	R	S	S	S	S	S	S	S
H 10	R	S	S	R	S	S	S	S
H 50	R	R	R	S	R	S	S	S

Los resultados del rango de hospedador se evidenciaron en forma de placas de lisis claras o turbias. La ausencia de placas de lisis no necesariamente equivale a la ausencia de infección, ya que en algunos casos se observaron halos turbios, en los cuales se supone que el fago no llega a lisar la célula, pero perturba su crecimiento lo suficiente para ser evidenciado en el césped bacteriano (Figura 20). Para calcular el porcentaje del rango de hospedador solo fueron consideradas las placas de lisis francas, no considerándose la perturbación del crecimiento. En la Tabla 12 se visualiza el rango de hospedador de los fagos ensayados sobre las 92 cepas que son *S. aureus*.



Figura 20: Visualización por microscopia óptica 10X de los diferentes spot de fagos obtenidos en el ensayo de rango de hospedador

Tabla 12 – Rango de hospedador de los fagos: Mat_T, Mat_N, Mat_29, Mh_1, Mh_4, Mh5, Mh_15, K y Cg. El color verde representa la lisis. En la lista de la izquierda se visualizan las diferentes cepas utilizadas para este rango y en negrita se destacan las meticilino resistentes.

Cepas	Bacteriófagos								
	Mat_T	Mat_N	Mat_29	Mh_1	Mh_4	Mh_5	Mh_15	K	Cg
RN 4220, HNC161, HNC32, I9, I10, I13, LP280									
ATCC 25923, LP320									
ATCC43300, HNC189, PS4, PS49									
NRS 70, NRS 153, NRS158, NB29740, I1, I5, PS36, PS37, PS41, HNC321, PS43, HNB399									
NRS123									
V329									
I11, HNC211, HNC323									
I3, I23									
I7									
I8									
LP275									
LP274									
LP277, LP279, H5, H6, HNC10, HNC149, HNB383, HNB393									
LP281									
LP308									
LP321, H42									
H1									
H43									
H44									
H45									
H2									
H10, H50									
HNC6									
HNC136									
HNC310, PS13, PS18, PS24									
HNC352									
HNC18									
HNC77									
HNC115									
HNC116									
HNC120									
HNC144, PS46									
HNC191									
HNC193									
HNC215, HNC262									
HNC224									
HNC253									
HNC271									
HNC274, HNB377, PS44									
HNB426									
HNB422									
HNB358									
HNB433, PS2									
PS27, PS28, PS48									
PS32 PS8									
PS5									
PS42									
PS45									

El fago K fue el que liso el mayor porcentaje de las 92 cepas de *S. aureus*, (76/92, 82.60%), seguido por Cg (64/92, 69.56%), Mat_T (58/92, 63.04%), Mh_5 (56/92, 60.87%), Mh_15 (45/92, 48,91%), Mat_N (29/92, 31.52%), Mat_29 (16/92, 17.39%), Mh_1 (14/92,15.22%) y Mh_4 (13/92, 14.13%). De las 4 cepas no *S. aureus* ensayadas; solo el fago K liso las 2 cepas de *S. epidermidis* ensayadas (ATCC 12228 y ATCC 14990), pero no *S. saprofiticus*.

En la Figura 21 se observa el porcentaje de cepas lisadas por cada fago según sean estas SAMS o SAMR y en la Figura 22 el porcentaje de cepas lisadas según su origen.

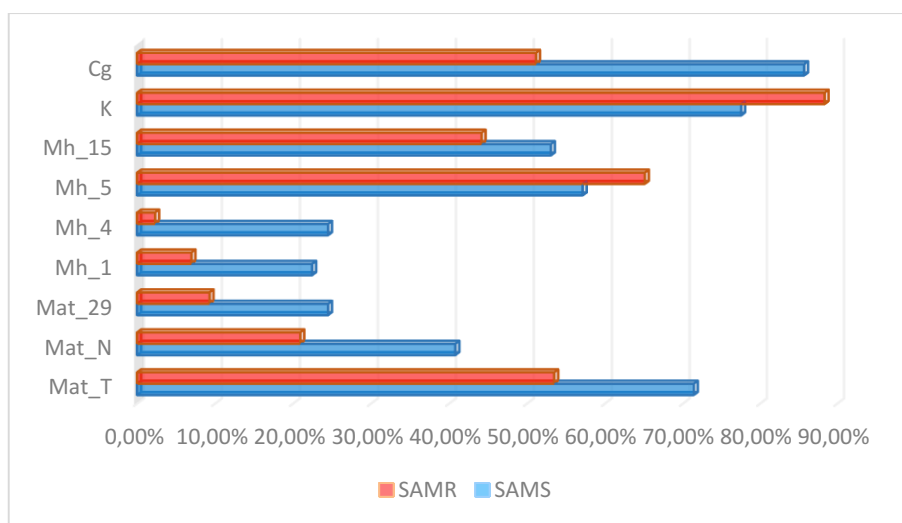


Figura 21: Porcentajes de cepas lisadas por cada fago según sean SAMS o SAMR.

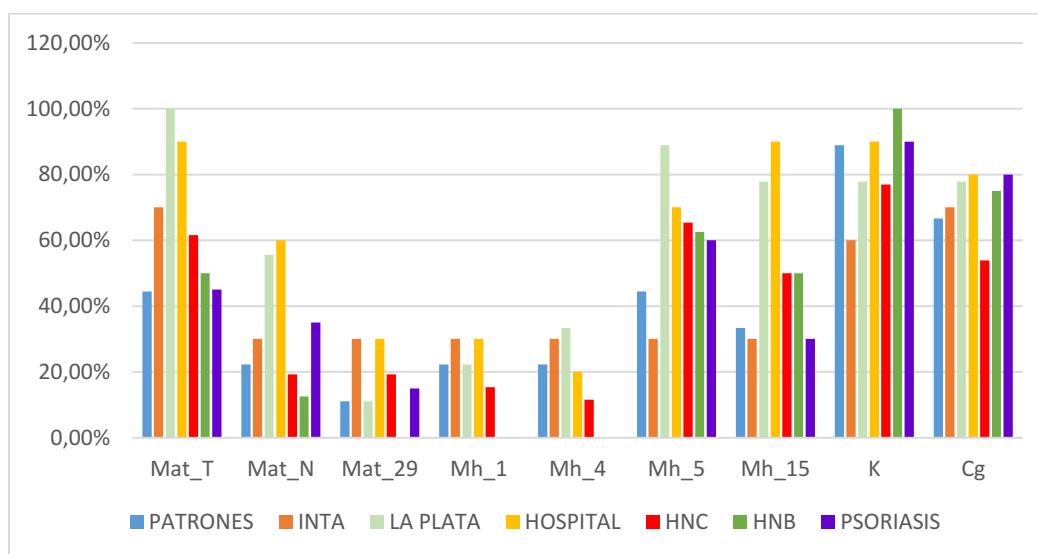


Figura 22: Porcentajes de cepas lisadas por cada fago según el origen de los diferentes *S. aureus* ensayados.

Amplificación en medio líquido

Teniendo en cuenta que Mat_T fue el fago con mayor rango de hospedador de los aislados en la presente tesis, se decidió utilizarlo como modelo para probar la amplificación en medio líquido. La misma se realizó con la cepa RN 4220 en TS líquido suplementado con CaCl₂ (2mM) y MgSO₄ (10mM), a 37°C. Para esto se ensayaron 2 MOI diferentes: 0.5 y 0.25. Se partió de una DO inicial de 0,23 equivalente a 6,9 x 10⁷ bacterias/ml. Como se puede observar en la Figura 23 ambas MOI fueron eficientes, y esto se evidencia en que a t= 3 hs la DO fue de 9,82 en ausencia del fago mientras que para el mismo tiempo para la MOI de 0.5 la DO fue de 0.024 y para la MOI de 0.25 la DO fue de 0.048. El fago Mat_T alcanzó un título similar en ambas MOI, 3x10⁸ UFP/ml.

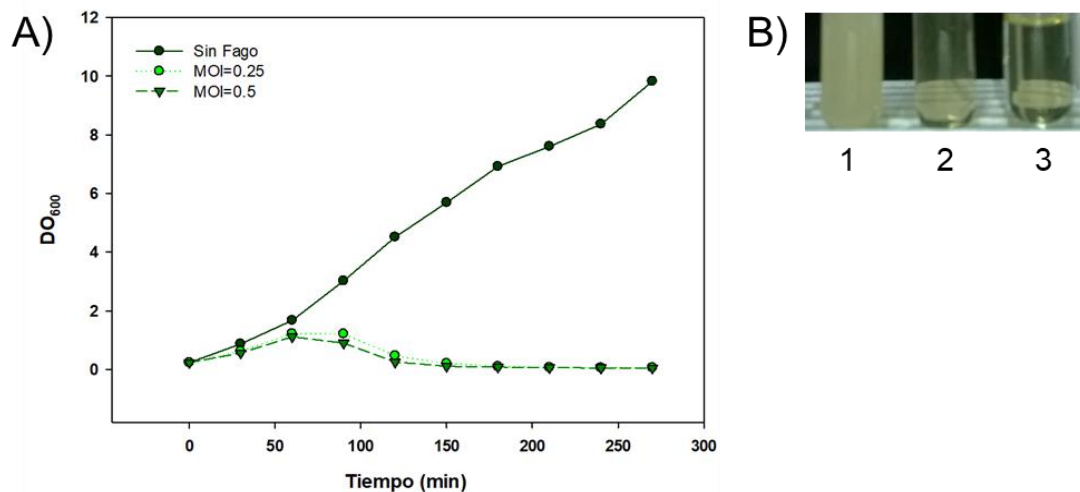


Figura 23: Curva en TS líquido suplementado con CaCl₂ y MgSO₄, a 37°C, fago Mat_T. A la derecha de la gráfica (B) pueden visualizarse en tubos de hemolisis la diferencia en la turbidez de los cultivos en las distintas condiciones, a las 3 horas de iniciado el ensayo; encontrándose: cultivo sin fago (1.), cultivo con MOI 0.25 (2) y cultivo con MOI 0.5 (3).

Optimización de la amplificación en medio líquido

Para la optimización de la amplificación de Mat_T (MOI=0.5) se probaron las siguientes condiciones 1) solo TS, 2) TS y CaCl₂ (2mM), 3) TS y Mg SO₄ (10mM), 4) TS con CaCl₂ (2 mM) y MgSO₄ (10mM) y 5) solo RN 4220 en TS líquido.

Como se puede observar en la Figura 24 el agregado de CaCl₂ mejora la capacidad de lisis del fago, el MgSO₄ no parece intervenir en este proceso. Este efecto se evidencia por las diferentes DO alcanzadas en las distintas condiciones a las 2:40 hs cuando no hay

CaCl₂ la DO es de 2.5 con o sin Mg SO₄, mientras que al mismo tiempo en las muestras suplementada con CaCl₂ con o sin MgSO₄ alcanzan una DO de 0.38 y 0.29 respectivamente. El cultivo que solo contenía RN 4220 a ese tiempo alcanzo una DO de 6,53.

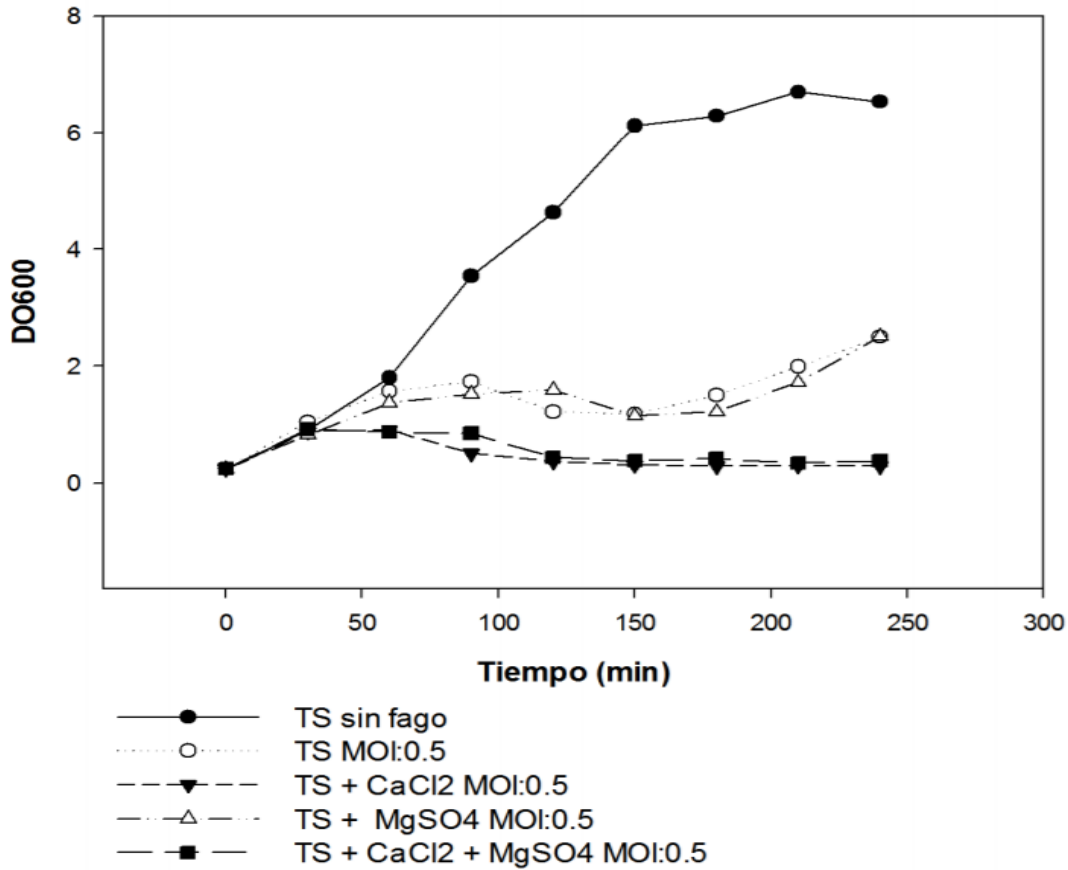


Figura 24: Amplificación en medio líquido. Se evalúa el requerimiento de CaCl₂ y de MgSO₄

Posteriormente decidimos optimizar el agregado de CaCl₂ para los ensayos en medio líquido, para ello realizamos una curva con diferentes concentraciones del mismo (0 mM, 1 mM, 2 mM y 4 mM). En la Figura 25 se observa que las concentraciones óptimas de CaCl₂ se encuentran en el rango de 2 a 4mM, observándose a las 3:15hs las siguientes DO: 1.123 (sin CaCl₂), 0.141 (1 mM CaCl₂), 0.033 (2mM CaCl₂) y 0.053 (4 mM CaCl₂). .

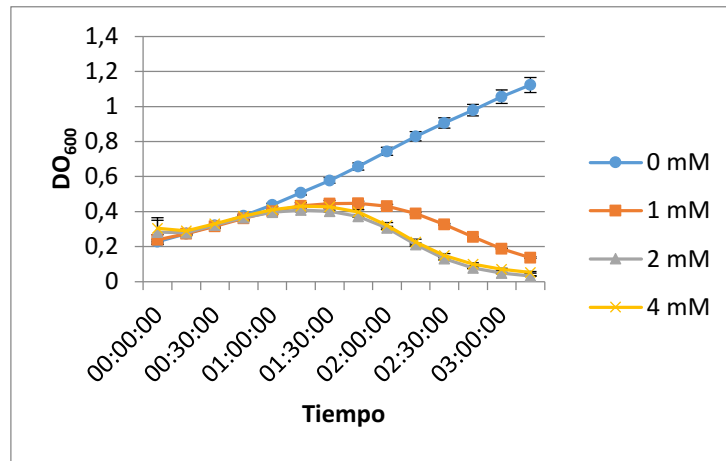


Figura 25: Optimización de los requerimiento de CaCl₂ para la amplificación en medio liquido del fago Mat_T

Amplificación en medio liquido de los fagos Mat_T, K y CG

Una vez optimizada la amplificación en medio liquido decidimos comparar la amplificación de Mat_T versus los 2 fagos líticos que utilizamos en el rango de hospedador. Se partió de una DO inicial de 0.25 en promedio (7.5×10^7 bacterias/ml). Esta curva se realizó por triplicado; los resultados de la misma se visualizan en la Figura 26. Podemos observar que CG no amplifica de manera eficiente en medio líquido y esto se traduce con un aumento de la DO a valores similares a los observados en el cultivo sin agregado de fago de RN 4220 y que alcanza un valor a las 3,15 hs de 1,11 (3.33×10^8 bacterias/ml). El fago K disminuye la DO alcanzando a las 3,15hs un valor de 0.024 que equivale a un recuento de sobrevivientes de 7.2×10^6 ; mientras que a ese tiempo el fago Mat_T alcanza un valor de DO de 0.032 con un recuento de sobrevivientes de 9.6×10^6 bacterias/ml. El fago Mat_T, al igual que el fago K, logra reducir el crecimiento de las bacterias en 2 órdenes de magnitud.

