



Universitat Autònoma de Barcelona

Biodistribución de bacteriófagos en mamíferos tras terapia fágica oral y emergencia de resistencia bacteriana a los fagos

Jennifer Otero Carrera

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**Biodistribución de bacteriófagos en mamíferos tras terapia
fágica oral y emergencia de resistencia bacteriana a los fagos**

Tesis Doctoral

Jennifer Otero Carrera

Directores: Dra. Montserrat Llagostera Casas y Dra. María Pilar Cortés Garmendia

Tutora: Dra. María Pilar Cortés Garmendia

Departament de Genètica i de Microbiologia

Bellaterra, 2019



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**Biodistribución de bacteriófagos en mamíferos tras terapia
fágica oral y emergencia de resistencia bacteriana a los fagos**

Tesis Doctoral con Mención Internacional presentada por **Jennifer Otero Carrera**

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

Programa de Doctorado en **Microbiología**

Jennifer Otero Carrera

Con el visto bueno de las Directoras de la Tesis

Dra. Montserrat Llagostera Casas

Directora

Dra. María Pilar Cortés Garmendia

Directora y tutora

Bellaterra, 2019

“Quien no haya experimentado la seducción que la ciencia ejerce sobre una persona, jamás comprenderá su tiranía.” (V́ctor Frankenstein)

Frankenstein o El moderno Prometeo de Mary W. Shelley.

RESUMEN

RESUMEN

La aplicación terapéutica de bacteriófagos líticos como alternativa a los antimicrobianos tradicionales ha resurgido en los últimos años debido a la cada vez más frecuente emergencia de bacterias resistentes a antibióticos. Sin embargo, existen algunos aspectos asociados a la terapia fágica que necesitan estudiarse con más profundidad para permitir su definitiva implementación. El presente trabajo se ha centrado en el estudio de dos aspectos de especial relevancia, como son: i) la emergencia de la resistencia a los bacteriófagos en diferentes condiciones de aplicación y ii) la biodistribución y transcitosis de bacteriófagos encapsulados en liposomas tras su administración por vía oral en un modelo murino.

Para el estudio de la emergencia de la resistencia bacteriana a bacteriófagos se utilizó el modelo de *Salmonella*/cóctel de bacteriófagos integrado por UAB_Phi20, UAB_Phi78 y UAB_Phi87 desarrollado previamente por nuestro grupo. Una primera aproximación permitió identificar que los receptores de los tres bacteriófagos se localizaban en el LPS, en el antígeno O en el caso de UAB_Phi20 y en el núcleo del LPS para los fagos UAB_Phi78 y UAB_Phi87. Debido a que el receptor del bacteriófago UAB_Phi78 se localiza en una región más interna de dicho núcleo, este fago fue seleccionado para el primer cribado del estudio de la resistencia a los bacteriófagos del cóctel. Posteriormente, se evidenció que la emergencia de resistencia difería en función del ámbito de aplicación. Así, el 92 % de los aislados recuperados de cultivos *in vitro* de *S. Typhimurium* ATCC14028 infectados con el cóctel de bacteriófagos fueron resistentes al fago UAB_Phi78 y también a los otros dos bacteriófagos. Dicha resistencia es debida probablemente a la pérdida de la proteína RfaJ, una glicosil transferasa implicada en la síntesis del LPS de *Salmonella*. Análogamente, el 3,2 % de los clones recuperados de lonchas de jamón cocido contaminadas con *S. Typhimurium* ATCC14028 y tratadas con el cóctel fágico fueron resistentes al bacteriófago UAB_Phi78. De estos, el 1,4 % fueron también resistentes a los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87; siendo la probable causa de la resistencia una mutación en el gen *rfaJ*; mientras que el 1,8 % sólo

Resumen

presentó resistencia adicional al fago UAB_Phi20 debido a cambios en el gen *rfc*, el cual codifica la polimerasa del antígeno O. Por último, en los estudios de terapia fágica en el modelo de pollo de engorde, no se encontró ningún clon resistente al fago UAB_Phi78, aislado de los animales contaminados con *S. Typhimurium* ATCC14028 y tratados con el cóctel fágico. Sin embargo, el 8,5 % de los aislados del grupo control fueron resistentes a los tres fagos del cóctel. No se ha podido determinar la causa de dicha resistencia, aunque los diversos estudios realizados, incluida la secuenciación de algunas cepas, permiten descartar la pérdida de LPS o la inmunidad mediada por los sistemas CRISPR-Cas de *Salmonella*, como posibles causas. Por otro lado, un pequeño porcentaje de aislados (1,3 % de los clones de los animales del grupo control y el 3,3 % de los procedentes del grupo tratado con el cóctel fágico) mostraron resistencia al bacteriófago UAB_Phi78, el cual ejerció un efecto bactericida, pero no bacteriolítico y sin producción de progenie fágica y resistencia asociada a UAB_Phi87. Aunque la causa de dicha resistencia no ha podido ser identificada hasta el momento, todo sugiere la implicación de un mecanismo basado en una infección abortiva. En conclusión, este estudio revela que tanto la frecuencia de la emergencia de resistencia como los mecanismos causantes de la misma son diferentes *in vitro*, en alimentos e *in vivo*. Además, demuestra la necesidad de abordar los estudios de resistencia de un modo más amplio, no sólo con estudios *in vitro*, y de utilizar cócteles que contengan bacteriófagos que reconozcan diferentes receptores en el hospedador para disminuir el desarrollo de resistencias.

En segundo término, los ensayos de biodistribución se realizaron administrando oralmente el fago UAB_Phi20 encapsulado en liposomas y marcado con el fluorocromo VTS-750 a ratones y visualizándolos mediante una metodología de imagen no invasiva IVIS Spectrum. Con esta metodología combinada con métodos de cultivo de órganos *ex vivo* de los ratones, se demostró que la encapsulación daba lugar a un aumento significativo de fagos encapsulados en el estómago, incluso 6 h después de su administración, sin disminuir su concentración y el porcentaje de encapsulación (50 %). Igualmente, los bacteriófagos encapsulados en liposomas también se

encontraron en el bazo, hígado y músculo ($68 \% \pm 8,6 \%$, $38 \% \pm 6,3 \%$ y $47 \% \pm 7,4 \%$, respectivamente). Por otro lado, la aplicación de microscopía laser de barrido en cultivos *in vitro* de células intestinales humanas (Caco-2/HT29/Raji-B) reveló que los liposomas teñidos con el fluorocromo Vybrant-Dil y conteniendo los bacteriófagos marcados con SYBR *gold* se adhieren a las membranas de dichas células pudiendo permanecer en su interior. En cambio, los bacteriófagos no encapsulados son capaces de translocar la barrera intestinal. Así, la prolongada persistencia de los fagos encapsulados en el estómago y su adherencia a la membrana intestinal podría explicar la mayor eficacia en el tiempo de la terapia fágica oral empleando bacteriófagos encapsulados en liposomas. Finalmente, en el modelo de barrera intestinal, se ha demostrado que los bacteriófagos pueden provocar la inducción de algunas citoquinas antiinflamatorias, asociadas a la respuesta inmune innata.

SUMMARY

SUMMARY

Interest in the therapeutic application of virulent bacteriophages as an alternative to traditional antimicrobials has re-emerged in recent years, due to the increasingly frequent occurrence of antibiotic-resistant bacteria. However, more detailed studies of several aspects associated with phage therapy are needed to allow its definitive implementation. The aim of the research presented in this dissertation was to study i) the emergence of resistance to bacteriophages under different conditions of their application and ii) the biodistribution and transcytosis of liposome-encapsulated bacteriophages after oral administration in a murine model.

The study of bacteriophage resistance made use of the model *Salmonella*/bacteriophage cocktail composed of the phages UAB_Phi20, UAB_Phi78, and UAB_Phi87, previously developed by our group. A first approach led to the identification of the receptors of the three bacteriophages, involving the LPS O-antigen in the case of UAB_Phi20 and the LPS core for UAB_Phi78 and UAB_Phi87. Because the bacteriophage receptor of UAB_Phi78 was located in a more internal region of the core, this phage was selected for preliminary screening of bacteriophage resistance. The results showed that the emergence of resistance differed depending on the scope of the application. Thus, 92 % of the isolates recovered from *in vitro* cultures of *S. Typhimurium* ATCC14028 infected with the bacteriophage cocktail were resistant to phage UAB_Phi78 and to the two other bacteriophages. This form of resistance was probably due to the loss of the RfaJ protein, a glycosyl transferase involved in the synthesis of *Salmonella* LPS. Similarly, 3.2 % of the clones recovered from slices of cooked ham contaminated with *S. Typhimurium* ATCC14028 and treated with the phage cocktail were resistant to bacteriophage UAB_Phi78. Of these, 1.4 % were also resistant to phages UAB_Phi20 and UAB_Phi87. Resistance in these cases was attributed to a mutation in the *rfaJ* gene. Additional resistance to phage UAB_Phi20 due to changes in the *rfaC* gene, encoding the O-antigen polymerase, was identified in only 1.8 % of the clones. Finally, in studies of phage therapy in a broiler chicken model, no resistance to UAB_Phi78 was

Summary

found in isolates from animals contaminated with *S. Typhimurium* ATCC14028 and treated with the phage cocktail. However, 8.5 % of the isolates in the control group were resistant to the three phages comprising the cocktail. While the cause of this resistance could not be determined, both the loss of LPS and immunity mediated by the *Salmonella* CRISPR-Cas system could be ruled out. In addition, a small percentage of isolates (1.3 % of the clones in the animals of the control group and 3.3 % of the isolates in the group treated with the phage cocktail) was resistant to bacteriophage UAB_Phi78, which exerted a bactericidal but not a bacteriolytic effect and did not result in the production of phage progeny, and additionally showed resistance to UAB_Phi87. The cause of this resistance was also unclear but the evidence suggested a mechanism based on an abortive infection. In conclusion, this study showed that both the frequency of the emergence of resistance and the mechanisms involved differ *in vitro*, in food, and *in vivo*. It, therefore, demonstrates the need for a broader approach to resistance studies that not only include *in vitro* studies and the use of cocktails containing bacteriophages that by recognizing different host receptors reduce the development of resistance.

Secondly, biodistribution studies were performed by orally administering to mice the liposome-encapsulated phage UAB_Phi20 labeled with VTS-750 fluorochrome and then visualizing the phages by a non-invasive IVIS Spectrum imaging methodology. Using this method together with *ex vivo* organ cultures of the mice we were able to show that encapsulation resulted in a significant accumulation of encapsulated phages in the mouse stomach, even 6 h after phage administration, without a decrease in their concentration or the encapsulation percentage (50 %). Similarly, liposome-encapsulated phages were found in spleen, liver, and muscle (68 % \pm 8.6 %, 38 % \pm 6.3 % and 47 % \pm 7.4 %, respectively). By contrast, in a scanning laser microscopy study of *in vitro* cultures of human intestinal cells (Caco-2/HT29/Raji-B), liposomes stained with Vybrant-Dil fluorochrome and containing bacteriophages labeled with SYBR gold were seen adhered to the cell membrane or embedded in the membrane. Non-encapsulated bacteriophages, however, were

able to translocate across the intestinal barrier. Taken together, these results could explain the greater efficacy over time of oral phage therapy using liposome-encapsulated bacteriophages. Finally, in the intestinal barrier model, bacteriophages can induced the production of anti-inflammatory cytokines associated with the innate immune response.

ÍNDICE

ÍNDICE

	Página
Resumen	I
Summary	VI
Índice	1
Índice de tablas	7
Índice de figuras	9
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. <i>Salmonella</i> y salmonelosis	15
1.1.1. Características del género <i>Salmonella</i>	15
1.1.2. Patología producida por <i>Salmonella</i>	16
1.1.3. Incidencia de <i>Salmonella</i> no tifoidea en la Unión Europea	19
1.1.3.1. Salmonelosis en humanos en el año 2017	19
1.1.3.2. Detección de <i>Salmonella</i> en alimentos en la UE en el año 2017	22
1.1.3.3. Detección de <i>Salmonella</i> en animales de producción en la UE en el año 2017	23
1.2. Bacteriófagos	25
1.2.1. Características generales	25
1.2.2. Clasificación de los virus de procariotas	26
1.2.3. Los bacteriófagos de <i>Salmonella</i>	29
1.2.4. Ciclo multiplicativo de los bacteriófagos	33
1.3. Aplicaciones de los bacteriófagos en terapia y seguridad alimentaria	40
1.3.1. Biodistribución de los bacteriófagos en terapia fágica	41
1.3.2. Mecanismos de resistencia de los patógenos bacterianos a los bacteriófagos	47
1.3.2.1. Vesículas de membrana externa como mecanismo anti-fago	48
1.3.2.2. Inhibición de la adsorción fágica	48
1.3.2.3. Bloqueo de la inyección del DNA fágico	49
1.3.2.4. Rotura del DNA fágico	50
1.3.2.5. Inhibición de la replicación del DNA fágico	51
1.3.2.6. Interferencias a nivel de ensamblaje	53
1.3.2.7. Infección abortiva	53
1.3.2.8. Otros mecanismos de resistencia	55
1.3.3. Resistencia a bacteriófagos en terapia fágica	55
2. OBJETIVOS	57
3. MATERIAL Y MÉTODOS	61
3.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	63

3.2. Bacteriófagos	63
3.3. Métodos microbiológicos	65
3.3.1. Multiplicación <i>in vitro</i> de bacteriófagos	65
3.3.2. Purificación de los bacteriófagos	65
3.3.3. Titulación	66
3.3.3.1. Test de la gota	66
3.3.3.2. Titulación en doble capa	67
3.3.4. Cinética de infección fágica	67
3.3.5. Eficiencia de plaqueo	68
3.3.6. Determinación de la emergencia de cepas de <i>Salmonella</i> resistentes a bacteriófagos	68
3.3.6.1. Resistencia a bacteriófagos <i>in vitro</i>	68
3.3.6.2. Resistencia a bacteriófagos durante terapia fágica	69
3.3.6.3. Resistencia a bacteriófagos durante el tratamiento de lonchas de jamón contaminadas experimentalmente	70
3.3.6.4. Determinación de la susceptibilidad a los bacteriófagos	71
3.3.6.5. Determinación de la permeabilidad al cristal violeta	72
3.3.6.6. Determinación del perfil del LPS de <i>Salmonella</i>	73
3.4. Encapsulación de bacteriófagos	74
3.4.1. Liposomas	74
3.4.2. Alginato	75
3.4.3. Caracterización y cálculo de la eficiencia de encapsulación	76
3.5. Transcitosis de bacteriófagos en modelo de barrera intestinal	77
3.6. Biodistribución <i>in vivo</i> de bacteriófagos en un modelo murino	79
3.6.1. Tinción del bacteriófago y determinación de la fluorescencia <i>in vitro</i>	79
3.6.2. Determinación de la fluorescencia <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i>	80
3.7. Microscopía	82
3.7.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	82
3.7.2. Microscopía de laser confocal (CLSM)	83
3.8. Técnicas de Biología Molecular	83
3.8.1. Oligonucleótidos utilizados en este estudio	83
3.8.2. Extracción de DNA	87
3.8.3. Electroforesis convencional en geles de agarosa	87
3.8.4. Reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR)	88
3.8.5. Obtención de células competentes	89
3.8.6. Electrotransformación	89
3.8.7. Clonación de fragmentos de DNA en vectores plasmídicos	90

3.8.8.Replicación de los bacteriófagos	91
3.8.9.Identificación de la presencia de las regiones CRISPR de <i>Salmonella</i>	92
3.8.10. Determinación de la expresión de citoquinas tras estimulación de células humanas con bacteriófagos <i>in vitro</i>	93
3.8.11. Secuenciación y análisis de los genomas de <i>Salmonella</i>	95
3.9. Análisis estadísticos	96
4. RESULTS	97
4.1. Resistance to bacteriophages	99
4.1.1.Identification of the cellular receptor of the UAB_Phi20, UAB_Phi78 and UAB_Phi87	99
4.1.2.Emergence of bacterial resistance to bacteriophages	101
4.1.2.1. <i>In vitro</i> emergence of bacterial resistance to bacteriophages	101
4.1.2.2. <i>In vivo</i> emergence of bacterial resistance to bacteriophages	102
4.1.2.3. Emergence of bacterial resistance to bacteriophage in food biocontrol	105
4.1.3.Characterization of the bacterial isolates resistant to bacteriophages	106
4.1.3.1. Permeability to crystal violet	107
4.1.3.2. LPS profile characterization	107
4.1.3.3. CRISPR <i>loci</i> sequence content	111
4.1.3.4. Genome sequencing and analysis	111
4.1.3.5. <i>Trans</i> complementation of the LPS mutants <i>rfc</i> and <i>rfaJ</i>	119
4.1.4.Characterization of the bacterial isolates with resistance to UAB_Phi78 infection obtained from <i>in vivo</i> studies	121
4.1.4.1. Bacteriophage infection kinetics	123
4.1.4.2. Permeability to crystal violet	127
4.1.4.3. LPS profile characterization	127
4.1.4.4. CRISPR <i>loci</i> sequence content	128
4.1.4.5. Bacteriophage DNA replication analysis by semi-quantitative PCR	130
4.1.4.6. Genome sequencing and analysis	130
4.2. Biodistribution of bacteriophages	133
4.2.1. <i>In vivo</i> biodistribution of bacteriophages in murine model	133
4.2.2.Transcytosis of bacteriophages across the <i>in vitro</i> intestinal barrier model	138
4.2.3.Cytokine expression after incubation of phages in epithelium cells	144
5. DISCUSIÓN	147
5.1. Emergencia y caracterización de la resistencia a bacteriófagos	149
5.2. Biodistribución de bacteriófagos	163

Índice

6. CONCLUSIONS	171
7. BIBLIOGRAFÍA	175
8. AGRADECIMIENTOS	195

Índice de tablas

	Página
1.1. Número de casos confirmados de zoonosis en humanos, número de muertes y porcentaje de letalidad en la UE en 2017	20
1.2. Número de casos confirmados y brotes de origen alimentario causados por <i>Salmonella</i> en la UE en el periodo 2013-2017	22
1.3. Incidencia de <i>Salmonella</i> en alimentos en la UE en 2017	22
1.4. Compendio de la clasificación taxonómica de los virus de procariotas	28
1.5. Clasificación taxonómica de los virus líticos de <i>Salmonella</i>	30
2.1. Cepas de <i>S. Typhimurium</i> utilizadas para la caracterización de receptores de los fagos y resistencia a bacteriófagos	64
2.2. Cebadores utilizados en este trabajo	84
3.1. Susceptibility to UAB_Phi78 of the <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 Rif ^R clones recovered from <i>Salmonella</i> control and phage-cocktail infected cultures	102
3.2. Resistance to UAB_Phi78 of <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 Rif ^R isolates belonged to cecum of chicken after phage therapy with the cocktail of phages	103
3.3. Susceptibility to UAB_Phi78 of the <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 Rif ^R clones isolated from cooked ham control and treated groups	105
3.4. Phage-resistant <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 Rif ^R isolates selected for the characterization of the phage resistance	106
3.5. Crystal violet susceptibility of LPS mutants of LT2 strain, isolates resistant to bacteriophages, and isolates with resistance to UAB_Phi78 and UAB_Phi87, but susceptible to UAB_Phi20	110
3.6. Variants identified in the genomes of all the <i>Salmonella</i> strains sequenced with respect to the genome of the NCBI reference strain ATCC14028s (GenBank CP001363.1)	113
3.7. Efficiency of plating of UAB_Phi20 and UAB_Phi78 in the isolates from <i>in vivo</i> experiments with resistance to UAB_Phi78 and UAB_Phi87, but susceptible to UAB_Phi20, compared to wild-type ATCC 14028	122
3.8. Detail of efficiency of plating and plaque morphology of the nine selected <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 Rif ^R isolates with resistance to UAB_Phi78 and UAB_Phi87, but susceptible to UAB_Phi20	123
3.9. Determination of the encapsulation yield (%) of UAB_Phi20 after three independent experiments	133
3.10. Bacteriophage concentrations in <i>ex vivo</i> organs obtained from mice orally administered bacteriophages and the products of phage encapsulation (PPE)	137

Índice de figuras

	Página
1.1. Colonización de las placas de Peyer murinas por <i>S. Typhimurium</i>	19
1.2. Distribución de los casos reportados y confirmados de salmonelosis humanas en la UE (2015-2017) para las serovariedades más frecuentes	21
1.3. Diagrama de Sankey de la distribución de las cinco principales serovariedades de <i>Salmonella</i> responsables de la salmonelosis de humanos en la UE y su asociación con diferentes alimentos y animales de consumo	25
1.4. Morfología de los bacteriófagos	27
1.5. Morfología de los bacteriófagos con cola	29
1.6. Receptores de bacterias Gram positivas y Gram negativas de los bacteriófagos con cola	35
1.7. Ciclos de replicación de los bacteriófagos	36
1.8. Representación esquemática del ciclo lítico y lisogénico de los bacteriófagos	37
1.9. Degradación del peptidoglicano en bacterias Gram negativas por bacteriófagos	38
1.10. Modelo para la disrupción de la membrana externa mediada por la <i>spanin</i> por fusión de membranas	39
1.11. Resumen de las pruebas clínicas en terapia fágica en humanos	42
1.12. Farmacocinética de diferentes estrategias en terapia fágica	43
1.13. Adherencia de los fagos a mucosa	44
1.14. Interacciones del bacteriófago con la capa celular epitelial de mamíferos	46
1.15. Resumen de los mecanismos de resistencia bacteriana a la infección de bacteriófagos	47
1.16. Estrategias utilizadas por las bacterias para bloquear la adsorción fágica	49
1.17. Bloqueo de la entrada de DNA fágico en la célula bacteriana	50
1.18. El sistema CRISPR-Cas	52
1.19. Sistema Rex de <i>E. coli</i> como modelo de un sistema de infección abortiva de dos componentes	54
3.1. Scheme of <i>S. Typhimurium</i> LPS and detail of the infective capacity of bacteriophages UAB_Phi20, UAB_Phi78, and UAB_Phi87 against different LPS mutants of <i>S. Typhimurium</i> LT2	100
3.2. Growth curves of non-infected and UAB_Phi78 infected cultures	104
3.3. Lipopolysaccharide profiles of the LT2 strain mutants representing defects in the LPS	108

3.4. LPS phenotypes of the isolates resistant to bacteriophages obtained from <i>in vivo</i> phage therapy studies, treated cooked ham, and infected <i>in vitro</i> cultures	109
3.5. Circular representation of the chromosomes of six phage-resistant isolates including the wild type and NCBI reference genomes	112
3.6. A scheme that shows the <i>rfc</i> deletion in HT1 isolate (resistant to UAB_Phi78 and UAB_Phi20) produced by the recombining of two direct repeats of 114 bp	116
3.7. Alignment of <i>rfaJ</i> nucleotide and amino-acid sequences of wild type ATCC 14028 Rif ^R and CI1, CI2, CI3, HT3 and HT5 isolates resistant to UAB_Phi20, UAB_Phi78, and UAB_Phi87 with Aliview software	117
3.8. Alignment of <i>rfc</i> nucleotide and amino-acid sequences of wild type ATCC 14028 Rif ^R and HT2 isolates resistant to UAB_Phi20, and UAB_Phi78 with Aliview software	118
3.9. LPS profiles of HT1, HT2, HT4 and CI1, CI2, CI3, HT3 and HT5 isolates transformed with pUA1108:: <i>rfc</i> and pUA1108:: <i>rfaJ</i> , respectively, showing the restoring of LPS profile typical of the wild-type strain	120
3.10. Plaque morphology of UAB_Phi78 and UAB_Phi20 in the isolates for <i>in vivo</i> experiments that showed resistance to UAB_Phi78 and UAB_Phi87, but susceptible to UAB_Phi20	121
3.11. UAB_Phi78 bacteriophage infection kinetic upon infection of isolates from <i>in vivo</i> studies with resistance to UAB_Phi78 and UAB_Phi87, but susceptible to UAB_Phi20	124
3.12. UAB_Phi20 bacteriophage infection kinetic upon infection of isolates from <i>in vivo</i> studies with resistance to UAB_Phi78 and UAB_Phi87, but susceptible to UAB_Phi20	126
3.13. UAB_Phi87 bacteriophage infection kinetic upon infection of isolates from <i>in vivo</i> studies with resistance to UAB_Phi78 and UAB_Phi87, but susceptible to UAB_Phi20	128
3.14. LPS phenotypes of the isolates with resistance to UAB_Phi78 and UAB_Phi87, but susceptible to UAB_Phi20, selected from <i>in vivo</i> studies	129
3.15. Semi-quantitative-PCR detection of UAB_Phi78 DNA replication inside the cells of AC2, AC3, AC5, AT2, and AT4 isolates	131
3.16. Circular representation of the five chromosomes belonged to isolates from <i>in vivo</i> experiments with resistance to UAB_Phi78 and UAB_Phi87, but susceptible to UAB_Phi20, including the wild type and NCBI reference genomes	132

- 3.17. Cryo-TEM image of liposome-encapsulated UAB_Phi20 and 3D confocal images of SYBR gold-labeled UAB_Phi20 encapsulated into fluorescent Dil-labeled liposome 134
- 3.18. *In vivo* fluorescence images of the biodistribution in mice of VTS-750-stained UAB_Phi20: non-encapsulated phages and the products of phage encapsulation (PPE) 135
- 3.19. *Ex vivo* fluorescence of bacteriophages and PPE in the mouse stomach and intestine at 3 h and 6 h post-administration 136
- 3.20. Epithelial cell monolayer TEM images after 48 h of incubation with the non-encapsulated bacteriophage 139
- 3.21. Transcytosis of non-encapsulated phage, PPE, alginate, and alginate/CaCO₃ across an intestinal epithelial monolayer 140
- 3.22. Confocal images of the *x*, *y*, and *z* scans of the *in vitro* Caco-2/HT29/Raji-B lymphocytes co-culture model 142
- 3.23. Three-dimensional images of a cross-section of the intestinal barrier model based on a Caco-2/HT29/Raji-B lymphocytes co-culture treated with bacteriophages and PPE 143
- 3.24. Relative expression of different cytokine mRNAs in human intestinal cell monolayers after 48h of exposure with bacteriophages, LPS and cell purified debris 145

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Salmonella* y salmonelosis

1.1.1. Características del género *Salmonella*

El género *Salmonella* pertenece al *phylum Proteobacteria*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Enterobacteriales* y familia *Enterobacteriaceae*. Este género está formado por bacilos Gram negativos anaerobios facultativos, cuyas células tienen un tamaño de 0,7-1,5 μm a 2,0-5,0 μm . *Salmonella* es una bacteria mesófila, capaz de crecer entre 7 y 48°C y a un pH comprendido entre 4,05 y 9,5. A pesar de ello, las condiciones de crecimiento óptimo se producen a pH neutro (pH 6,5-7,5), a una temperatura de 37°C y con una actividad de agua de 0,995. Las bacterias de este género son quimioorganotróficas, presentando un metabolismo fermentativo y respiratorio. A diferencia de otras bacterias entéricas, *Salmonella* no puede metabolizar la lactosa o la sacarosa, sin embargo, puede hidrolizar metilumbeliferona caprilato (MUCAP) y produce sulfuro de hidrógeno. La mayoría de las especies de *Salmonella* son móviles mediante flagelación peritrica gracias a la presencia de 5-10 flagelos por célula (Ellermeier y Schlauch, 2016).

La taxonomía y nomenclatura de las bacterias que pertenecen al género *Salmonella* ha sido fuente casi continua de debate desde la década de los años 80 del siglo XX. Desde el punto de vista de nomenclatura, según la opinión Judicial 80 de la Comisión Judicial del *The International Committee on Systematics of Prokaryotes*, el género *Salmonella* contiene una única especie: *Salmonella enterica*, en la cual se distinguen las siguientes subespecies, propuestas por Le Minor y Popoff (1987): *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*, *Salmonella enterica* subsp. *bongori*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*, *Salmonella enterica* subsp. *houtenae*, *Salmonella enterica* subsp. *indica*, y *Salmonella enterica* subsp. *salamae*.

En cambio, desde el punto de vista taxonómico, se proponen dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica* (Ellermeier y Schlauch, 2016; Tindall *et al.*, 2005). La especie *S. enterica* se

divide en seis subespecies: *enterica*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica* y *salamae* (Tindall *et al.*, 2005; Grimont y Weill, 2007).

Dentro de cada subespecie existen múltiples serovariedades que se clasifican, según el esquema de Kauffmann-White-Le Minor, en función de la composición de 3 antígenos de superficie: el antígeno somático O (LPS), el antígeno flagelar H y el antígeno capsular Vi (Grimont y Weill, 2007; Ryan *et al.*, 2017). En 2014, se habían descrito 2.659 serovariedades del género *Salmonella*, perteneciendo 2.639 a *S. enterica* y 20 a *S. bongori* (Ryan *et al.*, 2017).

