



Universitat Autònoma de Barcelona

Estudios sobre terapia fágica contra
S. enterica* en *Gallus gallus

Tesis Doctoral

Carlota Bardina Fons

Departament de Genètica i de Microbiologia

Bellaterra, 2011



Universitat Autònoma de Barcelona

Estudios sobre terapia fágica contra
S. enterica* en *Gallus gallus

Tesis Doctoral presentada por **Carlota Bardina Fons**

para optar al Grado de **Doctor** por la **Universitat Autònoma de Barcelona**

Programa de doctorado en **Microbiología**

Con el visto bueno de las Directoras de Tesis Doctoral:

Dra. Montserrat Llagostera Casas

Dra. M^a Pilar Cortés Garmendia

Resumen

Salmonella enterica es una enterobacteria zoonótica que reside en el intestino de los animales, presenta una elevada capacidad invasiva y, normalmente, su infección es asintomática en animales de granja. Las serovariedades no tifoideas causan brotes asociados a alimentos siendo *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* las que presentan una mayor prevalencia a nivel mundial. La principal vía de transmisión de este patógeno a humanos se produce a través del consumo de alimentos contaminados de origen animal. Es por ello que, actualmente, se está promoviendo, bajo el lema “de la granja a la mesa”, una actuación integrada dirigida a controlar a este enteropatógeno en todos los niveles de la cadena alimentaria.

El principal reservorio de *S. enterica* son las especies aviares y en particular *Gallus gallus*. Por ello, la Unión Europea (UE) ha invertido muchos esfuerzos para intentar disminuir, sobretudo en *Gallus gallus*, la prevalencia de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* y, en segundo término, la de las serovariedades Hadar, Infantis y Virchow, cuya incidencia es menor. En este sentido, la UE ha publicado una serie de regulaciones para establecer medidas de control como la vacunación de las manadas de reproductoras y ponedoras. No obstante, esta medida no es aplicable a pollos de engorde dado que su periodo de vida es demasiado corto. Dada esta situación, hay una clara necesidad de disponer de nuevas herramientas para conseguir reducir la presencia de *Salmonella* en todo el sector de producción aviar y, óptimamente, su erradicación. En este contexto, el objetivo del presente trabajo ha sido aislar, seleccionar y caracterizar fagos de *Salmonella*, candidatos para su aplicación en terapia fágica y estudiar su aplicación en animales, en particular en *Gallus gallus*.

Para abordar el objetivo propuesto, se aislaron bacteriófagos específicos de *Salmonella* desde muestras de heces de aves de granjas españolas, obtenidas durante los años 2007 y 2008, seleccionándose aquellos fagos que presentaran perfiles líticos y tuvieran un elevado rango de huésped. Tras esta primera selección, se estudió la cinética de infección de los fagos sobre *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Enteritidis* LK5, para poder escoger a los que presentaran una mayor y más rápida capacidad lítica. Asimismo, se determinaron los perfiles de restricción de dichos fagos como parámetro indicativo de que se trataba de fagos distintos. Tras ambos estudios, se escogieron a los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87 como candidatos para terapia fágica y se procedió a determinar su morfología, los parámetros de su ciclo multiplicativo, su estabilidad en diferentes condiciones ambientales y, finalmente, se secuenciaron sus genomas. El estudio de estos parámetros indicó que el fago UAB_Phi20 pertenece a la familia *Podoviridae* y al grupo de fagos tipo P22, mientras el fago UAB_Phi87 es de la familia *Myoviridae* y del grupo de fagos tipo Felix O1. Ambos fagos presentaron una buena estabilidad a temperaturas comprendidas entre 30 y 42°C y a pH entre 4 y 9, si bien su título disminuyó significativamente a pH 2. El análisis detallado de las secuencias de ambos fagos indicó que ninguno de ellos contiene genes conocidos relacionados con la virulencia.

Resumen

Asimismo, se demostró *in vitro* que la acción combinada de ambos fagos provocaba una mayor reducción de la concentración de *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Enteritidis* LK5 que la de los fagos individuales. Además, dicha reducción fue mayor si se utilizaba un combinado fágico integrado por los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87, aislados y caracterizados en este trabajo, y por el fago UAB_Phi78, el cual había sido aislado y estudiado por nuestro grupo (Spricigo, 2011). Por ello, los estudios de terapia fágica en animales se han realizado con este combinado fágico.

La experimentación animal se realizó en un modelo murino y en *Gallus gallus*. En ambos modelos se demostró que el tiempo de permanencia de los fagos en el tracto intestinal de los animales era muy corto y que se requerían repetidas dosis fágicas para conseguir que el cóctel tuviera un efecto significativo en la reducción de este patógeno, siendo mayor su eficacia durante los primeros días tras la infección bacteriana. Así, se consiguió que el 50% de los ratones sobreviviera a la infección promovida por *S. Typhimurium* ATCC 14028 al administrar 10^{10} pfu/animal simultáneamente a la infección y a las 6, 24 y 30 horas después de la infección. Del mismo modo, en pollos infectados con *S. Typhimurium* y tratados con dos dosis diarias de 10^{10} pfu/animal el día previo a la infección y los 4 días siguientes, junto con la readministración del cóctel en los días 6, 8, 10, 13 y 15 posinfección, produjo una reducción de *Salmonella* de más de 4 logaritmos durante los dos primeros días de la infección y de 1,5 logaritmos al final del experimento.

Finalmente, y dado que algunas de las problemáticas que se plantean ante el uso de bacteriófagos en terapia fágica son la selección de bacterias resistentes y la generación de una respuesta inmunitaria que pueda bloquear la acción de los fagos, también se estudió el impacto de dicho cóctel en la selección de bacterias resistentes en los animales tratados con fagos y se cuantificó su respuesta inmunitaria.

El conjunto de los resultados obtenidos en este trabajo muestran la potencialidad de la terapia fágica como herramienta de reducción de *Salmonella* en la producción aviar y señalan algunos aspectos a modificar para conseguir mejorar este tipo de terapia.

Summary

Salmonella enterica is a zoonotic enterobacteria mainly found in the gut of its hosts, which shows a high invasive capacity and an asymptomatic course of infection in farm animals. Nontyphoidal *Salmonella* serovars cause gastroenteritis, being *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* the most prevalent serovars causing food outbreaks worldwide. The main route of transmission of this pathogen to humans occurs by the consumption of contaminated food from animals infected but not detected. For this reason and to assure the control of *Salmonella* along all the food chain, a global actuation known as “from the farm to the fork” has been stimulated.

The main reservoirs of *S. enterica* are avian species, above all *Gallus gallus*. For this reason, the European Union (UE) makes efforts trying to decrease first of all, the prevalence of *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*, and also that of Hadar, Infantis and Virchow serovars. In this sense, UE has published different regulations to establish different strategies of control as vaccination. However, in some stages of the avian production as in broilers, this approach is not applicable due the short period of life of these animals. Thus, it is necessary to dispose of other new measures to reduce *Salmonella* prevalence in the entire avian production field and indeed, its eradication. In this context, the aim of this thesis was focused on the isolation, selection and characterization of new *Salmonella* bacteriophages to study their effectiveness as a control strategy in *Gallus gallus*.

To address this aim, specific *Salmonella* bacteriophages were isolated from faecal samples of Spanish avian farms over 2007 and 2008. Those bacteriophages that showed lytic abilities and wider host ranges were selected. After this first selection, the *in vitro* infection profiles on cultures of *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* and their restriction profiles were determined in order to further select those with higher and faster lytic capacity. In this way, bacteriophages UAB_Phi20 and UAB_Phi87 were selected to be used as phage therapy. In this way, further characterisation of their morphology, their infection cycle and their stability under different environmental conditions was made, and their genome was sequenced. The study of these parameters showed that the bacteriophage UAB_Phi20 is a virulent *Salmonella* phage from the *Podoviridae* family closely resembling to P22, while bacteriophage UAB_Phi87 is also a virulent *Salmonella* phage but is enclosed in the *Myoviridae* family closely related to bacteriophages Felix O1-like. Both phages, UAB_Phi20 and UAB_Phi87, are highly stable under temperatures ranging from 30°C to 42°C and in pH between 4 and 9. However, at extremely acidic pH values (pH 2) their viability is clearly compromised. The analysis of both genome sequences showed that none of them contain known virulence genes.

Likewise, the *in vitro* infection kinetics of both phages as a cocktail in liquid cultures of *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*, were also performed. With this approach better reduction levels on *Salmonella* concentration were achieved. Moreover, the addition of a third bacteriophage (UAB_Phi78), isolated in our laboratory (Spricigo, 2011), improves the effect of the cocktail herein

Summary

used. In this way, the subsequent studies on the efficacy of the phage therapy on animals were accomplished using the phage cocktail comprised with UAB_Phi20, UAB_Phi87 and UAB_Phi78.

The efficacy of this new cocktail was assayed in a mice model and in *Gallus gallus*. In both cases, the results obtained showed that the time of residence of bacteriophages in the intestinal tract of animals was really short and that the administration of several doses to obtain significant effects on the reduction of this pathogen is necessary, improving its effect during the first days after bacterial infection. The approaches herein studied allowed a 50% reduction in mice death promoted by *S. Typhimurium* when 10^{10} pfu/ml was administered simultaneously to the infection and at 6, 34 and 30 hours after the bacterial infection. In the same way, in poultry infected with *S. Typhimurium* and daily treated with two doses of 10^{10} pfu/ml since the day before of the infection and during the successive 4 days, with single re-administrations of the phage cocktail on days 6, 8, 10, 13 and 15 after the bacterial infection, promoted a *Salmonella* reduction of over 4 logs during the first days and a reduction of 1.5 logs at the end of the experiment

Finally and due the problematic set out on the selection of resistant bacterial and the activation of the immune system promoted by the use of bacteriophages, the impact of the phage cocktail on the selection of resistant bacteria in animals and their immune response was also evaluated.

The results herein obtained showed that bacteriophages are a promising strategy on the reduction of *Salmonella* populations in the avian industry, and point some aspects which must be improved to obtain better results.

Índice

Resumen.....	I
Summary.....	V
1. Introducción.....	1
1.1. <i>Salmonella</i>	1
1.1.1. Características generales.....	1
1.1.2. La salmonelosis y su impacto.....	3
1.1.3. Lucha integral contra <i>Salmonella</i>	7
1.2. Bacteriófagos.....	11
1.2.1. Generalidades.....	11
1.2.2. Taxonomía.....	11
1.2.3. Ciclo biológico.....	13
1.2.3.1. Fase de adsorción e inyección del genoma fágico.....	16
1.2.3.2. Fase de multiplicación.....	16
1.2.3.3. Fase de lisis bacteriana.....	18
1.2.4. Organización genómica.....	20
1.2.5. Bacteriófagos líticos: el bacteriófago T4.....	20
1.2.5.1. Características generales.....	20
1.2.5.2. Adsorción e inyección del DNA.....	20
1.2.5.3. Ciclo multiplicativo.....	21
1.2.5.4. Ensamblaje de los nuevos viriones y empaquetamiento del DNA.....	22
1.2.6. Fagos atenuados: el bacteriófago P22.....	22
1.2.6.1. Características generales.....	22
1.2.6.2. Adsorción e inyección del DNA.....	22
1.2.6.3. Ciclo multiplicativo.....	23
1.2.6.3.1. Establecimiento del ciclo lisogénico.....	23
1.2.6.3.2. Mantenimiento de la lisogenia.....	25
1.2.6.3.3. Establecimiento del ciclo lítico.....	25
1.2.6.4. Ensamblaje de los nuevos viriones y empaquetamiento del DNA.....	26
1.2.7. Arsenal fágico de <i>Salmonella</i>	26
1.3. Terapia fágica.....	28
1.3.1. Características generales.....	28
1.3.2. Terapia fágica y seguridad alimentaria.....	30
2. Objetivos.....	35
3. Material y métodos.....	39
3.1. Cepas bacterianas, plásmidos, muestras de campo y oligonucleótidos.....	39
3.2. Métodos microbiológicos.....	39

3.2.1.	Medios, condiciones de cultivo y de conservación de bacterias	39
3.2.2.	Aislamiento y purificación de bacteriófagos	44
3.2.3.	Obtención de lisados fágicos	45
3.2.4.	Test de la gota	46
3.2.5.	Titulación de los lisados fágicos	46
3.2.6.	Cinética de la infección fágica	46
3.2.7.	Adsorción fágica	47
3.2.8.	Determinación de los parámetros del ciclo multiplicativo	47
3.2.9.	Estabilidad fágica en diferentes condiciones ambientales	47
3.2.10.	Determinación de la resistencia bacteriana frente a la infección fágica	48
3.3.	Microscopía electrónica	48
3.4.	Métodos de biología molecular	48
3.4.1.	Extracción de DNA	48
3.4.2.	Electroforesis convencional en geles de agarosa	49
3.4.3.	Electroforesis en campo pulsante	50
3.4.4.	Reacción en cadena de la polimerasa	51
3.4.5.	Purificación de los fragmentos de DNA	51
3.4.6.	Digestión del DNA	52
3.4.7.	Secuenciación del DNA	52
3.4.8.	Obtención de células competentes	52
3.4.9.	Electrotransformación	52
3.4.10.	Obtención de mutantes bacterianos por inactivación génica en un paso	53
3.5.	Métodos bioinformáticos	54
3.6.	Experimentación animal	55
3.6.1.	Modelos animales	55
3.6.2.	Determinación de la dosis letal 50 (DL ₅₀) de <i>Salmonella</i> en ratones	56
3.6.3.	Recuperación de <i>Salmonella</i> de diferentes órganos de ratones	56
3.6.4.	Infección de <i>Gallus gallus</i> con <i>Salmonella</i>	57
3.6.5.	Determinación del tiempo de residencia de los bacteriófagos en el intestino de los animales	57
3.6.6.	Estudios de terapia fágica en ratones	58
3.6.7.	Terapia fágica en <i>Gallus gallus</i>	58
3.6.8.	Obtención del suero de los animales	59
3.7.	Técnicas inmunológicas	61
3.8.	Análisis estadístico	61
4.	Resultados	65

4.1. Aislamiento y selección de nuevo bacteriófagos.....	65
4.2. Caracterización de los bacteriófagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87.....	67
4.2.1. Morfología de los bacteriófagos y tamaño de sus genomas.....	68
4.2.2. Parámetros del ciclo lítico.....	70
4.2.3. Mecanismo de empaquetamiento.....	70
4.2.4. Efecto del pH y de la temperatura en la estabilidad fágica.....	72
4.3. Genómica del fago UAB_Phi20.....	73
4.3.1. Estrategia de secuenciación.....	73
4.3.2. Análisis de la secuencia genómica.....	73
4.3.2.1. Análisis de los promotores.....	74
4.3.2.2. Control traduccional.....	74
4.3.2.3. Terminadores de la transcripción.....	81
4.3.2.4. Organización del genoma del fago UAB_Phi20.....	81
4.3.2.5. Determinación a nivel molecular del comportamiento lítico del fago UAB_Phi20.....	84
4.3.3. Comparación filogenética del fago UAB_Phi20.....	87
4.4. Genómica del fago UAB_Phi87.....	89
4.4.1. Estrategia de secuenciación.....	89
4.4.2. Análisis de la secuencia genómica.....	89
4.4.2.1. Análisis de los promotores.....	89
4.4.2.2. Control traduccional.....	97
4.4.2.3. Terminadores de la transcripción.....	99
4.4.2.4. Codificación de tRNAs.....	99
4.4.2.5. Organización del genoma del fago UAB_Phi87.....	100
4.4.3. Comparación filogenética del fago UAB_Phi87.....	102
4.5. Efecto <i>in vitro</i> de los fagos.....	105
4.6. Eficacia del cóctel fágico en modelos animales.....	109
4.6.1. Modelo murino.....	109
4.6.2. Modelo <i>Gallus gallus</i>	112
4.7. Respuesta inmunológica frente a la administración fágica.....	126
4.8. Resistencia bacteriana y terapia fágica.....	127
5. Discusión.....	131
5.1. Aislamiento y selección de bacteriófagos de <i>Salmonella</i>	131
5.2. Genómica comparada y caracterización de los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87.....	132
5.3. Idoneidad de los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87 como candidatos para terapia fágica.....	134

5.4. Eficacia del cóctel fágico en terapia.....	136
6. Conclusiones.....	143
7. Bibliografía.....	147
8. Anexo.....	159
9. Agradecimientos.....	167

Índice de Figuras

1. Tipos de infección de <i>S. enterica</i>	3
2. Epidemiología de <i>S. enterica</i>	5
3. Estructura productiva de <i>Gallus gallus</i>	6
4. Procesamiento de los pollos de engorde en los mataderos.....	8
5. Ciclos biológicos de los bacteriófagos.....	14
6. Diagrama del ciclo biológico de los bacteriófagos.....	15
7. Parámetros del ciclo lítico.....	15
8. Diagrama de las fases de empaquetamiento del DNA fágico.....	18
9. Regulación del ciclo lisogénico del bacteriófago P22.....	24
10. Mantenimiento de la lisogenia del bacteriófago P22.....	26
11. Patrones de tamaño de bandas utilizados en electroforesis convencional.....	50
12. Patrones de tamaño de bandas utilizados en PFGE.....	51
13. Detalle de los casetes utilizados en la técnica de inactivación génica en un paso.....	53
14. Representación esquemática de la técnica de inactivación génica en un paso.....	54
15. Cinética de infección de los bacteriófagos C2, C14, C20, C72, C80 y C87 sobre ATCC 14028 y LK5.....	67
16. Patrón de restricción de los fagos C2, C14, C20, C72, C80 y C87.....	68
17. Microfotografía electrónica de los bacteriófagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87.....	69
18. Campo pulsante del DNA de los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87.....	69
19. Determinación de la presencia de secuencias cos en el genoma de los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87.....	71
20. Secuencia consenso de los promotores del fago UAB_Phi20.....	79
21. Secuencia consenso de los RBS del fago UAB_Phi20.....	80
22. Organización génica y modular del genoma del fago UAB_Phi20.....	83
23. Determinación de la posible integración del fago UAB_Phi20 en <i>S. Typhimurium</i>	85
24. Comparación de la arquitectura génica de los fagos UAB_Phi20, P22, ST104 y ST64T.....	88
25. Distancia filogenética de los genomas de los fagos UAB_Phi20, P22, ST104 y ST64T.....	89
26. Secuencia consenso de los promotores del fago UAB_Phi87.....	97
27. Secuencia consenso de los RBS del fago UAB_Phi87.....	98
28. Organización génica y modular del genoma del fago UAB_Phi87.....	103
29. Comparación de la arquitectura génica de los fagos UAB_Phi20, Felix O1, WV8 y SA1.....	104
30. Distancia filogenética de los genomas de los fagos UAB_Phi20, Felix O1, WV8 y SA1.....	105
31. Cinética de infección a 37oC de los fagos UAB_Phi20, UAB_Phi87 y de los cócteles A y B sobre <i>S. Typhimurium</i> y <i>S. Enteritidis</i>	106
32. Cinética de infección de los cócteles A y B sobre <i>S. Vrichow</i> , <i>S. Infantis</i> y <i>S. Hadar</i>	108

33. Cinética de infección a 42°C, con y sin sales biliares, de los cócteles A y B sobre S. Typhimurium y S. Enteritidis.....	109
34. Concentración a lo largo del tiempo de <i>S. enterica</i> en distintos órganos de BALB/C.....	110
35. Efecto del cóctel en las distintas aproximaciones estudiadas en el modelo murino.....	112
36. Colonización de <i>S. Typhimurium</i> UA1872 mediante el método de infección por contacto en pollos White Leghorn.....	114
37. Eficacia del cóctel fágico en la reducción de UA1872 en el ciego de pollos White Leghorn infectados con el método de infección por contacto.....	115
38. Eficacia del cóctel fágico en la reducción de UA1872 en el ciego de pollos White Leghorn, iniciándose el tratamiento fágico un día antes a su infección directa con <i>Salmonella</i>	118
39. Eficacia del cóctel fágico en la reducción de UA1872 en el ciego de pollos White Leghorn, iniciándose el tratamiento fágico un simultáneamente a su infección directa con <i>Salmonella</i>	121
40. Eficacia del cóctel fágico en la reducción de UA1872 en el ciego de pollos White Leghorn tratados <i>ad libitum</i> con el cóctel fágico.....	124

Índice de Tablas

1. Clasificación del género <i>Salmonella</i>	1
2. Prevalencia de <i>S. enterica</i> en manadas de <i>Gallus gallus</i>	10
3. Taxonomía de los bacteriófagos	13
4. Clasificación de los bacteriófagos de <i>Salmonella</i> spp.	27
5. Cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo	40
6. Plásmidos utilizados en el presente trabajo	41
7. Oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo	42
8. Protocolo de supervisión de los experimentos en ratones	56
9. Diseño experimental de los estudios en <i>Gallus gallus</i>	60
10. Patrón de infección de los bacteriófagos aislados	66
11. Parámetros del ciclo lítico de los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87	70
12. Infectividad de los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87 tras su exposición a diferentes pH ..	72
13. Infectividad de los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87 a diferentes temperaturas	73
14. Infectividad de los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87 mantenidos a 4°C	73
15. Análisis comparativo del genoma del fago UAB_Phi20	75
16. Localización de las posibles secuencias promotoras del fago UAB_Phi20	79
17. Uso de codón del fago UAB_Phi20 y de su huésped <i>Salmonella</i>	80
18. Porcentaje de GC en los tripletes del genoma del fago UAB_Phi20 y de su huésped <i>Salmonella</i>	80
19. Posibles terminadores Rho-independientes del fago UAB_Phi20	81
20. Posibles motivos de unión del activador transcripcional C1 en el genoma del fago UAB_Phi20	86
21. Análisis comparativo del genoma del fago UAB_Phi87	90
22. Localización de las posibles secuencias promotoras del fago UAB_Phi87	96
23. Uso de codón del fago UAB_Phi87 y de su huésped <i>Salmonella</i>	98
24. Porcentaje de GC en los tripletes del genoma del fago UAB_Phi87 y de su huésped <i>Salmonella</i>	98
25. Posibles terminadores Rho-independientes del fago UAB_Phi87	99
26. Localización de los tRNAs codificados en el genoma del fago UAB_Phi87	100
27. Reducción de las concentraciones de <i>S. Typhimurium</i> y <i>S. Enteritidis</i> tras la infección con los cócteles A y B	106
28. Detección de UA1872 en hígado, bazo, intestino delgado y muestras cloacales de pollos White Leghorn infectados con el método de infección por contacto	116
29. Concentración fágica en el ciego de pollos White Leghorn infectados con el método de infección por contacto	117

30. Detección de UA1872 en hígado, bazo, intestino delgado y muestras cloacales de pollos White Leghorn iniciándose el tratamiento un día antes a su infección con <i>Salmonella</i>	119
31. Concentración fágica en el ciego de pollos White Leghorn iniciándose el tratamiento un día antes a su infección con <i>Salmonella</i>	120
32. Detección de UA1872 en hígado, bazo, intestino delgado y muestras cloacales de pollos White Leghorn iniciándose el tratamiento simultáneamente a su infección con <i>Salmonella</i>	122
33. Concentración fágica en el ciego de pollos White Leghorn iniciándose el tratamiento simultáneamente a su infección con <i>Salmonella</i>	123
34. Estabilidad del cóctel fágico en agua de red	124
35. Detección de UA1872 en hígado, bazo, intestino delgado y muestras cloacales de pollos White Leghorn tratados ad libitum con el cóctel fágico	125
36. Concentración fágica en el ciego de pollos White Leghorn tratados ad libitum con el cóctel fágico	126

1. Introducción

1.1. *Salmonella*

1.1.1. Características generales

El género *Salmonella* pertenece al filo *Gamma-Proteobacteria* del orden *Enterobacteriales*. Estas bacterias gramnegativas de forma bacilar (0,7 – 1,5 x 2 – 5 µm), se caracterizan por ser oxidasa negativas, no esporuladas, mayormente móviles debido a su flagelación peritrica y anaerobias facultativas. Son bacterias incapaces de metabolizar la lactosa o la sacarosa y la mayoría de las serovariedades producen sulfuro de hidrógeno. Su crecimiento óptimo es a 37°C (mesófilo) y a pH 7,0 (neutrófilo), aunque pueden crecer en el rango de temperatura de 5 a 45 °C y a pH de 4,0 a 9,0 (Ellermeyer and Strauch, 2006). El hábitat de *Salmonella* es el tracto gastrointestinal de los animales, aunque también es posible su aislamiento desde otros ambientes (Mollie *et al.*, 2003). La clasificación de este género está en continua revisión, habiendo sufrido distintas modificaciones a lo largo del tiempo (Brenner *et al.*, 2000). En 1971, Kauffmman estableció la clasificación definitiva del género *Salmonella* basada en el antígeno O del lipopolisacárido (LPS) y en los antígenos flagelar H y capsular Vi. Asimismo, estableció la clasificación de *Salmonella* en subgéneros basándose en características bioquímicas, ampliando así el trabajo realizado por White y generando lo que se conoce como el esquema Kauffmann-White (Kauffmann, 1971), el cual va siendo revisado y actualizado periódicamente (Popoff, 2001). Actualmente, se reconocen tres especies: *Salmonella bongori*, *Salmonella enterica* (dividida en seis subespecies y con más de 2.500 serovariedades) y *Salmonella subterranea*. Esta última fue validada en 2005 después de su descubrimiento por Shelobolina y col. en 2004 (Shelobolina *et al.*, 2004) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación del género *Salmonella*.

Especie	Subespecie	Hábitat
<i>Salmonella bongori</i>	-	Animales de sangre fría y medio ambiente
<i>Salmonella enterica</i>	<i>enterica</i>	Animales de sangre caliente
	<i>salamae</i>	
	<i>arizonae</i>	
	<i>diarizonae</i>	Animales de sangre fría y medio ambiente
	<i>housteane</i>	
	<i>indica</i>	
<i>Salmonella subterranea</i>	-	Medio ambiente

Salmonella presenta un amplio rango de huésped y se caracteriza por ser uno de los principales patógenos zoonóticos causante de grandes pérdidas económicas y de elevado impacto en la salud humana y animal. Durante el año 2008, la salmonelosis fue la segunda infección de origen zoonótico más extendida a nivel europeo, siendo el principal agente patógeno causante de brotes asociados a alimentos (EFSA, 2010). En EE.UU., a excepción de algunos estados donde predomina *Campylobacter*, *Salmonella* es el principal patógeno zoonótico (WHO, 2005).

Introducción

La mayoría de las serovariedades de *Salmonella* son patógenas facultativas intracelulares que colonizan el tracto intestinal y pueden diferenciarse en función de su capacidad infectiva y del huésped al que infectan (Uzzau *et al.*, 2000). Las serovariedades de huésped restringido presentan un cuadro clínico muy grave que puede desencadenar en infecciones sistémicas y, aunque representan una proporción muy pequeña de las serovariedades descritas, en todos los huéspedes de *Salmonella* se conocen serovariedades que causan este tipo de infecciones (Ackers *et al.*, 2000; Boyen *et al.*, 2008). Las serovariedades de amplio espectro de huésped causan infecciones de gravedad limitada y son capaces de colonizar el tracto intestinal de muchos animales sin causar ninguna enfermedad ni sintomatología. No obstante, el sistema inmunitario y una microbiota bien establecida en el tracto intestinal son claves para evitar la morbilidad y mortalidad de estas infecciones (Roy *et al.*, 2001; Milleman *et al.*, 2006).

La vía habitual de entrada de *Salmonella* en el organismo de los animales que infecta es la oral. Tras su ingestión, el primer punto crítico que debe superar esta bacteria es el estómago. Los bajos valores de pH alcanzados en este órgano eliminan a gran parte de las bacterias ingeridas. No obstante, algunas de ellas son capaces de sobrevivir y llegar al íleon, donde inician la colonización del intestino delgado. Seguidamente, *Salmonella* invade el intestino grueso y se acumula en el ciego, lugar donde realmente inicia su proceso infeccioso así como la competencia con la microbiota del huésped (Mastroeni *et al.*, 2004). La invasión del epitelio intestinal empieza a través de los enterocitos o de las células M de las placas de Peyer, las cuales son estructuras linfoides que recubren la mucosa intestinal. Mediante proteínas efectoras codificadas en la isla de patogenicidad 1 (SPI-1), las bacterias invaden y alteran la señalización celular, promoviendo cambios en el citoesqueleto y facilitando la internalización bacteriana (Figura 1). Al llegar a la submucosa intestinal, principalmente los macrófagos y también los neutrófilos y/o las células dendríticas fagocitan a las bacterias. La muerte de los macrófagos, producida por *Salmonella*, provoca la liberación de interleuquinas que, a su vez, originan una reacción inflamatoria (Vázquez-Torres *et al.*, 1999; Mastroeni *et al.*, 2009). A partir de este momento, los dos tipos de infección anteriormente comentados siguen una evolución distinta. Según la serovariedad, el efecto sobre los macrófagos puede ser mayor o menor. Cuanto menor sea este efecto, menor será la respuesta inflamatoria e inmunitaria originada, lo que permitirá la diseminación de *Salmonella* por el torrente sanguíneo hasta los órganos más internos, pudiendo generar una infección sistémica (Figura 1). (Cirillo *et al.*, 1998; Vázquez-Torres *et al.*, 2000). En aquellos casos en los que la muerte inicial de los macrófagos es masiva, se producirá una rápida activación del sistema inmunitario del huésped que permitirá confinar la infección en el intestino, donde la pérdida de la integridad celular del epitelio provocará diarrea mediante un mecanismo exudativo (Figura 1) (Santos *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003).

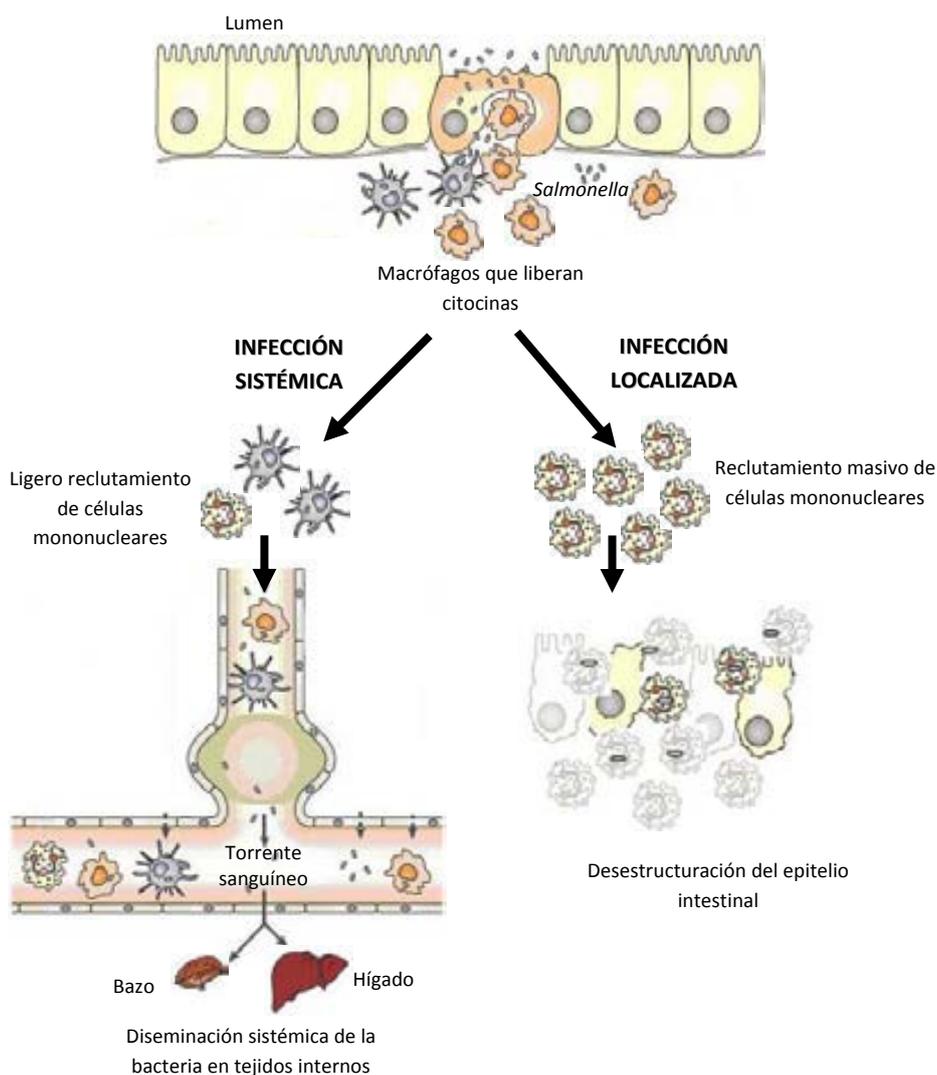


Figura 1. Tipos de infección promovidos por *Salmonella enterica*. La internalización de *Salmonella* a través de las células epiteliales y de las células M de las placa de Peyer prosigue, en el caso de la infección sistémica, con la diseminación del patógeno hacia tejidos internos a través del torrente sanguíneo. En las gastroenteritis la infección queda localizada debido a la rápida respuesta del sistema inmune del huésped (Adaptado de Mastroeni *et al.*, 2009).

1.1.2. La salmonelosis y su impacto

En EE.UU. se estima que se produce una media de 1,41 millones de casos anuales de salmonelosis no tifoideas, lo que implica 168.000 visitas médicas, 15.000 hospitalizaciones y 500 muertes anuales (Voetsch *et al.*, 2004). Durante el año 2009, se confirmaron un total de 108.614 casos de salmonelosis en 27 países de la Unión Europea (UE) (EFSA, 2011). Aunque estos datos sólo incluyen a pacientes que acudieron a los hospitales, significa una disminución del 17,4% respecto al año 2008 (EFSA, 2010). Las cinco serovariedades prevalentes en humanos en la UE fueron *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Virchow* y *S. Newport*. Las dos primeras causaron el 52,3% y el 23,3%,

Introducción

respectivamente, de los casos confirmados, mientras que el conjunto de las otras tres significó casi un 3%, siendo estos valores similares a los del año 2008 (EFSA 2010; EFSA, 2011). A nivel mundial, la serovariedad prevalente continúa siendo *S. Enteritidis*. Sin embargo, cabe mencionar que en EE.UU. *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* presentan, en humanos, una prevalencia muy similar (Figura 2) (WHO, 2005).

La elevada capacidad invasiva de *Salmonella* y la asintomatología de sus infecciones en animales de granja, convierte a estos animales en reservorio de este patógeno y a sus productos en potenciales vehículos de su transmisión. Las principales rutas de transmisión desde estos animales hasta el hombre son el consumo de alimentos contaminados como huevos y productos derivados, carne de pollo, de cerdo y también de vacuno (Miller *et al.*, 2000; White *et al.*, 2001). Es importante mencionar que en diferentes estudios también se ha detectado la presencia de *Salmonella* en vegetales (Barak *et al.*, 2005; Klerks *et al.*, 2007; Franz *et al.*, 2008), lo que los convierte en una fuente de transmisión adicional.

Está ampliamente aceptado que el principal reservorio de *Salmonella* es la producción aviar, concretamente la de *Gallus gallus*. Por ello, mantener sus manadas libres de dicho patógeno ha sido uno de los retos que se ha planteado la UE. A este respecto, debe considerarse que en la estructura productiva de *Gallus gallus* (Figura 3), no todos los niveles tienen la misma importancia económica. Así, cuando más arriba de la pirámide productiva se encuentre la manada afectada, su pérdida o infección será mucho más costosa económicamente, ya que repercutirá en la merma de los niveles inferiores. Por ello, las medidas de vigilancia y control deben ser aplicadas en consonancia con la estructura productiva.

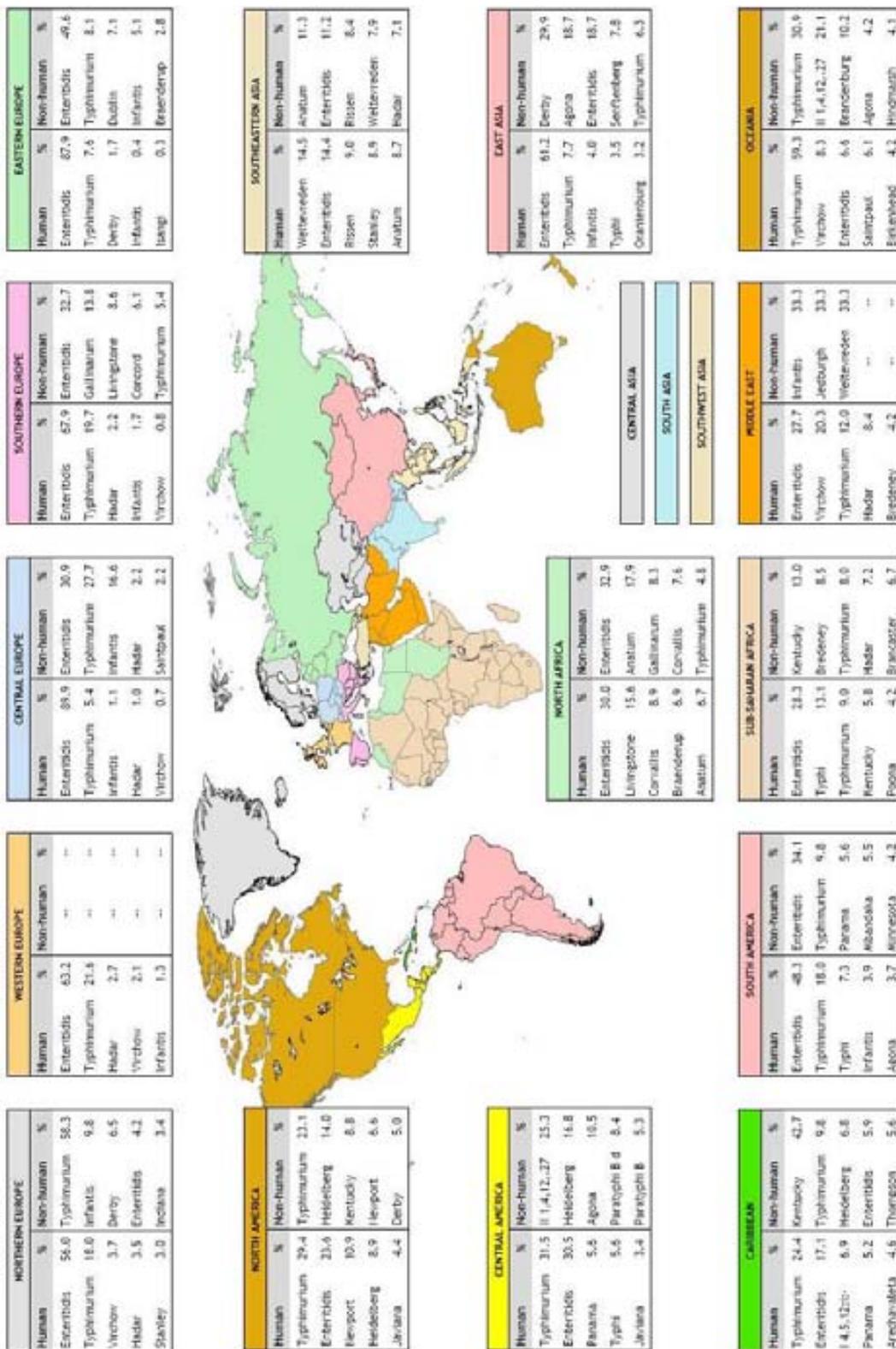


Figura 2. Epidemiología de *Salmonella enterica*. Distribución de las serovariedades predominantes de *S. enterica* a nivel mundial en humanos y animales durante el periodo comprendido entre los años 1995 y 2007 (Adaptado de Hendriksen et al., 2009).



Figura 3. Estructura productiva de las razas comerciales de *Gallus gallus*. La estructura piramidal muestra de forma simplificada la importancia de cada uno de los niveles de las manadas de pollos. Existen dos niveles de progenitores dada la importancia de conservar las manadas.

Para disponer de un mapa de la prevalencia de *Salmonella* en la producción de *Gallus gallus*, se realizaron estudios armonizados en la mayoría de los países de la UE durante los años 2004-2005 en gallinas ponedoras y durante los años 2005-2006 en pollos de engorde (EFSA 2007a; EFSA 2007b). En el primero de ellos se determinó una prevalencia de *Salmonella* en manadas de ponedoras del 30,8%. El 20,4% de los casos confirmados fueron causados por las serovariedades Enteritidis y Typhimurium y el promedio de gallinas infectadas dentro de cada grupo positivo fue del 57% (EFSA, 2007a). En el segundo estudio, la prevalencia de este patógeno fue del 23,7%, detectándose la serovariedad Enteritidis en un 10,9% de los casos mientras que este porcentaje disminuyó al 0,5% para *S. Typhimurium*. Cabe mencionar que este estudio demostró una elevada prevalencia de *Salmonella* dentro de cada manada positiva, ya que en muchos casos la presencia de dicho patógeno se detectó en todos los animales analizados (EFSA, 2007b).

Anualmente, los estados miembros de la UE deben informar sobre la prevalencia de *Salmonella*, si bien las metodologías de muestreo y procedimiento de detección no se estandarizaron hasta enero del 2009. Por ello, los informes anteriores a este año deben considerarse orientativos. La prevalencia del año 2009 en la UE se situó en el 2,3% para las manadas de reproductoras, en el 6,7% para las de ponedoras y en el 5% para los pollos de engorde. En España, estos valores fueron claramente superiores, alcanzándose valores del 6,6%, 29,2% y 6,7%, respectivamente (EFSA, 2011). Como se ha

indicado anteriormente, *Gallus gallus* es la especie aviar sobre la que existe un mayor control acerca de la presencia de *Salmonella*, lo cual se justifica por su elevado consumo y por la importancia de sus productos derivados. No obstante, el pavo, el pato y el ganso, con prevalencias del 7,1%, 22,1% y 11%, respectivamente, también están sometidos a programas de control y vigilancia en la UE (EFSA, 2011).

Es importante destacar el impacto de este patógeno en otros sectores productivos como el porcino o el vacuno. Estudios llevados a cabo en distintos países estiman que entre el 15% y el 23% de los casos de salmonelosis humana son debidos al consumo de carne de cerdo y sus derivados (Borch *et al.*, 1996; Berends *et al.*, 1998). La prevalencia de *Salmonella* en cerdos en la UE oscila entre el 0% y el 38,6%, siendo *S. Typhimurium* la serovariedad que presenta la máxima prevalencia (31,5 %) (EFSA, 2010). Estos datos junto con el elevado consumo de esta carne (Devine, 2003) han promovido el impulso de reglamentos en la UE para el control y seguimiento de *Salmonella* en este sector. Por otra parte, el ganado vacuno portador de *Salmonella* implica también un riesgo ya que este patógeno puede entrar en la cadena alimentaria a través del consumo de su carne y de sus productos derivados, así como de leche y derivados, sobre todo cuando éstos no están pasteurizados (Maguire *et al.*, 1992). En este sentido, en EE.UU. se estima que la presencia de *Salmonella* en manadas de vacas lecheras oscila entre el 27% y el 31%, con una prevalencia a nivel individual del 5,4% (Callaway *et al.*, 2005). Trabajos más recientes indican que la prevalencia en reses se sitúa alrededor del 0,2% en Canadá, del 5,5% en EE.UU. y del 3% en el Reino Unido (Rhoades *et al.*, 2009). Todos estos datos deberán considerarse a la hora de elaborar e implementar programas de control eficaces y sensibles con el propósito de disminuir la carga bacteriana de *Salmonella* en este tipo de animales.

1.1.3. Lucha integral contra *Salmonella*

Las diferentes autoridades reguladoras están promoviendo una actuación integrada en todos los niveles de la cadena alimentaria basándose en el lema “de la granja a la mesa”. Esta política de actuación contempla desde una estricta vigilancia en la granja, seguida de un elevado control sanitario y de higiene en la industria alimentaria, hasta la concienciación de la población sobre la importancia de mantener la cadena de frío y una correcta manipulación de los alimentos para evitar las contaminaciones cruzadas (Anonymous, 2009; Jacob *et al.*, 2009; Schiller, 2009).

Dado que el primer nivel en el que debe basarse este control son las granjas, la implementación de cualquier estrategia no tendrá el efecto esperado si no se aseguran unos mínimos de higiene, buenas prácticas y medidas de bioseguridad (Castellan *et al.*, 2004). La elevada concentración de los animales en los sistemas de producción intensiva puede aumentar su estrés y, consiguientemente, la deposición y suciedad del entorno. Asimismo, la ventilación, la temperatura y los sistemas de bebida pueden interferir en su salud, haciéndolos más susceptibles a la infección (Asakura *et al.*, 2001). En el caso concreto de los pollos de engorde, el riesgo de infección puede incrementarse durante su

Introducción

transporte hasta los mataderos. Los animales son transportados en grandes cantidades dentro de jaulas amontonadas, con el consiguiente estrés y aumento de las deposiciones. Esta situación sumada a la falta de limpieza de las jaulas incrementa de forma significativa el riesgo de infección (Humphrey, 2004).

El matadero es otro punto clave, ya que debido al gran volumen de animales y a su rápido procesamiento, la contaminación cruzada puede ocurrir con mayor facilidad de la deseada (Figura 4).

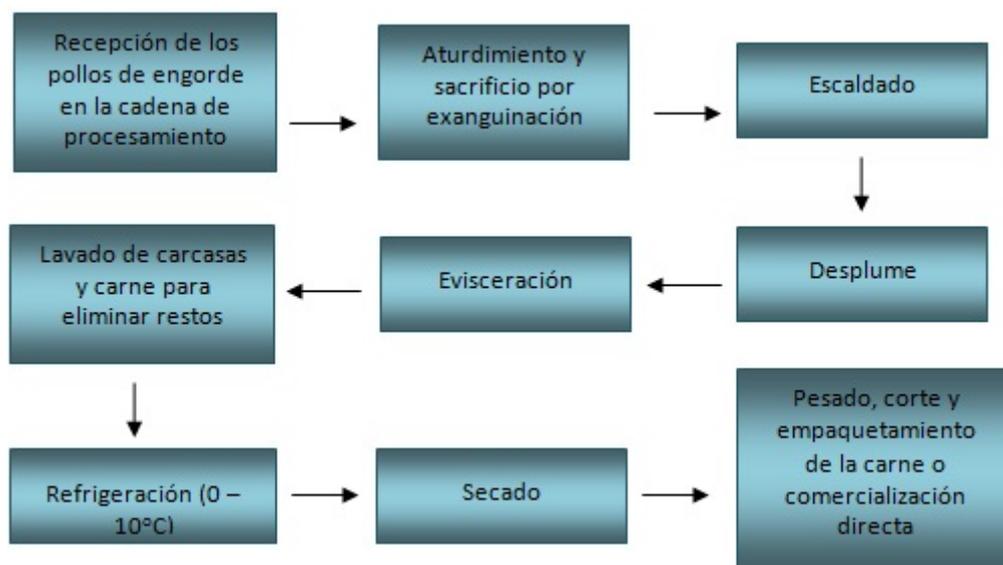


Figura 4. Procesamiento de los pollos de engorde en los mataderos. Los pollos son recogidos de las granjas y transportados en contenedores de plástico o acero. Su recepción en el matadero prosigue con el posicionamiento de los pollos en la cadena de procesamiento. El aturdimiento inicial por choque eléctrico es seguido por la exanguinación de los animales. Los puntos de escaldado y desplume permiten que el proceso de evisceración sea más limpio. Seguidamente la carne y las carcasas pasan por un ciclo de lavado para retirar restos de sangre, plumas, etc. El enfriamiento justo por encima de los 0°C permite eliminar las bacterias manteniendo las propiedades y calidad de la carne. Finalmente, el secado y el procesamiento final para su posterior comercialización, terminan con el procesamiento de la carne en los mataderos.

En estas instalaciones, los puntos más críticos son la fase de escaldado del animal, ya que se acumulan grandes cantidades de materia orgánica en el tanque y la evisceración, donde las heces pueden entrar en contacto con la carne (Refregier-Petton *et al.*, 2003). Todo esto pone de manifiesto la necesidad de controlar y erradicar al máximo los agentes zoonóticos en el animal vivo, previamente a la obtención del alimento (Vandeplas *et al.*, 2010). En este sentido, la actual reglamentación sobre aditivos alimentarios [(EC) No 1176/2006] impide la práctica utilizada anteriormente del uso de antibióticos como agentes preventivos.

Debido a esta situación, la UE emitió en 1992 la primera directiva (92/117/CEE) dirigida a establecer medidas de protección contra determinados agentes zoonóticos. Actualmente, el marco normativo de la UE dirigido al control y la vigilancia de las zoonosis es la directiva 2003/99/CE. Posteriormente,

se han ido implementando distintos reglamentos con el objetivo comunitario de regular y reducir la prevalencia de estos patógenos, en concreto de *Salmonella*. Los principales reglamentos establecidos a tal efecto se indican a continuación:

- i) Los reglamentos (EC) No 2073/2005 y (EC) No 1441/2007 recomiendan normas para el muestreo y la detección de patógenos, así como los límites aceptables en los alimentos.
- ii) El reglamento (EC) No 2160/2003 obliga a los países miembros de la UE a realizar programas de control para las cinco principales serovariedades de *Salmonella* de mayor impacto en el sector avícola (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Virchow* y *S. Hadar*). La aplicación de este reglamento en los distintos niveles de la estructura productiva de *Gallus gallus* ha generado los nuevos reglamentos citados a continuación:
 - a. El reglamento (EC) No 1003/2005, implementado en el 2007, estableció un objetivo de reducción de estas serovariedades al 1% para diciembre del 2009 en las manadas reproductoras de *Gallus gallus*. Los resultados obtenidos muestran que únicamente 18 estados miembros han logrado alcanzar el hito marcado aunque la prevalencia media de estas 5 serovariedades en el conjunto de la UE es del 1,2% (EFSA, 2011).
 - b. En 2008 se implementó el reglamento (EC) No 1168/2006 para gallinas ponedoras en el cual el objetivo anual varía en cada estado miembro en función de la prevalencia obtenida el año anterior. En aquellos países en los que el control de estas manadas esté más avanzado, el hito se sitúa en obtener una prevalencia máxima de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* del 2%.
 - c. El reglamento (EC) No 646/2007 marca como objetivo comunitario alcanzar una prevalencia máxima de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* del 1% en pollos de engorde para el año 2011. El primer año de implementación de este nuevo reglamento fue el 2009, alcanzándose el objetivo marcado en 18 estados miembros (EFSA, 2011).

La aplicación de estas regulaciones, como muestran los valores reportados por la UE, está generando un efecto significativo no únicamente a nivel del control de estas serovariedades sino en la reducción global de *Salmonella* en los distintos estadios productivos de las granjas de *Gallus gallus*. Cabe destacar que estos programas requieren un cierto tiempo de funcionamiento para poder valorar su efectividad (Tabla 2). Claros ejemplos de este hecho son los países nórdicos, los cuales, al llevar más años implementando programas de control contra *Salmonella*, son los que presentan una menor prevalencia (EFSA, 2010; EFSA, 2011).

Actualmente, la medida de control más utilizada para alcanzar los hitos marcados por la UE es la vacunación de las manadas de *Gallus gallus* con cepas de *Salmonella* muertas o atenuadas, práctica especialmente utilizada en gallinas ponedoras así como en las reproductoras. Sin embargo,

Introducción

actualmente la vacunación no es una medida aplicable a pollos de engorde dado su corto periodo de vida (EFSA, 2004).

Tabla 2. Prevalencia de *Salmonella enterica* (%) en las distintas manadas de *Gallus gallus* desde el año 2004 al 2009 a nivel europeo y español (Adaptado de EFSA, 2011).

Manada de <i>Gallus gallus</i>		Año					
		2004	2005	2006	2007	2008	2009
Reproductoras de ponedoras	UE	6,9	6,1	2,2	1,5	1,5	1,7
	España	2,6	10,4	1,5	-	2,2	2,9
Ponedoras	UE	3,2	3,2	4,8	4,3	5,9	6,7
	España	28	-	31,2	27,1	34,9	29,2
Reproductoras de pollos de engorde	UE	4,1	5,4	5,2	1,4	1,5	2,4
	España	10,4	12,5	20,5	2,6	3,7	6,9
Pollos de engorde	UE	4,9	4,1	3,4	3,7	2,8	5,0
	España	15,2	-	41,2	25,3	18,3	6,7

A pesar de las diferentes estrategias comentadas, todavía no se ha conseguido la erradicación de *Salmonella* en el sector aviar ni una reducción adecuada en pollos de engorde. Debe destacarse en este punto que en otros sectores productivos como el porcino o el vacuno, la UE está en fase de recolección de datos sobre la prevalencia de *Salmonella* y aún no se ha implementado ningún programa de control. Esta situación indica que hay una necesidad de incorporar nuevas estrategias en la lucha contra este patógeno. En esta línea, se han propuesto distintas actuaciones respecto a la dieta de los animales, entre las que destacan incrementar el contenido proteico, el aporte de fibra o acidificar el tracto gastrointestinal para dificultar la supervivencia de *Salmonella* y promover la microbiota propia del animal (Hume *et al.*, 1997; Udayamputhoor *et al.*, 2003; Doyle *et al.*, 2006; Van Immerseel *et al.*, 2006; Donalson *et al.*, 2008). Otras estrategias se basan en la estimulación del sistema inmunitario mediante el uso de anticuerpos del propio huevo o en la inmunización con antígenos del patógeno en cuestión (Van't Hof *et al.*, 2001; Schade *et al.*, 2005).