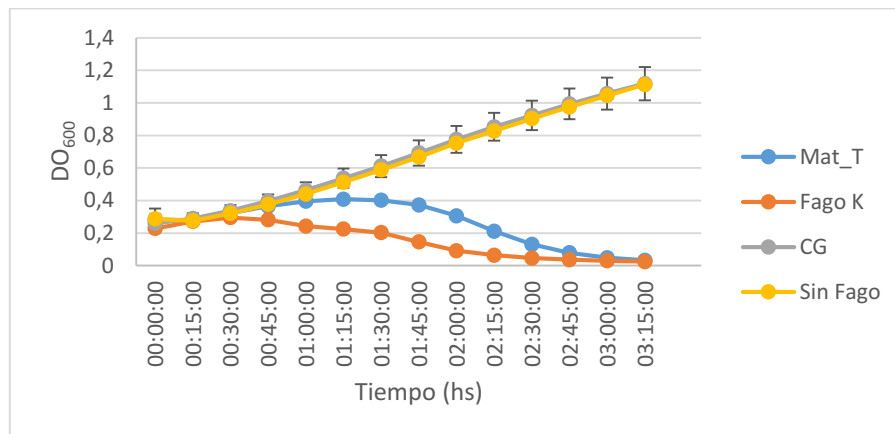


Figura 26: Amplificación en TS suplementado con CaCl₂ (2mM) de los fagos Mat_T, K y CG.

Análisis Bioinformático

Como ya hemos mencionado anteriormente los fagos poseen interés desde el punto de vista biotecnológico, por ejemplo, como agentes de biocontrol y para ser empleados como biosensores debido a su elevada especificidad y, por otro lado, los fagos temperados poseen implicancias en la transferencia horizontal de genes. Para el análisis de todas estas características es importante conocer la secuencia genómica de los fagos para analizar los genes que codifican.

Secuenciación genómica

Durante el desarrollo de esta tesis he logrado aislar 33 bacteriófagos de diferentes orígenes. De ellos fueron enviados a secuenciar seis: Mat_N, Mat_29, Mat_T, Mh_1, Mh_4 y Mh_15. Los fagos Mat_N, Mat_29 y Mat_T fueron obtenidos de hisopados nasales, mientras que Mh_1, Mh_4 y Mh_15 fueron obtenidos mediante inducción con mitomicina C a partir de cepas de origen clínico. Una vez aislados se realizó la extracción de ADN de los fagos como se detalla en materiales y métodos. La secuenciación se realizó en el Servicio de Genómica y Bioinformática del INDEAR.

Con los genomas ensamblados y en un solo contig se procedió a la anotación genómica mediante el uso del programa DNA Master.

Anotación genómica

La anotación de los fagos se realizó mediante la utilización del programa DNAMaster. Este análisis permite la identificación de ORFs mediante el uso de los programas Glimmer y Genmark, además identifica ARNt y mediante BLASTP se realiza la asignación de función (correspondiendo la Tabla 16: al fago Mat_T, Tabla 17: Mat_29, Tabla 18: Mat_N, Tabla 19: Mh_1, Tabla 20: Mh_4, Tabla 21: Mh_15, las mismas se encuentran en el Anexo). Después de la anotación automática que genera el programa se procedió a la inspección manual de cada ORF y corrección de los mismos en los casos que fuera necesario (ej. corrección de sitio de inicio de la traducción). Una vez anotados los genomas se los representó gráficamente empleando el programa CGView (Figura 27) (135).

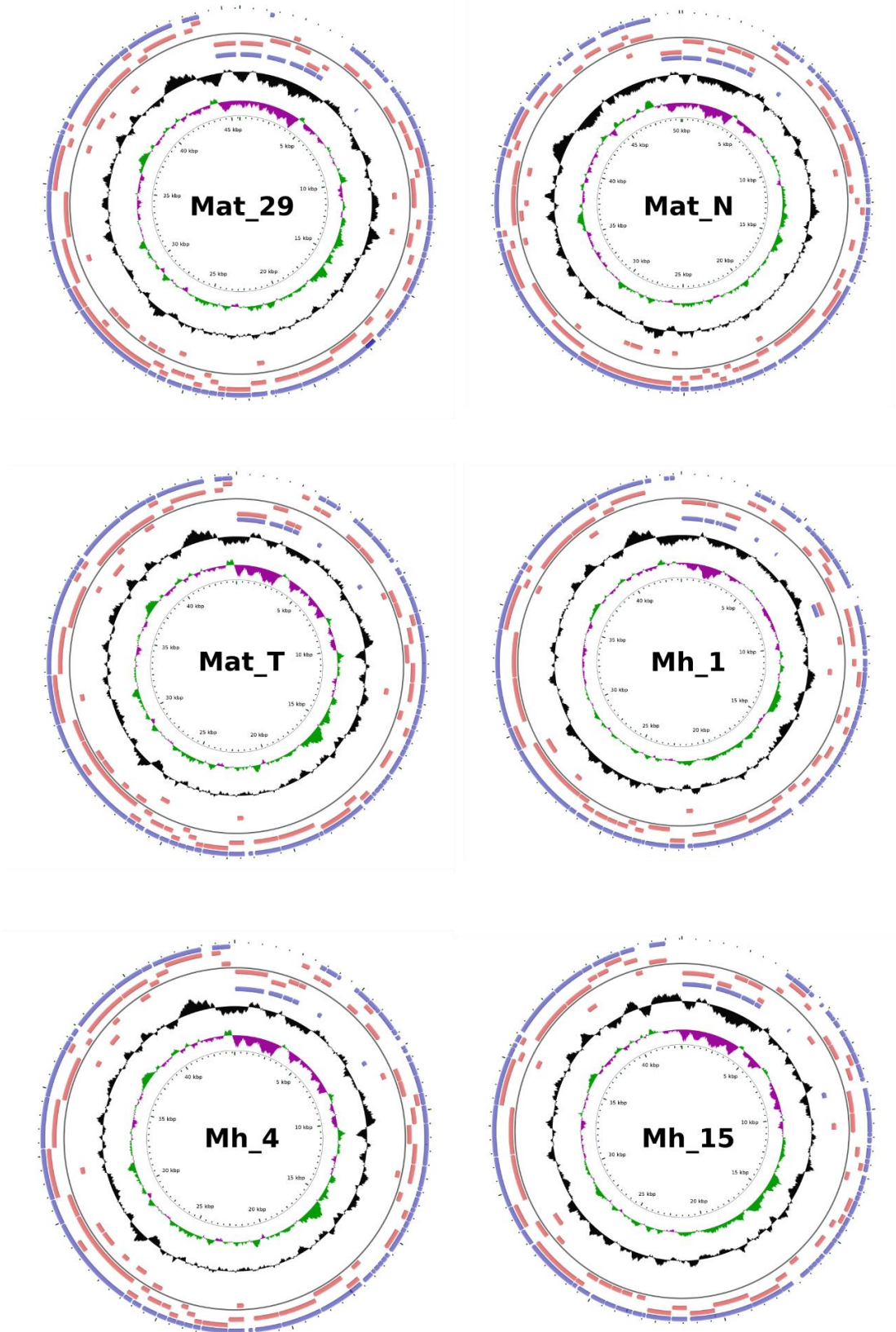


Figura 27: Mapas genómicos de los fagos Mat_29, Mat_N, Mat_T, Mh_1, Mh_4 y Mh_15 empleando el programa CGView. Los bloques de color azul representan los marcos abiertos de lectura, mientras que los bloques rosas, muestran los seis marcos de lectura y donde se posiciona cada ORF. Los histogramas internos muestran el contenido de GC a lo largo de toda la secuencia de los fagos.

Características genómicas generales

Las características genómicas de los cinco bacteriófagos fueron obtenidas mediante el uso del programa Artemis, y se detallan en la Tabla 13. La presencia de tRNA fue analizado utilizando los programas tRNA-scan y Aragorn en DNAMaster.

Tabla 13 – Características genómicas

Fagos	Tamaño genómico	GC(%)	CDS	Porcentaje codificante	Densidad génica (gen/kpb)	ARNt	Longitud promedio (pb)
Mat_29	45682	34.18	65	89.4	1.422	0	628
Mat_N	50127	33.84	73	90.5	1.456	0	621
Mat_T	44300	34.64	70	94.4	1.58	0	597
Mh_1	43800	35.09	74	94.4	1.689	0	559
Mh_4	44199	34.65	70	94.7	1.583	0	598
Mh_15	43090	35.18	73	92.2	1.694	0	544

Genómica comparativa

Oliveira y col. (163) han realizado una clasificación de los fagos del genero *Staphylococcus* mediante la agrupación en “phams” o familias de proteínas que comparten un cierto grado de similitud de secuencia (a partir de 35%) y comparando el contenido de genes compartidos. De esta manera han podido agrupar estos fagos en cuatro clústeres (A, B, C y D) y 27 subclústeres (A1-A2, B1-B17, C1-C6 y D1-D2). Los fagos pertenecientes a la familia *Siphoviridae* se ubican en el clúster B.

Para llevar a cabo un análisis comparativo, como primera medida descargamos las secuencias de fagos temperados que se encuentran cargadas en las bases de datos (NCBI), lo que correspondía a un total de 128 fagos. Luego se realizó una red filogenética mediante los programas Gegenees y Splitstree 4 utilizando dichas secuencias más las secuencias de nuestros fagos. El análisis de la red mostró claramente el agrupamiento en siete clústeres, los cuales se corresponden con los identificados por Oliveira (B2-B7) (163). Como se observa en la Figura 28, los fagos provenientes de hisopados nasales se encuentran relacionados evolutivamente ubicándose en el clúster B2, junto con el fago Mh_4, el cual muestra elevada similitud con el fago Mat_T. Los fagos Mh_1 y Mh_15 provenientes de muestras clínicas se encuentran ubicados en el clúster B3.

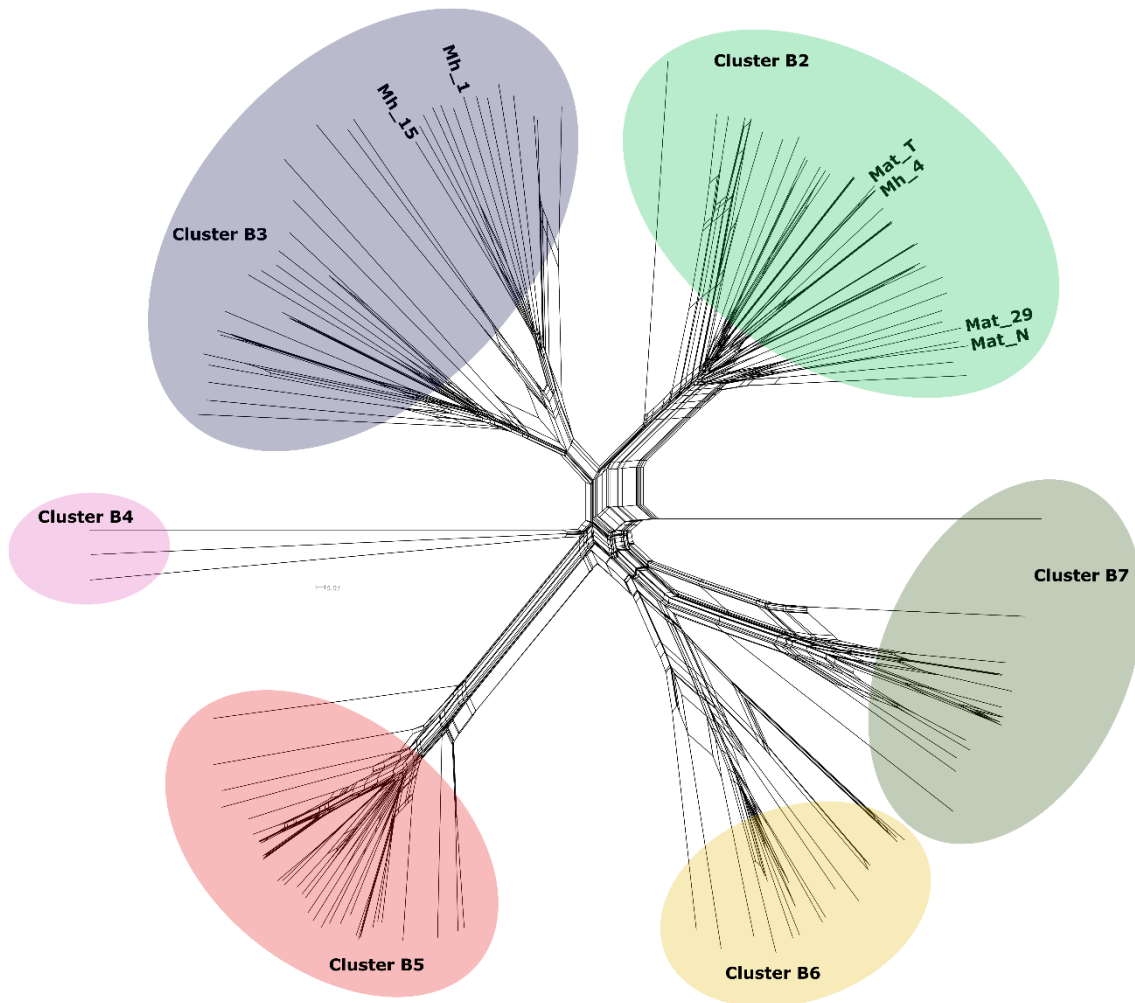


Figura 28 – Red filogenética de fagos pertenecientes a la familia *Siphoviridae*. Se construyó utilizando las secuencias de 134 fagos mediante los programas Gegenees y Splitstree 4 utilizando el método Neighbor-Net. Los clústeres B2 a B7 se encuentran marcados con elipses. Los nombres de las diferentes taxas fueron removidos para una mayor claridad en el análisis.

Por otro lado, se realizó una comparación mediante TBLASTN de nuestros fagos mediante el uso del programa Easyfig 2.25. Se estableció un mínimo de identidad de secuencia de 35% para que el programa muestre las zonas de homología. La Figura 29 muestra claramente que los fagos Mh_1 y Mh_15 comparten amplias zonas de similitud de secuencia, al igual que entre Mh_4 y Mat_T los cuales son muy similares y se corresponde con lo observado en la red filogenética. Por otro lado, Mat_T y Mat_N a pesar de pertenecer al mismo clúster, poseen zonas de baja similitud, como por ejemplo la zona donde se encuentra el módulo de integración. Es de interés, la identificación de una zona en el fago Mat_N (ORF67-74) corriente abajo del módulo de lisis, ausente en

su par más homólogo, Mat_29. Mientras que el ORF75 de Mat_N posee homología de secuencia con el ORF71 de Mat_29. Realizando un BLASTP con la secuencia codificante de estos genes, observamos que poseen homología con proteínas de *S. aureus* (Anexo, Tabla 18). Además, los mismos no presentan homología con factores de virulencia, lo cual se determinó mediante BLASTP en el servidor web VFAnalyzer (<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi?func=VFAnalyzer>) contra base de datos de factores de virulencia. Esto sugiere que estos genes podrían haber sido adquiridos de su hospedador en el proceso de integración y escisión.