El género *Salmonella* habita en el tracto gastrointestinal de animales, tanto de sangre caliente como fría (Ellermeier y Slauch, 2016). *S. enterica* subsp. *enterica* habita en animales de sangre caliente, mientras el resto de las subespecies de *S. enterica* y *S. bongori* son comensales de animales de sangre fría y raramente infectan humanos. Las serovariedades de *S. enterica* subsp. *enterica* pueden dividirse en: i) aquellas que infectan de forma principal un hospedador determinado pero que pueden causar enfermedad en otros (*host adapted*), ii) aquellas capaces de infectar un único hospedador (*host restricted*), y iii) las serovariedades generalistas que pueden infectar una amplia variedad de hospedadores, aunque el proceso sintomatológico puede diferir en cada caso (Ellermeier y Slauch, 2016). Los miembros de la subespecie *enterica* de la especie *S. enterica* son capaces de infectar aves y mamíferos vinculados a la industria alimentaria y destinados al consumo humano (Humphrey, 2000). Además, debido a la contaminación fecal se puede detectar su presencia en otros hábitats como el agua, los alimentos o el ambiente (Grimont *et al.*, 2000). Así, *Salmonella* es la causante de numerosas infecciones humanas derivadas del consumo de alimentos contaminados (Humphrey, 2000).

1.1.2. Patología producida por *Salmonella*

A diferencia de *Escherichia coli*, todos los miembros de *Salmonella* son considerados patógenos potenciales porque poseen el sistema de secreción tipo III-1 (T3SS_1), codificado en la isla de patogenicidad I de *Salmonella* (SPI1). Además, los miembros de la especie *S. enterica* codifican

el sistema de secreción tipo III-2 (T3SS_2), que ayuda a aumentar la supervivencia de las células en el tejido hospedador (Rivera-Chávez y Bäumler, 2015).

Las diferentes serovariedades de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* se pueden dividir en Salmonelas tifoideas (ST) y no tifoideas (SNT). Las serovariedades tifoideas, Typhi y Paratyphi, son patógenos de humanos, causando la fiebre tifoidea y paratifoidea, respectivamente. La fiebre tifoidea es una enfermedad enterica y sistémica que causa fiebre y dolor abdominal (LaRock *et al.*, 2015). Después de la fase enterica, se produce una bacteriemia grave, infectando la vesícula biliar y otros órganos. Desde el hígado, la bacteria vuelve al intestino a través de la bilis y se elimina por las heces. Los pacientes suelen curarse al cabo de un mes aproximadamente, pero algunos de ellos se convierten en portadores crónicos. La vía de transmisión es sobre todo a través de agua contaminada, por ello su incidencia es elevada en países en desarrollo. La fiebre paratifoidea presenta síntomas similares a los indicados, pero más leves.

El resto de las serovariedades son consideradas no tifoideas. Entre ellas destacan *S. Enteritidis*¹ y *S. Typhimurium* por ser patógenos de un amplio rango de hospedador y responsables de la mayoría de las salmonelosis en humanos, una enfermedad zoonótica que cursa como una gastroenteritis autolimitante, aunque también pueden causar bacteriemia e infecciones sistémicas en hospedadores inmunocomprometidos (LaRock *et al.*, 2015). *S. Enterica* y *S. Typhimurium* también pueden causar enfermedades en otros hospedadores, como, por ejemplo, infecciones en ratones (Wiedemann *et al.*, 2015). Además, ambas serovariedades pueden colonizar el intestino de aves y cerdos de forma asintomática, dando lugar a portadores asintomáticos. Así mismo, ciertas serovariedades también pueden causar patologías en plantas (Wiedemann *et al.*, 2015). Recientemente, se han reportado casos de vegetales y frutas, destinadas al consumo humano, contaminadas con *Salmonella*. Ello indica que la bacteria es capaz de adherirse a la superficie vegetal e infectarla, colonizando la planta, que actúa como hospedadora de *Salmonella* y reservorio

¹ A lo largo del texto se adoptará la nomenclatura *S. Enteritidis* para denominar a la serovariedad *S. enterica* serovar *Enteritidis*. Y lo mismo aplica para otras serovariedades.

potencial de esta bacteria (Wiedemann *et al.*, 2015). *Salmonella* puede entrar en las instalaciones de producción ganadera y agrícola a través de agua contaminada con heces de animales infectados. Típicamente, las serovariedades no tifoideas se adquieren por ingesta oral de alimentos o agua contaminada, por lo que la dosis infectiva debe ser lo suficiente alta para sobrepasar el efecto del pH ácido del estómago (Haraga *et al.*, 2008). Su paso a través del ambiente gástrico estimula la expresión de genes relacionados con la homeostasis del pH (Grimmont *et al.*, 2000). Las bacterias supervivientes deben evadir los compuestos bactericidas presentes en el intestino delgado, tales como las sales biliares, así como las defensas del sistema inmune innato (Grimmont *et al.*, 2000; Haraga *et al.*, 2008). En el intestino, las células de *Salmonella* deben competir con la propia microbiota del epitelio intestinal para poder colonizarlo. *Salmonella* utiliza adhesinas y fimbrias para unirse a las células epiteliales (Grimmont *et al.*, 2000; Haraga *et al.*, 2008). A continuación, las bacterias pueden invadir los enterocitos del epitelio intestinal por endocitosis. Para la invasión de células no fagocíticas, *Salmonella* expresa el sistema de secreción T3SS_1, codificado en la isla SPI1, que permite la translocación de proteínas efectoras al citoplasma de las células hospedadoras (Haraga *et al.*, 2008). Sin embargo, *Salmonella* entra preferentemente a través de las células M del epitelio intestinal, las cuales están especializadas en captar antígenos del lumen intestinal y transportarlos vía pinocitosis hasta las placas de Peyer (Haraga *et al.*, 2008) (Figura 1.1). Las células polimorfonucleares (PMN) también pueden actuar como caballos de Troya, ayudando a *Salmonella* a translocar la barrera intestinal. El T3SS_2, codificado en la isla SPI2, juega un importante rol en el establecimiento de infecciones sistémicas, ya que se expresa cuando la bacteria está en el fagosoma de los macrófagos, permitiendo así su supervivencia (Haraga *et al.*, 2008). Además, *Salmonella* también puede destruir las uniones estrechas que unen las células que conforman el epitelio intestinal. Esta destrucción del epitelio, junto con la respuesta inmune inflamatoria, probablemente contribuye a la inducción de diarrea en las infecciones por *Salmonella* (Haraga *et al.*, 2008).

Las serovariedades tifoideas, en cambio, son capaces de reducir la respuesta inflamatoria del intestino gracias a su polisacárido capsular y a su capacidad de producir cadenas largas de antígeno O. Esta disminución de la respuesta aguda permite la diseminación de los patógenos al torrente sanguíneo, alcanzando órganos internos y causando una infección sistémica grave.

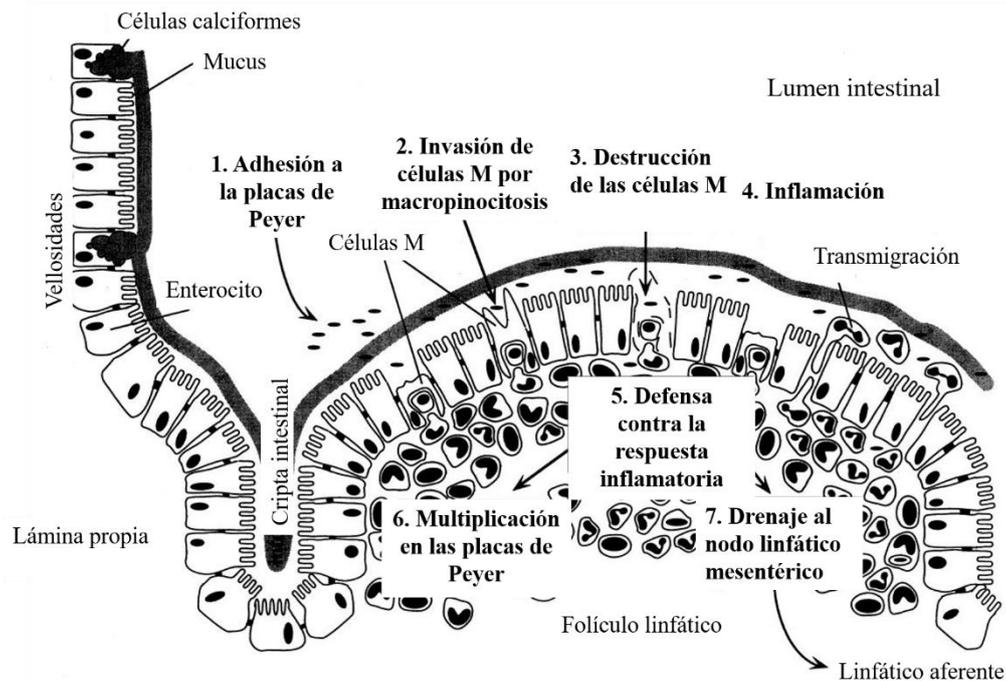


Figura 1.1. Colonización de las placas de Peyer murinas por *S. Typhimurium*. Corte transversal de la pared intestinal en el área de una placa de Peyer, mostrando un folículo linfático (centro) y parte de una vellosidad intestinal (izquierda). Las etapas consecutivas de la colonización de las placas de Peyer se describen en los recuadros 1-6 (según Bäumlner *et al.*, 2000).

1.1.3. Incidencia de *Salmonella* no tifoidea en la Unión Europea

1.1.3.1. Salmonelosis en humanos en el año 2017

En el último informe publicado por la European Food Safety Agency (EFSA) en 2018 sobre las tendencias y las fuentes de zoonosis, agentes zoonóticos y brotes transmitidos por alimentos en 2017 (EFSA, 2018), a partir de los datos obtenidos de 37 países europeos [28 estados miembros y 9 no miembros de la Unión Europea (EU)], se confirma el descenso de los casos de salmonelosis humana durante el periodo 2008-2017 en los 25 estados miembros. No obstante, durante los

últimos 5 años (2013–2017), la tendencia general no ha mostrado ningún aumento o disminución estadísticamente significativo. Siete de los estados miembros informaron sobre una tendencia creciente y cuatro sobre una decreciente durante el este período. En total, se reportaron 91.662 casos de salmonelosis en humanos, con 156 muertes registradas y una tasa de mortalidad del 0,25 % (Tabla 1.1). Las cinco principales serovariedades más comúnmente informadas durante 2017 fueron en orden decreciente: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* monofásica, *S. Typhimurium*, *S. Infantis* y *S. Newport*.

Tabla 1.1. Número de casos confirmados de zoonosis en humanos, número de muertes y porcentaje de letalidad en la UE en 2017 (EFSA, 2018).

Enfermedad	No. de casos confirmados	No. de muertes registradas	Letalidad (%)
Campilobacteriosis	246.158	45	0,04
Salmonelosis	91.662	156	0,25
Yersiniosis	6.823	3	0,07
Infecciones STEC ^a	6.073	20	0,50
Listeriosis	2.480	225	13,80
Fiebre Q	928	7	1,35
Tularemia	321	1	0,60
Equinococosis	827	1	0,40
Brucelosis	378	1	0,78
Fiebre del Nilo Occidental ^b	212	25	12,00
Triquinosis	168	0	0,0
Rabia	1	NA	NA

^a, Infecciones causadas por *Escherichia coli* productora de toxina Shiga.

^b, Se incluyen el número total de casos.

NA, No aplica

La proporción de enfermedades por salmonelosis debidas a *S. Enteritidis* continuó aumentando en 2017, teniendo en cuenta todos los casos o tan sólo los informados por estados miembros de la UE. Ello se debe, principalmente, a que un estado miembro comenzó a informar sobre casos debidos a esta serovariedad. No obstante, cuando se excluyeron los datos de este estado, la

proporción continuó siendo la misma que en 2016. Juntas, las serovariedades *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* (incluidas las variantes monofásicas) representaron casi el 80 % de los casos reportados, siendo *S. Infantis*, la cuarta serovariedad más frecuentemente reportada en casos domésticos y asociados a desplazamientos (Figura 1.2).

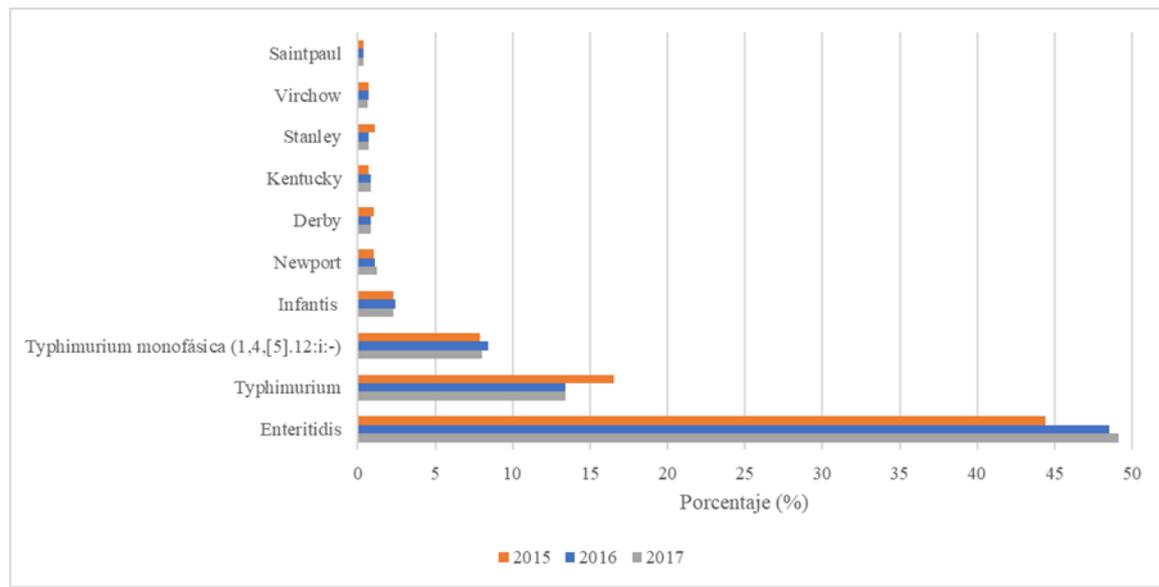


Figura 1.2. Distribución de los casos reportados y confirmados de salmonelosis humanas en la UE (2015-2017) para las serovariedades más frecuentes (EFSA, 2018).

El número de brotes de *Salmonella* de origen alimentario fue de 1.241, afectando a 9.600 personas, lo que representa un descenso respecto al año 2016 (Tabla 1.2).

Los casos confirmados de salmonelosis muestran una tendencia estacional en la UE, y también en Estados Unidos (EE. UU.), aumentando su número en los meses de verano. Sin embargo, la tendencia de los últimos 5 años no indica un aumento o disminución del número de casos en el conjunto de los países de la UE. Cabe destacar no obstante que en 7 países (Grecia, Eslovaquia, España, Estonia, Polonia, Portugal, y el Reino Unido) se detectó un aumento significativo en el periodo 2013-2017 al compararlo con los datos de 4 países (Francia, España, Portugal y República Checa) durante 2008-2017.

Tabla 1.2. Número de casos confirmados y brotes de origen alimentario causados por *Salmonella* en la UE en el periodo 2013-2017 (EFSA, 2018).

	2017	2016	2015	2014	2013
No. total de casos confirmados	91.662	94.530	94.597	92.012	87.753
No. total de brotes de origen alimentario	1.241	1.067	953	1.049	1.168
Estados que reportaron casos	28	28	28	28	28

1.1.3.2. Detección de *Salmonella* en alimentos en la UE en el año 2017

La mayor incidencia de incumplimiento de los criterios de *Salmonella* en alimentos en la UE se encontró en muestras de carne fresca, tanto en el año 2017 como en los anteriores (Tabla 1.3). Durante el año 2017, *Salmonella* se aisló más frecuentemente en carne de pollo (4,85 % de muestras positivas) y de pavo (4,18 %), dando lugar a un posible riesgo de infección para los consumidores por contaminaciones cruzadas con otros alimentos o por el consumo de carne inapropiadamente cocinada. Sin embargo, en productos cárnicos de pollo listos para su consumo directo (*RTE*, del inglés *ready to eat*), los cuales representan un riesgo mayor y directo para los consumidores porque no se cocinan antes de ser consumidos, la prevalencia fue mucho menor. Por otra parte, *Salmonella* se encontró de forma excepcional en huevos para consumo, productos de origen vegetal o brotes.

Tabla 1.3. Incidencia de *Salmonella* en alimentos en la UE en 2017.

	No. de estados de la UE que reportaron casos	No. de muestras analizadas	Porcentaje de muestras positivas (%)
Carne fresca de pollos	26	36.079	4,85
RTE de pollo	14	4.215	0,14
Carne fresca de pavo	18	3.999	4,18
RTE de pavo	12	453	0
Carne fresca de pollo que no sea de pollo de engorde	16	27.863	2,66
Carne fresca de cerdo	27	163.765	1,58
RTE de cerdo	20	11.087	0,50
Carne fresca de ternera	22	35.490	0,17
RTE de ternera	16	1.129	0,18

RTE, del inglés *ready to eat*.

1.1.3.3. Detección de *Salmonella* en animales de producción en la UE en el año 2017

El número de bandadas muestreadas de *Gallus gallus* y de pavos ha ido aumentando progresivamente en la UE durante el periodo 2013–2017 y, además, el número de estados miembros que presentaron informes al respecto fue mayor. Se encontró *Salmonella* en el 1,89 % de las bandadas (n=297 bandadas), lo cual significa un cierto aumento respecto a los datos de 2016 (1,47 %). La prevalencia fue positiva para cualquiera de las cinco serovariedades diana (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* (incluidas las variantes monofásicas), *S. Virchow*, *S. Infantis* y *S. Hadar*) con un valor del 0,57 % (n=90 bandadas), muy similar al obtenido en 2016 (0,54 %). La serovariedad reportada con mayor frecuencia fue *S. Enteritidis* (0,24 %), lo cual significa una cierta disminución respecto a 2016. Las siguientes serovariedades más reportadas fueron *S. Typhimurium* (incluidas las variantes monofásicas) (0,20 %) y *S. Infantis* (0,12 %). Se observó un aumento en el número de bandadas positivas para *S. Infantis* (9 positivas notificadas en 2015 y 2016 y 19 en 2017) y *S. Typhimurium*, (12 positivas en 2015, 24 en 2016 y 32 en 2017). Solo dos bandadas fueron positivas para *S. Virchow* y no hubo bandadas positivas para *S. Hadar*.

Catorce estados miembros y dos no miembros informaron sobre *Salmonella* en pavos reproductores. Se encontró esta bacteria en el 2,63 % de las bandadas analizadas, lo que significa un aumento respecto a 2016 (1,1 %). La prevalencia de bandadas positivas a cualquiera de las dos serovariedades diana fue del 0,50 %, en comparación con el 0,24 % de 2016. *S. Enteritidis* se aisló de una sola bandada en Alemania y *S. Typhimurium* en nueve bandadas en Alemania, Italia y España. El resto de los estados miembros informaron que no habían detectada ninguna bandada positiva para las serovariedades relevantes. Para los pavos de engorde, un total de 23 estados miembros y tres no miembros proporcionaron datos. *Salmonella* fue encontrada en el 5,95 % de las bandadas, en comparación con el 4,87 % en 2016. Las bandadas con prevalencia positiva para cualquiera de las dos serovariedades de *Salmonella* fue de 0,28 %, valor inferior al detectado en

2016 (0,36 %). Doce estados miembros y dos no miembros no reportaron ninguna bandada positiva para las serovariedades diana.

El número de rebaños de ganado porcino y vacuno muestreado e informado a EFSA ha disminuido en los dos últimos años. En 2017, dieciséis estados miembros y dos no miembros informaron datos sobre la prevalencia de *Salmonella* en cerdos. El 12,7 % de las 90.921 unidades muestreadas fueron positivas para *Salmonella*. Entre estas, aproximadamente el 80 % (n = 71.860) se muestrearon en el matadero y el 14,2 % fueron positivas. Con respecto al ganado vacuno, según los datos informados por 15 estados miembros y 3 no miembros, la prevalencia general de *Salmonella* fue del 0,20 % con 654.206 unidades muestreadas.

En la Figura 1.3. se ilustra como las cinco principales serovariedades responsables de la salmonelosis en humanos en la UE están asociadas con las especies animales más importantes en producción animal en 2017. *S. Enteritidis* se asoció por primera vez con pollos de engorde (el 57,2 % de los aislamientos de *S. Enteritidis* fueron de bandadas de pollos de engorde y de carnes de estos animales), y en segundo lugar con ponedoras (37,1 %). Un número marginal de aislamientos de *S. Enteritidis* se obtuvo de pavos (3,9 %). *S. Typhimurium* se asoció con todas las matrices, siendo de mayor a menor: 47,1 % de pollos de engorde, 28,3 % de cerdos, 11,1 % de pavos, 10,7 % de ponedoras y 2,8 % de ganado vacuno. Las serovariedades monofásicas de *S. Typhimurium* se asociaron principalmente con ganado porcino (49,7 %) y pollos de engorde (35,3 %). *S. Infantis* se relacionó con pollos de engorde (94,6 %) y *S. Newport* con pavo (65,5 %) y pollos de engorde (30,5 %).

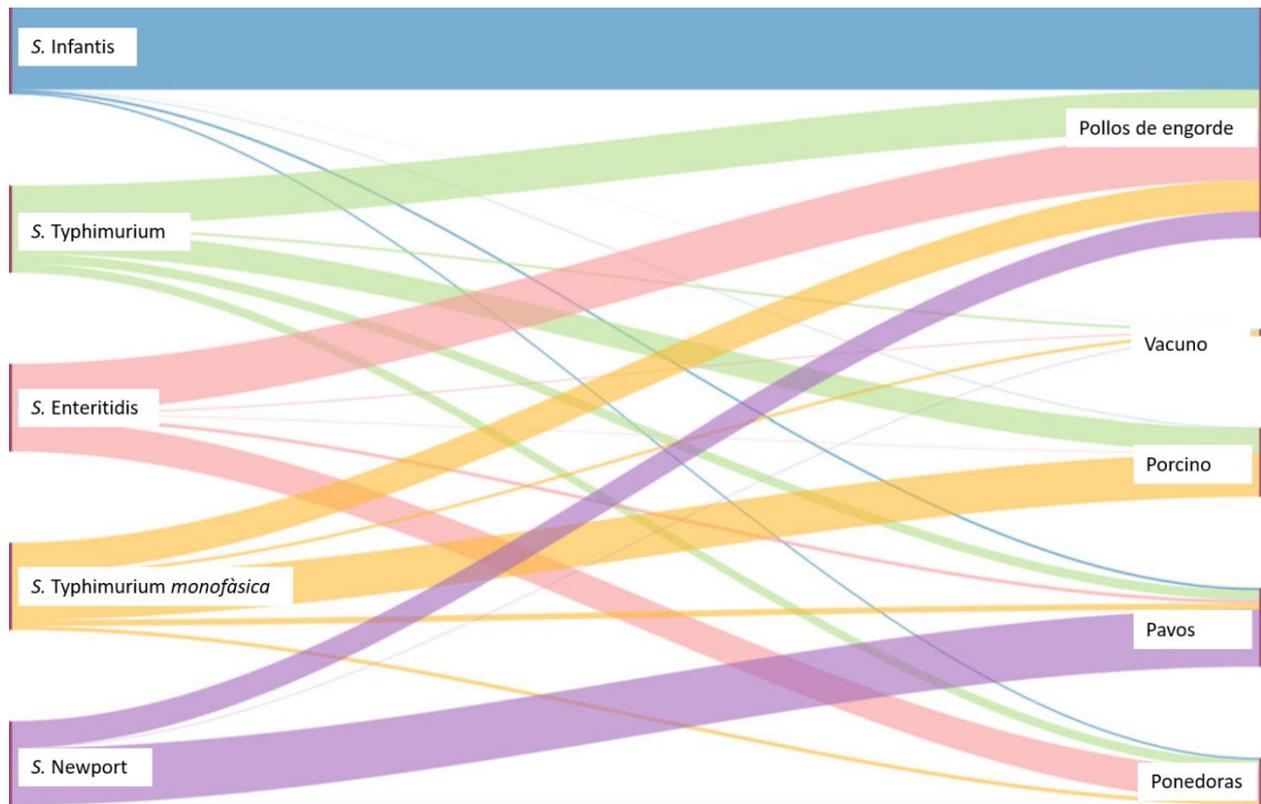


Figura 1.3. Diagrama de Sankey de la distribución de las cinco principales serovariedades de *Salmonella* responsables de la salmonelosis de humanos en la UE y su asociación con diferentes alimentos y animales de consumo. A la izquierda del diagrama se muestran las cinco serovariedades de *Salmonella* más comunes reportadas en casos de salmonelosis humana en la UE: *S. Infantis* (azul), *S. Typhimurium* (verde), *S. Enteritidis* (rosa), *S. Typhimurium monofásica* (amarillo) y *S. Newport* (violeta). Los datos de animales y alimentos de la misma fuente se fusionaron: 'pollos de engorde' incluye aislados de bandadas de pollos de engorde y carne de pollos de engorde, 'ganado vacuno' incluye aislados de ganado vacuno y carne de ganado vacuno, 'cerdos' incluye aislados de cerdos de engorde y carne de cerdo, 'pavo' incluye aislados de bandadas de pavos de engorde y carne de pavo y, "ponedoras" incluyen bandadas de gallinas ponedoras y huevos. A la derecha del diagrama se muestran las cinco fuentes consideradas (pollos de engorde, ganado, cerdo, pavo y ponedoras). El ancho de las bandas coloreadas que unen las fuentes y las serovariedades es proporcional al porcentaje de aislamientos de cada serovariedad de cada fuente (EFSA, 2018).

1.2. Bacteriófagos

1.2.1. Características generales

Los bacteriófagos, también denominados fagos, son virus que infectan exclusivamente a bacterias que fueron descubiertos en 1915 por el británico Frederick William Twort, e independientemente

en 1917 por el francocanadiense Félix d'Hérelle. Sin embargo, fue d'Hérelle quien dedicó toda su vida a la investigación de estos virus, siendo el primero en acuñar el término “bacteriófago”, así como el primero en explorar su potencial como agentes antibacterianos (Ackermann, 2011).

Los bacteriófagos son considerados la “forma de vida” más diversa y abundante del planeta (Ackermann, 2011) y se estima que puede haber del orden de 10^{31} virus de bacterias (Sharma *et al.*, 2017). Los fagos existen en todos los ecosistemas, desde chimeneas termales de las profundidades acuáticas hasta los glaciares polares, siendo especialmente abundantes en los océanos (Sharma *et al.*, 2017).

Los bacteriófagos presentan una elevada especificidad de hospedador, restringida en muchos casos a miembros de una misma especie (Sharma *et al.*, 2017). Cada partícula fágica, o virión, consta de un genoma (ssDNA, dsDNA, dsRNA o ssRNA) encapsulado dentro de una estructura proteica o lipoproteica denominada cápside (Ackermann, 2011). La mayoría de ellos tienen una cola proteica añadida a la cápside. Dicha cola es la responsable de reconocer, de forma específica, a los receptores que se encuentran en la superficie de las células bacterianas y de penetrar, a través de su envuelta celular, para inyectar el genoma fágico en el citoplasma de la bacteria (Nobrega *et al.*, 2018).

1.2.2. Clasificación de los virus de procariotas

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, *International Committee on Taxonomy of Viruses*) clasifica a los virus de procariotas en atención a su rango de hospedador, características físicas (estructura, tamaño de la cápside y forma), tipo de material genómico (DNA o RNA de cadena simple o doble), tamaño del genoma, y resistencia a solventes orgánicos (Sharma *et al.*, 2017).

Las partículas virales pueden ser viriones con cola, poliédricos, filamentosos o pleomórficos (Ackermann, 2011) (Figura 1.4). Se estima que los virus con cola representan el 96 % del total de virus y todos ellos se agrupan en el orden *Caudovirales* que se caracteriza por agrupar a virus de

dsDNA con cola y cápside icosaédrica. Los de morfología poliédrica o filamentosa y pleomórficos se clasifican en 8 familias (Tabla 1.4) a las que no se les ha asignado un orden. Se trata de 5 familias formadas por virus polimórficos y 3 familias de virus pleomórficos, filamentosos o de cápside icosaédrica sin cola.

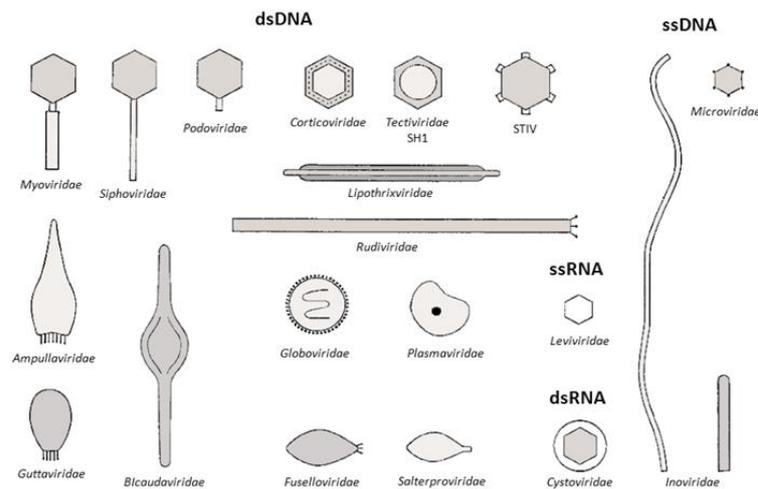


Figura 1.4. Morfología de los bacteriófagos (según Ackermann, 2007).