De la misma forma, el uso de prebióticos, que estimulan y benefician la microbiota intestinal dificultando la colonización de *Salmonella*, es otra estrategia ampliamente revisada (Methner *et al.*, 1997; Grizard *et al.*, 1999; Doyle *et al.*, 2006). Asimismo, el uso de bacteriófagos y sus derivados (como los enzibióticos) está reemergiendo como una estrategia prometedora. La comprensión de la biología de los bacteriófagos ha permitido mejorar los resultados de su uso para el control bacteriano, reavivando así su interés y estudio (Sklar *et al.*, 2001; Toro *et al.*, 2005; Atterbury *et al.*, 2007; Filho *et al.*, 2007; Borie *et al.*, 2009).

1.2. Bacteriófagos

1.2.1. Generalidades

Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan a las bacterias y que dependen de sus mecanismos celulares para su multiplicación. Los fagos son los entes más abundantes de la Tierra, con una población estimada de 10^{31} individuos (Hendrix, 2002). Su ubicuidad es ampliamente conocida, habiéndose aislado bacteriófagos en todos los ambientes en los que se han buscado. Hasta la fecha se han identificado fagos que infectan a más de 144 géneros del dominio *Bacteria* y a 10 géneros del dominio *Archaea* (Ackermann, 2003).

La diversidad de los fagos se manifiesta claramente en sus genomas, los cuales pueden tener un tamaño desde 17 hasta 500 kilobases (kb), presentar cualquier tipo de ácido nucleico (DNA o RNA) de cadena sencilla o doble y poseer mecanismos de regulación muy variados. Su diversidad también se constata en su morfología y en el amplio rango de huéspedes a los que pueden infectar (Guttman *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006). El genoma de los bacteriófagos se caracteriza por la elevada compactación de sus genes y por una organización génica en módulos funcionales. Asimismo, es importante destacar que el elevado grado de transferencia horizontal entre bacterias que contienen fagos ha generado que muchos bacteriófagos sean mosaicos génicos (Hendrix *et al.*, 1999; Casjens, 2008).

El descubrimiento de los bacteriófagos se debe a Frederick Twort en 1915 (Twort, 1915) y casi simultáneamente a Felix d'Hérelle en 1917 (d'Hérelle, 1917). D'Hérelle promovió dos vertientes en el estudio de lo que denominó bacteriófagos: una basada en el potencial de estos organismos de matar a las bacterias, abogando así sobre su importancia como agentes terapéuticos antes de la aparición de los antibióticos y la segunda basada en la investigación de la biología de estos virus (Brüssow, 2005). El estudio de la biología de los fagos contribuyó en gran medida al desarrollo de la Biología Molecular en la era pregenómica y, la publicación del genoma completo del bacteriófago Φ X174 (Sanger *et al.*, 1977), significó el inicio de una nueva era. Actualmente, el estudio de los bacteriófagos está centrado no únicamente en el conocimiento de su biología básica, sino también en su uso como antibacterianos.

1.2.2. Taxonomía

Felix d'Hérelle al descubrir estas nuevas entidades partió de la premisa que sólo había un bacteriófago (*Bacteriophagum intestinale*) compuesto por muchas "razas". No obstante, a medida que fueron descubriéndose más bacteriófagos se propuso su subdivisión basándose en su tamaño (en función del tamaño de poro de la membrana con la que se aislaban), rango de huésped, estabilidad y finalmente, gracias a la microscopía electrónica, en su morfología (Summers, 2005).

Introducción

En 1962 Lwoff, Horne y Torunier propusieron un nuevo esquema de clasificación basado en la naturaleza del ácido nucleico y en su morfología. Este sistema fue adoptado en 1965 por el Comité Provisional de Nomenclatura de los Virus (PCNV). Finalmente, en 1977 este comité, tras sucesivas denominaciones, adoptó el nombre de Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) siendo, desde entonces, el organismo que regularmente revisa, aprueba y actualiza la clasificación de los virus, entre ellos los bacteriófagos. El sistema de clasificación actual se basa en el tipo de ácido nucleico del virus, su morfología y su secuencia génica, dando lugar a una clasificación bastante genérica la cual, actualmente, está siendo cuestionada por distintos autores (Lawrence *et al.*, 2002; Proux *et al.*, 2002; Rower *et al.*, 2002).

Desde el año 1959, se han examinado por microscopía electrónica un mínimo de 5.568 bacteriófagos de los cuales el 96,2% son fagos con cola y, por tanto, pertenecen al orden *Caudovirales*, único orden establecido hasta el momento. Los fagos de este orden se caracterizan por presentar DNA de doble cadena, carecer de envuelta y tener simetría binaria, debida a la simetría cúbica de sus cápsides y a la simetría helicoidal de sus colas (Ackermann, 2005). Este orden está subdividido en tres familias las cuales se diferencian entre sí por el tipo de cola que presentan los fagos. La familia *Myoviridae* incluye a los fagos que presentan una cola larga y contráctil y representan aproximadamente el 25% de los fagos de este orden. La familia *Siphoviridae* incluye a aquellos fagos que tienen cola larga no contráctil, constituyendo el 61% de los fagos de este orden y la familia *Podoviridae* a los fagos con cola corta, los cuales significan el 14% restante.

Los 208 fagos restantes de los 5.568 observados presentan morfologías dispares y rangos de huésped muy limitados y se han clasificado en 14 familias y 3 géneros flotantes. Estas familias constituyen grupos filogenéticos independientes e incluyen a fagos que presentan todo tipo de ácido nucleico y morfología (Tabla 3) (Ackermann, 2003; Ackermann, 2007).

Tabla 3. Taxonomía de los bacteriófagos (adaptado de Ackermann, 2007).

Forma	Ácido nucleico	Familia	Número de géneros	Fago tipo	Característica relevante
Con cola	dsDNA lineal	<i>Myoviridae</i> ¹	8	T4	Cola contráctil
		<i>Siphoviridae</i> ¹	9	λ	Cola larga no contráctil
		<i>Podoviridae</i> ¹	6	P22	Cola corta
Polihédrico	ssDNA circular	<i>Microviridae</i>	4	ΦX174	Capsómeros que sobresalen
	dsDNA circular, superhelicoidal	<i>Corticoviridae</i>	1	PM2	Cápside compleja con lípidos
			1 ²	STV1	Forma de torre
	dsDNA circular	<i>Tectiviridae</i>	1	PRD1	Vesícula lipoproteica interna
	dsDNA lineal		1 ²	SH1	Doble cápside
	ssRNA lineal	<i>Leviviridae</i>	2	MS2	Similar al poliovirus
	dsRNA segmentado	<i>Cystoviridae</i>	1	Φ6	Envuelta lipídica
Filamentoso	ssDNA circular	<i>Inoviridae</i>	2	M13	Filamentos largos
	dsDNA lineal	<i>Lipothrixviridae</i>	4	TTV1	Envuelta lipídica
		<i>Rudiviridae</i>	1	SIRV1	Forma de varilla
Pleomórfico	dsDNA circular, superhelicoidal	<i>Plasmaviridae</i>	1	L2	Envuelta lipídica sin cápside
		<i>Fuselloviridae</i>	1	SSV1	Sin cápside y forma de huso
		<i>Guttaviridae</i>	1	SNDV	Forma de gota
	dsDNA circular	<i>Bicaudaviridae</i>	1	ATV	Dos colas
	dsDNA linial	<i>Ampullaviridae</i>	1	ABV	Forma de botella
		<i>Globuloviridae</i>	1	PSV	Esférico con envuelta lipídica
	dsDNA lineal, superhelicoidal		1 ²	His 1	Forma ovalada

¹ Familias que pertenecen al orden *Caudovirales*, ² Géneros flotantes, no clasificados en ninguna de las familias existentes, ds: Doble cadena (*double strand*), ss: Cadena sencilla (*single strand*)

1.2.3. Ciclo biológico

Típicamente, los bacteriófagos pueden dar lugar a dos ciclos biológicos (Figura 5). El denominado ciclo lítico, realizado por bacteriófagos líticos, en el cual se produce la muerte bacteriana y el ciclo lisogénico debido a fagos atemperados o atenuados. En este segundo ciclo, el genoma del fago se mantiene en el cromosoma o en el citoplasma bacteriano en un estado de quiescencia denominado profago. Hasta el momento se conocen tres tipos distintos de establecimiento de la lisogenia: i) inserción del profago en un sitio concreto del cromosoma por reconocimiento de unas determinadas secuencias; ii) inserción en el cromosoma mediante la acción de una transposasa codificada en el genoma vírico y iii) el profago se establece como un plásmido sin integrarse en el cromosoma bacteriano (Campbell, 2006). El profago se mantiene en uno de estos estados, reprimiendo la expresión de casi la totalidad de sus genes y replicándose conjunta o coordinadamente con el cromosoma bacteriano. Aunque el ciclo lisogénico es muy estable, el profago puede inducirse y dar lugar a un ciclo lítico (*genetic switch*) replicando así su genoma y generando nuevos viriones infectivos (Little *et al.*, 1999). La escisión del profago es un punto crítico, ya que debe producirse

Introducción

correctamente para poder formar viriones completos. En determinadas situaciones, esta desintegración no es correcta y se pueden escindir genes del cromosoma bacteriano adyacentes a la zona de integración fágica, de forma que, en el momento en que tenga lugar una nueva infección, estos genes pueden ser introducidos en otras bacterias. Este proceso se denomina transducción especializada y únicamente puede ocurrir tras la infección de una célula bacteriana por fagos atenuados.

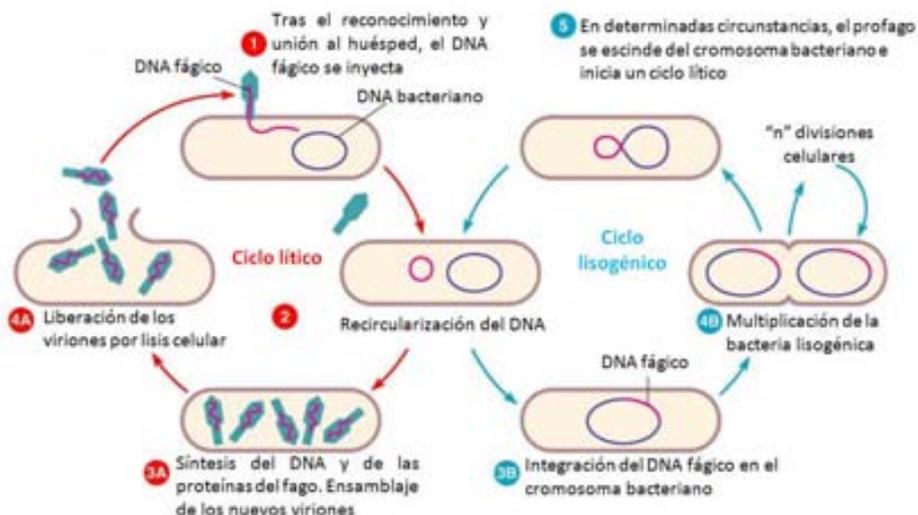


Figura 5. Ciclos biológicos de los bacteriófagos. Tras la inyección del DNA en el citoplasma bacteriano, los bacteriófagos líticos dan lugar a un ciclo lítico, mientras que los atenuados realizan un ciclo lítico o lisogénico.

En toda infección fágica en la que se provoque la muerte celular se distinguen tres fases (Figura 6): adsorción e inyección, multiplicación y lisis. El periodo de tiempo comprendido entre la inyección del DNA y la formación de viriones maduros en el citoplasma bacteriano tras su multiplicación y ensamblaje se conoce como periodo de eclipse (Figura 7). Análogamente, el periodo comprendido desde la inyección del DNA hasta la lisis celular y la consiguiente liberación al medio de las nuevas partículas fágicas corresponde al tiempo de latencia (Figura 7). La diferencia entre la concentración de bacteriófagos detectados antes y después de la lisis bacteriana es el tamaño de explosión y corresponde a la progenie fágica obtenida por bacteria infectada. Todos estos parámetros son específicos de cada fago y dependen del huésped y de las condiciones ambientales (Guttman *et al.*, 2005).

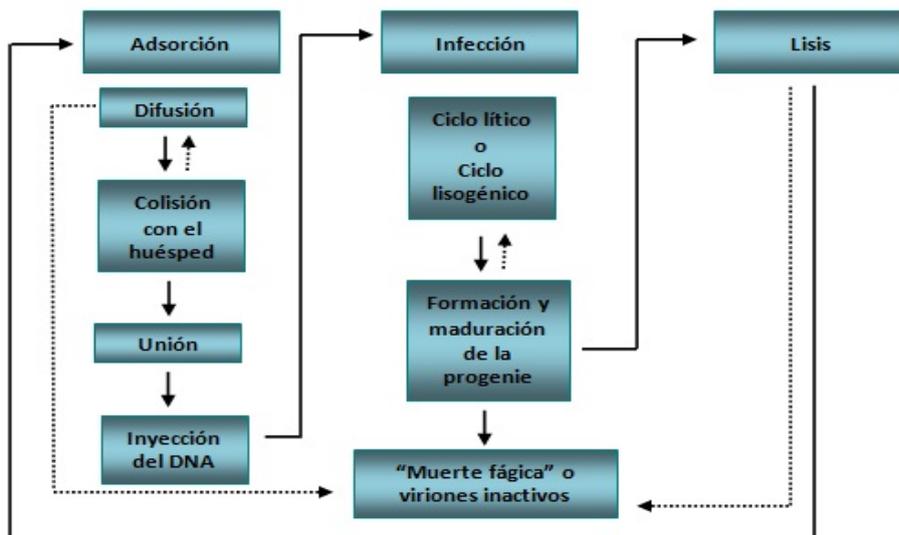


Figura 6. El ciclo biológico de los bacteriófagos engloba tres fases comunes: adsorción, infección y liberación de los nuevos viriones. En el diagrama se muestran estas fases y los principales pasos que pueden darse en cada una de ellas. Las líneas continuas son vías que el bacteriófago debe seguir para completar su ciclo multiplicativo. Las líneas discontinuas son adicionales y pueden ser desventajas para el desarrollo de la progenie fágica. El término de muerte se refiere a la incapacidad del bacteriófago de generar una nueva progenie vírica (adaptado de Abedon, 2006).

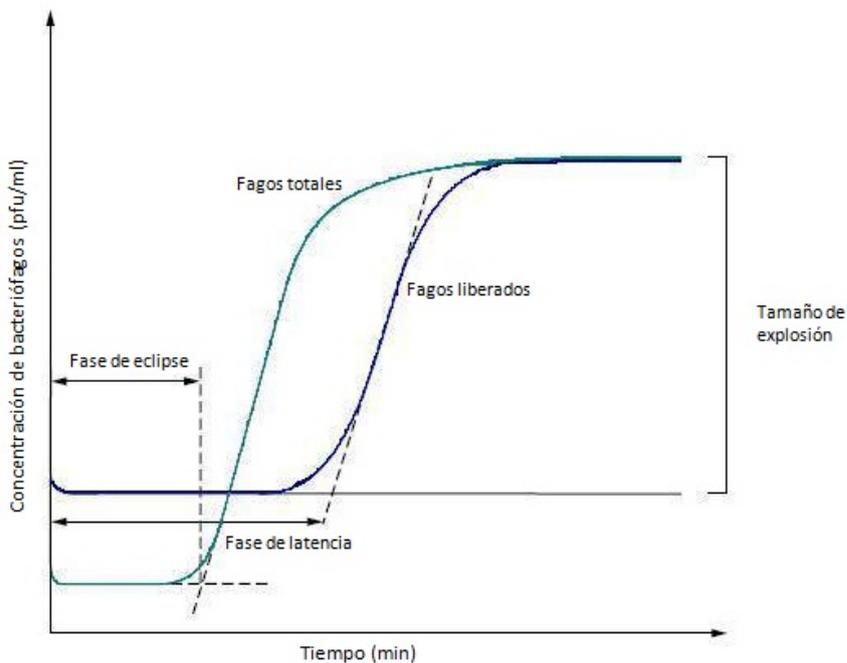


Figura 7. Parámetros del ciclo lítico de los bacteriófagos. Se muestran los tiempos de eclipse y latencia así como el tamaño de explosión del fago.

1.2.3.1. Fase de adsorción e inyección del genoma fágico

El proceso de adsorción se caracteriza por una primera unión reversible entre el fago y la bacteria tras el reconocimiento inicial del receptor de la célula huésped. Seguidamente, la reorganización de la base de la cola permite el correcto posicionamiento del bacteriófago para que la unión entre las proteínas de la cola y el receptor celular sea irreversible (Kutter *et al.*, 2005).

Los bacteriófagos reconocen una amplia gama de receptores y componentes de las envueltas y apéndices de sus huéspedes, hecho que ha dotado a algunos fagos de la capacidad de cambiar sus sitios de reconocimiento o de expresar diferentes adhesinas, permitiéndoles un mayor éxito y flexibilidad para infectar (Abedon *et al.*, 2001; Scholl *et al.*, 2001). Aunque estos entes tengan una elevada afinidad por estos receptores, el proceso de adsorción puede verse alterado por distintos factores ambientales y por el estado fisiológico de la bacteria (Kutter *et al.*, 2005).

Tras el proceso de adsorción, el material genético del fago es inyectado en el citoplasma bacteriano. El genoma fágico se libera de la cápside viral a través del vértice conector o proteína portal (zona de unión entre la cápside y la cola). Su internalización en el citoplasma es posible debido a la formación de un poro en la membrana celular por efecto de las proteínas de la cola y del núcleo interno del fago. Para que este proceso pueda ejecutarse se requiere un aporte energético que, aunque aún no está bien definido, se supone que se consigue por el establecimiento de un potencial electroquímico en la membrana (Goldberg *et al.*, 1994). Diversos estudios apuntan a que la inyección del material genético se produce en dos fases. En la primera, el potencial establecido permite la entrada de una parte del genoma y en la segunda, se finaliza la internalización con la ayuda de las proteínas inyectoras del propio bacteriófago, las cuales no facilitan únicamente este proceso sino que también protegen al material genético de los mecanismos de restricción de la célula huésped (Kutter *et al.*, 2005; Roos *et al.*, 2007).

1.2.3.2. Fase de multiplicación

Una vez inyectado el genoma fágico en el citoplasma bacteriano, el DNA fágico se recirculariza impidiendo su degradación por parte de las exonucleasas bacterianas e inicia el proceso de su replicación. Los mecanismos y requerimientos para la replicación fágica varían en función del fago, no obstante en todos los casos es necesario que inicialmente se transcriban un determinado grupo de genes del genoma fágico para secuestrar y controlar la maquinaria del huésped y redirigirla hacia la replicación del DNA fágico y la síntesis de nuevos viriones.

El inicio de la replicación tiene lugar en una región denominada *ori* (origen de replicación), la cual se caracteriza por contener zonas ricas en AT, lo que permite la separación de las hebras del DNA, y sitios de unión para las proteínas iniciadoras de la replicación (Kutter *et al.*, 2005). El proceso de

replicación comienza en zeta (θ) y posteriormente prosigue en círculo rotatorio, formando así los concatámeros de DNA.

Las terminasas fágicas son las proteínas que se unen al DNA fágico e inician el proceso de translocación o empaquetamiento del DNA. Estas proteínas reconocen unas secuencias determinadas que marcan el inicio y el fin de cada copia del genoma en el concatámero y que permiten el corte del DNA para su posterior translocación. La secuencia reconocida puede ser de repetición única (secuencias *cos*), de repetición no única (secuencias *pac*, las cuales generan redundancia terminal) o secuencias misceláneas (sin una secuencia concreta o con una proteína unida covalentemente) (Fujisawa *et al.*, 1997).

Cuando el sistema de empaquetamiento de un fago se produce por secuencias *cos*, los cortes en el DNA únicamente se generan en las secuencias de reconocimiento. En aquellos fagos en los que el sistema de empaquetamiento se produce por llenado de cápside, una de las terminasas reconoce una de las secuencias *pac* del concatámero de DNA. Tras este reconocimiento inicial y después de producir un corte en una zona próxima a dicha secuencia, el DNA fágico es translocado al interior de la cápside. El segundo corte, y todos los subsiguientes, no dependen de ninguna secuencia concreta sino que están provocados por una señal de llenado de cápside. Este hecho implica que la cantidad de DNA encapsidada sea superior al tamaño del genoma fágico, generando genomas con redundancia terminal. Debe señalarse que, con una frecuencia baja, estas terminasas pueden reconocer secuencias similares a las *pac* en el cromosoma bacteriano, iniciando así su empaquetamiento y dando lugar a viriones que contienen exclusivamente DNA cromosómico, el cual puede ser introducido en otra célula bacteriana al ser infectada por estos viriones. Este proceso de transferencia genética se conoce como transducción generalizada y ha sido descrito tanto en *E. coli* como en *S. enterica*.

La translocación del DNA dentro de la procápside se inicia a través del conector o proteína portal, localizada en el vértice inferior de la procápside (Figura 8). Normalmente, el sistema de empaquetamiento está formado por dos terminasas que forman un complejo. La subunidad pequeña reconoce el material genético y se une a él, mientras que la subunidad mayor se une a la proteína portal y permite la translocación del DNA, cortando cada una de las copias en función de la secuencia reconocida (Catalano *et al.*, 1995). Los motivos de unión a ATP de la subunidad mayor de la terminasa permiten el aporte de energía necesario para que pueda darse el proceso de translocación.

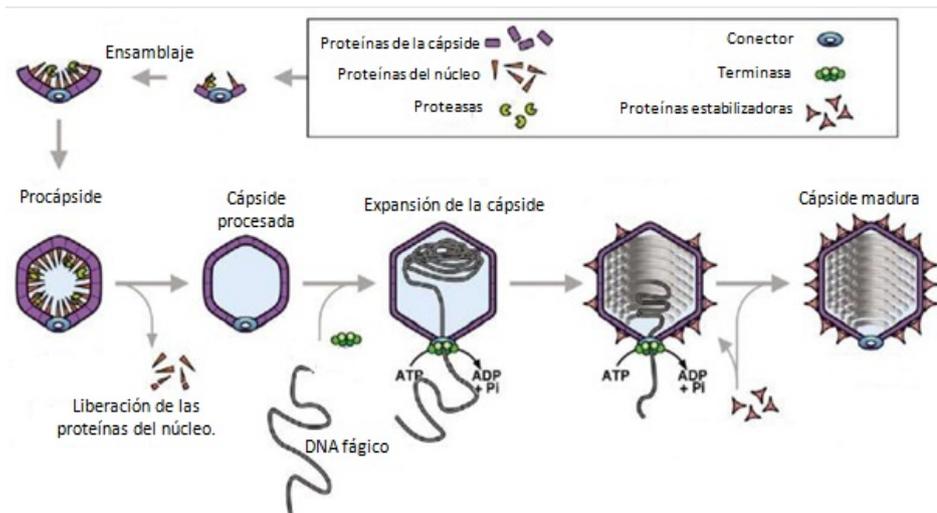


Figura 8. Diagrama de las fases de empaquetamiento del DNA fágico y de maduración de la cápside. La formación de la cápside se inicia con el ensamblaje de las proteínas del núcleo, las cuales son eliminadas una vez se han incorporado todas las proteínas de la cápside. El DNA se une a las terminasas y es empaquetado en la cápside mediante la energía aportada por la hidrólisis del ATP. Tras el empaquetamiento del DNA, la cápside se expande hasta adoptar su tamaño y forma definitiva. Su maduración final permitirá el ensamblaje de la cola con la cápside en la zona conectora (Adaptado de Steven *et al.*, 2005).

Una vez el DNA ha sido completamente empaquetado, la cápside termina su maduración expandiéndose, aproximadamente un 20%, y adoptando su estructura final pasando de circular a polihédrica para acomodar mejor el material genético, el cual se encuentra a unos niveles de condensación similar a los del DNA cristalino (Steven *et al.*, 2005). El proceso termina con el ensamblaje entre la cola y la cápside en la zona conectora y la generación de viriones infectivos (Jardine *et al.*, 2006).

1.2.3.3. Fase de lisis bacteriana

Tras la formación de los viriones maduros, el ciclo lítico termina, en la mayoría de los casos, con la lisis del huésped. En fagos con genomas pequeños, normalmente de DNA o RNA de cadena sencilla, este proceso se debe a la acción de una única proteína sin actividad muraminidasa, pero muy efectiva, que impide la biosíntesis del peptidoglicano bacteriano (Bernhardt *et al.*, 2002). En fagos con DNA de doble cadena, este proceso normalmente se ejerce a través de la actividad de dos proteínas claves que degradan al peptidoglicano: la endolisina y la holina.

La endolisina es una enzima que degrada la pared celular mediante la hidrólisis del peptidoglicano en distintos enlaces, según la actividad propia de cada enzima. Actualmente se conocen cuatro tipos de endolisinas: i) muraminidasa que rompe los enlaces glicosídicos 1,4 de la mureína, ii) transglicosilasa que rompe los mismo enlaces y genera un producto cíclico, iii) amidasa que hidroliza los enlaces

amida y iv) endopeptidasa que actúa a nivel de los enlaces peptídicos. En algunos bacteriófagos es posible encontrar varias endolisinas con diferentes actividades (Young *et al.*, 2006). Dado que la función de estas proteínas es la degradación de la pared celular, es crítico que puedan acceder a ella siendo por ello necesario la acción de las holinas.

Las holinas son pequeñas proteínas de membrana encargadas de determinar en qué momento debe producirse la lisis, ya que permiten el acceso de las endolisinas al peptidoglicano. Aunque su funcionamiento no está bien caracterizado ni definido, su acumulación en la membrana citoplasmática de la bacteria parece un punto clave para su acción. Se hipotetiza que en un momento dado estas proteínas forman poros en la membrana citoplasmática facilitando que las endolisinas la atraviesen y puedan alcanzar su diana (Wang *et al.*, 2000; Bernhardt *et al.*, 2002).

El proceso de lisis implica un equilibrio entre maximizar la productividad fágica por ciclo infectivo y minimizar el tiempo de generación. En este sentido, se hipotetiza que cuando mayor sea la concentración de huésped potencial en el entorno, la adsorción fágica se verá claramente favorecida. Por ello, y de forma natural, se seleccionarán aquellos fagos que presenten periodos de eclipse menores y, consiguientemente, productividades fágicas menores. Aunque no se obtenga una gran productividad fágica por ciclo, al disminuir el tiempo del ciclo multiplicativo del fago se podrán realizar más ciclos infectivos incrementando así la productividad fágica total. Análogamente, en aquellos entornos en los que la concentración de huésped sea menor, el proceso de adsorción y el inicio de un ciclo infectivo serán más costosos, seleccionándose así aquellos fagos que posean un mayor tiempo de eclipse para poder maximizar la productividad fágica de cada ciclo infectivo y, consiguientemente, la productividad fágica total (Wang *et al.*, 1996; Abedon, 2005). Por tanto, el correcto funcionamiento de las proteínas implicadas en la lisis bacteriana y su sincronización con el estado de madurez de los viriones y el entorno parecen factores claves para la consecución de un ciclo infectivo exitoso. A este respecto, se ha descrito que el fago T4 dispone de un mecanismo de inhibición de la lisis celular que actúa cuando hay demasiados fagos libres en el medio o cuando hay pocas células huésped en el entorno. Los genes relacionados con este proceso son los genes *r*, reguladores de la síntesis de la holina. No obstante, el mecanismo de acción aún no es conocido (Miller *et al.*, 2003). En el fago Lambda esta regulación está mediada por la existencia de una antiholina. Ambas proteínas (holina y antiholina) están codificadas en el mismo gen, pero la expresión de una u otra depende del codón de inicio de traducción. Así, respecto a la holina S-105 de 105 aminoácidos, la antiholina contiene dos codones de carácter básico adicionales en su extremo N-terminal. Este hecho provoca que la holina preferiblemente forme dímeros con la antiholina antes que con otra molécula de holina, lo que implica una disminución de su concentración y, consiguientemente, un mayor tiempo de lisis (Young *et al.*, 2006).

1.2.4. Organización genómica

Los principales mecanismos de regulación del ciclo biológico de los bacteriófagos se producen a nivel transcripcional. Así, para que ocurran los sucesos comentados anteriormente, se requiere la expresión de los genes fágicos, los cuales pueden dividirse en tres grandes bloques según su expresión temporal:

- i) Genes de expresión temprana (*early*), los cuales están implicados en la reestructuración de la maquinaria del huésped para su posterior utilización. Adicionalmente, protegen al genoma fágico de los mecanismos de restricción bacterianos e impiden o dificultan la infección del huésped por un fago similar (exclusión de la superinfección).
- ii) Genes de expresión intermedia (*middle*) que permiten el inicio de la replicación del genoma fágico así como la continuación de la transcripción del mismo.
- iii) Genes de expresión tardía (*late*). Este gran bloque puede subdividirse en tres grupos. El primero de ellos contiene los genes que codifican las proteínas implicadas en la morfogénesis de la cápside. El segundo incluye a aquellos genes que son necesarios para la formación de las colas y el último comprende a los genes relacionados con la lisis celular.

1.2.5. Bacteriófagos líticos: el bacteriófago T4

Entre los fagos líticos de las bacterias gramnegativas, el bacteriófago T4 es uno de los más estudiados. Seguidamente se exponen brevemente sus principales características y su ciclo multiplicativo.

1.2.5.1. Características generales

El bacteriófago T4 pertenece a la familia *Myoviridae* y su huésped es *E. coli*. La principal característica que diferencia a este fago y a todos sus derivados (tipo T4) de otros fagos virulentos como el T7, es el tamaño de su genoma (168.903 pb), el cual presenta una redundancia terminal próxima al 3%. Se han identificado en su genoma 299 genes, 289 de los cuales codifican proteínas, 8 tRNAs y 2 RNA de pequeño tamaño (*small RNA*) de función desconocida. Otra característica destacable de los bacteriófagos tipo T4 es que presentan el nucleótido hidroximetilcitosina (HMC) en lugar de citosina, hecho que les confiere una protección extra frente a los mecanismos de restricción del huésped (Miller *et al.*, 2003).

1.2.5.2. Adsorción e inyección del DNA

Al menos tres de las seis fibras de la cola del T4 son las encargadas del primer reconocimiento de los receptores del huésped y de la unión reversible del fago a los residuos de glucosa del lipopolisacárido de *E. coli*. Posteriormente, la base de la cola experimenta un cambio conformacional y de

posicionamiento lo cual, junto con su contracción, induce su unión irreversible a los residuos del núcleo del lipopolisacárido (Goldberg *et al.*, 1994). Mediante la acción de la lisozima codificada en una de las proteínas de la cola, el peptidoglicano bacteriano va siendo digerido, abriéndose un canal que facilitará la posterior inyección del DNA en el citoplasma bacteriano (Mosig *et al.*, 1989).

1.2.5.3. Ciclo multiplicativo

En todo su ciclo lítico, el fago T4 utiliza la maquinaria de transcripción de su huésped para lo cual modifica la RNA polimerasa bacteriana (RNAPol) de forma que ésta reconozca los promotores fágicos. Otros fagos líticos como el T7, disponen de sus propias RNAPol, las cuales presentan una mayor especificidad resultando, por tanto, más eficaces (Kutter *et al.*, 2005).

La expresión de los genes de cada uno de los tres grandes módulos de su genoma (temprano, intermedio y tardío) depende de una serie de modificaciones en cascada en el complejo de la RNAPol. En la expresión de los genes tempranos es imprescindible la acción de los genes *alc*, *alt*, *modA* y *modB* para que se favorezca su transcripción. La proteína Alc, inyectada conjuntamente con el DNA fágico, modifica la RNAPol del huésped para que ésta deje de transcribir DNA que contenga citosinas. La posterior síntesis de las proteínas Alt, ModA y ModB modifica la subunidad α del complejo multienzimático con el fin de incrementar la eficiencia del proceso de transcripción. Todo ello, unido al hecho de que los promotores de los genes de expresión temprana presentan secuencias de reconocimiento más fuertes que las del propio huésped, permite una rápida transición hacia la transcripción del genoma fágico.

Para la transcripción de los genes de expresión intermedia es necesario modificar de nuevo el complejo de la RNAPol del huésped. Para ello, es imprescindible la expresión de los genes *asiA* y *motA*. La proteína AsiA es un factor anti- σ que inhibe el reconocimiento de los promotores del huésped y estimula la transcripción de los genes del propio fago, mientras que la proteína MotA se une a unas secuencias específicas en los promotores de los genes de expresión intermedia facilitando su reconocimiento y activación transcripcional (Hinton *et al.*, 1996). La transcripción de dichos genes es necesaria para la síntesis de las proteínas de replicación y de las proteínas gp55 y gp33, las cuales producen las últimas modificaciones del complejo de la RNAPol del huésped. La proteína gp55 codifica el factor σ_{55} que permite el reconocimiento de los promotores fágicos de expresión tardía y la proteína gp33 es un coactivador que facilita la interacción de la RNAPol con dichos promotores. Ambas proteínas, juntamente con una serie de proteínas que interaccionan con los diferentes factores σ de la bacteria, inician la transcripción de los genes de este último módulo, con la consiguiente formación de la cápside, la cola y la expresión de los genes de lisis (Williams *et al.*, 1994). La elevada similitud de las secuencias de unión al ribosoma (RBS) y las modificaciones del complejo traduccional aceleran todo este proceso de traducción (Miller *et al.*, 2003).

La replicación del genoma de los fagos tipo T4 tiene lugar simultáneamente con la transcripción de los genes de expresión tardía. El fago codifica su propio replisoma, constituido por la conjunción de siete proteínas. Aunque estos fagos disponen de más de un origen de replicación, la primera ronda siempre se inicia únicamente en uno de ellos (Miller *et al.*, 2003).

1.2.5.4. Ensamblaje de los nuevos viriones y empaquetamiento del DNA

Más del 40% de la información genética de los fagos tipo T4 codifica las proteínas implicadas en la síntesis y el ensamblaje de cápsides, colas y fibras de la cola (Miller *et al.*, 2003). La morfogénesis de la cápside está dirigida por 24 proteínas distintas: 16 de ellas intervienen en la formación de la procápside y su maduración, 5 están involucradas en el empaquetamiento del DNA y las 3 restantes en la estabilización de la cápside después del empaquetamiento del DNA. A diferencia de otros fagos, T4 únicamente precisa de la proteína GroEL del huésped para el ensamblaje de sus cápsides.

La cola contráctil de este fago se compone de dos proteínas que forman dos co-cilindros, uno interno y otro externo. La cola se une a la base formada por otras 6 proteínas que constituirán las 6 fibras de reconocimiento, entre ellas la que tiene actividad lisozima (gp5). Todo este proceso de morfogénesis implica la intervención de 22 proteínas (Mosig *et al.*, 2006). El ensamblaje final termina cuando la cola, completamente formada, se une a la zona del conector de la cápside. Durante un ciclo infeccioso se libera una progenie de entre 100 y 150 viriones por célula infectada (Miller *et al.*, 2003).

1.2.6. Fagos atenuados: el bacteriófago P22

El fago P22 pertenece a la familia *Podoviridae*, su huésped es *Salmonella* y ha sido extensamente estudiado. Seguidamente se presentan sus principales características y su ciclo biológico.

1.2.6.1. Características generales

El genoma de P22 contiene 41.724 pb, ha sido secuenciado y se han anotado hasta 65 genes (Casjens *et al.*, 1989; Vander *et al.*, 2000; Pedulla *et al.*, 2003). El análisis de su secuencia ha revelado la naturaleza mosaica de la misma, producto de diferentes sucesos de recombinación entre distintos virus (Prevelige, 2006), así como su estructura modular. El DNA de P22 presenta redundancia terminal, lo que implica que el tamaño del DNA empaquetado en las cápsides sea del 102 al 104% de su genoma (Rhoades *et al.*, 1968).

1.2.6.2. Adsorción e inyección del DNA

La cola de P22 presenta seis fibras, estando cada una de ellas formada por trímeros de la proteína Gp9 unidas a un corto cilindro integrado por las proteínas Gp4, Gp10 y Gp26. El reconocimiento y unión del fago a su huésped es posible gracias a la interacción de una de las fibras con el extremo del antígeno O del lipopolisacárido de los serotipos A, B y D1. Tras esta unión inicial, la actividad

hidrolítica de la proteína Gp9 permite la digestión de la cadena O hidrolizando el enlace ramnosil-galactosa, hecho que permite la difusión del fago hacia el interior de la pared bacteriana. Esta internalización promueve la unión de las otras fibras de la cola, bastando un mínimo de tres uniones para orientar adecuadamente al fago e iniciar así la unión irreversible tras la cual y mediante el efecto de las proteínas inyectoras, se forma un poro en la membrana citoplasmática que permite la inyección del DNA fágico (Israel, 1976; Baxa, 1996).

1.2.6.3. Ciclo multiplicativo

Después de la inyección y recircularización del genoma fágico por recombinación entre las secuencias redundantes de sus extremos, el fago P22 puede iniciar un ciclo lítico o un ciclo lisogénico. La decisión depende tanto de la multiplicidad de infección (MOI) como del estado fisiológico del huésped. Ambos hechos provocarán que se sobreexpresen unos determinados genes del fago mientras que otros serán reprimidos (Prevelige, 2006).

El establecimiento de uno u otro ciclo depende de la concentración relativa de las proteínas antagonistas Cro y C2 del fago. Ambas proteínas pueden autoregularse y sus promotores se encuentran en una misma región operadora con tres sitios de unión, los cuales presentan afinidades inversas para cada una de las dos proteínas. Así, la afinidad de C2, represor del ciclo lítico, es mayor para el sitio OR1, donde se encuentra el promotor de *cro* (P_R). La unión de C2 a dicho promotor impide la síntesis de Cro. Adicionalmente, una vez C2 se ha unido a OR1, la afinidad por OR2 incrementa y termina uniéndose también a este sitio. Esta unión cooperativa permite incrementar el reconocimiento del promotor de C2 (P_{RM}) por parte de la RNA pol del huésped, aumentando así la síntesis de la proteína C2 y promoviendo la lisogenia. Por el contrario, la afinidad de Cro, antirepresor del ciclo lítico, es mayor por OR3, donde se localiza el promotor de *c2* (P_{RM}). La unión de Cro a este promotor impide la síntesis del represor C2 y permite el establecimiento del ciclo lítico.

1.2.6.3.1. Establecimiento del ciclo lisogénico

Tras la internalización y recircularización del DNA de P22 se inicia la transcripción de los primeros genes de expresión temprana. A partir del promotor P_R se transcriben los genes *cro* y *c1* (factor de transcripción activador de *c2* y equivalente al *cII* del fago lambda), mientras que los genes *gp24* (análogo al antiterminador N de lambda) y *c3* (gen regulador y activador de *c2* y equivalente al *cIII* del fago lambda) se transcriben a partir del promotor P_L (Figura 9).

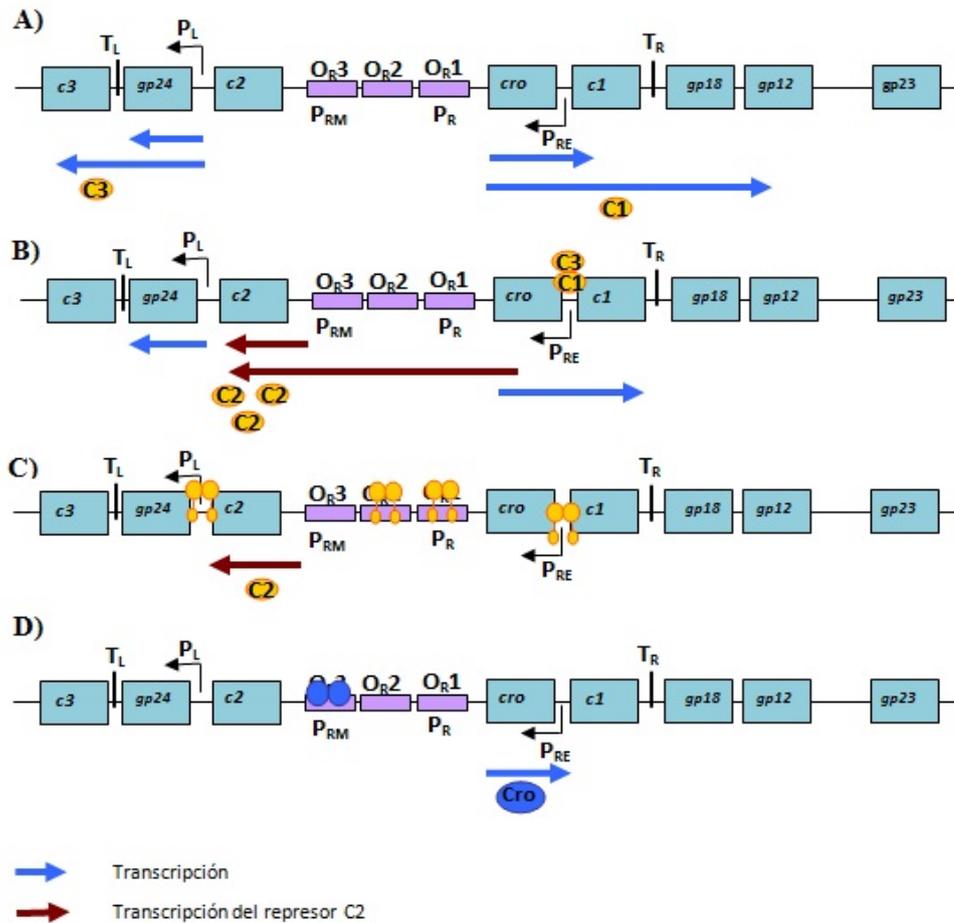


Figura 9. Regulación del ciclo lisogénico del bacteriófago P22. (A) Organización de la región de inicio de transcripción tras la inyección del DNA fágico en el citoplasma bacteriano. La transcripción se inicia desde los promotores *P_L* y *P_R*, respectivamente. (B) Las proteínas C1 y C3 se unen al promotor *P_{RE}* el cual inicia la transcripción del represor C2. C2 se sobreexpresa a partir del promotor propio *P_{RM}* localizado en la región operadora *O_{R3}*. (C) Elevadas cantidades de C2 bloquean la transcripción a partir de los promotores *P_L*, *P_R* y *P_{RE}*, silenciando toda transcripción génica. (D) La inducción del profago implica una disminución de los niveles de C2 y la subsiguiente expresión de los genes fágicos intermedios y tardíos. La síntesis de Cro, permite el bloqueo del promotor del gen *c2*, permitiendo así el avance del ciclo lítico.

Las proteínas C1 y C3 reconocen el promotor *P_{RE}* que activa la síntesis del represor C2. Éste se une a los promotores *P_R* y *P_L*, reprimiendo así la síntesis del resto de genes y manteniendo su nivel de transcripción desde el promotor de mantenimiento *P_{RM}*, dando lugar a un ciclo lisogénico. La transcripción basal de la integrasa antes de la represión permite la integración del fago en el genoma bacteriano. Adicionalmente, la proteína C1 reconoce la secuencia TTGN₆TTGC en la región -35 de un promotor adicional (PI) del gen que codifica la integrasa y del promotor de un RNA antisentido del gen *gp23*, el cual es un antiterminador que permite la expresión de los genes de expresión tardía.

Todo ello permite la integración del fago en el genoma bacteriano y bloquea la expresión de los genes tardíos.

El DNA del bacteriófago P22 se integra en el cromosoma bacteriano por recombinación homóloga entre una determinada secuencia de 15 pb del cromosoma bacteriano (*attB*) y una secuencia del DNA fágico (*attP*). Este proceso es asistido por los factores IHF (*integration host factors*) del huésped que permiten una mayor compactación del DNA, facilitando el proceso de recombinación. Tras el establecimiento del estado de profago, el gen *int* es silenciado.

1.2.6.3.2. Mantenimiento de la lisogenia

Adicionalmente, y a diferencia del fago lambda, el fago P22 dispone de un segundo represor codificado en el gen *mnt* que está involucrado en el mantenimiento del ciclo lisogénico. Su papel consiste en reprimir la expresión del gen *ant*, el cual codifica una proteína antirepresora del ciclo lisogénico que se une al represor C2. La proteína Mnt, conjuntamente con la proteína Arc, se une a la zona promotora de *ant* impidiendo su síntesis y permitiendo el mantenimiento de la lisogenia (Figura 10) (Susskind *et al.*, 1978).

1.2.6.3.3. Establecimiento del ciclo lítico

El ciclo lítico de P22 se debe a la pérdida de la represión génica ejercida por C2 (Figura 9, panel D) o bien se produce tras la infección si la proteína Cro impide la síntesis del represor C2. En cualquier caso, la ausencia de C2 permite la síntesis de los antiterminadores Gp24 (o antiterminador N) y Gp23 (o antiterminador Q), lo cual permitirá modificar el complejo de la RNAPol para que se produzca la transcripción de los genes de expresión intermedia y tardía, respectivamente, y se produzca un ciclo lítico productivo.

La replicación del genoma fágico se inicia cuando la primasa Gp18 (análoga a la proteína O del fago λ) reconoce y se une a la región *OriC*, reclutando a la helicasa Gp12 (análoga a la proteína P de los fagos lambdaoides), a la helicasa DnaB del huésped y al resto de componentes del complejo de replicación o replisoma del huésped (Dodson *et al.*, 1989). El proceso de replicación se inicia bidireccionalmente en forma *theta* (θ) y termina en círculo rotatorio, generando los concatámeros de DNA (Baranska *et al.*, 2001).

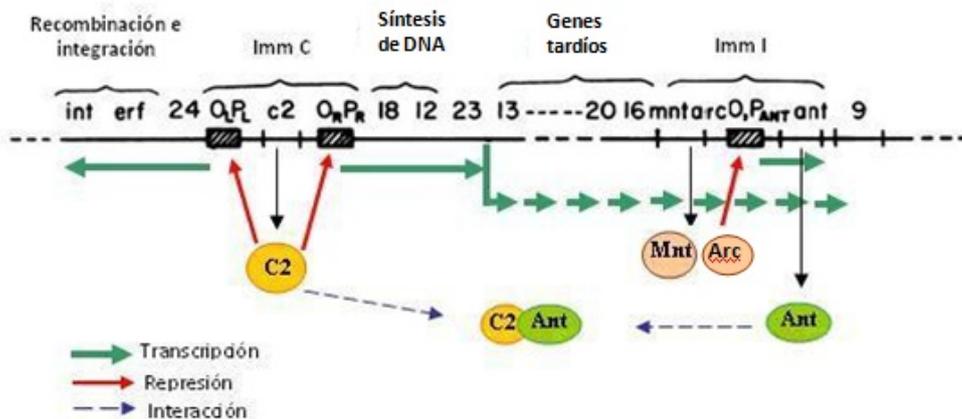


Figura 10. Mantenimiento de la lisogenia en el bacteriófago P22. El mantenimiento del ciclo lisogénico, establecido inicialmente por C2, se produce mediante el efecto de las proteínas Mnt y Arc, las cuales se unen a la zona promotora del gen antirepresor *ant*, impidiendo su transcripción. Cuando la proteína Ant está presente en el sistema se une a C2, impidiendo que el represor C2 pueda reprimir los promotores P_R y P_L (adaptado de Susskind *et al.*, 1978).

1.2.6.4. Ensamblaje de los nuevos viriones y empaquetamiento del DNA

La cápside del fago P22 está formada por 300 copias de la proteína Gp8, que forma el andamiaje inicial y por 420 copias de la proteína de la envuelta Gp5. Durante el ensamblaje, uno de los vértices se diferencia del resto debido a la presencia de la proteína portal Gp1, correspondiente a la zona conectora. Después de la translocación del DNA por parte de las terminasas, la cápside se expande un 10% de su tamaño inicial y adopta una forma más angular. Su formación termina con la incorporación de la proteína estabilizadora Gp14 y con la adición final de la cola. El ensamblaje de la cola, independiente del de la cápside, se basa en la trimerización de su principal proteína (Gp9) y la posterior unión con tres proteínas asociadas a ella (Gp4, Gp10 y Gp26). El proceso termina con su anclaje en el vértice de la zona portal (Prevelige, 2006).

1.2.7. Arsenal fágico de *Salmonella*

Las bacterias del género *Salmonella* se caracterizan por contener profagos o fagos defectivos en su cromosoma. Se estima que los profagos representan entre el 4% y el 6% del genoma de este género. Así, determinadas cepas de *S. Typhimurium* contienen entre cuatro y cinco profagos en su genoma, mientras que cepas de la serovariedad Typhi pueden llegar a tener hasta siete (Thomson *et al.*, 2004). Las ventajas que supone esta carga extra en el genoma de la bacteria son claras y diversas. En primera instancia, algunos de los profagos pueden codificar genes de virulencia, como los profagos Gifsy, Fels-1 y SopEΦ, los cuales confieren a las bacterias una mayor capacidad infectiva (Bossi *et al.*, 2005). En segundo lugar, el hecho de contener profagos impide la infección y la lisis de estas

bacterias por fagos relacionados, debido al proceso de exclusión de la superinfección. Finalmente, los fagos pueden contener genes de los cromosomas bacterianos y promover, mediante transducción generalizada o especializada, el intercambio de material genético entre bacterias, contribuyendo así a su diversidad y evolución (Thomson *et al.*, 2004).

Hasta el año 2005, el número de fagos específicos de *Salmonella* identificados y clasificados ascendía a unos 172. Aunque no todos estos fagos han sido secuenciados, su observación mediante microscopía electrónica permite clasificarlos en el orden *Caudovirales*, perteneciendo 44 de ellos a la familia *Myoviridae*, 65 a la *Siphoviridae* y 63 a la *Podoviridae*. Dado que la clasificación de los fagos atendiendo únicamente a su morfología es poco rigurosa, Kropinski y col. (Kropinski *et al.*, 2007) llevaron a cabo un estudio comparativo del proteoma de los fagos secuenciados, basándose en criterios establecidos previamente (Rower *et al.*, 2002). Este análisis ha permitido la clasificación de los fagos en los siguientes grupos: fagos tipo P27, tipo P2, tipo Lambda (λ), tipo P22 y tipo SP6, así como los fagos ϵ 15, KS7 y Felix O1, los cuales no pueden incluirse en ninguno de los grupos mencionados (Kropinski *et al.*, 2007)

En el año 2008 la clasificación anterior se amplió a 11 grupos tras estudiarse los fagos SETP3, H8, ES18 y Det7 (Casjens, 2008). El primero de ellos, perteneciente a la familia *Siphoviridae*, formó un nuevo grupo junto con el fago KS7 mientras que los otros tres restantes formaron grupos individuales ya que no pudieron incluirse en ninguno de los grupos definidos anteriormente (Tabla 4).

Tabla 4. Clasificación de los distintos subgrupos de bacteriófagos secuenciados de *Salmonella* spp. (Adaptado de Casjens, 2008).

Familia	Grupo	Fagos representantes	Perfil
<i>Myoviridae</i>		Felix O1	Lítico
		Det7	Lítico
	Tipo P27	ST64B	Atenuado
	Tipo P2	Fels-2/SopE ϕ /PsP3	Atenuado
<i>Siphoviridae</i>		KS7/SETP3	Lítico
		H8	Lítico
		ES18	Atenuado
	Tipo λ	Fels-1/Gifsy-1/Gifsy-2	Atenuado
<i>Podoviridae</i>	Tipo SP6	SP6	Lítico
	Tipo P22	P22/ST64T/HK620/ST104/ ϵ 34	Atenuado
		ϵ 15	Atenuado

El conocimiento actual de los bacteriófagos de *Salmonella* indica una clara predominancia de fagos atenuados, conociéndose por ello más fagos de este tipo y siendo más propicio su aislamiento. El

Introducción

fago lítico por excelencia del género *Salmonella* es el fago Felix O1, descrito en los años 40 (Felix *et al.*, 1943) y secuenciado en el año 2000 (Whichard *et al.*, 2000). Dicho fago posee un amplio rango de huésped ya que su lugar de adsorción es el núcleo del lipopolisacárido. Seguramente por ello es capaz de lisar al 99% de las cepas sobre las que ha sido probado (Kallings, 1967). Este hecho ha conllevado que Felix O1 fuera el fago elegido en los primeros estudios de terapia fágica contra *Salmonella*, tras el resurgimiento del interés por esta estrategia (Sklar, *et al.*, 2001).