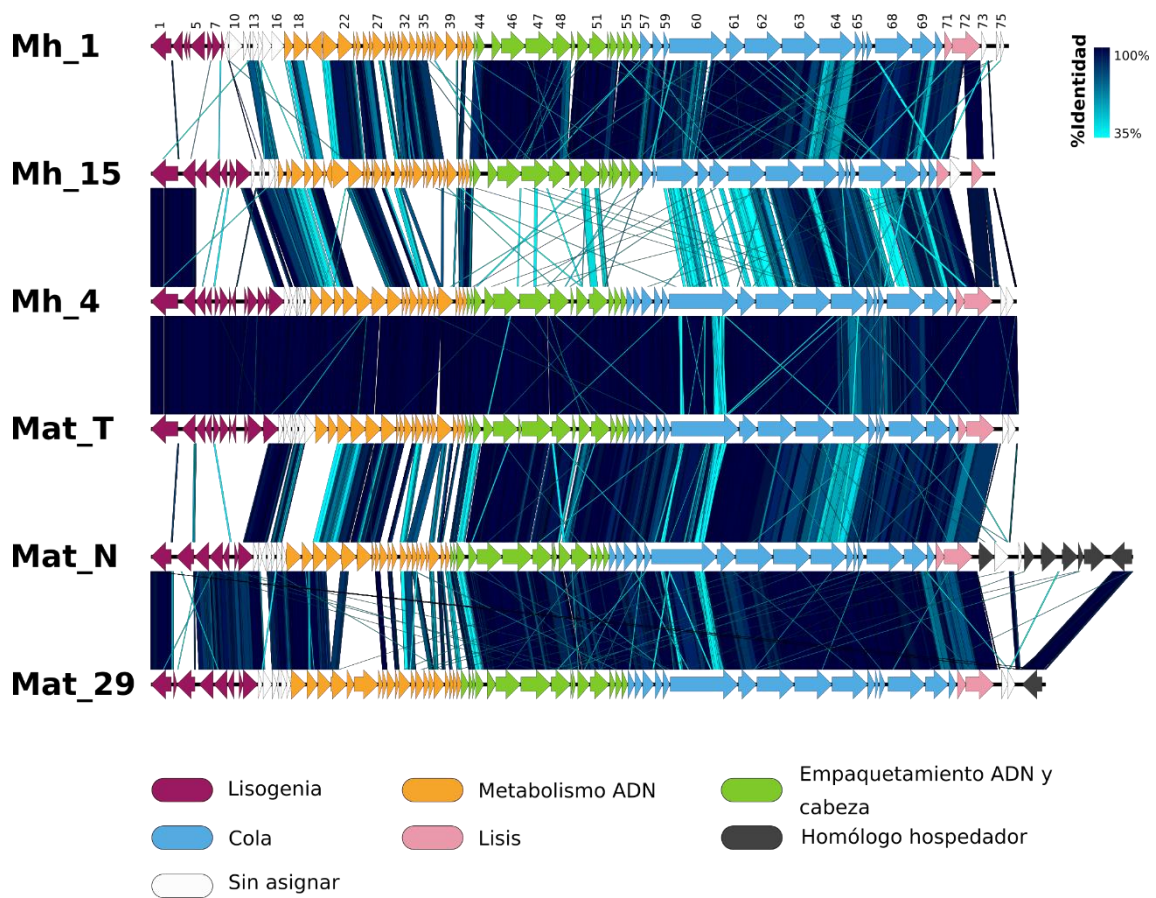


Figura 29: Comparación de las secuencias de los fagos mediante TBLASTN y organización modular de los mismos. Para ello se utilizó el programa Easyfig 2.25. La similitud de secuencia que se muestra entre las secuencias va en el rango de 35-100%, como se representa en la leyenda en la parte superior derecha de la figura.

Conclusiones y discusión del Capítulo 2

Los bacteriófagos son parte dominante del viroma cutáneo. Ellos se encuentran comúnmente en múltiples sitios de la piel, en los cuales se encuentran con sus hospedadores bacterianos. Los análisis metagenómicos sugieren que los fagos de *Propionibacterium* y *Staphylococcus* son los más abundantes de la piel, mientras que otros fagos, tal como los de *Streptococcus* y *Corynebacterium*, están también presentes pero en menor medida (164)

Durante el desarrollo de esta tesis se lograron aislar 33 fagos, 10 provenientes de la inducción con Mitomicina C de cepas clínicas y 23 presentes en hisopados nasales, no pudimos aislar fagos de muestras ambientales. Hasta donde hemos caracterizado actualmente se tratarían de fagos temperados, perteneciente a la clase II con un tamaño de ≈ 40 a 50 Kb y que muestran las características típicas de los miembros de la familia *Siphoviridae* (orden: *Caudovirales*).

Existe variabilidad en cuanto a la temperatura a la cual el fago puede infectar, las envolturas de las bacterias sufren cambios al ser expuestas a diferentes temperaturas lo que puede provocar que la misma pierda alguno de los receptores para fagos (165). En los fagos que realizamos el ensayo a diferentes temperaturas pudimos ver cambios en la morfología de las placas de lisis siendo más grandes y claras en un rango entre los 25 y los 37°C; y más turbias y puntiformes a 42°C. Durante la formación de las placas de lisis, los determinantes del tamaño de placa son las características intrínsecas de cada fago, las características del cultivo y las condiciones de siembra. La concentración de agar usada en el medio afecta considerablemente la movilidad del fago de manera que, si la concentración es alta, el fago difundirá menos y las placas de lisis serán más pequeñas. El efecto de la temperatura no es tan sencillo de describir, ya que es multicausal. Por un lado, los cambios de temperatura podrían modificar cinéticamente los parámetros del fago y/o generar cambios cuali- o cuantitativos en el entorno del receptor. Además, está claro que, si las bacterias crecen más lentamente, por limitación de nutrientes o exposición a temperaturas muy distintas de las temperaturas óptimas de crecimiento, la propagación de bacteriófagos tiende a aumentar (166).

Si bien el concepto de rango de hospedador como dijimos es un ideal y puede resultar confuso, debido a que las determinaciones del rango de hospedador dependen de la técnica y las condiciones que se utilicen (104), forma parte de las caracterizaciones que

se le realizan al mismo y es un parámetro importante para conocer. Como resultado de este experimento cabe destacar que a pesar que Mat_T y Mh_5 son fagos lisógenos presentan un amplio rango de cepas lisadas (63.04% y 60.87%) para su grupo.

Por otro lado, logramos poner a punto la amplificación de bacteriófagos en medio líquido y evaluar el requerimiento de cationes, esto es importante en el caso de querer realizar producción en grandes escalas del mismo. Se pudo demostrar la importancia del agregado de CaCl₂, ya que sin este catión no era posible lograr la amplificación y que la concentración optima se encuentran en el rango de 2 a 4mM.

El análisis bioinformático de los fagos es un punto clave para el estudio de los mismos, ya que la misma es una condición necesaria para su aplicación como agente de biocontrol. Por otro lado, la participación de fagos temperados como importantes agentes en la transferencia horizontal de genes y la evolución de los hospedadores también representa de interés poder conocer su secuencia genómica y analizar los genes que codifican.

En nuestro laboratorio hemos podido secuenciar, anotar y analizar los genes que codifican los fagos Mat_29, Mat_N, Mat_T, Mh_1, Mh_4 y Mh_15. El análisis de genómica comparativa ha clasificado a nuestros fagos como pertenecientes a los subclústeres B2 (Mat_29, Mat_N, Mat_T y Mh_4) y B3 (Mh_1 y Mh_15). Todos los miembros del clúster B son fagos temperados que codifican para una integrasa y su represor. Está reportado que el subclúster B2 es uno de los más heterogéneos del clúster B. Con respecto a los genes de virulencia, se observó una alta prevalencia de los mismos en los miembros del clúster B, no encontrándose presentes en los otros clústeres. Sin embargo, no se encuentran distribuidos de manera homogénea, hay subclústeres en donde no se han identificado, otro donde se los halla en bajo porcentaje como los subclústeres B2 y B3 con 32 y 31%, respectivamente, mientras que otros tienen un alto porcentaje (B5, B6 y B7) con más del 96%. Estos valores se condicen con los nuestros, ya que no hemos identificado genes que codifiquen para factores de virulencia en nuestros fagos que como dijimos se encuentran en los subclústeres B2 y B3.

Los bacteriófagos impactan en gran medida en la patogenicidad bacteriana, se estima que globalmente ocurren 2×10^{16} eventos de transferencia génica mediados por fagos cada segundo. Este proceso denominado conversión lisogénica (o conversión

fágica) provee a su hospedador de genes adicionales que benefician al lisógeno. La importancia de este proceso fue evidenciada en la década de los 90 cuando la secuenciación genómica reveló la abundancia de los profagos y los propuso como los principales responsables de la variabilidad genética entre cepas bacterianas estrechamente relacionadas (por ejemplo, patógenos vs no patógenos) (167). La identificación de una región de baja homología con el resto de los fagos en Mat_N, la cual codifica para genes presentes en *S. aureus*, podría ser una muestra de la capacidad de los fagos de transportar genes del hospedador, con el riesgo asociado de diseminarlos entre otras bacterias hospedadoras.

El aumento de la resistencia a los antimicrobianos conlleva a la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas. Entre las muchas opciones que se están explorando, se presenta el resurgimiento de la terapia con fagos, como una estrategia atractiva para sustituir o complementar a otras terapias. Dentro de los atributos positivos para el desarrollo de la misma cabe citar su origen natural, la falta de toxicidad para los seres humanos, la alta especificidad (siendo inofensivos para la microbiota normal), y su efectividad frente a bacterias resistentes a los antibióticos, entre otras. Sin embargo, la terapia con fagos generalmente requiere la identificación del patógeno, el desarrollo de resistencia sigue siendo una posibilidad, aunque muchos menos probables si se la compara con el uso de antibióticos y no suele ser fácilmente transferible a otros microorganismos. Además, la resistencia podría superarse fácilmente mediante el uso de combinaciones de diferentes fagos (cócteles de fagos) en lugar de utilizar un único fago para fines terapéuticos (168). Actualmente para la terapia fágica son solo de interés inmediato los fagos estrictamente líticos aunque hay argumentos fuertes que apoyan el uso de fagos temperados con fines terapéuticos (169), las agencias reguladoras tienen un largo camino a seguir antes de aceptar el uso de virus que podrían transferir sus genes directamente a las células bacterianas en el cuerpo (170).

CAPITULO 3: ENDOLISINAS

Búsqueda bioinformática de endolisinas

Como comentamos previamente las endolisinas son enzimas modulares con actividad peptidoglicano hidrolasas, que generan la disrupción del peptidoglicano, generando la lisis osmótica de las células y por lo tanto constituyen una prometedora alternativa para combatir la multiresistencia microbiana (112).

En nuestro laboratorio como parte del trabajo de tesis de varios integrantes, se realizó una búsqueda masiva de fagos específicos de *S. aureus* de diferentes orígenes y ambientes. El resultado de este trabajo fue el aislamiento de más de 60 fagos. Un gran número de ellos fueron secuenciados. Una vez obtenidas las secuencias genéticas de los mismos, en colaboración con el Dr. Cristian Suarez se realizó una búsqueda bioinformática de los genes que codifican para endolisinas. Para ello se utilizó la secuencia conocida de la endolisina del fago K (LysK) (171, 172) y mediante la utilización de la herramienta BLAST dentro del servidor RAST logramos identificar 25 secuencias de endolisinas con diferente nivel de homología. Se realizó un análisis filogenético de las endolisinas, mediante el alineamiento de secuencias con MAFFT y PhyML para la construcción del árbol. Para este análisis, también se incluyeron secuencias de endolisinas caracterizadas y publicadas como las de los fagos PhiH5, Phi11 y K (173-175). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 30.

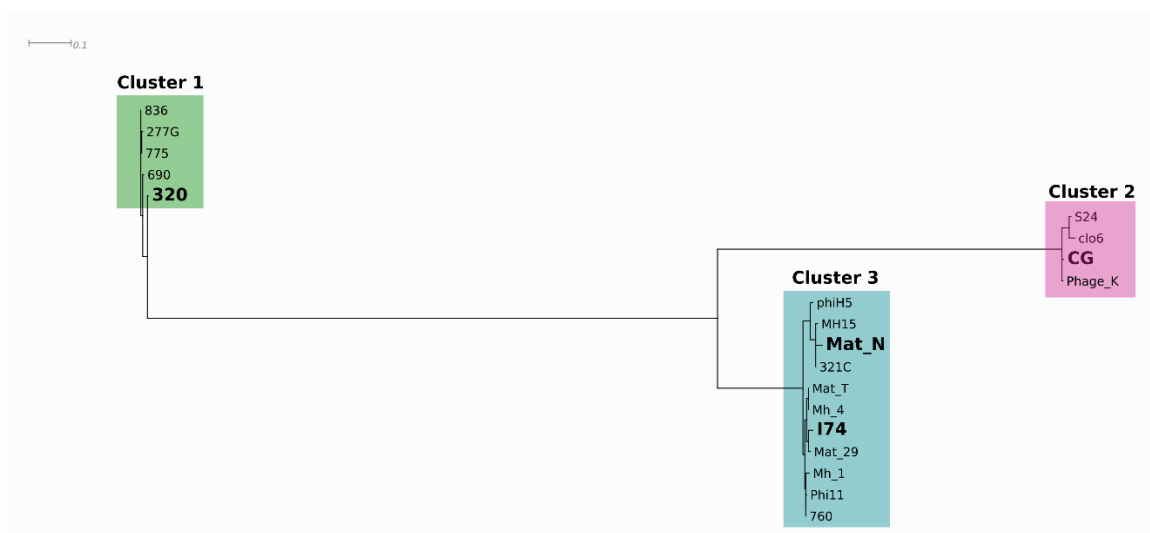


Figura 30: Relaciones evolutivas de las endolisinas. Para realizar el árbol se incluyeron las secuencias de endolisinas reportadas en la literatura, como Phi11, PhiH5, y K. En negrita se indican las endolisinas que elegimos para clonar y expresar en *E. coli*.

Mediante el análisis filogenético pudimos observar tres grupos de endolisinas bien marcados (I-III). El grupo II está formado por las endolisinas de fagos líticos, como el Fago K y el CG. A su vez el grupo III podemos sub-clasificarlo en dos subgrupos. Utilizamos este agrupamiento de endolisinas para seleccionar cuales serían elegidas para su clonado. Las endolisinas de los fagos 320 (I), la del fago CG (II), Mat_N (III a) y la del fago I74 (III b), las cuales se encuentran más alejadas filogenéticamente, fueron seleccionadas para ser clonadas en *E. coli* para su posterior expresión y purificación.

Posteriormente, con la secuencia proteica realizamos una búsqueda de dominios, tanto del dominio con actividad enzimática (Enzymatic Activity Domain, EAD) como del dominio de unión a pared celular (Cell Wall Binding Domain, CBD). Para ello, se usó la herramienta InterProScan. Este análisis mostro que todas las endolisinas analizadas poseen tres dominios; dos EAD (CHAP y AMI2/3) y un CBD (SH3). El dominio CHAP tiene una actividad D-alanil-glicil endopeptidasa, mientras que AMI-2 y AMI-3 tienen actividad amidasa (N-acetilmuramoil-L-alanin amidasa)(Figura 31).

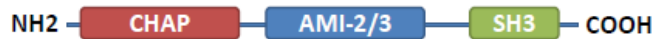


Figura 31: Organización de dominios de las endolisinas codificadas por nuestros bacteriófagos

En la Tabla 14 podemos observar el análisis de los dominios de las endolisinas Mat_N, 320, I74 y CG.