El orden *Caudovirales* está integrado por 3 familias y 18 géneros. Dichas familias son: i) *Podoviridae*, con cola corta; ii) *Siphoviridae*, con cola larga no contráctil; y iii) *Myoviridae*, con cola larga contráctil (Figura 1.5 y Tabla 1.4). Al final de la cola, los virus de cola larga tienen una placa basal a la cual se unen las proteínas de unión al receptor, así como las fibras de la cola y las espículas. En cambio, los miembros de la familia *Podoviridae*, carecen de esta placa base, por lo que tanto las proteínas de unión a los receptores como las fibras y espículas se unen directamente a la cola (Figura 1.5). (Nobrega *et al.*, 2018). Finalmente, y respecto al orden *Caudovirales*, cabe destacar que se han propuesto dos nuevas familias, *Ackermannviridae* y *Herelleviridae*, en los años 2017 y 2018, respectivamente (Tabla 1.4).

Tabla 1.4. Compendio de la clasificación taxonómica de los virus de procariotas^a

Orden	Familia	Morfología	Ácido nucleico	Particularidades	Ejemplo
	<i>Myoviridae</i>	Cápside icosaédrica con cola larga contráctil	dsDNA lineal		T4
	<i>Siphoviridae</i>	Cápside icosaédrica con cola larga no contráctil	daDNA lineal		λ
<i>Caudovirales</i>	<i>Podoviridae</i>	Cápside icosaédrica con cola corta	dsDNA lineal		T7
	<i>Ackermannviridae</i> ^b	Cápside icosaédrica con cola larga contráctil	dsDNA lineal		AG3
	<i>Herelleviridae</i> ^b	Cápside icosaédrica con cola larga contráctil	dsDNA lineal		Agate
	<i>Microviridae</i>	Poliédrico	ssDNA	Capsómeros visibles	ΦX174
	<i>Corticoviridae</i>	Poliédrico	dsDNA circular	Lípidos en la cápside	PM2
	<i>Tectiviridae</i>	Poliédrico	dsDNA	Vesícula lipídica interna. Pseudocola	PRD1
<i>No asignado</i>	<i>Leviviridae</i>	Poliédrico	ssRNA	Poliovirus-like	MS2
	<i>Cystoviridae</i>	Poliédrico	dsRNA	Envuelta lipídica	Φ6
	<i>Inoviridae</i>	Filamentoso	dsDNA		M13
	<i>Plasmaviridae</i>	Pleomórfico	dsDNA	Envuelta lipídica	MM_2
	<i>Sphaeloviridae</i>	Cápside icosaédrica sin cola	dsDNA		SH1

^a, Según Sharma *et al.*, 2017; ICTV (<https://talk.ictvonline.org/>).

^b, Familias propuestas al subcomité de bacteriófagos y arqueofagos del ICTV en 2017 y 2018.

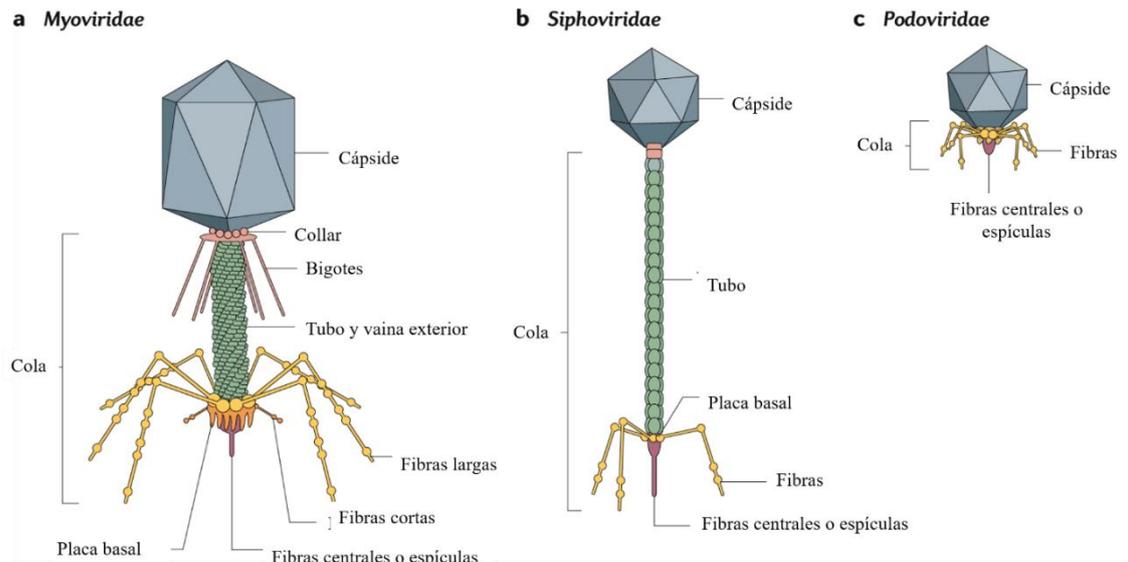


Figura 1.5. Morfología de los bacteriófagos con cola. (según Nobrega *et al.*, 2018).

1.2.3. Los bacteriófagos de *Salmonella*

Los bacteriófagos que infectan a *Salmonella* tienen una especial importancia por sus aplicaciones en el campo de la biología molecular, pero, sobre todo, por su utilización como agentes terapéuticos (Moreno Switt *et al.*, 2015). Todos ellos pertenecen al orden *Caudovirales* y recientemente se ha publicado una clasificación taxonómica sobre los bacteriófagos líticos descritos hasta 2015 que infectan a esta bacteria (Tabla 1.5). A este respecto, cabe indicar que los diferentes bacteriófagos que se muestran en dicha tabla no infectan a todos los aislados de *Salmonella*, dada la elevada diversidad de serovariedades que tiene este género bacteriano. No obstante, en su gran mayoría, infectan a las serovariedades Typhimurium y Enteritidis por ser las más estudiadas. También debe resaltarse que el número de bacteriófagos descritos que infectan a serovariedades de *Salmonella* está incrementando rápidamente, dado el auge de la investigación para desarrollar productos fágicos capaces de controlar a estas bacterias, ya sea en terapia fágica o en seguridad alimentaria.

Tabla 1.5. Clasificación taxonómica de los virus líticos de *Salmonella*^a.

Familia	Género	Ejemplo	Particularidades
	<i>Viunallikevirus</i>	Vi01	Sintenia génica, genomas de aproximadamente 157 kb, 44,5% G+C, reorganización de las espículas de la cola, cápside icosaédrica de 90 nm y cola contráctil de 110 ± 18 nm. Estos virus se caracterizan por tener hasta 6 espículas, lo que les confiere un amplio rango de hospedadores.
	<i>Felixounallikevirus</i> ^b	FelixO1	Genomas de aproximadamente 86 kb, 39% G+C, cápside icosaédrica de 73 nm y cola contráctil de 113 ± 17 nm con 6 fibras de la cola, normalmente plegada sobre esta. Su receptor es la N-acetilglucosamina del LPS.
<i>Myoviridae</i>	<i>V5likevirus</i>	PVP-SE1	Genomas de 136-148 kb, 37,4-46,3% G+C, cápside icosaédrica de 85 nm y cola contráctil de 120 ± 18 nm con 4 fibras de la cola cortas. Su receptor se encuentra en la región interna de la región central del LPS.
	<i>T4likevirus</i>	vB_SenM-S16	Genomas de 160 kb, 36,9% G+C, cápside icosaédrica de 117 x 91 nm y cola contráctil de 120 nm que termina en fibras de la cola largas.
	No clasificado	SPN3US	Genoma de 240 kb, 48,5% G+C. Su receptor es el flagelo de <i>Salmonella</i> .
	<i>T5likevirus</i>	EPS7	Genomas de 108-118 kb con repeticiones directas de 10 kb en cada extremo, 39% G+C, cápside icosaédrica de 70 nm y cola no contráctil de 185 nm. Los fagos de este género se unen irreversiblemente al LPS e irreversiblemente a diferentes proteínas de la membrana exterior.
<i>Siphoviridae</i>	<i>Jerseylikevirus</i>	STEP13	Genomas circulares con permutación cíclica redundante de 42 kb, 49% G+C, cápside icosaédrica de 63-34 nm y cola no contráctil de 120 nm.
	<i>Sp03unallikevirus</i>	FSL SP-031	Genomas de 44 kb, 51% G+C. Rango de hospedador muy reducido.

Tabla 1.5. Continuación

Familia	Género	Ejemplo	Particularidades
	<i>Chilikevirus</i>	X (Chi)	Genomas de 59 kb con terminaciones cohesivas, 57% G+C. Cápside icosaédrica de 60-68 nm y cola no contráctil de 220 nm. Su receptor es el flagelo de <i>Salmonella</i> .
	<i>JK06likevirus</i>	ΦKP26	Genomas con permutación cíclica redundante de 50,7 kb, 46 % G+C, cápside icosaédrica de 60 nm y cola no contráctil de 200 terminada en 4 fibras cortas. A nivel de proteoma es muy parecido al virus T1 de <i>E. coli</i>
<i>Siphoviridae</i>	<i>Sp062likevirus</i>	FSL SP-126	Genomas de 56 kb, 42,8 % G+C
	No clasificado	VIII-E1	Genomas de 45 kb, 47% G+C. Cápside icosaédrica de 55 nm y cola no contráctil de 205 nm. Su receptor es el antígeno de la cápsula de <i>Salmonella</i> Typhi.
	No clasificado	SPN3V	Este fago contiene una integrasa, lo cual sugiere que hace ciclo lisogénico.
	<i>SP6likevirus</i> ^c	SP6	Pertenece a la superfamilia <i>Autographivirinae</i> . Genomas de 43,8 kb con terminaciones directas repetidas de 174 pb, 47,2 %.
	<i>T7likevirus</i>	Vi06	Pertenece a la superfamilia <i>Autographivirinae</i> , conocida también como la superfamilia T7. Los fagos pertenecientes a esta superfamilia se caracterizan por poseer genomas con redundancias terminales de 37-50 kb, y codifican una RNA polimerasa de una sola subunidad.
<i>Podoviridae</i>	<i>Phieco32likevirus</i>	ΦSPB	Genomas de 89,9 kb, 44,1 %. Cápside de 154 x 40 nm y cola de 12 x 9 nm.
	<i>N4likevirus</i>	FSL SP-076	Genomas de 72 kb, 39,5 %.
	No clasificado	SPN1S	Este fago contiene una integrasa, lo cual sugiere que hace ciclo lisogénico.

^a, Según Moreno Switt *et al.* (2015).^b El bacteriófago UAB_Phi87 pertenece a este género.^c El bacteriófago UAB_Phi78 pertenece a este género.

En el marco de la línea de investigación “Aplicaciones biotecnológicas de los bacteriófagos”, nuestro grupo de investigación seleccionó tres bacteriófagos líticos, UAB_Phi20, UAB_Phi78 y UAB_Phi87, que infectan a diferentes serovariedades de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, entre las que se incluyen Typhimurium y Enteritidis. Dichos fagos fueron seleccionados de una amplia colección de bacteriófagos aislados de cerdos y de aves (Cortés *et al.*, 2015) por su amplio espectro de infección frente a una colección de cepas de estas dos serovariedades no relacionadas clonamente. Posteriormente, se estudiaron sus características y su genoma fue secuenciado (Bardina *et al.*, 2016). Los tres fagos, en forma de cóctel, fueron utilizados en pruebas de concepto de terapia fágica oral, en un modelo experimental de pollo de engorde contaminado experimentalmente con *S. Typhimurium* (Bardina *et al.*, 2012), y también para disminuir/eliminar la carga de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* en distintos tipos de alimentos (Spricigo *et al.*, 2013). El bacteriófago UAB_Phi20 tiene una cabeza icosaédrica ($60 \pm 1,5$ nm) y una cola corta no contráctil ($13 \pm 0,7$ nm). Su genoma consiste en dsDNA lineal de 41.809 pares de pares de bases (pb) de longitud y un contenido en G + C del 47,2 %, lo cual es ligeramente inferior al de su hospedador (52,2 %). La anotación genómica y el análisis de la organización genética del fago UAB_Phi20 mostraron una alta homología con la del bacteriófago P22 de *Salmonella*. La comparación de su genoma con los genomas de los fagos P22, ST64T y ST104 a nivel de proteínas reveló que compartía el 72 % de sus proteínas con P22 y el 63–65 % con las de ST64T y ST104. El conjunto de los resultados obtenidos permitió clasificar al bacteriófago UAB_Phi20 en el género *P22likevirus* (Bardina *et al.*, 2016). A diferencia de P22 y a pesar de su elevada homología, el bacteriófago UAB_Phi20 es lítico, lo cual se debe a diferentes mutaciones identificadas en genes clave de lisogenia.

El bacteriófago UAB_Phi78 tiene la misma morfología que el fago UAB_Phi20, presentando una cabeza icosaédrica de $66 \pm 1,7$ nm y una cola de $14 \pm 0,7$ nm. Su genoma es una molécula de dsDNA lineal de 44.110 pb, incluyendo repeticiones terminales directas (DTR, *direct terminal*

repeats) de 179 pb. Su contenido en G + C (47,41 %) es ligeramente inferior al de *Salmonella* (52,2 %). Los bacteriófagos UAB_Phi78 y SP6 tienen aproximadamente el 83% de proteínas en común. Por lo tanto, UAB_Phi78 pertenece al género *Sp6likevirus* de la familia *Podoviridae* (Bardina *et al.*, 2016) que incluye más del 35 % de los bacteriófagos de *Salmonella* (Abedon *et al.*, 2011).

Finalmente, el tercer bacteriófago del cóctel, el fago UAB_Phi87, tiene también una cabeza icosaédrica ($68 \pm 2,7$ nm), pero una larga cola contráctil ($114 \pm 4,3$ nm). Su genoma consta de 87,669 pb, con DTR de 608 pb y un porcentaje de G + C del 38,9 %, claramente inferior al de *Salmonella* (52,2 %). Sus proteínas fueron similares en casi un 90 % con las de los bacteriófagos FelixO1 y wV8. Esto permitió clasificar al fago UAB_Phi87 en el género *Felixounalikevirus* de la familia *Myoviridae* (Bardina *et al.*, 2016).

1.2.4. Ciclo multiplicativo de los bacteriófagos

Los bacteriófagos son parásitos obligados de procariotas debido a que necesitan de la maquinaria de biosíntesis de la célula hospedadora para llevar a cabo su ciclo infectivo y producir una nueva progenie.

El ciclo del virus consta de 6 fases: i) adsorción a la superficie celular, ii) inyección del genoma fágico, iii) replicación del genoma bacteriano iv) transcripción y traducción v) ensamblaje de las nuevas partículas víricas, y vi) lisis celular y liberación de los nuevos viriones.

El ciclo del virus comienza con la adsorción del bacteriófago a la superficie celular y la inyección de su DNA en el citoplasma celular. Los bacteriófagos son capaces de reconocer receptores específicos en la superficie celular (RBP, *receptor binding sites*). Estos receptores varían en función de si la célula hospedadora es Gram negativa o Gram positiva. Las bacterias Gram

negativas tienen una membrana externa (OM, *outer membrane*) con lipopolisacáridos (LPS) y está embebida por proteínas encargadas del transporte y difusión de nutrientes (OMP, *outer membrane proteins*). En cambio, las bacterias Gram positivas, carecen de membrana externa, pero tienen un mayor contenido de peptidoglicano y contienen ácidos teicoicos. Además, las bacterias pueden disponer de estructuras implicadas en el movimiento como los flagelos y fimbrias. Todas estas estructuras pueden ser reconocidas por los bacteriófagos y actuar como receptores de unión (Figura 1.6).

La cola de los bacteriófagos y sus espículas son las encargadas de reconocer los receptores de unión en la superficie celular, atravesar la envuelta lipídica e inyectar el material genético en el citoplasma. Esta especificidad a la hora de reconocer un receptor u otro es la responsable del rango de hospedador característico de cada bacteriófago. En el proceso de adsorción al receptor celular, las fibras de la cola y las espículas son las encargadas del primer reconocimiento de la célula mediante la unión reversible al receptor. Posteriormente, las proteínas de la base de la cola, mediante cambios estructurales, se unen de forma irreversible al receptor (Rakhuba *et al.*, 2010). Tras la unión al receptor, se produce la siguiente fase del ciclo, la inyección del DNA fágico. En los bacteriófagos de cola contráctil, tras la unión reversible de las fibras largas, se transmite una señal a la placa base, la cual cambia de conformación para permitir la reorientación del fago y la unión irreversible de las fibras cortas. Después de esta unión, se contrae la vaina exterior que recubre el tubo de la cola. Este fenómeno se produce de forma rápida, provocando así el empuje del tubo a través de la membrana exterior, inyectando el DNA en la célula (Nobrega *et al.*, 2018). En cambio, los bacteriófagos de cola corta inyectan su material genético después de la degradación enzimática de la membrana celular producida por las propias fibras de la cola (Rakhuba *et al.*, 2010).

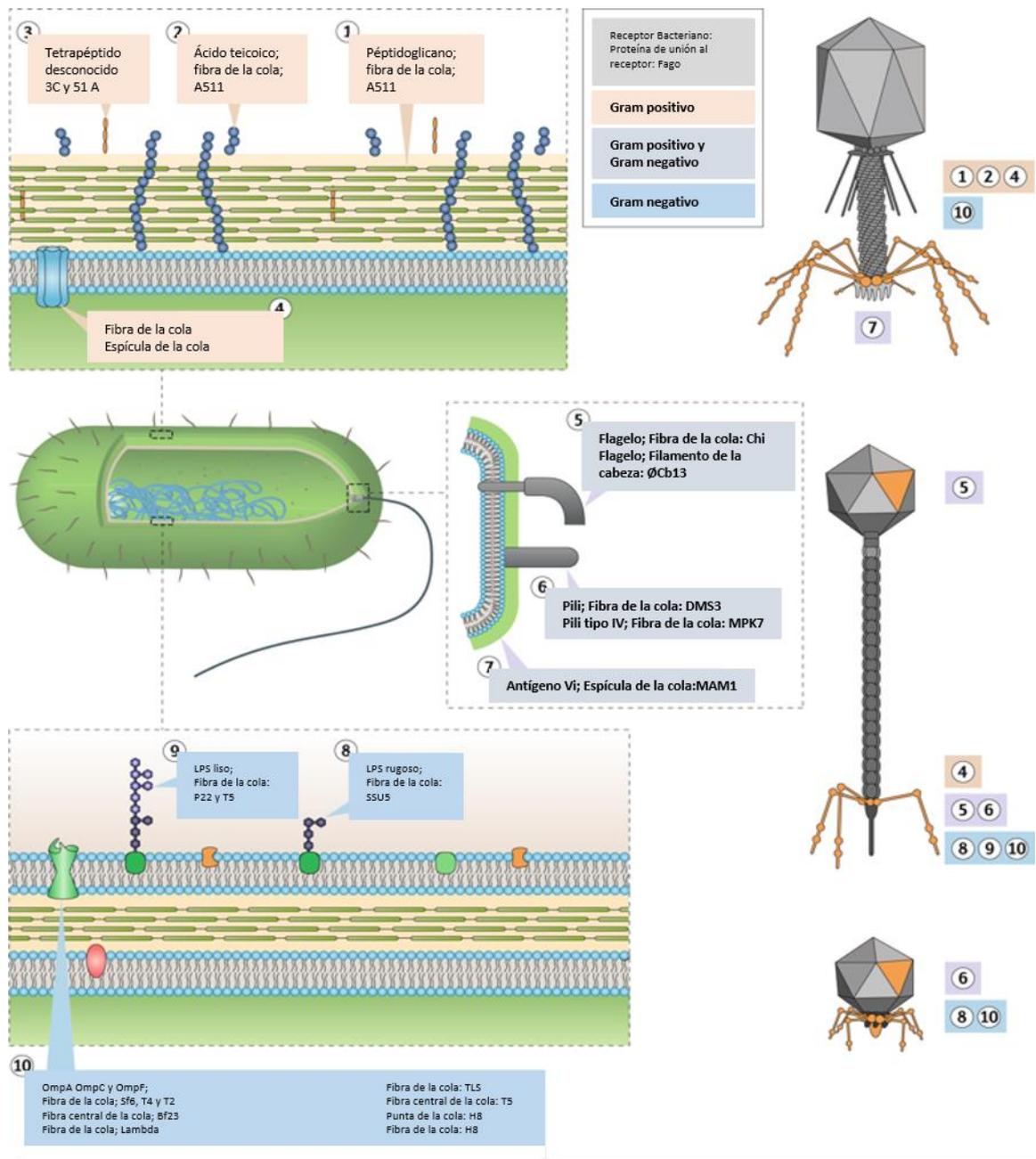


Figura 1.6. Receptores de bacterias Gram positivas y Gram negativas de los bacteriófagos con cola (según Nobrega *et al.*, 2018).

Después de la inyección del DNA fágico, el bacteriófago puede replicarse mediante 4 ciclos diferentes: i) lítico, ii) lisogénico, iii) crónico, o iv) pseudolisogénico (Figura 1.7) (Khan Mirzaei y Maurice, 2017).

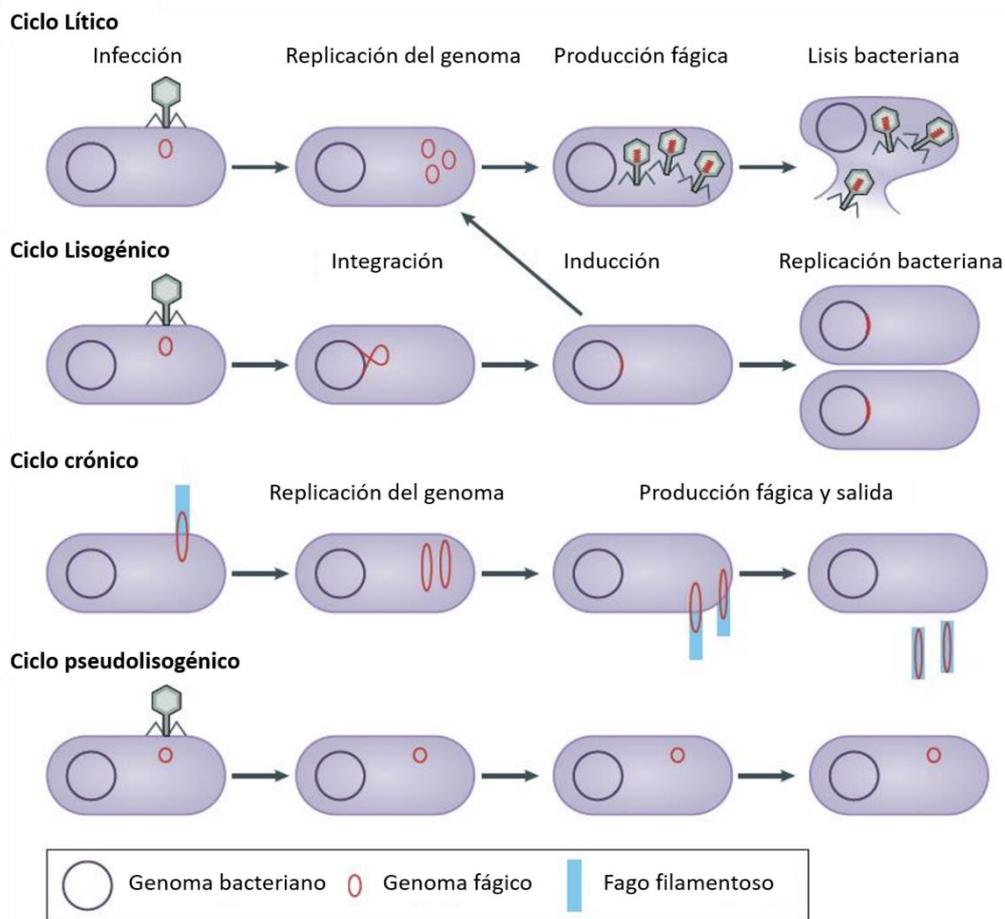


Figura 1.7. Ciclos de replicación de los bacteriófagos (según Khan Mirzaei y Maurice, 2017).

Los bacteriófagos virulentos utilizan el ciclo lítico para multiplicarse (Figura 1.8). Para ello, secuestran la maquinaria celular, generando múltiples copias de su material genético, el cual, tras su transcripción, será procesado por los ribosomas celulares para sintetizar las proteínas víricas. En un ciclo lisogénico (Figura 1.8), el genoma viral se integra en el cromosoma del hospedador y se replica cuando lo hace el cromosoma del que ahora forma parte. Cuando el DNA del bacteriófago está integrado en el cromosoma se denomina profago, y la célula que lo contiene lisogénica. El ciclo lisogénico es típico de fagos atemperados, los cuales pueden realizar un ciclo lítico tras la inducción del profago por estímulos externos como cambios ambientales o daño en el DNA que induzca el sistema SOS de la célula. La integración del virus en forma de profago en el cromosoma aumenta el contenido génico de la célula, produciendo cambios fenotípicos en esta, debido a la incorporación de genes de virulencia o metabólicos, entre otros.

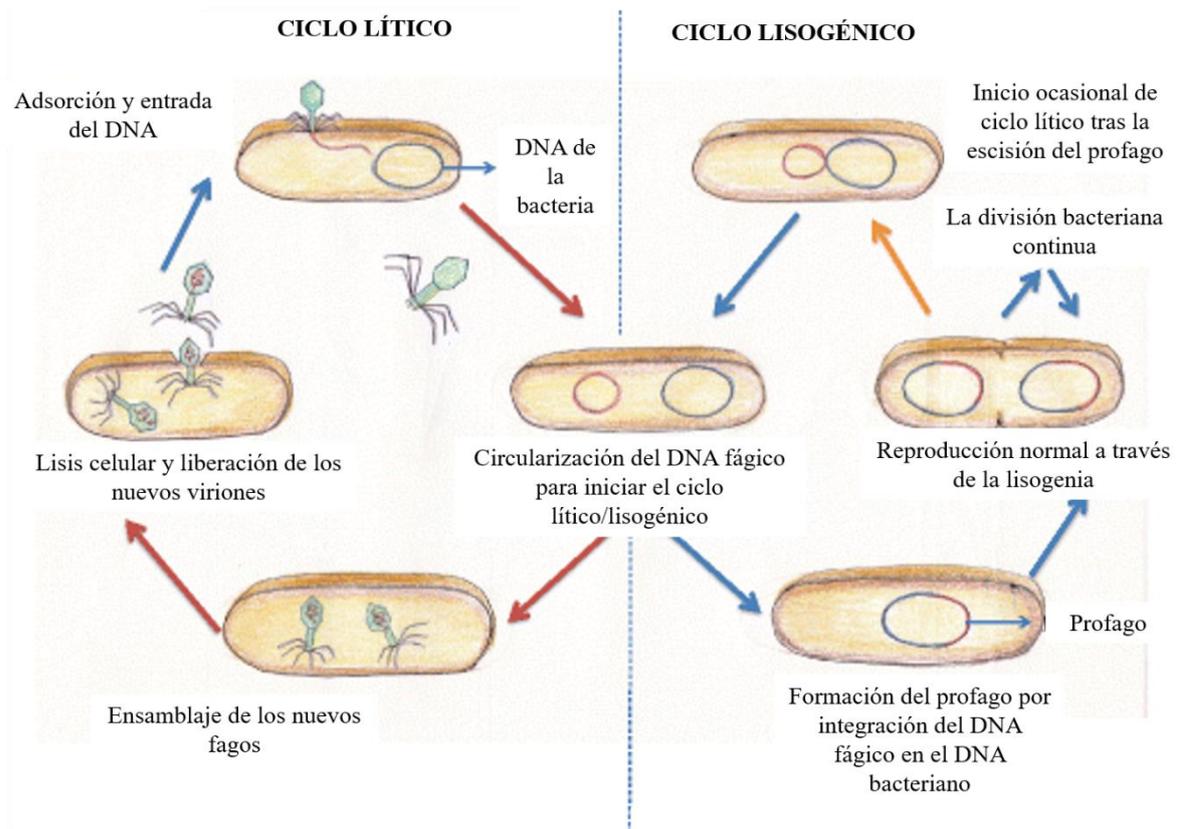


Figura 1.8. Representación esquemática del ciclo lítico y lisogénico de los bacteriófagos (según Sharma *et al.*, 2017).

Los ciclos de infección crónica y de pseudolisogenia están todavía poco caracterizados. Los ciclos crónicos son típicos de fagos filamentosos, como el M13, que se replican constantemente y salen del hospedador sin producir su lisis por un mecanismo tipo “gemación”. En la pseudolisogenia el genoma fágico ni se integra ni se propaga; este estado se ha detectado en condiciones limitantes de nutrientes en las cuales no se produce la replicación del DNA ni la síntesis proteica. Hasta ahora, se considera que los ciclos lítico y lisogénico son los predominantes.