1.3. Terapia fágica

1.3.1. Características generales

La capacidad de los bacteriófagos de lisar a sus huéspedes, su amplia distribución y su elevada especificidad hacen que estas entidades biológicas hayan sido propuestas como herramientas de control de la población bacteriana. D'Herelle ya abogó acerca del uso de los fagos como agentes antimicrobianos. De hecho, tras su descubrimiento, la terapia fágica fue utilizada en EE.UU., Europa y en la antigua URSS (Brüssow, 2005). Sin embargo, el escaso conocimiento de la biología de los fagos, la falta de resultados concluyentes y el descubrimiento de los antibióticos hicieron que tanto en Europa occidental como en EE.UU. se abandonara esta estrategia (Merril *et al.*, 2006). En cambio se mantuvo en Europa Oriental y, si bien no se dispone de mucha bibliografía al respecto, destacan los trabajos del Eliava Institute of Bacteriophage, Microbiology and Virology en Georgia, los cuales han contribuido especialmente al desarrollo de técnicas para la obtención, purificación y selección de bacteriófagos y presentan un claro ejemplo del potencial de la terapia fágica como muestran sus productos comercializados (Hanlon, 2007).

Actualmente, el incremento de cepas multiresistentes a los antibióticos, la dificultad de obtención de nuevos antibióticos y la restricción de su uso en nutrición animal, ha dinamizado la búsqueda de estrategias alternativas o adicionales para el control de los patógenos bacterianos. En este contexto y a partir de los estudios de Smith y Huggins (1982, 1983), el interés y el potencial de la terapia fágica renacieron con fuerza en EE.UU. y Europa Occidental.

La terapia fágica es una estrategia, basada en productos naturales, que presenta numerosas ventajas, pero también algunos inconvenientes que deben ser seriamente considerados (Skurnik *et al.*, 2006; Matthey *et al.*, 2008; Parisien *et al.*, 2008). Seguidamente se comentan algunos de dichos inconvenientes, así como sus principales ventajas desde el punto de vista de sus posibles aplicaciones:

- i) Un inconveniente que se deriva de la elevada especificidad de los fagos es la necesidad de encontrar y producir fagos para cada uno de los patógenos diana. No obstante, este hecho permite asegurar su inocuidad ante la microbiota residente y presenta la ventaja de ser una terapia realmente específica.

- ii) El uso masivo de fagos puede promover la selección de bacterias resistentes a la acción de dichos fagos ya que es bien conocido que tanto mutaciones en los receptores fágicos como la presencia de profagos en las células bacterianas puede dar lugar a bacterias resistentes. En cualquier caso, este inconveniente puede minimizarse o superarse, al menos parcialmente, utilizando mezclas de distintos fagos.
- iii) Los bacteriófagos “*per se*” son considerados entes de bajo riesgo. Sin embargo, se ha demostrado que diferentes patógenos bacterianos contienen genes de virulencia procedentes del DNA fágico. Además, los fagos participan en la transmisión de genes entre bacterias. Ambos inconvenientes pueden superarse con un adecuado estudio genómico de los fagos, así como con la utilización de fagos líticos para minimizar el riesgo de transmisión de información genética entre bacterias mediante transducción.
- iv) Dada la ubicuidad de estos entes, su aislamiento es relativamente fácil. Además, los costes de producción son significativamente menores a los de otros antibacterianos.
- v) Los bacteriófagos son entes autoreplicativos lo que implica una farmacodinámica completamente distinta a la de cualquier otro fármaco. Por ello, las diferentes administraciones deberán emitir las regulaciones adecuadas para que productos basados en fagos puedan ser registrados para posteriores usos.

A pesar de todas las ventajas que supone la terapia fágica, hay un consenso general respecto a que los fagos no deben entenderse como una estrategia alternativa a las ya existentes, sino que en muchos casos son una estrategia complementaria para el control de patógenos como *Salmonella* (Krylov, 2001). Asimismo, el conocimiento de aspectos como la estabilidad de los bacteriófagos a utilizar, su interacción con el sistema inmunitario, su capacidad de promover el intercambio genético entre bacterias y su rango de huésped, deberían ser requisitos necesarios para verificar su seguridad de cara a su uso en terapias (Merril *et al.*, 2006).

Como se ha indicado anteriormente, existe un desconocimiento sobre la farmacodinámica de estos productos así como sobre la posibilidad de que se genere una respuesta inmune indeseada que bloquee su efectividad. Por ello, se han propuesto alternativas al uso de fagos completos (Parisien *et al.*, 2008). Una de ellas consiste en el uso de las lisinas fágicas, responsables de la lisis bacteriana. La utilización de lisinas sin holinas es posible ya que el compuesto antibacteriano debe actuar desde el exterior de la célula. Diferentes estudios han demostrado el efecto sinérgico de las lisinas (Fischetti, 2005), corroborando la hipótesis de que la utilización de más de una debe tener un efecto mayor y más rápido. Actualmente, sólo se han conseguido resultados positivos en bacterias grampositivas debido, probablemente, a que las gramnegativas poseen una membrana externa que dificulta el acceso de estas enzimas a su diana (Kropinski, 2006; Skurnik *et al.*, 2006). Otra alternativa planteada

se basa en el efecto de la adsorción fágica sobre la viabilidad bacteriana. La estrategia utiliza la especificidad de reconocimiento de las proteínas de la cola de los fagos y su capacidad de formar poros en la membrana de la bacteria diana, lo cual provoca un desequilibrio iónico que se traduce en la muerte celular (Strauch *et al.*, 2001; Parisien *et al.*, 2008).

En cualquier caso, una muestra del creciente interés por la terapia fágica es el reciente estudio publicado por EFSA donde se explora la posible aplicación de los bacteriófagos en alimentos y se establecen las bases para las futuras regulaciones sobre su uso (EFSA, 2009).

1.3.2. Terapia fágica y seguridad alimentaria

La terapia fágica puede aplicarse en todos los niveles de la cadena alimentaria. El lema “de la granja a la mesa” implica adoptar medidas para eliminar o disminuir la carga de los patógenos desde el primer eslabón de la pirámide productiva hasta el consumidor. En el caso de animales y sus productos derivados, este primer nivel comporta actuar en la propia granja, tanto en los animales como en su entorno. El control debe continuar en el transporte y en el matadero así como durante la elaboración, distribución y comercialización del producto hasta su manipulación final a nivel doméstico; enfoque igualmente aplicable a productos agrícolas (Brüssow *et al.*, 2005).

Como se ha comentado anteriormente, hay una clara necesidad de aplicar nuevas estrategias para disminuir o eliminar *Salmonella* de los animales de producción. En este contexto, la terapia fágica es una de las estrategias que se ha propuesto en granjas con el objetivo de mejorar el bienestar de los animales y evitar su infección para minimizar el riesgo que el patógeno entre en la cadena alimentaria (Johnson *et al.*, 2008). En esta línea, se han realizado estudios de terapia fágica en producción animal frente a *E. coli*, *C. jejuni*, *Listeria monocytogenes* y *S. enterica*. Desde que en 1991 se publicó un trabajo en el que se reportaba que el tratamiento con fagos de pollitos recién nacidos reducía significativamente la mortalidad de estos animales tras su infección con *S. Typhimurium* (Berchieri, 1991), el número de trabajos basados en terapia fágica en animales se ha incrementado rápidamente, mostrando resultados esperanzadores tanto a nivel terapéutico como profiláctico (Brüssow, 2005; Loc – Carrillo *et al.*, 2005; Atterbury *et al.*, 2007; Filho *et al.*, 2007; Borie *et al.*, 2008). No obstante, los bacteriófagos utilizados, las pautas de administración y las dosis de infección son muy distintas, dificultando la comparación de los resultados, incluso entre aquellos que estudian el mismo patógeno. A pesar de ello, estos trabajos coinciden en proponer la necesidad de utilizar preparaciones fágicas de elevado título y en la aplicación del tratamiento antes de la colonización del tracto intestinal por el patógeno (Sulakvelidze *et al.*, 2005). Así, está claro que deberán realizarse estudios más completos para determinar la dosis, la pauta de tratamiento y la vía de administración más adecuada que permitan disminuir los niveles de los patógenos hasta el momento en el que el

sistema inmunitario del propio animal sea capaz de eliminar a la totalidad de las bacterias patógenas (Levin *et al.*, 2004).

A *priori*, respecto a la facilidad de aplicación, la vía más adecuada de administración de fagos en animales es la vía oral. Además, en el caso de patógenos entéricos como *Salmonella*, a través de esta vía se consigue que los fagos alcancen rápidamente el intestino, lugar donde dichos fagos encontrarán a su diana. Por ello, en la mayoría de estudios realizados con fagos para el control de patógenos entéricos, la principal vía de administración ha sido la oral. Además, el hecho de no inyectar los fagos en el torrente sanguíneo permite una mayor seguridad ante la generación de una respuesta inmune indeseada así como una excreción más rápida del producto. No obstante, aproximaciones como el uso de pulverizadores que permitan esparcir los fagos por todo el entorno de los animales deben ser seriamente consideradas. Ambos sistemas de aplicación (oral y pulverización) no son excluyentes y su uso conjunto puede tener un claro efecto sinérgico que permita mejorar los resultados obtenidos hasta el momento.

La higienización de la granja, de los medios de transporte y del matadero son otros puntos de aplicación. En estos casos, el preparado fágico debe considerarse más como un desinfectante que como un fármaco. En cualquier caso, las dificultades para aplicar este tipo de producto en estos lugares, donde hay superficies con distintas texturas y materiales, residen en la difusión del fago para interactuar con el huésped e iniciar así un ciclo infeccioso exitoso (Gill, 2010). Igualmente, el uso de los fagos durante el procesamiento del alimento crudo hasta su consumo final está también condicionado por la capacidad de difusión del fago, siendo por ello muy importante el método de aplicación de estos productos. Ante estas limitaciones, la pulverización se plantea de nuevo como una de las mejores aproximaciones.

A pesar de la emergencia de la terapia fágica como una estrategia alternativa y de bajo riesgo que puede contribuir a mejorar la seguridad alimentaria, hasta el momento sólo se han aprobado y comercializado cinco productos a nivel mundial. Estos son Listex™ P100, producido por la EBI Food Safety, ListShield™ y EcoShield™, desarrollados por la empresa Intralytix (Intralytix; Housby, 2009), Agriphage, diseñado por Omnylitcs (www.omnylitcs.com) y Biotector S1 producido por CJ Cheiljedang (www.eng.cjcheiljedang.com). Listex™ P100 y ListShield™ son productos diseñados para el control de *L. monocytogenes* que se aplican en forma de pulverizador en la producción de quesos y carnes procesadas. EcoShield™, también por pulverización, va dirigido al control de *E. coli* O157:H7 en alimentos procesados y en la cadena de procesamiento de los mismos. Agriphage es un producto comercializado en formato líquido con la finalidad de poder combinarse con otros fertilizantes y productos químicos para el cultivo de tomates y pimientos para el control de *Xanthomonas campestris* y *Pseudomonas syringae*. Finalmente el último producto, está licenciado como aditivo de piensos para especies aviares para el control de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*. Estos

Introducción

datos muestran el potencial de esta estrategia, no obstante aún debe recorrerse un largo camino para identificar los fagos más adecuados y desarrollar y optimizar sus múltiples aplicaciones en la producción y el procesamiento de alimentos.

2. Objetivos

Salmonella es un enteropatógeno zoonótico gramnegativo de amplio rango de huésped, causante de grandes pérdidas económicas y de elevado impacto en la salud humana y animal (EFSA, 2010). Su gran capacidad invasiva y la asintomatología de sus infecciones en animales de granja, convierte a estos animales en reservorios de este patógeno y a sus productos en potenciales vehículos de transmisión (Miller *et al.*, 2000; White *et al.*, 2001; Rigney *et al.*, 2004). Las granjas y mataderos son los primeros niveles en los que deben aplicarse medidas de control para esta bacteria (Castellan *et al.*, 2004). No obstante, a pesar de las múltiples estrategias utilizadas hasta el momento como, por ejemplo, la vacunación, todavía no se ha conseguido la erradicación de *Salmonella*. Esta situación indica que hay una necesidad de incorporar nuevas estrategias en la lucha contra este patógeno en todos los niveles de la cadena alimentaria, desde la granja hasta la mesa.

Como se ha mencionado en la introducción de este trabajo, el uso de bacteriófagos y sus derivados está emergiendo como una prometedora estrategia para el control de patógenos bacterianos dada la capacidad de los bacteriófagos de lisar a sus huéspedes, su amplia distribución y fácil obtención, así como su elevada especificidad. No obstante, aunque la terapia fágica es una estrategia que presenta numerosas ventajas, sus inconvenientes también deben ser seriamente considerados. Asimismo, la obtención de nuevos fagos más efectivos y la mejora de las pautas de administración y tratamiento deben optimizarse para obtener el máximo potencial de esta estrategia emergente.

El principal objetivo de la presente memoria ha sido estudiar las posibilidades de aplicar la terapia fágica en animales de granja, particularmente en el sector aviar, para disminuir o eliminar la presencia de *Salmonella* en estos animales de producción. En este marco, los objetivos parciales de la presente Tesis han sido los siguientes:

1. Aislar y seleccionar fagos líticos específicos de *Salmonella*.
2. Caracterizar biológica y molecularmente los fagos seleccionados.
3. Determinar la actividad de los fagos seleccionados sobre cultivos de *Salmonella*.
4. Estudiar la efectividad de los fagos seleccionados en modelos animales optimizando las pautas de tratamiento.

3. Material y Métodos

3.1. Cepas bacterianas, plásmidos, muestras de campo y oligonucleótidos

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla 5. Las cepas de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* utilizadas para el aislamiento de los bacteriófagos y el estudio del espectro de infección se seleccionaron tras un estudio de macrorestricción genómica mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE), demostrando ser clonalmente diferentes (Bardina, 2007). Asimismo las cepas de *S. Hadar*, *S. Infantis* y *S. Virchow* fueron también utilizadas para determinar el espectro de infección de los bacteriófagos seleccionados. Las cepas salvajes ATCC 14028 (American Type Culture Collection) y LK5 (*Salmonella* Genetic Stock Centre) se utilizaron para la caracterización de los parámetros biológicos y la estabilidad de los fagos seleccionados, así como para la realización de las curvas de infección *in vitro*. Las cepas modificadas genéticamente UA1872 (ATCC 14028 Ω Cm) y UA1894 (LK5 Ω Km) con casetes de resistencia a cloranfenicol y kanamicina, respectivamente, se utilizaron para los estudios de eficacia del cóctel fágico *in vivo*. Los plásmidos utilizados para la obtención de estas cepas se detallan en la Tabla 6.

Los aislados fágicos se obtuvieron a partir de 86 muestras de campo, procedentes de muestras fecales de pollos de granjas españolas recogidas durante los años 2007 y 2008.

Los oligonucleótidos utilizados para las distintas técnicas de manipulación de DNA se muestran en la Tabla 7.

3.2. Métodos microbiológicos

3.2.1. Medios y condiciones de cultivo y de conservación de bacterias

Los cultivos de *Salmonella* y *E. coli* se realizaron en medio líquido Luria-Bertani (LB) (Bertrani, 1951), o en medio sólido, adicionando agar-agar al 1,7% (p/v). La concentración de antibióticos empleada en el medio LB para *Salmonella* fue de 150 μ g/ml para la kanamicina (Km), 34 μ g/ml para el cloranfenicol (Cm) y 100 μ g/ml para la ampicilina (Ap). En el caso de *E. coli*, la concentración de ampicilina utilizada fue de 100 μ g/ml.

En los estudios *in vivo*, la detección de *Salmonella* se llevó a cabo por siembra en placas de medio LB debidamente suplementado con Cm o Km para los estudios con ratones, y en placas de medio selectivo xilosa-lisina-desoxicolato (XLD, Pronadisa) suplementado con cloranicol (3,4 μ g/ml) para los estudios con pollos. En aquellos casos en los que la detección de *Salmonella* no fue posible, se añadió un paso de enriquecimiento en medio selectivo Müller-Kauffmann (Merck) y posterior siembra en placas XLD (Pronadisa).

Material y Métodos

Tabla 5. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Bacteria	Cepa	Características	Uso	Procedencia
<i>E. coli</i>	BL21 pKOBEGA BW25113 pKD3 BW25113 pKD4			Chaverroche <i>et al.</i> , 2000 Datsenko <i>et al.</i> , 2000 Datsenko <i>et al.</i> , 2000
<i>S. Enteritidis</i>	LK5	Cepa salvaje de referencia	Caracterización fágica	SGSC
	UA1893	LK5 pKOBEGA	Obtención de mutantes	Este trabajo
	UA1894	LK5 Ω Km	Estudios <i>in vivo</i>	Este trabajo
	65			
	951			
	6824			
	7129			
	7358			
	7385			
	7593		Aislamiento de fagos y espectro de infección fágica	DARP
	7616			
	8044			
	8419			
	9310			
	9451			
9449				
9609				
	F20.5CP/94		Aislamiento de fagos y espectro de infección fágica	HVH
	O/20.9 CG/98			
	2123/F06		Aislamiento de fagos y espectro de infección fágica	HSP
	1861/F06			
<i>S. Hadar</i>	10152		Espectro de infección fágica	DARP
	8546			
	05S72			
<i>S. Infantis</i>	1056		Espectro de infección fágica	DARP
	05S44			
<i>S. Typhimurium</i>	ATCC 14028	Cepa salvaje de referencia	Caracterización fágica	ATCC
	UA1826	ATCC 14028 pKOBEGA	Obtención de mutantes	Este trabajo
	UA1872	ATCC 14028 Ω Cm	Estudios <i>in vivo</i>	Este trabajo
	1			
	16			
	124			
	421			
	976			
	887			
	3360			
	4516			
	S4426			
	S4354		Aislamiento fagos y espectro de infección fágica	DARP
	S5832			
	S5833			
	56254			
	MG86			
	MG98			
	5419			
	S5827			
S5857				
5833				
S5801				
S5812				

Tabla 5. Continuación

Bacteria	Cepa	Características	Uso	Procedencia
S. Typhimurium	S5974			
	6231			
	6269			
	7627			
	7320			
	7653			
	7987			
	8429			
	8647			
	8880			
	9208		Aislamiento de fagos y espectro de infección fágico	DARP
	8695			
	8862			
	9222			
	9434			
	9849			
	9813			
	10182			
	10082			
10175				
	10127			
	J/10.2 CP/96		Aislamiento de fagos y espectro de infección fágico	HVH
	D/20.5 CP/99			
	J/11.16 CP/01			
	1992/F06		Aislamiento de fagos y espectro de infección fágico	HSP
	1557/F06			
	1711/F06			
	1624/F06			
S. Virchow	9781		Espectro de infección fágico	DARP
	79/S			

SGSC, *Salmonella Genetic Stock Centre*; DARP, Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya; HVH, Hospital de la Vall d'Hebrón de Barcelona; HSP, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona; ATCC, *American Type Culture Collection*

Tabla 6. Plásmidos utilizados en el presente trabajo.

Plásmido	Característica	Referencia
pKOBEGA	Ap ^R Ts	Chaveroche <i>et al.</i> , 2000
pKD3	Ap ^R Cm ^R	Datsenko <i>et al.</i> , 2000
pKD4	Ap ^R Km ^R	Datsenko <i>et al.</i> , 2000

Ts, Termosensible; Ap, Ampicilina; Cm, Cloranfenicol; Km, Kanamicina

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Oligonucleótido	Secuencia (5' – 3')	Uso
IRup_P1	TTGGGCGGATTAAAAAATTTCGAAGGTAATTCAGATTAAATTATCATTTGCAGTATC AGGCTCATCCGTGAGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Inserción del casete de resistencia en la región intergénica de <i>Salmonella</i>
IRv_P2	TAAACGTTGCTGAGAAAAACCAATAACGAACTTTATTTATGGCTGGATCAAGA ATAGAGTGACCTAGACCAGGCTGCATATGAATATCCTCCTTAG	
16088_up	GTGTTTTCCGGAGTCCGATC	Comprobación de la inserción del casete de resistencia en la región intergénica de <i>Salmonella</i>
17026_rv	GAAAAGCCCTCAATTGCAGTC	
C1	TTATACGCAAGGGCACAAGG	Comprobación de la inserción del casete de resistencia a cloranfenicol
C2	GATCTCCGTCACAGGTAGG	
K1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	Comprobación de la inserción del casete de resistencia a kanamicina
K2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	
ORF118_up	ATTACAGCAGATGAACCTCG	
ORF134_rv	GTTTCGATAGTCACGTTAGC	Comprobación de la secuencia del fago UAB_Phi20
C20_1up	TGACATCCGCATTAAGCATG	
C20_1rv	ATG CCTGCACCTCTATATGG	
GtrA_up	TCAGTCGCATCTTTACTACC	Determinación de la posible integración del fago UAB_Phi20 en <i>Salmonella</i>
Int_rv	TTGCGGCCACTTCAATCTCC	

Tabla 7. Continuación

Oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	Uso
ProA_up	TGCGATATGCATAATGCTGC	Determinación de la posible zona de integración en <i>Salmonella</i> para el fago UAB_Phi20
IS3_rv	GTTCAACGGATTATCAGAGC	
C87_1up	AGAGCCATCCAACCTCTGTC	Comprobación de la secuencia del fago UAB_Phi87
C87_1rv	AGGTTGATTCCTTCACTCG	
C87_2up	GGAGACAAGGGATTGGAACC	
C87_2rv	GTTGCCACTGTAGAGATACG	

Material y Métodos

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las cepas de *Salmonella* a modificar genéticamente fue el medio SOB (Datsenko y Wanner, 2000). Asimismo, se utilizó el medio Terrific Broth (TB) (Tartoff y Hobbs, 1987) para el crecimiento de las cepas portadoras de plásmidos y el medio LB-Lennox para la obtención de las células competentes.

La inoculación de los microorganismos en medio líquido se realizó a partir de una dilución 1/100 de los cultivos líquidos crecidos durante 18 horas (h) a 37°C y en agitación a 150 rpm (agitador orbital Rotabit, Selecta). La inoculación en medio líquido de las cepas congeladas siempre estuvo precedida de una siembra en medio sólido para comprobar la pureza y morfología colonial. La temperatura de incubación de los cultivos fue de 37°C durante 18 h y 24 h para los medios LB y XLD, respectivamente.

Los medios se prepararon y esterilizaron siguiendo las recomendaciones indicadas por las casas comerciales. En el caso de los antibióticos, dada su inactivación por calor, se esterilizaron mediante filtros estériles de membrana de 0,45 µm de diámetro de poro (Millipore). En todos los casos, se utilizó agua ultrapura de grado Milli-Q (MQ) (*Ultra-pure water system Milli-Q_{plus} 185*; Millipore). Los medios sólidos se dejaron enfriar hasta una temperatura de 50°C, momento en el que se añadieron los suplementos adecuados en caso de ser necesario y se dispensaron en placas de Petri (Sterilin) en condiciones de esterilidad.

Las medidas de crecimiento bacteriano se determinaron mediante el recuento de células viables en medio sólido (cfu, unidades formadoras de colonia) y mediante la determinación espectrofotométrica de la absorbancia de los cultivos líquidos (espectrofotómetro Uvikon 810 Kontron, Microbean) a una longitud de onda de 550 nm (A_{550}) para los cultivos crecidos en medio LB y de 600 nm (A_{600}) para los crecidos en medio SOB.

La conservación de las cepas bacterianas se realizó mediante i) congelación a -20°C en viales con glicerol al 50% y ii) en viales de criopreservación *Protect* (Ferrer Farma) a -80°C.

3.2.2. Aislamiento y purificación de bacteriófagos

La obtención de lisados fágicos desde muestras de heces de aves se realizó siguiendo la metodología descrita por Connerton y col. (Connerton *et al.*, 2004), la cual consiste en resuspender 1 g de la muestra en tampón SM e incubarlo a 4°C durante 24 h. Paralelamente, se realizó un método de enriquecimiento basado en inocular 1 g de cada muestra en 20 ml de agua peptonada (Merck), incubándose a 37°C durante 18 h. Tras este tiempo, se realizó una dilución 1/10 del cultivo en medio selectivo Müller-Kauffmann (Merck), y se incubó durante 18 h a 37°C.

En ambas metodologías y tras el tiempo de incubación indicado, se centrifugaron los cultivos durante 10 minutos (min) a 8000 x g (Beckman J2-21) y se filtró el sobrenadante obtenido a través de filtros

de membrana estériles de fluoruro de polividinil (PVDF) de 0,45 μm de diámetro de poro (Durapore). Los filtrados obtenidos se conservaron a 4°C.

En los casos en que se visualizaron calvas, mediante el test de la gota (Apartado 3.2.4), se procedió a la purificación del fago en cuestión. Para ello, se recogieron los fagos presentes en el halo de lisis mediante una asa de Kolle estéril y se resuspendieron en 1 ml de tampón SM en un tubo de microcentrífuga. Tras agitar suavemente durante 20 min, se añadieron 200 μl de cloroformo y se centrifugó durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga y se visualizaron las calvas mediante siembra en doble capa de agar (Apartado 3.2.5), observándose su morfología. Seguidamente se recuperaron los fagos de una de las calvas mediante una pipeta Pasteur estéril y se procedió de nuevo a su purificación, según se ha comentado anteriormente. Este proceso se realizó tres veces consecutivas. Finalmente, se obtuvo el fago purificado resuspendiendo el contenido de una de las calvas en tampón SM y se conservó a 4°C.

3.2.3. Obtención de lisados fágicos

Para obtener lisados fágicos en medio líquido se realizó una resiembra 1/10 en medio líquido LB de un cultivo de noche de la cepa de *Salmonella* deseada, incubándose a 37°C hasta alcanzar una A_{550} de 0,5. Dicho cultivo se infectó con 500 μl del fago, obtenido según se ha comentado en el apartado 3.2.2 o con el volumen adecuado de un lisado obtenido previamente para conseguir una MOI de 1. Seguidamente, se incubó a 37°C durante 5 h y pasado dicho tiempo, se centrifugó durante 10 min. El sobrenadante se filtró a través de filtros de membrana de PVDF de 0,45 μm de diámetro de poro. El lisado obtenido se tituló (Apartado 3.2.5) y se almacenó a 4°C para posteriores usos.

Para conseguir títulos elevados, se obtuvieron lisados en medio sólido. Para ello, se mezclaron en 2,5 ml de agar blando 100 μl de una dilución 1/10 de un cultivo de noche de *Salmonella* con 100 μl de un lisado fágico a una concentración que permitiera obtener un recuento de entre 100 y 1000 calvas por placa. La mezcla se extendió sobre una placa de LB y se incubó a 37°C durante 18 h. Al día siguiente se añadieron 3 ml de MgSO_4 10 mM a la placa y se mantuvo 20 min a temperatura ambiente. Tras este tiempo se recogió el MgSO_4 y la capa de agar blanda mediante una asa de Digrafsky y se depositó en un tubo de polipropileno inerte. Se agitó la mezcla suavemente durante 30 min, se centrifugó a 8000 x g (Beckman J2-21) y se filtró el sobrenadante a través de filtros de membrana de PVDF de 0,45 μm de diámetro de poro.

Para ciertos experimentos fue necesario reconcentrar los fagos para obtener mayores títulos. Para ello los lisados se transfirieron a tubos de polipropileno y se centrifugaron a 51.000 x g durante 2 h, utilizando una ultracentrífuga Optima TM L-80 (Beckman) y se resuspendieron en 500 μl de MgSO_4 10mM. Además, en aquellos casos en los que fue necesario eliminar impurezas, se realizaron dos

Material y Métodos

procesos de ultracentrifugación sucesivos de los lisados en cuestión en gradiente de CsCl tal como describen Sambrook y col. (Sambrook *et al.*, 2001). El primero de ellos consiste en un gradiente discontinuo que permite separar las partículas víricas de otros componentes y el segundo en un gradiente continuo que permite purificar y concentrar más los viriones obtenidos. Tras esta última centrifugación, las partículas fágicas fueron dializadas utilizando membranas de celulosa (*dialysis tubing cellulose membrane*, Sigma) en MgSO₄ 10 mM a 4°C durante 48 h. Los fagos así obtenidos se almacenaron a 4°C.

Cuando fue necesario, se obtuvieron lisados de los fagos de estudio, infectando a *S. Typhimurium* ATCC 14028 o a *S. Enteritidis* LK5, para disponer de fagos que tuvieran el patrón de modificación de dichas cepas.

3.2.4. Test de la gota

Para visualizar la presencia de fagos a través de esta técnica, se inocularon 100 µl de una dilución 1/10 de un cultivo de noche de la cepa de *Salmonella* deseada en 2,5 ml de LB agar blando (0,7%) atemperado a 50°C. Se vertió el contenido sobre una placa LB y tras su solidificación se dispensaron gotas de 10 µl de los lisados fágicos. Las placas se incubaron a 37°C durante 18 h, tiempo tras el cual se observó la aparición de calvas.

3.2.5. Titulación de los lisados fágicos

Para conocer el título de un lisado fágico, se realizaron diluciones decimales seriadas del lisado en cuestión en MgSO₄ 10 mM. Seguidamente se inocularon 100 µl de la dilución apropiada y 100 µl de una dilución 1/10 de un cultivo de noche de la cepa indicadora de *Salmonella* deseada en 2,5 ml de LB blando mantenido a 50°C. La mezcla se extendió sobre una placa de LB y se incubó a 37°C durante 18 h. Pasado dicho tiempo se procedió al recuento del número de calvas observadas, expresándose el título en pfu (*plaque forming units*)/ml.

3.2.6. Cinética de la infección fágica

Para determinar la cinética de infección de los bacteriófagos sobre cepas de *Salmonella* se realizó una dilución 1/100 en medio LB de un cultivo de noche de la cepa deseada y se incubó el cultivo a la temperatura de ensayo (30°C, 37°C ó 42°C) en agitación hasta alcanzar una A₅₅₀ de 0,2 (10⁸ cfu/ml), momento en el que se infectó el cultivo con el fago o fagos de estudio a una MOI 1. Tras dicha infección, se detectó la concentración bacteriana a lo largo del tiempo, determinando la A₅₅₀ y realizando un recuento de viables, tomándose muestras cada 30 min durante un periodo de 8 h.

En los casos en que se determinó la cinética de infección de los fagos en presencia de sales biliares, se siguió la misma metodología pero con las siguientes modificaciones. Se partió de un cultivo

bacteriano obtenido tras una dilución 1/30 en medio mínimo suplementado con glucosa al 0,2% y con sales biliares al 5% (colato sódico, Sigma) de un cultivo de noche de la cepa deseada y, tras su infección, se siguió su absorbancia a una longitud de onda de 450 nm.

3.2.7. Adsorción fágica

La constante de adsorción fágica es un parámetro específico para cada fago y su huésped, y depende de las condiciones físicas y químicas a las que está sujeto el experimento. El cálculo de esta constante se basa en la fórmula descrita por Adams (Adams, 1959): $P_t = P_0 \cdot e^{-KNt}$, en donde P es el título fágico de la mezcla, K la constante de adsorción, N la población bacteriana en el momento de la infección y t el tiempo.

Para determinar dicha constante, se realizó una dilución 1/100 en medio LB de un cultivo de noche de la cepa deseada de *Salmonella*, incubándose el cultivo a 37°C hasta alcanzar una A_{550} de 0,3-0,4. En este momento se añadió KCN a una concentración final de 10 mM y se incubó el cultivo a 37°C durante 5 min. Tras este tiempo, el cultivo se centrifugó y el sedimento obtenido se resuspendió en el mismo volumen de $MgSO_4$ 10 mM. Seguidamente, se infectó con el fago de estudio a una MOI de 0,1 y se incubó a 37°C sin agitación. Se tomaron muestras cada 5 min durante los primeros 30 min y cada 10 min hasta los 50 min de la infección para determinar el título fágico.

3.2.8. Determinación de los parámetros del ciclo multiplicativo

La técnica *One-step growth* (Doermann, 1952) permite determinar diferentes parámetros del ciclo infectivo fágico: el tiempo de eclipse, el tiempo de latencia y el tamaño de explosión. Tras sincronizar un cultivo de *Salmonella* por adición de KCN, según se ha comentado en el apartado anterior, se infectó el cultivo con el fago de estudio a una MOI de 1 y se incubó a 37°C sin agitación para permitir la adsorción fágica. Tras este tiempo, se realizaron las diluciones -5, -6 y -7, las cuales se incubaron a 37°C sin agitación. Cada 5 minutos durante 60 min y cada 15 min hasta los 120 min se tomaron muestras por duplicado.

En cada tiempo, una de las muestras se diluyó y tituló directamente para conocer el número de partículas fágicas liberadas al medio, mientras la segunda muestra fue tratada con cloroformo para lisis a las células bacterianas y poder determinar el número de partículas fágicas infectivas totales. A partir de los datos obtenidos se calcularon los tiempos de latencia y eclipse, respectivamente, así como el tamaño de explosión.

3.2.9. Estabilidad fágica en diferentes condiciones ambientales

Para determinar la estabilidad de los fagos se procedió a su incubación en diferentes condiciones ambientales durante un periodo de tiempo determinado, tras el cual se calculó el número de

Material y Métodos

partículas infectivas. Los resultados obtenidos se expresaron en logaritmos (\log_{10}) y se analizó la disminución del título respecto al lisado inicial no tratado.

La estabilidad fágica a diferentes pH fue determinada añadiendo HCl o NaOH a 2 ml de MgSO_4 10 mM hasta alcanzar valores de pH de 2, 4, 6 y 9. Seguidamente se añadió el fago en cuestión y se tomaron muestras cada 30 min durante 2 h.

La estabilidad fágica a diferentes temperaturas se realizó incubando los fagos en LB a la temperatura deseada (30°C, 37°C y 42°C) durante siete días, tomándose muestras diariamente. Análogamente, se estudió la estabilidad de los fagos a 4°C en LB durante un año, tomándose muestras a los 2, 4, 6 y 12 meses.

Finalmente, se determinó la estabilidad de los fagos en agua de red. Para ello, se sedimentaron los fagos por ultracentrifugación a 51.000 x g durante 2 h y se resuspendieron en agua de red. Estos lisados se mantuvieron a 25°C y a 37°C durante siete días, tomándose muestras diariamente.

3.2.10. Determinación de la resistencia bacteriana frente a la infección fágica

Con la finalidad de determinar la frecuencia de células de *Salmonella* resistentes a la infección fágica, se mezclaron 100 μl de una dilución 1/10 de un cultivo de noche de la cepa deseada de *Salmonella* con 100 μl de una suspensión fágica a una MOI de 1 en 2,5 ml de LB blando mantenido a 50°C. La mezcla se extendió sobre una placa de LB y se incubó a 37°C durante 18 h, tiempo tras el cual se contaron las colonias que habían crecido. Asimismo, se realizó un recuento de viables del cultivo para conocer la concentración bacteriana inicial y se calculó la frecuencia de resistencia a la infección fágica.

3.3. Microscopia electrónica

Para la observación de los fagos por microscopía electrónica, se reconcentró el lisado fágico (Apartado 3.2.3) y se resuspendió en MgSO_4 10 mM para obtener un título aproximado de 10^{11} pfu/ml. Seguidamente, 5 μl de este lisado fueron adsorbidos en una rejilla de cobre la cual se tiñó negativamente con acetato de uranil al 2%. Las observaciones se realizaron con un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1400 en el Servei de Microscopia de la UAB.

3.4. Métodos de biología molecular

3.4.1. Extracción de DNA

La extracción del DNA cromosómico bacteriano se realizó mediante el kit comercial *Easy-DNA*TM (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante, mientras que las extracciones de DNA plasmídico se llevaron a cabo con el kit *GeneJet*TM *Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas). Tras cada

extracción se comprobó la integridad del DNA mediante electroforesis convencional y tras su visualización, se cuantificó (*GeneQuant*TM Amersham Biosciences) y se conservó a -20°C hasta su uso.

Para la extracción de DNA fágico se concentraron los lisados mediante ultracentrifugación a 51.000 x g durante 2 h (OptimaTM L de Beckman) para conseguir un título de entre 10¹¹ y 10¹² pfu/ml en MgSO₄ 10 mM. Para eliminar los restos de material genético bacteriano, la suspensión fágica se trató inicialmente con DNasa I (80 U/ml; Roche) y RNasa I (80 µg/ml; Roche) durante 2 h a 37°C. Seguidamente, se incubó con SDS (0,5%) y proteinasa K (200 µg/ml; Roche) a 56°C. Tras 2 h de tratamiento, se extrajo el DNA por el método de fenol-cloroformo convencional, mezclando 500 µl de la suspensión fágica con 500 µl de fenol-cloroformo 1:1 (v/v). A continuación, se realizó un proceso de agitación vigoroso durante 20 min y se centrifugó a 12.000 x g durante 5 min (MiniSpin, Eppendorf). Se recuperó la fase superior y se repitió el proceso. Para acabar de eliminar las impurezas, se añadió un volumen de cloroformo isoamílico 24:1 (v/v). Se recuperó la fase superior y se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C) con acetato sódico 80 mM (pH 4,8), realizándose la precipitación del DNA por centrifugación a 12.000 x g durante 10 min. Finalmente, se lavó el sedimento con etanol al 70% seguido de una centrifugación a 12.000 x g durante 5 min. El sedimento se resuspendió en 50 µl de TE con RNasa I (0,1 mg/ml) y se comprobó su integridad mediante su observación en un gel de agarosa al 0,4%. Finalmente, se cuantificó (*GeneQuant*TM, Amersham Biosciences) y se conservó a -20°C hasta su uso.

3.4.2. Electroforesis convencional en geles de agarosa

Los geles de agarosa se prepararon en tampón TAE 1X a concentraciones comprendidas entre el 0,4 y el 2% (LWO EOO, Pronadisa), en función del tamaño de los fragmentos esperados. Para poder visualizar los fragmentos de DNA con radiación UV se añadió bromuro de etidio al gel a una concentración final de 0,5 µg/ml.

Antes de cargar las muestras en el gel, se les añadió una solución transportadora a una relación 1:6 (v/v) respecto al volumen final. La electroforesis se realizó en tampón TAE 1X a un voltaje comprendido entre 80 – 120 V durante el tiempo adecuado en una cubeta horizontal (*Mini-Sub Cell GT Cell*, Bio-Rad). Las bandas de DNA se observaron con el sistema de transiluminación y captación de imagen *E-box-1000/20 M* (Vilber Loumat). Los patrones de tamaño que se utilizaron fueron, según los casos, el DNA del fago λ (Promega) digerido con *BstEII* (New England Biolabs), digerido con *HindIII* (Roche) y la forma replicativa del DNA del fago φX174 digerida con *Hinfl* (Biotools) (Figura 11).

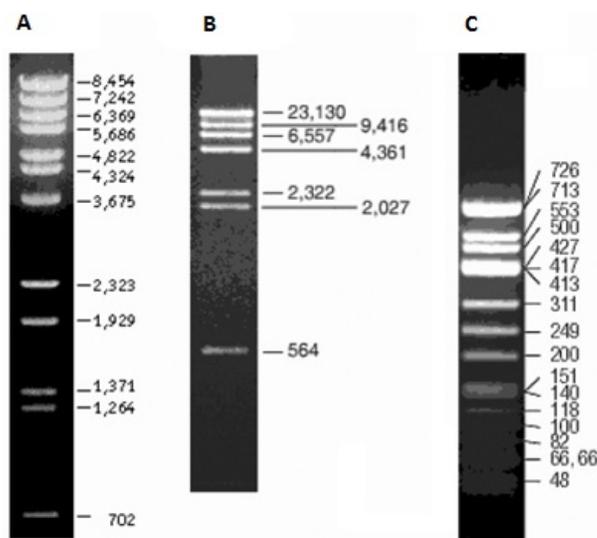


Figura 11. Patrones de tamaño utilizados en la electroforesis convencional. Se muestra el patrón de bandas de los marcadores: A) DNA del fago λ cortado con *Bst*EII, B) DNA del fago λ cortado con *Hind*III y C) DNA del fago ϕ X174 cortado con *Hin*fl en un gel de agarosa al 0,7%.

3.4.3. Electroforesis en campo pulsante

La determinación del tamaño del genoma fágico se realizó mediante la técnica de PFGE. Para ello, la preparación del DNA fágico, inmovilizado en bloques de agarosa, se llevó a cabo según describieron Atterbury y col. (Atterbury *et al.*, 2003), partiendo de un lisado fágico a un título de 10^{11} pfu/ml en TE 10 mM y utilizando 5 μ l de lisado por bloque.

La electroforesis se realizó en el sistema *Contour-clamped homogenous electric field* (CHEF DRIII System apparatus, BioRad) y se utilizaron geles de agarosa al 1% en TBE 1X. La electroforesis se llevó a cabo en este mismo tampón a 6 V/cm con una rampa ascendente de pulsos de 2 a 20 s durante 10 h y de 20 a 30 s durante 5 h. Los patrones de tamaño utilizados fueron *Lambda Ladder PFG* y *Low range PFG* (New England Biolabs) (Figura 12). El tamaño de los genomas fágicos fue determinado mediante el programa Fingerprinting II (BioRad).

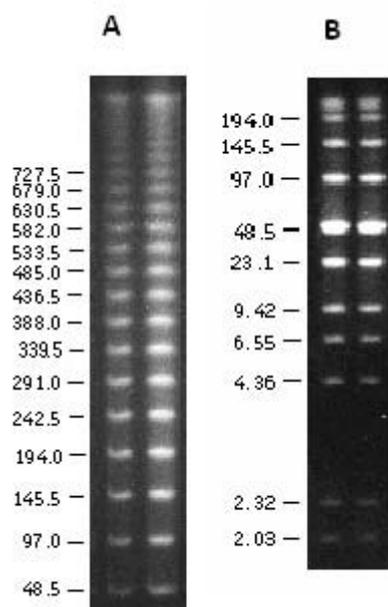


Figura 12. Patrones de tamaño utilizados en la electroforesis del PFGE. Se muestra el patrón de bandas de los marcadores: A) *Lambda Ladder PFG* y B) *Low Range PFG* en un gel de agarosa al 1%.

3.4.4. Reacción en cadena de la polimerasa

La amplificación de fragmentos de DNA se realizó en un termociclador *Thermal Cycler* (Applied Biosystems) con el kit *Expand™ High Fidelity PCR System* (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los distintos oligonucleótidos (Invitrogen) (Tabla 7) se utilizaron a una concentración final de 0,5 pmoles cada uno. Asimismo, se añadieron cada uno de los dNTP (Thermo Scientific) a una concentración final de 0,2 mM. De la misma forma, el DNA molde se añadió a razón de 150 ng por reacción. Generalmente, la mezcla de reacción fue de 25 μ l, exceptuando los casos en que se requirió una mayor cantidad de producto amplificado, en los cuales el volumen se aumentó hasta 200 μ l, manteniéndose las proporciones de cada componente.

Las condiciones de amplificación se determinaron para cada pareja de cebadores y en función del tamaño del fragmento a amplificar, tomándose como referencia para el tiempo de extensión 1 min por cada kb del fragmento esperado.

3.4.5. Purificación de los fragmentos de DNA

La recuperación de los fragmentos de DNA desde geles de agarosa o desde solución se realizó con el kit *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.4.6. Digestión del DNA

Las endonucleasas de restricción utilizadas en este trabajo se obtuvieron de Roche o New England Biolabs y se utilizaron siguiendo, en cada caso, las indicaciones recomendadas por dichas casas comerciales. Generalmente, se realizaron reacciones de 25 μ l, añadiendo cantidades de entre 500 ng y 1 μ g de DNA. En caso de ser necesario, el volumen de la reacción se aumentó hasta 100 μ l manteniendo las proporciones de los diferentes reactivos.

3.4.7. Secuenciación del DNA

Para comprobar las modificaciones genéticas de las cepas UA1872 y UA1894 así como para verificar determinadas zonas de los genomas fágicos, se secuenciaron distintos fragmentos de DNA por la empresa Macrogen (<http://dna.macrogen.com>).

La secuenciación completa de los genomas fágicos fue realizada por Sistemas Genómicos (Valencia, España). El fago UAB_Phi20 fue secuenciado mediante la técnica de rotura mecánica para obtener fragmentos de DNA de 2 a 3 kb. Dichos fragmentos se secuenciaron y se ensamblaron con una redundancia de 5 a 6 lecturas por cada posición nucleotídica. Por otra parte, el fago UAB_Phi87 fue secuenciado mediante la técnica de pirosecuenciación en un secuenciador 454 (Roche).

3.4.8. Obtención de células competentes

Para la obtención de células competentes se empleó la técnica descrita por Dower y col. (Dower *et al.*, 1988). Para ello se realizó una dilución 1/100 en medio LB-Lennox de un cultivo de noche de la cepa deseada y se incubó a 37°C hasta alcanzar una A_{550} de 0,5. Transcurrido este tiempo, el cultivo fue centrifugado a 4°C durante 10 min a 5000 x g tres veces consecutivas. Tras cada proceso de centrifugación el sedimento obtenido fue lavado con 1 volumen de agua MQ, excepto en la última centrifugación, tras la cual el sedimento fue resuspendido en 1 ml de glicerol frío al 10%. Se realizaron alícuotas de 50 μ l y se conservaron a -80°C.

3.4.9. Electrotransformación

Una alícuota de 100 μ l de células competentes debidamente descongelada se mezcló con 200 ng de DNA plasmídico o con 1 μ g de DNA lineal (producto de PCR). Tras un periodo de incubación en hielo de 15 min, la mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación (2 mm *electrode gap*, Biolabs) y se realizó la electrotransformación mediante un pulso eléctrico de 2,5 kV/cm² a 25 μ F de capacitancia y 200 Ω de resistencia (*Biorad Gene Pulser*; Biorad). Tras el pulso eléctrico, la mezcla se diluyó en 1 ml de medio BHI frío, en el caso de transformar con DNA plasmídico, o con 1 ml de medio SOB frío, para el protocolo de inactivación génica en un paso. Seguidamente, todo el contenido se transfirió a tubos de vidrio estériles, los cuales se incubaron a 37°C durante 90 min. En aquellos casos en que se

transformaron plásmidos termosensibles, la incubación se realizó a temperatura no restrictiva. Tras esta incubación, se procedió a la siembra de la mezcla en placas selectivas, incubándose a la temperatura adecuada durante 18 h.

3.4.10. Obtención de mutantes bacterianos por inactivación génica en un paso

Para la obtención de las cepas mutantes UA1872 y UA1894 de *Salmonella*, se introdujo mediante la técnica de inactivación génica en un paso (Datsenko *et al.*, 2000) el casete de resistencia a Cm en *S. Typhimurium* ATCC 14028 y a Km en *S. Enteritidis* LK5. Para ello, en primer lugar se introdujo por electroporación el plásmido pKOBEGA (Chaverocche *et al.*, 2000) en las cepas ATCC 14028 de *S. Typhimurium* y LK5 de *S. Enteritidis*, obteniéndose las cepas UA1826 y UA1893, respectivamente.

Para no alterar la virulencia de las cepas ATCC 14028 y LK5, ni interrumpir genes o sus respectivos promotores, se decidió insertar los casetes de resistencia en una zona intergénica conservada en ambas serovariedades. A tal efecto y según se muestra en la Figura 13, se amplificó el casete de resistencia a Cm desde el plásmido pKD3 y el casete de resistencia a Km desde el plásmido pKD4 mediante los oligonucleótidos detallados en la Tabla 7. Tras la obtención de estos fragmentos de DNA lineales, los cuales portan el casete de resistencia a Cm o Km, se introdujeron por electrotransformación en células competentes de las cepas UA1826 y UA1893, respectivamente y se sembró el producto de la electrotransformación en placas de LB suplementadas con el antibiótico adecuado.

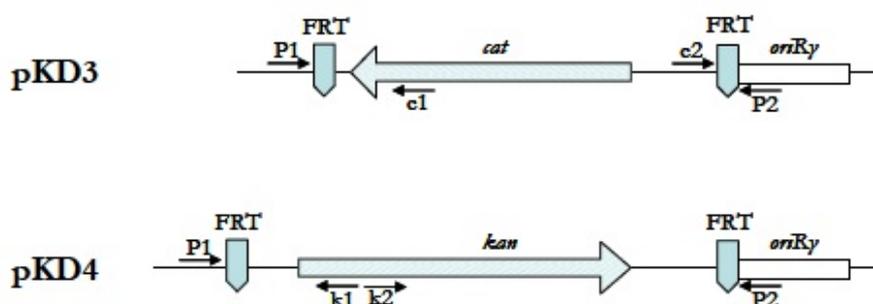


Figura 13. Detalle de las regiones de los casetes de resistencia utilizados en la técnica de inactivación génica en un paso. El plásmido pKD3 es portador de un casete de resistencia a cloranfenicol mientras que el plásmido pKD4 contiene un casete de resistencia a kanamicina. En ambos esquemas se muestran los cebadores P1 y P2 los cuales, tras añadirles colas de hibridación complementarias a la región deseada del cromosoma de *Salmonella*, fueron utilizados para la obtención del DNA lineal para su posterior electrotransformación. Asimismo se indica también la situación de los cebadores C1, C2, K1 y K2, utilizados para la comprobación de la inserción dirigida de los casetes en el cromosoma *Salmonella*.

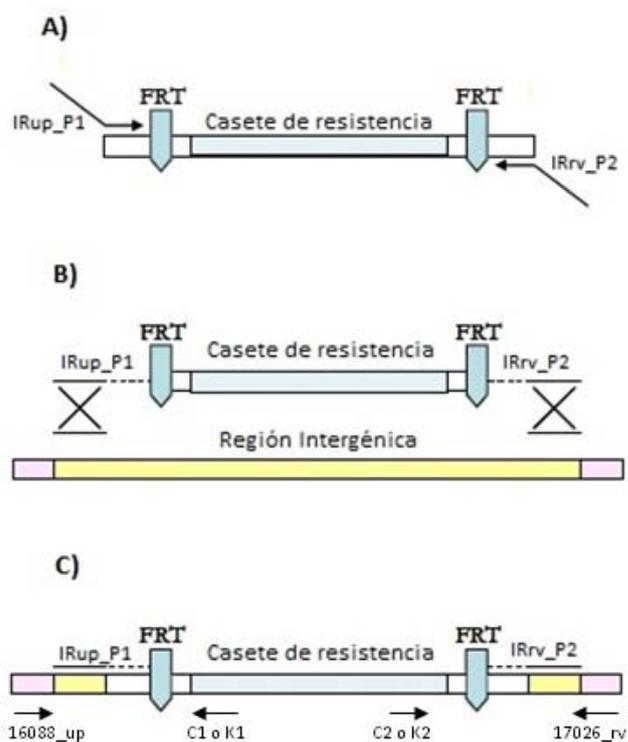


Figura 14. Representación esquemática del proceso de recombinação en la técnica de inactivación génica en un paso. A) El casete de resistencia se amplifica mediante los cebadores IRup_P1 e IRrv_P2. B) El producto amplificado contiene dicha casete y las colas complementarias a la región intergénica donde se desea que se produzca la inserción. Tras la electrotransformación de dicho producto se espera que se produzca un intercambio de DNA por doble recombinação. C) Producto final obtenido tras la doble recombinação. El casete de resistencia se ha integrado en la zona deseada del cromosoma de *Salmonella*. Para comprobar la correcta inserción se realiza una PCR desde una posición externa a la construcción y una interna. Las parejas de cebadores para realizar dicha comprobación fueron 16088_up/C1 y 17026_rv/C2 para la cepa UA1872 y las parejas 16088_up/K1 y 17026_rv/K2 para la cepa UA1894.

Tras el aislamiento de los clones resistentes a dichos antibióticos, se procedió a la curación del plásmido termosensible pKOBEGA, según se ha descrito (Datsenko *et al.*, 2000), obteniéndose finalmente las cepas UA1872 y UA1894. La comprobación de que dichas cepas contenían el casete de resistencia deseado se realizó por amplificación de la región modificada mediante PCR con las parejas de cebadores 16088_up y C1 y 17026_rv y C2 para la cepa UA1872, y con 16088_up y K1 y 17026_rv y K2 para la cepa UA1894 (Tabla 7, Figura 14).

3.5. Métodos bioinformáticos

Para el análisis de las secuencias de DNA se utilizó el paquete de programas informáticos *DNASTar* (DNASTar Inc.) y los programas y bases de datos: <http://www.ncbi.nlm.nih>, <http://ebi.ac.uk> y <http://cmr.jcvi.org>.

Los análisis para determinar los marcos abiertos de lectura (ORF) de los genomas fágicos se realizaron utilizando el programa ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>), delimitando las proteínas a partir de 25 aminoácidos. Los potenciales ORFs fueron comparados mediante la base de datos BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con las secuencias depositadas en dicha base de datos. La localización de los promotores y terminadores se llevó a cabo con las aplicaciones *FindTerm* y *BProm* de Softberry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>). Asimismo, se utilizó la aplicación Glimmer (<http://www.cbc.umd.edu/software/glimmer/>) para la detección de los mejores RBS y la dirección de internet WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) para la creación de la secuencia consenso de la caja de reconocimiento Shine-Dalgarno y de las regiones promotoras -35 y -10. Para el alineamiento de múltiples secuencias y la representación de las distancias evolutivas entre los distintos bacteriófagos se utilizó el programa *ClustalW2* del *European Bioinformatics Institute* (EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

3.6. Experimentación animal

3.6.1. Modelos animales

Los ensayos *in vivo* se realizaron en un modelo murino y en *Gallus gallus*. En ambos casos el régimen alimenticio fue *ad libitum*. Todos los experimentos realizados fueron aprobados por la CEEAH (*Comissió d'Ètica en l'Experimentació Animal i Humana*) de la UAB.