Tabla 14: Análisis de los dominios de las endolisinas seleccionadas para clonado y expresión. Base datos utilizada Pfam

Endolisinas	Id Dominio	Dominio	Inicio	Final	E-value
Mat_N	PF01510	AMI-2	199	323	2,10E-15
	PF05257	CHAP	27	113	1,70E-11
	PF08460	SH3	395	460	3,90E-24
320	PF05257	CHAP	28	113	2.0E-7
	PF01520	AMI-3	181	363	1.1E-39
	PF08460	SH3	400	464	4.0E-8
I74	PF05257	CHAP	28	113	4.1E-11
	PF01510	AMI-2	198	323	3.0E-15
	PF08460	SH3	395	460	3.9E-24
CG	PF05257	CHAP	46	136	4.3E-11
	PF01510	AMI-2	206	334	5.0E-11
	PF08460	SH3	409	475	3.7E-19

Clonado y expresión de las endolisinas I74, Mat_N, 320 y CG

Se amplificaron los genes de las endolisinas utilizando cebadores con los sitios de restricción NdeI y BamHI. Luego se clonaron en pGEM-T Easy, se secuenciaron y subclonaron en el vector de expresión pET22b. Posteriormente, se transformó la cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLys y se expresaron mediante el agregado de IPTG. Se ensayaron diferentes tiempos y concentraciones de IPTG a diferentes temperaturas (15, 20 y 37°C) y observamos que cuando se induce durante 3 horas a 37°C con 1 mM de IPTG, obtenemos la máxima inducción de las endolisinas I74, Mat_N y 320 (Figura 32).

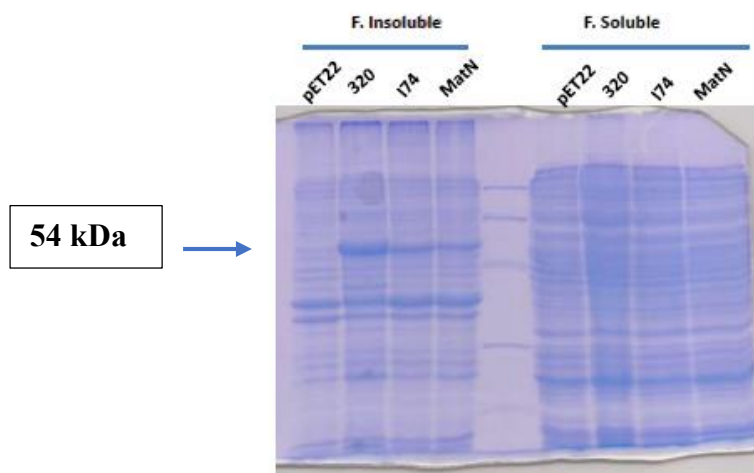


Figura 32: SDS-PAGE. Se observa (señalado con flecha) la sobre-expresión de diferentes endolisinas únicamente en la fracción insoluble.

No fue posible clonar la endolisina CG mediante la técnica convencional de clonado por lo que recurrimos al uso de la técnica de RF cloning; de esta manera pudimos obtener un clon en el vector de expresión pET-32 como proteína de fusión a His-tag N-terminal.

Purificación de las endolisinas

Como se mostró en la Figura 32, la inducción de las endolisinas solo se observaron en la fracción insoluble. Con la colaboración de la Dra. Cecilia Balaban, investigadora de Conicet que trabaja en nuestro laboratorio se ensayaron diferentes protocolos de purificación. Finalmente, hasta el momento se lograron purificar a partir de la fracción soluble, las endolisinas 320, Mat_N y Cg. Para ello, se partió de volúmenes de cultivo de entre 0.5 – 1 litro y con el agregado de detergente (Tween 20) en el buffer de lisis. Para

la purificación de las enzimas se realizó una cromatografía de afinidad mediante resina Ni-NTA, lograndose obtener buenos rendimientos en la purificación de las tres endolisinas como se observa en la Figura 33. La endolisina I74 no se logró obtener de manera soluble hasta el momento.

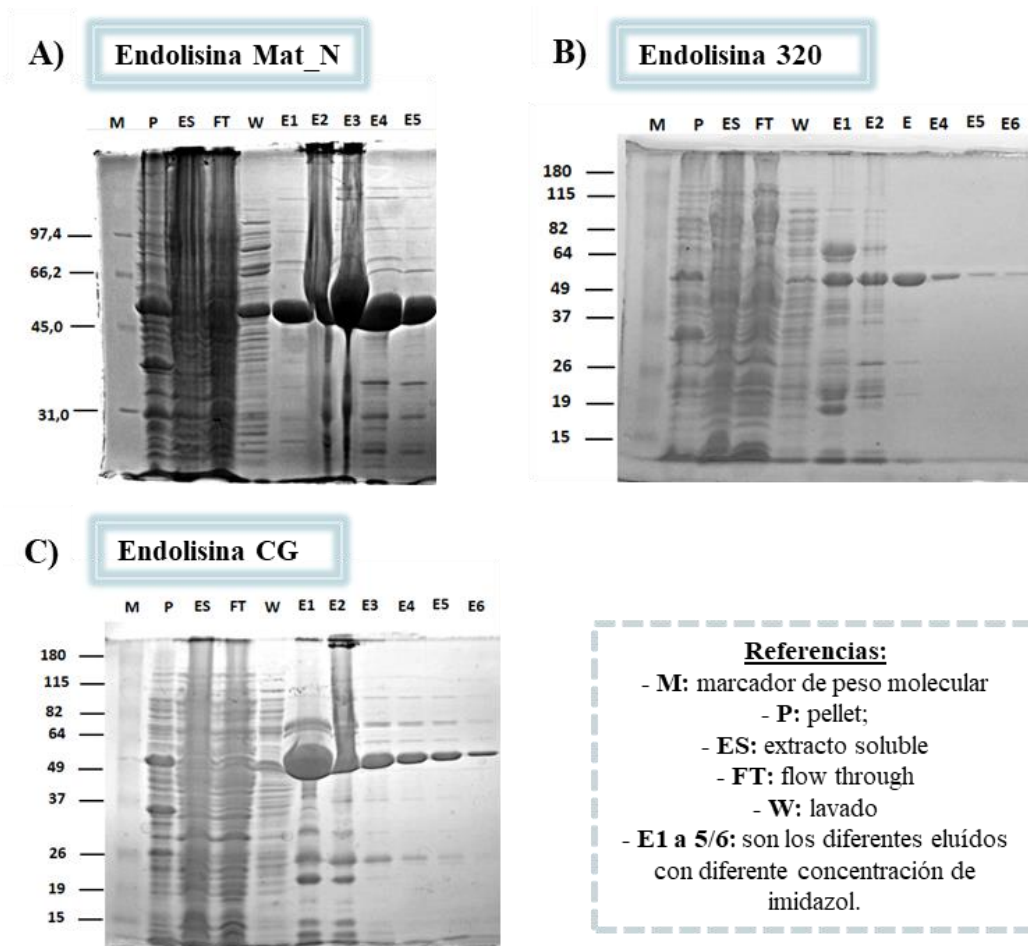


Figura 33: Purificación de las endolisinas A) Mat_N, B) 320 y C) CG mediante columnas de afinidad de Ni-NTA. M, marcador de peso molecular; P, pellet; ES, extracto soluble; FT, flow through; W, lavado E1 a 5/6, son los diferentes eluidos con diferente concentración de imidazol.

Ensayos de actividad de endolisinas

Análisis de la actividad mediante el uso de zimogramas

Para ensayar la actividad de las endolisinas se utilizó la técnica de zimograma (147). Para ello, se realizó un SDS-PAGE con el agregado de células de *S. aureus* muertas por calor en el gel de separación. Después de la corrida electroforética y de la tinción del gel la aparición de zonas claras es indicativa de la lisis de las células (Figura 34).

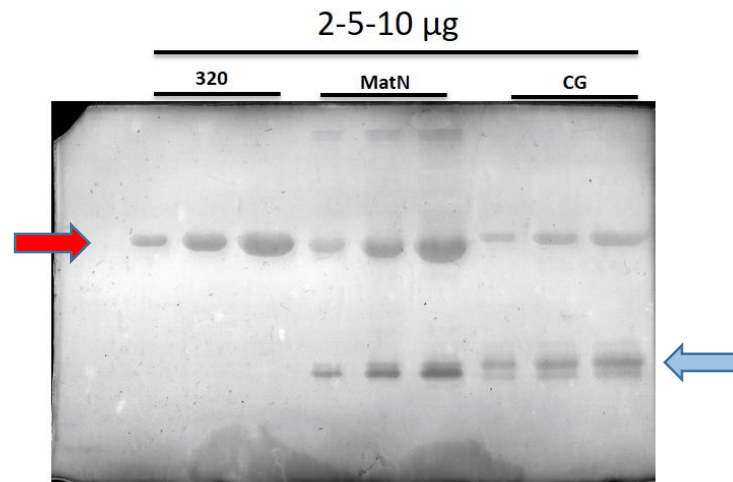


Figura 34: Zimograma con las endolisinas 320, Mat_N y CG agregadas a 2,5 y 10µg. La flecha roja indica la aparición de zonas de lisis demostrando la actividad lítica. La flecha celeste señala zonas de lisis de menor peso molecular que podrían corresponder a proteólisis.

Lisis en placas

Para este ensayo se hicieron placas indicadoras de las cepas de *S. aureus* RN 4220 y ATCC 25923. Se ensayó la actividad a 25, 30, 37 y 42°C (Figura 35). La elección de las cepas se debió a que los fagos que dieron origen a las endolisinas Mat_N y 320 fueron aislados en la cepa RN 4220 y el fago CG en ATCC 25923.

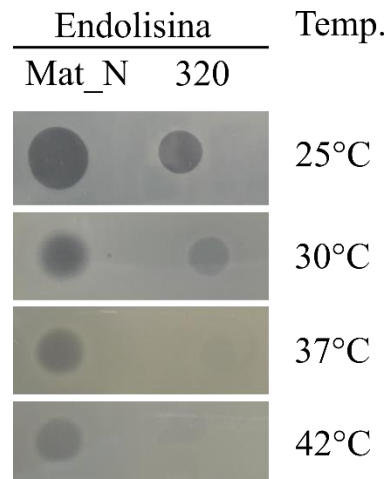


Figura 35: Efecto de la temperatura sobre la actividad en placa de las diferentes endolisinas. Se realizaron spot de 5µl de Mat_N (5mg/ml) y 320 (4,5mg/ml)

La endolisina CG no liso ninguna de las cepas a ninguna de las temperaturas ensayadas. En cuanto a las endolisinas Mat_N y 320 ambas lisaron la cepa RN 4220 a

todas las temperaturas ensayadas dando un mayor halo de lisis y mayor claridad de la misma a 25°C, el aumento de la temperatura parece afectar mas a 320 que a Mat_N, ya que en la primera el halo de lisis se vuelve más pequeño y turbio que el de Mat_N a la misma temperatura. Por otro lado, ninguna fue capaz de lisar la cepa ATCC 25923.

Lisis en TS liquido

Se evaluó la capacidad de lisis de las 3 endolisinas purificadas sobre la cepa RN 4220 en TS liquido suplementado con CaCl₂ y MgSO₄, a 37°C en microplaca, este ensayo se realizó por triplicado. Se observó una rápida disminución de la DO en los primeros 15 minutos luego del agregado de la endolisinas Mat_N y 320. En el caso de la endolisina de CG no se observa una caída tan marcada en los primeros minutos, pero se observa un efecto aparentemente bacteriostático ya que mantiene una DO constante, sin que se recupere el crecimiento en el tiempo que transcurre el experimento Figura 36.

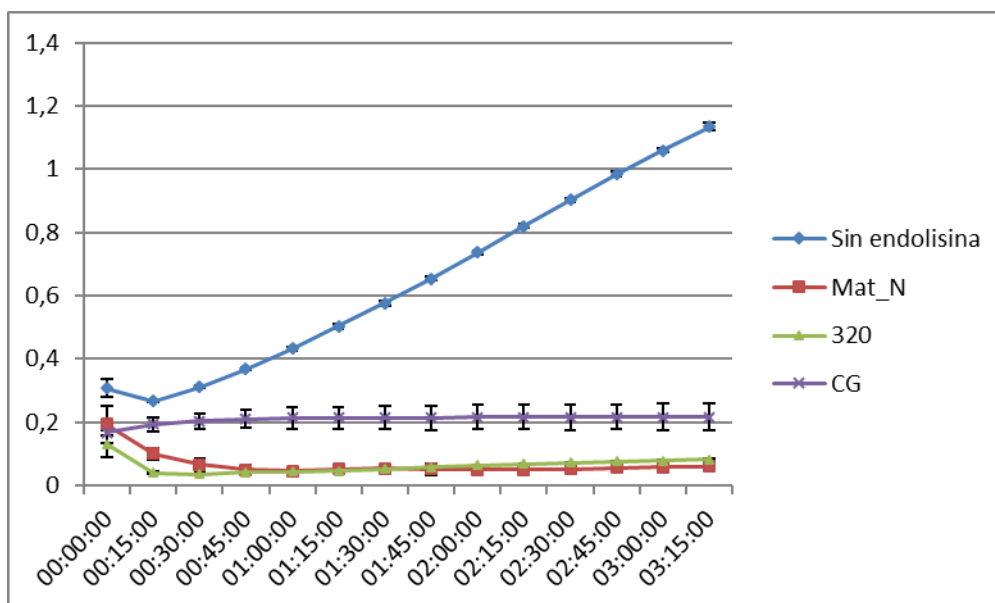


Figura 36: Curva en medio liquido evaluando la actividad de las endolisinas Mat_N, 320 y CG

Rango de lisis en placa de las endolisinas Mat_N y 320.

Para evaluar dicho rango se prepararon placas indicadoras de las diferentes cepas donde se realizaron spot de 5µl de cada endolisinas (5mg/ml). A su vez en la misma placa se realizaron spot de los fagos Mat_N y 320, para poder comparar el rango entre las endolisinas y el fago de origen de la misma. Este ensayo se llevó a cabo sobre las mismas

96 cepas que utilizamos para el rango de huésped de los bacteriófagos caracterizados en el capítulo 2. Las cepas de *S. aureus* sobre las que se probaron las endolisinas se detallan en la Tabla 15. En dicha tabla, se aplica una clasificación según el tipo de lisis que provoca sobre las cepas ensayadas como se representa en la Figura 37.

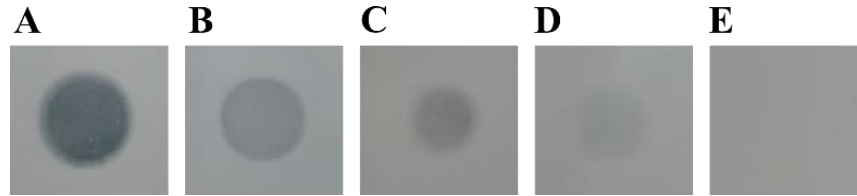


Figura 37: Tipos de lisis que se observan en las diferentes cepas. A) lisis clara, B) y C) lisis turbia, D) perturbación del crecimiento, E) no presenta lisis.

Tabla 15 – Rango de lisis. El color verde representa la lisis, el amarillo claro que perturba el crecimiento y el blanco la no lisis. La letra delante del número, de la cepa es para diferenciar su origen, I: INTA, LP: La Plata, H: hospital, C: hisopado nasal Centenario, (HPC) B: hisopado nasal HEEP y PS: hisopado nasal de pacientes con psoriasis. En negrita se encuentran destacadas las cepas que son meticilino resistente.

CEPAS	Mat_N		320	
	Fago	Lisina	Fago	Lisina
RN 4220, I9, I10, I13, LP321, H10, H50 , C32, PS13 , PS18, PS24, P48	Green	Green	Green	Green
ATCC 25923	Green	White	White	White
ATCC 43300 , NRS70 , NRS123 , NRS153 , NRS158 , NB29740, V329, I1, I3, I5, I23, LP277, LP279, LP281, H5 , C136, C352, C10 , C18 , C77 , C115 , C144 , C149 , C189 , C191 , C193 , C211 , C215 , C224 , C262 , C271 , C274 , C321 , C323 , B358 , B377 , B383 , B393 , B399 , B422 , B433 , PS5, PS32 , PS37, PS41, PS43, PS44, PS45, PS46	White	Green	White	Green
LP275, LP308, H42, H44, H45, C120 , C161, C253 , C310, B426, PS27 , PS28 , PS42	Green	Green	White	Green
LP280	Green	Yellow	Green	Yellow
LP329	Green	Yellow	White	Green
H1, H43, C6, C116 , PS2, PS4 , PS8	White	Green	Green	Green
H2	Green	Yellow	Green	Yellow
I7, I8, LP274, H6 , PS36	White	Yellow	White	Yellow
PS49	White	White	Green	White

Las endolisinas son específicas y no lisaron los otros cocos gram positivos probados (*Staphylococcus saprofiticus*, ni las cepas de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y ATCC 14990), tampoco lisaron DH5 α al igual que los fagos que le dieron origen.