En el ciclo lítico, tras la replicación, transcripción y traducción del genoma vírico, se produce el ensamblaje de los nuevos viriones y su liberación mediante lisis celular. En los fagos de dsDNA, la lisis celular es un proceso temporalmente muy controlado. En bacterias Gram negativas, este proceso consta de tres etapas, cada una de las cuales está involucrada en la destrucción de la

membrana citoplasmática, del peptidoglicano, y de la membrana externa, respectivamente (Young, 2014). Se conocen dos tipos de lisis celular (Figura 1.9) (Young, 2014): i) Lisis mediada por las proteínas holina y endolisina, en la cual la holina se acumula en la membrana citoplasmática hasta formar agujeros de escala micrométrica. Ello permite el paso de la endolisina a través de dicha membrana, alcanzando la envuelta de peptidoglicano; ii) Anclaje y liberación por pinholinas. En este caso, intervienen un tipo diferente de holinas, llamadas pinholinas, las cuales forman canales heptaméricos pequeños cuya función es despolarizar la membrana. Las endolisinas SAR (*signal-arrest-release*) se acumulan de forma inactiva en el periplasma hasta que las pinholinas colapsan la membrana plasmática, activándolas y permitiendo que degraden la membrana plasmática.

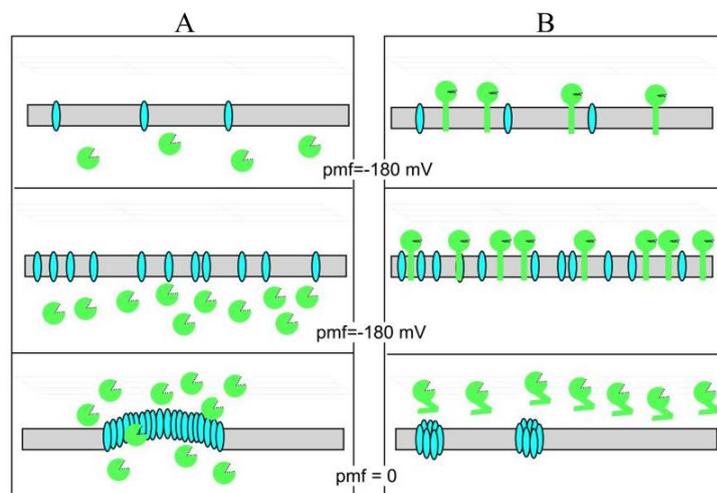


Figura 1.9. Degradación del peptidoglicano en bacterias Gram negativas por bacteriófagos (A) Holina-endolisina canónica y (B) Pinholina- endolisina SAR. Se muestra la membrana celular (rectángulo gris). La serie comienza al inicio de la expresión génica tardía (período de morfogénesis) y progresa hacia abajo. Holinas (óvalos azules en A), Pinholinas (óvalos azules en B), endolisinas solubles (óvalos verdes con "hendidura activa del sitio activo" en A) y endolisinas SAR (óvalos verdes con dos conformaciones en B). Los holinas se acumulan en la membrana celular (los dos paneles superiores de A y B). El panel inferior de A y B representan las células activadas, en las que las holinas canónicas forman un gran orificio en la membrana celular (a escala de micrómetros) (A) o las pinholinas forman pequeños orificios heptaméricos (B). Se indica la fuerza motriz de protones de la membrana celular en cada etapa (según Young, 2014).

En la tercera etapa de la lisis, el complejo de las *spanins* se encarga de degradar la membrana externa. Este complejo está formado por las *o-spanin*, una lipoproteína pequeña de la membrana externa, y la *i-spanin*, una proteína citosólica. Además de este complejo, existen *spanins* de un solo componente, llamadas *u-spanins*, que tienen una señal típica de lipoproteínas de membrana externa en su dominio N-terminal y un dominio transmembrana C-terminal. Se cree que el complejo de *spanins* causa la destrucción de la membrana externa mediante la fusión de las membranas interna y externa (Figura 1.10). Sin la función ejercida por las *spanins*, el proceso de lisis se bloquea y la progenie vírica queda atrapada en la célula muerta (Young, 2014).

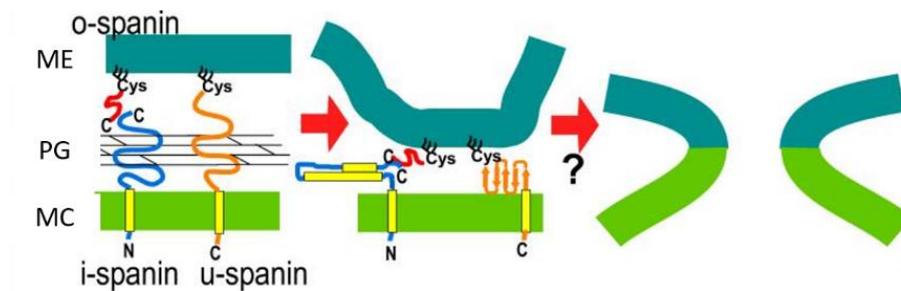


Figura 1.10. Modelo para la disrupción de la membrana externa mediada por la *spanin* por fusión de membranas. ME, membrana externa; PG, peptidoglicano; MC membrana celular (según Young, 2014).

1.3. Aplicaciones de los bacteriófagos en terapia y seguridad alimentaria

La salmonelosis humana, y especialmente las causadas por *Salmonella* no tifoidea, son un problema de salud pública importante en todo el mundo. En este sentido, como ya se ha comentado ampliamente, EFSA ha informado que la salmonelosis ha sido la segunda zoonosis más común y la causa más frecuente de brotes alimentarios en la UE en 2017 (EFSA, 2018). De manera similar, los datos reportados por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de EE. UU. indican que *Salmonella* fue el segundo patógeno transmitido por los alimentos, responsable del 33 % de los brotes de transmisión alimentaria, y el primero asociado con enfermedades de brotes (33 %) y hospitalizaciones (56 %) (CDC, 2018). Estos datos son motivo de preocupación para la Organización Mundial de la Salud (OMS) debido a la emergencia de *Salmonella* resistente a antibióticos, como las fluoroquinolonas y las cefalosporinas de espectro extendido, dado que ambos tipos son los agentes antimicrobianos de "máxima prioridad" para el tratamiento de estas infecciones en medicina humana (WHO, 2017).

Por todo ello, es urgente disponer de medidas alternativas o complementarias que ayuden a resolver este problema. En este sentido, los bacteriófagos, considerados como las entidades más numerosas en la naturaleza y con la propiedad de ocurrir naturalmente en aquellos ambientes donde proliferan sus hospedadores específicos, pueden ser una herramienta muy útil. Esto se debe a las ventajas que presenta sus aplicaciones en comparación con los antibióticos. Entre ellas, cabe citar su elevada especificidad y efectos adversos mínimos contra órganos y tejidos animales y también contra su propia microbiota (Gordillo Altamirano y Barr, 2019). Sin embargo, todavía existen algunas preocupaciones sobre su uso, como, por ejemplo, el criterio de selección del fago o la combinación de fagos más adecuados, la emergencia de patógenos resistentes a dichos fagos, la respuesta inmune por parte del hospedador, las vías de administración y su biodistribución, según dicha vía, entre otras. Todo ello ha hecho que existan muchas precauciones en la autorización de sus aplicaciones, tanto en terapia fágica humana o animal como en seguridad

alimentaria (Huys *et al.*, 2013; Casey *et al.*, 2018; Górski *et al.*, 2018). En EE.UU. y otros países como Canadá o Australia se ha autorizado el uso de determinados fagos en alimentos, mientras que en la UE todavía está en estudio (Sharma, 2013).

Seguidamente se comentan más ampliamente dos de los aspectos que preocupan sobre el uso de bacteriófagos en terapia y en seguridad alimentaria, ya que son objeto de este trabajo de Tesis.

1.3.1. Biodistribución de los bacteriófagos en terapia fágica

El redescubrimiento de las posibilidades de la terapia fágica en los países occidentales como una valiosa herramienta para combatir las enfermedades infecciosas humanas causadas por patógenos bacterianos multirresistentes, requiere que esta terapia cumpla con los estándares de nuestros países. Ello es también válido para la aplicación de la terapia fágica en animales. Hasta el presente, se han puesto en marcha 9 ensayos clínicos en humanos (Figura 1.11), pero no se disponen de datos sobre este tipo de pruebas en animales. En este tipo de estudios, un aspecto importante a considerar y estudiar es la farmacocinética de los distintos fagos en función de la vía de administración. En la Figura 1.12, se muestra cómo se espera que sea la farmacocinética de los fagos por el cuerpo de animales según la vía de administración y otros parámetros como la dosis, por ejemplo.

En el contexto del trabajo que se presenta, son de especial interés diversos aspectos relacionados con la terapia fágica oral en humanos y animales. En este sentido se ha de considerar que el cuerpo humano y también el de los animales está colonizado por una pléyade de microorganismos. Los fagos están presentes de forma natural en los organismos vivos, modificando su microbioma, y, como consecuencia, ejerciendo un impacto sobre su salud.

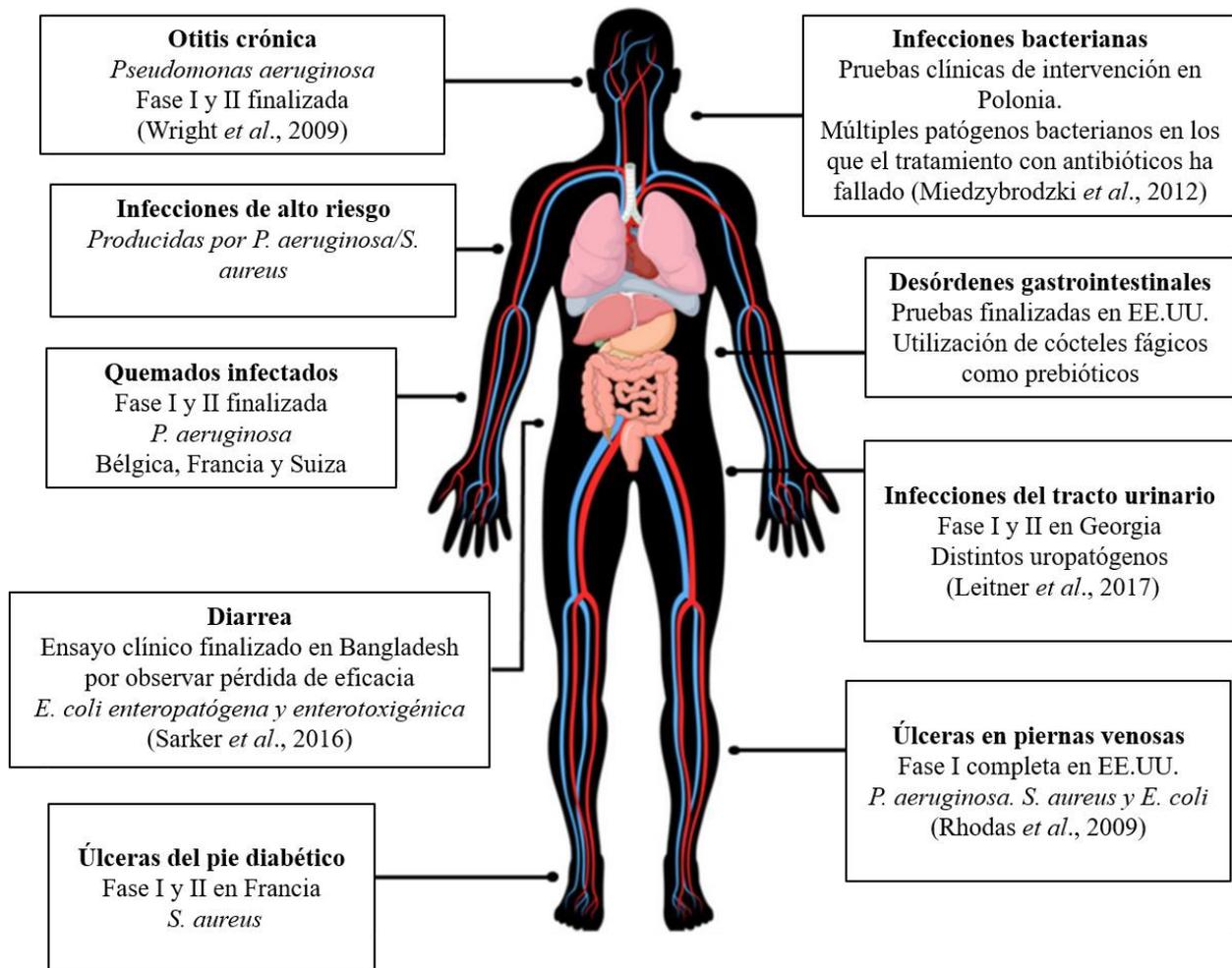


Figura 1.11. Resumen de las pruebas clínicas en terapia fágica en humanos (según Furfaro *et al.*, 2018).

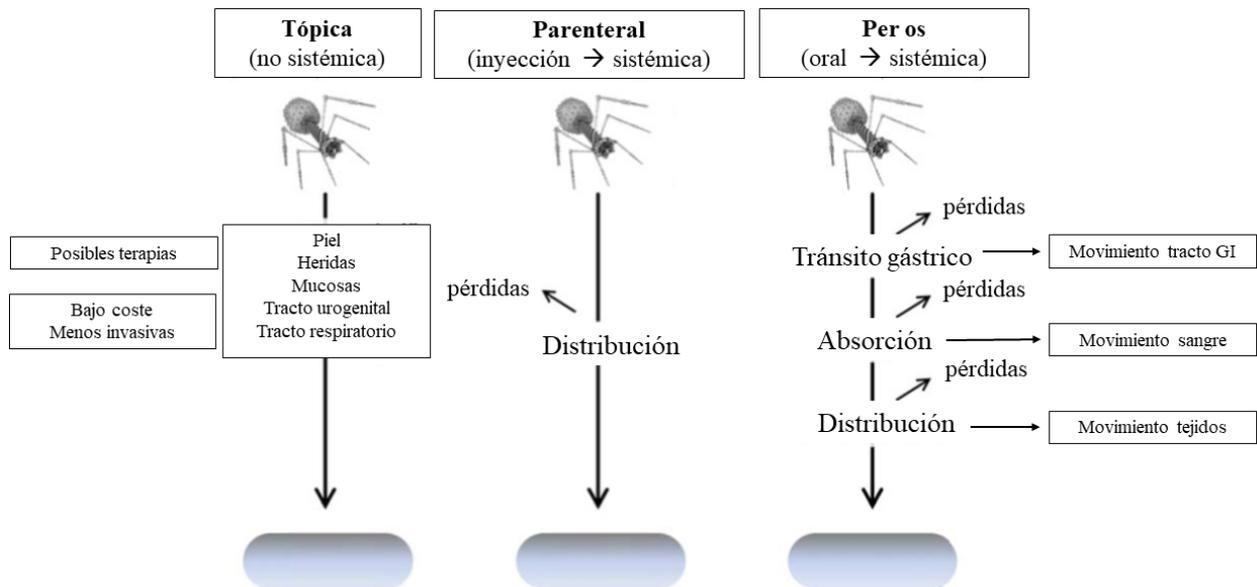


Figura 1.12. Farmacocinética de diferentes estrategias en terapia fágica (según Abedon, 2015). GI, gastrointestinal.

Se sabe que los fagos interactúan con las mucosas (Figura 1.13) y que son capaces de traspasar las barreras que significan las células epiteliales (Barr, 2017). Colonizan todos los nichos ecológicos de los organismos vivos, pero, a pesar de ello se desconoce en gran medida su interacción con las células, órganos y con el sistema inmune. Este desconocimiento es también válido respecto a la distribución de los fagos en los seres vivos cuando se administran oralmente. En esta vía de administración, los fagos deberán superar el efecto deletéreo que significa para su estructura el pH ácido estomacal, el cual puede conducir a una significativa reducción de la dosis terapéutica inicial. Seguidamente, al alcanzar el intestino podrán interactuar con la barrera epitelial y translocarse a través de ella para alcanzar órganos internos a través de los sistemas linfáticos y circulatorio, estableciendo lo que se ha dado en denominar “fagoma intra-corporal” (Barr, 2017).

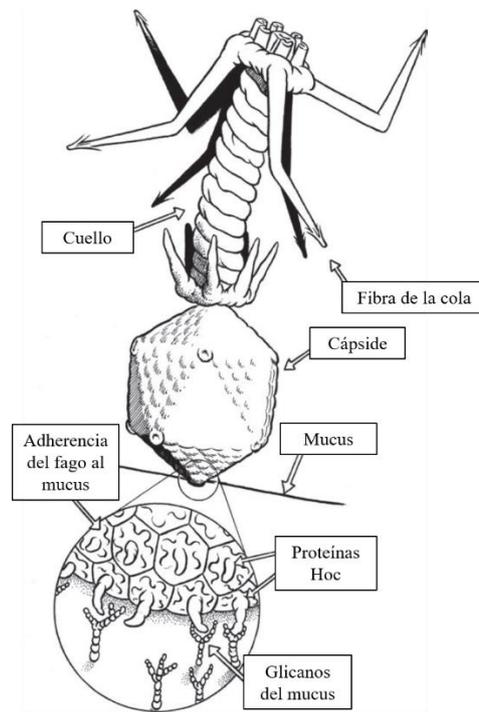


Figura 1.13. Adherencia de los fagos a mucosa (según Barr, 2017). Algunos fagos se adhieren a los glicanos del mucus a través de interacciones débiles mediante las proteínas Hoc de sus cápsides. Esta unión facilita su difusión a través de las superficies de las mucosas, aumentando su probabilidad de entrar en sus hospedadores.

En la Figura 1.14 se muestran las interacciones del bacteriófago con la capa celular epitelial de los mamíferos (según Barr, 2017). Tal vez, uno de los aspectos más desconocidos es qué funciones tiene este fagoma intra-corporal en el cuerpo y en el sistema inmune. En dicha figura se puede observar como las interacciones de unión entre fagos y mucinas transmembrana pueden permitir la transducción de señales en la célula epitelial [Figura 1.14 (1)]. Las mucinas asociadas a la membrana sirven como ligandos para diversas moléculas, como los bacteriófagos. Seguidamente, las mucinas transmembrana pueden sufrir cambios primarios en su conformación que conduce a la fosforilación de la cola citoplásmica, lo que puede desencadenar la transducción de señales en sentido descendente y la activación de las proteínas de choque térmico (HSP) que pueden regular

la apoptosis y afectar a los factores de transcripción. En la parte (2) de dicha figura se indica que los fagos pueden acceder al interior del cuerpo a través de un “intestino permeable”, donde evitan la barrera de las células epiteliales en sitios donde haya daño celular y perforaciones vasculares. En la parte (3) se muestra cómo las partículas fágicas pueden ser transportadas al interior de la célula por endocitosis mediada por un receptor, por lo que dicho receptor de la superficie celular se une fuertemente a un ligando extracelular que se localiza en la cápside del fago. Las partículas de fago pueden diseñarse para mostrar diversos ligandos en sus cápsides, lo que desencadena la endocitosis y la captación mediada por receptores por un tipo de célula específico. En la parte (4) se señala que los fagos también pueden entrar en las células eucariotas por captación no específica de partículas de fago libres. En la parte (5) se presenta que las partículas de fago internalizadas pueden degradarse, lo que lleva a la liberación intracelular de partículas de fago y material genético, que puede transcribirse y traducirse mediante la maquinaria celular eucariota, y, finalmente en la parte (6), se hipotetiza que las partículas de fago internalizadas pueden cruzar la célula eucariota permitiendo la diseminación del fago al interior del cuerpo.

Si el conocimiento del que se dispone sobre la farmacocinética de los fagos en mamíferos es escaso, no hay ningún dato sobre si dicha farmacocinética varía cuando los fagos se administran oralmente encapsulados en liposomas u otros materiales biocompatibles, con el objetivo de superar la más que posible disminución del título de fagos durante su tránsito a través del estómago. Así pues, son muchos los aspectos que requieren de esfuerzo investigador con la finalidad de contribuir a que la aplicación de la terapia fágica sea lo más segura posible y con los altos estándares de calidad de los países occidentales.

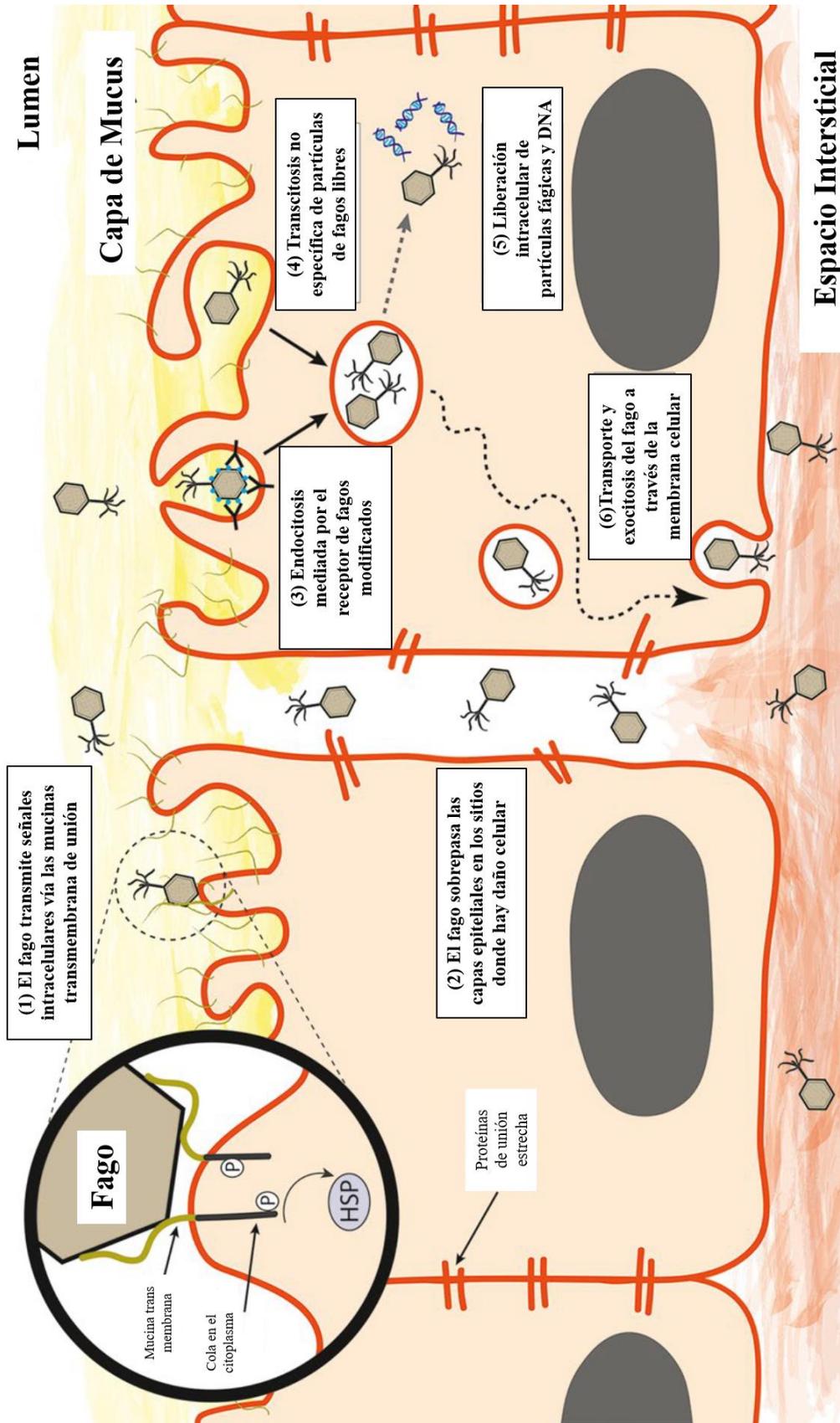


Figura 1.14. Interacciones del bacteriófago con la capa celular epitelial de los mamíferos (según Barr, 2017).

1.3.2. Mecanismos de resistencia de los patógenos bacterianos a los bacteriófagos

El estudio de los mecanismos bacterianos de resistencia a los bacteriófagos ha sido de gran interés en la última década. De hecho, se postulaba que los mecanismos de resistencia podían afectar a cualquiera de los procesos que intervienen en la multiplicación vírica desde su adsorción hasta la liberación de la nueva progenie (Figura 1.15). Hasta hace poco eran escasos los detalles a nivel molecular que se conocían sobre la resistencia bacteriófagos, a excepción de algunos mecanismos moleculares implicados en la resistencia mediada por la interferencia en la adsorción de los fagos a sus receptores. Seguidamente se resumen los mecanismos descritos hasta la actualidad.

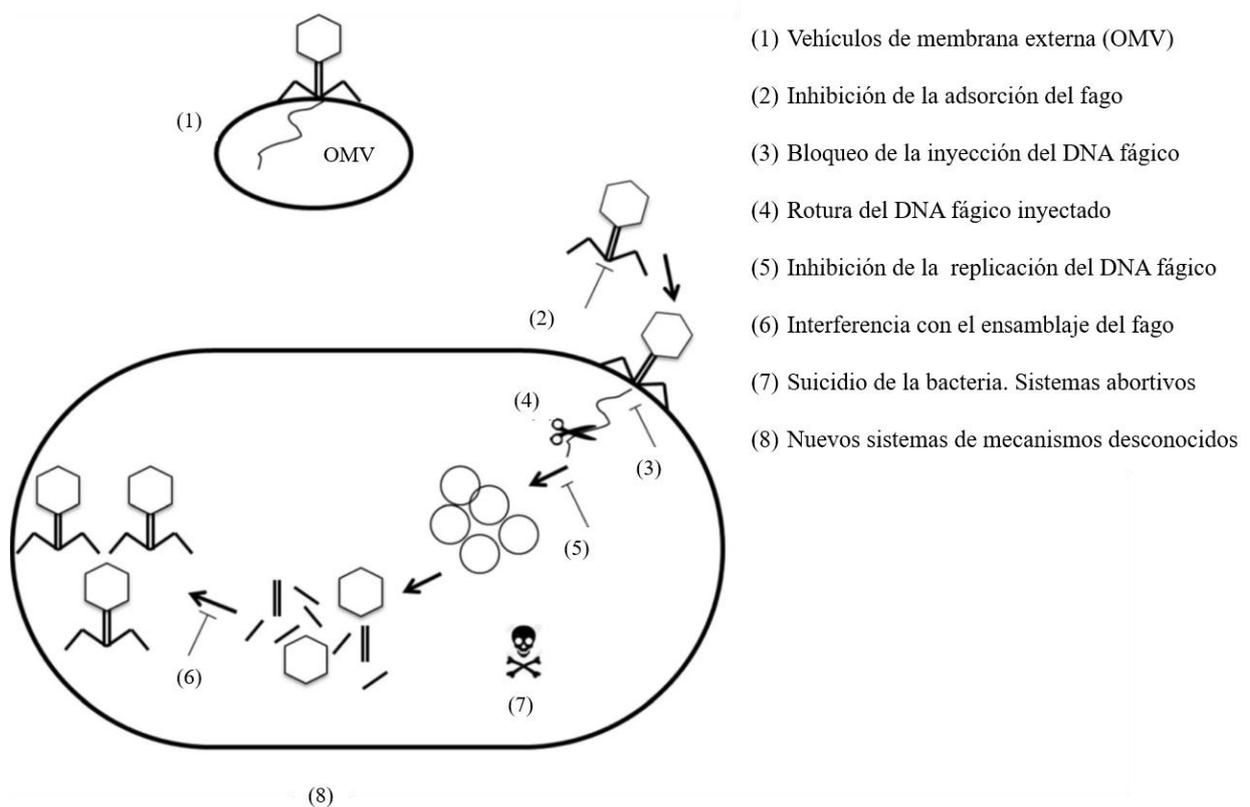


Figura 1.15. Resumen de los mecanismos de resistencia bacteriana a la infección de bacteriófagos (según Azam y Tanji, 2019).

1.3.2.1. Vesículas de membrana externa como mecanismo anti-fago

Las vesículas de membrana externa (OMV) son nanoestructuras formadas por lípidos y proteínas de membrana externa y también moléculas que se encuentran en el espacio periplasmático. Las OMV se producen durante el crecimiento bacteriano y pueden servir de señuelo para defenderse de sustancias nocivas, por ejemplo, antibióticos (Grenier *et al.*, 1991; Grenier y Belanger, 1991) y también bacteriófagos. Este fenómeno se ha descrito para fagos de *Escherichia coli* y de *Vibrio cholerae* (Azam y Tanji, 2019). Se trataría pues de una primera línea de defensa bacteriana contra los fagos.