Para el modelo murino se utilizaron ratones hembra BALB/cAnNHsd de 3 semanas de edad (Harlan Iberica, Barcelona). Todos los animales pasaron una semana de cuarentena y se estabularon en grupos de 3 o 6 animales por jaula. Los animales fueron estabulados en el Servei d'Estabulari de la UAB a una temperatura de 19 a 21°C con ciclos artificiales de 12 h de luz y 12 h de oscuridad y una humedad relativa del 50-60%. La morbilidad y mortalidad se monitorizó diariamente, considerándose el criterio de punto final según el protocolo de supervisión aprobado (Tabla 8).

Para los ensayos en *Gallus gallus*, se utilizaron huevos fértiles libres de patógenos (SPF) de la estirpe White Leghorn, obtenidos de Valo Lohmann Tierzucht (Salamanca). Estos huevos fueron incubados en el estabulario de nivel de biocontención 3 del Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA). Tras la eclosión de los huevos, los animales fueron estabulados en aisladores independientes, disminuyéndose la temperatura gradualmente según los requerimientos de los animales. *Salmonella enterica* en especies aviares generalmente coloniza los animales sin morbilidad, causando muerte ocasional en animales de muy corta edad. No obstante, se monitorizó diariamente el estado de los animales sacrificándolos por dislocación cervical en caso de necesidad.

Tabla 8. Protocolo de supervisión del estado de los animales en el modelo murino

Parámetro utilizado	Valoración
Peso	Normal ¹ : 0 puntos Pérdida de peso inferior al 10%: 1 punto Pérdida de peso entre el 10% y el 20%: 2 puntos Pérdida de peso superior al 20%: 3 puntos
Aspecto	Normal: 0 puntos Pelaje en mal estado: 1 punto Pelaje en mal estado y secreciones oculares y/o nasales: 2 puntos Postura anormal, automutilaciones o vocalización indicativa de dolor: 3 puntos
Respiración	Ausencia de disnea: 0 puntos Disnea leve: 1 punto Disnea moderada: 2 puntos Disnea severa: 3 puntos
Conducta	Normal: 0 puntos Agresivo y/o comatoso: 3 puntos

¹ No hay pérdida de peso o el animal crece con normalidad

Cuando un animal obtuvo una puntuación de 3 en dos o más parámetros, se le asignó una valoración de 4 a cada parámetro. Asimismo, se estableció como criterio de punto final una puntuación igual o superior a 8 (50% de la máxima puntuación posible).

3.6.2. Determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀) de *Salmonella* en ratones

Para determinar la DL₅₀ de las cepas UA1872 y UA1894 de *Salmonella* en el modelo murino utilizado en este trabajo, se inocularon 4 grupos de 3 ratones cada uno, con dosis decrecientes de la cepa de *Salmonella* a estudiar. El inóculo se realizó resuspendiendo la biomasa celular desde placas frescas de las cepas UA1872 y UA1894, por separado, en LB líquido hasta alcanzar una A₅₅₀ de 0,2. Seguidamente, se realizaron diluciones seriadas en LB líquido, hasta conseguir las concentraciones deseadas por inóculo. La inoculación se realizó por vía oral (0,1 ml por animal) mediante una cánula recta (modelo 7.7.1 de 38 mm y 22G de Harvard Apparatus). Tras la inoculación, se registró diariamente el número de animales supervivientes y se calculó la DL₅₀ para cada cepa.

3.6.3. Recuperación de *Salmonella* de diferentes órganos de ratones

Para evaluar el proceso de infección de *Salmonella* en el modelo murino, se utilizaron 10 ratones los cuales se inocularon oralmente con 0,1 ml de las cepas de estudio a una dosis 100 veces superior a la DL₅₀. A los tiempos 0, 4, 8, 24 y 48 h de la inoculación, se sacrificaron 2 ratones y se extrajeron muestras del intestino grueso y delgado, hígado, bazo y de las placas de Peyer. Las muestras se pesaron y se homogenizaron en 0,5 ml de LB. El recuento de *Salmonella* se realizó por siembra de las diluciones de los homogenizados en placas de LB debidamente suplementadas con antibiótico según

la cepa de estudio. Las placas se incubaron a 37°C durante 18 h, tiempo tras el cual se realizó el recuento de colonias y se expresaron los resultados en cfu/g de órgano analizado.

3.6.4. Infección experimental de *Gallus gallus* con *Salmonella*

La infección experimental de *Gallus gallus* con *Salmonella*, se realizó únicamente con la cepa UA1872 siguiendo las dos metodologías que se comentan a continuación:

Infección por contacto. Se utilizó el procedimiento descrito por Fiorentin y col. (Fiorentin *et al.*, 2005), el cual simula las condiciones de infección que se dan habitualmente en las granjas. El método se basa en infectar a un reducido número de los animales de la manada y permitir que el resto se infecte por contacto. En este trabajo, se partió de dos grupos de 15 animales cada uno, de los cuales únicamente 3 de ellos fueron inoculados oralmente en su primer día de vida con 0,1 ml de la cepa UA1872 de *S. Typhimurium*. En el primer grupo la dosis fue de 10^6 cfu/animal y en el segundo de 10^8 cfu/animal. A los tres días de la inoculación se sacrificaron los tres animales infectados y 4 de los infectados por contacto. Los animales restantes fueron sacrificados en grupos de 4 a los 6 y 10 días después de la infección. Se realizó la necropsia de todos los animales para tomar muestras de hígado, bazo, intestino delgado y ciego de cada animal con el objetivo de analizar su colonización por *Salmonella*. Las muestras se pesaron, se homogenizaron en 2 ml de LB y se sembraron las diluciones en placas de XLD suplementadas con cloranfenicol. Las placas se incubaron a 37°C durante 30 h, tiempo tras el cual se realizó el recuento de colonias expresándose los resultados en cfu/g de órgano analizado.

Infección directa. El segundo método de infección experimental se basó en la inoculación de todos los animales de la manada con una dosis de 10^5 cfu/animal de la cepa UA1872. La inoculación se realizó administrando 0,1 ml por vía oral al sexto día de vida. Con este método es más probable que la infección se dé por igual en cada uno de los individuos de estudio.

3.6.5. Determinación del tiempo de residencia de los bacteriófagos en el intestino de los animales

En ambos modelos de experimentación animal, se determinó el tiempo de residencia de los bacteriófagos en el intestino grueso. En el modelo murino se inocularon 2 grupos de 10 animales con 10^8 pfu/animal y 10^{10} pfu/animal, respectivamente. Los fagos fueron diluidos en LB hasta alcanzar la concentración deseada y se administró oralmente 0,1 ml a cada animal. Se tomaron muestras de heces diariamente y se sacrificaron 2 animales a las 4 y 8 h y a los 2, 4 y 10 días de dicha administración para obtener el contenido del intestino grueso. Las muestras obtenidas se homogenizaron en 1 ml de $MgSO_4$ 10 mM, se realizaron diluciones y se determinó la concentración de los fagos por siembra en doble capa de agar. En aquellos casos en los que no se detectaron fagos, se realizó un proceso de enriquecimiento basado en la inoculación de 0,2 ml del homogenizado a un

Material y Métodos

cultivo de 3 ml de *Salmonella* en fase exponencial en LB líquido. Tras 18 h de incubación, la detección de los bacteriófagos se realizó mediante el test de la gota (Apartado 3.2.4). Para determinar el efecto de los fagos en la activación de una respuesta inmunitaria se extrajo sangre a los animales supervivientes como se describe en el apartado 3.6.8.

En el modelo *Gallus gallus*, se inocularon oralmente 12 animales en su primer día de vida con 0,1 ml de una dosis de 10^{10} pfu/animal. Los animales fueron sacrificados en grupos de 4 en los días 3, 4 y 8 tras su inoculación. Se realizó la necropsia de los animales para obtener el contenido del ciego. Las muestras se procesaron como se ha comentado previamente.

3.6.6. Estudios de terapia fágica en ratones

Para estudiar el efecto del tratamiento fágico en ratones infectados experimentalmente con *Salmonella* se diseñaron tres experimentos distintos. En todos ellos se utilizaron dos grupos de 6 ratones, los cuales fueron infectados por vía oral con 0,1 ml de la cepa UA1872 de *S. Typhimurium* o UA1894 de *S. Enteritidis* con una dosis 100 veces superior a la DL_{50} . En todos los experimentos uno de los grupos fue tratado con fagos, administrándose oralmente 0,1 ml de una mezcla 1:1:1 de los fagos UAB_Phi20, UAB_Phi87 y UAB_Phi78 a una dosis de 10^{10} pfu/animal, mientras que el otro grupo únicamente se infectó con *Salmonella*. Los tres experimentos difirieron en la pauta de administración del cóctel fágico. En el primero de ellos, el cóctel se administró 8 h antes de la infección con *Salmonella*. En el segundo, la administración de los fagos se realizó a las 4 h y a los 7 y 10 días de la infección. En el tercero, el cóctel se administró simultáneamente a la infección y a las 6, 24 y 30 h de la misma.

En todos los casos se comprobó que la muerte de los animales era debida a *Salmonella*. Para ello se tomaron muestras del intestino de los animales, se homogenizaron en 0,5 ml de LB líquido y se sembró directamente en placas de LB suplementadas con cloranfenicol o kanamicina, incubándose a 37°C durante 18 h. En los casos en los que no se obtuvo crecimiento, se realizó un enriquecimiento de *Salmonella* para proceder a su detección. Para ello, 200 µl del tejido homogenizado se incubaron en 2 ml de agua peptonada durante 18h a 37°C. Tras este tiempo se realizó una dilución 1/10 de este cultivo en 2 ml del medio selectivo Müller-Kauffmann (Merck) y se incubó a 37°C durante 24 h, tiempo tras el cual se sembró 0,1 ml en placas de LB debidamente suplementadas. Para determinar el efecto de los fagos en la activación de una respuesta inmunitaria se extrajo sangre a los animales supervivientes como se describe en el apartado 3.6.8.

3.6.7. Terapia fágica en *Gallus gallus*

Para realizar estos estudios se diseñaron 4 experimentos, utilizándose los dos métodos de infección de *Salmonella* descritos en el apartado 3.6.4. En cada experimento se utilizaron dos grupos de

animales, los cuales fueron infectados con *Salmonella* utilizando el mismo procedimiento. Uno de los grupos fue infectado con *Salmonella* y tratado oralmente con 0,1 ml del cóctel fágico compuesto por los fagos UAB_Phi20, UAB_Phi87 y UAB_Phi78 (1:1:1) a una dosis de 10^{10} pfu/animal. El segundo grupo, o grupo control, fue infectado exclusivamente con *Salmonella*. En la Tabla 9 se presenta el diseño de cada uno de estos experimentos así como la pauta de administración de los fagos y la toma de muestras.

En todos los experimentos, tras el sacrificio y necropsia de los animales, se recogieron muestras del ciego, intestino delgado, hígado y bazo. Las muestras fueron procesadas como se ha comentado anteriormente (apartado 3.6.4). En aquellas muestras en las que no se obtuvo crecimiento, se procedió a la detección de *Salmonella* según el método de enriquecimiento descrito en el apartado 3.6.6. Además, se obtuvieron periódicamente de todos los animales muestras cloacales mediante hisopos. Dichas muestras se incubaron en 2 ml de agua peptonada durante 18 h a 37°C. Tras este tiempo se realizó una dilución 1/10 de este cultivo en 2 ml del medio selectivo Müller-Kauffmann (Merck) y se incubó a 37°C durante 24 h, tiempo tras el cual se sembraron 0,1 ml en placas de XLD debidamente suplementadas para detectar la presencia de *Salmonella*.

En todos los experimentos se realizaron siembras de las diluciones de los homogenizados de los diferentes órganos en doble capa de agar en LB para determinar la concentración fágica. En caso de que no se observaran calvas, se siguió el método de enriquecimiento descrito en el apartado 3.6.5. Por lo que respecta a los hisopos cloacales, la detección de fagos se realizó mediante el test de la gota, utilizándose dicho método de enriquecimiento.

3.6.8. Obtención del suero de los animales

Para determinar el efecto de los fagos en la activación de la respuesta inmunitaria se procedió a la obtención del suero de los animales utilizados en los diferentes experimentos.

En el modelo murino, los animales fueron anestesiados, extrayéndose las muestras por sangrado axilar con una aguja de calibre 21G (BD Microlance). La sangre se recogió en un tubo de plástico inerte que se incubó en posición horizontal sin agitación a 37°C durante 1 h para permitir la coagulación. Seguidamente se traspasó el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga y se centrifugó a 3000 x g, tras lo cual, el suero obtenido fue traspasado a un nuevo tubo de microcentrífuga y conservado a -20°C.

En el modelo *Gallus gallus*, se extrajo sangre de la vena braquial del ala de cada animal por punción con una aguja de calibre 21G (BD Microlance) y se recogió en un tubo de plástico inerte. Para la obtención del suero se siguió el procedimiento comentado previamente.

Tabla 9. Diseño experimental de los estudios realizados en *Gallus gallus*.

Experimento	Método de infección	Edad de los animales ¹ (días)	Número de animales ²	Vía de administración del cóctel fágico	Pauta de administración del cóctel fágico (días) ³	Día de la eutanasia y necropsia ³
1	Contacto entre animales	3	60	Oral	4 ⁴ , 5 ⁴	4, 5, 6, 12, 19 y 26
2	Directo	5	45	Oral	-1 ⁵ , 0 ⁴ , 1 ⁴ , 2 ⁴ , 3 ⁴ , 6, 8, 10, 13, 15	1, 2, 6, 8, 10, 13, 15 y 17
3	Directo	5	45	Oral	0 ⁴ , 1 ⁴ , 2 ⁴ , 3 ⁴ , 6, 8, 10, 13, 15	1, 2, 6, 8, 10, 13, 15 y 17
4	Directo	5	35	Agua de bebida	Reemplazo del agua en los días: -1 ⁵ , 1, 3, 6, 9, 13, 16, 20	3, 6, 9, 13, 16 y 20

¹ Edad de los animales en el momento de la infección con *Salmonella*; ² En todos los casos, se separaron los animales en dos grupos de igual número de especímenes. Uno de ellos fue tratado con el cóctel fágico y el otro fue utilizado como control; ³ El día 0 corresponde al día de infección con *Salmonella*; ⁴ La administración del cóctel fágico se realizó dos veces diarias; ⁵ El día -1 corresponde al día anterior a la infección con *Salmonella*

3.7. Técnicas inmunológicas

Para determinar y cuantificar la respuesta inmunológica de los animales tras la administración de los bacteriófagos se procedió a la realización de ensayos indirectos ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) siguiendo el protocolo previamente descrito (Kutter and Kropinski, 2009). Para ello, se adsorbieron los bacteriófagos en placas de ELISA MaxiSorp (Nunc), utilizando 100 μ l de un lisado fágico a un título de 10^9 pfu/ml en tampón carbonato durante toda la noche a 4°C. El bloqueo de la placa se realizó con PBS y leche en polvo al 5% incubándose a 37°C durante 1 h. Los sueros a examinar se diluyeron en PBST y se añadieron a razón de 100 μ l por pocillo, incubándose las placas a 37°C durante 2 h. Los anticuerpos secundarios utilizados se diluyeron en PBST según las indicaciones de los proveedores y también se añadieron a razón de 100 μ l por pocillo, incubándose las placas a 37°C durante 1 h. Todos los lavados se realizaron por triplicado tras cada etapa con 200 μ l de PBS.

Para el revelado de las placas se utilizó pNPP (*p-Nitrophenyl Phosphate*, Sigma) para los anticuerpos marcados con fosfatasa alcalina o TMB (*3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine*, Sigma) para los anticuerpos conjugados con peroxidasa. Las placas se incubaron a oscuras durante 15 – 30 min y se midió la absorbancia en el lector Infinite F200 (Tecan) a 405 nm o a 630 nm para los sustratos pNPP o TMB, respectivamente.

3.8. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos en los estudios de supervivencia de los ratones se realizó utilizando el test Mantel-Cox (*logrank*). En los estudios con el modelo de *Gallus gallus* se utilizaron test estadísticos no paramétricos (test de Mann-Whitney-Wilcoxon) para determinar la significancia del tratamiento fágico aplicado. Estos estudios fueron realizados por el Servei d'Estadística de la UAB.

4. Resultados

4.1. Aislamiento y selección de nuevos bacteriófagos

La ubicuidad de los bacteriófagos, no únicamente en el medio ambiente, sino también en los animales y alimentos, permite que su obtención sea un proceso relativamente fácil. El primer objetivo de este trabajo fue el aislamiento de bacteriófagos específicos de *Salmonella* desde muestras de heces de aves de granjas españolas, obtenidas durante los años 2007 y 2008. Para incrementar las posibilidades de aislamiento se procedió a un proceso de enriquecimiento y selección de *Salmonella* en dichas muestras. Finalmente, de un total de 86 muestras analizadas, se aislaron 22 bacteriófagos los cuales fueron debidamente purificados.

Debido al interés de utilizar los bacteriófagos aislados como agentes de control contra *Salmonella*, fue imprescindible seleccionar aquellos fagos líticos que presentaran un mayor rango de huésped dentro del género *Salmonella*. Por ello, y dado que actualmente las dos serovariedades con mayor prevalencia a nivel humano y aviar son *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* (EFSA, 2011), se determinó la capacidad de infección de todos los fagos líticos que se habían aislado en dichas serovariedades. El espectro de infección, determinado sobre 49 cepas de *S. Typhimurium* y 18 de *S. Enteritidis* no relacionadas clonalmente (Tabla 5) mediante el test de la gota (Tabla 10), permitió diferenciar claramente a aquellos fagos que presentaban un rango de huésped muy limitado de aquellos que tenían un rango más amplio. En función de los resultados obtenidos, se seleccionaron para estudios posteriores a los fagos C2, C14, C20, C72, C80 y C87, los cuales presentan un rango de infección superior al 77% y, en conjunto, son capaces de lisar a 66 de las 67 cepas bacterianas utilizadas.

Seguidamente se procedió a comparar la cinética de infección de los bacteriófagos seleccionados utilizando una MOI de 1. A tal efecto, se infectaron cultivos al inicio de la fase exponencial de las cepas *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Enteritidis* LK5 con cada uno de los fagos seleccionados y se determinó la A_{550} de dichos cultivos a lo largo del tiempo. Los resultados obtenidos (Figura 15) revelaron la elevada capacidad lítica de todos los fagos sobre ambas serovariedades, con excepción del fago C14 sobre la cepa LK5 de *S. Enteritidis* (Figura 15, panel B). Cabe destacar que de entre todos los fagos estudiados, el C20 fue el que causó un mayor y más rápido descenso de la A_{550} de los cultivos de ambas serovariedades, mientras que la infección con el fago C87 fue la que mantuvo valores más bajos de la A_{550} de los cultivos durante un periodo de tiempo más prolongado. Es importante mencionar que en todos los casos se observó un aumento de la absorbancia a partir de la quinta hora de la infección, aunque este efecto no fue tan evidente en la serovariedad *Enteritidis*, sobre la cual el efecto lítico de los fagos fue, generalmente, algo más prolongado.

Tabla 10. Patrón de infección de los fagos aislados sobre cepas de *Salmonella* no relacionadas clonalmente.

Fago	C74	C73	C28	C23	C22	C21	C25	C13	C19	C69	C2	C80	C61	C86	C45	C17	C14	C20	C18	C87	C82	C72	
1																							
16																							
124																							
421																							
887																							
976																							
3360																							
S4426																							
S4354																							
S5832																							
S5833																							
S6254																							
M686																							
MG98																							
4516																							
5419																							
J10.2 CP/96																							
5833																							
55827																							
55857																							
55801																							
55812																							
55974																							
6231																							
6269																							
D20.9 CP/99																							
7627																							
7320																							
7653																							
7987																							
8429																							
J11.16 CP/01																							
8647																							
8880																							
9208																							
8695																							
8862																							
9222																							
9434																							
9849																							
9813																							
10182																							
10127																							
10082																							
10175																							
1992/F06																							
1557/F06																							
1711/F06																							
1624/F06																							
65																							
951																							
F20.5 CP/94																							
0/20.9 CG/98																							
6824																							
7129																							
7385																							
7358																							
7593																							
7616																							
8044																							
8419																							
9310																							
9451																							
9449																							
9609																							
2123/F06																							
1861/F06																							

Cepa

S. Typhimurium (■) y S. Enteritidis (■)

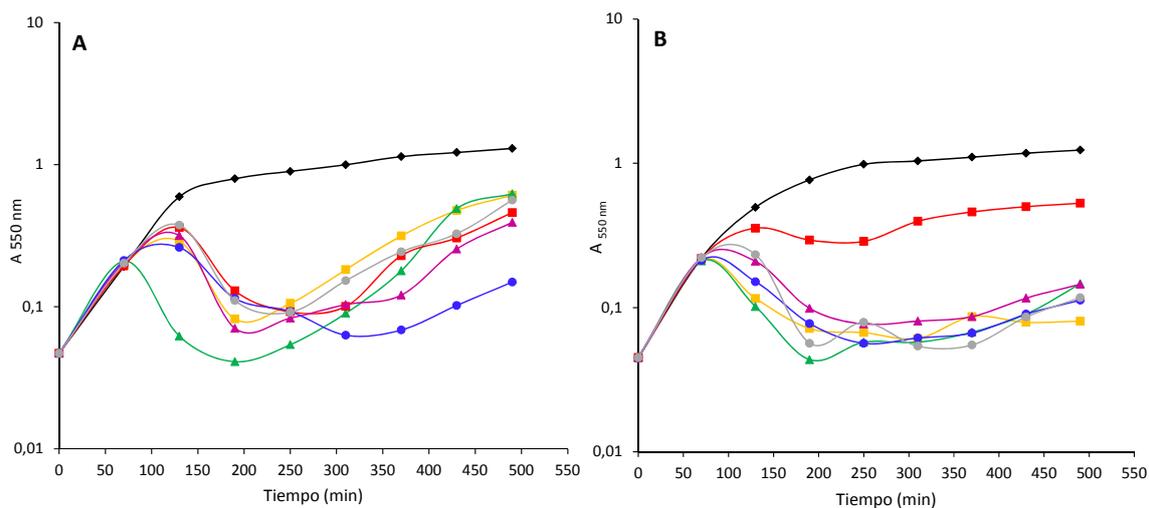


Figura 15. Cinética de infección a 37°C de los bacteriófagos C2 (■), C14 (■), C20 (▲), C72 (▲), C80 (●) y C87 (●) sobre *S. Typhimurium* ATCC 14028 (panel A) y *S. Enteritidis* LK5 (panel B). Se muestra la A_{550} de los cultivos no infectados (◆).

Finalmente, se analizaron los patrones de restricción del genoma de los fagos seleccionados (C2, C14, C20, C72, C80 y C87) para analizar su similitud. A tal efecto, se extrajo el DNA de todos los fagos y se digirió con las enzimas de restricción *Hind*III y *Eco*RI, considerándose patrones distintos aquellos que presentaran una o más bandas de diferencia. Los resultados obtenidos (Figura 16) mostraron que todos los fagos presentaban patrones de restricción distintos, si bien los fagos C2, C20, C14 y C80, así como los fagos C87 y C72, podrían estar estrechamente relacionados entre ellos dada la elevada similitud de los patrones de bandas obtenidos.

4.2. Caracterización de los bacteriófagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87

Los resultados obtenidos tras el análisis del rango de huésped de los fagos, sus cinéticas de infección y sus perfiles de restricción permitieron seleccionar, como candidatos para terapia fágica, a los fagos C20 y C87, los cuales pasaron a denominarse UAB_Phi20 y UAB_Phi87, respectivamente. Seguidamente, se procedió a su caracterización, estudiando su morfología y tamaño, su ciclo lítico, su mecanismo de empaquetamiento y su estabilidad a distintas condiciones ambientales.

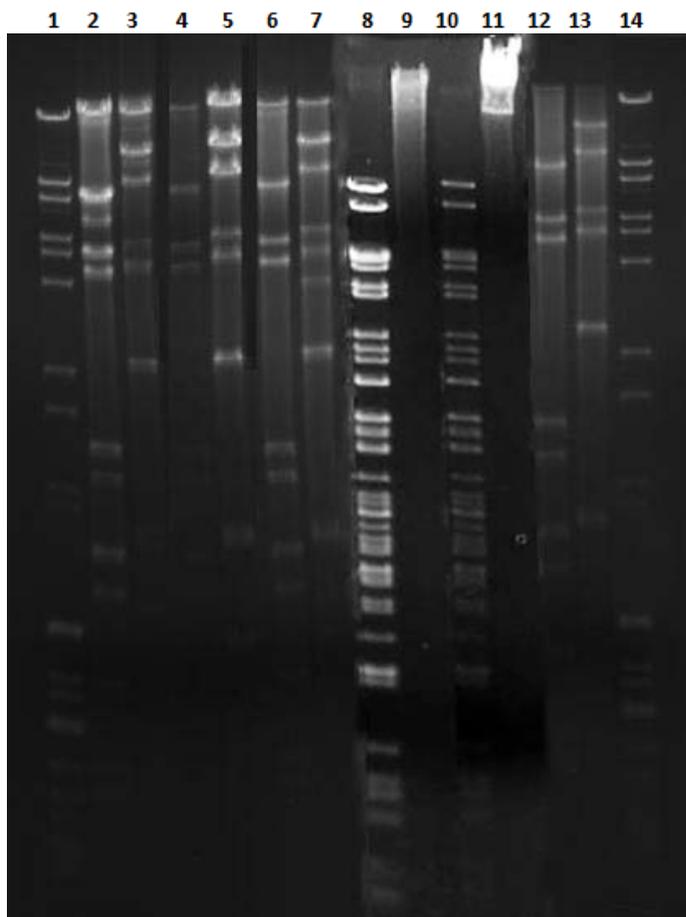


Figura 16. Patrón de restricción de los fagos C2 (carriles 2 y 3), C20 (carriles 4 y 5), C14 (carriles 6 y 7), C72 (carriles 8 y 9), C87 (carriles 10 y 11) y C80 (carriles 12 y 13) digeridos con las enzimas *Hind*III (carriles pares) y *Eco*RI (carriles impares). Los carriles 1 y 14 corresponden al patrón de tamaño de bandas correspondiente al DNA del fago λ cortado con *Bst*EII junto con el DNA del fago ϕ X174 cortado con *Hin*fl.

4.2.1. Morfología de los bacteriófagos y tamaño de sus genomas

Mediante microscopía electrónica de transmisión de una tinción negativa del bacteriófago UAB_Phi20, se observó que posee una cápside icosaédrica ($60 \pm 1,5$ nm) y una cola corta no contráctil ($13 \pm 0,7$ nm) (Figura 17, panel A), características propias de la familia *Podoviridae* (Ackermann, 1998). En referencia al fago UAB_Phi87, se determinó que posee una cápside icosaédrica de mayor tamaño ($68 \pm 2,7$ nm) y una cola larga ($114 \pm 4,3$ nm) (Figura 17, panel B) que lo clasifica dentro de las familias de cola larga del orden *Caudovirales* (Ackermann, 1998).

La determinación del tamaño de los genomas de ambos fagos se realizó mediante PFGE. Según se observa en la Figura 18, el tamaño del genoma de los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87 fue, aproximadamente, de 32,3 Kb y 84,9 Kb, respectivamente.

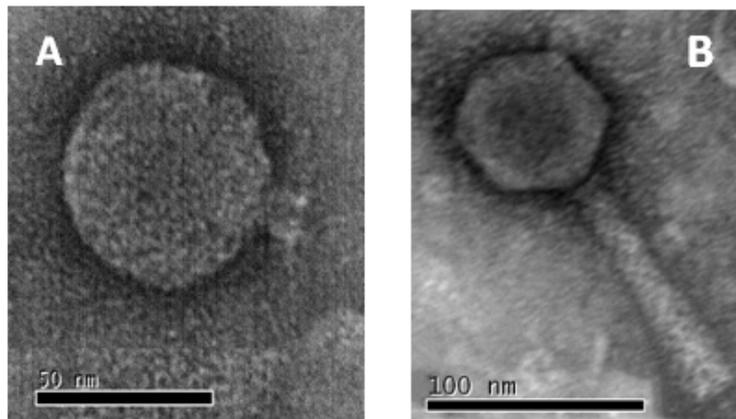


Figura 17. Microfotografía electrónica de los bacteriófagos UAB_Phi20 (Panel A) y UAB_Phi87 (Panel B).

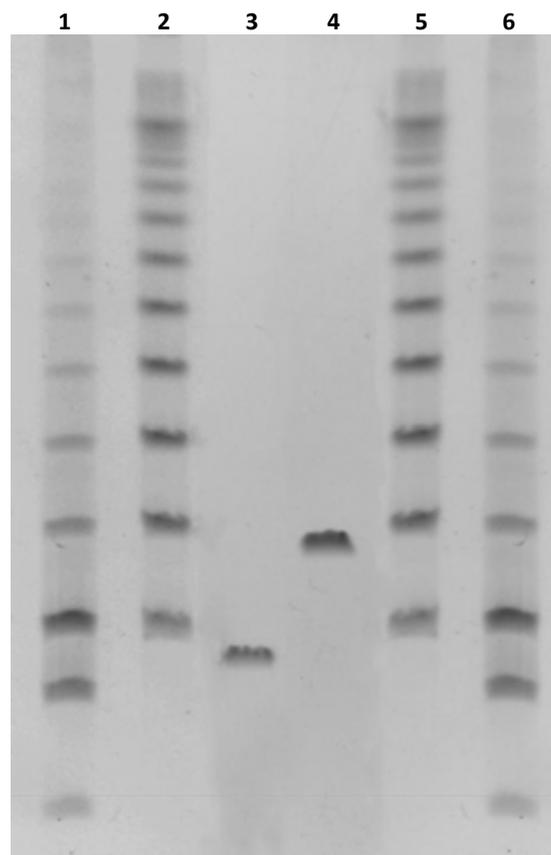


Figura 18. Campo pulsante del DNA de los fagos UAB_Phi20 (carril 3) y UAB_Phi87 (Carril 4). Los carriles 1 y 6 corresponden al patrón de tamaño de bandas Lambda Ladder PFG y los 2 y 5 al Low range PFG.

4.2.2. Parámetros del ciclo lítico

Como se ha comentado anteriormente, el primer paso en la infección fágica es el reconocimiento y la adsorción del fago a los receptores de su huésped. Este proceso viene definido por la constante de adsorción, la cual es un valor característico de cada pareja fago/bacteria y puede variar en función de las condiciones fisiológicas del huésped, de la MOI y de factores físico-químicos tales como la temperatura, el pH y la presencia de determinadas sustancias o iones en el medio (Gill, 2010). La determinación de este parámetro para los dos fagos seleccionados se realizó frente a *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Enteritidis* LK5. Los resultados obtenidos (Tabla 11) mostraron que las constantes de adsorción del fago UAB_Phi20 fueron prácticamente las mismas frente a ambas serovariedades. En cambio, si bien el fago UAB_Phi87 presentó una constante de adsorción similar a la de UAB_Phi20 para *S. Typhimurium*, su constante de adsorción en *S. Enteritidis* fue algo menor.

Tabla 11. Parámetros del ciclo lítico de los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87.

Parámetro	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028		<i>S. Enteritidis</i> LK5	
	UAB_Phi20	UAB_Phi87	UAB_Phi20	UAB_Phi87
Constante de adsorción (ml cfu ⁻¹ min ⁻¹)	1,2x10 ⁻⁹	1,1x10 ⁻⁹	1,5x10 ⁻⁹	9,3x10 ⁻¹⁰
Tiempo de eclipse (min)	38	46	32	35
Tiempo de latencia (min)	46	58	42	40
Tamaño de explosión (pfu/cfu)	95	55	3,6	5

La obtención de información más precisa de los eventos que ocurren durante la infección fágica es posible mediante el experimento de la curva de crecimiento viral en escalón (*one step growth curve*), diseñado por Ellis y Delbrück y posteriormente modificado por Doermann. Este experimento permite determinar el tiempo de latencia, el de eclipse y el tamaño de explosión. En la Tabla 11 se presentan estos parámetros para ambos fagos al infectar *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Enteritidis* LK5. En esta última serovariedad ambos fagos presentaron tiempos de latencia y eclipse muy parecidos entre ellos e inferiores a los obtenidos en *S. Typhimurium*, pero la producción vírica de ambos fagos fue muy baja. En la serovariedad *Typhimurium*, el fago UAB_Phi87 presenta mayores tiempos de latencia y de eclipse que los del fago UAB_Phi20, si bien el tamaño de explosión es menor (Tabla 11).

4.2.3. Mecanismo de empaquetamiento del DNA

Como se ha comentado en la Introducción de esta Memoria, la replicación fágica termina con la acumulación de concatámeros de DNA que deben ser cortados y empaquetados en las nuevas cápsides víricas. Para deducir el tipo de empaquetamiento de los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87, se digirió el DNA de ambos fagos y se procedió a comparar el patrón de restricción obtenido tras someter o no el DNA cortado a una desnaturalización por temperatura.

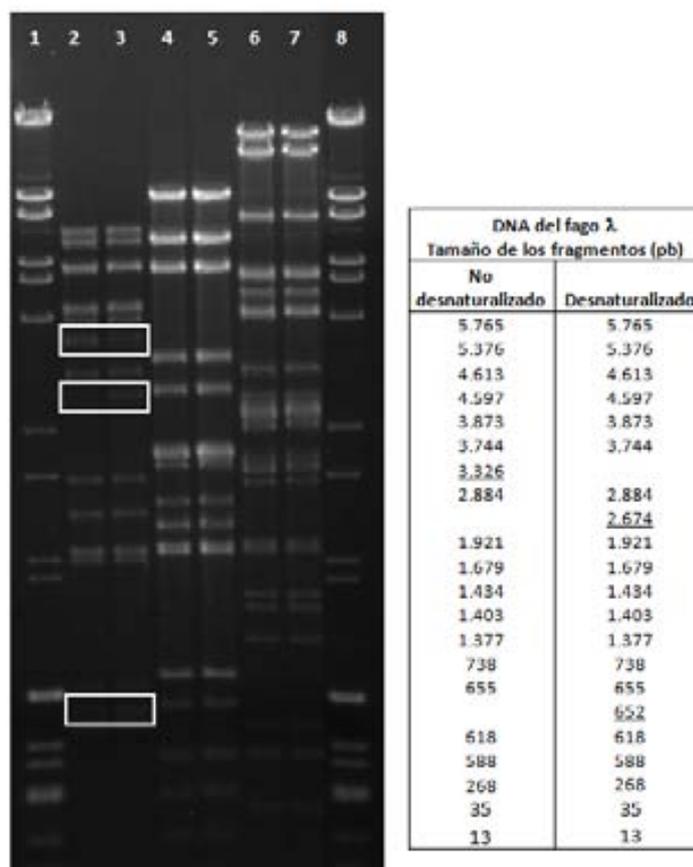


Figura 19. Determinación de la presencia de extremos *cos* en el genoma de los fagos UAB_Phi20 (carriles 4 y 5), UAB_Phi87 (carriles 6 y 7) y λ como control (carriles 2 y 3) mediante restricción con la enzima *EcoRV*. Los carriles 2, 4 y 6 corresponden a la muestra no desnaturalizada mientras que los carriles 3, 5 y 7 a la desnaturalizada. Los patrones de tamaño de bandas, DNA del fago λ cortado con *BstEII* junto con el DNA del fago ϕ X174 cortado con *Hinfl*, se muestran en los carriles 1 y 8. En la tabla, se indican los tamaños de los fragmentos obtenidos de la digestión del genoma del fago λ con el programa MapDraw (DNASTAR Inc.). El fragmento generado por la unión de los extremos *cos* y los generados tras su desnaturalización se subrayan en la tabla y se indican con un recuadro en la imagen.

La comparación del patrón de bandas debe mostrar diferencias si el fago posee extremos cohesivos. Como puede observarse en la Figura 19, el patrón de restricción del DNA de Lambda cortado y desnaturalizado presenta una banda menos intensa de 3,3 kb que el patrón de restricción del DNA no desnaturalizado. Dicha banda corresponde al fragmento de DNA que se forma entre los fragmentos que contienen los extremos *cos* del DNA del fago. Además, en el patrón de restricción del DNA desnaturalizado, también se observan dos nuevas bandas de 2,6 kb y 652 pb, correspondientes a la separación de los fragmentos con los extremos *cos*. Los resultados obtenidos al realizar este estudio con los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87, indicaron que su patrón de restricción no varía (Figura 19). Consiguientemente, ninguno de ellos posee extremos cohesivos y, por tanto, su mecanismo de empaquetamiento se produce por llenado de la cápside.

4.2.4. Efecto del pH y de la temperatura en la estabilidad fágica

Un aspecto relevante de los fagos que pueden ser utilizados en terapia fágica es su estabilidad en los distintos ambientes en los que deben ser aplicados y almacenados (Gill, 2010). Por ello, se determinó el efecto del pH y la temperatura en la estabilidad de los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87. Como puede observarse en la Tabla 12, ambos fagos mantienen su capacidad infectiva a valores de pH comprendidos entre 4 y 9, mientras que a las 2 h de mantenerlos a pH extremadamente ácido (pH 2), el fago UAB_Phi20 ve disminuida su infectividad en 4 Log₁₀ mientras que para el fago UAB_Phi87 esta disminución es de más de 7 Log₁₀, hecho que muestra una mayor sensibilidad de este último fago al pH.

Tabla 12. Infectividad de los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87 tras su exposición a diferentes pH a lo largo del tiempo.

Fago	Valor de pH	Reducción (Log ₁₀ pfu/ml)			
		Tiempo de exposición (min)			
		30	60	90	120
UAB_Phi20	2	1,7	2,5	3,3	4,4
	4	0	0	0	0,8
	6	0	0	0,03	0,05
	9	0	0,03	0,06	0,06
UAB_Phi87	2	3,4	6,3	7,5	7,9
	4	0,5	0,6	0,6	1,2
	6	0	0	0	0,05
	9	0	0,04	0,07	0,2

La estabilidad de ambos fagos a distintas temperaturas resultó ser óptima. Así, la incubación de ambos fagos a 30°C y a 37°C prácticamente no alteró su capacidad infectiva, aunque tras 7 días a 42°C se obtuvo un descenso de la infectividad de ambos fagos cercano a 1 Log₁₀, siendo un poco mayor este descenso para el fago UAB_Phi87 (Tabla 13). Asimismo, el estudio de la estabilidad de estos fagos a 4°C durante un año mostró su elevada estabilidad ya que mantuvieron su título sin variaciones apreciables (Tabla 14).

Tabla 13. Infectividad de los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87 a diferentes temperaturas a lo largo del tiempo.

Fago	Temperatura (°C)	Reducción (Log ₁₀ pfu/ml)						
		Tiempo (días)						
		1	2	3	4	5	6	7
UAB_Phi20	30	0	0	0,02	0,03	0,04	0,04	0,04
	37	0,2	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5
	42	0,4	0,6	0,6	0,7	0,8	0,8	0,9
UAB_Phi87	30	0,06	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
	37	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	42	0,7	0,8	0,8	1,0	1,3	1,3	1,3

Tabla 14. Infectividad de los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87 mantenidos a 4°C.

Tiempo de conservación (meses)	Reducción (Log ₁₀ pfu/ml)	
	UAB_Phi20	UAB_Phi87
2	0	0
4	0,1	0,1
6	0,2	0,3
12	0,2	0,3

4.3. Genómica del fago UAB_Phi20

4.3.1. Estrategia de secuenciación

La secuenciación del genoma del fago UAB_Phi20 fue realizada por Sistemas Genómicos, empleando la técnica de rotura mecánica y con una redundancia de 5 a 6 lecturas para cada posición nucleotídica. La secuencia obtenida fue depositada en el GenBank bajo el número de acceso GQ422450.

4.3.2. Análisis de la secuencia genómica

El análisis de la secuencia indicó que el tamaño del genoma del fago UAB_Phi20 es de 41.809 pb, valor sustancialmente superior al estimado mediante PFGE, con un porcentaje GC del 47,2%. El análisis de los ORFs presentes en el genoma del fago UAB_Phi20, así como su traducción a secuencias aminoacídicas, se realizó mediante el programa ORF Finder (NCBI), fijando un tamaño mínimo de polipéptido de 25 aa. Siguiendo esta estrategia se predijo la existencia de 80 genes. Se analizó la similitud de las secuencias proteicas con las existentes en los bancos de datos utilizando el programa

BlastP (NCBI) (Tabla 15). El análisis del genoma del fago UAB_Phi20 reveló una elevada homología con el fago P22 y con otros fagos tipo P22. En función de ello y de la morfología observada, se clasificó a este fago en el grupo de los fagos tipo P22.

4.3.2.1. Análisis de los promotores

Dado el elevado nivel de compactación de los genomas fágicos, muchos de los promotores se encuentran solapados en regiones codificantes. Por ello, se buscaron posibles promotores mediante el programa BPPROM (Softberry), limitando la búsqueda a una distancia máxima de 100 pb respecto al inicio de los posibles genes del fago UAB_Phi20. Así, se detectaron 12 promotores hipotéticos (Tabla 16), los cuales presentan muy conservada la secuencia consenso -10 (TATAAT), si bien en la caja -35 (TTGACA) sólo se conservan claramente la segunda T y la G (Figura 20).

4.3.2.2. Control traduccional

Se identificó claramente el codón de inicio de traducción de los 80 genes predichos ya que todos ellos presentaban el codón ATG, a excepción del gen *Phi20p80*, el cual mostraba TTG como codón de inicio. En referencia a los codones de final de traducción, los tres se encuentran presentes, si bien el codón TAA, presente en el 56,3% de los genes, es el mayoritario, mientras que el codón TGA se halla presente en el 36,2% y el codón TAG en el 7,5% restante.

Tabla 15. Análisis comparativo de los productos génicos codificados en el genoma del fago UAB_Phi20

Orf	Gen		Producto génico		Secuencia con mayor similitud			
	Inicio	Final	Aa	Producto	Función Propuesta	Proteína (origen)	Valor e	Nº acceso
1	27	173	48	Phi20p1		Proteína hipotética (fago P22)	8,00E-19	NP_059609.1
2	166	981	271	Gp18	Proteína de replicación. Primasa	P22gp51 (fago P22)	4,00E-159	NP_059610.1
3	978	2354	458	Gp12	Proteína de replicación. Helicasa	P22gp52 (fago P22)	0	NP_059611.1
4	2351	2431	26	NinA		NinA (fago Lambda)	3,00E-05	YP_063725.1
5	2428	2865	145	NinB		NinB (<i>Salmonella</i> Heidelberg str. SL486)	4,00E-80	ZP_032224164.1
6	2862	3035	57	NinD		NinD (fago P22)	9,00E-27	YP_063726.1
7	3002	3178	58	NinE		NinE (fago P22)	4,00E-26	NP_059614.1
8	3175	3513	112	NinX		NinX (fago P22)	8,00E-61	NP_059615.1
9	3506	3682	58	NinF		NinF (fago P22)	1,00E-25	YP_063727.1
10	3672	4286	203	NinG		NinG (fago P22)	2,00E-114	YP_063728.1
11	4283	4507	74	NinY		NinY (fago P22)	2,00E-37	NP_059618.1
12	4504	4707	67	NinH		NinH (fago P22)	6,00E-32	NP_059619.1
13	4688	4867	59	NinZ		NinZ (fago P22)	2,00E-26	YP_063729.1
14	4864	5487	207	23	Proteína antiterminadora	Q (fago P22)	3,00E-120	YP_063730.1
15	5577	5786	69	Phi20p15		Proteína hipotética (fago Epsilon34)	2,00E-31	YP_002533523.1
16	5809	5913	34	Phi20p16				
17	5922	6248	108	Gp13	Holína	13 (fago P22)	2,00E-55	NP_059621.1
18	6229	6669	146	Gp19	Endolisina	19 (fago P22)	6,00E-80	NP_059622.1
19	6804	7103	99	Gp15	Endopeptidasa	15 (fago P22)	8,00E-51	NP_059623.2
20	6838	7050	70	Rz1	Proteína de lisis	Rz1 (fago P22)	8,00E-27	YP_063732.1
21	7144	7329	61	Phi20p21				
22	7322	7858	178	Rha		Rha (fago P22)	2,00E-102	NP_059624.1
23	7940	8296	118	Phi20p23		ORF 118 (fago ST64T)	7,00E-59	NP_720322.1
24	8300	8689	129	Phi20p24		ORF 129 (fago ST64T)	5,00E-72	NP_720323.1
25	8689	9093	134	Phi20p25		ORF 134 (fago ST64T)	4,00E-71	NP_720324.1
26	9097	9585	162	Gp3	Subunidad pequeña de la terminasa	Gp3 (fago ST64T)	2,00E-91	NP_720325.1
27	9737	11062	441	Gp2	Subunidad mayor de la terminasa	Gp2 (fago ST104)	0	YP_006405
28	11062	13239	725	Gp1	Proteína portal	Gp1 (fago ST104)	0	YP_006406.1

Tabla 15. Continuación

Gen			Producto génico		Secuencia con mayor similitud			
Orf	Inicio	Final	Aa	Producto	Función Propuesta	Proteína (origen)	Valor e	Nº acceso
29	13253	14164	303	Gp8	Proteína mayoritaria de la pro-cápside	Gp8 (fago P22)	3,00E-174	YP_063736.1
30	14164	15456	430	Gp5	Proteína mayoritaria de la cápside	Proteína de la cápside (S. Paratyphi str. AKU_12601)	0	YP_002143075.1
31	15495	15704	69	Phi20p31				
32	15688	16188	166	Gp4	Proteína estabilizadora del DNA en el empaquetamiento	Proteína hipotética (fago P22)	5,00E-31	NP_059631.1
33	16148	17566	472	Gp10	Proteína estabilizadora del DNA en el empaquetamiento	Gp4 (fago P22)	2,00E-94	NP_059632.1
34	17570	18271	233	Gp26	Proteína estabilizadora del DNA en el empaquetamiento	Gp10 (fago P22)	0	NP_059633.1
35	18271	18726	151	Gp14	Proteína de ensamblaje de la cápside	Gp26 (fago P22)	4,00E-130	YP_063715.1
36	18729	19418	229	Gp7	Proteína de inyección del DNA	Gp14 (fago P22)	1,00E-85	YP_063716.1
37	19429	20844	471	Gp20	Proteína de inyección del DNA	Gp7 (fago P22)	6,00E-122	YP_063717.1
38	20844	22673	609	Gp16	Proteína de inyección del DNA	Gp20 (fago P22)	0	NP_059637.1
39	23406	22696	236	SieA	Proteína de exclusión de la superinfección	Gp16 (fago P22)	0	YP_063718.1
40	23221	23586	121	Phi20p40		SieA (fago P22)	3,00E-87	NP_059639.1
41	23794	23600	64	Phi20p41		Proteína hipotética (fago HK620)	1,00E-66	NP_112089.1
42	24130	23879	83	Mnt	Represor: mantenimiento de la lisogenia	Proteína hipotética (Fago P22)	2,00E-25	NP_059640.1
43	24158	24382	74	Arc	Represor transcripcional	Mnt (Fago P22)	1,00E-41	NP_059641.1
44	24451	25353	300	Ant	Proteína antirepresora	Arc (E. coli MS 16-3)	1,00E-35	EFU59036.1
45	25564	27567	667	Gp9	Proteína de la cola con actividad endorhamnosidasa	Ant (Fago P22)	3,00E-177	NP_059643.1
46	28858	27626	410	GtrC	Conversión lisogénica del antígeno O- Glucosil transferasa	Gp9 (Fago P22)	0	NP_059644.1
47	28879	28983	34	Phi20p47		GtrC (Fago P22)	0	YP_063719.1

Tabla 15. Continuación

Gen				Producto génico		Secuencia con mayor similitud		
Orf	Inicio	Final	Aa	Producto	Función Propuesta	Proteína (origen)	Valor e	Nº acceso
48	30050	29073	325	GtrB	Conversión lisogénica del antígeno O- Bactoprenol glucosil transferasa	GtrB (Fago ST64T)	0	NP_720276.1
49	30364	30002	120	GtrA	Conversión lisogénica del antígeno O- Translocasa	GtrA (Fago P22)	3,00E-63	NP_059583.1
50	30538	30660	40	Phi20p50				
51	31876	30713	387	Int	Integrasa	Int (Fago P22)	0	NP_059584.1
52	32103	31753	116	Xis	Escisionasa	Xis (Fago P22)	4,00E-62	NP_059585.1
53	32741	32106	211	EaC		EaC (Fago P22)	4,00E-121	YP_063720.1
54	33021	32842	60	EaG		EaG (Fago P22)	3,00E-26	NP_059587.1
55	34071	33118	317	EaA		EaA (Fago P22)	0	NP_059588.1
56	34269	34075	64	Eal		Eal (Fago P22)	5,00E-28	NP_059589.1
57	35147	34266	293	Phi20p57				
58	35726	35217	169	Phi20p58		ORF9 (Fago ST104)	2,00E-93	YP_006365.1
59	35893	35723	56	Phi20p59		ORF10 (Fago ST104)	3,00E-25	YP_006366.1
60	36197	35904	97	Abc2	Anti Rec-BCD	Abc2 (Fago ST104)	2,00E-49	YP_006367.1
61	36528	36244	94	Abc1	Anti Rec-BCD	Abc1 (Fago ST104)	1,00E-48	YP_006368.1
62	37235	36528	235	Erf	Proteína de recombinación	ORF13 (Fago ST104)	9,00E-137	YP_006369.1
63	37375	37232	47	Arf	Proteína de recombinación	Arf (Fago P22)	2,00E-18	NP_059597.1
64	37553	37365	62	Kil	Inhibidor de la formación del septo celular	Kil (Fago P22)	1,00E-29	NP_059598.1
65	37692	37534	52	C3	Proteína reguladora	C3 (Fago P22)	1,00E-22	NP_059599.1
66	38089	37778	103	17	Proteína de exclusión de la superinfección	17 (Fago P22)	1,00E-54	NP_059600.1
67	38040	38159	39	Phi20p67				
68	38440	38237	67	Phi20p68		Proteína hipotética (Fago P22)	6,00E-32	CAA33649.1
69	38676	38440	78	Phi20p69		Proteína hipotética (Fago P22)	7,00E-37	NP_059602.1
70	38773	38648	41	Phi20p70				
71	38907	38713	64	Ral	Proteína de antirestricción	Ral (Fago P22)	7,00E-29	NP_059603.1

Tabla 15. Continuación

Orf	Gen		Producto génico		Secuencia con mayor similitud			
	Inicio	Final	Aa	Producto	Función Propuesta	Proteína (origen)	Valor e	Nº acceso
72	38977	38891	28	Phi20p72		Proteína hipotética (Fago Lambda)	6,00E-06	NP_040623.1
73	38945	39700	251	SieB	Proteína de exclusión de la superinfección	SieB (Fago P22)	2,00E-109	NP_059604.1
74	40023	39721	100	24	Proteína antiterminadora	24 (Fago P22)	4,00E-51	NP_059605.1
75	40043	40255	70	Phi20p75				
76	41027	40377	216	C2	Proteína represora	C2 (Fago P22)	2,00E-124	NP_059606.1
77	41108	41293	61	Cro	Proteína antirepresora	Cro (Fago P22)	2,00E-27	NP_059607.1
78	41354	41241	37	Phi20p78				
79	41400	41678	92	C1	Activador transcripcional	C1 (Fago P22)	2,00E-46	NP_059608.1
80	41668	41808	46	Phi20p80				

Tabla 16. Localización de las posibles secuencias promotoras del fago UAB_Phi20.

Posición	Caja -35	Caja -10	Gen 5'	Gen 3'
933	gtgata	agctaattt	<i>gp18</i>	<i>gp12</i>
7108	ctgcag	gcttaaaat	<i>rz1</i>	<i>Phi20p21</i>
7633	tttaat	cgtaaaga	<i>rha</i>	<i>Phi20p23</i>
13210	ttgcca	agacaaaat	<i>gp1</i>	<i>gp8</i>
18214	ctgaaa	tgctctaata	<i>gp26</i>	<i>gp14</i>
28905	ttggcg	tcctttatt	<i>Phi20p47</i>	<i>gtrC</i>
30455	ttgatc	atgtataat	<i>gtrB</i>	<i>Phi20p50</i>
30471	ttgatc	aattaacat	<i>Phi20p50</i>	<i>gtrA</i>
31952	ttgatg	tctcaagat	<i>xis</i>	<i>int</i>
35834	ttgaaa	cttaaaaat	<i>Phi20p59</i>	<i>Phi20p58</i>
37641	ttttca	agtgagtat	<i>cIII</i>	<i>kil</i>
38509	ttgtcg	ggtcacatt	<i>Phi20p68</i>	<i>Phi20p67</i>
38901	ttcaca	ttgtatcaa	<i>Phi20p72</i>	<i>sieB</i>



Figura 20. Logo de las secuencias consenso -35 y -10 de los promotores del fago UAB_Phi20.