Las endolisinas lisan un mayor número de cepas en comparación con los fagos de los cuales se obtuvieron; el fago Mat_N lisa 29/92 cepas (31.52%) y el fago 320 lisa 22/92 (23.91%) mientras que sus endolisinas lisan 81/92 (88.04%) y 82/92 (89.13%) respectivamente. Las únicas diferencias encontradas en el rango entre ambas endolisinas es que 320 lisa una cepa SAMS de La Plata que la endolisina Mat_N no lisa, sin embargo, esta última cualitativamente genera una lisis más clara sobre las cepas y mayor diámetro del halo de lisis a concentraciones similares. En la Figura 38 se puede apreciar el porcentaje de lisis de cada fago versus su endolisina según el origen de las cepas. Podemos observar que ambas endolisinas lisan un mayor porcentaje de cepas de origen clínico versus las cepas de probable origen animal (INTA y La Plata).

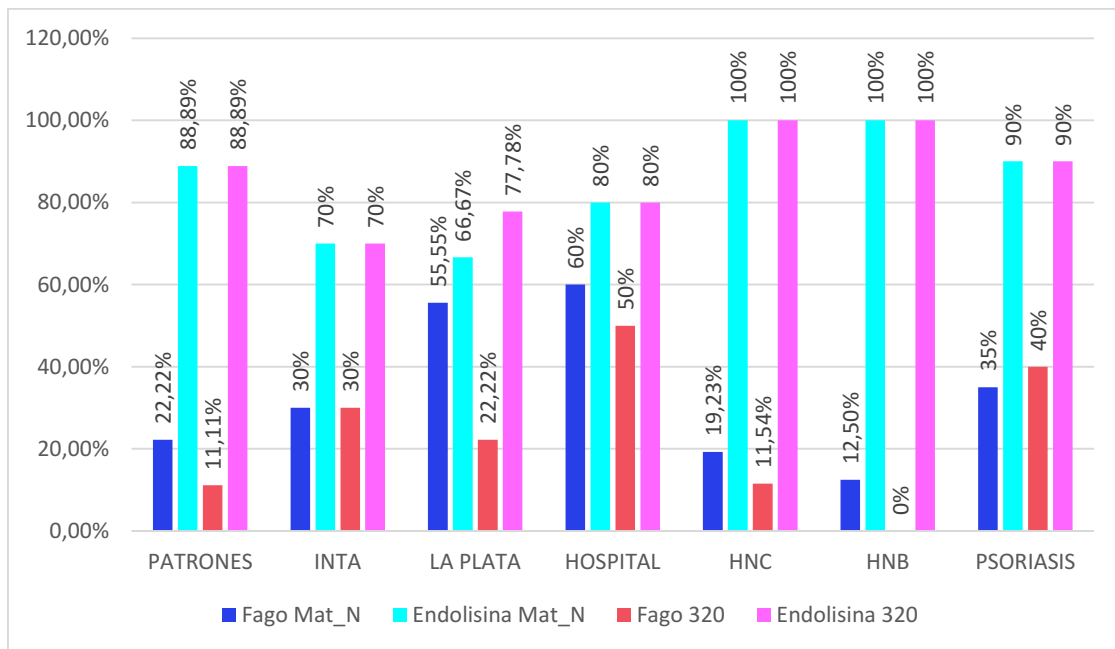


Figura 38: Porcentaje de cepas lisadas por el fago Mat_N y 320 y por sus endolisinas respectivamente.

En la Figura 39 podemos observar de manera comparativa el porcentaje de cepas SAMS y SAMR lisadas por los fagos y sus respectivas endolisinas. A diferencia de los bacteriófagos que le dieron origen estas endolisinas lisan una mayor proporción de cepas

SAMR (41/43) que de SAMS. Los dos SAMR que no son lisados pertenecen a cepas hospitalarias. El hecho de que lisen mayor cantidad de SAMR vs SAMS podría ser el motivo por el cual cuando en la Figura 38 evaluamos el porcentaje de lisis de las cepas por su origen vemos que donde menos actividad presentan son sobre las cepas del INTA y de La Plata y que justamente todas estas cepas son SAMS.

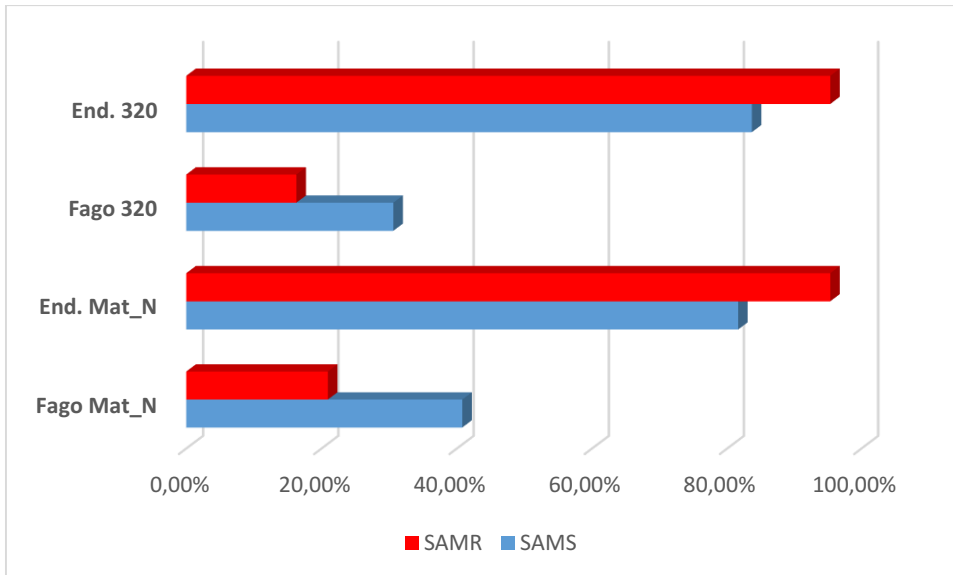


Figura 39: Porcentaje de cepas SAMS y SAMR lisadas por el fago Mat_N y 320, y por sus endolisinas respectivamente.

Discusión del Capítulo 3

S. aureus resistente a meticilina es una amenaza creciente para la salud a nivel mundial. Las estrategias actuales para reducir el impacto de este patógeno incluyen un control restrictivo del uso mundial de antibióticos, medidas profilácticas para obstaculizar la contaminación de alimentos y del medio, y la búsqueda de nuevos antimicrobianos para tratar infecciones humanas y animales causadas por esta bacteria. Una alternativa que se está estudiando para solucionar este problema es el uso de las proteínas líticas del fago (112, 172, 176).

Durante este capítulo mediante análisis bioinformáticos pudimos seleccionar para clonar 4 endolisinas: Mat_N, 320, I74 y CG. Pudimos purificar 3 de las endolisinas expresadas, pero no fue posible de obtener de manera soluble la cuarta endolisina I74. La producción de proteínas en sí misma puede ser problemática debido a la acumulación de proteína recombinante en el citoplasma que puede conducir a una mayor inestabilidad y

a la formación de cuerpos de inclusión (177, 178). Quizás el plegado anormal de la proteína con la consiguiente formación de los cuerpos de inclusión sean una posible explicación de porqué no se pudo obtener I74 de manera soluble.

La obtención del producto de manera soluble no nos garantiza la actividad del mismo. Para evaluar la actividad de nuestras endolisinas recurrimos a varios ensayos, entre ellos el zimograma que nos permitió ver que tanto Mat_N, 320 como CG fueron activas. Posteriormente evaluamos su actividad en medio líquido, en cuyo caso demostraron un efecto bactericida tanto Mat_N como 320, no siendo así en el caso de CG que mostro un efecto más bien “bacteriostático”, este ensayo en el caso de esta última endolisina podría ser realizado sobre la ATCC 25923 que es sobre la que se aisló el fago CG y otras cepas para ver si se comporta de igual manera. También se evaluó la actividad de las mismas en placa a diferentes temperaturas, demostrando ser activas mediante este ensayo tanto Mat_N como 320, ambas lisaron la cepa RN 4220 a todas las temperaturas dando un mayor halo de lisis y mayor claridad de la misma a 25°C; el aumento de la temperatura parece afectar mas a 320 que a Mat_N. Esta observación concuerda con lo reportado en la literatura donde a temperaturas más elevadas puede observarse una disminución de la lisis (179).

Posteriormente evaluamos el rango de actividad de las endolisinas Mat_N y 320, pudiendo demostrar que presentan un mayor rango de lisis que los fagos de los cuales provienen, los fagos Mat_N y 320 presentaron un rango de lisis de 31.52% y de 23.91% respectivamente, mientras sus endolisinas lisaron el 88.04% y el 89.13% de las cepas ensayadas respectivamente. No pudimos evaluar la actividad de la endolisina CG mediante ensayos en placa Petri con ninguna de las 96 cepas utilizadas en el rango de hospedador ya que no se observó lisis en ninguna de las placas. Para explicar este fenómeno se deberían realizar, por ejemplo, estudios estructurales de la proteína para evaluar si tanto el dominio catalítico como el de unión a la bacteria poseen alteraciones que afecten la actividad.

Uno de los principales obstáculos para la erradicación de *S. aureus* en los hospitales y en las industrias alimentarias es su capacidad para formar biopelículas. Las cepas de este microorganismo muestran diversas habilidades para adherirse y crecer en varias superficies bióticas y abióticas. En contraste con las condiciones del laboratorio de microbiología donde las bacterias a menudo se cultivan planctónicamente en condiciones

ricas en nutrientes, las bacterias que se encuentran en el medio ambiente crecen casi exclusivamente en condiciones de deficiencia de nutrientes donde forman biopelículas. Es preocupante que las biopelículas representen una barrera para las acciones de los antibióticos y desinfectantes, dificultando tanto el tratamiento de las infecciones aumentando la morbilidad, la mortalidad y los costos para atención; así como también dificultando la limpieza de las superficies (180). En el rango de actividad que realizamos de las endolisinas Mat_N y 320, evaluamos su actividad sobre numerosas cepas capaces de producir biopelículas. Un paso a seguir sería evaluar la actividad de estas endolisinas sobre la biopelícula ya formada. En este contexto, existe evidencia considerable con respecto a la eficacia de estas lisinas contra biofilms preformados de *S. aureus*. Algunas de las proteínas con probada actividad sobre el mismo son: SAL-2, phi11, PlyGRCS y SAL200, así como las proteínas quiméricas del fago K (derivadas de LysK) (112, 181-183).

Las endolisinas constituyen una buena alternativa tanto para el problema de la formación de biopelículas como para el problema de la multiresistencia ya que además de exhibir una alta actividad antibacteriana y de ser específicas para el patógeno a tratar, hasta la fecha no hay evidencias de que se desarrolle resistencia a la mismas. Sin duda, esta es una de las características más valiosas de estas proteínas y podría estar relacionado con el hecho de que su objetivo es el peptidoglicano el cual es esencial para la viabilidad bacteriana. Además, la mayoría de las endolisinas de *S. aureus* contienen dos dominios catalíticos, que teóricamente reducirían la probabilidad de encontrar bacterias con una doble modificación en la estructura diana (179, 184, 185). En el caso de las endolisinas analizadas en este capítulo presentaron tanto el dominio CHAP como AMI, con lo que sería poco probable que se desarrolle resistencia a la misma.

A futuro podrían probarse otros sistemas de expresión como *Saccharomyces cerevisiae* (levadura), ya que un problema en usar *E. coli* como sistema de expresión es la presencia de lipopolisacáridos (186), una ventaja adicional que nos ofrecería *Saccharomyces* es que se encuentra reconocido como microorganismo seguro (GRAS, del inglés “generally regarded as safe”) por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA), quien avala su uso para la producción de proteínas terapéuticas libres de contaminación por endotoxinas (193).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas a partir de los estudios realizados en este trabajo de tesis se detallan a continuación:

Capítulo 1: Aislamiento y caracterización de cepas de *Staphylococcus aureus*

✓ Se analizaron 548 hisopados nasales que nos permitieron aislar y caracterizar parcialmente 148 cepas de *S. aureus*, de las cuales 34 corresponden a SAMR y 114 a SAMS, por lo que hay una resistencia global a meticilina del 22.97% en las cepas aisladas.

✓ Al evaluar la resistencia a otras familias de antibióticos destaca la resistencia global a macrólidos de 41,22%, que supera a la resistencia a meticilina encontrada, observándose una resistencia del 61.76% en cepas SAMR vs 35.09% en SAMS. La resistencia a aminoglucósidos fue del 20.27%, correspondiendo a SAMR 41.18% y a SAMS 14.03%. En lo que respecta a fluorquinolonas la resistencia general fue del 15.54% siendo del 32.35% para SAMR y del 10.53% para SAMS. Solo se encontraron 3 cepas de SAMS resistentes a mupirocina.

✓ En ninguna de las cepas aisladas se encontró resistencia a TMS ni a vancomicina. Se destaca el potencial uso de TMS como alternativa a los macrólidos.

✓ Dentro de las cepas SAMR el *agr* más prevalente fue el tipo II 41,18%, seguido del tipo I 35.29%. En cambio, en las cepas SAMS el *agr* más frecuente fue el tipo I: 65.79%, seguido del tipo III: 15.79%. El *agr* más prevalente dentro de las cepas SAMR fue el menos frecuente entre las cepas SAMS. En general las cepas que presentan *agr* tipo I y II presentan una forma funcional del mismo y las de tipo III una forma no funcional. La *hdl* se evidenció en 32/37 cepas con *agr* de tipo I, en 12/17 de las de tipo II, en 2/13 de las de tipo III y en 1/2 de las cepas con *agr* tipo IV.

✓ Todas las cepas aisladas fueron capaces de formar biopelículas, y en el 100% se detectó el gen *ica*.

✓ Se identificó la presencia de PVL en el 20.59% (7/34) de los SAMR

✓ Se logró identificar el tipo de SCC*mec* presente en 32 de los 34 SAMR aislados siendo el tipo predominante SCC*mec* tipo IV (27/34), mientras el SCC*mec* tipo I fue identificado en 5/34 cepas

✓ Tres de las cepas que presentan el SCC*mec* tipo IV, mostraron la inserción de un gen de la familia transposasas 20 (*tnp20*).

- ✓ Los estudios de portación nasal *S. aureus* en personal de salud arrojaron una prevalencia de 30% para el HPC y de 18.18% para el HEEP. Sin embargo, no hubo diferencia significativa entre ambos efectores en lo que respecta a la presencia de cepas SAMR siendo de 6% y de 5.3% respectivamente.
- ✓ La prevalencia de la portación nasal de *S. aureus* en pacientes con psoriasis fue mayor que en el grupo control (40% vs 17.39%).
- ✓ No pudimos demostrar una mayor preponderancia de la toxina *sei* (“superantígeno”) en los pacientes con psoriasis vs el grupo control.
- ✓ La edad y el sexo influyen en la portación nasal de SAMS. Mientras que si hablamos de portación de SAMR no hay diferencia entre ambos sexos.