1.3.2.2. Inhibición de la adsorción fágica

La adsorción fágica es tal vez uno de los procesos más intrincados y complejos de la infección fágica. Ello se debe a que se reconoce un receptor específico de la célula hospedadora de entre la pléyade de receptores que tienen dichas células. El mecanismo más descrito es la modificación del receptor debido a alguna mutación. Este proceso se ha descrito para muchas bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas y es uno de los más estudiados (Seed, 2015; Azam y Tanji, 2019). Además, las bacterias han coevolucionado con los fagos y han desarrollado diferentes barreras o mecanismos de bloqueo para evitar dicha adsorción y, a su vez, los fagos también han desarrollado mecanismos para sobrepasar dichas barreras. El primer mecanismo de bloqueo consiste en la síntesis de alguna molécula que impida el acceso del fago a su receptor. Igualmente, la producción de algún tipo de matriz extracelular también puede significar un bloqueo en la adsorción. Y, finalmente, la bacteria puede sintetizar moléculas que inhiban la adsorción por competición con los receptores, se trata de los denominados inhibidores competitivos (Labrie *et al.*, 2010). En el ejemplo de la Figura 1.16, se ilustra como la bacteria *Staphylococcus aureus* ha desarrollado todos estos mecanismos frente a algunos de sus fagos.

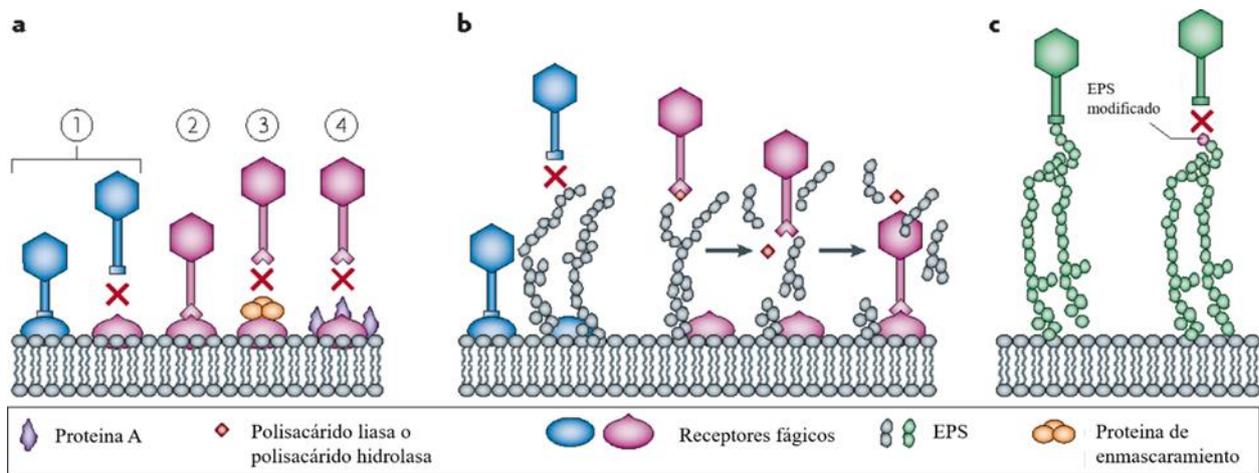


Figura 1.16. Estrategias utilizadas por las bacterias para bloquear la adsorción fágica (Labrie *et al.*, 2010). (a1) Las bacterias pueden ser resistentes a los fagos, modificando los receptores de la superficie celular; (a2) los fagos pueden adaptarse para reconocer estos nuevos receptores; (a3) las bacterias también pueden producir proteínas que enmascaran el receptor del fago; (a4) *S. aureus* produce la proteína A, la cual reduce la adsorción de fagos. (b) La adsorción de los fagos también se puede bloquear mediante la producción de exopolisacárido (EPS), pero los fagos superan la capa de EPS produciendo una polisacárido liasa o una polisacárido hidrolasa para escindir el EPS. (c) Los fagos también han evolucionado para reconocer específicamente los polisacáridos como los antígenos O y los antígenos K.

1.3.2.3. Bloqueo de la inyección del DNA fágico

Este mecanismo se refiere a los sistemas de exclusión de la superinfección, denominados Sie, y se han descrito en diferentes bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas (Azam y Tanji, 2019). Fundamentalmente, consisten en la síntesis de determinadas proteínas, codificadas generalmente en profagos, que impiden la entrada del DNA del fago que infecta.

En la Figura 1.17 se ilustra como el fago T4 de *E. coli* sintetiza la proteína Imm, la cual bloquea la translocación del DNA de otros fagos tipo T4 al citoplasma de la bacteria. También se observa en dicha figura cómo el propio fago T4 sintetiza la proteína Sp, la cual bloquea la degradación del peptidoglicano, atrapando así al DNA fágico entrante entre el peptidoglicano y la membrana externa (Labrie *et al.*, 2010).

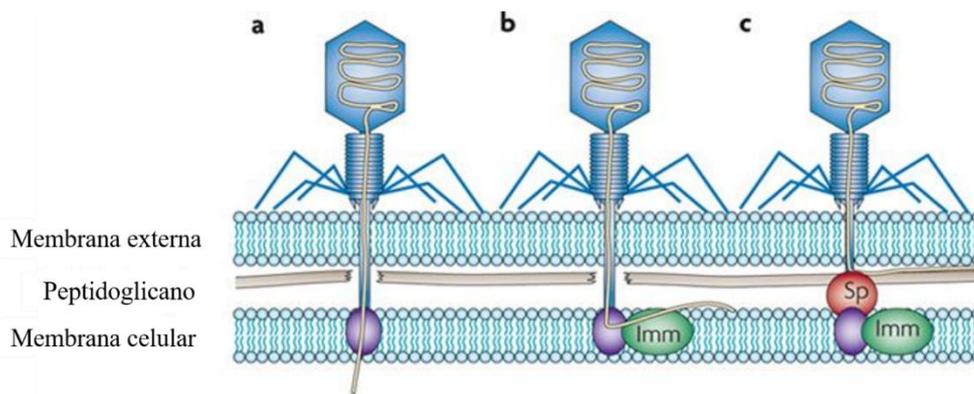


Figura 1.17. Bloqueo de la entrada de DNA fágico en la célula bacteriana (Labrie *et al.*, 2010). (a) Infección del fago T4 de una célula de *E. coli*. La capa de peptidoglicano se degrada y una proteína de la membrana interna participa en la translocación del DNA al citoplasma. (b) El fago T4 codifica la proteína Imm, la cual bloquea la translocación del DNA del fago al citoplasma, impidiendo así la infección por otros fagos similares. (c) La proteína Sp, codificada también por el fago T4, bloquea la degradación del peptidoglicano, atrapando el DNA entre la capa de peptidoglicano y la membrana externa.

1.3.2.4. Rotura del DNA fágico

Si el fago infectante consigue inyectar su DNA deberá superar toda una serie de mecanismos implicados en la rotura de dicho DNA. Se han descrito dos tipos de sistemas de defensa: innatos e inmune adquiridos. Entre los primeros se encuentran los sistemas de restricción-modificación (R-M), que actúan sobre cualquier DNA que entra en la célula y se reconoce como extraño por no estar metilado adecuadamente, y los denominados sistemas de islas de defensa asociados a restricción-modificación (DISARM). Estos últimos se han descrito recientemente (Ofir *et al.*, 2018), están muy extendidos entre bacterias y arqueas y pueden servir de defensas contra diferentes bacteriófagos, si bien su mecanismo molecular es todavía desconocido. Los DISARM se presentan como islas génicas en las que se identifican típicamente cuatro genes que codifican una DNA metilasa y tres proteínas con dominios helicasa, fosfolipasa D y DUF1998, respectivamente. Además, hay un quinto gen de función desconocida.

El único mecanismo inmune adquirido es el sistema CRISPR-Cas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated*), el cual parece ser un sistema principal de defensa frente a la entrada de DNA exógeno, ya que se encuentra en el 40 % de los todos los genomas bacterianos secuenciados (Godde y Bickerton, 2006). Este sistema fue descrito inicialmente como una serie de repeticiones en el genoma de la arquea *Haloferax mediterranie* por el alicantino Francisco Mojica (Mojica *et al.*, 1993), el cual demostró que se encontraban en muchos otros procariontes. Hoy en día se sabe que este sistema se basa en la síntesis de RNAs de pequeño tamaño, a los que se les ha denominado crRNAs, que bloquean la actividad de fagos y plásmidos y parecen funcionar como los RNA de interferencia de eucariotas. El DNA de estos sistemas típicamente contiene repeticiones de DNA de pocas bases, separadas por las denominadas secuencias espaciadoras que son también cortas, y que son iguales a secuencias que están presentes en fagos, plásmidos y otros elementos móviles, que fueron adquiridos por la bacteria en algún momento. Una vez el DNA de los espaciadores CRISPR-Cas es transcrito, guía a la nucleasa Cas hacia la región complementaria del DNA exógeno que ha entrado en la célula, el cual es cortado (Figura 1.18). Los fagos han coevolucionado para escapar a este sistema, por ejemplo, a través de mutaciones en los espaciadores o incluso sintetizando proteínas anti-CRISPR que interfiere con el sistema (Azam y Tanji, 2019). Cabe mencionar que este sistema ha tenido una gran aplicación en la edición de genes.

1.3.2.5. Inhibición de la replicación del DNA fágico

Se trata de un nuevo mecanismo de resistencia, denominado BREX (*Bacteriophage exclusion*) que permite la adsorción del fago pero se bloquea la replicación de su DNA (Goldfarb *et al.*, 2015). Este mecanismo se encuentra codificado en un casete que contiene seis genes: una supuesta proteasa de tipo Lon, una proteína con dominio de fosfatasa alcalina, una proteína de unión a RNA hipotética, una metilasa de DNA, una proteína con dominio ATPasa y una proteína de función desconocida. Se ha sugerido que es la metilación en motivos no palindrómicos TAGGAG del

genoma bacteriano la que permite distinguir entre DNA propio y DNA extraño. Sin embargo, a diferencia de los sistemas de modificación y restricción, comentados anteriormente, el DNA fágico parece que no se rompe ni es degradado. Este sistema se ha encontrado en el 10 % de los genomas microbianos secuenciados hasta 2015 y también se han detectado sistemas anti-BREX en determinados fagos (Goldfarb *et al.*, 2015). Aún no se han conseguido determinar los mecanismos moleculares que intervienen exactamente en este mecanismo de defensa.

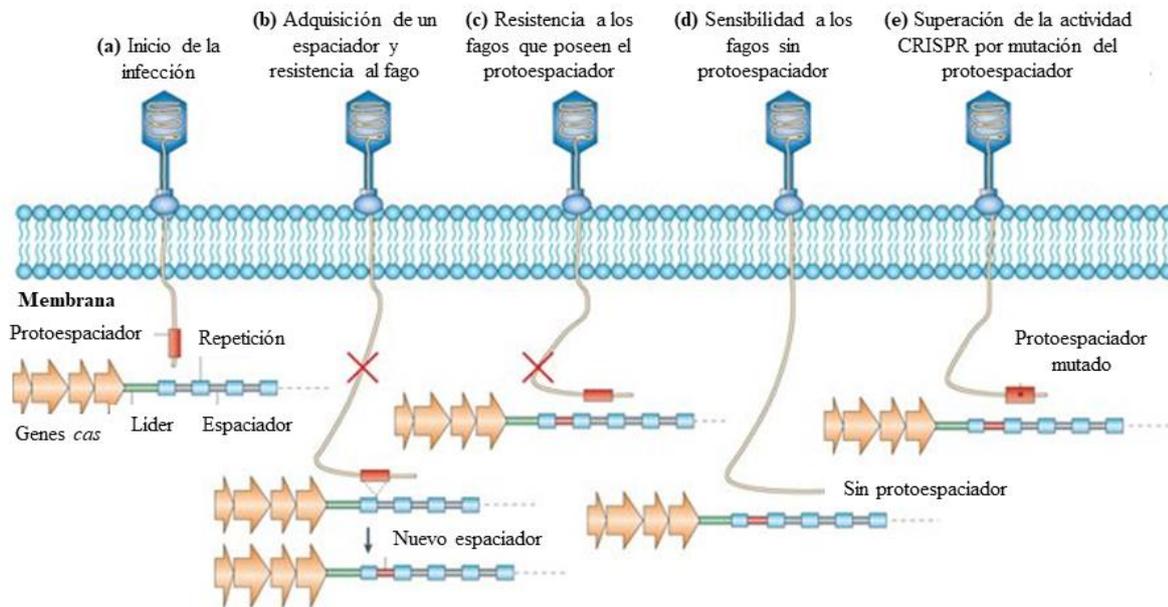


Figura 1.18. El sistema CRISPR-Cas (Labrie *et al.*, 2010). (a) El DNA del fago entra en la célula bacteriana y se inicia el ciclo lítico del fago en la mayoría de las infecciones. (b) Una de las células infectadas adquiere un espaciador. (c) Cualquier genoma de fago entrante que lleve un proto-espaciador con un 100 % de identidad de nucleótidos a la nueva unidad de repetición espaciadora se desactivará y se bloqueará el proceso de infección del fago. (d) Las células que no poseen el nuevo espaciador siguen siendo sensibles a los fagos. (e) Los mutantes del fago que lleven una mutación puntual o una deleción en su proto-espaciador (o en el motivo contiguo al proto-espaciador) podrán completar su ciclo lítico.

1.3.2.6. Interferencias a nivel del ensamblaje

Se ha detectado en distintas bacterias regiones cromosómicas que contiene islas, denominadas islas cromosómicas inducibles por fagos (PICI, *phage-inducible chromosomal islands*), presentes tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas. Entre ellas, las más conocidas son las islas de patogenicidad de *S. aureus*, denominadas SAPI, las cuales son portadoras de factores de virulencia y responsables de su dispersión. Estas islas en principio son estables en el cromosoma de la bacteria y están controladas por un represor codificado por la propia isla. No obstante, tras la infección de la bacteria que las contiene por algún fago específico auxiliar, las SAPI se escinden, replican y se empaquetan ellas mismas, generando partículas infectivas maduras que contienen DNA de SAPI en lugar del DNA del fago que ha infectado a la célula. Se trata pues de un mecanismo de interferencia en el empaquetamiento del DNA del fago, que, además, tiene otras funciones biológicas (Novick *et al.*, 2010).

1.3.2.7. Infección abortiva

El sistema Abi, o de infección abortiva, provoca la muerte celular. A diferencia de los mecanismos mencionados anteriormente, los sistemas Abi actúan en diferentes momentos del ciclo multiplicativo de los fagos líticos. Estos sistemas son a menudo codificados por fagos atemperados y plásmidos. A pesar de ser conocidos hace más de 50 años, sus mecanismos moleculares son muy desconocidos. Uno de los más estudiados ha sido el sistema Rex descrito en una cepa de *E. coli* que contiene el profago Lambda y que actúa contra la infección mediada por el fago T4 (Labrie *et al.*, 2010). El sistema Rex es un proceso abortivo de dos componentes (Figura 1.19).

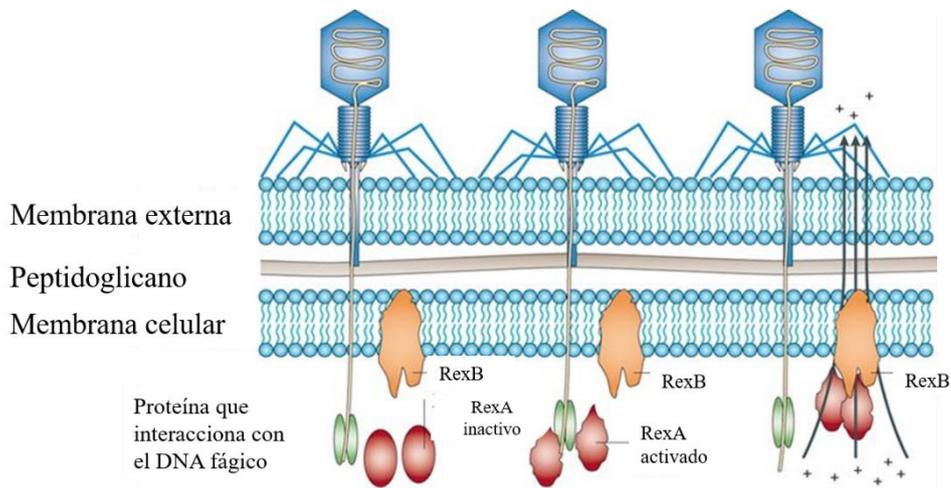


Figura 1.19. Sistema Rex de *E. coli* como modelo de un sistema de infección abortiva de dos componentes (según Labrie *et al.*, 2010).

En dicha figura se ilustra como una forma inactiva de la proteína RexA actúa como proteína sensora, susceptible de ser activada por el complejo proteína del fago-DNA, el cual forma un intermediario de replicación o recombinación durante la infección fágica. Se requieren dos proteínas RexA activadas para que la proteína RexB, anclada en la membrana celular, actúe como un canal iónico permitiendo el paso de cationes monovalentes a través de la membrana interna, destruyendo así el potencial de membrana y produciendo la muerte de la bacteria. Este sistema es de hecho un suicidio de una bacteria infectada por el fago, pero así consigue proteger a otras células de la población bacteriana (Labrie *et al.*, 2010). Junto al sistema Rex se conoce también con algo de detalle el sistema Abi de *Lactobacillus lactis* y también se han descrito sistemas tipo Abi en la isla de defensa de *Bacillus subtilis* (Azam y Tanji, 2019). Además, los sistemas toxina-antitoxina están muy extendidos en bacterias y, alguno de ellos se ha relacionado con sistemas del tipo Abi. Para superar los mecanismos Abi, los fagos han evolucionado a través de diversas estrategias como, por ejemplo, sintetizando proteínas con funciones antitoxina. Es el caso del bacteriófago T4 que produce la proteína Dmd que actúa contra las toxinas LsoA y RnIA de *E. coli* (Azam y Tanji, 2019).

1.3.2.8. Otros mecanismos de resistencia

Junto a los mecanismos comentados anteriormente, debe señalarse que es seguro que existen muchos más que no han sido descritos todavía o cuyo nivel de conocimiento es muy incipiente. En este último grupo se encuentran 9 nuevos sistemas (Thoeris, Hachiman, Shedu, Gabija, Septu, Lamassu, Zorya type I, Zorya type II, Kiwa, Druantia), muy desconocidos, que han sido identificados a través de predicción computacional de sistemas de defensas, y que fueron posteriormente validados experimentalmente (Doron *et al.*, 2018). Genes que se han identificado en estos sistemas codifican actividades helicasa, nucleasa, ATPasa, metilasa, condensina y topoisomerasa VI. Entre ellos destaca, el sistema Druantia, basado en un gen que codifica la proteína DruE, el cual está precedido por un conjunto de genes variables sin un dominio o función conocidos. El mecanismo de acción de este sistema es totalmente desconocido si bien se sabe que se encuentra codificado en unas 12 kb del genoma y que debe ser totalmente nuevo dado que no se han identificado dominios conocidos (Doron *et al.*, 2018).

1.3.3. Resistencia a bacteriófagos en terapia fágica

En el apartado anterior se han comentado los mecanismos de resistencia conocidos hasta el presente y se ha hecho hincapié en que, en muchos casos, los mecanismos moleculares que subyacen son desconocidos. Junto a ello, otro aspecto clave es determinar y conocer la resistencia que se genera en terapia fágica, y también en seguridad alimentaria, concomitante a la aplicación de fagos, ya que, según su importancia, se podrían comprometer ambas aplicaciones.

A pesar de que no hay muchos estudios sobre la emergencia de resistencias bacterianas a los fagos en terapia fágica, los resultados experimentales indican que se han detectado clones resistentes en hasta un 80 % de los estudios realizados en medio intestinal y en el 50 % de los que utilizaron modelos de sepsis. También se han observado clones resistentes a fagos en estudios en humanos, como se describe en tres de los cuatro ensayos clínicos que registraron la aparición de resistencia a los fagos. Por otro lado, estudios recientes en animales sugieren que las mutaciones bacterianas

que confieren resistencia a los fagos pueden disminuir la *fitness* de las bacterias resistentes, lo que a su vez, podría beneficiar al hospedador. En cualquier caso, la resistencia a los fagos no debe ser subestimada y se deben hacer esfuerzos para desarrollar metodologías para conocerla y prevenirla (Oechslin, 2018).

En este contexto debe además tenerse en cuenta que, a diferencia con lo que ocurre con el uso de antibióticos, la resistencia a los fagos es fruto de una coevolución bacteria-bacteriófago de millones de años. Se ha sugerido que es esencial considerar la evolución de la resistencia de las bacterias en el diseño de estrategias de terapia fágica. Nuestra comprensión de las interacciones entre fagos y bacterias puede guiar la selección de combinaciones específicas que pueden ayudar a minimizar cualquier posible impacto del desarrollo de resistencia en una terapia efectiva (Torres-Barceló, 2018). La inclusión de diversos enfoques con diferentes bacterias patógenas puede contribuir a establecer principios evolutivos para refinar la selección de fagos candidatos. En otras palabras, debe tratarse de detectar fagos potencialmente efectivos a largo plazo para poder utilizarlos en estrategias de control duraderas. Entre los criterios evolutivos y algunas de las preguntas no resueltas relacionadas con los fagos y su efecto en las bacterias se encuentran los siguientes: tiempo de aplicación, efectos de la diversidad de la población bacteriana y la historia evolutiva relacionada con los fagos, así como las características de los fagos con respecto a su potencial de adaptación a las bacterias (Torres-Barceló, 2018).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Las distintas aplicaciones de los bacteriófagos requieren todavía incrementar el conocimiento sobre la interacción bacteriófago-bacteria diana-matriz. Así, y como se ha indicado en el apartado anterior, uno de los aspectos más desconocidos sobre la aplicación de los bacteriófagos en terapia es discernir las funciones que tiene el fagoma en el interior del cuerpo de los animales, cuál es su farmacocinética y su relación con el sistema inmune de los animales. Por otra parte, no hay un conocimiento profundo sobre la emergencia de resistencias bacterianas a los fagos tanto en terapia como en su aplicación en seguridad alimentaria y las implicaciones que dicha resistencia puede tener para ambas aplicaciones.

En este contexto, los objetivos de esta tesis doctoral han sido los siguientes:

1. Estudio comparativo de la emergencia de resistencias bacterianas a bacteriófagos en tres situaciones: i) en cultivos *in vitro*, ii) en tratamiento de alimentos con bacteriófagos y iii) en terapia fágica. Para ello, se ha utilizado el modelo desarrollado en nuestro grupo: *Salmonella*/bacteriófagos del cóctel integrado por UAB_Phi20, UAB-Phi78 y UAB_Phi87 (Colom *et al.*, 2015; Colom *et al.*, 2017).
2. Estudio de la biodistribución de bacteriófagos encapsulados en lípidos y de su capacidad de translocación a través de la membrana epitelial del tracto digestivo para poder alcanzar así tejidos y órganos internos.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

La cepa *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LB5000 (SGSC181; University of Calgary) se usó para la propagación y cuantificación de los bacteriófagos UAB_Phi20, UAB_Phi78 y UAB_Phi87. Un mutante espontáneo resistente a Rifampicina (Rif^R) de la cepa *S. Typhimurium* ATCC 14028 (Universitat Autònoma de Barcelona) se usó para el estudio de resistencia a bacteriófagos. Para la caracterización de los receptores de los bacteriófagos UAB_Phi20, UAB_Phi78 y UAB_Phi87 y la caracterización de la resistencia de ATCC 14028 a dichos fagos, se utilizó una colección de cepas derivadas de *S. Typhimurium* LT2 (University of Calgary) con mutaciones en el lipopolisacárido (LPS), la cepa salvaje LT2 y la cepa TA1537 (Dr. Bruce Ames, University of California, Berkeley), tal y como se detalla en la Tabla 2.1. Para la construcción y selección de vectores de expresión, se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5 α (Clontech, Gutenberg, Suecia).

Todas las cepas se cultivaron de forma rutinaria en medio Luria-Bertani (LB) líquido o en placas de LB agar durante 18 h a 37°C, suplementados con rifampicina (75 μ g/ml) o ampicilina (100 μ g/ml) en función de la cepa bacteriana. Para la cuantificación de *Salmonella* en los estudios de emergencia de resistencia a bacteriófagos se sembraron en placas de xilosa lisina desoxicolato (XLD, Laboratorios Conda, España) suplementadas con rifampicina. Por último, se utilizaron las denominadas placas verdes (véase apartado 3.3.6.4) para determinar la ausencia de bacteriófagos en los clones de *Salmonella* aislados en el estudio de la emergencia de resistencia a bacteriófagos.

3.2. Bacteriófagos

Se usaron los bacteriófagos UAB_Phi20, UAB_Phi78 pertenecientes a la familia *Podoviridae* y UAB_Phi87, de la familia *Myoviridae* (Bardina *et al.*, 2012; Bardina *et al.*, 2016).

Tabla 2.1. Cepas de *S. Typhimurium* utilizadas para la caracterización de receptores de los fagos y resistencia a bacteriófagos.

Cepa	Quimiotipo de LPS*	Genotipo parcial	Procedencia
ATCC 14028 Rif ^R	Liso	<i>rfa</i> +; Rif ^R	Íñigo Lasa, Universidad de Navarra, España.
TA1537	Rugoso profundo	<i>hisC3076 rfa invrB</i>	Dr. Ames, University of California, Estados Unidos
SL3770	Liso	<i>Rfa</i> (+)	
SL4807	Mezcla de Rc + liso	<i>rfaB707</i>	
SL428	Ra con 1 unidad de antígeno O	<i>rfc-458</i>	
SA1627	Ra	<i>rfb-his</i> deletion	
SL3749	Ra	<i>rfaL446</i>	
SL733	Rb1	<i>rfaK953</i>	
SL3750	Rb2	<i>rfaJ417</i>	
SL3748	Rb3	<i>rfaI432</i>	
SL1306	Rc	<i>galE503</i>	
SL3769	Rd1	<i>rfaG471</i>	
SL3789	Rd2	<i>rfaF511</i>	
SA1377	Re	<i>rfaC630</i>	
SL1102	Re	<i>rfaE543</i>	

* Ra, Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Rd1 y Rd2 son quimiotipos rugosos. Re es un quimiotipo rugoso profundo (Hitchcock *et al.*, 1983).

3.3. Métodos microbiológicos

3.3.1. Multiplicación *in vitro* de bacteriófagos

Para la obtención de lisados de bacteriófagos se utilizaron cultivos de 200 ml de *S. Typhimurium* LB5000 en LB líquido. Los cultivos se incubaron a 37°C con agitación orbital a 150 rpm hasta alcanzar una absorbancia ($DO_{550\text{ nm}}$) de 0,6 (mitad de la fase exponencial). A continuación, se infectaron los cultivos con el bacteriófago deseado con una multiplicidad de infección (*multiplicity of infection*, MOI) igual a 0,1. Los cultivos se incubaron a 37°C sin agitación durante 10 min para favorecer la adsorción de los bacteriófagos. Posteriormente, se incubaron con agitación a 150 rpm el tiempo necesario hasta la clarificación del cultivo por efecto de la lisis. Este tiempo depende del bacteriófago empleado y puede variar entre 2 y 6 h. Seguidamente, se centrifugaron los lisados a $10.414 \times g$ durante 10 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante para posteriormente ser filtrado a través de filtros de polietersulfona (PES; Millipore, Carrigtwohill, Irlanda) de 0,45 y 0,22 μm de diámetro de poro. Finalmente, se determinó la concentración de bacteriófagos por el método de titulación en doble capa (véase apartado 3.3.3.2) y se conservaron los lisados a 4°C.

3.3.2 Purificación de los bacteriófagos

Los lisados se purificaron y concentraron 10 veces por ultracentrifugación (Optima™ XPN-100, Beckman, California, Estados Unidos) en un rotor 90Ti (Beckman, California, Estados Unidos) a $68.584 \times g$ durante 2 h a 15°C para los bacteriófagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87 o durante 1 h y 18 min a 4°C para el bacteriófago UAB_Phi78. El sedimento se disolvió en 1 ml de MgSO_4 10 mM en agitación a 200 rpm a temperatura ambiente durante toda la noche. La suspensión resultante de bacteriófagos se filtró a través de filtros de polietersulfona (PES) de 0,45 μm de diámetro de poro y se determinó la concentración de bacteriófagos por el método de titulación en doble capa (véase apartado 3.3.3.2). El lisado purificado y concentrado se conservó a 4°C.

Para la aplicación de los bacteriófagos en determinados estudios se requirió un mayor grado de purificación. Para ello, se procedió a la ultrafiltración de los lisados obtenidos tras la ultracentrifugación utilizando los filtros Amicon Ultra-15 Centrifugal 100K (100MWCO; Merck Millipore Ltd. Carrigtwohill, Irlanda) hasta un máximo de 12 ml y prehidratados con MgSO₄ 10 mM a 5.000 x g durante 15 min a 20°C. Debido al tamaño de los bacteriófagos, estos se quedan retenidos en el filtro, mientras que las impurezas más pequeñas son eliminadas. Se recuperó el lisado y se ajustó en MgSO₄ 10 mM hasta el volumen final deseado. Finalmente, se determinó la concentración de bacteriófagos por el método de titulación en doble capa (véase apartado 3.3.3.2) y se conservaron los lisados a 4°C.