Como se ha comentado previamente, el porcentaje de GC del fago UAB_Phi20 es del 47,2%, valor algo inferior al 52,2% de *Salmonella*. Analizando el uso de codón del fago en cuestión y de su huésped, mediante la aplicación *countcodon output* de la página web <http://www.kazusa.or.jp/codon> (Tablas 17 y 18), se observó una clara disminución del porcentaje de GC en la primera y última posición del triplete en el genoma del fago, lo cual puede explicar la diferencia en el porcentaje de GC entre el genoma de *Salmonella* y el del fago.

Los mejores sitios RBS se detectaron mediante el programa RBS Finder (Glimmer). La alineación de las secuencias con el programa Weblogo mostró una conservación parcial de los RBS del fago UAB_Phi20 respecto a la secuencia consenso Shine-Dalgarno (AGGAGG) (Figura 21). Es importante mencionar que la distancia de esta secuencia consenso respecto al inicio de la traducción no se conserva en todos los genes. Así, en determinados genes esta distancia es únicamente de 7 pb mientras que en otros se amplía hasta los 40 pb.

Tabla 17. Uso de codón del fago UAB_Phi20 y de su huésped *Salmonella*.

		U		C		A		G					
U	Phe	22	<i>21,5</i>	Ser	15	<i>8,4</i>	Tyr	17,4	<i>16,4</i>	Cys	12	<i>4,7</i>	U
	Phe	18,7	<i>15,3</i>	Ser	13,1	<i>10,7</i>	Tyr	11,4	<i>11,7</i>	Cys	15,9	<i>6,2</i>	C
	Leu	15,8	<i>13,2</i>	Ser	21	<i>8</i>	STOP	14	<i>1,8</i>	STOP	17,9	<i>1,2</i>	A
	Leu	15,6	<i>12,1</i>	Ser	13,3	<i>9,5</i>	STOP	6,5	<i>0,3</i>	Trp	16,9	<i>14,3</i>	G
C	Leu	14	<i>12,2</i>	Pro	12,6	<i>8</i>	His	16,3	<i>12,1</i>	Arg	12,5	<i>18,1</i>	U
	Leu	10,8	<i>11</i>	Pro	7,4	<i>7,2</i>	His	10,7	<i>9,4</i>	Arg	17	<i>21,2</i>	C
	Leu	9,8	<i>4,7</i>	Pro	16,9	<i>6,6</i>	Gln	21,1	<i>12,6</i>	Arg	12,8	<i>4,3</i>	A
	Leu	18,4	<i>49,3</i>	Pro	12,1	<i>22,6</i>	Gln	24	<i>30,5</i>	Arg	10,9	<i>7,9</i>	G
A	Ile	20,9	<i>27,4</i>	Thr	12,2	<i>8,2</i>	Asn	21,8	<i>19,1</i>	Ser	10,6	<i>8,6</i>	U
	Ile	16,9	<i>24</i>	Thr	15	<i>23,6</i>	Asn	23	<i>21,1</i>	Ser	17,8	<i>17,8</i>	C
	Ile	16	<i>6,7</i>	Thr	12,4	<i>8,1</i>	Lys	25,6	<i>32,4</i>	Arg	18,3	<i>3,4</i>	A
	Met	20,2	<i>26</i>	Thr	10,2	<i>18,5</i>	Lys	18,4	<i>12,8</i>	Arg	11,4	<i>2,5</i>	G
G	Val	17,2	<i>16,4</i>	Ala	19,7	<i>14,6</i>	Asp	21,1	<i>32,6</i>	Gly	14,9	<i>18</i>	U
	Val	10,6	<i>17,8</i>	Ala	15,2	<i>27,9</i>	Asp	13,8	<i>21,7</i>	Gly	17,2	<i>32,5</i>	C
	Val	12,2	<i>11,7</i>	Ala	22,5	<i>15</i>	Glu	20,5	<i>35,8</i>	Gly	13,9	<i>9,3</i>	A
	Val	13,2	<i>24,2</i>	Ala	17,7	<i>36,4</i>	Glu	14,2	<i>21,2</i>	Gly	9,8	<i>11,8</i>	G

La columna de la izquierda indica el primer nucleótido de los codones, la fila superior corresponde al segundo nucleótido y, finalmente, en la columna de la derecha se indican los nucleótidos de la tercera posición del codón. Las frecuencias de uso de codón se indican en negrita para el fago UAB_Phi20 y en cursiva para *Salmonella*.

Tabla 18. Porcentaje de GC de cada uno de los tripletes del genoma del fago UAB_Phi20 y del cromosoma de *Salmonella*.

Posición del triplete	% GC UAB_Phi20	% GC <i>Salmonella</i>
1	48,2	58,5
2	47,1	41,5
3	46,8	57,9



Figura 21. Logo de la secuencia consenso Shine-Dalgarno de los RBS del fago UAB_Phi20.

4.3.2.3. Terminadores de transcripción

Mediante el programa FindTerm (Softberry) se detectó la presencia de 11 terminadores Rho-independientes en el genoma del fago UAB_Phi20 (Tabla 19). El primer terminador se sitúa tras el transcrito de los genes implicados en la replicación del DNA fágico (*gp18* y *gp12*). El segundo terminador tras el antiterminador 23 y el tercero está situado tras los genes de lisis. Estos dos últimos pertenecen al grupo de terminadores t_R , los cuales son suprimidos por la acción de la proteína 23. Los terminadores 4, 5 y 6 se sitúan entre los genes responsables de la morfogénesis de la cápside y la cola. Los terminadores del séptimo al décimo pertenecen al grupo de terminadores t_L , suprimidos por el producto del gen *gp24*. Finalmente, el último terminador se encuentra tras el gen *sieB*.

Tabla 19. Posibles terminadores Rho-independientes en el genoma del fago UAB_Phi20.

Terminador	Gen	Inicio	Final	Cadena
T1	<i>gp12</i>	2381	2399	+
T2	23	5595	5618	+
T3	<i>gp15</i>	7143	7166	+
T4	<i>gp5</i>	15463	15476	+
T5	<i>ant</i>	25373	25388	+
T6	<i>gp9</i>	27583	27596	+
T7	<i>int</i>	30542	30583	-
T8	<i>xis</i>	32762	32775	-
T9	17	37771	37786	+
T10	<i>Phi20p68</i>	38112	38130	-
T11	<i>sieB</i>	39956	39972	+

+, indica que se encuentra en la cadena codificante 5'→ 3' del DNA; -, indica que se encuentra en la cadena complementaria

4.3.2.4. Organización del genoma del fago UAB_Phi20

Mediante un análisis bioinformático y el estudio de similitud con las secuencias incluidas en las bases de datos pudo asignarse una función a 57 de los 80 posibles genes codificados en el genoma del fago UAB_Phi20. El análisis de su organización génica mostró una elevada homología con la de otros fagos lambdoides, como el propio fago lambda o el fago P22. De los 23 genes potenciales restantes, 13 de ellos presentaron similitud con algún gen ya descrito, pero no se les pudo adjudicar una función determinada. Finalmente, los 10 genes restantes no mostraron similitud alguna con los genes disponibles en las bases de datos.

Como se detalla en la Figura 22, los resultados obtenidos en las comparaciones realizadas permitieron distinguir siete módulos funcionales en el genoma de este fago. Cada módulo está

Resultados

compuesto por genes próximos físicamente y relacionados funcionalmente. Entre estos módulos destacan los de conversión lisogénica, integración y represión del ciclo lítico (gen *c2*).

Seguidamente, se comentan algunas características de cada uno de los módulos así como la similitud a nivel de genes entre el fago UAB_Phi20 y algunos de los fagos tipo P22:

Conversión lisogénica. La lisogenización de determinados fagos lambdoides produce un cambio químico en el antígeno O del lipopolisacárido bacteriano. Este hecho implica un cambio del serotipo del huésped que impide la unión de otros fagos que reconozcan el mismo receptor (Kropinski *et al.*, 2007). Los genes responsables de esta conversión antigénica son *gtrC*, *gtrB* y *gtrA*, los cuales presentan una similitud superior al 98% con los genes homólogos de los fagos P22, ST64T y ST104.

Integración. El establecimiento de la lisogenia necesita la actividad de la integrasa y de la escisionasa para la posterior inducción del profago. Estos dos genes presentan una elevada similitud con sus homólogos en los fagos P22, ST64T y ST104. Así, el gen de la integrasa (*int*) presenta una similitud superior al 94%, mientras que el de la escisionasa (*xis*) es superior al 96%.

Recombinación. Este módulo, idéntico al del fago ST104, es el que presenta una menor similitud con el fago P22 (70%). En él se localizan los genes de función anti-RecBCD, *abc2* y *abc1*, así como un hipotético gen *erf* y el gen *arf*, implicados en la recombinación y recircularización del DNA fágico (Casjens *et al.*, 1989).

Regulación génica. Principalmente, este módulo contiene los genes *c2*, *cro*, *c1* y *c3*, los cuales inciden directamente en la decisión entre ciclo lítico o lisogénico. Estos genes presentan una similitud del 98% con los del fago P22. Asimismo, en este módulo también se hallan los genes *mnt*, *arc* y *ant*, los cuales participan en el control del mantenimiento de la lisogenia (Susskind, 1978) y manifestaron una similitud del 94% con los del fago P22.

Replicación. La replicación del genoma vírico precisa de la presencia de las proteínas víricas Gp18 y Gp12, análogas a las proteínas GpO y GpP del fago lambda (Campbell, 1994). Estos dos genes son casi idénticos a la primasa y replicasa del fago P22 con una similitud del 99%.

Lisis. Los genes encargados de lisar a la célula bacteriana son la holina (*gp13*), la endolisina (*gp19*) y la endopeptidasa (*gp15*). Este módulo es idéntico al del fago P22, sin embargo, cabe destacar la presencia de un cuarto gen tras la endopeptidasa, el gen *Phi20p21*, el cual podría tener también un papel en la lisis bacteriana. No obstante, al no encontrarse ningún gen homólogo al *Phi20p21* no se pudo determinar su función ni pudo asegurarse que perteneciera a este módulo.

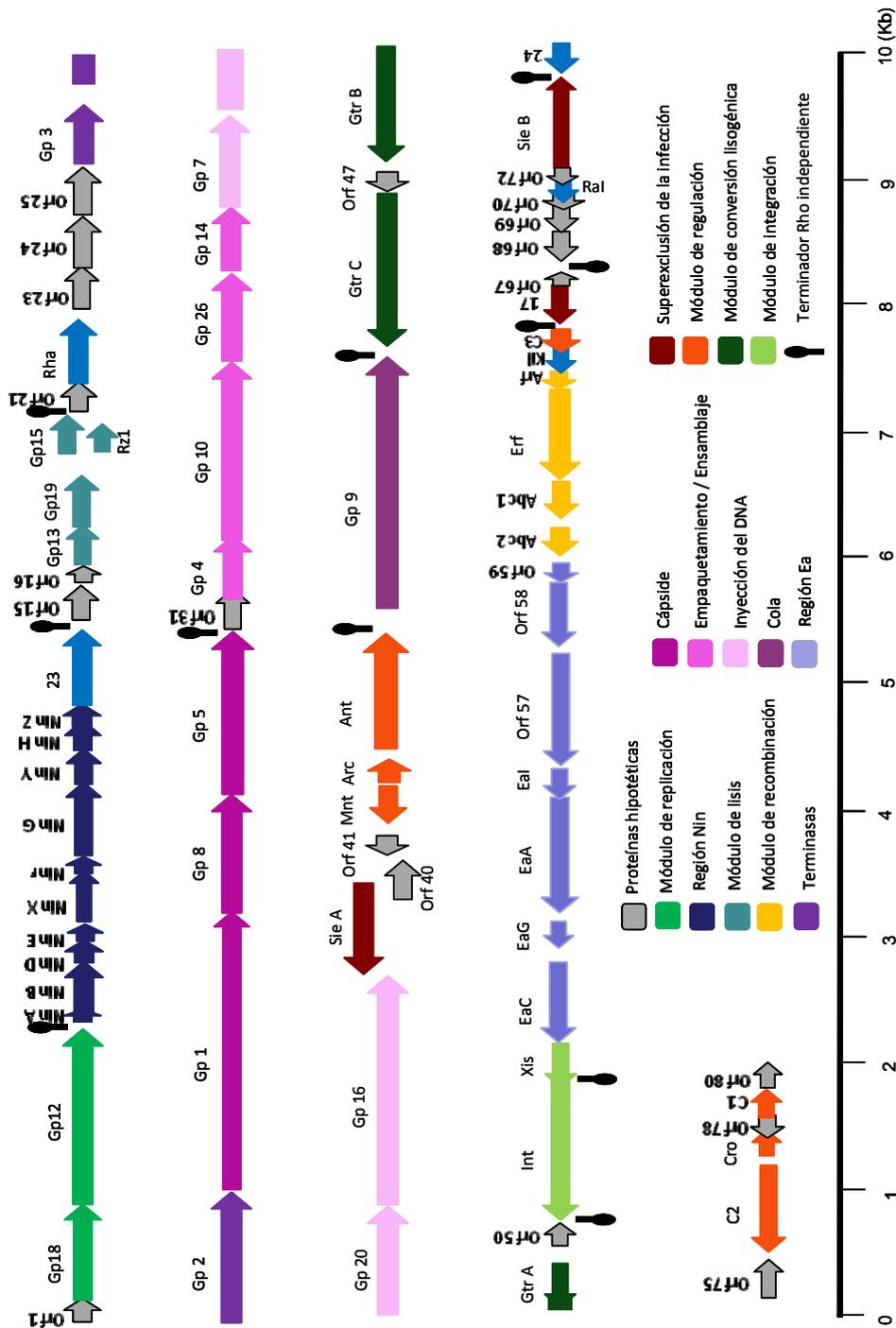


Figura 22. Organización génica y modular del genoma del fago UAB_Phi20.

Morfogénesis. Este módulo estructural, compuesto por casi la mitad del genoma de los fagos lambdoides, se puede dividir en cuatro grupos según codifiquen a las proteínas de la terminasa, de la cápside, de inyección del DNA o de la cola. El subgrupo de las terminasas, formado por los genes *gp3* y *gp2*, presenta una similitud del 99% con los fagos ST64T y ST104. El submódulo formado por los genes de la cápside y de empaquetamiento es muy parecido al del fago P22 (96%). El módulo de inyección del DNA es idéntico al de P22. Finalmente, el gen *gp9*, único integrante del último grupo, codifica la proteína que forma la cola de los fagos de la familia *Podoviridae* y presenta una similitud superior al 98% con los fagos P22, ST64T y ST104.

Aparte de la existencia de estos siete módulos, es importante mencionar la presencia de las regiones *ea* y *nin*, las cuales codifican una serie de proteínas de función desconocida. Estos genes no son imprescindibles para el funcionamiento de fagos de este tipo, al menos en infecciones realizadas en el laboratorio, pero su presencia y mantenimiento pueden ser indicativos del aporte de alguna ventaja selectiva para su huésped o para los propios fagos en otros ambientes (Hendrix, 2002). Cabe destacar también, la presencia en el fago UAB_Phi20 de tres genes implicados en la exclusión de la superinfección muy similares a los del fago P22. Estos genes codifican la proteína 17, implicada en el escape de la exclusión por fagos heterólogos como el Fels-1, y las proteínas SieB y SieA, las cuales evitan la infección de fagos heteroimunes o la superinfección por el propio fago (Susskind, 1978).

4.3.2.5. Determinación a nivel molecular del comportamiento lítico del fago UAB_Phi20

El fago UAB_Phi20 produce calvas líticas al infectar cultivos en medio sólido de *Salmonella* y provoca la lisis de cultivos líquidos de esta bacteria. No obstante, en su genoma se han identificado genes claramente implicados en la lisogenia. Por ello, se procedió a estudiar las causas del comportamiento lítico de este fago.

Dada la elevada homología del módulo de integración del fago UAB_Phi20 con el del fago P22, una búsqueda por similitud de secuencia permitió localizar una hipotética secuencia *attP* en el genoma del fago UAB_Phi20. Partiendo de la base de que las secuencias *attP* de ambos fagos son idénticas, se consideró que el sitio de reconocimiento y recombinación integrativa en el cromosoma bacteriano (*attB*) debería ser el mismo, situándose en la región del gen *thr-w trna*, flanqueado por los genes que codifican la proteína ProA y la transposasa IS3 (Smith-Mungo *et al.*, 1994). Para determinar si el bacteriófago UAB_Phi20 se integraba en el cromosoma bacteriano, se diseñaron cuatro oligonucleótidos para amplificar, mediante PCR, el sitio de integración (Figura 23).

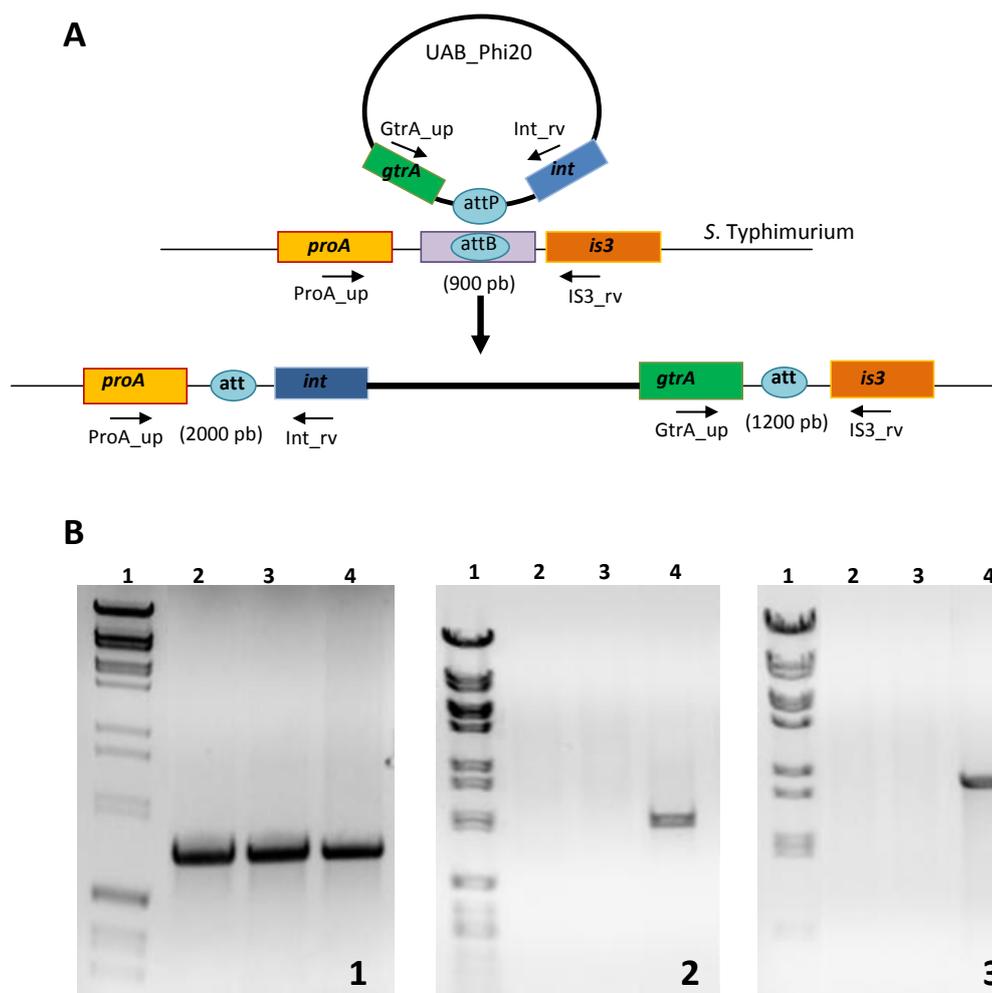


Figura 23. A) Esquema de la posible integración del fago UAB_Phi20 por reconocimiento de la secuencia *attB* de *S. Typhimurium*, localizada en el gen *thr-w tRNA*. B) Productos de amplificación del DNA de un cultivo de *S. Typhimurium* sin infectar (carril 2) e infectado con los fagos UAB_Phi20 (carril 3) y P22 (carril 4). Los cebadores empleados fueron: 1) ProA_up e IS3_rv; 2) GtrA_up e IS3_rv y 3) ProA_up e Int_rv. En todos los casos, el carril 1 corresponde al patrón de tamaño de bandas (DNA del fago λ cortado con *BstEII* junto con el DNA del fago ϕ X174 cortado con *Hinfi*).

Dos de estos oligonucleótidos (ProA_up e IS3_rv) permiten amplificar la región cromosómica que contiene al gen *thr-w tRNA*, mientras que los otros dos (GtrA_up e Int_rv) amplifican la región de integración *attP*. Para realizar este estudio se utilizó como molde el DNA de la cepa *S. Typhimurium* ATCC 14028, infectada con el fago UAB_Phi20. Asimismo, como control positivo se utilizó el DNA de dicha cepa infectada con el fago P22 y como control negativo el de esta misma cepa bacteriana sin infectar. En el caso de que el fago UAB_Phi20 se integrara en el genoma bacteriano, la región comprendida entre el gen *proA* y la transposasa IS3 quedaría interrumpida por todo el genoma fágico, aumentando así la distancia entre ambos genes bacterianos. En este sentido, se observó una banda de amplificación del mismo tamaño para la región del gen *thr-w tRNA* en los tres casos, pero en las amplificaciones con un oligonucleótido del genoma bacteriano y otro del DNA fágico,

Resultados

únicamente se obtuvo banda de amplificación desde el cultivo de *Salmonella* infectado con P22. Estos resultados muestran la incapacidad del fago de recombinar en la región *attB* de *Salmonella* a pesar de tener los módulos de integración, de conversión lisogénica y de recombinación. Asimismo, dada la función crítica de la proteína C1 para el establecimiento de la lisogenia, comentado previamente en la introducción de este trabajo, y la elevada homología de este activador transcripcional con el del fago P22, se determinó *in silico* la presencia del motivo de reconocimiento de esta proteína (TTGN₆TTGC) en el genoma del fago UAB_Phi20. La búsqueda de esta secuencia, mediante el programa EditSeq (DNASTAR Inc.), mostró distintos sitios de reconocimiento (Tabla 20) pero ninguno de ellos se situaba en las proximidades del propio gen *c1*, donde se encuentra el promotor P_{RE}, necesario para la transcripción del represor *c2*, ni en las inmediaciones del gen que codifica la integrasa, región donde debería localizarse otra zona de reconocimiento de este activador.

Tabla 20. Posibles motivos de unión del activador transcripcional C1 en el genoma del fago UAB_Phi20.

Inicio	Final	Cadena	Secuencia
1546	1558	+	TTGTGATTATTGC
3278	3266	-	TTGTGTCCCTTGC
4104	4092	-	TTGTGTTGATTGC
10925	10913	-	TTGACAATCTTGC
12548	12560	+	TTGTTGACCTTGC
13737	13725	-	TTGCGCTGATTGC
14238	14226	-	TTGGAGTGATTGC
15669	15657	-	TTGCGGCCTTTGC
16388	16376	-	TTGTAGAGCTTGC
16404	16416	+	TTGGTGATGTTGC
17694	17706	+	TTGGTGCTATTGC
19109	19097	-	TTGGGGCGATTGC
20874	20862	-	TTGAATGTCTTGC
21773	21761	-	TTGTATCAATTGC
25083	25071	-	TTGCTTCTTTTGC
25862	25874	+	TTGACTATATTGC
31074	31086	+	TTGTGATGATTGC
35004	35016	+	TTGCCTCCTTTGC
38140	38128	-	TTGATAGTCTTGC
38311	38323	+	TTGAGTTCTTTGC
38846	38858	+	TTGCAGCCTTTGC
40388	40400	+	TTGCGAGTTTTGC

+, indica que se encuentra en la cadena codificante 5' → 3' del DNA; -, indica que se encuentra en la cadena complementaria

4.3.3. Comparación filogenética del fago UAB_Phi20

Como se ha comentado previamente, el genoma del fago UAB_Phi20 comparte un gran número de regiones similares con los fagos P22, ST64T y ST104. La representación esquemática de dichos genomas (Figura 24) permite observar la conservación de la organización genómica. Además, la elevada similitud entre los genes de estos fagos así como su organización revelan el hecho que todos ellos son mosaicos genéticos.

La diferente longitud que presentan los genomas de estos cuatro fagos es consecuencia de su distinta composición génica. Los módulos más conservados entre ellos son los de morfogénesis, recombinación, integración y conversión antigénica. Las principales diferencias se observan en la región de mantenimiento de la lisogenia o región *imml*, en los genes involucrados en la exclusión de la superinfección y, finalmente, en las regiones *ea* y *nin*.

Con la finalidad de estimar la relación filogenética de estos cuatro bacteriófagos, se procedió a su comparación mediante el alineamiento de sus genomas completos. Los resultados obtenidos (Figura 25) muestran que todos ellos proceden de un mismo ancestro común. Sin embargo, fueron divergiendo hasta separarse los fagos ST64T, ST104 y un ancestro común de los fagos P22 y UAB_Phi20. Estos dos fagos terminaron distanciándose, aunque a nivel evolutivo el fago UAB_Phi20 se mantendría más cercano a este ancestro común.

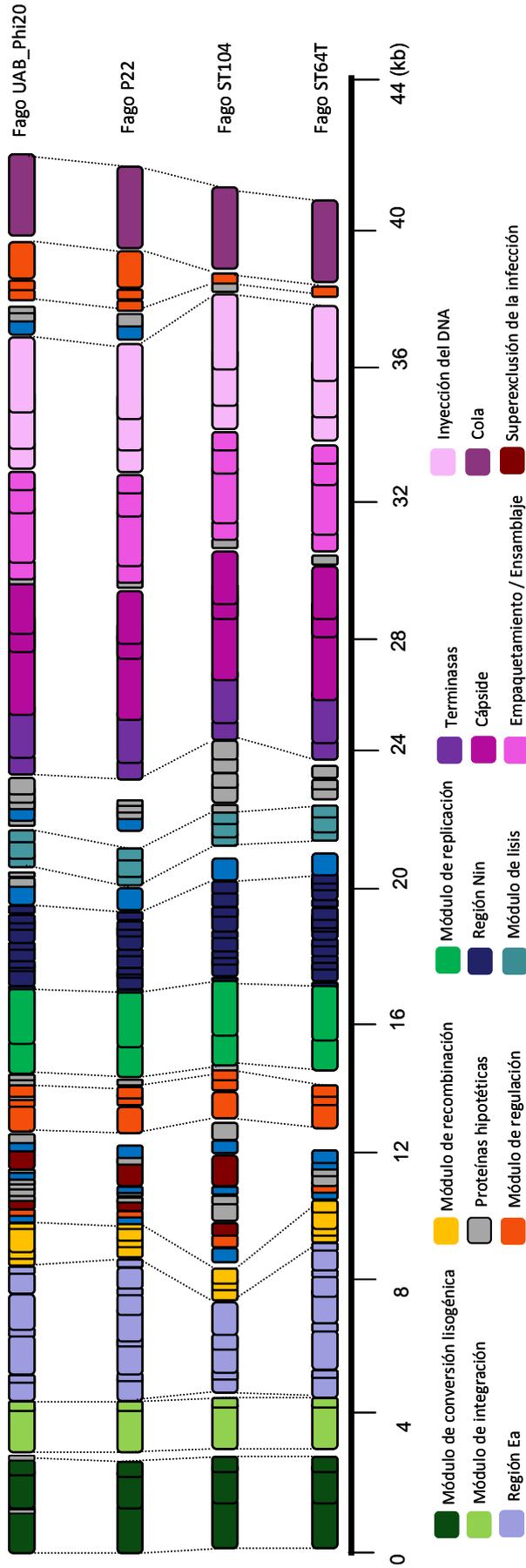


Figura 24. Comparación de la arquitectura génica de los fagos UAB_Phi20, P22, ST104 y ST64T.

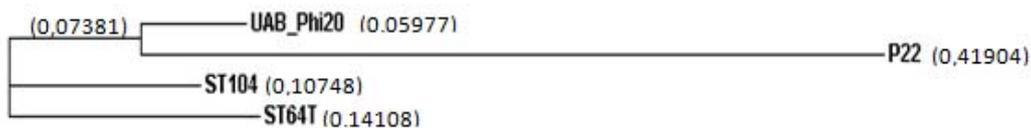


Figura 25. Representación de la distancia filogenética de los genomas de los fagos UAB_Phi20, P22, ST104 y ST64T. La distancia entre ellos se encuentra indicada entre paréntesis y equivale al número mínimo de sustituciones necesarias para convertir una secuencia en otra.

4.4. Genómica del fago UAB_Phi87

4.4.1. Estrategia de secuenciación

La secuenciación del genoma del fago UAB_Phi87 fue realizada por Sistemas Genómicos empleando la técnica de pirosecuenciación con un secuenciador 454-FLX (Roche). Las secuencias obtenidas fueron ensambladas en un único contig. La secuencia obtenida fue depositada en la base de datos del GenBank bajo el número de acceso JN225449.

4.4.2. Análisis de la secuencia genómica

El análisis de la secuencia indicó que el genoma del fago UAB_Phi87 es de 87.273 pb, valor muy próximo al obtenido previamente mediante PFGE, y presenta un porcentaje de GC del 38,9%. Siguiendo la misma metodología que la aplicada en el análisis del genoma del fago UAB_Phi20, el análisis de los ORFs del fago UAB_Phi87 permitió la detección de 210 ORFs, de los cuales se seleccionaron 149 (Tabla 21) ya que los 60 restantes estaban codificados en regiones que se solapaban (*nested* ORFs) con alguno de los 149 genes previamente identificados. Los resultados obtenidos revelaron una elevada similitud con el fago Felix O1 de *Salmonella*, el WV8 de *E. coli* y el SA1 de *Staphylococcus aureus*. En función de ello y de la morfología observada, el fago UAB_Phi87 fue clasificado dentro de la familia *Myoviridae*, del orden *Caudovirales* y en el grupo de fagos tipo Felix O1.

4.4.2.1. Análisis de los promotores

Mediante el programa BPROM (Softberry) se buscaron posibles promotores en el genoma del fago UAB_Phi87, limitando los parámetros de búsqueda a aquellos posibles promotores situados a no más de 100 pb del inicio del gen. Bajo estas condiciones, se detectaron 42 hipotéticos promotores (Tabla 22), los cuales presentaban las secuencias consenso -10 (TATAAT) y -35 (TTGACA) muy conservadas.

Tabla 21. Análisis comparativo de los productos génicos codificados en el genoma del fago UAB_Phi87

Orf	Gen			Producto génico			Secuencia con mayor similitud		
	Inicio	Final	Aa	Producto	Función Propuesta	Proteína (origen)	Valor e	Nº acceso	
1	767	210	185	Phi87p02		Proteína hipotética (fago WV8)	1,00E-101	YP_002922836.1	
2	1006	764	80	Phi87p05					
3	927	1037	36	Phi87p06		Proteína hipotética (fago WV8)	0,02	YP_002922835.1	
4	1432	1250	60	Phi87p07					
5	2479	2384	31	Phi87p08					
6	2460	2600	46	Phi87p09		Proteína hipotética (fago WV8)	2,00E-18	YP_002922831.1	
7	2978	2799	59	Phi87p10		Proteína hipotética (fago WV8)	1,00E-27	YP_002922830.1	
8	3045	3302	85	Phi87p11		Proteína hipotética (fago WV8)	3,00E-39	YP_002922829.1	
9	3693	3869	58	Phi87p12					
10	3820	4035	71	Phi87p13					
11	5695	4280	471	Phi87p14		Proteína hipotética (fago WV8)	0	YP_002922828.1	
12	6147	5776	123	Phi87p16		Proteína hipotética (fago SA1)	2,00E-63	ACZ55587.1	
13	6397	6558	53	Phi87p17		Proteína hipotética (fago Felix 01)	3,00E-22	YP_001504372.1	
14	6540	6773	77	Phi87p18		Proteína hipotética (fago Felix 01)	1,00E-36	NP_944854.1	
15	6767	7357	196	Phi87p19		Proteína hipotética (fago WV8)	2,00E-97	YP_002922824.1	
16	7405	7776	123	Phi87p20		Proteína hipotética (fago WV8)	8,00E-58	YP_002922823.1	
17	7773	8906	377	Phi87p21		Proteína hipotética (fago WV8)	0	YP_002922822.1	
18	8906	9370	154	Phi87p24	Lisina	Lisina (fago Felix 01)	3,00E-85	NP_944846.1	
19	9421	9819	132	Phi87p26		Proteína hipotética (fago Felix 01)	5,00E-70	NP_944844.1	
20	9812	10210	132	Phi87p27		Proteína hipotética (fago SA1)	7,00E-61	ACZ55561.1	
21	10210	10503	97	Phi87p29		Proteína hipotética (fago WV8)	2,00E-48	YP_002922818.1	
22	10496	10840	114	Phi87p30		Proteína hipotética (fago WV8)	1,00E-59	YP_002922817.1	
23	10840	11421	193	Phi87p31		Proteína hipotética (fago SA1)	7,00E-109	ACZ55551.1	
24	11494	12039	181	Phi87p33		Proteína hipotética (fago SA1)	5,00E-101	ACZ55556.1	
25	12036	12254	72	Phi87p34		Proteína hipotética (fago Felix 01)	4,00E-32	NP_944832.1	
26	12251	12754	167	Phi87p36		Proteína de membrana (fago Felix 01)	6,00E-86	NP_944826.2	
27	12736	12831	31	Phi87p38					
28	12831	13055	74	Phi87p39		Proteína hipotética (fago WV8)	2,00E-32	YP_002922812.1	

Tabla 21. Continuación

Gen			Producto génico		Secuencia con mayor similitud			
Orf	Inicio	Final	Aa	Producto	Función Propuesta	Proteína (origen)	Valor e	Nº acceso
29	13110	13538	142	Phi87p41		Proteína hipotética (fago WV8)	2,00E-37	YP_002922811.1
30	13528	13992	154	Phi87p42		Proteína hipotética (fago Felix 01)	2,00E-77	NP_944827.1
31	13949	14554	201	Phi87p43		Proteína hipotética (fago Felix 01)	2,00E-84	NP_944826.2
32	14632	14525	35	Phi87p44				
33	15166	15017	49	Phi87p45				
34	15312	15235	25	Phi87p46				
35	16494	16246	82	Phi87p47		Proteína hipotética (fago Felix 01)	5,00E-41	NP_944825.1
36	17090	16560	176	Phi87p48		Proteína hipotética (fago SA1)	2,00E-88	ACZ55558.1
37	17653	17312	113	Phi87p49		Proteína hipotética (fago Felix 01)	2,00E-54	NP_944820.1
38	17979	17746	77	Phi87p50		Proteína hipotética (fago WV8)	4,00E-35	YP_002922803.1
39	18588	18046	180	Phi87p51		Proteína hipotética (fago SA1)	3,00E-96	ACZ55557.1
40	18877	18674	67	Phi87p52		Proteína hipotética (fago WV8)	4,00E-27	YP_002922801.1
41	19386	18982	134	Phi87p53		Proteína hipotética (fago WV8)	4,00E-66	YP_002922800.1
42	19746	19474	90	Phi87p54		Proteína hipotética (fago WV8)	7,00E-43	YP_002922799.1
43	20169	19837	110	Phi87p56		Proteína hipotética (fago SA1)	3,00E-51	ACZ55598.1
44	20459	20163	98	Phi87p57		Proteína hipotética (fago Felix 01)	3,00E-49	NP_944810.1
45	21064	20552	170	Phi87p58		Proteína hipotética (fago SA1)	4,00E-91	ACZ55561.1
46	21412	21155	85	Phi87p59		Proteína hipotética (fago WV8)	1,00E-24	YP_002922796.1
47	21882	21499	127	Phi87p60		Proteína hipotética (fago WV8)	3,00E-64	YP_002922795.1
48	21794	21901	35	Phi87p62				
49	22010	22168	52	Phi87p63				
50	22170	22325	51	Phi87p64				
51	23189	22404	261	Phi87p65		Proteína fágica conservada (fago Felix 01)	4,00E-151	NP_944801.1
52	23390	23190	66	Phi87p66		Proteína fágica conservada (fago Felix 01)	6,00E-31	AAQ14610.1
53	23610	23383	75	Phi87p67		Proteína hipotética (fago Felix 01)	7,00E-30	NP_944797.1
54	23941	23585	118	Phi87p68		Proteína hipotética (fago Felix 01)	4,00E-55	NP_944795.1

Tabla 21. Continuación

Gen				Producto génico		Secuencia con mayor similitud		
Orf	Inicio	Final	Aa	Producto	Función Propuesta	Proteína (origen)	Valor e	Nº acceso
55	24215	23901	104	Phi87p70		Proteína hipotética (fago Felix 01)	6,00E-54	NP_944793.2
56	24481	24212	89	Phi87p71		Proteína hipotética (fago WV8)	5,00E-46	YP_002922789.1
57	24747	24478	89	Phi87p72		Proteína hipotética (fago Felix 01)	6,00E-44	NP_944791.1
58	24988	24641	115	Phi87p73		Proteína hipotética (fago Felix 01)	3,00E-61	NP_944790.1
59	25505	25041	154	Phi87p75		Proteína hipotética (fago WV8)	2,00E-82	YP_002922786.1
60	26211	25516	231	Phi87p76		Proteína hipotética (fago SA1)	3,00E-130	ACZ55543.1
61	26737	26189	182	Phi87p79		Proteína hipotética (fago WV8)	2,00E-101	YP_002922784.1
62	27947	26838	369	rIB	Control de la lisis celular	rIB (fago WV8)	0	YP_002922783.1
63	30393	28027	788	rIIA	Control de la lisis celular	rIIA (fago SA1)	0	ACZ55494.1
64	30598	30422	58	Phi87p83		Proteína de membrana (fago Felix 01)	2,00E-24	NP_945023.1
65	30915	30580	111	Phi87p84		Proteína hipotética (fago SA1)	2,00E-58	ACZ55596.1
66	32750	30969	593	nadV	Fosforibosiltransferasa	NadV (fago SA1)	0	ACZ55503.1
67	33677	32796	293	Phi87p89	Pirofosfoquinasa	Ribosa-fosfato pirofosfoquinasa (fago SA1)	9,00E-166	ACZ55530.1
68	33971	33693	92	Phi87p92		Proteína hipotética (fago Felix 01)	2,00E-46	NP_945013.1
69	34479	33964	171	Phi87p94		Proteína hipotética (fago SA1)	2,00E-94	ACZ55559.1
70	34851	34531	106	Phi87p95		Proteína hipotética (fago Felix 01)	2,00E-52	NP_945007.1
71	35111	34854	86	Phi87p96		Proteína hipotética (fago WV8)	2,00E-40	YP_002922914.1
72	35721	35236	161	nrdG	Ribonucleotidil reductasa	NrdG (fago WV8)	1,00E-88	YP_002922912.1
73	36176	35781	131	Phi87p100		Proteína hipotética (fago SA1)	6,00E-70	ACZ55582.1
74	36373	36173	66	Phi87p101		Proteína de membrana (fago Felix 01)	8,00E-29	NP_945001.1
75	36474	36349	41	Phi87p102				
76	37382	36528	284	Phi87p103	Ribonucleotidil reductasa	NrdD (fago WV8)	8,00E-169	YP_002922907.1
77	37454	37597	47	Phi87p104				
78	38102	37638	154	Phi87p105	Endonucleasa	Endonucleasa (fago JSE)	2,00E-34	YP_002922130.1
79	39414	38215	399	Phi87p108	Ribonucleotidil reductasa	NrdD (fago WV8)	0	YP_002922907.1
80	39669	39463	68	Phi87p109		Proteína de membrana (fago Felix 01)	7,00E-29	NP_944998.1
81	39904	39662	80	Phi87p110	Glutaredoxina	Glutaredoxina (fago Felix 01)	3,00E-39	NP_944996.1

Tabla 21. Continuación

Orf	Gen		Producto génico		Secuencia con mayor similitud		
	Inicio	Final	Producto	Función Propuesta	Proteína (origen)	Valor e	Nº acceso
82	40977	39904	nrdB	Ribonucleotidil reductasa	NrdB (fago Felix 01)	0	NP_944994.1
83	41315	40974	Phi87p112		Proteína hipotética (fago SA1)	4,00E-56	ACZ55595.1
84	43521	41287	nrdA	Ribonucleotidil reductasa	NrdA (fago Felix 01)	0	NP_944991.1
85	43807	43568	Phi87p118		Proteína hipotética (fago Felix 01)	5,00E-40	NP_944989.1
86	44222	43899	Phi87p119		Proteína hipotética (fago Felix 01)	1,00E-56	NP_944987.2
87	44958	44203	Phi87p120		Proteína hipotética (fago WV8)	5,00E-144	YP_002922899.1
88	45181	44951	Phi87p121		Proteína hipotética (fago WV8)	7,00E-31	YP_002922898.1
89	45700	45203	Phi87p122		Proteína hipotética (fago WV8)	2,00E-92	YP_002922897.1
90	46730	45690	Phi87p124	Exodeoxiribonucleasa	Exodeoxiribonucleasa (fago SA1)	0	ACZ55525.1
91	47650	46793	Phi87p127		Proteína hipotética (fago WV8)	1,00E-163	YP_002922894.1
92	47872	47723	Phi87p128		Proteína hipotética (fago Felix 01)	2,00E-19	YP_001504375.1
93	48156	47869	Phi87p129		Proteína hipotética (fago Felix 01)	5,00E-45	YP_001504374.1
94	50110	48125	Phi87p131	Primasa	DNA primasa (fago WV8)	0	YP_002922891.1
95	50303	50103	Phi87p134		Proteína hipotética (fago Felix 01)	3,00E-28	NP_944966.1
96	51055	50312	Phi87p135	Quinasa	Deoxinucleotido monofosfato quinasa (Fago SA1)	4,00E-140	ACZ55540.1
97	51918	51118	Phi87p136		Proteína hipotética (fago Felix 01)	5,00E-146	NP_944960.1
98	52342	51920	Phi87p137		Proteína hipotética (fago Felix 01)	4,00E-76	NP_944959.1
99	52569	52298	Phi87p139	DNA polimerasa	DNA polimerasa (fago WV8)	0	YP_002922886.1
100	53360	55578	Phi87p141		Proteína hipotética (fago WV8)	5,00E-07	YP_002922885.1
101	55813	55499	Phi87p143				
102	55781	55999	Phi87p145		Proteína hipotética (fago Felix 01)	1,00E-29	NP_944952.2
103	55996	56142	Phi87p146		Proteína hipotética (fago Felix 01)	6,00E-20	YP_001504373.1
104	56165	56389	Phi87p147		Proteína hipotética (fago Felix 01)	2,00E-33	NP_944949.1
105	56343	56606	Phi87p148		Proteína hipotética (fago Felix 01)	1,00E-30	NP_944947.1
106	56603	56821	Phi87p149		Proteína hipotética (fago Felix 01)	6,00E-35	NP_944945.1
107	56760	57896	Phi87p150	DNA ligasa	DNA ligasa (Fago Felix 01)	0	NP_944942.1
108	57900	58046	Phi87p152				

Tabla 21. Continuación

Gen				Producto génico		Secuencia con mayor similitud		
Orf	Inicio	Final	Aa	Producto	Función Propuesta	Proteína (origen)	Valor e	Nº acceso
109	58114	57947	55	Phi87p153		Proteína hipotética (fago Felix 01)	3,00E-67	NP_944938.1
110	58457	58840	127	Phi87p154		Proteína hipotética (fago WV8)	1,00E-31	YP_002922875.1
111	58842	59054	70	Phi87p155		Proteína reguladora transcripcional (fago WV8)	3,00E-51	YP_002922874.1
112	59047	59346	99	Phi87p157	Proteína reguladora			
113	59348	59707	119	Phi87p158		Proteína hipotética (fago SA1)	8,00E-64	ACZ55590.1
114	59721	60236	171	Phi87p159		Proteína hipotética (fago WV8)	2,00E-92	YP_002922872.1
115	60237	60497	86	Phi87p161		Proteína hipotética (fago WV8)	9,00E-41	YP_002922871.1
116	60494	61039	181	frd	Dihidrofolato reductasa	Frd (fago WV8)	4,00E-96	YP_002922870.1
117	61041	61940	299	td	Timidilato sintetasa	Td (fago SA1)	2,00E-175	ACZ55527.1
118	62347	61976	123	Phi87p165		Proteína hipotética (fago WV8)	6,00E-63	YP_002922868.1
119	62541	62344	65	Phi87p166		Proteína hipotética (fago WV8)	1,00E-27	YP_002922867.1
120	64968	62620	782	Phi87p167		Proteína de la cola (fago SA1)	0	ACZ55495.1
121	66185	65019	388	Phi87p170		Proteína de la cola (fago Felix 01)	0	NP_944921.1
122	66490	66188	100	Phi87p171		Proteína hipotética (fago Felix 01)	3,00E-51	NP_944920.1
123	67347	66490	285	Phi87p172		Proteína hipotética (fago Felix 01)	1,00E-161	NP_944918.1
124	68819	67350	489	Phi87p173	Proteína de la base de la cola	Proteína de la base de la cola (fago SA1)	0	ACZ55510.1
125	69238	68819	139	Phi87p174		Proteína hipotética (fago Felix 01)	5,00E-76	NP_944914.1
126	69861	69238	207	Phi87p175	Proteína de la base de la cola	Proteína de la base de la cola (fago SA1)	4,00E-120	YP_002922860.1
127	70838	69861	325	Phi87p177		Proteína hipotética (fago WV8)	0	YP_002922859.1
128	71179	70838	113	Phi87p179		Proteína hipotética (fago WV8)	3,00E-60	YP_002922858.1
129	71979	71179	266	Phi87p180		Proteína hipotética (fago WV8)	2,00E-148	YP_002922857.1
130	74210	71979	743	Phi87p181	Proteína de la medida de la cola	Proteína de la medida de la cola (fago WV8)	0	YP_002922856.1
131	74449	74210	79	Phi87p184		Proteína hipotética (fago Felix 01)	2,00E-38	NP_944900.1
132	74850	74452	132	Phi87p185		Proteína hipotética (fago Felix 01)	7,00E-70	NP_944899.1
133	75370	74924	148	Phi87p186		Proteína estructural (fago WV8)	8,00E-82	YP_002922853.1
134	76738	75386	450	Phi87p187		Proteína estructural (fago Felix 01)	0	NP_944896.1

Tabla 21. Continuación

Gen				Producto génico			Secuencia con mayor similitud		
Orf	Inicio	Final	Aa	Producto	Función Propuesta	Proteína (origen)	Valor e	Nº acceso	
135	77338	76739	199	Phi87p189		Proteína hipotética (fago Felix 01)	5,00E-112	NP_944895.1	
136	77714	77313	133	Phi87p190		Proteína hipotética (fago WV8)	8,00E-73	YP_002922850.1	
137	78193	77711	160	Phi87p191		Proteína hipotética (fago Felix 01)	2,00E-87	NP_944893.1	
138	78642	78193	149	Phi87p193		Proteína hipotética (fago Felix 01)	4,00E-82	NP_944892.1	
139	79767	78664	367	Phi87p194	Proteína de la cápside	Proteína de la cápside (fago Felix 01)	0	NP_944891.1	
140	80178	79801	125	Phi87p196		Proteína estructural (fago SA1)	6,00E-64	ACZ55585.1	
141	81536	80190	448	Phi87p197	Proteasa	Proteína de maduración de la cápside (fago Felix 01)	0	NP_944888.1	
142	81880	81548	110	Phi87p199		Proteína hipotética (fago Felix 01)	3,00E-56	NP_944887.1	
143	82380	81880	166	Phi87p200		Proteína hipotética (fago SA1)	8,00E-90	ACZ55564.1	
144	83846	82380	488	Phi87p203	Proteína portal	Proteína portal (fago WV8)	0	YP_002922841.1	
145	85464	83863	533	Phi87p206	Terminasa	Terminasa (fago Felix 01)	0	NP_944884.1	
146	85686	85486	66	Phi87p207		Proteína hipotética (fago WV8)	1,00E-28	YP_002922839.1	
147	85887	85711	58	Phi87p208					
148	85971	85879	31	Phi87p209					
149	86819	86085	244	Phi87p210		Proteína hipotética (fago SA1)	1,00E-117	ACZ55541.1	

Tabla 22. Localización de posibles secuencias promotoras del fago UAB_Phi87.

Posición	Caja -35	Caja -10	Gen 5'	Gen 3'
1076	ttggaa	agttcaaat	<i>Phi87p05</i>	<i>Phi87p06</i>
3743	ttaata	gttttttct	<i>Phi87p13</i>	<i>Phi87p12</i>
5726	ttgaca	ctctaaagt	<i>Phi87p14</i>	<i>Phi87p16</i>
9709	ttgaca	ggttattat	<i>Phi87p27</i>	<i>Phi87p26</i>
11931	ttaaaa	ttatattat	<i>Phi87p34</i>	<i>Phi87p33</i>
12664	ttgtat	tggtatcat	<i>Phi87p38</i>	<i>Phi87p36</i>
13430	ttgtag	aggтатаat	<i>Phi87p42</i>	<i>Phi87p41</i>
13878	ttatca	acttaaaat	<i>Phi87p43</i>	<i>Phi87p42</i>
15387	ttgtta	taacaaaat	<i>Phi87p46</i>	<i>Phi87p47</i>
16549	ttgacg	ctgtaaatt	<i>Phi87p47</i>	<i>Phi87p48</i>
18037	tcgcag	ttttataat	<i>Phi87p50</i>	<i>Phi87p51</i>
18632	tttaca	tgatatctt	<i>Phi87p51</i>	<i>Phi87p52</i>
18936	ttgatt	aagtaaatt	<i>Phi87p52</i>	<i>Phi87p53</i>
20506	tttaca	tggtaggat	<i>Phi87p57</i>	<i>Phi87p58</i>
21973	ttcatt	ttttaaaat	<i>Phi87p60</i>	<i>Phi87p62</i>
23707	ttgaag	gtgtctgat	<i>Phi87p67</i>	<i>Phi87p68</i>
24013	ttgata	ggtaaagat	<i>Phi87p68</i>	<i>Phi87p70</i>
25023	ttgcta	ggttaagat	<i>Phi87p73</i>	<i>Phi87p75</i>
26316	tttaca	tcatataat	<i>Phi87p76</i>	<i>Phi87p79</i>
27984	ttgaca	ccttagaat	<i>Phi87p80</i>	<i>Phi87p81</i>
30427	ttgttg	tggtaaaat	<i>rIIA</i>	<i>Phi87p83</i>
30949	ttgaca	gtatatgat	<i>Phi87p84</i>	<i>nadV</i>
33726	ttacca	ctgtaaaat	<i>Phi87p89</i>	<i>Phi87p92</i>
34052	atgaag	atcaaaaat	<i>Phi87p92</i>	<i>Phi87p94</i>
35766	ttgtca	gagtaaaac	<i>nrdG</i>	<i>Phi87p100</i>
37376	tttcca	ctttagaat	<i>Phi87p104</i>	<i>Phi87p105</i>
39727	atgcca	gttcatcat	<i>Phi87p109</i>	<i>Phi87p110</i>
43581	gtgata	tggcagaat	<i>nrdA</i>	<i>Phi87p118</i>
55692	ttgaga	attgacaat	<i>Phi87p145</i>	<i>Phi87p144</i>
55845	tttaag	cactacaat	<i>Phi87p143</i>	<i>Phi87p144</i>
56135	tttaaa	aggtagact	<i>Phi87p147</i>	<i>Phi87p146</i>
58424	ttgaca	ttttatact	<i>Phi87p154</i>	<i>Phi87p153</i>
60180	ttccta	tggtattct	<i>Phi87p161</i>	<i>Phi87p159</i>
60953	ttgaaa	ctgtatgat	<i>td</i>	<i>frd</i>
62577	ttgact	tgtaatat	<i>Phi87p166</i>	<i>Phi87p167</i>
72038	ttgatg	tactaagat	<i>Phi87p180</i>	<i>Phi87p181</i>
74285	ttgcta	atattattat	<i>Phi87p181</i>	<i>Phi87p184</i>
78706	ttgaag	tgccatact	<i>Phi87p193</i>	<i>Phi87p194</i>
81939	ttgtca	tgatatgat	<i>Phi87p199</i>	<i>Phi87p200</i>
83928	tttcaa	agttaaatt	<i>Phi87p203</i>	<i>Phi87p206</i>
85791	tagaca	agttatact	<i>Phi87p207</i>	<i>Phi87p208</i>
86901	ttcaaa	atattatagt	<i>Phi87p210</i>	<i>Phi87p02</i>

La elevada conservación de estas secuencias y su similitud con los promotores de las células procariotas podría representar una ventaja para el fago ya que facilitaría el reconocimiento de sus promotores una vez infectara a la bacteria huésped (Figura 26).