Capítulo 2: Aislamiento y caracterización de bacteriófagos de *S. aureus*

- ✓ Se lograron aislar 33 fagos, 10 provenientes de la inducción con mitomicina C de cepas clínicas y 23 de manera espontánea de hisopados nasales de trabajadores de la salud. No se lograron aislar fagos de muestras ambientales.
- ✓ Se caracterizaron 7 de los bacteriófagos aislados (Mat_T, Mat_N, Mat_29, Mh_1, Mh_4, Mh_5 y Mh_15). Se demostró que todos fueron capaces de amplificar a 25°C, 30°C, 37°C y 42°C); observándose que a 25°C las placas son más claras y a 42 °C son más turbias y puntiformes.
- ✓ Se determinó el tamaño de los genomas mediante PFGE, teniendo un peso molecular aproximado de 50 Kb, por lo que pertenecerían a la Clase II.
- ✓ Mediante la observación de la morfología utilizando las imágenes provenientes del TEM, se pudo determinar que cuatro de estos bacteriófagos (Mh_1, Mh_15, Mat_T y Mat_29) muestran las características típicas de los miembros del orden: *Caudovirales*, familia *Siphoviridae*, los cuales poseen genomas de ADNdh, cápside icosaédrica y colas largas, flexibles y no contráctiles.
- ✓ Rango de hospedador: Mat_T liso 63.04%, Mh_5 60.87%, Mh_15 48,91%, Mat_N 29/92, Mat_29 17.39%, Mh_1 15.22% y Mh_4 14.13%. Los fagos Mat_T y Mh_5 son los que presentan un mayor rango de cepas lisadas.
- ✓ Se optimizó la amplificación en medio líquido la cual es importante por múltiples razones desde la reducción de costos hasta la posibilidad de obtener mayores

volúmenes del fago a amplificar. Se determinó que la concentración óptima de CaCl_2 se encuentran en el rango de 2 a 4mM.

✓ . El fago Mat_T al igual que el fago K logra reducir el crecimiento de las bacterias en 2 órdenes de magnitud.

✓ Se secuenciaron y se anotaron 6 de los bacteriófagos aislados (Mat_N, Mat_29, Mat_T, Mh_1, Mh_4 y Mh_15).

✓ Según la clasificación de Oliveira (163) los fagos provenientes de hisopados nasales se encuentran relacionados evolutivamente ubicándose en el clúster B2, junto con el fago Mh_4, el cual muestra elevada similitud con el fago Mat_T. Los fagos Mh_1 y Mh_15 provenientes de muestras clínicas se encuentran ubicados en el clúster B3.

✓ Aunque los fagos Mat_T y Mh_4 presentan homología de secuencia difieren notablemente en el rango de hospedador (63.04% vs 14.13%)

Capítulo 3: Endolisinas

✓ A través de una búsqueda bioinformática, se pudo identificar los genes que codifican para endolisinas.

✓ Trabajamos con 4 endolisinas (CG, I74, Mat_N y 320), las cuales pudimos clonar, pero solo logramos purificar 3 de ellas (CG, Mat_N y 320).

✓ Para evaluar la actividad de nuestras endolisinas recurrimos a varios ensayos, entre ellos el zimograma que nos permitió ver que tanto Mat_N, 320 como CG fueron activas.

✓ En lo que respecta a la capacidad de lisis a diferentes temperaturas (25 °C, 30°C, 37°C y 42°C) en placa pudimos ver que las endolisinas Mat_N y 320 lisaron a todas las temperaturas ensayadas dando un mayor halo de lisis y mayor claridad de la misma a 25°C. El aumento de la temperatura parece afectar mas a 320 que a Mat_N, ya que en la primera el halo de lisis se vuelve más pequeño y turbio que el de Mat_N a la misma temperatura.

✓ En lo que respecta a las pruebas en placas no pudimos evaluar por este ensayo la actividad de CG.

✓ Con respecto a la prueba de actividad pudimos ver que en medio líquido tienen una mayor actividad bactericida Mat_N y 320 vs CG.

✓ Cuando comparamos el rango de lisis de las endolisinas Mat_N y 320 vs los fagos que le dieron origen, vemos que el mismo se incrementa de manera notable. Los fagos de los cuales se obtuvieron; el fago Mat_N lisa el 31.52% de las cepas y el fago 320 lisa el 23.91% y las endolisinas de ambos lisan 88.04% y 89.13% respectivamente.

Queda un largo camino para recorrer para que las endolisinas y los bacteriófagos sean utilizados como terapéutica en el país, pero el incremento de la resistencia a antibióticos hace imperioso que sean evaluadas nuevas alternativas, y el conocimiento actual nos permite saber que de elección las nuevas terapéuticas deberían ser más selectivas para no generar mayor daño en el ecosistema bacteriano.

Tabla 16: Lista de ORFs y funciones predichas para el fago Mat_T mediante el programa DNAMaster

ORF	Función	ORF	Función
1	DNA invertasa	38	Proteína hipotética
2	Proteína hipotética	39	Regulador transcripcional
3	Proteína hipotética	40	Terminasa subunidad pequeña
4	Regulador transcripcional XRE	41	Terminasa subunidad grande
5	Regulador transcripcional XRE	42	Proteína hipotética
6	Proteína hipotética	43	Proteína portal
7	Proteína hipotética	44	Morfogénesis de cabeza
8	Proteína hipotética	45	Proteína hipotética
9	Regulador transcripcional XRE	46	Proteína con dominio DUF4355
10	Oxidoreductasa	47	Proteína mayor de cápside
11	Antirrepresor	48	Proteína hipotética
12	Proteína hipotética	49	Proteína adaptadora cabeza-cola
13	Proteína hipotética	50	Proteína hipotética
14	Proteína hipotética	51	Proteína hipotética
15	Proteína hipotética	52	Proteína hipotética
16	Proteína con dominio DUF1270	53	Proteína de cola
17	Proteína hipotética	54	Proteína de cola
18	Proteína hipotética	55	Proteína hipotética
19	Dominio de unión a ADNsh	56	Proteína de membrana
20	Dominio de unión a ADNsh	57	Proteína de cola
21	Proteína hipotética	58	Peptidasa
22	Proteína con dominio AP2	59	Proteína hipotética
23	Proteína de replicación	60	Proteína con dominio DUF2479
24	Proteína de replicación DNAC	61	Proteína hipotética
25	Proteína hipotética	62	Proteína hipotética
26	Proteína hipotética	63	Proteína hipotética
27	Endodesoxiribonucleasa de familia RusA	64	Hidrolasa de pared
28	Proteína con dominio DUF3113	65	Proteína con dominio DUF2479
29	Proteína hipotética	66	Proteína hipotética
30	Proteína con dominio DUF3310	67	Holina
31	Proteína hipotética	68	Endolisina
32	Proteína hipotética	69	Proteína con dominio DUF3467
33	dUTPsa	70	Proteína hipotética
34	Proteína hipotética		
35	Proteína con dominio DUF1381		
36	Proteína hipotética		
37	Proteína hipotética		

Tabla 17: Lista de ORFs y funciones predichas para el fago Mat_29 mediante el programa DNAMaster

ORF	Función	ORF	Función
1	Integrasa	37	Proteína hipotética
2	Excisionasa	38	Regulador transcripcional RinA
3	Proteína hipotética	39	Terminasa subunidad pequeña
4	Proteína hipotética	40	Terminasa subunidad pequeña
5	Familia Imma/IrrE metalo-endopeptidasa	41	Terminasa subunidad grande
6	Regulador transcripcional familia XRE	42	Proteína portal
7	Familia de Proteínas HTH	43	Proteína de morfogénesis de cabeza
8	Antirrepresor	44	Proteína hipotética
9	Proteína hipotética	45	Proteína hipotética
10	Proteína hipotética	46	Proteína con dominio DUF4355
11	Proteína hipotética	47	Proteína mayor de la cápside
12	Proteína hipotética	48	Proteína hipotética
13	Proteína hipotética	49	Proteína adaptadora de cabeza-cola
14	Proteína con dominio DUF2483	50	Proteína hipotética
15	Proteína hipotética	51	Proteína hipotética
16	Proteína hipotética	52	Proteína hipotética
17	Proteína hipotética	53	Proteína mayor de cola
18	Proteína de replicación	54	Proteína de cola
19	Proteína hipotética	55	Proteína hipotética
20	Proteína inducible por daño al ADN	56	Proteína de membrana
21	Proteína hipotética	57	Proteína de cola
22	Proteína putativa phiETA-like	58	Peptidasa
23	endodeoxirribonucleasa de familia RusA	59	Proteína hipotética
24	Proteína con dominio DUF3113	60	Proteína con dominio DUF2479
25	Proteína hipotética	61	Proteína con dominio DUF2977
26	Proteína hipotética	62	Proteína hipotética
27	Proteína hipotética	63	Proteína con dominio DUF2951
28	Proteína hipotética	64	Hidrolasa de pared
29	Proteína con dominio DUF1024	65	Proteína de cola
30	dUTPasa	66	Proteína hipotética
31	Proteína hipotética	67	Holina
32	Proteína con dominio DUF1381	68	Endolisina
33	Proteína hipotética	69	Proteína con dominio DUF3467
34	Proteína hipotética	70	Proteína hipotética
35	Proteína hipotética	71	Proteína YfkAB con motivo SAM/CxCxxxxC
36	Regulador transcripcional RinB		

Tabla 18: Lista de ORFs y funciones predichas para el fago Mat_N mediante el programa DNAMaster

ORF	Función	ORF	Función
1	Integrasa	40	Proteína portal
2	Proteína hipotética	41	Proteína minoritaria de la cápside
3	Proteína hipotética	42	Proteína hipotética
4	Familia Imma/IrrE metalo-endopeptidasa	43	Proteína hipotética
5	Familia de Proteínas HTH	44	Proteína con dominio DUF4355
6	Regulador transcripcional HTH	45	Proteína mayoritaria de la cápside
7	Antirrepresor	46	Proteína hipotética
8	Proteína hipotética	47	Proteína conectora cabeza-cola
9	Proteína hipotética	48	Proteína hipotética
10	Proteína hipotética	49	Proteína hipotética
11	Proteína hipotética	50	Proteína hipotética
12	Proteína con dominio DUF1270	51	Proteína mayoritaria de cola
13	Proteína hipotética	52	Chaperona de ensamblado de cola
14	Proteína con dominio DUF2483	53	Proteína hipotética
15	Proteína de unión a ATP	54	Proteína de membrana
16	Proteína de unión a ADNsh	55	Proteína de cola
17	Proteína hipotética	56	Proteína de cola
18	Proteína conteniendo dominio AP2	57	Proteína hipotética
19	Proteína con dominio N-terminal organizadora de replisoma	58	Proteína de la familia BppU
20	Proteína de unión a ATP	59	Proteína con dominio DUF2977
21	Proteína hipotética	60	Proteína hipotética
22	Proteína con dominio DUF3269	61	Proteína con dominio DUF2951
23	Proteína con dominio DUF1064	62	Proteína con dominio glucosaminidasa
24	Proteína con dominio DUF3113	63	Proteína de la familia BppU
25	Proteína hipotética	64	Proteína hipotética
26	Proteína hipotética	65	Holina
27	Proteína hipotética	66	Proteína con dominio SH3
28	Proteína con dominio DUF1024	67	Fosfatidilinositol kinasa
29	Proteína hipotética	68	Proteína hipotética
30	Proteína hipotética	69	Proteína hipotética
31	Proteína hipotética	70	Glutamina amidotransferasa
32	dUTPsa	71	Peptidoglicano glicosiltransferasa SgtB
33	Proteína con dominio DUF1381	72	Regulador de la recombinación RecX
34	Proteína hipotética	73	Regulador transcripcional YfhH
35	Regulador transcripcional RinB	74	Transportador ABC
36	Proteína hipotética	75	Proteína YfkAB con motivo SAM/CxCxxxxC
37	Regulador transcripcional RinA		
38	Terminasa subunidad pequeña		
39	Terminasa subunidad grande		

Tabla 19 : Lista de ORFs y funciones predichas para el fago Mh_1 mediante el programa DNAMaster

ORF	Función	ORF	Función
1	Integrasa	39	dUTP difosfatasa
2	Proteína hipotética	40	Proteína hipotética
3	Proteína hipotética	41	Proteína con dominio DUF1381
4	Proteína hipotética	42	Proteína hipotética
5	Regulador transcripcional HTH	43	Regulador transcripcional RinB
6	Regulador transcripcional HTH	44	Proteína hipotética
7	Proteína hipotética	45	Terminasa subunidad pequeña
8	Proteína hipotética	46	Terminasa subunidad grande
9	Proteína hipotética	47	Proteína portal
10	Proteína conteniendo el dominio ORF6C	48	Proteína minoritaria de cápside
11	Proteína hipotética	49	Proteína hipotética
12	Proteína con dominio DUF1270	50	Proteína con dominio DUF4355
13	Proteína hipotética	51	Proteína mayoritaria de cápside
14	Proteína hipotética	52	Proteína hipotética
15	Proteína hipotética	53	Proteína adaptadora cabeza-cola
16	Proteína hipotética	54	Proteína de cápside
17	Proteína de la familia ERF	55	Proteína hipotética
18	Proteína de unión a ADNsh	56	Proteína con dominio DUF3168
19	Proteína hipotética	57	Proteína de cola
20	Proteína hipotética	58	Proteína hipotética
21	Proteína hipotética	59	Proteína hipotética
22	Proteína de unión a ATP	60	Terminasa
23	Proteína hipotética	61	Proteína de cola
24	Proteína con dominio DUF3269	62	Proteína de cola
25	Proteína con dominio DUF1064	63	Proteína hipotética
26	Proteína con dominio DUF3113	64	Proteína de la familia BppU
27	Proteína hipotética	65	Proteína con dominio DUF2977
28	Proteína con dominio DUF3310	66	Proteína hipotética
29	Proteína hipotética	67	Proteína con dominio DUF2951
30	Proteína hipotética	68	Proteína con dominio glucosaminidasa
31	Proteína hipotética	69	Proteína de la familia BppU
32	Proteína hipotética	70	Proteína hipotética
33	Proteína hipotética	71	Holina
34	Proteína hipotética	72	Proteína con dominio SH3
35	Proteína con dominio DUF1024	73	Proteína hipotética
36	Proteína hipotética	74	Proteína hipotética
37	Proteína hipotética	75	Proteína hipotética
38	HNH endonucleasa		

Tabla 20: Lista de ORFs y funciones predichas para el fago Mh_4 mediante el programa DNAMaster

ORF	Función	ORF	Función
1	Recombinasa	38	Regulador transcripcional RinB
2	Sistema toxina-antitoxina tipo II	39	Proteína hipotética
3	Proteína hipotética	40	Regulador transcripcional RinA
4	Regulador transcripcional HTH	41	Terminasa subunidad pequeña
5	Regulador transcripcional HTH	42	Terminasa subunidad grande
6	Proteína hipotética	43	Proteína portal
7	Proteína hipotética	44	Proteína minoritaria de la cápside
8	Proteína hipotética	45	Proteína hipotética
9	Regulador transcripcional HTH	46	Proteína con dominio DUF4355
10	Proteína represora de la familia AntA/AntB	47	Proteína mayoritaria de la cápside
11	Antirrepresor KilAC	48	Proteína hipotética
12	Antirrepresor	49	Proteína conectora cabeza-cola
13	Antirrepresor	50	Proteína hipotética
14	Proteína hipotética	51	Proteína hipotética
15	Proteína hipotética	52	Proteína hipotética
16	Proteína hipotética	53	Proteína mayoritaria de la cola
17	Proteína hipotética	54	Proteína de cola
18	Proteína con dominio DUF1270	55	Proteína de cola
19	Proteína con dominio DUF1108	56	Proteína hipotética
20	Proteína inhibidora de nucleasas del hospedador de la familia Gam	57	Proteína de cola
21	Proteína de la familia ERF	58	Proteína de cola
22	Proteína de unión a ADNsh	59	Proteína hipotética
23	Proteína hipotética	60	Proteína de la familia BppU
24	Proteína conteniendo el dominio AP2	61	Proteína con dominio DUF2977
25	Proteína conteniendo el dominio N terminal de organización del replisoma	62	Proteína de la familia XkdX
26	Proteína de unión a ATP	63	Proteína con dominio DUF2951
27	Proteína hipotética	64	Proteína con dominio glucosaminidasa
28	Proteína con dominio DUF3269	65	Proteína de la familia BppU
29	endodeoxirribonucleasa de familia RusA	66	Proteína hipotética
30	Proteína con dominio DUF3113	67	Holina
31	Proteína hipotética	68	Endolisina
32	Proteína con dominio DUF3310	69	Proteína con dominio DUF3467
33	Proteína hipotética	70	Proteína hipotética
34	dUTP difosfatasa		
35	Proteína hipotética		
36	Proteína con dominio DUF1381		
37	Proteína hipotética		