3.3.3. Titulación

3.3.3.1. Test de la gota

El test de la gota fue utilizado para: i) determinar la presencia o ausencia de bacteriófagos de una determinada suspensión; ii) determinar de forma aproximada la concentración de bacteriófagos de una determinada muestra; y, iii) determinar la susceptibilidad a bacteriófagos de los clones de *Salmonella*.

Para realizar el test de la gota, se preparó un cultivo de noche en 10 ml de LB líquido con la cepa bacteriana deseada. Al día siguiente, se preparó una dilución 1:10 del cultivo de noche en LB líquido y se sembró en doble capa. Después de la solidificación del medio, se depositaron gotas de 10 µl de la suspensión de fago sobre la doble capa. Se dejaron secar las gotas y las placas se incubaron a 37⁰C durante 18 h. Finalmente, se observó la presencia o ausencia de calvas o de halo de lisis.

3.3.3.2. Titulación en doble capa

Para determinar la concentración de los bacteriófagos se realizaron diluciones seriadas decimales de la suspensión de fagos en MgSO₄ 10 mM y se sembraron mediante doble capa de agar en la cepa de *Salmonella* adecuada (Green y Sambrook, 2012). Tras su incubación a 37°C durante 18 h, se procedió al recuento del número de calvas por placa, considerando solo las placas que mostraron entre 15 y 300 calvas, y se determinó la concentración de bacteriófagos en pfu/ml (*plaque-forming unit*; unidades formadoras de calvas por mililitro).

3.3.4. Cinética de infección fágica

Para determinar las cinéticas de infección de los bacteriófagos en las diferentes cepas o aislados de *Salmonella*, se trabajó con una resiembra de cada cepa en un volumen final de 25 ml de LB, ajustando la DO_{550 nm} inicial a 0,07-0,1. Se incubó la resiembra 30 min a 37°C con agitación orbital a 150 rpm hasta alcanzar una DO_{550 nm} de 0,15-0,2 (equivalente a 5×10^7 cfu/ml (*colony-forming unit*; unidades formadoras de colonias por mililitro), momento en el que se infectaron los cultivos con los fagos de interés a una MOI de 1. Seguidamente, los cultivos se incubaron a 37°C con agitación durante 24 h. Se tomaron muestras cada 30 min desde la infección hasta las primeras 2,5 h, y posteriormente cada hora hasta las 6,5 h de la infección y, por último, a las 24 h. Con dichas muestras se realizó la medida de la DO_{550 nm}, el recuento de viables de *Salmonella* mediante siembra en superficie de la dilución adecuada del cultivo en NaCl 0,9 % en placas de agar LB y, también se determinó la concentración de bacteriófagos titulando la dilución adecuada del cultivo en MgSO₄ 10 mM mediante el método de doble capa (véase apartado 3.3.3.2). Se procedió al recuento del número de colonias y calvas tras la incubación de las placas a 37°C durante 18 h y se expresaron los resultados en cfu/ml o pfu/ml. Se incluyeron como controles cultivos de las diferentes cepas problema sin infección.

3.3.5 Eficiencia de plaqueo

Para la evaluación de la eficiencia del plaqueo (*efficiency of plating*; EOP) de los diferentes bacteriófagos sobre las bacterias de interés se realizaron cultivos de 18 h a 37°C y se titularon diluciones decimales seriadas del fago apropiado mediante el método de doble capa (véase apartado 3.3.3.2). Las placas se incubaron a 37 °C durante 18 h y se contó el número de pfu/placa. La EOP se calculó como describen Mirzaei y Nilsson (2015) obteniendo la razón: PFU promedio en las bacterias problema/PFU promedio en la bacteria control y la desviación estándar para tres ensayos independientes. La clasificación de los valores promedio de EOP fue similar a la descrita por otros autores (Viazis *et al.*, 2011; Khan Mirzaei y Nilsson, 2015), considerando los valores de 0,5-1 como EOP de "alta" eficiencia; valores de 0,2-0,5 como eficiencia "media", y valores entre 0,001-0,2, como eficiencia "baja".

3.3.6. Determinación de la emergencia de cepas de *Salmonella* resistentes a bacteriófagos

La aparición de clones de *Salmonella* resistentes a los bacteriófagos UAB_Phi20, UAB_Phi78 y UAB_Phi87 se determinó en 3 condiciones diferentes: i) durante la infección de cultivos *in vitro*, ii) en experimentos de terapia de fagos *in vivo* en pollos de engorde experimentalmente contaminados con *Salmonella* (Colom *et al.*, 2015; Colom *et al.*, 2017) y iii) en el tratamiento con bacteriófagos de lonchas de jamón cocido previamente contaminadas con *Salmonella*.

3.3.6.1. Resistencia a bacteriófagos *in vitro*

La metodología utilizada para determinar la resistencia de *Salmonella* ATCC14028 Rif^R durante la infección de cultivos *in vitro* fue similar a la detallada en el apartado 3.3.4. Para este estudio, se aislaron colonias de: i) cultivo control no infectado con bacteriófago y ii) cultivos infectados con el cóctel de los tres bacteriófagos. En los tiempos 0, 4, 6,5 y 24 h posinfección, se sembraron

diluciones decimales de las muestras tomadas en LB agar suplementado con rifampicina. Posteriormente, se seleccionaron aleatoriamente 50 colonias de los cultivos infectados y del control por cada tiempo.

Cada colonia se sembró en forma de estría en una placa de agar LB suplementado con rifampicina y se incubó a 37°C durante 18 h. Las placas se guardaron a 4°C hasta su posterior utilización.

3.3.6.2. Resistencia a bacteriófagos durante terapia fágica

La selección de clones de *Salmonella* se realizó a partir de muestras de ciego obtenidas de un estudio de terapia fágica de pollos de engorde experimentalmente contaminados con *Salmonella* Typhimurium ATCC14028 Rif^R realizado previamente por nuestro grupo de investigación (Colom *et al.*, 2015; Colom *et al.*, 2017). Las muestras de ciego correspondían a grupos de pollos control no tratados y grupos de pollos a los que se administró un cóctel de bacteriófagos (UAB_Phi20, UAB_Phi78 y UAB_Phi87) a una concentración de 1×10^{11} pfu/ml (1:1:1). A los días 1, 8 y 15 posinfección, se sacrificaron 8 pollos y se obtuvieron muestras del ciego para la cuantificación de *Salmonella* siguiendo la metodología previamente descrita (Colom *et al.*, 2015). Posteriormente, se seleccionaron al azar treinta colonias de las placas de las muestras de ciego pertenecientes al grupo de control (240 colonias por período (0, 8 y 15 días después de la infección); 720 colonias en total). Con respecto a los grupos tratados con el cóctel de bacteriófagos, se seleccionaron todas las colonias cultivadas en placas en los tres períodos estudiados. De esta forma, se seleccionaron un máximo de 30 colonias por muestra de ciego (166 colonias en el día 1, 225 en el día 8 y 240 en el día 15; 630 colonias en total).

Para aislar los diferentes clones de *Salmonella* se procedió de forma similar a la descrita en el apartado 3.3.6.1.

3.3.6.3. Resistencia a bacteriófagos durante el tratamiento de lonchas de jamón contaminadas experimentalmente

Para el aislamiento de clones de *Salmonella* durante el tratamiento con bacteriófagos de matrices alimentarias, se usó como modelo lonchas de jamón cocido envasadas y adquiridas en un supermercado local, las cuales fueron previamente contaminadas con *S. Typhimurium* ATCC14028 Rif^R. En cada paquete de jamón cocido se comprobó la ausencia de *Salmonella* y de bacteriófagos mediante métodos de enriquecimiento (Guttman *et al.*, 2005).

Los procesos de preparación, contaminación, tratamiento y secado del jamón cocido se llevaron a cabo en una cabina de seguridad biológica de nivel II (Telstar™ Bio II Advance 4; Telstar Technologies S.L.). Primero, se cortaron las lonchas de jamón cocido en piezas de 49 cm² utilizando material estéril. Previamente a la contaminación y para eliminar los restos de conservantes, el jamón se lavó en NaCl 0,9 % por inmersión (300 ml NaCl 0,9 % por cada 25 lonchas de 49 cm²) en bandejas de Pyrex esterilizadas mediante autoclave y con agitación orbital a 50 rpm durante 5 min. Las piezas de jamón cocido se depositaron sobre bandejas recubiertas con papel de aluminio de 1.225 cm², las cuales fueron previamente desinfectadas con etanol al 70 % e irradiadas con luz ultravioleta durante 15 min por cada cara, y se secaron en la cabina durante 5 min por ambas caras. A continuación, se contaminaron las piezas con 6,1 ml de un cultivo de *Salmonella* en NaCl 0,9 % a 1×10^7 cfu/ml por una sola cara mediante pulverizado con un aerógrafo acoplado a un compresor (Ventus Air-23) a una presión de 1,5 bares. Tras 15 min de secado, las piezas se trataron mediante pulverización con 6,1 ml del cóctel de bacteriófagos (UAB_Phi20, UAB_Phi78 y UAB_Phi87) a una concentración de 1×10^9 pfu/ml (1:1:1) en MgSO₄ 10 mM y se dejaron secar las piezas durante 15 min. Las muestras control, no tratadas, se pulverizaron con el mismo volumen de MgSO₄ 10 mM. Cada pieza de jamón cocido se guardó individualmente en bolsas Whirl-Pak con filtro (Nasco, Fort Atkinson, WI) a 4°C durante 7 días. A los días 0, 1, 3, 5 y 7 se cogieron 5 piezas de cada grupo y se añadieron 50 ml de agua peptonada

tamponada (BPW; Merck) a cada bolsa y se trituró el contenido con un *Bagmixer* (Interscience) a la máxima velocidad durante 60 s. Finalmente, se determinó la concentración de *Salmonella* mediante siembra en superficie de la dilución adecuada del cultivo en NaCl 0,9 % en placas de XLD. Finalmente, se seleccionaron un total de 240, 232 y 214 colonias de placas XLD de las siembras a los 0, 3 y 7 días procedentes de las muestras para los estudios de caracterización de la resistencia de fagos. Con respecto a las muestras tratadas, se seleccionaron 235, 198 y 232 clones correspondientes a los días 0, 3 y 7, respectivamente.

Para aislar los diferentes clones de *Salmonella*, se procedió de forma similar a la descrita en el apartado 3.3.6.1.

3.3.6.4. Determinación de la susceptibilidad a los bacteriófagos

En el estudio de resistencia a los bacteriófagos, se realizó un proceso de purificación de los clones de *Salmonella* ATCC14028 Rif^R para asegurar la ausencia de bacteriófagos contaminantes en las colonias recuperadas de los experimentos comentados anteriormente. Para ello, dichas colonias se sembraron en estría en placas verdes (Chan *et al.*, 1972) mediante tres cultivos consecutivos. Las condiciones de incubación fueron las habituales. En estas placas, cuando hay lisis por efecto del fago, se libera el contenido del citosol al medio, provocando un descenso del pH, lo que provoca el viraje del color de las colonias a verde oscuro azulado, revelando la presencia de bacteriófagos. En cambio, cuando no hay bacteriófagos, las colonias son de color verde claro. Tras los tres pases, se recuperaron las colonias y se sembraron en LB suplementado con rifampicina.

La susceptibilidad a los bacteriófagos UAB_Phi20, UAB_Phi78 y UAB_Phi87 de los aislados de ATCC14028 Rif^R se determinó mediante dos aproximaciones: i) mediante test de la gota, inoculando 10 µl de cada lisado (1×10^6 pfu/ml) sobre una capa de agar inoculada con cada uno de los clones recuperados e incubando durante 18 h a 37°C (Kutter, 2009) y ii) infectando cultivos

líquidos de cada aislado con el bacteriófago de interés en placas de 96 pocillos (Sterilin™, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). Para ello, se realizaron cultivos de noche de cada aislado en 200 µl de LB en placas de 96 pocillos. Al día siguiente, se preparó una dilución 1:200 en 200 µl de LB de cada cultivo de noche y se incubó la placa de 96 pocillos a 37°C con agitación a 500 rpm (K3E, Ovan, Barcelona, España). Cuando la DO_{550 nm} llegó a 0,12-0,15 (equivalente a 1×10^7 cfu/ml) se infectaron los cultivos con el fago a una MOI de 0,1 y las placas se incubaron a 37°C con agitación a 500 rpm. A las 0, 1,5, 2,5, 3,5 y 4,5 h (siendo 1,5 h el momento de infección con el fago) se realizaron medidas de la densidad óptica (DO_{550 nm}) con el lector de placas modelo Sunrise (Tecan Trading AG, Suiza). Se utilizaron como controles las cepas ATCC 14028 Rif^R (susceptible a los 3 bacteriófagos) y TA1537 (resistente a los tres bacteriófagos). Además, se incluyó como control los cultivos de cada aislado sin infectar. Se consideraron resistentes aquellos aislados cuya DO_{550 nm} aumentó a lo largo del tiempo de forma similar a la del cultivo sin infectar. En cambio, se consideraron susceptibles al fago aquellos cuya DO_{550 nm} disminuyó a lo largo del tiempo.

3.3.6.5. Determinación de la permeabilidad al cristal violeta

Las cepas con una estructura de LPS defectuosa muestran una mayor permeabilidad a ciertas moléculas hidrófobas, como el cristal violeta (Maron y Ames, 1983). Con este objetivo, la alteración de la permeabilidad de los aislados de *Salmonella* se determinó mediante un ensayo de permeabilidad al cristal violeta (Mortelmans y Zeiger, 2000). Para ello, se realizó una dilución 1:10 de un cultivo de noche de cada clon de *Salmonella* y se sembraron 0,1 ml mediante doble capa en una placa de LB agar. Tras su solidificación, se depositaron 3 discos de papel de filtro estéril (Whatman®, 6 mm) sobre que se adicionaron 10 µl de cristal violeta estéril al 0,1 %. Después de incubar las placas a 37°C durante 18 h se midió el diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano. Como controles se utilizaron las cepas *S. Typhimurium* ATCC 14028 Rif^R

(rfa +) y TA1537 (*rfa*). Además, las cepas derivadas de LT2 con mutaciones de LPS (Tabla 2.1.) también se incluyeron en este estudio.

3.3.6.6. Determinación del perfil del LPS de *Salmonella*

El perfil del lipopolisacárido (LPS) de los diferentes clones de *Salmonella* estudiados se determinó por visualización electroforética siguiendo un protocolo experimental adaptado a partir del descrito previamente por Buendia-Claveria *et al.*, 2003 y facilitado por el Dr. J. Casadesús (Universidad de Sevilla, España). Se partió de 10 ml de cultivo de noche de cada aislado y se centrifugó a 8.228 x g durante 5 min a 4°C (Eppendorf 5810R, Madrid, España). El sedimento se disolvió en NaCl 0,9 %, repitiéndose el proceso 3 veces. A continuación, se ajustó la DO_{600 nm} a 1 en un volumen final de 500 µl de NaCl 0,9 %. La suspensión celular se volvió a centrifugar a 4.293 x g (Minispin, Eppendorf, Madrid, España) para eliminar el sobrenadante. El sedimento se disolvió en 62,5 µl de tampón 1 (60 mM Tris; 1 mM EDTA; SDS 2 %; pH 6,8) y se hirvió durante 6 min. Después de atemperar las muestras se añadieron 437,5 µl de tampón 2 (60 mM Tris; 1 mM EDTA; pH a 6,8) y 0,75 µl de RNAsa (20 mg/ml) y 1 µl de DNasa RNA free (Roche, Barcelona, España; 10 U/ µl) y se incubaron 4 h a 37°C. Posteriormente, se añadieron 7,5 µl de Proteinasa K (Roche, Barcelona, España; 10 mg/ml) y se incubaron las muestras toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se preparó un gel de acrilamida/bisacrilamida 30 % (37,5:1; Bio Basic, Markham, Canadá) con la parte inferior (*lower*) al 15 % (1,5 M trizma base; SDS 4 %; pH 8,8) y la parte superior (*upper*) al 12 % (0,5 M trizma base; SDS 4 %; pH 6,8). En paralelo, 35 µl de la suspensión celular se mezclaron con 35 µl de tampón de carga (5,9 ml tampón 1, 4 ml glicerol 100 %, 0,6 ml de solución saturada de azul de bromofenol y 0,8 ml β-mercaptoetanol). Las mezclas se hirvieron durante 6 min y se centrifugaron a 9.660 x g (Minispin, Eppendorf, Madrid, España) durante 7 min. A continuación, se cargaron 25 µl de cada muestra y se corrió el gel durante 3 h a 170 V. Para la electroforesis se utilizó un tampón para el cátodo (Tris-HCl 0,1 M; tricina 0,1 M; SDS 0,1 %; pH

8,25) y otro tampón para el ánodo (Tris-HCl 0,2 M; pH 8,9), cargándose las muestras en el cátodo (Lesse *et al.*, 1990). Como marcador de peso molecular se utilizó el marcador Rainbow (Rainbow™; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). Para visualizar los perfiles de LPS, los geles se tiñeron con una tinción de plata. Para ello, los geles se depositaron en una solución de fijación (30 % etanol absoluto y 10 % ácido acético) durante 4 h. Posteriormente, se sumergieron en una solución de oxidación (30 mM periodato de sodio preparado en solución de fijación) y se realizaron 5 lavados con H₂O grado Milli-Q (x 5 min.). A continuación, se incubaron los geles con la solución de tinción (nitrato de plata 50 mM) durante 30 min en oscuridad, tras lo cual se realizó un lavado de 6 min con H₂O grado Milli-Q. Finalmente, se añadió la solución reveladora (carbonato de sodio 280 mM y 0,014 % formaldehído) y se paró la reacción con ácido acético al 1 % durante 5 min y, posteriormente, se realizaron 3 lavados con H₂O grado Milli-Q. La visualización y adquisición de las imágenes de los geles se realizó con el sistema Gel Doc XR system (Bio-Rad Laboratories, S.A).

3.4. Encapsulación de bacteriófagos

El proceso de nano y microencapsulación del bacteriófago UAB_Phi20, así como la cuantificación de la eficiencia de la encapsulación, se ha realizado usando métodos previamente desarrollados por nuestro laboratorio (Colom, *et al.*, 2015; Colom *et al.*, 2017; Cortés *et al.*, 2018). A continuación, se detalla brevemente el proceso de encapsulación en liposomas y en alginato.

3.4.1. Liposomas

El bacteriófago UAB_Phi 20 (1×10^{11} pfu/ml) se encapsuló mediante el método *Thin-film hydration* (Benett-Guerrero *et al.*, 2000). Para ello, se usó una mezcla de lípidos compuesta por *1,2-dilauroyl-rac-glycero-3-phosphocoline* (DLPC), *cholesteryl polyethylene glycol 600 sebacate*

(Chol-PEG600), *cholesterol* (Chol) y *cholesteryl 3 β -N (dimethylaminoethyl)carbamate hydrochloride* (cholesteryl) en una relación molar de 1:0,1:0,2:0,7. Dicha mezcla se preparó añadiendo la cantidad correspondiente de cada lípido previamente disuelto en cloroformo (100 mg/ml) hasta alcanzar una concentración final total de lípidos de 17 mM, siguiendo la relación molar previamente especificada. A continuación, se eliminó el cloroformo mediante vacío y nitrógeno para obtener una película lipídica seca, la cual fue hidratada posteriormente con la suspensión de cada bacteriófago en MgSO₄ 10 mM a una concentración igual o superior a 10¹¹ pfu/ml, mediante agitación durante 1 h. Durante la hidratación de la película, se forman vesículas multilamelares lipídicas atrapando a los bacteriófagos en su interior. Para la obtención de vesícula unilamelares de tamaño uniforme la suspensión de vesículas multilamelares se pasó por un extrusor (Lipex Biomembranes, Vancouver, Canadá) y una membrana de policarbonato con poros de 400 nm de diámetro. Finalmente, los liposomas se guardaron a 4°C hasta su utilización.

3.4.2. Alginato

El bacteriófago UAB_Phi20 (1×10^{11} pfu/ml) se microencapsuló en alginato con o sin CaCO₃ siguiendo el protocolo previamente desarrollado por nuestro laboratorio (Colom *et al.*, 2017; Cortés *et al.*, 2018). Para ello, se añadió alginato sódico (1,8 %) a una suspensión de cada bacteriófago a 10¹¹ pfu/ml en MgSO₄ 10 mM y se homogenizó durante toda la noche hasta la completa disolución del alginato. Cuando fue necesario, se añadió CaCO₃ (1 %) a la suspensión de fagos y alginato. Paralelamente, se prepararon 50 ml de CaCl₂ al 2 % en un recipiente circular cóncavo de 17 cm de diámetro para la gelificación del alginato. Posteriormente, la suspensión de bacteriófagos con alginato se pulverizó sobre el baño de CaCl₂ utilizando una boquilla B-290 (Buchi, Flawil, Suiza) a una presión de 2,7 bares y a una velocidad de 1,5 ml/min. Las cápsulas de alginato gelificadas se dejaron en el baño de CaCl₂ durante 90 min agitándose a 150 rpm, tiempo en el cual se produce el endurecimiento de estas. Finalmente, las cápsulas obtenidas se recuperaron

y se centrifugaron a 469 x g durante 5 min y se retiró el sobrenadante. Las cápsulas se lavaron con MgSO₄ 10 mM tres veces y se resuspendieron en MgSO₄ 10 mM, ajustando al volumen final deseado y se guardaron a 4°C hasta su utilización.

3.4.3. Caracterización y cálculo de la eficiencia de encapsulación

Para la caracterización de los diferentes métodos de encapsulación se emplearon técnicas desarrolladas y validadas por nuestro grupo de investigación (Colom, *et al.*, 2015; Colom *et al.*, 2017; Cortés *et al.*, 2018) las cuales se detallan brevemente a continuación.

La distribución de tamaños de las vesículas lipídicas, así como su potencial ζ superficial se determinaron usando el equipo *Zetasizer Nano ZS* (Malvern Instruments, Reino Unido) que analiza la dispersión dinámica de la luz (*dynamic light scattering, DLS*) combinado con técnicas de retrodispersión no invasivas. Para determinar el tamaño de las cápsulas de alginato con y sin CaCO₃, se utilizó el equipo *Mastersizer 2000* (Malvern Instruments, Reino Unido) que realiza un ensayo granulométrico basado en la difracción laser (*laser diffraction, LD*). En ambos casos se determinó el tamaño y el potencial ζ calculando el promedio de tres mediciones independientes de 1 ml de muestra diluida 10 veces para los liposomas y sin diluir para las cápsulas de alginato.

La eficiencia de encapsulación (EE) se calculó siguiendo la siguiente fórmula: $EE (\%) = [(C_{total} - C_{libre}) / C_{total}] \times 100$; donde C_{total} es la concentración total de fagos, y C_{libre} es la concentración de fago sin encapsular. Las concentraciones de fago libre y fago total se determinaron mediante titulación en doble capa de agar. En el caso de las cápsulas lipídicas, C_{libre} se calculó realizando diluciones seriadas 1:10 de los fagos encapsulados en liposomas. Para cuantificar C_{total} , se trataron 500 μ l de fagos encapsulados con 500 μ l de sales biliares 50 mM (Sigma-Aldrich, Missouri, EE. UU.). Posteriormente, se realizaron las diluciones adecuadas para su titulación. Por lo que respecta a las cápsulas de alginato, C_{total} se obtuvo mediante la titulación

directa de diluciones decimales seriadas de las cápsulas, las cuales se rompen durante la gelificación de la doble capa de agar. Para cuantificar C_{libre} , se filtraron 500 μl de las capsulas a través de membranas PES (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda) de 0,22 μm , quedando las cápsulas de alginato atrapadas en la membrana. Igualmente, se realizaron las diluciones adecuadas para realizar la titulación.

Las nanocápsulas de lípidos mostraron un tamaño medio de $341,6 \pm 8.6$ nm, un potencial ζ de $+34 \pm 5,0$ mV, y una eficiencia de encapsulación alrededor del 46 %. Por lo que hace referencia a las microcápsulas de alginato, las realizadas con CaCO_3 mostraron un tamaño entre 123,7 y 149,3 μm con un porcentaje de encapsulación del 99 %, aproximadamente. Las cápsulas que sólo contenían alginato mostraron un tamaño alrededor de 150 μm y con un porcentaje de encapsulación similar al mencionado anteriormente.

3.5. Transcitosis de bacteriófagos en un modelo de barrera intestinal

Los ensayos de transcitosis *in vitro* se llevaron a cabo con las líneas celulares humanas de adenocarcinoma colorrectal Caco-2 y HT29. Las células Caco-2 fueron amablemente facilitadas por la Dra. Isabella Angelis (Istituto Superiore di Sanità, Italia), y las células HT29 (ATCC® HTB-38™) y the Raji-B (ATCC® CCL-86™) se compraron en la colección americana de cultivos tipo (*American Type Culture Collection*, ATCC; Manassas, Estados Unidos.). Todas las líneas celulares se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (del inglés, DMEM) con alta concentración de glucosa y sin piruvato (DMEM w/o Piruvate, Life Technologies, California, Estados Unidos) suplementado con suero bovino fetal (SBF) (Biowest, Nuaille, Francia) al 10 %, aminoácidos no esenciales (NEAA) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) al 1 %, y 2,5 mg/ml de plasmocina (InvivoGen, California, Estados Unidos). Los cultivos celulares se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada de 5 % de CO_2 y 95 % de aire. De forma rutinaria, las líneas

celulares Caco-2 y HT29 se subcultivaron una vez a la semana con 1 % de tripsina-EDTA (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) a $7,5 \times 10^5$ células/75 cm² flascón y 4×10^5 células/75 cm² flascón, respectivamente.

La transcitosis del bacteriófago UAB_Phi20 encapsulado y no encapsulado en liposomas se realizaron en monocapas de células Caco-2 y HT29 generadas en placas de 12 pocillos usando el sistema *Transwell*® (*Polyethylene Terephthalate Transwell*®, PET; Merk Millipore, Darmstadt, Germany) con poros de 1 µm de diámetro y un área de 1,12 cm², generando dos compartimentos separados que diferencian el lado apical del basolateral. Brevemente, $1,7 \times 10^5$ células de Caco-2 y HT29 se mezclaron en medio DMEM con FBS y se sembraron en el compartimento apical del *Trasnwell* a una ratio 90:10, respectivamente. Posteriormente, las células se incubaron a 37°C y con atmósfera humidificada al 5 % de CO₂ durante 21 días, formándose una monocapa de células polarizadas sobre la superficie del *Trasnwell*. El día 14 de incubación se añadieron linfocitos B Raji en el compartimento basolateral del *Trasnwell* para promover la diferenciación del 10 % de las células Caco-2 a células M. El medio de cultivo se cambió cada dos días (García-Rodríguez *et al.*, 2018). Tras 21 días de incubación, se determinó la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de todas las monocapas celulares usando un ohmímetro (Millicell ERS-2 Voltohmmeter; Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Sólo se aceptaron las monocapas con valores de TEER > 300 Ω/cm². El bacteriófago UAB_Phi20 (0,5 ml, 1×10^{10} y 1×10^7 pfu / ml) disuelto en medio DMEM con FBS se inoculó en el lado apical del *Transwell*. A las 2, 6, 24 y 48 h después de la inoculación, los bacteriófagos de los lados apical y basolateral del *Transwell* se cuantificaron mediante doble capa de la cepa LB5000, como se ha descrito anteriormente (véase apartado 3.3.3.2). Para ello, el volumen del lado basolateral (1,5 ml) se eliminó y se reemplazó con DMEM fresco con FBS. El TEER se midió después de cada prueba de transcitosis para garantizar la integridad y la polarización de los cultivos celulares. El bacteriófago UAB_Phi20 encapsulado en liposomas (0,5 ml, 1×10^{10} y 1×10^7 pfu / ml) se analizó en los mismos períodos de tiempo y condiciones, sin

embargo, se utilizó medio DMEM sin FBS, ya que la presencia de FBS producía la agregación de los liposomas.