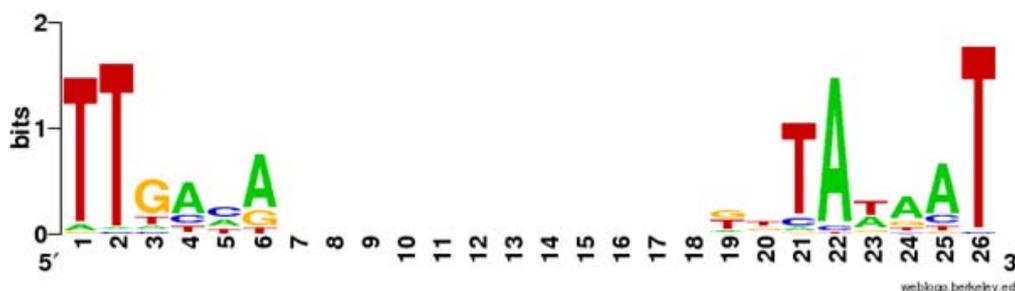


Figura 26. Logo de las secuencias consenso -35 y -10 de los promotores del fago UAB_Phi87.

4.4.2.2. Control traduccional

De los 149 genes anotados del genoma del fago UAB_Phi87, 147 presentan el codón de inicio ATG mientras que los dos restantes, correspondientes a los genes *Phi87p119* y *Phi87p145*, se inician con el codón TTG. En referencia a los codones de final de traducción, análogamente a lo descrito para el UAB_Phi20, el codón TAA vuelve a ser el mayoritario estando presente en el 67,1% de los genes, seguido del codón TGA, representado en un 25,5% y, finalmente, el codón TAG en el 7,4% de los genes restantes.

El porcentaje de GC del fago UAB_Phi87 (38,9%) es claramente inferior al de su huésped *Salmonella* (52,2%). Un análisis más profundo del uso de codón, mediante la aplicación *countcodon output* (Tablas 23 y 24), reveló una significativa diferencia en el uso de determinados codones que se traduce en una notable disminución del porcentaje de GC en la primera y última posición del triplete del codón. Aunque este hecho también se comentó anteriormente para el fago UAB_Phi20, en este caso la diferencia entre el porcentaje de GC del fago UAB_Phi87 y el de *Salmonella* es significativamente superior.

Finalmente, el análisis de los mejores sitios de unión de los ribosomas reveló una elevada conservación de la secuencia consenso de Shine-Dalgarno (Figura 27). A diferencia del fago UAB_Phi20, en el fago UAB_Phi87 la mayoría de los RBS detectados están a una distancia media de 14 pb respecto al inicio de traducción.

Tabla 23. Uso de codón del fago UAB_Phi87 y de su huésped *Salmonella*.

		U		C		A		G				
U	Phe	34,6	<i>21,5</i>	Ser	26,1	<i>8,4</i>	Tyr	15,7	<i>16,4</i>	Cys	20,2	<i>4,7</i>
	Phe	22,9	<i>15,3</i>	Ser	10,6	<i>10,7</i>	Tyr	16,5	<i>11,7</i>	Cys	14,5	<i>6,2</i>
	Leu	27,6	<i>13,2</i>	Ser	22,7	<i>8</i>	STOP	23,9	<i>1,8</i>	STOP	20,2	<i>1,2</i>
	Leu	24,3	<i>12,1</i>	Ser	4,9	<i>9,5</i>	STOP	12,6	<i>0,3</i>	Trp	12,3	<i>14,3</i>
C	Leu	29,6	<i>12,2</i>	Pro	13,9	<i>8</i>	His	19,7	<i>12,1</i>	Arg	6,2	<i>18,1</i>
	Leu	14,1	<i>11</i>	Pro	7,2	<i>7,2</i>	His	12,5	<i>9,4</i>	Arg	3,2	<i>21,2</i>
	Leu	11,5	<i>4,7</i>	Pro	17,1	<i>6,6</i>	Gln	21,	<i>12,6</i>	Arg	4,6	<i>4,3</i>
	Leu	18,9	<i>49,3</i>	Pro	3,5	<i>22,6</i>	Gln	16,1	<i>30,5</i>	Arg	3	<i>7,9</i>
A	Ile	24,3	<i>27,4</i>	Thr	17,5	<i>8,2</i>	Asn	23,2	<i>19,1</i>	Ser	21	<i>8,6</i>
	Ile	19,3	<i>24</i>	Thr	18,3	<i>23,6</i>	Asn	19,9	<i>21,1</i>	Ser	15,5	<i>17,8</i>
	Ile	23,4	<i>6,7</i>	Thr	18,6	<i>8,1</i>	Lys	24,7	<i>32,4</i>	Arg	21,6	<i>3,4</i>
	Met	14,6	<i>26</i>	Thr	8,1	<i>18,5</i>	Lys	24,6	<i>12,8</i>	Arg	10,9	<i>2,5</i>
G	Val	20,9	<i>16,4</i>	Ala	15,2	<i>14,6</i>	Asp	13,7	<i>32,6</i>	Gly	12,4	<i>18</i>
	Val	12,8	<i>17,8</i>	Ala	6,8	<i>27,9</i>	Asp	8,1	<i>21,7</i>	Gly	4,8	<i>32,5</i>
	Val	17,6	<i>11,7</i>	Ala	15,2	<i>15</i>	Glu	18,4	<i>35,8</i>	Gly	7	<i>9,3</i>
	Val	12,4	<i>24,2</i>	Ala	2,8	<i>36,4</i>	Glu	10,3	<i>21,2</i>	Gly	5	<i>11,8</i>

La columna de la izquierda indica el primer nucleótido de los codones, la fila superior corresponde al segundo nucleótido y finalmente en la columna de la derecha se indican los nucleótidos de la tercera posición del codón. Las frecuencias de uso de codón se indican en negrita para el fago UAB_Phi87 y en cursiva para *Salmonella*.

Tabla 24. Porcentaje de GC de cada uno de los tripletes del genoma del fago UAB_Phi87 y del cromosoma de *Salmonella*.

Posición del triplete	% GC UAB_Phi87	% GC <i>Salmonella</i>
1	38,5	58,5
2	44,2	41,5
3	39,1	57,9



Figura 27. Logo de la secuencia consenso Shine-Dalgarno de los RBS del fago UAB_Phi87.

4.4.2.3. Terminadores de transcripción

El genoma del fago UAB_Phi87 presenta 20 terminadores Rho-independientes, determinados mediante el programa FindTerm (Softberry) (Tabla 25). Entre ellos cabe destacar el terminador 2, situado tras la lisina del fago; el terminador 10, localizado tras el gen *rIIB*, hipotéticamente involucrado en la maquinaria replicativa del fago en determinadas condiciones ambientales; el terminador 11, posicionado tras el gen *nadV*, relacionado con el metabolismo de los nucleótidos y, finalmente, el terminador 19, situado tras el principal gen de la cola.

Tabla 25. Posibles terminadores Rho-independientes en el genoma del fago UAB_Phi87.

Terminador	Gen	Inicio	Final	Cadena
T1	<i>Phi87p19</i>	7367	7380	+
T2	<i>Phi87p24</i>	9381	9396	+
T3	<i>Phi87p31</i>	11447	11470	+
T4	<i>Phi87p39</i>	13064	13082	+
T5	<i>Phi87p43</i>	14565	14582	+
T6	<i>Phi87p47</i>	16189	16206	-
T7	<i>Phi87p51</i>	17998	18012	-
T8	<i>Phi87p65</i>	22335	22372	-
T9	<i>Phi87p75</i>	25013	25028	-
T10	<i>rIIB</i>	26805	26820	-
T11	<i>nadV</i>	30938	30953	-
T12	<i>Phi87p95</i>	34500	34516	-
T13	<i>Phi87p103</i>	36486	36517	-
T14	<i>Phi87p109</i>	39439	39454	-
T15	<i>Phi87p118</i>	43544	43561	-
T16	<i>Phi87p127</i>	46752	46772	-
T17	<i>Phi87p136</i>	51082	51095	-
T18	<i>Phi87p165</i>	61949	61968	-
T19	<i>Phi87p170</i>	64988	65005	-
T20	<i>Phi87p186</i>	74886	74911	-

+, indica que se encuentra en la cadena codificante 5' → 3' del DNA; -, indica que se encuentra en la cadena complementaria

4.4.2.4. Codificación de tRNAs

A diferencia de lo comentado para el fago UAB_Phi20, el análisis realizado mediante la aplicación tRNAscan-SE (Lowe *et al.*, 1997) reveló la presencia de 23 tRNAs codificados en el genoma del fago UAB_Phi87 (Tabla 26), lo cual concuerda con que este fago pertenezca al grupo de fagos tipo Felix O1, los cuales también presentan tRNAs en su genoma. Cabe mencionar que 3 de estos 23 tRNAs,

Resultados

correspondientes a los tRNAs 13, 18 y 20, están descritos como pseudo tRNAs. Asimismo, la presencia del tRNA de la metionina (tRNA 14) puede tener un papel positivo en el inicio de la traducción del genoma fágico tras la infección del huésped (Whichard *et al.*, 2010).

Tabla 26. Localización de los tRNAs codificados en el genoma del fago UAB_Phi87.

tRNA	Inicio	Final	Aminoácido	Anticodón	Codón	Cove Score
1	1100	1025	Arg	ACG	CGT	63,5
2	1183	1106	Leu	CAA	TTG	43,8
3	1259	1185	Val	TAC	GTA	51,8
4	1430	1355	Thr	TGT	ACA	59,8
5	1512	1438	Gly	TCC	GGA	56,5
6	1594	1519	Ala	TGC	GCA	46,3
7	1676	1601	Lys	CTT	AAG	59,7
8	1761	1684	Leu	TAG	CTA	48,9
9	2422	2346	Arg	TCT	AGA	74,9
10	2834	2759	Ile	GAT	ATC	68,2
11	2992	2917	Lys	TTT	AAA	60,2
12	3527	3451	Asp	GTC	GAC	68,4
13	3621	3534	Pseudo (Tyr)	GTA	TAC	39,9
14	3861	3785	Met	CAT	ATG	28,9
15	4030	3953	Glu	TTC	GAA	63,1
16	4114	4038	Pro	TGG	GGA	68,3
17	85986	85911	Cys	GCA	ACG	50,4
18	86083	85991	Pseudo (Ala)	GCT	AGC	41,1
19	86911	86836	Phe	GAA	TTC	43,8
20	86993	86918	Pseudo (His)	GTG	CAC	42,3
21	87100	87025	Gln	CTG	CAG	50,2
22	87184	87106	Leu	TAA	TTA	57,9
23	87262	87187	Gln	TTG	CAA	47,3

4.4.2.5. Organización del genoma del fago UAB_Phi87

El análisis bioinformático del genoma del fago UAB_Phi87, realizado por similitud con las secuencias depositadas en las bases de datos, permitió asignar una función clara únicamente a 36 de los 149 posibles genes. De los 113 genes restantes, 94 presentan similitud con genes de los fagos Felix O1, WV8 y SA1, pero no tienen función atribuida, por lo que sus productos deben considerarse como proteínas hipotéticas. Finalmente, 19 de los posibles genes codificados en el genoma del fago UAB_Phi87 no presentan homología con ninguna secuencia disponible en las bases de datos.

Los fagos del tipo Felix O1 presentan genomas de más de 80 Kb y, aunque algunos de ellos como el propio Felix O1 han sido ampliamente utilizados, todavía se desconoce el papel ejercido por la mayoría de sus genes, siendo por ello más difícil el establecimiento de módulos funcionales. Los

resultados obtenidos tras las comparaciones realizadas mostraron que la organización génica de estos fagos está claramente conservada. Por ello y en función del estudio del análisis transcripcional del fago Felix O1 realizado por Whichard y col. (Whichard *et al.*, 2010), se ha organizado el genoma del fago UAB_Phi87 en los cuatro grandes módulos que se comentan a continuación (Figura 28), indicándose también la similitud de estos módulos a nivel génico entre fagos tipo Felix O1:

Metabolismo. Este módulo funcional agrupa a casi la mitad de los genes del genoma del fago UAB_Phi87 (desde el ORF 32 hasta el ORF 98) y equivale al 43% del genoma fágico. Aunque la mayoría de los genes son de función desconocida es el módulo más caracterizado. Entre las proteínas codificadas en él cabe destacar a todas aquellas relacionadas con el metabolismo de los nucleótidos que debe permitir la replicación del fago y el control de la maquinaria transcripcional del huésped. La mayoría de los genes codificados en este módulo son de expresión temprana o intermedia y su similitud se sitúa en torno al 90% con el módulo equivalente al de los fagos FelixO1 y SA1 y al 89% con el del fago WV8.

Es importante mencionar que en este módulo, el fago UAB_Phi87 presenta el gen *nrdD* (ribonucleotidil reductasa) interrumpido por una endonucleasa (ORF 78), análoga a la del fago JSE, el cual pertenece al grupo de los fagos tipo T4 de *E. coli*.

Replicación. Aunque este módulo es el de menor tamaño, ya que representa algo menos del 10% del genoma del fago UAB_Phi87 (desde el ORF 99 hasta el ORF 117), comprende los principales genes para la replicación del genoma fágico. Es destacable el hecho de que es el módulo que presenta una menor similitud (88%) con respecto a los módulos equivalentes de los fagos Felix O1, WV8 y SA1. La expresión de sus genes debe producirse casi simultáneamente a algunos de los genes del módulo anterior y por ello es probable que los dos principales promotores divergentes, a partir de los cuales se inicia la transcripción del fago, se encuentren entre estos dos módulos.

Lisis. El único gen con función clara de este módulo es la lisina, no obstante y dado que la mayoría de las proteínas codificadas en este módulo corresponden a genes de expresión intermedia y tardía, se han agrupado todos ellos bajo un mismo módulo. Así, este módulo comprende el 10% del genoma del fago UAB_Phi87 (desde el ORF 13 hasta el ORF 31) y presenta una similitud del 90% con el módulo equivalente de los fagos Felix O1 y SA1 y del 87% con el del fago WV8.

Morfogénesis y empaquetamiento. Este módulo estructural está compuesto por, aproximadamente, el 37% del genoma del fago UAB_Phi87 (desde el ORF 1 al ORF 12 y desde el ORF 118 hasta el ORF 149). Este módulo engloba los genes relacionados con la formación de la cápside, la cola y del ensamblaje final de los viriones. Dado que la mayoría de los genes de este módulo son de función desconocida, se determinó el porcentaje de similitud de todo el módulo funcional con los fagos Felix O1, WV8 y SA1, obteniéndose valores del 93%, 90% y 93%, respectivamente, siendo el módulo más

Resultados

conservado. Cabe mencionar que el fago SA1 presenta un genoma de 147,3 Kb y es en el módulo de morfogénesis donde se encuentran las 60 Kb de diferencia con respecto a los otros tres fagos. Por ello, debe tenerse en cuenta que la similitud obtenida para este módulo entre este fago y el fago UAB_Phi87 está sesgada ya que, en realidad, si se incluyeran las 60 Kb mencionadas, la similitud debería ser mucho menor.

Otro aspecto importante es el hecho de que en este módulo, los fagos Felix O1, WV8 y SA1 contienen una serie de endonucleasas de las que carece el fago UAB_Phi87, habiéndose sustituido este grupo de genes por otros para los cuales no se ha encontrado ninguna homología.

4.4.3. Comparación filogenética del fago UAB_Phi87

Como se ha indicado anteriormente, el fago UAB_Phi87 presenta una elevada homología, tanto a nivel génico como de organización funcional, con los fagos Felix O1, WV8 y SA1. La representación esquemática de los genomas de estos fagos (Figura 29) permite observar dicha conservación genómica aunque sus tamaños sean distintos, hecho atribuible a su diferente composición génica, sobre todo en el caso del fago SA1 que presenta un genoma claramente mayor al de los otros tres fagos.

Con la finalidad de estimar la proximidad filogenética de estos cuatro bacteriófagos y siguiendo el mismo análisis que el realizado con el fago UAB_Phi20, se procedió a alinear sus genomas. Los resultados obtenidos (Figura 30) muestran, como era de esperar, una mayor proximidad entre los fagos UAB_Phi87 y Felix O1 ya que ambos fagos son específicos de *Salmonella*. Sin embargo, cabe mencionar que el fago UAB_Phi87 estaría un poco más cercano filogenéticamente al ancestro común de ambos fagos y, relativamente, más próximo a los fagos WV8 y SA1.

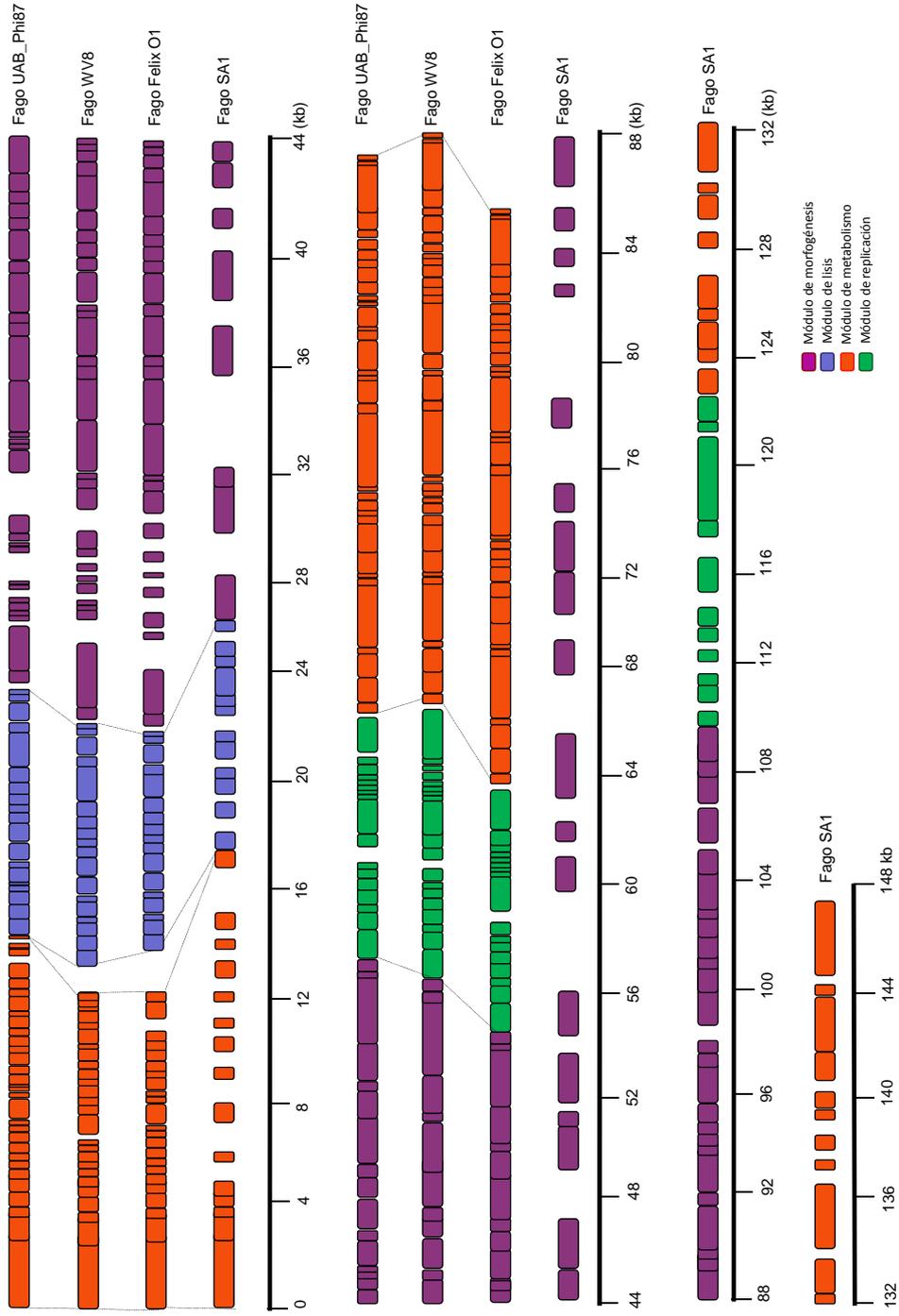


Figura 29. Comparación de la arquitectura génica de los fagos UAB_Phi87, Felix O1, WV8 y SA1

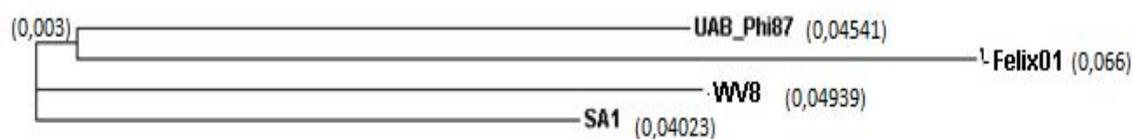


Figura 30. Representación de la distancia filogenética de los genomas de los fagos UAB_Phi87, Felix O1, WV8 y SA1. La distancia entre ellos se encuentra indicada entre paréntesis y equivale al número mínimo de sustituciones necesarias para convertir una secuencia en otra.

4.5. Efecto *in vitro* de los fagos

Una vez caracterizado el ciclo multiplicativo de los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87, así como su estabilidad a diferentes condiciones ambientales, se estudió la cinética de infección sobre cultivos en LB de *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Enteritidis* LK5, infectados con los fagos UAB_Phi20, UAB_Phi87 y con ambos fagos al mismo tiempo (cóctel A). Además, dado que en trabajos paralelos a los presentados en esta memoria, se había aislado y caracterizado el fago UAB_Phi78 (Spricigo, 2011) que también se perfilaba como un buen candidato, se infectaron cultivos de las mencionadas cepas con un combinado de los tres fagos (cóctel B). En todos los casos la MOI fue de 1 y los fagos que integraron los distintos combinados fágicos estuvieron a la misma concentración.

Como era de esperar, la infección promovida por una mezcla de diferentes fagos provocó una mayor disminución de la concentración bacteriana y también más prolongada en el tiempo (Figura 31). Para poder comparar mejor el efecto producido por los cócteles fágicos A y B sobre la concentración de la población bacteriana, en la Tabla 27 se muestra la reducción de dicha concentración a dos tiempos de infección con ambos cócteles fágicos, así como la máxima reducción obtenida. En dicha tabla puede observarse que aunque la infección con el cóctel A produjo reducciones significativas de la concentración bacteriana, los valores obtenidos con el cóctel B siempre fueron iguales o superiores, indicando así una mejor efectividad de este último cóctel. Asimismo, al comparar los resultados obtenidos al infectar con los cócteles fágicos respecto a las dos serovariedades, se observó que la máxima reducción bacteriana así como la obtenida tras 8 horas de la infección fue mayor para *S. Enteritidis* LK5 que para *S. Typhimurium* ATCC 14028.

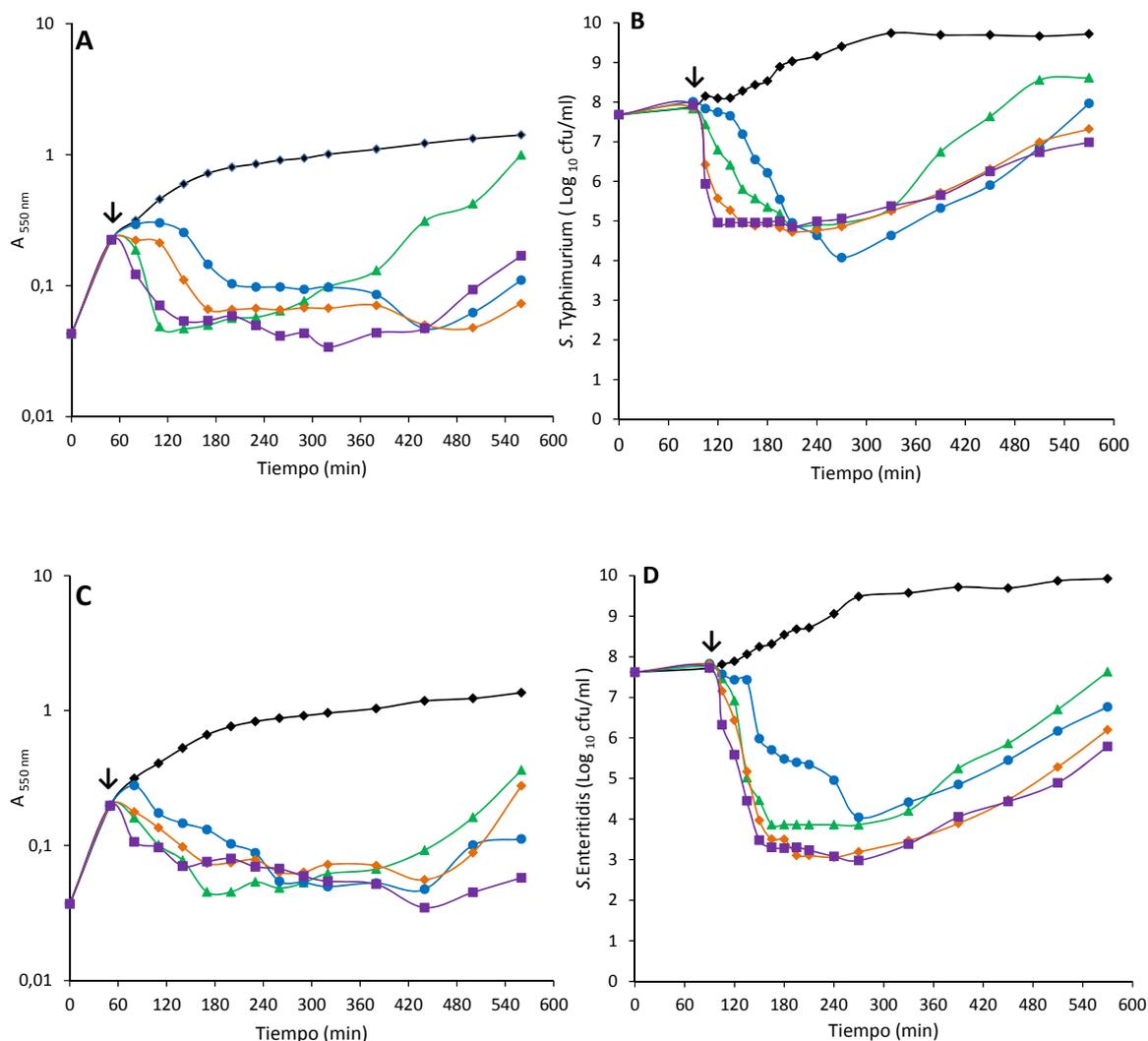


Figura 31. Cinética de infección a 37°C de los bacteriófagos UAB_Phi20 (▲), UAB_Phi87 (●), del cóctel integrado por los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87 (◆) y del cóctel compuesto por los fagos UAB_Phi20, UAB_Phi87 y UAB_Phi78 (■) sobre *S. Typhimurium* (paneles A y B) y *S. Enteritidis* (paneles C y D). Como control se presenta la cinética de crecimiento bacteriano sin infección fágica (◆) y con una flecha se señala el momento de la infección.

Tabla 27. Reducción de la concentración de las serovariedades Typhimurium y Enteritidis debidas a la infección con los cócteles A (UAB_Phi20 y UAB_Phi87) y B (UAB_Phi20, UAB_Phi87 y UAB_Phi78).

Bacteria	Cóctel	Reducción (Log ₁₀ cfu/ml)		
		60 min	8 h	Máxima
<i>S. Typhimurium</i>	A	2,5	2,4	4,3
	B	3,2	2,8	4,3
<i>S. Enteritidis</i>	A	1,5	3,7	5,6
	B	2,3	4,1	6,5

Dado que en los programas de la UE de control de *Salmonella* en el sector avícola las serovariedades objeto de reducción no son únicamente *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, sino que también se regula el control de las serovariedades Hadar, Infantis y Virchow (EFSA, 2010b), se estudió si ambos cócteles eran también capaces de lisar a los cultivos de estas tres últimas serovariedades. Los resultados obtenidos mostraron que ambos cócteles producían un descenso significativo de la concentración de estas bacterias (Figura 32).

Para determinar el efecto de la temperatura en la infectividad de los cócteles fágicos A y B, se realizaron cinéticas de infección de ambos cócteles a 42°C. Los resultados obtenidos (Figura 33, paneles A y C) mostraron que los cócteles A y B producían una clara disminución de la concentración de *S. Enteritidis* LK5 y *S. Typhimurium* ATCC 14028, si bien el descenso obtenido fue menor que el obtenido a 37°C (Figura 31, paneles A y C). Además, se observó que a 42°C el aumento de A_{550} de los cultivos tuvo lugar aproximadamente a partir de los 250 min de la infección. Asimismo, el efecto del cóctel B sobre *S. Typhimurium* ATCC 14028 a 42°C fue mucho mayor que el del cóctel A (Figura 33, panel A).

Para simular el efecto de las sales biliares presentes en el tracto intestinal de los animales, se infectaron cultivos de *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Enteritidis* LK5, crecidos a 42°C y suplementados con sales biliares, con los cócteles A y B. Como se muestra en la Figura 33 (paneles B y D), ambos cócteles son capaces de lisar a ambas poblaciones bacterianas. Sin embargo, el descenso de la concentración bacteriana no es tan acusado como el obtenido a 37°C o a 42°C en ausencia de sales biliares. Es de destacar que, en estas condiciones, la actividad de los fagos sobre los cultivos de *S. Enteritidis* LK5 fue menor que sobre *S. Typhimurium* ATCC 14028.

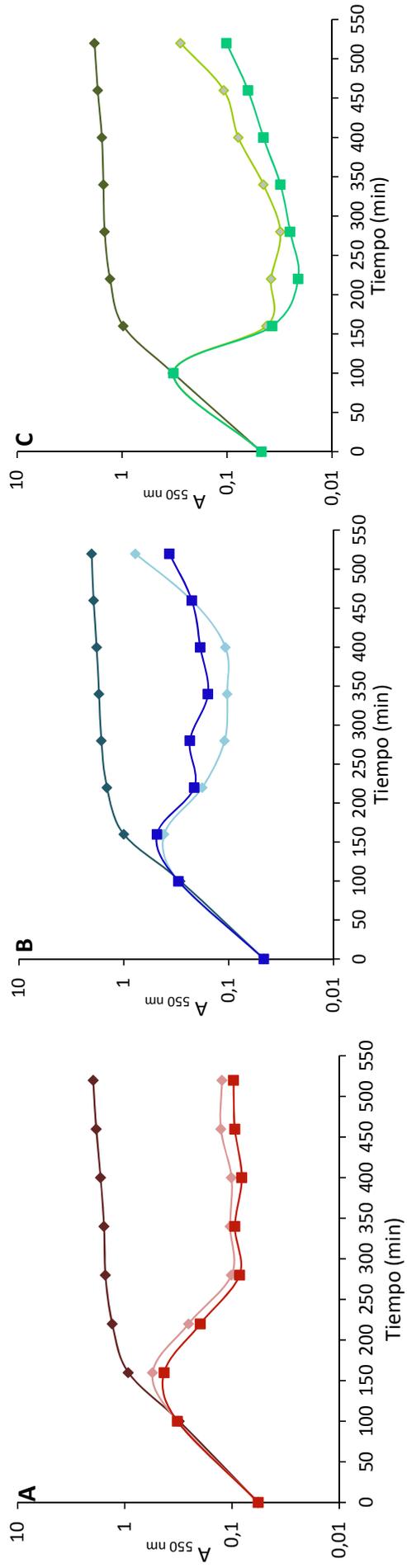


Figura 32. Cinética de infección de los cócteles fágicos A (♦) y B (■) sobre las serovariedades Virchow (panel A), Infantis (panel B) y Hadar (panel C) de *S. enterica*. Como control se muestra la A_{550 nm} de los cultivos de cada una de las serovariedades estudiadas sin infectar (♦).

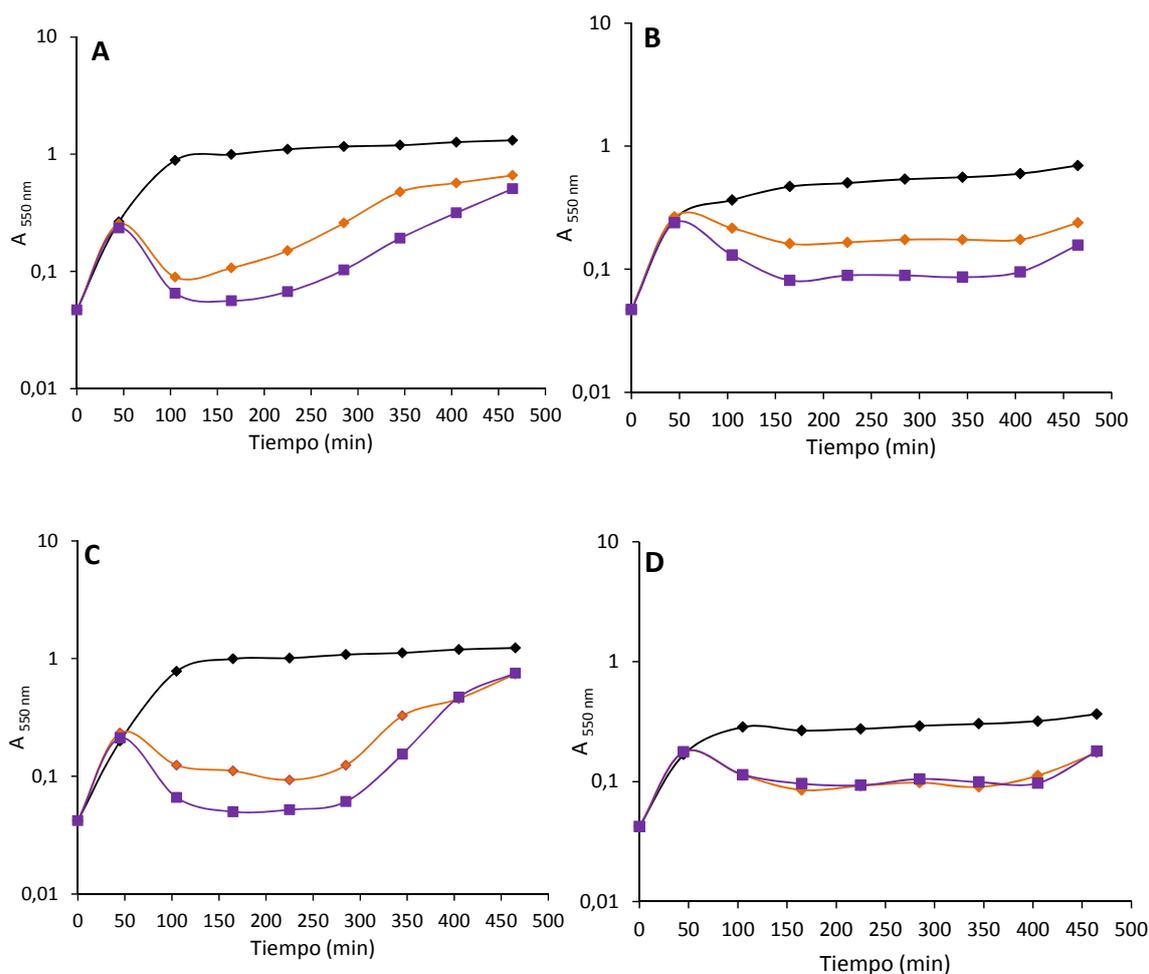


Figura 33. Cinética de infección de los cócteles A (◆) y B (■) sobre *S. Typhimurium* (paneles A y B) y de *S. Enteritidis* (paneles C y D). Los paneles A y C corresponden a los cultivos crecidos a 42°C, mientras que los paneles B y D se refieren a los cultivos crecidos a 42°C en presencia de sales biliares. Como control se muestra la $A_{550\text{ nm}}$ del cultivo bacteriano sin infectar (◆).

4.6. Eficacia del cóctel fágico en modelos animales

4.6.1. Modelo murino

En primer lugar se determinó el tiempo de residencia de los fagos en el tracto intestinal de los animales. Para ello, se administraron a dos grupos de 10 ratones BALB/C, por vía oral, dosis únicas de 10^8 y 10^{10} pfu/animal, respectivamente, y se determinó la presencia de dichos fagos en el intestino de los animales a lo largo del tiempo. Para analizar la capacidad de translocación de los fagos, se analizó su presencia en el bazo y el hígado y también en las heces para así determinar su excreción. Cabe destacar que únicamente pudieron detectarse fagos en el intestino mediante siembra directa en placa hasta un día después de la administración del cóctel fágico. No obstante, mediante la técnica de enriquecimiento fue posible su detección hasta el cuarto día en los ratones tratados con

Resultados

10^8 pfu/animal y hasta el noveno día cuando la dosis fue de 10^{10} pfu/animal. En atención a los resultados obtenidos, se estableció la dosis de 10^{10} pfu/animal para los siguientes estudios. Es importante comentar que la detección de los fagos en las heces de los animales fue posible a lo largo de todo el experimento para ambas dosis de ensayo, no así en tejidos internos, en donde no se detectaron ni siquiera con el método de enriquecimiento.

En el modelo murino y según la dosis infectiva, *Salmonella* puede dar lugar a infecciones sistémicas, que terminan con la muerte del animal, o bien a la eliminación total del patógeno (Mastroeni, 2004). Para determinar el efecto del cóctel fágico fue preciso utilizar dosis infectivas de *Salmonella* que produjesen la muerte de los animales, lo que permitirá valorar la eficacia del cóctel en función de la supervivencia de los animales. Por ello, en primer lugar, se determinó la dosis letal 50 (DL₅₀) de las cepas UA1872 y UA1894 en ratones BALB/C, según se ha descrito en el apartado de Material y Métodos. Los resultados obtenidos indicaron que la DL₅₀ de *S. Typhimurium* UA1872 es de $1,8 \cdot 10^6$ cfu/animal y de $3,3 \cdot 10^6$ cfu/animal para *S. Enteritidis* UA1894. En atención a estos resultados, la dosis infectiva de ambas cepas para los siguientes estudios se estableció en 10^8 cfu/animal, lo cual corresponde a 100 veces las DL₅₀ indicadas. Seguidamente, se determinó el tiempo que tardaba *Salmonella* en colonizar el tracto intestinal de los animales sanos. Para ello, los ratones se infectaron oralmente con 10^8 cfu/animal y se realizó un recuento de viables de *Salmonella* en distintos órganos. Los resultados obtenidos (Figura 34) mostraron que a las 4 h de la infección, la bacteria había colonizado completamente el tracto intestinal del animal y empezaba su diseminación hacia tejidos internos a través de las placas de Peyer. La detección del patógeno en hígado y bazo a las 48 h de la infección denotan la rápida propagación sistémica de *Salmonella* en este modelo animal.

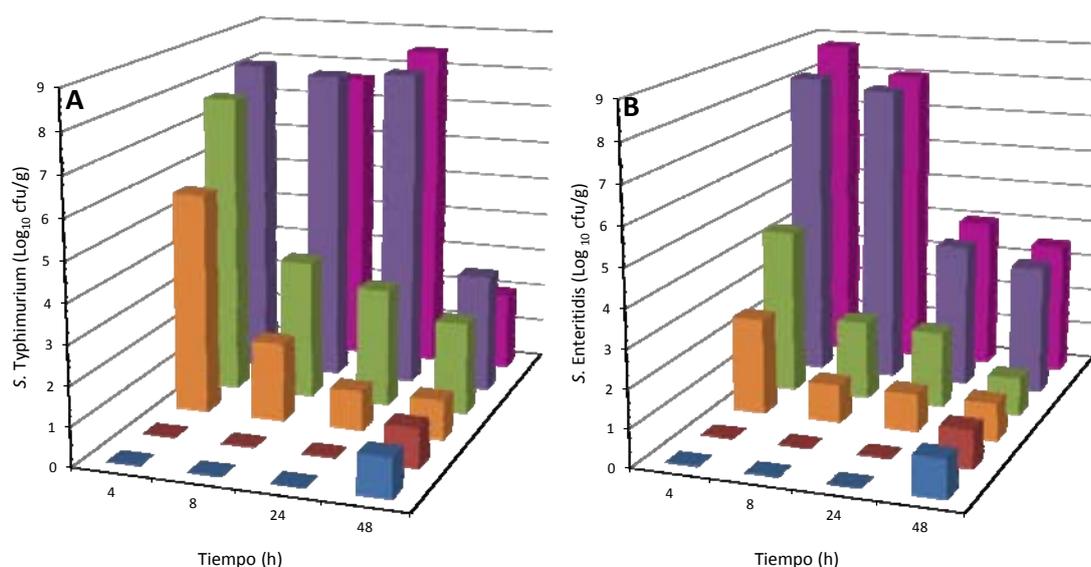


Figura 34. Concentración a lo largo del tiempo de *S. Typhimurium* UA1872 (Panel A) y *S. Enteritidis* UA1894 (Panel B) en hígado (■), bazo (■), placas de Peyer (■), intestino delgado (■), intestino grueso (■) y heces (■) de ratones BALB/C.

Para determinar la capacidad preventiva y terapéutica del cóctel fágico y para refinar las pautas de administración de dicho cóctel, se llevaron a cabo tres experimentos distintos. En todos ellos, tanto la infección bacteriana como el tratamiento fágico fueron aplicados por vía oral mediante inoculación directa en el estómago. El primer experimento se diseñó para determinar la capacidad preventiva del cóctel fágico. Para ello, se administró a los ratones una única dosis de fagos 8 h antes de su infección con *Salmonella*. Los resultados mostraron un retraso en la muerte de los ratones infectados con *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* de seis y cuatro días, respectivamente (Figura 35, paneles A y B).

En el segundo experimento se evaluó la capacidad terapéutica del cóctel, administrándolo tras 4 h y al séptimo y décimo día después de infectar a los ratones con *Salmonella*. En este caso, el retraso en la muerte de los ratones respecto al grupo control fue de 4 y 2 días, respectivamente, para los animales infectados con *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* (Figura 35, paneles C y D).

Finalmente, se estudió la eficacia de dicho cóctel, administrándolo en el momento de la infección y mediante una readministración a las 6, 24 y 30 h después de la infección para dificultar la completa colonización de *Salmonella*. Esta última aproximación retrasó ocho días la muerte de los ratones infectados con *S. Enteritidis* y permitió la supervivencia de la mitad de los ratones infectados con *S. Typhimurium* ($p = 0,068$) (Figura 35, paneles E y F). El conjunto de resultados justificó la realización de estudios de eficacia del cóctel fágico en el modelo *Gallus gallus*.

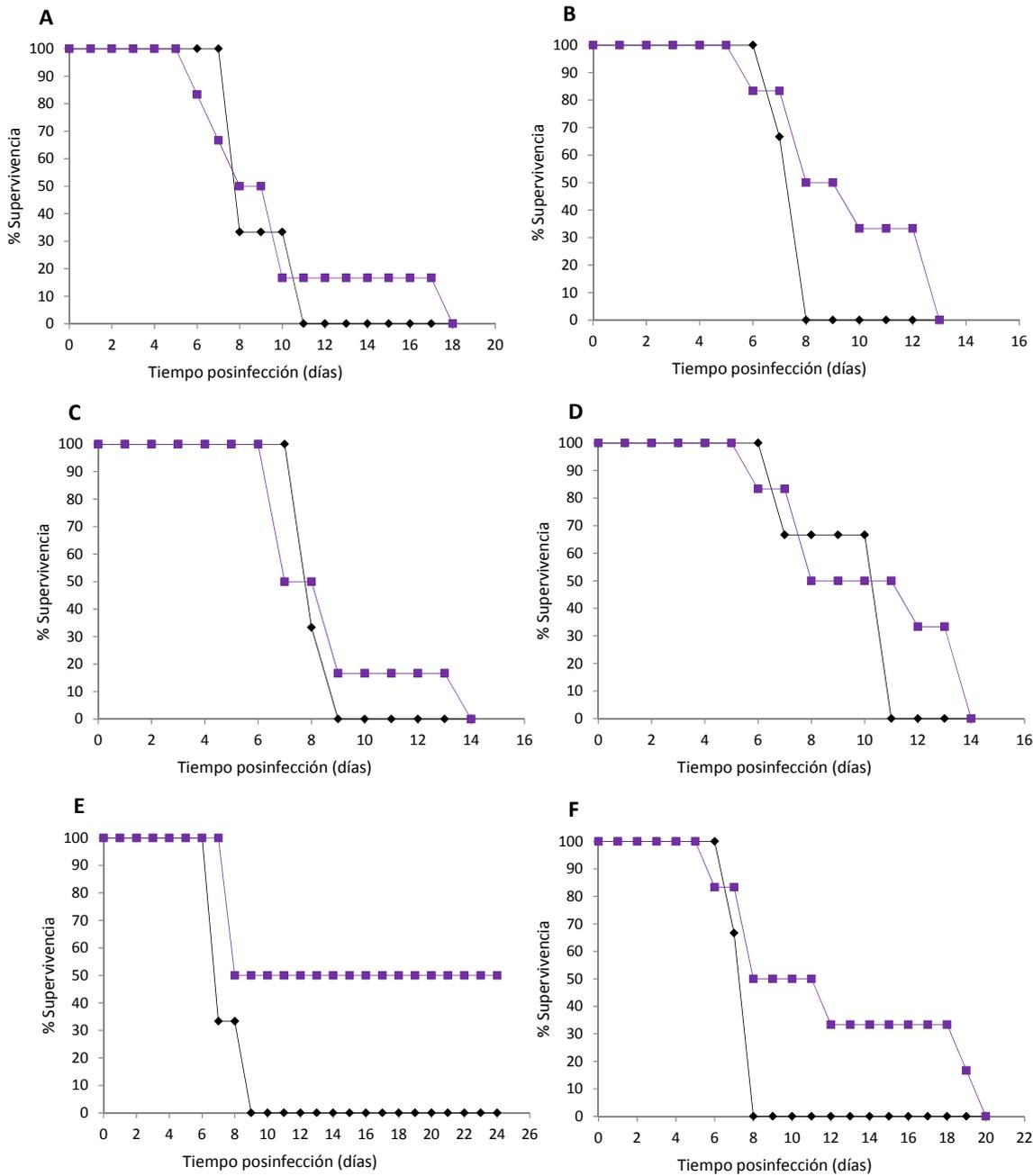


Figura 35. Efecto del cóctel fágico en la supervivencia de los ratones infectados con *S. Typhimurium* UA1872 (paneles A, C y E) y *S. Enteritidis* UA1894 (paneles B, D y F). Los paneles A y B corresponden a la aplicación del cóctel fágico 8 h antes de la infección. Los paneles C y D muestran el efecto cuando los fagos fueron administrados a las 4 h y a los 7 y 10 días tras la infección. Finalmente, los paneles E y F corresponden a la aplicación del cóctel fágico simultáneamente a la infección y a las 6, 24 y 30 h después de la infección. En cada gráfica se indica el grupo tratado (■) y el grupo control (◆).

4.6.2. Modelo *Gallus gallus*

Las especies aviares son uno de los reconocidos reservorios de bacterias zoonóticas como *Salmonella* la cual, en general, no produce ninguna sintomatología en estos animales, por lo que estos reservorios son difíciles de detectar. Así y dado que la infección por *Salmonella* en pollos raramente

causa su muerte, para poder determinar el efecto del tratamiento fágico fue preciso sacrificar a los animales a determinados tiempos y, tras su necropsia, proceder a detectar *Salmonella* en diferentes órganos. En todos los experimentos se utilizaron pollos de engorde White Leghorn SPF, los cuales fueron estabulados en aisladores para mantenerlos en un ambiente lo más controlado posible, garantizando así que los resultados obtenidos fueran debidos, directa y exclusivamente, al tratamiento fágico aplicado.

Al igual que en el modelo murino, en primer lugar se determinó el tiempo de permanencia de los bacteriófagos en el tracto intestinal de pollos sanos, administrándose exclusivamente una dosis única de 10^{10} pfu/animal. La concentración de bacteriófagos en el intestino fue muy baja, ya que en ningún caso se detectaron por siembra directa en placa. En cambio, a través del método de enriquecimiento, pudieron detectarse en el intestino delgado y en el ciego de los animales hasta el octavo día. Es importante mencionar que la detección de los fagos fue posible desde el primer día en todos los hisopos cloacales, sin embargo no se detectaron ni en el hígado ni en el bazo. Estos resultados, similares a los del modelo murino, permitieron confirmar la dosis fágica de 10^{10} pfu/animal para los posteriores experimentos.

Dado que los resultados obtenidos previamente en el modelo murino indicaron un mayor efecto de los fagos sobre la serovariedad Typhimurium, únicamente se estudió la efectividad del cóctel fágico en pollos infectados experimentalmente con dicha serovariedad. En el primer experimento se administraron los fagos tras la colonización del tracto intestinal por dicha bacteria. A pesar de que este diseño no había dado buenos resultados en ratones, se creyó conveniente experimentarlo ya que la infección por *Salmonella* en pollos cursa de forma diferente a la del modelo murino. Para llevar a cabo este estudio, se simuló las condiciones de infección en granjas, a través del contacto entre animales sanos e infectados (Fiorentin *et al.*, 2005). Para conseguir esta situación, en primer lugar se determinó la dosis infectiva de *Salmonella* más adecuada para asegurar que toda la manada se infectaba a través del contacto entre animales infectados y no infectados. Para ello, se partió de 2 grupos de 15 animales, infectando 3 pollos de cada grupo con dosis infectivas de 10^6 y 10^8 cfu/animal de *S. Typhimurium* UA1872, y se determinó la concentración de *Salmonella* a distintos tiempos en diferentes muestras de los animales de ambos grupos. Los resultados obtenidos indicaron que tras la infección oral del 20% de los animales de la manada, tres días de contacto entre los animales son suficientes para generalizar la infección al resto del grupo (Figura 36). Es importante destacar que la infección no queda confinada únicamente en el tracto intestinal sino que la bacteria rápidamente migra hacia tejidos más internos. Asimismo, en el grupo en el que se utilizó una dosis infectiva de 10^8 cfu/animal, la concentración de *Salmonella* fue, en general, algo superior que la obtenida en el grupo infectado con una dosis de 10^6 cfu/animal. Por ello, en el siguiente estudio, la dosis infectiva de *Salmonella* fue de 10^8 cfu/animal.

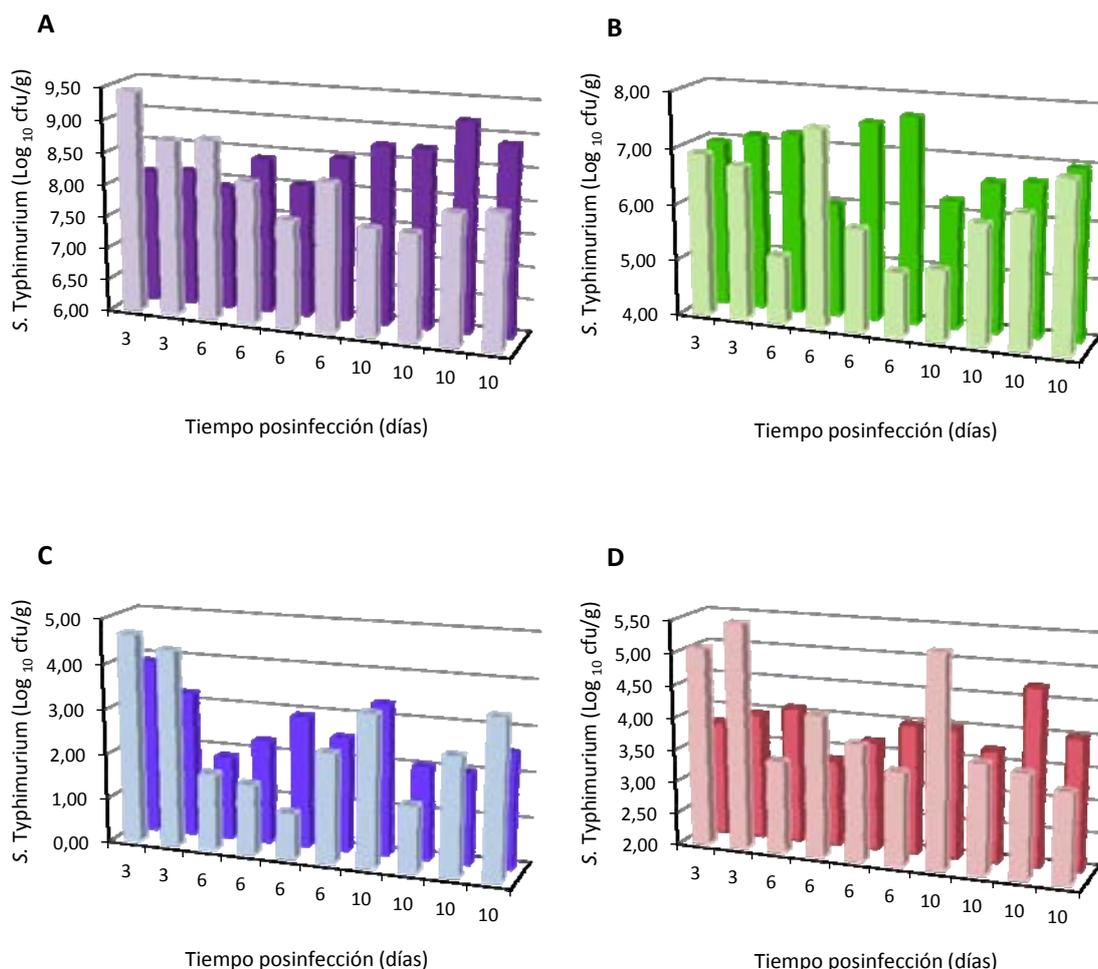


Figura 36. Colonización de *S. Typhimurium* UA1872, mediante el método de infección por contacto, del intestino grueso (Panel A), intestino delgado (Panel B), hígado (Panel C) y bazo (Panel D) de pollos White Leghorn. En todos los paneles las columnas claras corresponden a animales infectados con 10⁶ cfu/animal y las columnas oscuras a los infectados con 10⁸ cfu/animal.