Tabla 21: Lista de ORFs y funciones predichas para el fago Mh_15 mediante el programa DNAMaster

ORF	Función	ORF	Función
1	Recombinasa	39	Proteína de la familia DUF1381
2	Sistema toxina-antitoxina tipo II	40	Proteína hipotética
3	Proteína con dominio PH	41	Proteína hipotética
4	Familia Imma/IrrE metalo-endopeptidasa	42	Regulador transcripcional RinB
5	Regulador transcripcional HTH	43	Proteína hipotética
6	Regulador transcripcional HTH	44	Terminasa subunidad pequeña
7	Antirrepresor KilAC	45	Terminasa subunidad grande
8	Proteína hipotética	46	Proteína portal
9	Proteína hipotética	47	Proteína minoritaria de la cabeza
10	Proteína hipotética	48	Proteína conteniendo el dominio DUF4355
11	Proteína hipotética	49	Proteína mayoritaria de la cápside
12	Proteína hipotética	50	Proteína hipotética
13	Proteína inhibidora de nucleasas del hospedador de la familia Gam	51	Proteína adaptadora cabeza-cola
14	Proteína inhibidora de nucleasas del hospedador de la familia Gam	52	Proteína de cierre de la cabeza del fago
15	Proteína de la familia ERF	53	Proteína hipotética
16	Proteína de unión a ADNsh	54	Proteína conteniendo el dominio DUF3168
17	Proteína hipotética	55	Proteína de cola
18	Proteína hipotética	56	Proteína hipotética
19	Proteína hipotética	57	Proteína hipotética
20	Proteína Rep	58	Terminasa
21	Proteína de unión a ATP	59	Proteína hipotética
22	Proteína hipotética	60	Proteína de cola
23	Proteína de la familia DUF3269	61	Proteína de cola
24	Proteína de la familia DUF3269	62	Proteína hipotética
25	Proteína de la familia DUF1064	63	Proteína de la familia BppU
26	Proteína de la familia DUF3113	64	Proteína conteniendo el dominio DUF2977
27	Proteína hipotética	65	Proteína hipotética
28	Proteína hipotética	66	Proteína hipotética
29	Proteína hipotética	67	Proteína con dominio glucosaminidasa
30	Proteína hipotética	68	Proteína de la familia BppU
31	Proteína hipotética	69	Proteína hipotética
32	Proteína hipotética	70	Holina
33	Proteína hipotética	71	Proteína con dominio CHAP
34	Proteína hipotética	72	HNH endonucleasa
35	Proteína hipotética	73	Proteína con dominio SH3
36	Proteína de la familia DUF1024		
37	Proteína hipotética		
38	dUTP pirofosforilasa		

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis.* 2008;197(8):1079-81.
2. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013;11(3):297-308.
3. Founou RC, Founou LL, Essack SY. Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis. *PloS one.* 2017;12(12):e0189621.
4. Giono-Cerezo S, Santos-Preciado JI, Morfin-Otero MDR, Torres-Lopez FJ, Alcantar-Curiel MD. Antimicrobial resistance. Its importance and efforts to control it. *Gac Med Mex.* 2020;156(2):171-8.
5. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(3):318-27.
6. Aminov R. History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochem Pharmacol.* 2017;133:4-19.
7. Travis A, Chernova O, Chernov V, Aminov R. Antimicrobial drug discovery: lessons of history and future strategies. *Expert Opin Drug Discov.* 2018;13(11):983-5.
8. Peres AG, Madrenas J. The broad landscape of immune interactions with *Staphylococcus aureus*: from commensalism to lethal infections. *Burns.* 2013;39(3):380-8.
9. Petersen C, Round JL. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell Microbiol.* 2014;16(7):1024-33.
10. Sakr A, Bregeon F, Mege JL, Rolain JM, Blin O. *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections. *Frontiers in microbiology.* 2018;9:2419.
11. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical microbiology reviews.* 2018;31(4).
12. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol.* 2008;8(6):747-63.
13. Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, Riahi F, Costello AJ, Kroeger JS, et al. Activity of ceftaroline and epidemiologic trends in *Staphylococcus aureus* isolates collected from 43 medical centers in the United States in 2009. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2011;55(9):4154-60.
14. Long SW, Olsen RJ, Mehta SC, Palzkill T, Cernoch PL, Perez KK, et al. PBP2a mutations causing high-level Ceftaroline resistance in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2014;58(11):6668-74.
15. Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet.* 2006;368(9538):874-85.
16. Takadama S, Nakaminami H, Aoki S, Akashi M, Wajima T, Ikeda M, et al. Prevalence of skin infections caused by Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Japan, particularly in Ishigaki, Okinawa. *J Infect Chemother.* 2017;23(11):800-3.
17. D'Agata EM, Webb GF, Horn MA, Moellering RC, Jr., Ruan S. Modeling the invasion of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* into hospitals. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2009;48(3):274-84.
18. Centers for Disease C, Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2002;51(26):565-7.

19. Sievert DM, Rudrik JT, Patel JB, McDonald LC, Wilkins MJ, Hageman JC. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2008;46(5):668-74.
20. Kourtis AP, Hatfield K, Baggs J, Mu Y, See I, Epton E, et al. Vital Signs: Epidemiology and Recent Trends in Methicillin-Resistant and in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections - United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2019;68(9):214-9.
21. Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed Res Int*. 2016;2016:2475067.
22. Kizziah JL, Manning KA, Dearborn AD, Dokland T. Structure of the host cell recognition and penetration machinery of a *Staphylococcus aureus* bacteriophage. *PLoS Pathog*. 2020;16(2):e1008314.
23. Xia G, Wolz C. Phages of *Staphylococcus aureus* and their impact on host evolution. *Infect Genet Evol*. 2014;21:593-601.
24. Jenul C, Horswill AR. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. *Microbiol Spectr*. 2019;7(2).
25. Bronner S, Monteil H, Prevost G. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS microbiology reviews*. 2004;28(2):183-200.
26. Gilot P, Lina G, Cochard T, Poutrel B. Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(11):4060-7.
27. Painter KL, Krishna A, Wigneshweraraj S, Edwards AM. What role does the quorum-sensing accessory gene regulator system play during *Staphylococcus aureus* bacteremia? *Trends in microbiology*. 2014;22(12):676-85.
28. Enkhbaatar P, Joncam C, Traber L, Nakano Y, Wang J, Lange M, et al. Novel ovine model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced pneumonia and sepsis. *Shock*. 2008;29(5):642-9.
29. Singh R, Ray P. Quorum sensing-mediated regulation of staphylococcal virulence and antibiotic resistance. *Future microbiology*. 2014;9(5):669-81.
30. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*. 2011;2(5):445-59.
31. del Pozo JL, Patel R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;82(2):204-9.
32. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000;44(6):1549-55.
33. Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. Staphylococcal cassette chromosome mec (Scmec) classification and typing methods: an overview. *Pol J Microbiol*. 2011;60(2):95-103.
34. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecl* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(7):1955-63.
35. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(5):1323-36.
36. Corso A, Santos Sanches I, Aires de Sousa M, Rossi A, de Lencastre H. Spread of a methicillin-resistant and multiresistant epidemic clone of *Staphylococcus aureus* in Argentina. *Microb Drug Resist*. 1998;4(4):277-88.
37. Aires De Sousa M, Miragaia M, Sanches IS, Avila S, Adamson I, Casagrande ST, et al. Three-year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(6):2197-205.

38. Sola C, Cortes P, Saka HA, Vindel A, Bocco JL. Evolution and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic and sporadic clones in Cordoba, Argentina. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(1):192-200.
39. Lopez Furst MJ, de Vedia L, Fernandez S, Gardella N, Ganaha MC, Prieto S, et al. Prospective multicenter study of community-associated skin and skin structure infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Buenos Aires, Argentina. *PloS one*. 2013;8(11):e78303.
40. Fernandez S, de Vedia L, Lopez Furst MJ, Gardella N, Di Gregorio S, Ganaha MC, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST30-SCCmec IVc clone as the major cause of community-acquired invasive infections in Argentina. *Infect Genet Evol*. 2013;14:401-5.
41. Egea AL, Gagetti P, Lamberghini R, Faccone D, Lucero C, Vindel A, et al. New patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones, community-associated MRSA genotypes behave like healthcare-associated MRSA genotypes within hospitals, Argentina. *Int J Med Microbiol*. 2014;304(8):1086-99.
42. Sollid JU, Furberg AS, Hanssen AM, Johannessen M. *Staphylococcus aureus*: determinants of human carriage. *Infect Genet Evol*. 2014;21:531-41.
43. Cong Y, Yang S, Rao X. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. *J Adv Res*. 2020;21:169-76.
44. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(12):751-62.
45. VandenBergh MF, Yzerman EP, van Belkum A, Boelens HA, Sijmons M, Verbrugh HA. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. *Journal of clinical microbiology*. 1999;37(10):3133-40.
46. Frank DN, Feazel LM, Bessesen MT, Price CS, Janoff EN, Pace NR. The human nasal microbiota and *Staphylococcus aureus* carriage. *PloS one*. 2010;5(5):e10598.
47. Iwase T, Uehara Y, Shinji H, Tajima A, Seo H, Takada K, et al. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature*. 2010;465(7296):346-9.
48. Williams RE. Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriol Rev*. 1963;27:56-71.
49. Hamdan-Partida A, Sainz-Espunes T, Bustos-Martinez J. Characterization and persistence of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the anterior nares and throats of healthy carriers in a Mexican community. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(5):1701-5.
50. Gorwitz RJ, Kruszon-Moran D, McAllister SK, McQuillan G, McDougal LK, Fosheim GE, et al. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001-2004. *J Infect Dis*. 2008;197(9):1226-34.
51. Herwaldt LA, Cullen JJ, French P, Hu J, Pfaller MA, Wenzel RP, et al. Preoperative risk factors for nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004;25(6):481-4.
52. Luzar MA, Coles GA, Faller B, Slingeneyer A, Dah GD, Briat C, et al. *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *N Engl J Med*. 1990;322(8):505-9.
53. Peacock SJ, Justice A, Griffiths D, de Silva GD, Kantzanou MN, Crook D, et al. Determinants of acquisition and carriage of *Staphylococcus aureus* in infancy. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(12):5718-25.
54. Legrand J, Temime L, Lawrence C, Herrmann JL, Boelle PY, Guillemot D. Occupational determinants of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization among healthcare workers: a longitudinal study in a rehabilitation center. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2015;36(7):767-76.
55. Albrich WC, Harbarth S. Health-care workers: source, vector, or victim of MRSA? *Lancet Infect Dis*. 2008;8(5):289-301.

56. Balci DD, Duran N, Ozer B, Gunesacar R, Onlen Y, Yenin JZ. High prevalence of *Staphylococcus aureus* cultivation and superantigen production in patients with psoriasis. *Eur J Dermatol.* 2009;19(3):238-42.
57. Skov L, Baadsgaard O. Bacterial superantigens and inflammatory skin diseases. *Clin Exp Dermatol.* 2000;25(1):57-61.
58. Totte JE, van der Feltz WT, Bode LG, van Belkum A, van Zuuren EJ, Pasmans SG. A systematic review and meta-analysis on *Staphylococcus aureus* carriage in psoriasis, acne and rosacea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;35(7):1069-77.
59. Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B, Delattre AS, Lavigne R. Learning from bacteriophages - advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Curr Protein Pept Sci.* 2012;13(8):699-722.
60. Bobay LM, Ochman H. Biological species in the viral world. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(23):6040-5.
61. Ackermann HW. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. *Arch Virol.* 2001;146(5):843-57.
62. Perez Sepulveda B, Redgwell T, Rihtman B, Pitt F, Scanlan DJ, Millard A. Marine phage genomics: the tip of the iceberg. *FEMS Microbiol Lett.* 2016;363(15).
63. Batinovic S, Wassef F, Knowler SA, Rice DTF, Stanton CR, Rose J, et al. Bacteriophages in Natural and Artificial Environments. *Pathogens.* 2019;8(3).
64. Ackermann HW, Prangishvili D. Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Arch Virol.* 2012;157(10):1843-9.
65. Koskella B, Meaden S. Understanding bacteriophage specificity in natural microbial communities. *Viruses.* 2013;5(3):806-23.
66. Dy RL, Richter C, Salmond GP, Fineran PC. Remarkable Mechanisms in Microbes to Resist Phage Infections. *Annu Rev Virol.* 2014;1(1):307-31.
67. Kelly D, McAuliffe O, Ross RP, O'Mahony J, Coffey A. Development of a broad-host-range phage cocktail for biocontrol. *Bioeng Bugs.* 2011;2(1):31-7.
68. Chan BK, Abedon ST, Loc-Carrillo C. Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future microbiology.* 2013;8(6):769-83.
69. Brigati JR, Ripp SA, Johnson CM, Iakova PA, Jegier P, Sayler GS. Bacteriophage-based bioluminescent bioreporter for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Prot.* 2007;70(6):1386-92.
70. Ripp S, Jegier P, Johnson CM, Brigati JR, Sayler GS. Bacteriophage-amplified bioluminescent sensing of *Escherichia coli* O157:H7. *Anal Bioanal Chem.* 2008;391(2):507-14.
71. Anany H, Chen W, Pelton R, Griffiths MW. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in meat by using phages immobilized on modified cellulose membranes. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(18):6379-87.
72. Xu J, Chau Y, Lee YK. Phage-based Electrochemical Sensors: A Review. *Micromachines (Basel).* 2019;10(12).
73. Alhadrami HA. Biosensors: Classifications, medical applications, and future prospective. *Biotechnol Appl Biochem.* 2018;65(3):497-508.
74. Bernhardt TG, Wang IN, Struck DK, Young R. Breaking free: "protein antibiotics" and phage lysis. *Res Microbiol.* 2002;153(8):493-501.
75. Summers WC. The strange history of phage therapy. *Bacteriophage.* 2012;2(2):130-3.
76. Wittebole X, De Roock S, Opal SM. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence.* 2014;5(1):226-35.
77. Gelman D, Eisenkraft A, Chanishvili N, Nachman D, Copenhagen Glazer S, Hazan R. The history and promising future of phage therapy in the military service. *J Trauma Acute Care Surg.* 2018;85(1S Suppl 2):S18-S26.
78. Kutateladze M, Adamia R. Phage therapy experience at the Eliava Institute. *Med Mal Infect.* 2008;38(8):426-30.