3.6. Biodistribución *in vivo* de bacteriófagos en un modelo murino

3.6.1. Tinción del bacteriófago y determinación de la fluorescencia *in vitro*

El bacteriófago UAB_Phi20 purificado (1×10^{12} pfu/ml) se tiñó con el fluorocromo Vivo-Tag S 750 (PerkinElmer, Massachusetts, Estados Unidos). Para ello, se añadieron 100 μ l del fluorocromo por cada mililitro de lisado fágico. Después de incubar la mezcla durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad, se diluyó el bacteriófago 10 veces en MgSO_4 10 mM y se lavó por ultrafiltración usando tubos Amicon Ultracel10 KDa (Merk Millipore, Carrigtwohill, Irlanda) durante 5 min a $5.000 \times g$ y 20°C (Eppendorf 5810R). A continuación, se calculó la relación fluorocromo:bacteriófago (F:P), midiendo la absorbancia a 750 y 280 nm usando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) y aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Relación F:P} = \frac{A(750)/\epsilon \text{ molar}}{[(A(280)-(A(750) \times 0.06 \text{ Cross talk}))/\epsilon \text{ molar}]/\text{Masa molecular del fago}};$$

donde el coeficiente de extinción (ϵ molar) es $24.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el fluorocromo Vivo Tag-S 750 y $10 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para una mezcla de proteínas (lisado de bacteriófagos), el *Cross talk* del fluorocromo Vivo Tag-S 750 es del 6 % (0,06) y, se consideró la masa molecular del bacteriófago P22 la cual es de $5,22 \times 10^{10}$ mg/mol. Finalmente, se determinó la concentración de la suspensión de bacteriófagos marcados mediante doble capa de agar con la cepa *S. Typhimurium* LB5000 (véase apartado 3.3.3.2). El bacteriófago marcado se encapsuló en la mezcla de liposomas tal y como se indica en el apartado 3.4.1 para el estudio de distribución *in vivo*. Para medir la producción de fluorescencia del bacteriófago UAB_Phi20 conjugado con el fluorocromo Vivo Tag-S 750 no encapsulado y encapsulado en liposomas se realizaron diluciones seriadas a la mitad de la

suspensión de bacteriófagos conjugados de $5,8 \times 10^{11}$ a $1,1 \times 10^9$ pfu/ml en placas opacas de 96 pocillos. La señal de fluorescencia (FLI) se evaluó mediante la cuantificación cualitativa de las unidades de la eficiencia de radiación (*radiant efficiency*, RE; radiación fluorescente emitida proporcional a al poder de excitación incidente). Después se correlacionó la señal de fluorescencia de cada pocillo con la concentración correspondiente del bacteriófago marcado.

La medición de la fluorescencia de VTS-750 se llevó a cabo utilizando el sistema de imágenes IVIS Spectrum (PerkinElmer), y las imágenes y la señal RE se registraron y analizaron utilizando el paquete informático Living Image 4.5 (PerkinElmer). Posteriormente, se determinó la intensidad FLI media y el error estándar correspondiente (SEM) o la desviación estándar (SD). Todos los análisis y la construcción del gráfico se realizaron con el paquete informático GraphPad Prism 5 (GraphPad Prism).

3.6.2. Determinación de la fluorescencia *in vivo* y *ex vivo*

La biodistribución del bacteriófago UAB_Phi20 conjugado con el fluorocromo Vivo Tag-S 750 encapsulado en liposomas o no encapsulado se evaluó *in vivo* y *ex vivo* en ratones atímicos hembra sin pelo (*nude*) de 5 semanas de edad (*Mus musculus*, cepa Hsd:Athymic Nude-Foxn1; ENVIGO, Santa Perpètua de la Mogoda, España). Los animales permanecieron en habitaciones de cuarentena durante 8 días para su aclimatación y supervisión veterinaria, tiempo tras el cual se estabularon en condiciones libres de patógenos (*Specific Pathogen Free*, *SPF*) en jaulas con autoventilación y con comida y bebida administrada *ad libitum*.

Los bacteriófagos encapsulados y no encapsulados se administraron de forma oral en una única dosis de $1,3 \times 10^{13}$ pfu/kg de ratón. El volumen administrado correspondió a 22,4 ml/kg. Por cada grupo de 8 animales, se incluyó un ratón no tratado con el bacteriófago como control de autofluorescencia para eliminar los niveles propios de fluorescencia de los tejidos. A las 2,5 y 5,5

horas posadministración se monitorizó de forma no invasiva la fluorescencia emitida por el fluorocromo VTS-750 (*VTS-750 fluorescence image, FLI*) en todo el cuerpo de cada ratón, adquiriendo imágenes tanto de la zona dorsal como ventral.

Posteriormente, 30 min más tarde, a las 3 y 6 horas posadministración los animales se sacrificaron por dislocación cervical mientras permanecían anestesiados y se realizó la extracción de forma aséptica del estómago, intestino, bazo, hígado, riñón, músculo y sangre de cada ratón (en grupos de 4 animales por tiempo). Se determinó la acumulación de bacteriófagos en los diferentes tejidos respectivos mediante la monitorización de la fluorescencia VTS-750 *ex vivo*, adquiriendo vistas ventrales y dorsales de los órganos. Finalmente, la concentración de bacteriófagos se determinó en órganos completos (estómago, intestino, hígado, bazo y riñón), una porción dorsal del músculo y del volumen de sangre que se extrajo con una punción cardíaca para obtener plasma. Todas las muestras se pesaron y luego se resuspendieron en 2 ml de MgSO₄ (10 mM). Posteriormente, las muestras se homogeneizaron mecánicamente durante 15 min y las diluciones seriadas de los homogeneizados se plaquearon utilizando el método de doble capa de agar (véase apartado 3.3.3.2). La concentración de bacteriófagos encapsulados también se determinó en los tejidos de ratones tratados con fagos encapsulados en liposomas, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (véase apartado 3.4.1). Además, la presencia o ausencia de bacteriófagos se verificó en todos los tejidos, incluidos los de ratones control no tratados con bacteriófagos, utilizando protocolos de enriquecimiento (Guttman *et al.*, 2005).

La monitorización de la fluorescencia FLI *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* se realizó con el sistema IVIS Spectrum imaging system (PerkinElmer, Massachusetts, Estados Unidos) como se ha mencionado anteriormente.

Todos los experimentos *in vivo* y *ex vivo* se realizaron por el grupo ICTS “NANBIOSIS” del área CIBER-BBN’s *in vivo experimental platform of the functional validation & preclinical research* (FVPR) (<http://www.nanbiosis.es/unit/u20-in-vivoexperimentalplatform/>) y el laboratorio

Laboratory Animal Service (LAS) del Institut de Recerca de la Vall d'Hebró (VHIR; Barcelona).

Los animales fueron tratados de acuerdo con las indicaciones de la comisión ética (Comissió d'Ètica en l'Experimentació Animal i Humana [CEEAA]) del VHIR, Barcelona. El estudio fue aprobado y se le asignó el número de autorización 69/15.

3.7. Microscopía

La evaluación de la integridad y polarización de las monocapas celulares durante la transcitosis de bacteriófagos se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Por otro lado, la microscopía de láser confocal (CLSM) se usó para observar la transcitosis de los bacteriófagos, encapsulados o no en liposomas, a través de la monocapa celular, así como su localización en la célula.

3.7.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se incubaron las monocapas celulares con bacteriófagos (0.5 mL; 1×10^{10} pfu/ml) en la parte apical del *Transwell* durante 48 h (véase apartado 3.3.7) y se lavaron con tampón fosfato salino (PBS 1 x). Posteriormente, se fijaron durante 2 h a 4°C con glutaraldehído al 2,5 % en tampón cacodilato 0,1 M (pH 7,2). Las monocapas fijadas se lavaron 4 veces con H₂O grado MilliQ y se deshidrataron con concentraciones crecientes de acetona. A continuación, las monocapas se embebieron en resina Epon 812 polimerizada durante 48 h. Los bloques de resina se cortaron utilizando un micrótopo (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) hasta obtener secciones ultrafinas (60-70 nm), las cuales se tiñeron con acetato de uranilo durante 30 min y solución de Reynolds con citrato durante 5 min. Finalmente, las monocapas celulares se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1400 en el Servei de Microscopia de la UAB.

3.7.2. Microscopía de laser confocal (CLSM)

El bacteriófago UAB_Phi20 y los liposomas se tiñeron con SYBR Gold y Vybrant DiI (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos), respectivamente, siguiendo un protocolo previamente descrito (Colom *et al.*, 2015). Los bacteriófagos no encapsulados y encapsulados en liposomas (0,5 mL; 1×10^{10} pfu/ml) se depositaron en el compartimento apical del *Transwell* y se incubaron durante 2 h a 37°C en oscuridad. Posteriormente, las monocapas celulares se lavaron con PBS 1x y se fijaron con paraformaldehído al 4 % (Sigma Aldrich, Missouri, Estados Unidos) durante 15 min a 37°C y en oscuridad. Las monocapas fijadas se lavaron con PBS 1x y se guardaron a 4°C hasta su utilización. Para observar las células, se tiñeron los núcleos celulares y las membranas plasmáticas durante 15 min a temperatura ambiente con Hoechst 33342 y CellMask DeepRed (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos), respectivamente. Después, las monocapas se colocaron boca abajo en una placa de cultivo de 35 mm con el fondo de vidrio con pocillos de 14 mm de diámetro (MatTek Corporation, Massachusetts, Estados Unidos). Las monocapas celulares se observaron en el microscopio de láser confocal Leica TSC SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) usando el objetivo PL APO 63x/1.4-0.6 oil CS (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Las imágenes se procesaron con los paquetes informáticos Fiji (Schindelin *et al.*, 2012) e IMARIS (Bitplane, Zurich, Switzerland) para visualizar los cortes ortogonales de las imágenes del confocal y para obtener las reconstrucciones tridimensionales de las secciones transversales, respectivamente. Todo el proceso se realizó en el Servei de Microscopia de la UAB.

3.8. Técnicas de Biología Molecular

3.8.1. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Los oligonucleótidos (Invitrogen, California, Estados Unidos) empleados en las distintas técnicas se detallan en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Cebadores utilizados en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Aplicación	Referencia
Oligonucleótidos empleados para la detección mediante PCR de los bacteriófagos UAB_Phi20, UAB_Phi78 y UAB_Phi87			
GP18up	TTAGATGAACGAAAATTTTGGTGGT	Detección del bacteriófago UAB_Phi20	
GP18rv	CCGAAAATGGAATGGTCTGG		
GP13up	TATGGCTGGCAAAATCTAAGGAGT	Detección del bacteriófago UAB_Phi78	Colom <i>et al.</i> , 2016
GP13rv	ACCACCAAAAATTCGTTATCTAA		
ORF131up	CAAAACTTCCCTCTTCATCCGTATC	Detección del bacteriófago UAB_Phi87	
ORF131rv	GCTGCTGGCAATTCCTTATC		
Oligonucleótidos empleados para la amplificación por PCR y secuenciación de los <i>loci</i> CRISPR de <i>Salmonella</i>			
CRISPR1_1F	CAGCATATTGACAAGGGCGT	PCR y Secuenciación <i>loci</i> CRISPR	
CRISPR1_5R	TGAAAAACAGACGTAATCCGGTAGAT	PCR y Secuenciación <i>loci</i> CRISPR	
CRISPR1_6F	GTTACGTTCCGGTAAATGGAA	Secuenciación <i>loci</i> CRISPR	
CRISPR1_6R	TTCATTTACCGAACGTAAC	Secuenciación <i>loci</i> CRISPR	
CRISPR2_1F	TCCAGCTCCCCTTATGATTTT	PCR y Secuenciación <i>loci</i> CRISPR	Este estudio
CRISPR2_3R	ATTGTTGCGATTATGTTGGT	PCR y Secuenciación <i>loci</i> CRISPR	
CRISPR2_9F	GTGACGTCAGTGCCGAA	Secuenciación <i>loci</i> CRISPR	
CRISPR2_9R	TTCGGCACTGACGTCAC	Secuenciación <i>loci</i> CRISPR	

Tabla 2.2. Continuación.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Aplicación	Referencia
Oligonucleótidos empleados para la amplificación, secuenciación y clonación de genes de <i>Salmonella</i>			
rfc_up	GTTGGTAATGATGGCTCA	PCR y Secuenciación gen <i>rfc</i>	
rfc_rv	CACCTTATTTGCCCTGATG		
rfc_int_up	GACTGCTATAACAGCAAAC	Secuenciación gen <i>rfc</i>	
rfc_int_rv	GTTTGCTGTTATAGCAGTC		
HiFircFw	TTCACACAGGAAACAGTACAATGCTTATAATTTTCATACATTGC	PCR gen <i>rfc</i> para clonación por ensamblaje HiFi	Este estudio
HiFircRv	TCGACCCGGGGAATCCGGGTTAATTTATTGTTTCTTAGTAAAAACGAATC		
HiFircF	TTCACACAGGAAACAGTACAATGGATTCAATTCCTGAGATAGAAATAG	PCR gen <i>rfc</i> para clonación por ensamblaje HiFi	
HiFircR	TCGACCCGGGGAATCCGGGTTAATTTGTGGAAAAAGTTTACGATAAAG		
+128 pNAS	AGACAAGCTGTGACCCGTC	PCR y Secuenciación plásmido pUA1108	Medina-Ruiz, 2012
-108 pNAS	CCGACATCATAAACGGTTC		
Oligonucleótidos empleados en el experimento de qPCR			
<i>IL-1α</i>	F: GTCTCTGAAATCAGAAAATCCTTCTATC		Jung <i>et al.</i> , 1995
	R: CATGTCAAATTTCACTGCTTCATCC		
<i>IL-1β</i>	F: AAACAGATGAAGTGCTCCTCCAGG		Jung <i>et al.</i> , 1995
	R: TGGAGAACACCACCTTGTGCTCCA		
<i>TNFα</i>	F: TCTCGAACCCCGAGTGACAA	Análisis de la expresión de interleuquinas por qPCR	Furrie <i>et al.</i> , 2004 Bahrami <i>et al.</i> , 2010
	R: TATCTCTCAGCTCCACGCCA		
<i>IL-2</i>	F: GAATGGAATTAATAATTACAAGAAT		Jung <i>et al.</i> , 1995
	R: TGTTTCAGATCCCTTTAGTTCAG		
<i>IL-4</i>	F: TCAATTTCCCTCGGTTTCAG		Bahrami <i>et al.</i> , 2010
	R: AGAACAGAGGGGGAAGCAGT		
	R: CTTCAGCACTGGCCTTCCC		

Tabla 2.2. Continuación.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Aplicación	Referencia
<i>IL-5</i>	F: GCTTCTGCATTGAGTTTGCTAGCT		Jung <i>et al.</i> , 1995
	R: TGGCCGTCAATGTATTTCTTTATTAAG		
<i>IL-6</i>	F: CATCCTCGACGGCATCTCAG		Bahrami <i>et al.</i> , 2010
	R: GCTCTGTTGCCCTGGTCCTC		
<i>IL-8</i>	F: ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT		Jung <i>et al.</i> , 1995
	R: TCTCAGCCCTCTTCAAAAACCTTCTC		
<i>IL-10</i>	F: TCAGGGTGGGACTCTAT		Bahrami <i>et al.</i> , 2010
	R: TGGGCTTCTTCTAAATCGTTC		
<i>IL-12p40</i>	F: ATGTCGTAGAATTGGATTGGTATCCG		Jung <i>et al.</i> , 1995
	R: GTACTGATTGTCGTCAGCCACCAGC		
<i>IL-17a</i>	F: AGGCACAAACTCATCCATCC	Análisis de la expresión de	Sugihara <i>et al.</i> , 2010
	R: CCCACGGACACCAGTATTT	interleuquinas por qPCR	
<i>GM-CSF</i>	F: ACACCTGCTGAGATGAATGAAAACAGTAG		Jung <i>et al.</i> , 1995
	R: TGGACTGGCTCCCAGCAGTCAAAGGGGATG		
<i>MIF</i>	F: GTTCCCTCCGAGCTCACCCAGCAGC		Maaser <i>et al.</i> , 2002
	R: GCAGCTTGCTGTAGGAGCGGTCTG		
<i>CXCL1/GROα</i>	F: ACTCAAGAATGGGCGGAAAG		Yang <i>et al.</i> , 1997
	R: TGGCATGTGACGGCTCCT		
<i>IFNγ</i>	F: TTTGGGTTCTCTGGCTGTTACT		Blaschke <i>et al.</i> , 2000
	R: CCTTTTCGCTTCCCCTCTTTT		
<i>hBD1</i>	F: CTCTGTCAGTCAGCCTC		Furrie <i>et al.</i> , 2004
	R: CTTGCAGCACTTGGCCCTTCCC		Bahrami <i>et al.</i> , 2010

3.8.2. Extracción de DNA

La extracción del DNA cromosómico bacteriano se realizó mediante el kit comercial *Easy-DNATM* (Invitrogen, California, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante, mientras que las extracciones de DNA plasmídico se llevaron a cabo con el kit *NZYMiniprep Kit* (NZYTech, Lisboa, Portugal). Tras cada extracción se comprobó la integridad del DNA mediante electroforesis convencional y tras su visualización, se cuantificó la concentración y calidad del DNA mediante el sistema Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) y se conservó a -20°C hasta su uso.

3.8.3. 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 % (p/v; D1 LWO EOO, Pronadisa, Laboratorios Conda, Madrid, España), en función del tamaño de los fragmentos esperados. La electroforesis para recuperación de fragmentos de DNA se realizó con agarosa preparada de forma similar pero la agarosa total fue una mezcla de agarosa de bajo punto de fusión (LM-SIEVE, Laboratorios Conda, Madrid, España) y de agarosa convencional (D1 LWO EOO) en proporción 3:1. La visualización de los fragmentos se realizó con radiación UV para lo cual se añadió a la agarosa *Red Safe 1X* (Intron Biotechnology, Seongnam-Si, Korea) al 1 % de concentración final.

Antes de cargar las muestras en el gel, a las muestras se les añadió una solución transportadora en una proporción 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, Madrid, España). Las bandas de DNA se observaron con el sistema de transiluminación y captación de imagen *E-box-1000/20 M* (Vilber Loumat, Collégien, Francia). Los patrones de tamaño que se utilizaron fueron, según los casos, el DNA del fago λ

(Promega, Wisconsin, Estados Unidos) digerido con BstEII (New England Biolabs, Massachusetts, Estados Unidos), digerido con HindIII (Roche, Basilea, Suiza) y el *NZYDNA Ladder V* (NZYTech, Lisboa, Portugal).

3.8.4. Reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de DNA se realizó en un termociclador *Thermal Cycler* (Applied Biosystems, California, Estados Unidos) con el kit *Taq DNA Polymerase, native* (Invitrogen, California, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En los casos que fue necesario, se empleó el kit *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). La polimerasa *Phusion*, a diferencia de la polimerasa *Taq*, no añade colas poliA al final de los fragmentos amplificados por PCR. Cuando fue necesario se realizó la PCR desde colonia. Para ello, una colonia se resuspendió en 50 µl de agua grado MilliQ y se incubó a 100 °C durante 10 min. A cada reacción de PCR de colonia se añadieron 5 µl del hervido de colonia previamente centrifugado. Los distintos oligonucleótidos (Tabla 2.2) se utilizaron a una concentración final de 0,5 pmoles cada uno. Asimismo, se añadieron cada uno de los dNTP (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) a una concentración final de 0,2 mM. El DNA molde se añadió a razón de 100 ng por cada reacción, cuyo volumen fue de 25 µl, con excepción de los casos en que se requirió una mayor cantidad de producto amplificado, en los cuales el volumen se aumentó hasta 100 µl, manteniéndose las proporciones de cada componente.

Las condiciones de amplificación (temperatura de hibridación y tiempo de extensión) 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 o 30 s por cada kb del fragmento esperado para las polimerasas *Taq* o *Phusion*, respectivamente.

3.8.5. Obtención de células competentes

Para la obtención de células competentes se empleó la técnica descrita por Dower y col. (Dower *et al.*, 1988), con pequeñas modificaciones. Para ello se realizó una dilución 1:100 en medio LB de un cultivo de noche de la cepa deseada y se incubó a 37°C hasta alcanzar una $DO_{550\text{ nm}}$ de 0,5. Transcurrido este tiempo, el cultivo fue sedimentado y lavado tres veces consecutivas con glicerol frío estéril al 10 % (v/v) estéril mediante centrifugación a 5.000 x g durante 10 min a 4°C (Centrífuga 5810R, Eppendorf). A continuación, las células se resuspendieron en 1 ml de volumen final de la misma solución. Se realizaron alícuotas de 50 o 100 μl y se conservaron a -80°C.

3.8.6. Electrotransformación

Para la electrotransformación, un vial de 100 μl de las células receptoras, debidamente descongeladas, se puso en contacto con el ADN plasmídico (~500 ng). Tras un periodo de incubación en hielo de 5 min, la mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación (2 mm *electrode gap*, DD Biolab, Barcelona, España) y se realizó la electrotransformación mediante un pulso eléctrico de 2,5 kV/cm² a 25 μF de capacitancia y 200 Ω de resistencia (*Biorad Gene Pulser*; Biorad, California, Estados Unidos).

Tras la electroporación, las células se diluyeron en 1 ml de medio LB frío. Posteriormente, todo el contenido se transfirió a tubos de 10 ml estériles, los cuales se incubaron a 37°C durante 1 hora. Tras el período de incubación, las células se sembraron en placas de LB con el suplementado con el antibiótico adecuado, incubándose a la temperatura adecuada durante 18 h.

3.8.7. Clonación de fragmentos de DNA en vectores plasmídicos

Los fragmentos de DNA de interés se clonaron en el vector de expresión pUA1108 (derivado de pGEX4T-1; promotor Ptac; lacIq; Ap^R; Mayola *et al.*, 2014). Para ello, se utilizó el kit NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit (New England Biolabs, Massachusetts, Estados Unidos). Para diseñar los cebadores se utilizó la herramienta *on-line* NEBuilder Assembly Tool (<https://nebuilder.neb.com>, New England Biolabs, Massachusetts, Estados Unidos). Dichos cebadores portan en sus extremos 5' secuencias de homología con la región del vector pUA1108 regulada por el promotor pTAC. Primero, se digirió 1 µg de DNA plasmídico con 1 µl de las endonucleasas NdeI y BamHI (New England Biolabs, Massachusetts, Estados Unidos) y 2 µl del buffer de digestión CutSmart (New England Biolabs, Massachusetts, Estados Unidos) en un volumen final de 20 µl. La digestión se realizó a 37 °C durante 2 h. A continuación, se desfosforiló el plásmido con la enzima fosfatasa alcalina (1U/µl; Roche, Basilea, Suiza) siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante. Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión para la recuperación y purificación del vector linearizado con el kit comercial *NzyGelpure* (NZYTech, Lisboa, Portugal). Paralelamente, se amplificaron los diferentes genes mediante PCR a partir del DNA cromosómico de ATCC 14028Rif^R utilizando los cebadores apropiados detallados en la Tabla 2.2. y la polimerasa *Phusion* (ver apartado 3.8.4). Los productos de PCR obtenidos se purificaron utilizando el kit comercial *NzyGelpure* (NZYTech, Lisboa, Portugal).

La ligación de los productos de PCR y el vector linealizado y defosforilado se realizó utilizando el sistema NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (New England Biolabs, Massachusetts, Estados Unidos). Este sistema permite ligar el producto de PCR al plásmido en una única reacción. Durante la reacción de ligación, la enzima exonucleasa del kit crea extremos cohesivos generando cadenas simples (3'), facilitando la hibridación de las regiones de homología del inserto y el vector; la polimerasa rellena los huecos entre cada fragmento y la DNA ligasa sella las uniones del DNA

ensamblado. La reacción de ligación se realizó en un volumen final de 10 μ l, a 5 μ l de la reacción HiFi DNA Assembly Master Mix se añadieron 50-70 ng del vector pUA1108 y la cantidad necesaria de inserto en una relación de 5:1 (inserto:vector) calculada con la herramienta *on-line* NEBio *calculator* (<https://nebiocalculator.neb.com>, New England Biolabs, Massachusetts, Estados Unidos). La reacción se incubó a 50 °C durante 1 hora. A continuación, la ligación se dializó en membranas de nitrocelulosa con diámetro de poro de 0,05 μ m (Merck Millipore Ltd. Carrigtwohill, Irlanda). Finalmente, todo el volumen de la ligación se transformó por electroporación a células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α (ver apartados 3.8.5 y 3.8.6.). Tras la electroporación, las células se sembraron en placas de LB suplementadas con ampicilina (100 μ g/ml). A partir de las colonias transformantes obtenidas, se comprobó por PCR de colonia (ver apartado 3.8.4) la correcta clonación de los diferentes genes de interés en el vector utilizando cebadores externos a la región de clonación del vector pUA1108 (ver Tabla 2.2). La secuenciación de los plásmidos recombinantes fue realizada por la empresa MacroGen (<http://dna.macrogen.com>).

3.8.8. Replicación de los bacteriófagos

El tiempo de inicio de la replicación del fago, así como su duración, dependen tanto del fago como de la cepa bacteriana. Para caracterizar la replicación del fago, se realizó una dilución 1:100 de un cultivo de noche de la cepa bacteriana de estudio en 50 ml de LB y se incubó a 37°C en un baño con agitación orbital a 150 rpm. Cuando la DO_{550 nm} llegó a 0,25 (equivalente a 5 x 10⁷ cfu/ml) se infectó el cultivo con una MOI de 1 y se incubó a 37°C en un baño con agitación. Previamente, el fago se trató con 4 μ l de DNasa RNA free (Roche, Barcelona, España; 10U/ μ l) y 2 μ l de RNasa (Roche, Barcelona, España; 20 mg/ μ l) por cada 500 μ l de lisado, para eliminar la posible contaminación de DNA bacteriano. Por cada tiempo de muestreo, se tomó una muestra de 5 ml del cultivo y se filtró a través de filtros de nitrocelulosa de 0,45 μ m de diámetro de poro (Millipore,

Carrigtwohill, Irlanda) y se lavó el filtro con 5 ml de MgSO₄ 10 mM frío por duplicado. El cultivo filtrado se tituló por el método de la doble capa de agar con la cepa ATCC14028 para determinar la concentración de bacteriófago libre y, las células bacterianas retenidas en el filtro se disolvieron con 1 ml de MgSO₄ 10 mM y se congeló inmediatamente a -80°C. Finalmente, las muestras de todos los tiempos muestreados se descongelaron y se realizó la extracción del DNA genómico según se ha descrito en el apartado 3.8.2. La presencia o ausencia del DNA del fago infectivo en el interior de las células de *Salmonella* se determinó mediante PCR semicuantitativa. Se ajustó la concentración de DNA a 100 ng y se realizó la PCR con 20 ciclos de amplificación. En la tabla 2.2, se detallan los cebadores utilizados para la detección del fago de interés. La visualización de los productos de PCR se realizó tal y como está descrito en el apartado 3.8.3., utilizando el marcador de masa molecular NZYDNA Ladder V (NZYTech, Lisboa, Portugal).

3.8.9. Identificación de la presencia de las regiones CRISPR de *Salmonella*

En el genoma de *S. Typhimurium* ATCC14028s se han identificado dos sistemas CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)-Cas (*CRISPR-associated*) canónicos (Fabre *et al.*, 2012; Shariat *et al.*, 2015). Las secuencias de los loci correspondientes a los *proto-spacers* se obtuvieron con el paquete informático CRISPRCasFinder (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr>, Grissa *et al.*, 2007; Couvin *et al.*, 2018) y la secuencia del genoma de ATCC14028s (Accession number Genbank CP001363.1). CRISPR1 tiene 1.476 nt de tamaño (de la posición 3096848 a la 3098323) y 23 espaciadores (Fabre *et al.*, 2012) y CRISPR2 1.615 nt de tamaño (de la posición 3114455 a la 3116070) y 26 espaciadores. Tras su localización se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de los *loci* correspondientes a los *proto-spacers* y se diseñó un conjunto de cebadores detallados en la Tabla 2.2, para la amplificación y secuenciación de dichos *loci* en los diferentes aislados problemas. Los diferentes procesos de extracción del DNA total, la reacción de PCR y la purificación de los productos de PCR generados y su secuenciación, se realizó tal y

como se ha descrito anteriormente (véase apartados 3.8.2, 3.8.3 y 3.8.4). La secuenciación de fragmentos de DNA fue realizada por la empresa Macrogen (<http://dna.macrogen.com>). Las secuencias obtenidas se analizaron y compararon con la secuencia nucleotídica de cada *locus* CRISPR del genoma de referencia de la cepa *S. Typhimurium* ATCC14028s utilizando el paquete informático *DNAstar* (DNAstar Inc.).

3.8.10. Determinación de la expresión de citoquinas tras estimulación de células humanas con bacteriófagos *in vitro*

Para determinar el efecto que los bacteriófagos pueden producir en el sistema inmune del hospedador tratado se estudió la expresión de mRNA de una serie de citoquinas en un sistema de barrera intestinal y tras la incubación durante 48 h con el bacteriófago UAB_Phi20 (utilizado como modelo). La creación de la barrera intestinal formada por monocapas de las células Caco-2/HT-29/M y las condiciones de incubación fue similar al descrito en el apartado 3.5. Las condiciones que se valoraron fueron las siguientes: i) bacteriófago UAB_Phi20 (5×10^9 pfu/pocillo); ii) restos celulares de un lisado; iii) LPS de *S. Typhimurium* (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) y iv) células sin tratar (DMEM con/sin piruvato). Los restos celulares se obtuvieron mimetizando el contenido celular presente en un lisado de bacteriófagos, pero sin fagos. Para preparar los restos celulares se partió de 200 ml de un cultivo de *S. Typhimurium* LB5000 en medio LB líquido suplementado con NaCl 0,5 %. Cuando el cultivo llegó a una $DO_{550\text{ nm}}$ de 0,6 se añadió ampicilina (200 $\mu\text{g/ml}$) y se incubó durante 2,5 h a 37°C con agitación orbital a 100 rpm. Tras la lisis del cultivo, este se purificó de forma similar a un lisado de bacteriófagos según la metodología descrita en el apartado 3.3.2. El LPS comercial se diluyó en PBS 1X a una concentración final de 1 mg/ml. Para su uso en el ensayo, se diluyó en medio DMEM hasta una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$ (Jung *et al.*,1995).