En función de los resultados comentados, la infección por contacto entre animales se realizó infectando oralmente al 20% de los animales de cada manada con 10⁸ cfu/animal e iniciando el tratamiento con fagos a partir del cuarto día de la infección. Dado que los resultados obtenidos en el modelo murino indicaban que se conseguía un mejor efecto de los fagos si se administraba más de una dosis a cada animal, la pauta escogida fue la de administrar oralmente dos dosis diarias del cóctel fágico al cuarto y quinto día de la infección, considerándose como día 0 de tratamiento el día en que los animales recibieron la primera dosis fágica. Los resultados obtenidos mostraron que la terapia fágica aplicada producía una disminución de la concentración de *Salmonella* en el ciego de los animales durante los 8 primeros días de tratamiento. Así, tras un día de tratamiento, se obtuvo una reducción de *Salmonella* de un logaritmo respecto al grupo control, disminuyendo a medio logaritmo a partir del segundo día de tratamiento y hasta el octavo, tras el cual los niveles de *Salmonella* se equipararon con los del grupo control ($p = 0,055$) (Figura 37). Como era de esperar, dado que el

tratamiento se inició una vez que *Salmonella* había colonizado completamente al animal, todas las muestras cloacales del grupo control y del tratado fueron positivas para *Salmonella*, al igual que las de los otros órganos analizados (hígado, bazo e intestino delgado) (Tabla 28).

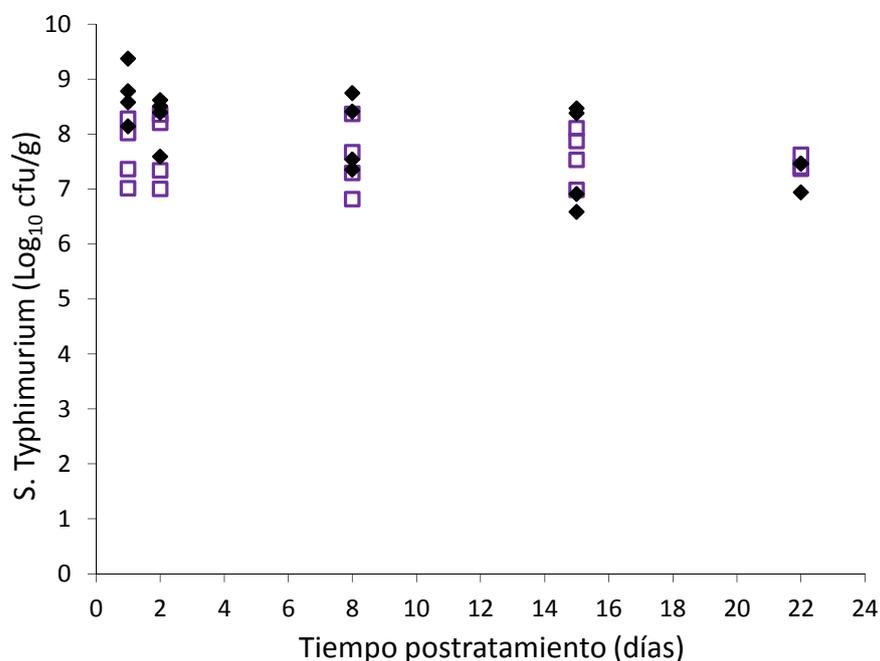


Figura 37. Eficacia del cóctel fágico en la reducción de *S. Typhimurium* UA1872 en el ciego de pollos White Leghorn infectados con dicha bacteria mediante el método de infección por contacto. La concentración de *Salmonella* en los pollos tratados (□) y no tratados (◆) se representa en Log₁₀ cfu/g de contenido del ciego. La administración del cóctel fágico se realizó por duplicado en los días 4 y 5 posteriores a la infección.

Para un mejor análisis del efecto de los fagos, también se determinó la concentración fágica en el ciego de los animales tratados. Así se observó que, durante los dos primeros días desde el inicio del tratamiento, la concentración se mantuvo entre 10^6 y 10^7 pfu/g y fue disminuyendo paulatinamente hasta que a los 22 días de haber iniciado el tratamiento, la detección de fagos sólo pudo confirmarse a través del método de enriquecimiento (Tabla 29).

Tabla 28. Detección por el método de enriquecimiento de *S. Typhimurium* UA1872 en el hígado, bazo, intestino delgado y en muestras cloacales de pollos White Leghorn.

Día postratamiento	Grupo Tratado ¹				Grupo Control ¹			
	Hisopos cloacales	Hígado	Bazo	Intestino delgado	Hisopos cloacales	Hígado	Bazo	Intestino delgado
0	23/23	-	-	-	23/23	-	-	-
1	19/19	4/4	3/4	4/4	19/19	4/4	4/4	4/4
2	15/15	3/4	3/4	4/4	15/15	4/4	4/4	4/4
8	11/11	4/4	4/4	4/4	11/11	4/4	4/4	4/4
15	7/7	4/4	4/4	4/4	7/7	4/4	4/4	4/4
22	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3

Los animales tratados recibieron dos dosis diarias del cóctel fágico al cuarto y quinto día de la infección con *Salmonella*

¹ Número de muestras positivas / Número de muestras analizadas

Tabla 29. Concentración fágica a lo largo del tiempo en el ciego de los animales tratados con el cóctel fágico tras su infección por contacto con *S. Typhimurium*.

Día posinfección	Día postratamiento	Concentración (Log ₁₀ pfu/g)	Promedio de la concentración (Log ₁₀ pfu/g)
5	1	8,5	7,6
		6,9	
		7,1	
		7,9	
6	2	5,4	6,8
		7,4	
		7,9	
		6,5	
12	8	4,0	4,3
		3,9	
		4,1	
		5,0	
19	15	3,8	3,8
		3,6	
		3,9	
		3,8	
26	22 ¹	+ ¹	
		+ ¹	
		+ ¹	

¹ Los resultados que se indican fueron obtenidos mediante el método de enriquecimiento

Seguidamente, se diseñaron dos experimentos para estudiar el efecto del tratamiento fágico previo a la infección con *Salmonella* y en el mismo momento de dicha infección. En ambos experimentos, todos los animales fueron infectados individualmente con *Salmonella* por inoculación oral con una dosis infectiva de 10⁵ cfu/animal y se consideró como día 0 el día de la infección bacteriana. En el primer experimento, se administraron dos dosis diarias del cóctel fágico desde el día anterior a la infección con *Salmonella* y hasta el tercer día posinfección y, posteriormente, se administró una dosis diaria del cóctel fágico en los días 6, 8, 10, 13 y 15 posinfección. Como puede observarse en la Figura 38, la administración del cóctel fágico produjo una disminución de la concentración de *Salmonella* en el ciego de los animales superior a 4 logaritmos respecto al grupo control durante los dos primeros días de la infección y de 3 logaritmos hasta el sexto día. A partir del octavo día esta reducción se mantuvo en 2 logaritmos, hasta que al final del experimento (17 días) se obtuvo una disminución de 1,5 logaritmos ($p < 0,0001$). El progreso de la infección en diferentes órganos de los animales de la manada reveló el elevado nivel de contención efectuado por el tratamiento fágico. Así, si bien se detectó *Salmonella* en casi todas las muestras de intestino delgado analizadas, únicamente 3 de los 23 pollos (13%) dieron positivo en el análisis cloacal realizado al primer día de la infección y no fue hasta el décimo día que la totalidad de pollos restantes fueron positivos. En contraposición, en el grupo control la detección cloacal de *Salmonella* fue del 91% en el primer día y del 100% a partir del

Resultados

segundo (Tabla 30). Asimismo, no se detectó la presencia de *Salmonella* en el hígado y bazo del grupo tratado con fagos hasta el sexto día de la infección, mientras que en el grupo control se detectó desde el primer día (Tabla 30). La concentración fágica en el ciego de los animales tratados fue de entre 10^5 y 10^6 pfu/g durante los días en los que se administraron dos dosis fágicas diarias y, a partir del sexto día, disminuyó hasta mantenerse en 10^4 pfu/g (Tabla 31).

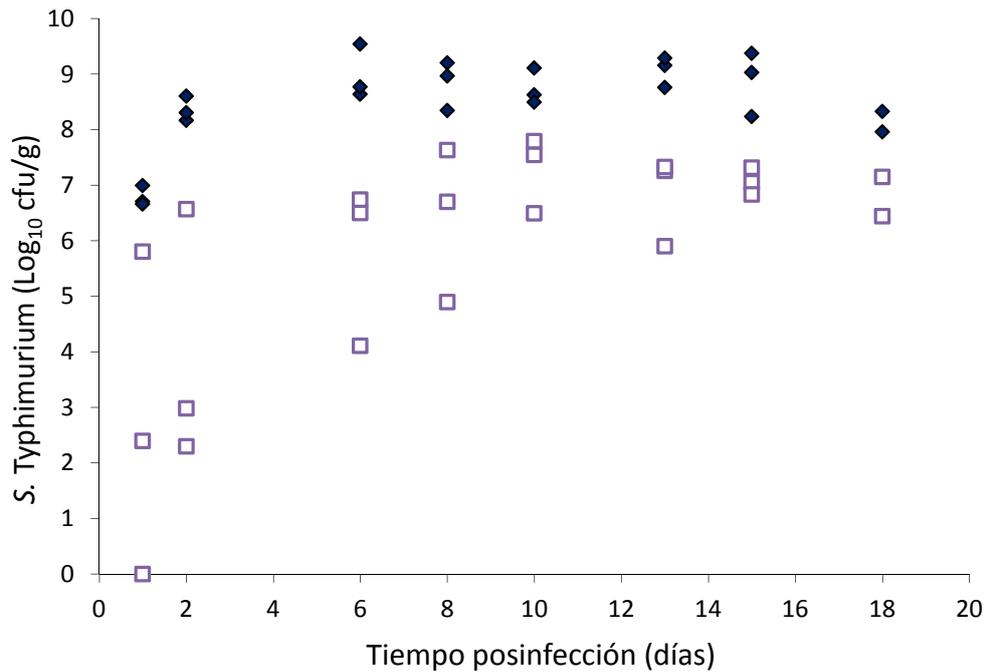


Figura 38. Eficacia del cóctel fágico en la reducción de *S. Typhimurium* UA1872 en el ciego de pollos White Leghorn infectados oralmente un día después de iniciarse el tratamiento. Se readministraron dos dosis diarias del cóctel hasta el tercer día de dicha infección y una dosis diaria en los días 6, 8, 10, 13 y 15 posinfección. La concentración de *Salmonella* de los pollos tratados (□) y no tratados (◆) se representa en Log₁₀ cfu/g de contenido del ciego.

Tabla 30. Detección por el método de enriquecimiento de *S. Typhimurium* UA1872 en el hígado, bazo, intestino delgado y en muestras cloacales de pollos White Leghorn.

Día posinfección	Grupo Tratado ¹				Grupo Control ¹			
	Hisopos cloacales	Hígado	Bazo	Intestino delgado	Hisopos cloacales	Hígado	Bazo	Intestino delgado
1	3/23	0/3	0/3	2/3	21/23	1/3	3/3	3/3
2	8/20	0/3	0/3	3/3	20/20	3/3	3/3	3/3
6	15/17	2/3	1/3	3/3	17/17	3/3	3/3	3/3
8	12/14	3/3	1/3	3/3	14/14	3/3	3/3	3/3
10	11/11	2/3	3/3	3/3	11/11	3/3	3/3	3/3
13	8/8	2/3	3/3	3/3	8/8	3/3	3/3	3/3
15	5/5	2/3	1/3	3/3	5/5	2/3	2/3	3/3
17	2/2	1/2	1/2	2/2	2/2	1/2	1/2	2/2

El tratamiento fágico se inició un día antes de la infección con *Salmonella*. Los animales tratados recibieron dos dosis diarias de fagos desde el día anterior a la infección con *Salmonella* hasta el tercer día posinfección, y una dosis diaria en los días 6, 8, 10, 13 y 15 de dicha infección.

¹ Número de muestras positivas / Número de muestras analizadas

Resultados

Tabla 31. Concentración fágica a lo largo del tiempo en el ciego de los animales infectados con *S. Typhimurium* UA1872 y tratados con el cóctel fágico.

Día posinfección	Día postratamiento	Concentración (Log ₁₀ pfu/g)	Promedio de la concentración (Log ₁₀ pfu/g)
1	2	5,6 5,3 4,9	5,2 ± 0,4
2	3	6,0 6,2 6,3	6,2 ± 0,1
6	7	4,2 4,5 4,0	4,2 ± 0,2
8	9	4,7 4,1 4,6	4,5 ± 0,3
10	11	5,8 4,8 4,0	4,9 ± 1,3
13	14	3,9 6,2 3,3	4,5 ± 1,6
15	16	3,1 4,3 4,4	3,9 ± 0,7
17	18	5,8 5,4	5,6 ± 0,3

El tratamiento fágico se inició un día antes de la infección con *Salmonella*.

En el segundo experimento se administraron dos dosis fágicas diarias durante cuatro días iniciándose dicho tratamiento al mismo tiempo que la infección bacteriana. Además, como en el primer experimento, se administró una dosis diaria del cóctel fágico en los días 6, 8, 10, 13 y 15 posinfección. En este caso, la administración fágica también produjo una clara disminución de la concentración de *Salmonella* en el ciego, si bien su efecto durante los primeros días fue menos prolongado que en el experimento anterior. Así, se obtuvo una disminución de la concentración de *Salmonella* superior a 4 logaritmos durante los dos primeros días después de la infección, pero a partir del sexto día y hasta el final del experimento esta reducción se situó en 2 logaritmos ($p < 0,0001$) (Figura 39).

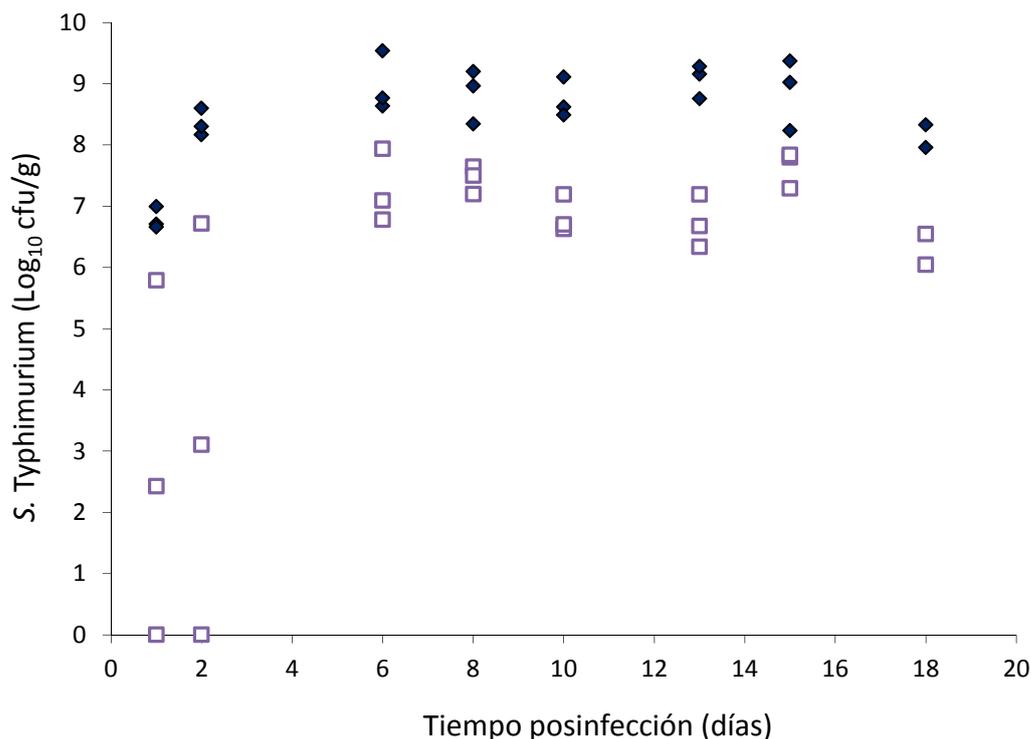


Figura 39. Eficacia del cóctel fágico en la reducción de *S. Typhimurium* UA1872 en el ciego de pollos White Leghorn infectados oralmente. La primera administración fágica se realizó, por duplicado, simultáneamente a la infección con *Salmonella*, y se readministraron dos dosis diarias del cóctel hasta el tercer día de dicha infección y una dosis diaria en los días 6, 8, 10, 13 y 15 posinfección. La concentración de *Salmonella* de los pollos tratados (□) y no tratados (◆) se representa en Log₁₀ cfu/g de contenido del ciego.

En el análisis cloacal, *Salmonella* fue detectada en 11 de los 23 pollos (47,8 %) en el primer día posinfección y en la totalidad de los animales a partir del sexto día (Tabla 32), revelando una buena contención respecto al grupo control, pero algo menor que en el experimento anterior. No obstante, la detección de *Salmonella* en el hígado y el bazo fue positiva sólo a partir del sexto día de la infección como en el caso anterior. En cambio, en el grupo control *Salmonella* se detectó desde el primer día posinfección (Tabla 32). Al determinar la concentración de los fagos en el ciego de los animales tratados, se observó que ésta fue de 10^4 pfu/g tras un día de la infección, entre 10^5 y 10^6 pfu/g del segundo al octavo día posinfección y, finalmente, entre 10^4 y 10^5 pfu/g desde el décimo día hasta la finalización del experimento (Tabla 33). Estos datos indican que la concentración fágica inicial en el intestino fue menor que la conseguida en el experimento anterior.

Tabla 32. Detección por el método de enriquecimiento de *S. Typhimurium* UA1872 en el hígado, bazo, intestino delgado y en muestras cloacales de pollos White Leghorn.

Día posinfección	Grupo Tratado ¹				Grupo Control ¹			
	Hisopos cloacales	Hígado	Bazo	Intestino delgado	Hisopos cloacales	Hígado	Bazo	Intestino delgado
1	11/23	0/3	0/3	2/3	21/23	1/3	3/3	3/3
2	14/20	0/3	0/3	2/3	20/20	3/3	3/3	3/3
6	17/17	3/3	2/3	3/3	17/17	3/3	3/3	3/3
8	14/14	3/3	1/3	3/3	14/14	3/3	3/3	3/3
10	11/11	3/3	2/3	3/3	11/11	3/3	3/3	3/3
13	8/8	3/3	2/3	3/3	8/8	3/3	3/3	3/3
15	5/5	1/3	1/3	3/3	5/5	2/3	2/3	3/3
17	2/2	1/2	1/2	2/2	2/2	1/2	1/2	2/2

El tratamiento fágico se inició simultáneamente a la infección con *Salmonella*. Los animales tratados recibieron dos dosis diarias de fagos desde el primer día de infección con *Salmonella* hasta el tercer día posinfección, y una dosis diaria en los días 6, 8, 10, 13 y 15 de dicha infección.

¹: Número de muestras positivas / Número de muestras analizadas

Tabla 33. Concentración fágica a lo largo del tiempo en el ciego de los animales infectados con *S. Typhimurium* UA1872 y tratados con el cóctel fágico.

Día posinfección	Día postratamiento	Concentración (Log10 pfu/g)	Promedio de la concentración (Log10 pfu/g)
1	2	5,1 5,2 3,1	4,4 ± 1,2
2	3	5,9 5,4 5,6	5,6 ± 0,3
6	7	4,4 5,8 6,2	5,5 ± 0,9
8	9	4,9 5,4 5,1	5,2 ± 0,3
10	11	4,3 4,5 5,3	4,9 ± 0,5
13	14	4,8 4,2 4,4	4,5 ± 0,3
15	16	3,3 4,2 4,3	3,9 ± 0,5
17	18	4,1 4,9	4,5 ± 0,6

El tratamiento fágico se inició un día antes de la infección con *Salmonella*.

Los resultados obtenidos sugirieron que un tratamiento continuo con fagos debería favorecer su efecto. Por ello, se procedió a administrarlos *ad libitum* a través del agua de bebida, lo cual seguramente es la mejor pauta de administración de fagos en producción aviar. Previamente, se determinó que la infectividad de los fagos prácticamente no se alteraba cuando se mantenían en agua de red durante 7 días a 25°C y 37°C (Tabla 34). Dado que la dosis fágica deseada era de 10¹⁰ pfu/animal y que los animales ingieren entre 10 y 50 ml diarios de agua, se ajustó la concentración fágica en el agua de bebida a 10⁹ pfu/ml, renovándose cada dos o tres días durante todo el experimento.

Tabla 35. Detección por el método de enriquecimiento de *S. Typhimurium* UA1872 en el hígado, bazo, intestino delgado y en muestras cloacales de pollos White Leghorn.

Día posinfección	Grupo Tratado ¹				Grupo Control ¹			
	Hisopos cloacales	Hígado	Bazo	Intestino delgado	Hisopos cloacales	Hígado	Bazo	Intestino delgado
3	11/18	0/3	0/3	3/3	18/18	2/3	3/3	3/3
6	13/15	3/3	2/3	3/3	15/15	3/3	2/3	3/3
9	12/12	3/3	3/3	3/3	12/12	3/3	2/3	3/3
13	9/9	2/3	2/3	3/3	9/9	3/3	3/3	3/3
16	6/6	3/3	3/3	3/3	6/6	3/3	3/3	3/3
20	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3

Resultados

En referencia a la concentración de los fagos en el ciego de los animales, se obtuvieron valores comprendidos entre 10^3 y 10^4 pfu/g a los tres días de la infección y entre 10^5 y 10^6 pfu/g desde el sexto día hasta el final del experimento (Tabla 36). Dado que la concentración fágica en los primeros días fue insospechadamente baja, se determinó dicha concentración en los bebederos de los animales, observándose una disminución de 1 Log_{10} a las 24 h. Este descenso indica que la dosis aplicada fue inferior a la deseada, lo cual puede justificar que esta pauta de tratamiento no fuera más efectiva que las anteriores.

Tabla 36. Evolución de la concentración fágica en el ciego de los animales infectados con *S. Typhimurium* UA1872.

Día posinfección	Día postratamiento	Concentración (Log10 pfu/g)	Promedio de la concentración (Log10 pfu/g)
3	4	3,5 4,7 2,2	$3,5 \pm 1,3$
6	7	7,3 4,9 6,6	$6,3 \pm 1,2$
9	10	7,2 6,7 5,9	$6,6 \pm 0,6$
13	14	4,9 5,4 5,2	$5,2 \pm 0,3$
16	17	6,5 6,5 6,2	$6,4 \pm 0,2$
20	21	5,6 5,4 5,3	$5,4 \pm 0,2$

El tratamiento fágico se inició un día antes de la infección con *Salmonella*.

4.7. Respuesta inmunológica frente a la administración fágica

Una de las problemáticas que se postula ante la readministración o administración continuada de un cóctel fágico, es la posibilidad de que el animal tratado desarrolle una respuesta inmunológica en contra del fago o fagos utilizados (Merril *et al.*, 2006). Por ello, y mediante la técnica del ELISA, se cuantificó la respuesta inmune de los animales tratados con el cóctel fágico, determinándose el título de sus sueros frente a los fagos de dicho cóctel. El título es una medida indicativa de la cantidad de anticuerpo producida por el organismo ante un antígeno concreto y equivale a la dilución del suero en la que se alcanza la mitad de la señal máxima obtenida mediante la técnica de ELISA. Así, cuanto

mayor sea la respuesta inmunológica ante un determinado antígeno, mayor será la dilución del suero que permita una lectura positiva y, consiguientemente, mayor será su título.

En el modelo murino, se determinó el título del suero de los ratones supervivientes a la infección con *Salmonella* que fueron tratados con 4 dosis fágicas. Dicho título se comparó con el de los ratones que habían recibido una única dosis fágica y que se habían utilizado para determinar el tiempo de permanencia de los fagos. Como control, se incluyeron sueros de ratones no tratados. Los resultados obtenidos indicaron que no había una respuesta inmune detectable en los ratones que habían recibido una dosis fágica, ya que no se observaron diferencias significativas respecto a los valores obtenidos con los animales no tratados. Por el contrario, los sueros obtenidos de los ratones tratados con múltiples dosis fágicas mostraron una leve respuesta inmunológica, obteniéndose un título de 1/128.

En el modelo *Gallus gallus*, se determinó el título de los sueros de los animales que se sacrificaron al final de cada experimento frente al cóctel fágico. La diferencia entre estos animales estriba en la cantidad de fagos recibida. Así, los animales del primer experimento fueron tratados con cuatro dosis fágicas, mientras que los del segundo y tercer experimento recibieron 15 y 13 dosis, respectivamente, y en el último experimento los animales recibieron el cóctel fágico *ad libitum* durante 21 días. Como control negativo se incluyeron los sueros de los animales no tratados que se sacrificaron al final de cada experimento.

Los resultados obtenidos revelaron un aumento del título de los sueros y, por consiguiente, de anticuerpos contra los fagos de dicho cóctel, a medida que aumenta el número de dosis fágica administrada. Así, en los animales del primer experimento se obtuvo un título de 1/16, en los del segundo y tercer experimento de 1/32 y finalmente, en los del último experimento se alcanzaron títulos de 1/64. Dado que los títulos obtenidos son extraordinariamente altos, se deduce que la respuesta generada fue muy leve.

4.8. Resistencia bacteriana y terapia fágica

Otra de las limitaciones postuladas en contra de la terapia fágica es la selección de células resistentes a la infección de los fagos utilizados en la terapia, lo cual puede verse magnificado por la administración reiterada de los bacteriófagos (Skurnik and Strauch, 2006).

Con el propósito de determinar el impacto del cóctel fágico en la selección de bacterias resistentes, se determinó, *in vitro*, la frecuencia de resistencia de *S. Typhimurium* UA1872 y *S. Enteritidis* UA1894 a dicho cóctel. Los valores obtenidos fueron de $6,08 \cdot 10^{-7}$ y $3,3 \cdot 10^{-8}$, respectivamente.

Dado que las condiciones de estudio *in vivo* son claramente diferentes, también se procedió a evaluar la proliferación de las bacterias resistentes en los animales. Para ello, se determinó la

Resultados

sensibilidad o resistencia a la infección fágica de 10 colonias aisladas del intestino de cada uno de los animales utilizados en los experimentos comentados en el apartado 4.6.2. Primeramente, se calculó el porcentaje de animales tratados y no tratados con fagos que contenían bacterias resistentes. Los resultados obtenidos mostraron que en ambos grupos el porcentaje de animales que contenían bacterias resistentes al cóctel fágico es similar. Así, en el grupo no tratado dicho porcentaje fue del 11% (4/35) y en el tratado del 14% (9/64). No obstante, debe destacarse que el número de colonias resistentes fue muy superior en el conjunto de los animales tratados con fagos (66/640) que en el de los no tratados (4/350). Cuando se analizaron con detalle los datos del grupo tratado en relación al número de dosis fágicas recibidas, se observó que a partir de la décima administración fágica, el porcentaje de resistencia era similar. Así, el porcentaje fue del 10%, 9% y 11% para los animales que recibieron 15 dosis fágicas, 13 o *ad libitum*, respectivamente. Igualmente es destacable el hecho de que la mayoría de bacterias resistentes fueron detectadas en aquellos animales en los que la población de *Salmonella* había sido prácticamente erradicada, siendo muy poco frecuente la detección de bacterias resistentes en aquellos animales en los que la concentración de *Salmonella* en el intestino fue superior a 10^6 cfu/g.

5. Discusión

5.1. Aislamiento y selección de bacteriófagos de *Salmonella*

Está ampliamente reconocido que los bacteriófagos son ubicuos, lo cual tiene como consecuencia que pueden aislarse desde cualquier entorno en el que proliferen su huésped (Connerton *et al.*, 2004). *Salmonella* es un enteropatógeno, por ello, las muestras intestinales o las heces de animales portadores de dicho patógeno se pueden considerar un ambiente propicio para aislar fagos que infecten a dicha bacteria. En este sentido, se ha descrito el aislamiento de fagos específicos de *Salmonella* desde heces de pollos y cerdos (Fiorentin *et al.*, 2004), desde el pienso para la alimentación de estos animales e incluso desde aguas residuales de granjas de producción animal y también desde el tracto digestivo de humanos (Berchieri *et al.*, 1991; Higgins *et al.*, 2005; Callaway *et al.*, 2005).

En el presente trabajo, los fagos se aislaron a partir de muestras de heces de granjas aviares españolas, alcanzándose un porcentaje de aislamiento del 25,6% (22/86), el cual es superior a los valores reportados del 4,7% por Fiorentin y col. (2004) y del 19% por Toro y col. (2005). Los fagos aislados por estos primeros autores procedían de muestras fecales de pollos de engorde de Brasil, mientras que en el trabajo de Toro y col. (2005) fueron obtenidos desde muestras ambientales de granjas de EE.UU. En ambos casos, no se realizó un preenriquecimiento, seguido de un enriquecimiento selectivo para *Salmonella* como el utilizado en nuestro trabajo. Así pues, el mayor porcentaje de aislamiento de fagos obtenido en este trabajo podría deberse a los cambios metodológicos introducidos, así como a que nuestras muestras tuvieran un mayor número de bacteriófagos. Esta última posibilidad debe considerarse ya que la prevalencia de *Salmonella* en las granjas aviares españolas se sitúa dentro de las más elevadas en la UE (EFSA, 2010), siendo del 25% en el año 2007, año en el que se obtuvieron muchas de las muestras procesadas en este trabajo. En cambio, la prevalencia de *Salmonella* reportada en Brasil y en EE.UU. en el año 2003, en el que se iniciaron los trabajos anteriormente comentados, fue del 10% y 12%, respectivamente (Bailey *et al.*, 2005). No obstante, la metodología desarrollada por nosotros tiene también un impacto en el aumento de aislamientos. De hecho, cuando utilizamos el método descrito por Connerton y col. (2004) que se basa en resuspender la muestra en tampón SM y realizar el test de la gota para detectar la presencia de fagos, tras incubar dicha suspensión a 4°C durante 24 h, el porcentaje de aislamiento disminuyó al 17,5% (datos no presentados).

El estudio del perfil de infección de los 22 fagos obtenidos fue un claro criterio de selección, ya que nos permitió desestimar a 10 de ellos por presentar un limitado rango de huésped. Junto a ello, las características de la cinética de infección (Figura 15) así como los patrones de restricción del genoma de los fagos preseleccionados (Figuras 16), nos permitió elegir a los fagos C20 y C87, renombrados como UAB_Phi20 y UAB_Phi87, respectivamente, como candidatos para posteriores estudios.

Los bacteriófagos generalmente tienen un rango de huésped limitado a un género bacteriano e incluso restringido a un bajo número de especies o de cepas dentro de su género diana (O'Flaherty *et al.*, 2005; EFSA, 2009). Se ha de resaltar que con los criterios de selección aplicados en este trabajo se ha conseguido seleccionar a dos fagos que producen la lisis del 97% de las 67 cepas de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* de nuestra colección (Tabla 10), y que además también son capaces de lisar a cepas de las serovariedades Hadar, Infantis y Virchow de *S. enterica* (Figura 32). Probablemente, la utilización de la metodología RAPD-PCR descrita recientemente para fagos de diferentes especies bacterianas, puede facilitar la selección de fagos genéticamente distintos de forma más rápida (Gutiérrez *et al.*, 2011).

5.2. Genómica comparada y caracterización de los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87

El fago UAB_Phi20 posee un genoma de 41 Kb, pertenece a la familia *Podoviridae* y concretamente, a los fagos tipo P22. Es importante señalar que el fago P22, así como la mayoría de fagos relacionados con él, son atenuados y, consiguientemente, no es conveniente su uso en terapia fágica dada la posibilidad de integrarse en el genoma de su huésped y de promover la transferencia de genes. Como se ha demostrado, el fago UAB_Phi20 aún y teniendo los módulos de recombinación y de integración así como el represor C2, es un fago lítico. En este punto, debe señalarse que muchas de las cepas de *Salmonella* contienen profagos, por lo cual la población de fagos atenuados en el ambiente debe ser elevada. No obstante, dichos fagos pueden sufrir determinadas mutaciones que den lugar a mutantes líticos. En esta línea, Susskind y Botstein (1978) en su estudio sobre la genética del fago P22 ya mencionaron la existencia de distintas mutaciones puntuales que generaban mutantes de P22 líticos. Estos autores identificaron que las principales mutaciones causantes de este fenotipo se sitúan en las regiones de regulación *immC* e *immI*, correspondientes a la zona de control y mantenimiento de la lisogenia. Nuestros estudios sugieren que el fago UAB_Phi20 es lítico debido a la ausencia de cajas de reconocimiento del activador C1 en el represor C2.

El análisis de genómica comparada del fago UAB_Phi20, reveló una elevada similitud con el fago P22, hasta tal punto que sus secuencias son idénticas en un 93%. No obstante, algunos módulos funcionales del fago UAB_Phi20 presentan una mayor similitud con los fagos ST104 y ST64T y, además, la identificación de genes hipotéticos que no presentan similitud con los de estos otros tres fagos, indica una naturaleza mosaica multigénica (Figura 24). El origen de estos mosaicos génicos puede explicarse mediante el modelo de evolución modular. Dicho modelo propone la transferencia horizontal de módulos genéticos por recombinación homóloga como la causa de combinaciones genéticas nuevas las cuales dan lugar a nuevos fagos lambdoides (Thomson *et al.*, 2004). En un reciente artículo en el que se comparaban 57 fagos tipo P22 (Casjens and Thuman-Commike, 2011), se demuestra que las proteínas más conservadas en este grupo de fagos son las terminasas y la proteína de la cápside, mientras que las de mayor divergencia son las relacionadas con el

reconocimiento del huésped, como la proteína de la cola y las proteínas inyectoras. En este sentido, la similitud de las terminasas y de la proteína mayoritaria de la cápside del fago UAB_Phi20 con las proteínas homólogas de los fagos P22, ST104 y ST64T es del 99%. Sin embargo, las proteínas de la cola de estos cuatro fagos también presentan una similitud alrededor del 97%, lo cual indica una menor divergencia y una elevada relación filogenética entre todos ellos.

El genoma del fago UAB_Phi87 es de 87 Kb y tiene un elevado grado de similitud con fagos tipo Felix O1, perteneciendo por ello a este grupo de fagos de la familia *Myoviridae*. Aunque los fagos de este grupo no están tan bien caracterizados como los lambdoides, se ha descrito que son líticos, que no codifican genes de virulencia conocidos y que tienen una cierta similitud con los fagos tipo T4 (Miller *et al.*, 2003; Whichard *et al.*, 2010). El estudio del genoma del fago UAB_Phi87 reveló su estructura mosaica, identificándose genes similares, pero no idénticos, a los de los fagos Felix O1, WV8 y SA1 (Tabla 21). Cabe destacar dos particularidades del fago UAB_Phi87. La primera de ellas es que carece de las regiones génicas que codifican a las endonucleasas que presentan los fagos Felix O1, WV8 y SA1. Probablemente, por algún suceso de recombinación, estas regiones han sido reemplazadas por genes que, hasta el momento, no muestran similitud con los disponibles en las bases de datos. La segunda característica es la adquisición del gen que codifica una endonucleasa muy similar a la del fago JSE, del grupo de fagos tipo T4 (Denou *et al.*, 2009). Dicho gen interrumpe al gen *nrdD* que codifica una ribonucleotidil difosfatasa reductasa anaeróbica. Puede especularse que la actividad endonucleasa es clave para el ciclo biológico de los fagos de este grupo, y que para que el fago UAB_Phi87 pueda multiplicarse con éxito ha adquirido la endonucleasa del fago JSE al perder las típicas endonucleasas de la mayoría de los fagos tipo Felix O1. Además, la adquisición de una endonucleasa de un fago tipo T4, sugiere que es posible la recombinación entre fagos tipo Felix O1 y tipo T4, al igual que ocurre entre fagos lambdoides y tipo P22 (Suskind *et al.*, 1978).

Un último aspecto a destacar del fago UAB_Phi87 es que contiene los genes *r*, descritos por primera vez en el fago T4 (Miller *et al.*, 2003). Se ha propuesto que la función de dichos genes es la de controlar la lisis del huésped. Así se plantea que, de forma similar a lo que ocurre con los fagos atenuados en la regulación del ciclo lítico o lisogénico, los genes *r* de los fagos líticos serían los responsables de regular de alguna forma la expresión de la lisina a través de *quorum sensing*. Ello está de acuerdo con la hipótesis de diversos autores sobre la posibilidad de que los fagos dispongan de algún mecanismo para ajustar temporalmente la lisis bacteriana en función de las condiciones de su entorno. Así, se apunta que debe existir un tiempo óptimo de latencia (o lisis) para cada fago y condición ambiental, de forma que la productividad sea máxima y el tiempo de eclipse mínimo (Abedon *et al.*, 2001). La determinación de dichos parámetros en los dos fagos de estudio (Tabla 11) reveló algunos hechos destacables. En primera instancia, ambos fagos presentaron tiempos de latencia y eclipse menores en la serovariedad Enteritidis que en la Typhimurium. El hecho de que la

generación de nuevos viriones sea más rápida en *S. Enteritidis* debería comportar que la lisis de los cultivos fuera también más rápida. Sin embargo, nuestros resultados indican que la lisis de los cultivos de *S. Typhimurium* acontece en un tiempo menor que en *S. Enteritidis*. Esta aparente contradicción puede explicarse por la baja producción de partículas víricas que se obtiene al ser infectada *S. Enteritidis* con cada uno de estos fagos. En concordancia con estos resultados, debe indicarse que las calvas de los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87 muestran una clara reducción de su tamaño al infectar a dicha serovariedad en comparación con el que presentan en *S. Typhimurium*. Esta menor productividad no puede, aparentemente, ser atribuida a los mecanismos de restricción bacteriana, ya que se observó al infectar a *S. Enteritidis* LK5 con lisados que habían sido obtenidos sobre esta misma cepa. Estos resultados sugieren que alguno de los procesos implicados en la replicación del genoma viral o en la morfogénesis de ambos fagos en *S. Enteritidis* son ineficientes, apuntando incluso a infecciones abortivas en donde la bacteria muere pero la progenie fágica es muy baja (Hyman *et al.*, 2010).

5.3. Idoneidad de los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87 como candidatos para terapia fágica

El éxito de la terapia fágica radica, básicamente, en la elección de fagos con una elevada capacidad lítica, que infecten al máximo número de cepas de la especie o género deseado, que no sean atenuados para evitar la transferencia de genes entre bacterias, y que sean estables a diferentes parámetros ambientales como el pH o la temperatura (EFSA, 2009). El estudio del rango de infección de ambos fagos mostró su capacidad de infectar y lisar a un gran número de cepas de las serovariedades *Enteritidis* y *Typhimurium*, así como a las otras tres serovariedades objeto de control por la UE (*S. Hadar*, *S. Infantis* y *S. Virchow*). Ambos hechos permiten afirmar que estos fagos presentan un amplio rango de huésped. En referencia al comportamiento de los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87 es importante denotar su carácter lítico, hecho apreciable en sus cinéticas de infección y en la morfología de sus calvas. Además, el genoma del fago UAB_Phi87 presenta las características de un fago lítico obligado, no así el del fago UAB_Phi20. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, presenta un fenotipo lítico ya que es incapaz de integrarse en el cromosoma de *Salmonella* (Figura 23). Por otra parte, ambos fagos presentan un sistema de empaquetamiento por llenado de cápside (Figura 19), lo que puede comportar que algunas cápsides víricas incorporen material genético de la bacteria lisada el cual puede ser transferido a otras bacterias por transducción. En este sentido, está claro que sería preferible la utilización de fagos líticos con sistemas de empaquetamiento tipo *cos* en el cual la transferencia de genes bacterianos sería mucho más difícil. No obstante, los únicos fagos descritos de *Salmonella* que presentan un sistema de empaquetamiento tipo *cos* son fagos lambdoides atenuados como los fagos Gifsy o Fels, presentando el resto de fagos estudiados un sistema de empaquetamiento por llenado de cápside (Casjens *et al.*, 2005). Ello justifica que los fagos seleccionados en este trabajo presenten este sistema de

encapsulación del DNA. Además, respecto al análisis del genoma de ambos fagos cabe destacar la inexistencia de genes de virulencia conocidos, hecho importante para la seguridad de la terapia fágica.

Por otra parte, los estudios de estabilidad del título fágico a distintas condiciones ambientales, revelaron una elevada estabilidad de ambos fagos en todas las situaciones probadas, con excepción de su exposición a pH 2, siendo en general algo más estable el fago UAB_Phi20 que el fago UAB_Phi87. En los estudios realizados a distintos pH, la infectividad de los fagos a pH 4, 6 y 9 prácticamente no decreció. Sin embargo, a pH 2, el título del fago UAB_Phi20 disminuyó 4,5 logaritmos, mientras que el del fago UAB_Phi87 sufrió un descenso de casi 8 logaritmos (Tabla 12). Estos resultados coinciden con los descritos por otros autores para fagos de enterobacterias, en los cuales la infectividad de los fagos en estas mismas condiciones es prácticamente nula (Kwon *et al.*, 2008; Jamalludeen *et al.*, 2009). La elevada pérdida de infectividad de los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87 a pH 2 es sin duda una desventaja para su aplicación en terapia fágica y, concretamente, para su administración por vía oral a los posibles animales portadores de *Salmonella*, ya que puede suponer que el tránsito de los fagos a través del estómago comporte la inactivación de los viriones. Las sales biliares son otro de los factores que pueden modificar negativamente la eficacia de la terapia fágica en producción aviar, como se comentará más adelante. No obstante, ambos factores no fueron suficientes para evitar el efecto de los fagos sobre poblaciones de *Salmonella* que colonizan el tracto intestinal de los animales, ya que como se ha demostrado, el tratamiento con fagos consigue reducir significativamente la concentración de *Salmonella*, tanto en el modelo murino como en el de *Gallus gallus*.

En referencia a la estabilidad de los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87 a diferentes temperaturas (30°C, 37°C y 42°C), los resultados revelaron que el descenso del título de ambos era inferior a 1 logaritmo tras una semana de permanencia a estas temperaturas (Tabla 13). Este hecho garantiza que la temperatura corporal de los animales o la del ambiente no modificarán significativamente su capacidad infectiva. La estabilidad de ambos fagos en agua de bebida es muy elevada, ya que sólo se detectó una reducción de 0,5 logaritmos tras una semana de mantenimiento en estas condiciones (Tabla 34). Ello indica que es posible administrar fagos a través del agua de bebida, siendo esta pauta la más idónea y práctica en producción aviar. En este sentido, estudiar la viabilidad de este cóctel en pienso o en el lecho de los animales, entre otras matrices, puede ser útil para ampliar las aplicaciones de estos fagos, siendo esperable un mejor efecto cuando se utilicen simultáneamente en distintas áreas de una misma explotación. Finalmente, cabe destacar que el mantenimiento de estos fagos a 4°C durante un año, prácticamente no alteró su estabilidad (Tabla 14), indicando así la idoneidad de estas condiciones de almacenamiento.

5.4. Eficacia del cóctel fágico en terapia

Los estudios realizados en este trabajo han mostrado que el uso de un combinado (o cóctel) fágico integrado por los fagos UAB_Phi20, UAB_Phi87 y UAB_Phi78 amplía el rango de infección de los fagos individuales y consigue mantener las poblaciones de *Salmonella* a una baja concentración durante un mayor periodo de tiempo. Así, en condiciones óptimas de crecimiento de *Salmonella*, la infección con el cóctel fágico produjo a las ocho horas de la infección una reducción de 3 y 4 logaritmos de la concentración de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, respectivamente (Figura 31, paneles B y D). De entre los diversos estudios de este tipo que se han publicado hasta el momento, los de Toro y col. (2005), son los que se han realizado en unas condiciones similares a las de este trabajo. Estos autores utilizaron un cóctel fágico integrado también por 3 fagos e infectaron los cultivos de *S. Typhimurium* a una MOI de 100. En estas condiciones consiguieron disminuir la concentración de dicha bacteria 3 logaritmos hasta las 3 horas de la infección, tiempo a partir del cual el cultivo creció rápidamente.

Por otra parte, es de resaltar que el cóctel fágico desarrollado por nuestro grupo produce una mayor reducción de los cultivos de *S. Enteritidis* que los de *S. Typhimurium*, lo cual no guarda relación con el tamaño de explosión de los fagos en estas serovariedades. Esta mayor reducción podría explicarse, al menos en parte, por el hecho de que la frecuencia de resistencia de *S. Enteritidis* es menor que la de *S. Typhimurium* frente la infección del cóctel fágico.

El último objetivo de esta tesis ha sido aplicar la terapia fágica en el sector aviar para evitar la infección de los animales por *Salmonella* y para eliminar dicha bacteria de los animales portadores. Respecto a esto, cabe indicar que la acción de los fagos en este tipo de animales está muy comprometida. Los fagos deberán actuar eficazmente a 42°C, ya que es la temperatura corporal de los animales. Además, deberán superar el efecto del pH del estómago y actuar en ambientes con sales biliares y carbohidratos y con una baja disponibilidad de cationes divalentes, los cuales son necesarios para su adsorción y replicación (Gill, 2010). Como se ha demostrado en este trabajo, el efecto de la infección fágica sobre la reducción de la concentración bacteriana a lo largo del tiempo se ve afectado negativamente al elevar la temperatura a 42°C (Figura 33, paneles A y C), al aumentar la acidez del medio (pH 2) (Tabla 12) y también por la presencia de sales biliares (Figura 33, paneles B y D). Debe considerarse que todas estas condiciones también afectan de forma negativa al crecimiento de *Salmonella*, lo cual sin duda enlentece el proceso de multiplicación de los fagos. Igualmente, en las mencionadas condiciones, la afinidad de los fagos por sus receptores bacterianos podría alterarse y disminuir el efecto del cóctel y las condiciones anaeróbicas del tracto digestivo podrían afectar al proceso de adsorción. En este sentido, se ha reportado la disminución de la capacidad lítica de determinados fagos bajo condiciones anaeróbicas como consecuencia de cambios en la expresión de determinados receptores (Kropinski, 2006). Teniendo en cuenta los múltiples

obstáculos que deben superarse para conseguir una terapia fágica eficaz, los primeros estudios que se realizaron en los modelos de experimentación animal utilizados en el presente trabajo, se dirigieron a determinar si con la administración por vía oral de una única dosis del cóctel fágico se conseguía una concentración significativa de fagos en el intestino de los animales. En ambos modelos, las concentraciones obtenidas fueron bajas, e incluso en algunos casos su detección por siembra directa no fue posible. Todo ello, de acuerdo con otros autores (Payne *et al.*, 2001), pone de manifiesto la necesidad de aplicar elevadas dosis fágicas para conseguir un título fágico adecuado en el intestino del animal y para aumentar su permanencia en el tracto intestinal.

La efectividad del cóctel fágico en el modelo murino se abordó desde tres perspectivas. La administración de una única dosis del cóctel fágico mostró una baja eficacia, tanto como tratamiento terapéutico como preventivo. No obstante, dicha eficacia mejoró significativamente cuando se combinó el tratamiento preventivo con la readministración del cóctel durante las primeras horas de la infección bacteriana, consiguiéndose incluso la supervivencia del 50% de los ratones infectados con *S. Typhimurium* (Figura 35, panel E). Estos resultados revelaron dos aspectos claves. El primero de ellos es la conveniencia de administrar fagos de forma reiterada antes de que *Salmonella* colonice el intestino de los animales. El segundo aspecto es la escasa eficacia del cóctel sobre *S. Enteritidis* en las condiciones probadas. Estos resultados contrastan con el hecho de que en los experimentos *in vitro*, el cóctel fágico produce una mayor reducción de la concentración de *S. Enteritidis* que de *S. Typhimurium*, a pesar de que la progenie fágica por célula infectada es mayor en *S. Typhimurium*. Respecto a esta aparente contradicción, debe señalarse que nuestros trabajos también muestran que la colonización por *S. Enteritidis* es más rápida que la de *S. Typhimurium* (Figura 34, panel B). Del mismo modo, otros autores han indicado la elevada capacidad invasiva de *S. Enteritidis* que, en el caso de los pollos, coloniza rápidamente el ovario y el oviducto, siendo por ello la principal serovariedad causante de brotes zoonóticos a través de huevos contaminados (Keller *et al.*, 1995). Nuestros resultados parecen sugerir que *S. Enteritidis* es capaz de traspasar la barrera intestinal con mayor rapidez, lo cual podría justificar el menor efecto del cóctel fágico observado en los animales infectados con esta serovariedad, ya que como hemos demostrado, los fagos son incapaces de atravesar dicha barrera.

En función de lo comentado anteriormente y atendiendo al coste y a las dificultades de experimentación en el modelo *Gallus gallus*, la terapia fágica en pollos se estudió exclusivamente frente a *S. Typhimurium*. Todos estos estudios se realizaron bajo estrictas medidas de bioseguridad, manteniendo a los animales, provenientes de huevos SPF, en incubadoras aisladas. Asimismo, se experimentó con animales de muy corta edad, iniciando la infección con *Salmonella* a los seis días de vida. Es importante destacar estos aspectos puesto que los ensayos se realizaron en condiciones muy adversas, en animales con un sistema inmunológico inmaduro y sin microbiota intestinal. Además, se

infectaron con dosis elevadas de *Salmonella* y en condiciones que facilitaban claramente la transmisión de la infección entre los animales, como se demostró en las pruebas de infección por contacto.

De forma similar a lo observado en el modelo murino, en *Gallus gallus* los resultados obtenidos indicaron el poco efecto de esta terapia cuando el tracto intestinal estaba completamente colonizado por *Salmonella*. Así, únicamente se obtuvo una reducción de 0,5 logaritmos desde los 2 y hasta los 8 días de tratamiento (Figura 37). En cambio, se ha observado que la terapia fágica es más efectiva si la concentración de fagos en el intestino de los animales es superior a la de *Salmonella*. Ello explica que los mejores resultados se hayan conseguido al administrar múltiples dosis de fagos. Así, el aumento de la administración de dosis fágicas durante los primeros días de la infección produjo una significativa reducción de *Salmonella* y una clara contención de la diseminación de dicha bacteria hacia los órganos internos de los animales (Tablas 30 y 32, Figuras 38 y 39). Aunque es difícil la comparación de nuestros resultados con los obtenidos por otros autores, el cóctel fágico desarrollado en este trabajo junto a la pauta de administración indicada da lugar a una mayor reducción de *Salmonella* que las descritas (Toro *et al.*, 2005; Atterbury *et al.*, 2007; Filho *et al.*, 2007). Todo ello sugiere que la terapia fágica es más efectiva de forma pasiva que activa, entendiéndose por activa la disminución de la población bacteriana por efecto de sucesivas infecciones fágicas. Este efecto ha sido señalado por otros autores (Payne *et al.*, 2001; Atterbury *et al.*, 2007), habiéndose propuesto que aunque las rondas de infección fago-bacteria se sigan produciendo, cuando la concentración bacteriana es inferior a un determinado umbral, no se generan suficientes partículas virales y la lisis bacteriana es cada vez más dificultosa dada la baja probabilidad de reconocimiento fago-bacteria (Payne *et al.*, 2001). En esta situación, los fagos remanentes son rápidamente eliminados por excreción y, al desaparecer, el patógeno vuelve a proliferar y a colonizar el animal. Por ello, es posible que el incremento de *Salmonella* que hemos observado a partir del sexto día fuera debido a una falta de aporte fágico al animal, ya que el tratamiento no fue continuo.

Según lo que se ha comentado, la administración de fagos *ad libitum* a través del agua de bebida, debería mejorar la eficacia del cóctel fágico. No obstante, los resultados obtenidos, aparentemente, contradecían esta hipótesis (Figura 40). Sin embargo, pudimos determinar que el título fágico disminuyó en 1 logaritmo a las 24 h en los bebedores de los animales, lo cual tuvo como consecuencia que la dosis fágica por animal fuera inferior a la utilizada en los anteriores experimentos. El descenso del título fágico en el agua de bebida de los animales fue totalmente inesperado ya que previamente se había demostrado que la concentración fágica se mantenía casi inalterable en agua de red durante 7 días a temperatura ambiente, condiciones iguales a las del agua de bebida de los animales (Tabla 34). Probablemente, el hecho de que el agua de los bebedores acumule restos de pienso y de otras partículas a lo largo del tiempo puede afectar a la estabilidad de

los fagos y producir un descenso de las partículas virales infectivas. En cualquier caso, estos resultados refuerzan la importancia de administrar una concentración de fagos superior a la bacteriana, sobre todo al inicio de la infección por el patógeno. En función de todo ello, probablemente una dosis de fagos insuficiente puede explicar los resultados obtenidos.