79. Ackermann HW. Bacteriophage observations and evolution. *Res Microbiol.* 2003;154(4):245-51.
80. E. White H, V. Orlova E. Bacteriophages: Their Structural Organisation and Function. *Bacteriophages - Perspectives and Future: IntechOpen*; 2020.
81. Campbell A. The future of bacteriophage biology. *Nat Rev Genet.* 2003;4(6):471-7.
82. Bertozzi Silva J, Storms Z, Sauvageau D. Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiol Lett.* 2016;363(4).
83. Young R. Phage lysis: three steps, three choices, one outcome. *J Microbiol.* 2014;52(3):243-58.
84. Fortier LC, Sekulovic O. Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence.* 2013;4(5):354-65.
85. Ansaldo M. Cell biology perspectives in phage biology. *Front Biosci (Elite Ed).* 2012;4:1823-9.
86. Deghorain M, Van Melderen L. The Staphylococci phages family: an overview. *Viruses.* 2012;4(12):3316-35.
87. Kwan T, Liu J, DuBow M, Gros P, Pelletier J. The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(14):5174-9.
88. Lobočka M, Hejnowicz MS, Dabrowski K, Gozdek A, Kosakowski J, Witkowska M, et al. Genomics of staphylococcal Twort-like phages--potential therapeutics of the post-antibiotic era. *Adv Virus Res.* 2012;83:143-216.
89. Goerke C, Pantucek R, Holtfreter S, Schulte B, Zink M, Grumann D, et al. Diversity of prophages in dominant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *J Bacteriol.* 2009;191(11):3462-8.
90. Grose JH, Casjens SR. Understanding the enormous diversity of bacteriophages: the tailed phages that infect the bacterial family Enterobacteriaceae. *Virology.* 2014;468-470:421-43.
91. Hatfull GF. Molecular Genetics of Mycobacteriophages. *Microbiol Spectr.* 2014;2(2):1-36.
92. Yoshida M, Takaki Y, Eitoku M, Nunoura T, Takai K. Metagenomic analysis of viral communities in (had)opelagic sediments. *PloS one.* 2013;8(2):e57271.
93. Rodriguez-Valera F, Mizuno CM, Ghai R. Tales from a thousand and one phages. *Bacteriophage.* 2014;4(1):e28265.
94. Roux S, Hawley AK, Torres Beltran M, Scofield M, Schwientek P, Stepanauskas R, et al. Ecology and evolution of viruses infecting uncultivated SUP05 bacteria as revealed by single-cell- and meta-genomics. *Elife.* 2014;3:e03125.
95. Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in microbiology.* 2019;10:539.
96. Brussow H, Hendrix RW. Phage genomics: small is beautiful. *Cell.* 2002;108(1):13-6.
97. Fogg PC, Colloms S, Rosser S, Stark M, Smith MC. New applications for phage integrases. *J Mol Biol.* 2014;426(15):2703-16.
98. Casjens SR. Comparative genomics and evolution of the tailed-bacteriophages. *Curr Opin Microbiol.* 2005;8(4):451-8.
99. Fuhrman JA, Schwalbach M. Viral influence on aquatic bacterial communities. *Biol Bull.* 2003;204(2):192-5.
100. Petersen J, Dubilier N. Gene swapping in the dead zone. *Elife.* 2014;3:e04600.
101. Abeles SR, Pride DT. Molecular bases and role of viruses in the human microbiome. *J Mol Biol.* 2014;426(23):3892-906.
102. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(5):317-27.
103. Barrangou R, van der Oost J. Bacteriophage exclusion, a new defense system. *EMBO J.* 2015;34(2):134-5.

104. Hyman P, Abedon ST. Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Adv Appl Microbiol.* 2010;70:217-48.
105. Borysowski J, Weber-Dabrowska B, Gorski A. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Exp Biol Med (Maywood).* 2006;231(4):366-77.
106. Fischetti VA. Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *Int J Med Microbiol.* 2010;300(6):357-62.
107. Zhang J, Xu LL, Gan D, Zhang X. In Vitro Study of Bacteriophage AB3 Endolysin LysAB3 Activity Against *Acinetobacter baumannii* Biofilm and Biofilm-Bound *A. baumannii*. *Clin Lab.* 2018;64(6):1021-30.
108. Viertel TM, Ritter K, Horz HP. Viruses versus bacteria-novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(9):2326-36.
109. Dams D, Briens Y. Enzybiotics: Enzyme-Based Antibacterials as Therapeutics. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1148:233-53.
110. Oliveira H, Melo LD, Santos SB, Nobrega FL, Ferreira EC, Cerca N, et al. Molecular aspects and comparative genomics of bacteriophage endolysins. *J Virol.* 2013;87(8):4558-70.
111. Fisher JF, Mobashery S. Constructing and deconstructing the bacterial cell wall. *Protein Sci.* 2020;29(3):629-46.
112. Gutierrez D, Fernandez L, Rodriguez A, Garcia P. Are Phage Lytic Proteins the Secret Weapon To Kill *Staphylococcus aureus*? *mBio.* 2018;9(1).
113. Oechslin F, Menzi C, Moreillon P, Resch G. The multi-domain architecture of a bacteriophage endolysin enables intramolecular synergism and regulation of bacterial lysis. *J Biol Chem.* 2021:100639.
114. Jassim SA, Limoges RG. Natural solution to antibiotic resistance: bacteriophages 'The Living Drugs'. *World J Microbiol Biotechnol.* 2014;30(8):2153-70.
115. Divya Ganeshan S, Hosseinidoust Z. Phage Therapy with a Focus on the Human Microbiota. *Antibiotics (Basel).* 2019;8(3).
116. Rohde C, Resch G, Pirnay JP, Blasdel BG, Debarbieux L, Gelman D, et al. Expert Opinion on Three Phage Therapy Related Topics: Bacterial Phage Resistance, Phage Training and Prophages in Bacterial Production Strains. *Viruses.* 2018;10(4).
117. Markoishvili K, Tsitlanadze G, Katsarava R, Morris JG, Jr., Sulakvelidze A. A novel sustained-release matrix based on biodegradable poly(ester amide)s and impregnated with bacteriophages and an antibiotic shows promise in management of infected venous stasis ulcers and other poorly healing wounds. *Int J Dermatol.* 2002;41(7):453-8.
118. Totte JEE, van Doorn MB, Pasmans S. Successful Treatment of Chronic *Staphylococcus aureus*-Related Dermatoses with the Topical Endolysin Staphfect SA.100: A Report of 3 Cases. *Case Rep Dermatol.* 2017;9(2):19-25.
119. Newbould FH. Antibiotic treatment of experimental *Staphylococcus aureus* infections of the bovine mammary gland. *Can J Comp Med.* 1974;38(4):411-6.
120. Nair D, Memmi G, Hernandez D, Bard J, Beaume M, Gill S, et al. Whole-genome sequencing of *Staphylococcus aureus* strain RN4220, a key laboratory strain used in virulence research, identifies mutations that affect not only virulence factors but also the fitness of the strain. *J Bacteriol.* 2011;193(9):2332-5.
121. Treangen TJ, Maybank RA, Enke S, Friss MB, Diviak LF, Karaolis DK, et al. Complete Genome Sequence of the Quality Control Strain *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923. *Genome Announc.* 2014;2(6).
122. Putonti C, Kalesinskas L, Cudone E, Engelbrecht KC, Koenig DW, Wolfe AJ. Draft Genome Sequence of *Staphylococcus epidermidis* (Winslow and Winslow) Evans (ATCC 14990). *Genome Announc.* 2017;5(27).
123. Zhang YQ, Ren SX, Li HL, Wang YX, Fu G, Yang J, et al. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol Microbiol.* 2003;49(6):1577-93.

124. Winn, Allen, Janda, Koneman, Procop, Schreckenberger, et al. Koneman Diagnóstico Microbiológico. Edición t, editor: Médica Panamericana; 2008.
125. Patel JB. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
126. Louie L, Goodfellow J, Mathieu P, Glatt A, Louie M, Simor AE. Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(8):2786-90.
127. Kumar JD, Negi YK, Gaur A, Khanna D. Detection of virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from paper currency. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2009;13(6):e450-5.
128. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1999;29(5):1128-32.
129. Nashev D, Toshkova K, Salasia SI, Hassan AA, Lammler C, Zschock M. Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;233(1):45-52.
130. Gardella N, von Specht M, Cuirolo A, Rosato A, Gutkind G, Mollerach M. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, eastern Argentina. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;62(3):343-7.
131. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, et al. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(1):264-74.
132. Traber KE, Lee E, Benson S, Corrigan R, Cantera M, Shopsin B, et al. agr function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiology*. 2008;154(Pt 8):2265-74.
133. Raya R, E. H. Isolation of Phage via Induction of Lysogens. *Bacteriophages, Methods and Protocols*.: Humana Press. ; 2009. 23-32 p.
134. Laslett D, Canback B. ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(1):11-6.
135. Stothard P, Wishart DS. Circular genome visualization and exploration using CGView. *Bioinformatics*. 2005;21(4):537-9.
136. Agren J, Sundstrom A, Hafstrom T, Segerman B. Gegenees: fragmented alignment of multiple genomes for determining phylogenomic distances and genetic signatures unique for specified target groups. *PloS one*. 2012;7(6):e39107.
137. Huson DH, Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol*. 2006;23(2):254-67.
138. Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform*. 2019;20(4):1160-6.
139. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol*. 2010;59(3):307-21.
140. Lefort V, Longueville JE, Gascuel O. SMS: Smart Model Selection in PhyML. *Mol Biol Evol*. 2017;34(9):2422-4.
141. Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, et al. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Database issue):D222-30.
142. Kwon SK, Kim SK, Lee DH, Kim JF. Comparative genomics and experimental evolution of *Escherichia coli* BL21(DE3) strains reveal the landscape of toxicity escape from membrane protein overproduction. *Scientific reports*. 2015;5:16076.
143. Correa A, Ortega C, Obal G, Alzari P, Vincentelli R, Oppezzo P. Generation of a vector suite for protein solubility screening. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:67.

144. Miroux B, Walker JE. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol.* 1996;260(3):289-98.
145. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
146. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
147. Westbye AB, Fogg PC, Beatty JT. Endolysin Expression, Purification and Activity Determination by Zymography. *Bio-protocol.* 2014;4(16):e1208.
148. Boncompain CA, Suarez CA, Morbidoni HR. *Staphylococcus aureus* nasal carriage in health care workers: First report from a major public hospital in Argentina. *Revista Argentina de microbiologia.* 2017;49(2):125-31.
149. Boles BR, Horswill AR. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog.* 2008;4(4):e1000052.
150. Gocmen Julide S, Sahiner N, Kocak M, Karahan ZC. PCR investigation of Panton-Valentine leukocidin, enterotoxin, exfoliative toxin, and agr genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from psoriasis patients. *Turk J Med Sci.* 2015;45(6):1345-52.
151. Park C, Shin HH, Kwon EY, Choi SM, Kim SH, Park SH, et al. Two variants of staphylococcal cassette chromosome mec type IVA in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in South Korea. *J Med Microbiol.* 2009;58(Pt 10):1314-21.
152. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med.* 2009;361(5):496-509.
153. Benoit SR, Estivariz C, Mogdasy C, Pedreira W, Galiana A, Galiana A, et al. Community strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as potential cause of healthcare-associated infections, Uruguay, 2002-2004. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(8):1216-23.
154. Diaz E, Fernandez IM, Jimenez L, Rodriguez M, Surani S. Is methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia epidemiology and sensitivity changing? *Am J Med Sci.* 2012;343(3):196-8.
155. Peng H, Liu D, Ma Y, Gao W. Comparison of community- and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a Chinese tertiary hospital, 2012-2017. *Scientific reports.* 2018;8(1):17916.
156. Collins J, Rudkin J, Recker M, Pozzi C, O'Gara JP, Massey RC. Offsetting virulence and antibiotic resistance costs by MRSA. *ISME J.* 2010;4(4):577-84.
157. Rudkin JK, Edwards AM, Bowden MG, Brown EL, Pozzi C, Waters EM, et al. Methicillin resistance reduces the virulence of healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by interfering with the agr quorum sensing system. *J Infect Dis.* 2012;205(5):798-806.
158. Lee SS, Kim YJ, Chung DR, Jung KS, Kim JS. Invasive infection caused by a community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain not carrying Panton-Valentine leukocidin in South Korea. *Journal of clinical microbiology.* 2010;48(1):311-3.
159. Garcia C, Acuna-Villaorduna A, Dulanto A, Vandendriessche S, Hallin M, Jacobs J, et al. Dynamics of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among healthcare workers in a tertiary-care hospital in Peru. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;35(1):89-93.
160. Clokie MR, Millard AD, Letarov AV, Heaphy S. Phages in nature. *Bacteriophage.* 2011;1(1):31-45.
161. Ackermann HW. Bacteriophage electron microscopy. *Adv Virus Res.* 2012;82:1-32.
162. Abatangelo V, Peressutti Bacci N, Boncompain CA, Amadio AF, Carrasco S, Suarez CA, et al. Broad-range lytic bacteriophages that kill *Staphylococcus aureus* local field strains. *PloS one.* 2017;12(7):e0181671.
163. Oliveira H, Sampaio M, Melo LDR, Dias O, Pope WH, Hatfull GF, et al. *Staphylococci* phages display vast genomic diversity and evolutionary relationships. *BMC Genomics.* 2019;20(1):357.

164. Oh J, Byrd AL, Deming C, Conlan S, Program NCS, Kong HH, et al. Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. *Nature*. 2014;514(7520):59-64.
165. Tokman JI, Kent DJ, Wiedmann M, Denes T. Temperature Significantly Affects the Plaquing and Adsorption Efficiencies of Listeria Phages. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:631.
166. Abedon ST, Yin J. Bacteriophage plaques: theory and analysis. *Methods Mol Biol*. 2009;501:161-74.
167. Brussow H, Canchaya C, Hardt WD. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004;68(3):560-602, table of contents.
168. Fernandez L, Gutierrez D, Garcia P, Rodriguez A. The Perfect Bacteriophage for Therapeutic Applications-A Quick Guide. *Antibiotics (Basel)*. 2019;8(3).
169. Monteiro R, Pires DP, Costa AR, Azeredo J. Phage Therapy: Going Temperate? *Trends in microbiology*. 2019;27(4):368-78.
170. Furfaro LL, Payne MS, Chang BJ. Bacteriophage Therapy: Clinical Trials and Regulatory Hurdles. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:376.
171. Fujiki J, Nakamura T, Furusawa T, Ohno H, Takahashi H, Kitana J, et al. Characterization of the Lytic Capability of a LysK-Like Endolysin, Lys-phiSA012, Derived from a Polyvalent *Staphylococcus aureus* Bacteriophage. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2018;11(1).
172. Becker SC, Foster-Frey J, Donovan DM. The phage K lytic enzyme LysK and lysostaphin act synergistically to kill MRSA. *FEMS Microbiol Lett*. 2008;287(2):185-91.
173. Obeso JM, Martinez B, Rodriguez A, Garcia P. Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage PhiH5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. *Int J Food Microbiol*. 2008;128(2):212-8.
174. Sass P, Bierbaum G. Lytic activity of recombinant bacteriophage phi11 and phi12 endolysins on whole cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(1):347-52.
175. Sanz-Gaitero M, Keary R, Garcia-Doval C, Coffey A, van Raaij MJ. Crystal structure of the lytic CHAP(K) domain of the endolysin LysK from *Staphylococcus aureus* bacteriophage K. *Virology*. 2014;511:133.
176. Yu JH, Lim JA, Chang HJ, Park JH. Characteristics and Lytic Activity of Phage-Derived Peptidoglycan Hydrolase, LysSAP8, as a Potent Alternative Biocontrol Agent for *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Biotechnol*. 2019;29(12):1916-24.
177. Carrio MM, Villaverde A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J Biotechnol*. 2002;96(1):3-12.
178. Ventura S, Villaverde A. Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends Biotechnol*. 2006;24(4):179-85.
179. Kaur J, Singh P, Sharma D, Harjai K, Chhibber S. A potent enzymatic agent against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Virus Genes*. 2020;56(4):480-97.
180. Moormeier DE, Bayles KW. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Mol Microbiol*. 2017;104(3):365-76.
181. Fenton M, Keary R, McAuliffe O, Ross RP, O'Mahony J, Coffey A. Bacteriophage-Derived Peptidase CHAP(K) Eliminates and Prevents Staphylococcal Biofilms. *Int J Microbiol*. 2013;2013:625341.
182. Jun SY, Jung GM, Yoon SJ, Oh MD, Choi YJ, Lee WJ, et al. Antibacterial properties of a pre-formulated recombinant phage endolysin, SAL-1. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;41(2):156-61.
183. Olsen NMC, Thiran E, Hasler T, Vanzielegem T, Belibasakis GN, Mahillon J, et al. Synergistic Removal of Static and Dynamic *Staphylococcus aureus* Biofilms by Combined Treatment with a Bacteriophage Endolysin and a Polysaccharide Depolymerase. *Viruses*. 2018;10(8).
184. Fischetti VA. Using phage lytic enzymes to control pathogenic bacteria. *BMC Oral Health*. 2006;6 Suppl 1:S16.

185. Fischetti VA. Development of Phage Lysins as Novel Therapeutics: A Historical Perspective. *Viruses*. 2018;10(6).
186. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:172.