Otros aspectos que pueden afectar directamente a la eficacia de la terapia fágica son la selección de bacterias resistentes a la infección y también la posible generación de una respuesta inmunitaria del animal contra los fagos utilizados. Las bacterias pueden mutar rápidamente y ser resistentes a la infección fágica debido, normalmente, a cambios en los receptores que impiden la adsorción de los fagos o a mecanismos que bloqueen su multiplicación (Connerton *et al.*, 2004). En nuestros estudios *in vivo* hemos demostrado que el número de bacterias resistentes a la infección fágica aisladas de animales tratados con fagos es muy superior al de las aisladas de animales no tratados. No obstante, cabe reseñar que la mayor parte de aislados resistentes desde los animales tratados procedían de individuos en los que *Salmonella* había sido prácticamente erradicada. Respecto a este tipo de bacterias, se ha descrito que su *fitness* es bastante menor que la de las cepas bacterianas sensibles a la infección fágica (Atterbury *et al.*, 2007). Por ello, es de esperar que, progresivamente, estas cepas resistentes tiendan a ser eliminadas del conjunto de los animales de granja.

En cuanto a la posible inactivación de los fagos por el sistema inmunitario de los animales (Matsuzaki *et al.*, 2005), los resultados obtenidos mediante ELISA demuestran que a medida que aumenta el número de dosis fágicas por animal, también incrementa la respuesta inmunológica. El nivel de respuesta máxima alcanzado en estos estudios en animales de 30 días de edad y con un sistema inmunitario completamente desarrollado, es insuficiente para inactivar a la mayoría de fagos y no compromete, probablemente, la administración de los fagos a través del agua de bebida. Además, como se ha demostrado, la capacidad de translocación de los fagos hacia tejidos más internos es prácticamente nula, lo cual justifica, también, la baja respuesta inmunológica detectada.

El conjunto de resultados obtenidos muestran la potencialidad de la fagoterapia para el control de bacterias zoonóticas como *Salmonella* en la producción aviar, señalando aspectos importantes a considerar para mejorar el efecto de este tipo de terapia.

6. Conclusiones

Las principales conclusiones del presente trabajo son las siguientes:

1. Las granjas de aves españolas son un buen reservorio de fagos específicos de *Salmonella*. Mediante el método de enriquecimiento desarrollado en este trabajo, se han aislado 22 fagos a partir de 86 muestras, lo cual significa un porcentaje superior al obtenido por otros autores.
2. La aplicación de los criterios de selección basados en el espectro de infección, el patrón de restricción y la cinética de infección, han permitido seleccionar a los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87 como candidatos para terapia fágica.
3. El fago lítico UAB_Phi20 pertenece a la familia *Podoviridae* y al grupo de fagos tipo P22. El tamaño de su genoma es de 41,8 kb, presenta un sistema de empaquetamiento por llenado de cápside y no contiene genes de virulencia conocidos. Su genoma posee una elevada similitud con el de los fagos P22, ST104 y ST64T.
4. El fago lítico UAB_Phi87 pertenece a la familia *Myoviridae* y al grupo de fagos tipo Felix O1. El tamaño de su genoma es de 87,2 kb, también presenta un sistema de empaquetamiento por llenado de cápside y tampoco contiene genes de virulencia conocidos. Su genoma tiene una elevada similitud con el de los fagos Felix O1, WV8 y SA1.
5. Los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87 son muy estables a diferentes condiciones de temperatura y pH, con excepción de su exposición a pH 2. La elevada estabilidad a 4°C hace que su conservación sea adecuada a dicha temperatura.
6. El uso de un combinado fágico integrado por los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87, junto con el fago UAB_Phi78, aislado por nuestro grupo, produce una significativa reducción de la concentración de los cultivos de *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Enteritidis* LK5 durante 8 h, siendo mayor este efecto en la serovariedad Enteritidis. Además, este combinado lisa también a cultivos de las serovariedades Hadar, Infantis y Virchow de *S. enterica*.
7. La presencia de sales biliares y la temperatura de 42°C afectan negativamente al crecimiento de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* y también a la reducción de la concentración bacteriana debida a la infección con el cóctel fágico.
8. Los estudios realizados en el modelo murino y en el de *Gallus gallus* indican que el efecto del combinado fágico es mayor cuando la concentración fágica intestinal es superior a la bacteriana. Se recomienda una dosis de 10^{10} pfu/animal y una administración frecuente de los fagos para conseguir la concentración fágica intestinal deseada.

Conclusiones

9. En el modelo murino, el tratamiento con el combinado fágico no produjo una disminución de la mortalidad de los ratones infectados con *S. Enteritidis* LK5. En cambio, tanto en este modelo como en el de *Gallus gallus* dicho combinado mostró ser eficaz frente a la infección de *S. Typhimurium*, aumentando este efecto cuando se administró de forma preventiva, es decir, antes de que el patógeno hubiera colonizado el tracto intestinal de los animales.
10. El título del suero de ratones y pollos tratados con múltiples dosis del cóctel fágico es, como máximo de 1/128 y 1/64, respectivamente, lo cual indica una baja respuesta inmune.
11. Si bien el número de pollos portadores de bacterias resistentes fue similar en los grupos tratado y no tratado con fagos, la administración por vía oral de múltiples dosis del cóctel fágico a estos animales ejerce una presión selectiva sobre las bacterias intestinales resistentes a la infección fágica.
12. Los mejores resultados de la terapia fágica en *Gallus gallus* se han obtenido al administrar dos dosis diarias del cóctel fágico durante 5 días, iniciándose el tratamiento el día previo a la infección con *Salmonella* y readministrando el cóctel a los días 6, 8, 10, 13 y 15 posinfección. En estas condiciones, se consiguió una significativa reducción de este patógeno superior a 4 logaritmos durante los dos primeros días de la infección. Dicha reducción disminuyó a lo largo del tiempo, obteniéndose a los 17 días posinfección una reducción de 1,5 logaritmos.

7. Bibliografía

- Abedon, S. T., Herschler, T. D. y Stopar, D. Bacteriophage latent-period evolution as a response to resource availability. *Applied Environmental Microbiology*. 2001. 67: 4233-4241.
- Abedon, S. T. Phage Ecology. En: *The Bacteriophages*. Calendar, R. (Eds.) 2006. 5:37-46.
- Ackermann, H. W. Tailed bacteriophages. The order Caudovirales. *Advances in Virus Research*. 1998. 51:135-201.
- Ackermann, H. W. Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology*. 2003. 154:245-251.
- Ackerman, H. W. Bacteriophage classification. En: *Bacteriophages. Biology and Applications*. Kutter, E. y Sulakvelidze, A. (Eds.) 2005. 4:67-90.
- Ackermann, H. W. 5500 phages examined in the electron microscope. *Arch. Virol*. 2007. 152:227-243.
- Ackers, M. L., Phur, N. D., Tauxe, R. V. and Mintz, E. D. Laboratory-based surveillance of *Salmonella* serotype Typhi infections in the United States: antimicrobial resistance on the rise. *JAMA*. 2000. 283:2668-2673.
- Adams, M. H. *Bacteriophages*. Interscience Pub. New York. 1959. 7:98-119.
- Anonymous, Editorial. *Nature Reviews*. 2009. 7:478.
- Asakura, A., Tajima, O., Watarai, M., Shirahata, T., Kurazono, H y Makino, S. Effects of rearing conditions on the colonization of *Salmonella* Enteritidis in the cecum of chicks. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2001. 63:1221-1224.
- Atterbury R.J., Connerton P.L., Dodd C.E., Rees C.E. y Connerton I.F. Isolation and characterization of *Campylobacter* bacteriophages from retail poultry. *Applied Environmental Microbiology*. 2003. 69:4511-4518.
- Atterbury R. J., Van Bergen M. A. P. y Ortiz F. Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. *Applied Environmental Microbiology*. 2007. 73:4543-4549.
- Bailey J. y Cosby D. *Salmonella* prevalence in free-range and certified organic chickens. *Journal of Food Protection*. 2005. 68(11):2451-2453.
- Barak, J.D., Gorski, L., Naraghi-Arani, P. y Charkowski, A. O. *Salmonella* enterica virulence genes are required for bacterial attachment to plant tissue. *Applied Environmental Microbiology*. 2005. 71:5685-5691.
- Baranska, S., Gabig, M., Wegrzyn, A., Konopa, G., Herman-Antosiewicz, A., Hernandez, P., Schwartzman, J. B., Helinski, D. R. y Wegrzyn, G. Regulation of the switch from early to late bacteriophage lambda DNA replication. *Microbiology*. 2001. 147:535-547.
- Bardina, C. Aïllament de bacteriòfags de les serovarietats Enteritidis i Typhimurium de *Salmonella* entèrica. Trabajo experimental de máster. 2007.
- Baxa, U., Steinbacher, S., Miller, S., Weintraub, A., Huber, R. y Seckler, R. Interactions of phage P22 tails with their cellular receptor *Salmonella* O-antigen polysaccharide. *Biophysical Journal*. 1996. 71:2040-2048.
- Berchieri, A., Lovell, M. A. y Barrow, P. A. The activity in the chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for *Salmonella* Typhimurium. *Research in Microbiology*. 1991. 142:541-549.
- Berends, B.R., Van Knapen, F., Mossel, D.A.A., Burt, S.A. y Snijders, J.M.A. Impact on human health of *Salmonella* spp. On pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. *International Journal of Food Microbiology*. 1998. 44:219-229.
- Bernhardt, T. G., Wang, I. N., Struck, D. K. y Young, R. Breaking free: "Protein antibiotics" and phage lysis. *Research in Microbiology*. 2002. 153:493-501.

Bibliografía

- Bertrani, G. Studies on Lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1951. 62:293-300.
- Borch, E., Nesbakken, T. y Christensen, H. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 1996. 30: 9–25.
- Borie, C., Albala, I., Sánchez, P., Sánchez, M. L., Ramírez, S., Navarro, C., Morales, M. A., Retamales, J. y Robeson, J. Bacteriophage treatment reduces *Salmonella* colonization of infected chickens. *Avian Diseases*. 2008. 52:64-67.
- Borie, C., Sánchez, M. L., Navarro, C., Ramírez, S., Morales, M. A., Retamales, J. y Robeson, J. Aerosol spray treatment with bacteriophages and competitive exclusion reduces *Salmonella* Enteritidis infection in chickens. *Avian Diseases*. 2009. 53:250-254.
- Bossi, L y Figueroa-Bossi, N. Prophage arsenal of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. En: Phages. Their role in bacterial pathogenesis and biotechnology. Waldor, K. M., Friedman, D. I. and Adhya, S. L. (Eds.) 2005. 8:165-185.
- Boyen, F., Haesebrouck, F., Maes, D., Van Immerseel, F., Ducatelle, R. y Pasmans, F. Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: a closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Veterinary Microbiology*. 2008. 130:1-19.
- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, f. J., Tauxe, R y Swaminathan, B. *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000. 38(7):2465-2467.
- Brüssow, H. Phage therapy: the *Escherichia coli* experience. *Microbiology*. 2005. 151:2133-2140.
- Callaway, T. R., Keen, J. E., Edrington, T. S., Baumgard, L. H., Spicer, L., Fonda, E. S., Griswold, K. E., Overton, T. R., VanAmburgh, M. E. Anderson, R. C., Genovese, K. J., Poole, T. L., Harvey, R. B. y Nisbet, D. J. Fecal prevalence and diversity of *Salmonella* species in lactating dairy cattle in four states. *Journal of Dairy Science*. 2005. 88(10):3603-3608.
- Campbell, A. Comparative molecular biology of lambdoid phages. *Annual Review of Microbiology*. 1994. 48:193-222.
- Campbell, A. General aspects of Lysogeny. En: *The Bacteriophages*. Calendar, R. (Eds.) 2006. 7:66-73.
- Casjens, S., Eppler, K., Parr, R. and Poteete, A. R. Nucleotide sequence of the bacteriophage P22 gene 19 to 3 region: identification of a new gene required for lysis. *Virology*. 1989. 171:588-598.
- Casjens, S. R. Diversity among the tailed bacteriophages that infect the Enterobacteriaceae. *Research in Microbiology*. 2008. 159 (5):340-348.
- Casjens, S. and Thuman-Commike, P. Evolution of mosaic tailed bacteriophage genomes seen through the lens of phage P22 virion assembly. *Virology*. 2011. 411:393-415.
- Castellan, D. M., Kinde, H. y Kass, P. H. Descriptive study of California egg layer premises and analysis of risk factors for *Salmonella* enterica serotype Enteritidis as characterized by manure drag swabs. *Avian Diseases*. 2004. 48:550-561
- Catalano, C. E., Cue, D. y Feiss, M. Virus DNA packaging: the strategy used by phage λ . *Molecular Microbiology*. 1995. 16:1075-1086.
- Chaverroche, M. K., Ghigo, J. M. y d'Enfert, C. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acid Research*. 2000. 28:E97.

- Cirillo, D. M., Valdivia, R. H., Monack, D. M. y Falkow, S. Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* Pathogenicity island 2n type III secretion system and its role in intracellular survival. *Molecular Microbiology*. 1998. 30:175-188.
- Connerton P.L., Loc Carrillo C.M., Swift C., Dillon E., Scott A., Rees C.E., Dodd C.E., Frost J. y Connerton I.F. Longitudinal study of *Campylobacter jejuni* bacteriophages and their hosts from broiler chickens. *Applied Environmental Microbiology*. 2004.70:3877-3883.
- D'Hérelle, F. Sur un microbi invisible antagoniste des bacilles dysenteriques. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. 1917. 165:373-375.
- Datsenko K. A. y Wanner B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2000. 97:6640-6645.
- Denou, E., Bruttin, A., Barretto, C., Ngom-Bru, C., Brüssow, H. y Zuber, S. T4 phages against *Escherichia coli* diarrhea: potential and problems. *Virology*. 2009. 388(1):21-30.
- Devine, R. Meat consumption trends in the world and the European Union. *INRA Productions Animals*. 2003. 16:325-327.
- Directiva 2003/99/CE. Vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos . 17 de Noviembre de 2003.
- Directiva 92/117/CEE. Medidas de protección contra determinadas zoonosis y determinados agentes productores de zoonosis en animales y productos animales. 17 de Diciembre de 1992.
- Dodson, M., McMacken, R. y Echols, M. Specialized nucleoprotein structures at the origin of replication of bacteriophage lambda. Protein association and disassociation reactions responsible for localized initiation of replication. *Journal of Biological Chemistry*. 1989. 264:10719-10725.
- Doermann, A. H. The intracellular growth of bacteriophages. Liberation of intracellular bacteriophage T4 by premature lysis with another phage or cyanide. *Journal of General Physiology*. 1952. 35:645-656.
- Donalson, L. M., McReynolds, J. L., Kim, W. K., Chalova, V. I., Woodward, C. L., Kubena, L. F., Nisbet, D. J. y Ricke, S. C. The influence of a fructooligosaccharide prebiotic combined with alfalfa molt diets on the gastrointestinal tract fermentation, *Salmonella* Enteritidis infection and intestinal shedding in laying hens. *Poultry Science*. 2008. 87:1253-1262.
- Dower, W. J., Miller, F. y Ragsdale, C. W. High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acid Research*. 1988. 16:6127-6145.
- Doyle, M. P. y Erickson, M. C. Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry. *Poultry Science*. 2006. 85:960-973.
- EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the Commission related to the use of vaccines for the control of *Salmonella* in poultry. *The EFSA Journal*. 2004. 114:1-74.
- EFSA. Preliminary report on the analysis of the baseline study on the prevalence of *Salmonella* in laying hen flocks of *Gallus gallus*. *The EFSA Journal*. 2007a. 81:1-71.
- EFSA. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in broiler flocks of *Gallus gallus*. *The EFSA Journal*. 2007b. 98:1-85.
- EFSA. The use and mode of action of bacteriophages in food production. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards (Question No EFSA-Q-2008-400). *The EFSA Journal*. 2009. 1076:1-26.

Bibliografía

- EFSA. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal*. 2010. 8(1):1496.
- EFSA. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009; *EFSA Journal*. 2011. 9(3):2090
- Ellermeyer, C. D. y Strauch, J. M. The genus *Salmonella*. En: *Prokaryotes*. Dworkin, M. y Falkow, S. (Eds.) 2006. 6:123-158.
- Felix, A. y Callow, B. R. Typing of paratyphoid B bacilli by means of Vi bacteriophage. *Brazilian Medical Journal*. 1943. 2:4308-4310.
- Filho A. R. L., Higgins J.P., Higgins S.E., Gaona G., Wolfenden A.D., Tellez G. y Hargis B.M. Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce *Salmonella* enterica serovar Enteritidis in vitro and in vivo. *Poultry Science*. 2007. 86:1904-1909.
- Fiorentin, L., Vieira, N. D., Barioni, W. y Barros, S. In vitro characterization and in vivo properties of *Salmonella* lytic bacteriophages isolated from free-range layers. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 2004. 6(2):121-128.
- Fiorentin L., Vieira N.D. y Barioni W. Jr. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella* Enteritidis PT4 in caecal contents of broilers. *Avian Pathology*. 2005. 34:258-63.
- Fischetti, V. A. The use of phage lytic enzymes to control bacterial populations. En: *Bacteriophages. Biology and Applications*. Kutter, E. y Sulakvelidze, A. (Eds.) 2005. 12:318-332.
- Franz, E. and y Bruggen, A.H. Ecology of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* enterica in the primary vegetable production chain. *Critical Reviews in Microbiology*. 2008. 34:143-161.
- Fujisawa, H. y Morita, M. Phage DNA packaging. *Genes Cells*. 1997. 2:537-545.
- Gill, J. J. Practical and theoretical considerations for the use of bacteriophages in food systems. In: *Bacteriophages in the control of food and waterborne pathogens*. Sabour, P. M. Y Griffiths, M. W. (Eds.) 2010. 11:217-235.
- Goldberg, E., Grinius, L. y Letellier, L. Recognition, attachment, and injection. En: *Molecular Biology of bacteriophage T4*. American Society for Microbiology. Washington, D. C. 1994. 18:347-356.
- Grizard, D. y Barthelemy, C. Non-digestible oligosaccharides used as prebiotic agents: mode of production and beneficial effects on animal and human health. *Reproduction Nutrition Development*. 1999. 39:563-588.
- Gutiérrez, D., Martín-Platero, A. M., Rodríguez, A., Martínez-Bueno, M., García, P y Martínez, B. Typing of bacteriophages by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR to assess genetic diversity. *FEMS Microbiology Letters*. 2011. 322:90-97.
- Guttman, B., Raya, R. and Kutter, E. Basic Phage Biology. En: *Bacteriophages. Biology and Applications*. Kutter, E. y Sulakvelidze, A. (Eds.) 2005. 3:28-66.
- Hanlon, G. W. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2007. 30(2):118-128.
- Hendriksen, R. S., Mikloleit, M., Carlson, V. P., Karlsmose, S., Vieira, A. R., Jensen, A. B., Seyfarth, A. M., DeLong, S. M., Weill, F. X., Lo Fo Wong, D. M., Angulo, F. J., Wegener, H. C. y Arestrup, F. M. WHO global *Salmonella* surveillance external quality assurance for serotyping of *Salmonella* isolates from 2000 to 2007. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009. 47(9):2729-2736.

- Hendrix R.W., Smith, M. C., Burns, R. N., Ford, M. E. y Hatfull, G. F. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: All the world's a phage. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 1999. 96:2192-2197.
- Hendrix, R. W. Bacteriophages: evolution of the majority. *Theoretical Population Biology*. 2002. 61:471-480.
- Higgins J. P., Higgins S. E., Guenther K.L., Huff W., Donoghue A.M., Donoghue D.J. y Hargis B.M. Use of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products. *Poultry Science*. 2005. 84:1141-1145.
- Hinton, D. M., March-Amegadzie, R., Gerber, J. S. y Sharma, M. Bacteriophage T4 middle transcription system: T4-modified RNA polymerase; AsiA, a sigma 70 binding protein; and transcriptional activator MotA. *Methods in Enzymology*. 1996. 274:43-57.
- Housby, J. N. y Mann, N. H. Phage therapy. *Drug Discovery Today*. 2009.14:536-540.
- Hume, M. E., D. E., Nisbet, D. J. y DeLoach, J. R. In vitro 14C-amino acid fermentation by CF3TM, a characterized continuous-flow competitive exclusion culture of caecal bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 1997. 83:236-242.
- Humphrey, T. Science and society: *Salmonella*, stress responses and food safety. *Nature Reviews Microbiology*. 2004. 2:504-509.
- Hyman, P. y Abedon, S. T. Bacteriophage Host range and bacterial resistance. *Advances in Applied Microbiology*. 2010. 70:218-242.
- Intralytix. http://www.intralytix.com/Intral_Human.htm
- Israel, V. Role of the bacteriophage P22 tail in the early stages of infection. *Journal of Virology*. 1976. 18:361-364.
- Jacob, C. J. and Powell, D. A. Where does foodborne illness happen - in the home, at foodservice or elsewhere - and does it matter? *Foodborne Pathogens and Disease*. 2009. 9:1121-1123.
- Jamalludeen N., She Y-M., Lingohr E. J., y Griffiths M. Isolation and characterization of virulent bacteriophages against *Escherichia coli* serogroups O1, O2 and O78. *Poultry Science*. 2009. 88:1694-1702.
- Jardine, P. J. and Anderson, D. L. DNA packaging in double-stranded DNA phages. In: *The Bacteriophages. Calendar*, R. (Eds.) 2006. 6:49-65.
- Johnson, R. P., Gyles, C. L., Huff, W. E., Ojha, S., Huff, G. R., Rath, N. C. y Donoghue, A. M. Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle, poultry and pigs. *Animal Health Research Review*. 2008. 9(2):201-215.
- Kallings, L. O. Sensitivity of various *Salmonella* strains to Felix 0-1 phage. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*. 1967. 70:446-454.
- Kauffmann, F. On the classification and nomenclature of the genus *Salmonella*. *Microbiology and Immunology*. 1971. 79:421-422.
- Keller, L. H., Benson, C. E., Krotec, K. and Eckroade, R. J. *Salmonella* enteritidis colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. *Infection and Immunity*. 1995. 63:2443-2449.
- Klerks, M. M., Franz, E., Van Gelt-Peltzer, M., Zijlstra, C., y Van Bruggen, A. H. Differential interaction of *Salmonella* enterica serovars with lettuce cultivars and plant-microbe factors influencing the colonization efficiency. *International Society for Microbial Ecology Journal*. 2007. 1:620-631.
- Kropinski, A. M. Phage therapy. Everything old is new again. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 2006. 17(5):297-306.

Bibliografía

- Kropinski, A. M., Sulakvelidze, A., Konczy, P. y Poppe, C. *Salmonella* phages and prophages. Genomics and practical aspects. *Methods in Molecular Biology*. 2007. 394: 133-175.
- Krylov, V. N. Phage therapy in terms of bacteriophage genetics: hopes, prospects, safety, limitations. *Russian Journal of Genetics*. 2001. 37(7):715-730.
- Kutter, E., Raya, R. y Carlson, K. Molecular Mechanisms of phage Infection. In: *Bacteriophages. Biology and Applications*. Kutter, E. y Sulakvelidze, A. (Eds.) 2005. 7:163-220.
- Kutter, E. and Kropinski, A. M (Eds.). *Bacteriophages. Methods and protocols: Isolation, Characterization and Interactions*. Humana Press. 2009.
- Kwon H-J., Cho S-H. y Kim T-E. 2008. Characterization of a T7-Like lytic bacteriophage (SG-JL2) of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum. *Applied Environmental Microbiology*. 74:6970-6979.
- Lawrence, J. G., Hatfull, G. F. y Hendrix, R. W. Imbroglios or viral taxonomy: genetic exchange and failings of phenetic approaches. *Journal of Bacteriology*. 2002. 184(16):4891-4905.
- Levin, B. R. y Bull, J. J. Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nature Reviews Microbiology*. 2004. 2(2):166-173.
- Little, J. W., Shepley, D. P. and Wert, D. W. Robustness of a gene regulatory circuit. *EMBO Journal*. 1999. 18:4299-4307.
- Liu, J., Glazko, G. y Mushegian, A. Protein repertoire of double-stranded DNA bacteriophages. *Virus Research*. 2006. 117:68-80.
- Loc Carrillo C., Atterbury R. J., El-Shibiny A., Connerton P. L., Dillon E., Scott A. y Connerton I. F. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Applied Environmental Microbiology*. 2005. 71:6554-6563.
- Lowe, T. M. y Eddy, S. R. tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acid Research*. 1997. 25:955-964.
- Maguire, H., Cowden, J. y Jacob, M. An outbreak of *Salmonella* Dublin infection in England and Wales associated with a soft unpasteurized cows milk chesse. *Epidemiology and Infection*. 1992. 109:389-396.
- Mastroeni, P. y Sheppard, M. *Salmonella* infections in the mouse model: host resistance factors and in vivo dynamics of bacterial spread and distribution in the tissues. *Microbes and Infection*. 2004. 6:398-405.
- Mastroeni, P., Grant, A., Restif, O. y Maskell, D. A dynamic view of the spread and intracellular distribution of *Salmonella enterica*. *Nature reviews*. 2009. 7:73-80.
- Matsuzaki S., Rashed M., Uchiyama J., Sakurai S., Ujihara T., Kuroda M., Ikeuchi M., Tani T., Fujieda M., Wakiguchi H. y Imai S. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2005.11:211-219.
- Mattey, M. y Spencer, J. Bacteriophage therapy. Cooked goose or Phoenix rising? *Current Opinion Biotechnology*. 2008. 19:608-612.
- Methner, U., Barrow, P.A., Martin, G. y Meyer, H. Comparative study of the protective effect against *Salmonella* colonisation in newly hatched SPF chickens using live, attenuated *Salmonella* vaccine strains, wild-type *Salmonella* strains or a competitive exclusion product. *International Journal of Food and Microbiology*. 1997. 35:223-230.

- Merril, C. R., Scholl, D. y Adhya, S. Phage therapy. En: The bacteriophages. Calendar, R. (Eds.) 2006. 48: 725-741.
- Milleman, Y., Mouline, C., Lafont, J. P. y Chaslus-Dancla, E. Bacteraemia assays in chickens as a model of the virulence of *Salmonella* enterica serovars Typhimurium and Enteritidis strains. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 2006. 1:15670-15676.
- Miller, S. I. y Pegues, D. A. *Salmonella* species, including *Salmonella* Typhi. En: Principles and practice of infectious diseases. Mandell, G. L., Douglas, R. G. y Bennet, J. E. (Eds.) 2000. 5:2344-2363.
- Miller, E. S., Kutter, E., Mosig, G., Arisaka, F., Kunisawa, T. y Rüger, W. Bacteriophage T4 genome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003. 67(1):86-156.
- Mollie, D. W. y Groisman, E. A. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology*. 2003. 69(7): 3687-3694.
- Mosig, G., Lin, G. W., Franklin, J. y Fan, W. H. Functional relationships and structural determinants of two bacteriophage T4 lysozymes: a soluble (gene e) and a baseplate associated (gene 5) protein. *New Biology*. 1989. 1:171-179.
- Mosig, G. y Eiserling, F. T4 and related phages: structure and development. En: The Bacteriophages. Calendar, R. (Eds.) 2006. 18:225-267.
- Parisien, A., Allain, B., Zhang, J., Mandeville, R. y Lan, C. Q. Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal of Applied Microbiology*. 2008. 104:1-13.
- Payne R. J. y Jansen V.A. Understanding bacteriophage therapy as a density-dependent kinetic process. *Journal of Theoretical Biology*. 2001.208:37-48.
- Pedulla, M. L., Ford, M. E. y Karthikeyan, T. Corrected sequence of the bacteriophage P22 genome. *Journal of Bacteriology*. 2003. 185(4):1475-1477.
- Popoff, M. Y. (Eds.) Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 8th ed. World Health Organization Collaborating Centre for Reference and research on *Salmonella*. Institut Pasteur. Paris, France. 2001.
- Prevelige, P.E. Bacteriophage P22. En: The Bacteriophages. Calendar, R. (Eds.). 2006. 29:457-468.
- Proux, C., Van Sinderen, D., Suarez, J., Garcia, P., Ladero, V., Fitzgerald, G. F., Desire, F. y Brussow, H. The dilemma of phage taxonomy illustrated comparative genomics of Sfi21-like Syphoviridae in lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*. 2002. 184(16):6026-6036.
- Refregier-Petton, J., Kemp, G. K., Nebout, J. M., Allo, J. C. y Salvat, G. Post treatment effects of a SANOVA immersion treatment on turkey carcasses and subsequent influence on recontamination and cross contamination of breast fillet meat during turkey processing. *Brazilian Poultry Science*. 2003. 44:790-791.
- Reglamento (EC) No 2160/2003. Control de *Salmonella* y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos. 17 de Noviembre de 2003.
- Reglamento EC No 1003/2005. Implementing regulation (EC) No 2160/2003 as regards a Community target for the reduction of the prevalence of certain *Salmonella* serotypes in breeding flocks of *Gallus gallus* and amending Regulation (EC) No 2160/2003. 30th June 2005.
- Reglamento (EC) No 2073/2005. Criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. 15 de Noviembre de 2005.

Bibliografía

- Reglamento EC No 1168/2006. Objetivo comunitario de reducción de la prevalencia de determinados serotipos de *Salmonella* en las gallinas ponedoras de la especie *Gallus gallus*. 31 de Julio de 2006.
- Reglamento EC No 646/2007. Objetivo comunitario de reducción de la prevalencia de *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium en los pollos de engorde. 12 de Junio de 2007.
- Reglamento CE No 1441/2007. Criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. 5 de Diciembre de 2007.
- Rhoades, M., MacHattie, L. A. y Thomas Jr, C. A. The P22 bacteriophage DNA molecule. I. The mature form. *Journal of Molecular Biology*. 1968. 37:21-40.
- Rhoades, J. R., Duffy, G. y Koutsoumanis, K. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella* enterica and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: a review. *Food Microbiology*. 2009. 26(4):357-376.
- Rigney, C. P., Salamone, B. P., Anandaraman, N., Rose, B. E., Umholts, R. L., Ferris, K. E., Parham, D. R. y James, W. *Salmonella* serotypes in selected classes of food animal carcasses and raw ground products. January 1998 through December 2000. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2004. 224:524-530.
- Rohwer, F. y Edwards, R. The phage proteomic tree: a genome-based taxonomy for phage. *Journal of Bacteriology*. 2002. 184(16):4529-4535.
- Roos, W. H., Ivanovska, I. L., Evilevitch, A. y Wuite, G. J. L. Viral cpsids: mechanical characteristics, genome packaging and delivery mechanisms. *Cellular and Molecular Life Science*. 2007. 64:1484-1497.
- Roy, P., Dhillon, A. S., Shivaprasad, H. L., Schaberg, D. M., Bandli, D. y Johnson, S. Pathogenicity of different serogroups of avian *Salmonellae* in specific pathogen free chickens. *Avian Diseases*. 2001. 45:922-937.
- Sambrook, J. y Russell, D. W. (Eds.). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Volume 2. 2001.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology*. 1977. 24:104-108.
- Santos, R. L., Zhang, S., Tsois, R. M., Kingsley, R. A., Adams, L.G. y Bäumler, A. J. Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes and infection*. 2001. 3: 1335-1344.
- Santos, R. L., Tsois, R. M., Bäumler, A. J. y Adams, L. G. Pathogenesis of *Salmonella* induced enteritis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2003. 36:3-12.
- Schade, R., Gutierrez-Calzado, E., Sarmiento, R., Chacan, P. A., Porankiewicz-Asplund, J. y Terzolo, H. R. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Alternatives to Laboratory Animals*. 2005. 33:129-154.
- Schiller, L. R. A germ world. Food-borne infections in 2009. *Nature Reviews*. 2009. 6:197-198.
- Scholl, D., Rogers, S., Adhya, S. y Merrill, C.R. Bacteriophage K1-5 encodes two different tail fiber proteins, allowing it to infect and replicate on both K1 and K5 strains of *Escherichia coli*. *Journal of Virology*. 2001. 75: 2509-2515.
- Shelobolina, E. S., Sullivan, S. A., O'Neill, K. R., Neun, K. P. y Louley, D. R. Isolation, characterization, and UVI-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid resistant bacterium from low pH, nitrate and UVI contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella* subterranea spp. *Applied Environmental Microbiology*. 2004. 70(5):2959-2965.

- Sklar, I. B. y Joerger, R. D. Attempts to utilize bacteriophage to combat *Salmonella* enterica serovar Enteritidis infection in chickens. *Journal of Food Safety*. 2001. 21:15-29.
- Skurnik, M. y Strauch, E. Phage therapy: facts and fiction. *International Journal of Medical Microbiology*. 2006. 296:5-14.
- Smith, H. W. y Huggins, M. B. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *Journal of General Microbiology*. 1982. 128:307-318.
- Smith, H. W. y Huggins, M. B. Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *Journal of General Microbiology*. 1983. 129:2659-2675.
- Smith-Mungo, L., Chan, I. T. y Landy, A. Structure of the P22 att site. Conservation and divergence in the lambda motif of recombinogenic complexes. *J. Biol. Chem.* 1994. 269:20798-20805.
- Spricigo, D. A. La desinfección basada en bacteriófagos como herramienta de biocontrol de *Salmonella* en alimentos. Tesis Doctoral. 2011.
- Steven, A. C., Heymann, J. B., Cheng, N., Trus, B. L. y Conway, J. F. Virus maturation: dynamics and mechanism of a stabilizing structural transition that leads to infectivity. *Current Opinion in Structural Biology*. 2005. 15(2):227-236.
- Strauch, E., Kaspar, H., Schaudinn, C., Dersch, P., Madela, K., Gewinner, C., Hertwig, S., Wecke, J. y Appel, B. Characterization of enterocolitacin, a phage tail-like bacteriocin, and its effect on pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. *Applied Environmental Microbiology*. 2001. 67:5634-5642.
- Sulakvelidze, A. and Barrow, P. Phage therapy in animal and agribusinesses. En: *Bacteriophages. Biology and Applications*. Kutter, E. and Sulakvelidze, A. (Eds.) 2005. 13:333-376.
- Summers, W. C. Bacteriophage Research: Early History. En: *Bacteriophages. Biology and Application*. Kutter, E. And Sulakvelidze, A. (Eds.). 2005. 2:5-27.
- Summers, W. C. Phage and the early development of molecular biology. En: *The Bacteriophages*. Calendar, R. (Eds.) 2006. 1:3-8.
- Susskind, M. M. y Botstein, D. Molecular genetics of bacteriophage P22. *Microbiological reviews*. 1978. 42(2):385-413.
- Tartoff, K. D., and Hoobs, C. A. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. 1987. *Beteshda Research Laboratory Focus*. 1:9-12.
- Thomson, N., Baker, S. y Pickard, D. The role of prophage-like elements in the diversity of *Salmonella* enterica serovars. *Journal Molecular Biology*. 2004. 339:279-300.
- Toro H., Price S.B., McKee A.S., Hoerr F.J., Krehling J., Perdue M. y Bauermeister L. Use of bacteriophages in combination with competitive exclusion to reduce *Salmonella* from infected chickens. *Avian Disease*. 2005. 49:118-124.
- Twort, F. W. An investigation on the nature of the ultra-microscope viruses. *Lancet*. 1915. II:1241-1243.
- Udayamputhoor, R. S., Hariharan, H., Van Lunen, T. A., Lewis, P. J., HEaney, S., Price, L. y Woodward, D. Effects of diet formulations containing proteins from different sources on intestinal colonization by *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. *Canadian Journal Veterinary Research*. 2003. 67:204-212.
- Uzzau, S., Brown, D. J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., Casadesus, J., Platt, D. J. y Olsen, J. E. Host adapted serotypes of *Salmonella* enterica. *Epidemiology and Infection*. 2000. 125:229-255.

Bibliografía

- Van Immerseel, F., Russell, J. B., Flythe, M. D., Gantois, I., Timbermont, L., Pasmans, F., Haesebrouck, F. y Ducatelle, R. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathology*. 2006. 35:182-188.
- Van't Hof, W., Veerman, E. C. I., Helmerhost, E. J. y Amerongen, A. V. N. Antimicrobial peptides: properties and applicability. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001. 382:597-619.
- Vandeplas, S., Dubois, D. R., Beckers, Y., Thonart, P. y Théwis, A. *Salmonella* in chicken: current and developing strategies to reduce contamination at farm level. *Journal of Food Protection*. 2010. 73(4):774-785.
- Vander Byl, C. y Kropinski, A. M. Sequence of the genome of *Salmonella* bacteriophage P22. *Journal of Bacteriology*. 2000. 182:6472-6482.
- Vázquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Baumler, A. J., Falkow, S., Valdivia, R., Brown, W., Le, M., Berggren, R., Parks, W. T. y Fang, F. C. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature*. 1999. 401:804-808.
- Vázquez-Torres, A., Xu, Y. y Jones-Carson, J. *Salmonella* pathogenicity island 2 dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science*. 2000. 287:1655-1668.
- Voetsch, A. C., Van Gilder, T. J. y Angulo, F. J. Foodnet estimate of the burden illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Clinical Infectious Diseases*. 2004. 38(3):S127-S134.
- Wang, I. N., Dykhuizen, D. E., y Slobodkin, L. B. The evolution of phage lysis timing. *Trends in Ecology and Evolution*. 1996. 10:545-558.
- Wang, I. N., Smith, D. L. y Young, R. Holins: The protein clocks of bacteriophage infections. *Annual Review of Microbiology*. 2000. 54:799-825.
- Whichard, J. Bacteriophage Felix O1: genetic characterization and bioremedial application. Thesis. 2000.
- Whichard, J. M., Weigt, L. A., Borris, D. J., Ling, L. L., Zhang, Q., Kapur, V., Pierson, F. W., Linghor, E. J., She, Y-M., Kropinski, A. M. y Sriranganathan, N. Complete genome sequence of bacteriophage Felix O1. *Viruses*. 2010. 2(3):710-730.
- White, D. G., Zhao, S., Sudler, R., Ayers, S., Friedman, S., Chen, S., McDermott, P. F., McDermott, S., Wagner, D. D. y Meng, J. The isolation of antibiotic-resistant *Salmonella* from retail ground meats. *New England Journal of Medicine*. 2001. 345:1147-1154.
- Williams, K. P., Kassavetis, G. A., Herendeen, D. R., y Geiduschek, E. P. Regulation of late-gene expression. In: *Molecular Biology of bacteriophage T4*. American Society for Microbiology. Washington, D. C. 1994. 161-175.
- World Health Organization. Drug-resistant *Salmonella*. 2005. Fact sheet N°139. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>
- Young, R. y Wang, I-N. Phage Lysis. En: *The Bacteriophages*. Calendar, R. (Eds.) 2006. 10:104-125.
- Zhang, S., Kingsley, R.A., Santos, R. L. y Andrews-Polymenis. Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium induced diarrhea. *Infection and Immunity*. 2003. 71(1):1-12.

8. Anexo

1. Medios de cultivo

Los medios de cultivo y algunas de las soluciones empleadas fueron esterilizados mediante autoclave durante 15 min a 121°C. El agua utilizada en todos los medios de cultivos fue agua ultrapura de grado MQ. Tras su esterilización, se dejaron enfriar los medios sólidos hasta una temperatura de 50°C, momento en el que se añadieron los suplementos adecuados en caso de ser necesario, se dispensaron en placas de Petri (Sterilin) en condiciones de esterilidad y se almacenaron a 4°C.

1.1. Agua peptonada

Medio de cultivo líquido utilizado para el enriquecimiento bacteriano.

Agua peptonada	
Agua Peptonada (Merck)	25,5 g
Agua grado MQ	Hasta 1 L

1.2. Medio mínimo AB

Medio de cultivo mínimo compuesto por dos soluciones que deben prepararse y almacenarse por separado.

Solución A	
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Panreac)	20 g
Na ₂ HPO ₄ (Merck)	55,99 g
KH ₂ PO ₄ (Panreac)	30 g
NaCl (Panreac)	30 g
Na ₂ SO ₄ (Panreac)	0,11 g
Agua grado MQ	Hasta 1 L

Solución B	
MgCl ₂ ·6H ₂ O (Merck)	16 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O (Merck)	0,58 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O (Merck)	0,032g
Agua grado MQ	Hasta 1L

Para su utilización y tras su esterilización, se mezclan en esterilidad 100 ml de la solución A y 25 ml de la solución B y se ajusta el volumen a 1000 ml. Cuando fue necesario se suplementó con glucosa al 0,2% y sales biliares al 5%.

1.3. Medio Müller –Kauffman

Medio de cultivo líquido selectivo con tetracionato.

Müller - Kauffman	
Medio Müller –Kauffman (MKTn)(Merck)	89,5 g
Agua grado MQ	Hasta 1 L

Solución de yodo – potasio yoduro	
Iodo (Merck)	4 g
KI (Merck)	5 g
Agua grado MQ	Hasta 20 mL

Este medio no debe esterilizarse con autoclave. La mezcla se hierve durante 5 min, se enfría rápidamente en hielo y se almacena a 4°C hasta un máximo de 10 días. Antes de utilizarse, se añaden 20 ml de la solución de yodo-potasio yoduro por litro del medio Müller –Kauffman.

1.4. Medio LB

Medio de cultivo líquido utilizado para el crecimiento bacteriano.

LB	
Tryptona (Pronadisa)	10 g
Extracto de levadura (Pronadisa)	5 g
NaCl (Panreac)	10 g
Agua grado MQ	Hasta 1 L

Para la obtención de LB sólido se añaden 17 g de agar-agar por litro y para el LB blando 7 g.

1.5. Medio LB – Lennox

Medio de cultivo líquido utilizado para la obtención de células competentes.

LB – Lennox	
Tryptona (Difco)	10 g
Extracto de levadura (Difco)	5 g
NaCl (Panreac)	5 g
Agua grado MQ	Hasta 1 L

1.6. Medio SOB

Medio de cultivo para realizar la obtención de células competentes y electrotransformación.

SOB	
Triptona (Difco)	20 g
Extracto de levadura (Difco)	5 g
NaCl (Panreac)	0,5 g
KCl 2,5M	0,5 mL
Agua grado MQ	Hasta 1 L

Ajustar el pH del medio a 7, utilizando NaOH 10N.

1.7. Medio TB

Medio de cultivo para el crecimiento de cepas portadoras de plásmidos para realizar la extracción de los plásmidos. Para su elaboración se preparan las soluciones A y B por separado y se mezclan tras su esterilización, evitando de esta manera la precipitación de las sales.

Solución A	
Triptona (Pronadisa)	12 g
Extracto de levadura (Pronadisa)	24 g
Glicerol (Panreac)	4 mL
Agua grado MQ	Hasta 900 mL

Solución B	
KH ₂ PO ₄ (Panreac)	2,31 g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O (Merck)	14,43 g
Agua grado MQ	Hasta 100 mL

1.8. Medio XLD

Medio de cultivo sólido para la selección y detección de *Salmonella*.

XLD	
Medio XLD (Pronadisa)	55,2 g
Agua grado MQ	Hasta 1 L

Este medio no debe esterilizarse con autoclave. La mezcla se calienta hasta que esté totalmente disuelto.

2. Soluciones y tampones

2.1. EDTA 0,5 M

EDTA 0,5 M pH 8	
EDTA 0,5 M (Sigma)	186,12 g
Agua grado MQ	Hasta 1 L

Ajustar el pH de la solución a 8 utilizando NaOH 10N.

2.2. Solución transportadora

Solución transportadora 6X	
Glicerol (Panreac)	30 g
Xilencianol (Clontech)	0,25 g
Azul de bromofenol (Panreac)	0,25 g
EDTA 0,5M pH8	2 ml
Agua grado MQ	Hasta 100 mL

2.3. Tampón carbonato

Tampón carbonato	
Na ₂ CO ₃ (Merck)	3,03 g
NaHCO ₃ (Merck)	6 g
Agua grado MQ	Hasta 1 L

Ajustar el pH de la solución a 9,6 utilizando NaOH 10N.

2.4. Tampón SM

SM	
Tris-HCl 1M pH 7,4 (AppliChem)	50 mL
NaCl (Panreac)	5,84 g
MgSO ₄ (Panreac)	1,56 g
Gelatina(Panreac)	0,1 g
Agua grado MQ	Hasta 1 L

2.5. Tampón PBS 10X

PBS 10X	
NaCl (Panreac)	80 g
KCl (Merck)	2 g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O (Merck)	26,8 g
KH ₂ PO ₄ (Merck)	2,4 g
Agua grado MQ	Hasta 1000 mL

Ajustar el pH del medio a 7,4 utilizando NaOH 10N.

2.6. Tampón PBST 1X (0,05% Tween 20)

PBST 1X	
Tween 20	250 µL
PBS 1x	Hasta 500 mL

2.7. Tampón TAE

TAE 50X	
Trizma Base (Sigma)	242 g
EDTA 0,5M pH8	100 ml
Ácido acético glacial (Panreac)	57 mL
Agua grado MQ	Hasta 1 L

2.8. Tampón TBE

TBE 50X	
Trizma Base (Sigma)	121,1 g
Ácido bórico (Sigma)	61,8 g
EDTA (Sigma)	0,745 g
Agua grado MQ	Hasta 1 L

2.9. Tampón TE 1X

TE 1X	
EDTA 0,5M pH8	2 mL
Tris-HCl 1M pH 7,4 (AppliChem)	1 mL
Agua grado MQ	97 mL

2.10. Tampón TE (PFGE)

TE 10 mM	
EDTA 0,5M (Sigma)	200 µL
Tris-HCl 1M pH 7,4 (AppliChem)	1 mL
Agua grado MQ	Hasta 100 mL

9. Agradecimientos

Després d'haver escrit tota una tesis, un es pensa que els agraïments és la part més fàcil. Ben al contrari, em trobo en la situació en que no sé ni com resumir tot el que m'agradaria expressar, perquè durant aquest període de temps, que mirat amb retrospectiva sembla curt però que en realitat és molt intens, he necessitat el recolzament, l'ajuda i la paciència de moltes persones.

En primer lloc m'agradaria agrair a les meves directores de tesis l'esforç descomunal d'aquestes últimes setmanes i tot el suport i ajuda prestats en aquests quatre/cinc anys. A la Dra. Montserrat Llagostera per brindar-me aquesta oportunitat que m'ha fet créixer professional i personalment, per intentar fer-me veure que el got no sempre està buit i per confiar en mi. A la Dra. Pilar Cortés, per quedar-te sempre que ho hem necessitat, per estar disposada a treure el cap i ajudar i, entre altres coses, per ensenyar-me a ser millor científica, si se'm permet la paraula. Fer extensius aquests agraïments al Dr. Jordi Barbé per donar-me l'oportunitat d'entrar al grup de Microbiologia Molecular i adoptar-me en aquesta gran família, i a la Dra. Susana Campoy per arremangar-se les mànigues quan ha estat necessari i prestar-me un trosset del seu cervell per ajudar en el petit però enrevessat món dels bacteriòfags.

Així mateix m'agradaria expressar el meu agraïment a la Montserrat Saco del DARP i als Serveis de Microbiologia dels hospitals de la Santa Creu i Sant Pau i de la Vall d'Hebrón de Barcelona per la col·lecció de soques prestades i a Calier per les mostres que han permès fer aquesta tesis. Igualment agrair al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA per la financió del present projecte (RTA2006-00065 del Ministerio de Ciencia e Innovación) i al Comissionat per a Universitats i Recerca del Departament d'Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu pel gaudi de la beca predoctoral de la Generalitat de Catalunya.

En segon lloc a tota la gran família del grup de Micro Mol., que per cada un de vosaltres sacrificaria totes les braves del món. GRÀCIES, en majúscules, en negreta, subratllat o en Arial 2000: GRÀCIES. Perquè que tots sempre estiguem disposats a ajudar-nos, animar-nos i escoltar-nos es el que ens permet créixer, aprendre, ser millors persones i al final doctors!

Denis...BUF!!! Qué decirte que no sepas ya. ¿Como agradecerte toda la ayuda? Las discusiones, los ratones, las rabinetas, los pollos, las alegrías, los millones de placas, la desesperación, los fines de semana y el largo etcétera que me dejo. Soy muy consciente que yo sola no hubiera sacado tantos experimentos adelante, y convencidísima de que tu personalidad tranquila y bondadosa ha permitido que el "*phage team*" funcionara a la perfección. Escribano! Porque sí, porque siempre estás ahí, porque siempre sacas fuerzas, porque siempre tiras pa'lante, porque nunca tienes una mala palabra en la boca.

Teixi... encara que no he treballat "codo con codo" amb tu, creu-me que les xerradetes a partir de les 7 de la tarda eren millor que un tonificant, perquè els autoclaus d'última hora venien de gust i tot, i

Agradecimientos

perquè compartir aquests anys i els que ens queden serà tot un plaer. Andreita!!! Per dir les coses tal qual, per anar amb la veritat pel davant, perquè m'encanta el teu esperit inconformista, i al cap i a la fi, per ser-hi. OOOLE TU!

Medina, las ratas y los niños de Castellar no serian nuestro fuerte, pero que nos metan un coche delante que van a flipar! Me gusta que siempre tengas otro punto de vista que añadir, que tiendas a ser tan perfeccionista y minuciosa, pero no te me pases eh que después estamos horas dándole vueltas a todo. Mayola...tremola món, que aquí va el biotecnòleg/bioquímic d'Olot. Perquè encara que no he compartit tant de temps amb tu com amb els altres, t'has guanyat un lloc igual de gran. Perquè ser tio i directe (per no dir simple...) mola. Joan Ruisss...que ja es divendres!!! I sinó com si ho fos. Gràcies per tot el treball que fas i facilitar-nos el nostre, i gràcies per sempre tenir 5 minuts per cada un de nosaltres i deixar-nos escalfar-te el cap quan necessitem desfogar-nos i quan no, també.

Meri, Fede i Joan, amb vosaltres he estat ben poc, però gent amb ganes i gran esperit sempre es bó tenir-los a prop. Estela!!! Gràcies per aportar tranquil·litat amb el teu dolç caràcter. Esa Ary de Roquetas! A mi m'encanta el teu caràcter espontani i el carinyu que desprens. Sandra, que tu buen humor no es fácil de olvidar.

I els que ja no hi sou... Albert Serra, el nen prodigi que va abandonar els fags... ya te vale! Gerard! Per les piscines, per les enrabiades, per dir-hi la teva, per deixar-nos coneixe't de debò i per tenir sempre una paraula agradable. Jesús!!! Porque discutir nunca había sido tan divertido ni estimulante: por no callarte nunca y por dejar que te moleste y te caliente la cabeza...un placer. Paulix... el temps que vas estar se'm va fer moooolt curt, senyal que el vam disfrutar! Em venen al cap molts moments divertits, molts moments autèntics i algú que altre moment crític, però això ho superavem ràpidament amb unes bones curses (*claaaro*)!!! Anna, merci per la teva alegria i el teu vozarrón! Vanessilla: per adoptar-me i ser la meva mami al lab! Elena, per guiar els meus primers passos. Isabel, porque de mayor quiero tener tu espíritu, así que no se lo vendas al Diablo... I a la resta que em falteu i hem compartit, sinó molt, alguna que altra aventurilla: Sergi, Natàlia, Yuli, Montse Ramírez, Marc Pybus i Neus.

Agrair també l'ajuda prestada per la Marina Luquin, l'Ester i la Silvia. Merci per prestar-nos un trosset del vostre laboratori, de la vostra paciència i del vostre temps. Als integrants dels laboratoris "3" i "4", perquè entre tots som un altre grup. A la família del CRESA que ens va adoptar com un fill pròdig: David, Ivàn, M^a Angeles, Valentí, Isabel, Roser i algú que segur que em deixo, gràcies per la vostra ajuda i per fer que els matins allà baix fossin més amens.

Per últim, però no menys important, a totes les *biotec's* que porten ja uns quants anys suportant les meves queixes i les meves idees atropellades: Mireia, Forn, Caminal, Núria, Helen, Mèrtxi i Ester. Perquè encara que cada una estiguem en un submón diferent és molt gratificant poder compartir tot

això amb persones que t'entenen, i perquè si tornés a començar la llicenciatura segur que us tornava a conèixer. A tots els que heu aguantat les meves divagacions, a tots els que heu intentat entendre el que faig, a tots els que heu hagut de moure plans i vacances (*esos ingenieros!!!*) perquè jo hi pogués ser: GRÀCIES també a vosaltres, perquè encara que potser no ho entengueu tots sumeu. I a tota la meva família, directa o indirecta, i sobretot a la mama i al papa o al papa i a la mama, gràcies per educar-me, ensenyar-me i escoltar-me, sou el meu coixí.

I ara sí, Xavi, com bé dius, segur que ets la persona que tens més ganes de que sigui doctora després de jo mateixa. T'ho dic cada dia, però per si de cas, t'ho recordo: amb tu tot sempre es una mica més fàcil. Per les esperes, pels findes que no son findes, pels ànims i per un fotimer de motius que farien una llista infinita.

A tots vosaltres que heu estat aquí i allà, allà i aquí, gràcies. Gràcies pels somriures dels bons moments, les paraules de consol en els mal moments, l'empatia, la efusivitat i el "tira endavant que tu pots" en moments d'estrès i sobretot, gràcies per aguantar-me.