El RNA celular total se extrajo usando TRIzol® Reagent (Invitrogen, California, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. El posible DNA contaminante se eliminó usando DNaseI RNA free (*DNA-free™* kit; Ambion, Reino Unido). Se utilizó 1 µg RNA total para la síntesis de cDNA usando el kit comercial *Transcriptor first-strand cDNA synthesis kit* (Roche, Basilea, Suiza) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA obtenido se utilizó para evaluar los niveles de expresión relativa de diferentes interleuquinas (*IL1α*, *IL-1β*, *IL-2*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-12/p40*, *IL-17a*, *GM-CSF*, *MIF*, *CxCL1/GROα*, *IFNγ*, y *TNFα*) mediante PCR cuantitativa a tiempo real (*real-time PCR*, qPCR) en el termociclador Lightcycler 480 (Roche, Basel, Suiza) y utilizando *hBD1* como gen control *housekeeping*. La secuencia de los cebadores utilizados para la PCR se detalla en la Tabla 2.2. Cada 20 µl de reacción de PCR contenía 2 µl de cDNA, 10 µl de 2X LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche, Basilea, Suiza), 1 µl de cada pareja de cebadores (10 µM concentración final) y 6 µl de H₂O. Las condiciones de la reacción fueron: 10 min a 95°C, seguido de 45 ciclos de 10 s a 95°C, 20 s de temperatura de hibridación (*hBD-1*, *IL-8*, *MIF*, *CxCL1/GROα*, y *TNFα*: 60°C; *IL-1α*, *IL-1β*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-12/p40*: 55°C; *IL-4*, *IL-5*, *IL-10*, *IFNγ*, y *GM-CSF*: 50°C) y 20 s a 72°C. Además, las muestras se sometieron a una rampa de temperatura (desde 10°C por encima de la temperatura de hibridación hasta 95°C a 2,2°C/s) y a la monitorización continua de la fluorescencia, para analizar la curva de fusión de los fragmentos amplificados. Se realizaron tres experimentos de qPCR independientes testando cada gen dos veces en cada experimento. El análisis cuantitativo se realizó calculando el ratio de la expresión relativa de los diferentes genes correspondientes a las interleuquinas en las células estimuladas comparados con las células no estimuladas y normalizados con el gen de referencia (*hBD-1*) mediante el método descrito por Pfaffl (Pfaffl *et al.*, 2001). El análisis se realizó con el paquete informático *Relative Expression Software Tool* (REST) 2009 (<http://www.gene-quantification.de/rest-2009.html>; Pfaffl *et al.*, 2002). La significación estadística se calculó con el test aleatorio usando 2.000 permutaciones, tal y como lo determina el el paquete informático REST (límite de significación $P \leq 0,05$).

3.8.11. Secuenciación y análisis de los genomas de *Salmonella*

La extracción del DNA total de los diferentes aislados de *Salmonella* se realizó de forma similar a la descrita en el apartado 3.8.2. La secuenciación, así como el ensamblaje de las secuencias y el análisis de los resultados fue realizado por Sistemas Genómicos S.L (Sistemas Genómicos S.L, Valencia, España). La calidad y cantidad de DNA total se determinó mediante análisis en Nanodrop-1000, electroforesis en gel de agarosa y con el sistema Qubit 3.0. Las bibliotecas de secuenciación e construyeron siguiendo las recomendaciones y protocolos de Illumina, utilizando un flujo de trabajo libre de PCR.

La calidad de las bibliotecas se analizó en el sistema 4200 Tape Station (*High sensitivity assay*) y la cuantificación de las bibliotecas generadas previamente a la generación de *pools* se realizó mediante PCR en tiempo real en un LightCycler 480 (Roche). La secuenciación de las bibliotecas se realizó por secuenciación de extremos pareados (100 x 2) en el secuenciador Illumina HiSeq 2500. Se obtuvieron alrededor de 9 millones de lecturas finales pareadas de 101 nucleótidos de longitud para cada muestra, con una puntuación media de calidad de Phred > 30.

Las lecturas resultantes de la secuenciación se alinearon con el genoma de *S. Typhimurium* ATCC 14028s (número de acceso de Genbank: CP001363.1) utilizando el algoritmo Burrows-Wheeler Aligner (BWA-mem) y la secuencia de comandos internos. Los procesos de filtrado se realizaron utilizando *Picard-tools* (<http://picard.sourceforge.net>) y *SAMtools* (Li *et al.*, 2009). Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), las inserciones/deleciones y las variantes del número de copias (CNV) se determinaron usando el algoritmo GATK (McKenna *et al.*, 2010). La alineación de los *contigs* resultantes de los genomas problema con el genoma de referencia se realizó utilizando Mauve (Darling *et al.*, 2004; Darling *et al.*, 2010).

El genoma de la cepa original de *S. Typhimurium* ATCC 14028 Rif^R (susceptible a los tres bacteriófagos) se incluyó como referencia para identificar las variaciones específicas relacionadas con la resistencia a los fagos.

3.9. Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el paquete informático GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, California Estados Unidos). La normalidad de las muestras se comprobó mediante el test Kolmogorov-Smirnov. Para las muestras con distribución normal se aplicó una ANOVA de dos vías y el test de Turkey para comparaciones múltiples.

El paquete informático GraphPad Prism 6.01 también se utilizó para calcular las medias y desviaciones estándar (SD) de las muestras, así como para la representación gráfica de los resultados.

RESULTS

4. RESULTS

4.1. Resistance to bacteriophages

4.1.1. Identification of the cellular receptors of UAB_Phi20, UAB_Phi78 and UAB_Phi87

During the phage lytic cycle, the first contact between phages and cells occurs during the adsorption step, when the receptor binding proteins of the bacteriophages recognise their receptors at the bacterial surface. The latter include proteins of the outer membrane, lipopolysaccharide (LPS) and flagella (Lindberg, 1973; Bertozzi-Silva *et al.*, 2016).

Previous studies revealed the high similarity of the genomes of UAB_Phi20, UAB_Phi78, and UAB_Phi87 with those of bacteriophages P22, SP6, and Felix O1, respectively (Bardina *et al.*, 2016). P22 binds to the α -Rhamnosyl 1-3 galactose linkage of the O-chain (Iwashita y Kanegasaki, 1973); SP6 recognizes two receptors, one on the O-antigen and the other probably in the inner LPS core (lipid A-KDO region) (Tu *et al.*, 2017); the binding site of FelixO1 is the N-acetylglucosamine branch of the LPS (Hudson *et al.*, 1978).

To confirm the receptors of the three phages, spotting tests with the three phages were conducted using a collection of LPS mutants of strain LT2 (Table 2.1). The results are shown in Figure 3.1. UAB_Phi20 only infected smooth strains with a complete LPS (*rfa*⁺) or *rfaB*⁻ mutation, in which the wild-type O-antigen of LPS is preserved. UAB_Phi78 infected smooth and *galE*⁻ mutants with similar efficiencies but not the *rfaG*⁻ mutant strain, suggesting that the receptor of this phage is the first glucose of the LPS core. UAB_Phi78 also infected a *rfaC*⁻ mutant, although with less efficiency and yielding small plaque sizes. Finally, UAB_Phi87 infected smooth strains and the *rfc*⁻, *rfb*⁻ and *rfaL*⁻ mutants (with LPS but without O-antigen) but not *rfaK*⁻ and *rfaJ*⁻. These results indicated that the N-acetylglucosamine of the terminal glucose of the LPS core was the viral receptor.

Thus, the UAB_Phi78 receptor could be situated in the inner core of LPS. This phage was selected for a screening study of the emergence of bacteriophage resistance in all isolates recovered from the *in vivo*, contaminated food and from the *in vitro* experiments.

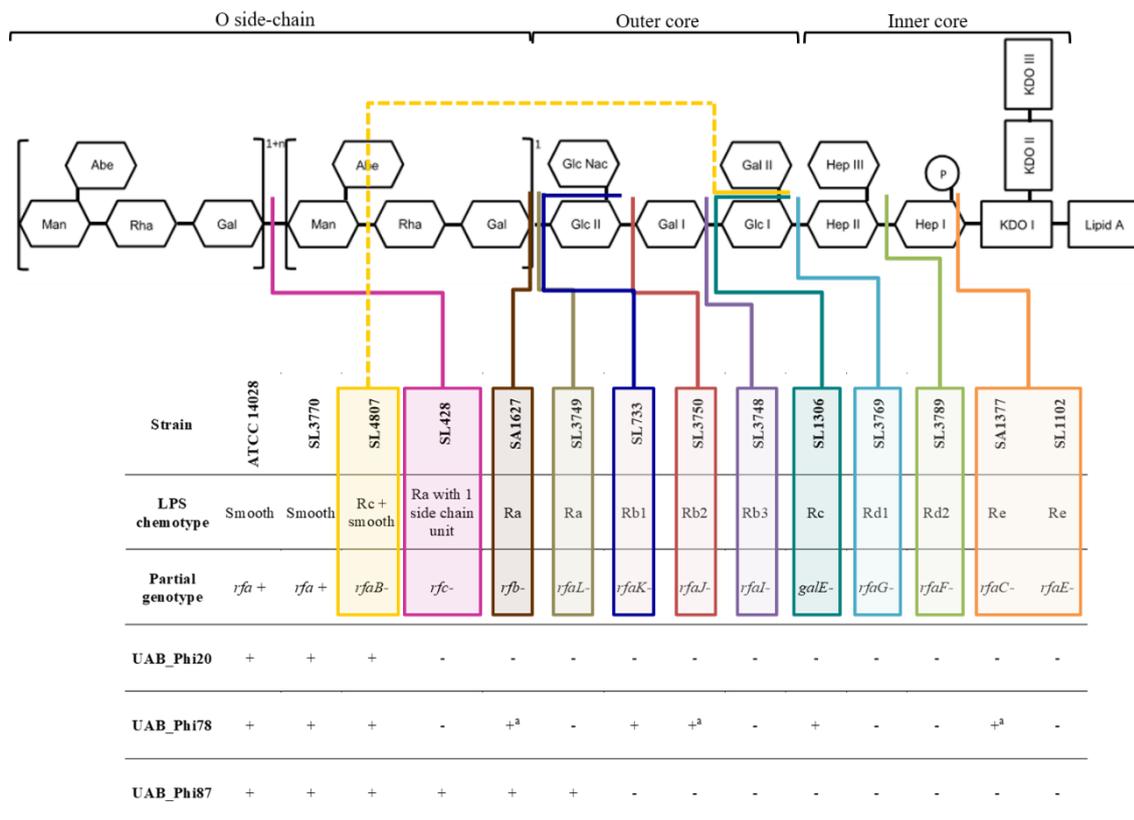


Figure 3.1. Scheme of *S. Typhimurium* LPS and detail of the infective capacity of bacteriophages UAB_Phi20, UAB_Phi78, and UAB_Phi87 against different LPS mutants of *S. Typhimurium* LT2 (see Table 2.1). The different coloured lines indicate the level of LPS present in the different mutant strains. +, lytic spot; -, no infection.

^a Different plaque morphology and lower EOP (< 3 to 4 log₁₀) than those of LT2 wild type strain.

4.1.2. Emergence of bacterial resistance to bacteriophages

The emergence of phage resistance was examined using a cocktail of UAB_Phi20, UAB_Phi78, and UAB_Phi87 phages in *S. Typhimurium* ATCC 14028 isolates obtained from the *in vitro* cultures, *in vivo* and in contaminated food. All isolates recovered from the phage-treated samples were then grown for three consecutive passages in green plates to ensure that they were free of phages.

First, the susceptibility of all isolates from the non-treated and treated samples to UAB_Phi78 was determined. For phage therapy and the treatment of contaminated cooked ham, susceptibility was checked in liquid cultures established in 96-well microtitre plates, by monitoring the OD_{550 nm} for 4.5 h. For the isolates recovered from the *in vitro* cultures, susceptibility was tested in a spotting test. Appropriate susceptible and resistant strains (ATCC 14028 and TA 1537, respectively) were included as controls. All isolates assumed to be resistant to UAB_Phi78 were retested against UAB_Phi20 and UAB_Phi87 in a spotting test to determine their susceptibility.

4.1.2.1. *In vitro* emergence of bacterial resistance to bacteriophages

The emergence of resistance to the bacteriophages *in vitro* was assessed by infecting liquid cultures of *Salmonella* with the cocktail of bacteriophages at a MOI of 1 (Material and methods, Section 3.3.4.). From the *in vitro* non-infected and cocktail-infected cultures, 200 and 197 isolates were recovered, respectively, at 0, 4, 6.5, and 24 h post-infection. In the control cultures, all isolates were susceptible to UAB_Phi78 at all time points. Among the treated cultures, 96 (48.7 %) isolates were resistant to UAB_Phi78, with resistance appearing after 4 h of infection but peaking at 24 h (92 % of the isolates sampled). All isolates were resistant to the other two phages of the cocktail (Table 3.1).

Table 3.1 Susceptibility to UAB_Phi78 of the *S. Typhimurium* ATCC 14028 Rif^R clones recovered from *Salmonella* control and phage-cocktail infected cultures.

Time postinfection (h)	CONTROL		INFECTED	
	No. isolates	No. resistant (%) ^a	No. isolates	No. resistant (%) ^a
0	50	0 (0)	50	0 (0)
4	50	0 (0)	49	24 (49)
6.5	50	0 (0)	49	27 (55)
24	50	0 (0)	49	45 (92)
Total	200	0 (0)	197	96 (48.7)

^a, Isolates resistant to UAB_Phi20, UAB_Phi78, and UAB_Phi87.

4.1.2.2. *In vivo* emergence of bacterial resistance to bacteriophages

The emergence of bacteriophage resistance *in vivo* was determined by randomly selecting 720 and 631 isolates from 24 cecae obtained from control and treated chickens, respectively, on days 1, 8, and 15 post-infection (Material and methods, Section 3.3.6.2.). The vast majority of isolates of both groups were sensitive to UAB_Phi78 (Table 3.2). Only 61 (8.5 %) of the control isolates obtained on days 8 and 15 post-infection had OD_{550 nm} values and a growth curves similar to that of the resistant control strain (Figure 3.2.). These isolates were thus considered as resistant to UAB_Phi78 (Table 3.2). Moreover, on a spotting test they also showed resistance to UAB_Phi20 and UAB_Phi87. Additionally, for 9 (1.3 %) and 21 (3.3 %) isolates recovered from control and treated animals, respectively, there was no change in the OD_{550 nm} values after UAB_Phi78 infection, and thus neither growth nor lysis (Figure 3.2.). On a spotting test, these isolates were susceptible to UAB_Phi20 and resistant to UAB_Phi87. They were therefore considered to be resistant for UAB_Phi78 (Table 3.2).

Table 3.2. Resistance to UAB_Phi78 of *S. Typhimurium* ATCC 14028 Rif^R isolates belonged to cecum of chicken after phage therapy with the cocktail of phages.

Day postinfection	CONTROL				TREATED			
	Animal isolates	No. resistant (%) ^a	No. resistant (%) ^b	Animal isolates	No. resistant (%) ^a	No. resistant (%) ^b		
1	1	30	0	0	1	29	0	0
	2	30	0	0	2	30	0	0
	3	30	0	0	3	15	0	0
	4	30	0	0	4	30	0	0
	5	30	0	0	5	28	0	0
	6	30	0	0	6	26	0	0
	7	30	0	0	7	3	0	2
	8	30	0	0	8	5	0	0
Subtotal		240	0 (0)	0 (0)		166	0 (0)	2 (1.2)
8	1	30	0	0	1	15	0	0
	2	30	9	0	2	30	0	0
	3	30	0	1	3	30	0	1
	4	30	26	0	4	30	0	0
	5	30	8	1	5	30	0	0
	6	30	0	0	6	30	0	0
	7	30	0	0	7	30	0	0
	8	30	0	0	8	30	0	0
Subtotal		240	43 (17.9)	2 (0.8)		225	0 (0)	1 (0.4)
15	1	30	0	1	1	30	0	0
	2	30	0	6	2	30	0	0
	3	30	9	0	3	30	0	18
	4	30	0	0	4	30	0	0
	5	30	5	0	5	30	0	0
	6	30	0	0	6	30	0	0
	7	30	1	0	7	30	0	0
	8	30	3	0	8	30	0	0
Subtotal		240	18 (7.5)	7 (2.9)		240	0 (0)	18 (7.5)
Total		720	61 (8.5)	9 (1.3)		631	0 (0)	21 (3.3)

^a Isolates resistant to UAB_Phi20, UAB_Phi78, and UAB_Phi87.^b Isolates with resistance to UAB_Phi78, susceptible to UAB_Phi20 and resistant to UAB_Phi87.

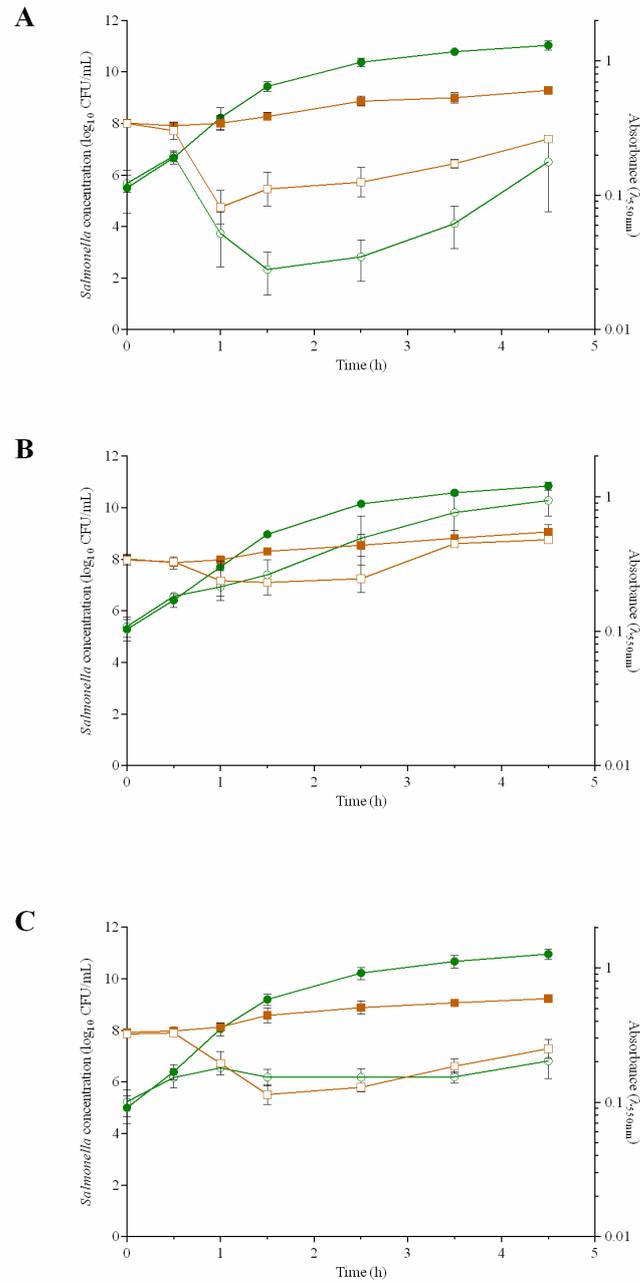


Figure 3.2. Growth curves (concentration and absorbance) of non-infected and UAB_Phi78 infected cultures of (A) wild-type (ATCC 14028Rif^R), and two isolates from *in vivo* experiments: (B) C5 (resistant to UAB_Phi20, UAB_Phi78, and UAB_Phi87), and (C) AT2 (resistant to UAB_Phi78, susceptible to UAB_Phi20, and resistant to UAB_Phi87). Brown squares and green circles represent concentration and OD values, respectively. Open symbols represent UAB_Phi78 infected values.

4.1.2.3. Emergence of bacterial resistance to bacteriophage in food biocontrol

From the *Salmonella*-contaminated cooked ham, 686 and 665 isolates were obtained from 15 ham samples from the control and treated groups, respectively, at 0, 3, and 7 days post-treatment (Table 3.3). All isolates recovered from the control group were susceptible to UAB_Phi78 whereas only 21 (3.2 %) isolates from the treated samples were resistant (Table 3.3). Of these, 9 isolates were also resistant to UAB_Phi20 and UAB_Phi87 (1.4 %) and 12 (1.8 %) were resistant to UAB_Phi20 but susceptible to UAB_Phi87.

Table 3.3. Susceptibility to UAB_Phi78 of the *S. Typhimurium* ATCC 14028 Rif^R clones isolated from cooked ham control and treated groups.

Day of treatment	CONTROL			TREATED		
	Sample	No. isolates	No. resistant (%)	Sample	No. isolates	No. resistant (%)
0	1	48	0	1	48	0
	2	48	0	2	48	2
	3	48	0	3	43	0
	4	48	0	4	48	2
	5	48	0	5	48	1
Subtotal		240	0 (0)		235	5 (2.1)
3	1	47	0	1	48	1
	2	46	0	2	17	0
	3	46	0	3	43	2
	4	48	0	4	48	3
	5	45	0	5	42	0
Subtotal		232	0 (0)		198	6 (3.0)
7	1	48	0	1	46	0
	2	48	0	2	45	6
	3	30	0	3	48	2
	4	42	0	4	46	1
	5	46	0	5	47	1
Subtotal		214	0 (0)		232	10 (4.3)
Total		686	0 (0)		665	21 (3.2)

4.1.3. Characterization of the bacterial isolates resistant to bacteriophages

The basis for the observed resistance to the bacteriophages was further investigated in a collection of 15 *Salmonella* isolates. Twelve of them were resistant to the three bacteriophages: i) 7 isolates (1 per animal) from the control group of the *in vivo* studies, obtained on days 8 (3 animals) and 15 (4 animals) post-infection with *Salmonella*; ii) 2 isolates recovered from cooked ham, respectively, on days 3 and 7 post-treatment; iii) 3 isolates collected, respectively, 4, 6.5, and 24 h after infection with the cocktail. Moreover, 3 isolates resistant to UAB_Phi78 and UAB_Phi20 but susceptible to UAB_Phi87, collected from the cooked ham, respectively, on days 0, 3, and 7 (Table 3.4).

Table 3.4. Phage-resistant *S. Typhimurium* ATCC 14028 Rif^R isolates selected for the characterization of the phage resistance.

Experiment	Time post-treatment (day)/infection (h)	Isolate	Susceptibility		
			UAB_Phi20	UAB_Phi78	UAB_Phi87
<i>In vivo</i>	8	C1	R	R	R
		C2*	R	R	R
		C3	R	R	R
	15	C4	R	R	R
		C5*	R	R	R
		C6	R	R	R
		C7	R	R	R
Cooked ham	0	HT1*	R	R	S
	3	HT2	R	R	S
		HT3	R	R	R
	7	HT4	R	R	S
		HT5*	R	R	R
<i>In vitro</i> cultures	4	CI1	R	R	R
	6.5	CI2*	R	R	R
	24	CI3*	R	R	R

C, control group; HT, ham treated; CI, culture infected.

R, resistant to bacteriophage; S, susceptible to bacteriophage.

* Isolates selected for further genome sequencing and analysis.

4.1.3.1. Permeability to violet crystal

Table 3.5 shows the results of the crystal violet screening test (Material and methods, Section 3.3.6.5.) for all 15 isolates as well as the 12 LPS mutants of LT2 strain and the susceptible strain ATCC 14028 Rif^R. The results were assessed based on the diameter of the growth inhibition zone. Isolates with superficial LPS changes (*rfb* to *rfaK*) showed a slight decrease in growth whereas for the LT2 mutants with highly modified LPS SL1306 (*galE*), SL3789 (*rfaF*), SL3769 (*rfaG*), SA1377 (*rfaC*), and SL1102 (*rfaE*) the zone of growth inhibition was larger. Among the *Salmonella* phage-resistant isolates, the diameter of growth inhibition was similar to that determined for the phage-susceptible strain.

4.1.3.2. LPS profile characterization

Differences in the LPS phenotype of the phage-resistant variants compared to the wild-type ATCC 14028 were assessed (Material and methods, Section 3.3.6.6). The LPS profiles of the LT2 strain mutants which showed defects in LPS were included for comparison (Figure 3.3).

The LPS phenotypes of the seven isolates resistant to the three bacteriophages screened in the *in vivo* studies (C1–C7; Table 3.4) were similar to those of wild-type ATCC14028 and mutant SL4807 (*rfaB*-) strains (Figure 3.4A), which showed smooth LPS and were sensitive to the three bacteriophages studied. No alteration of the LPS profile was seen on SDS-PAGE.

The LPS profiles of the two isolates resistant to the three bacteriophages (HT3 and HT5; Table 3.4) obtained from the treated cooked ham were similar but differed from the LPS profile of ATCC 14028 (Figure 3.4B). The LPS profiles of the two isolates were also similar to those of the LPS rough mutants SL3749 (*rfaL*-), SL733 (*rfaK*-), SL3750 (*rfaJ*-) and SL3748 (*rfaI*-) (Figure 3.3). However, only the mutant SL3748 (*rfaI*-) was resistant to the three phages under study (Figure 3.1). For the remaining three isolates (HT1, HT2 and HT4; Table 3.4.) resistant to UAB_Phi20

and UAB_Phi78 but not to UAB_Phi87, their LPS profiles were very similar but they differed from the those described above (Figure 3.4B). Specifically, the LPS profiles of HT1, HT2, and HT4 resembled that of mutant SL428 (Ra with one side chain unit), whose behaviour with respect to the three phages was similar (Figure 3.3). Finally, the LPS profiles of the three isolates recovered from the *in vitro* studies (CI1, CI2 and CI3; Table 3.4) and resistant to the three bacteriophages were similar to those of the resistant isolates recovered from the treated cooked ham samples (Figure 3.4C).

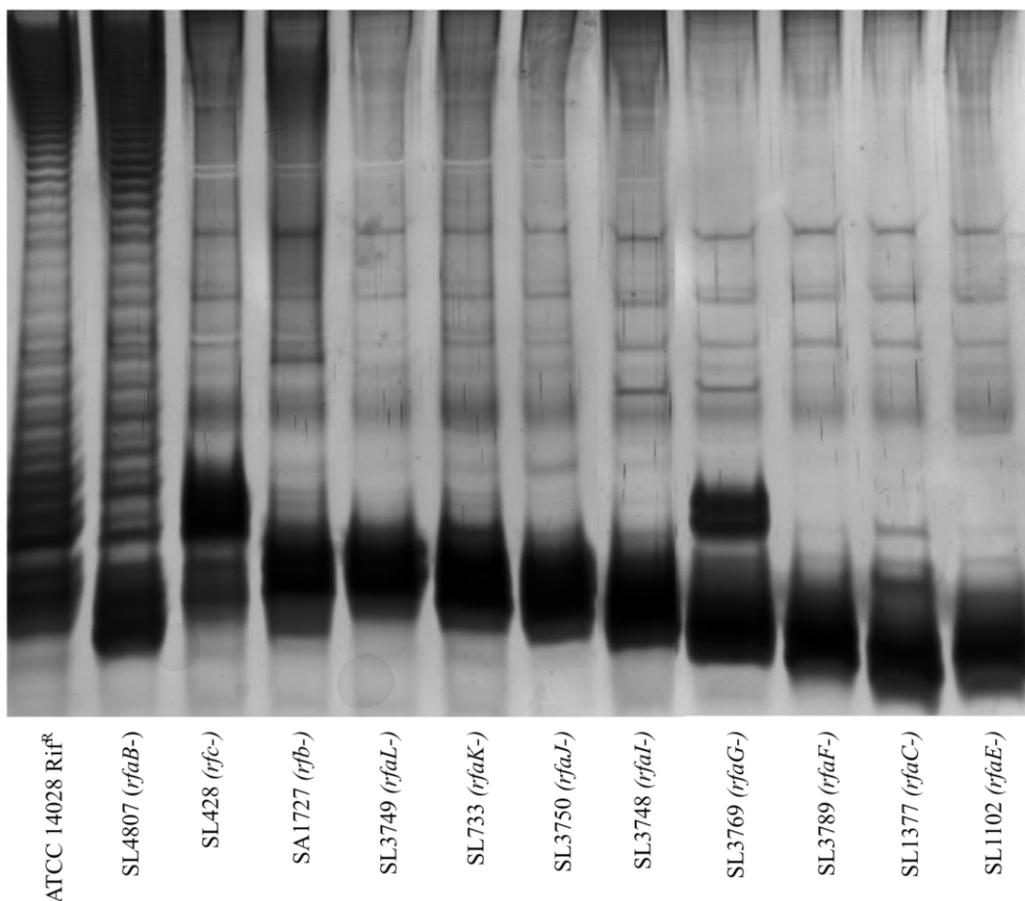


Figure 3.3. Lipopolysaccharide profiles of the LT2 strain mutants representing defects in the LPS (see Table 2.1)

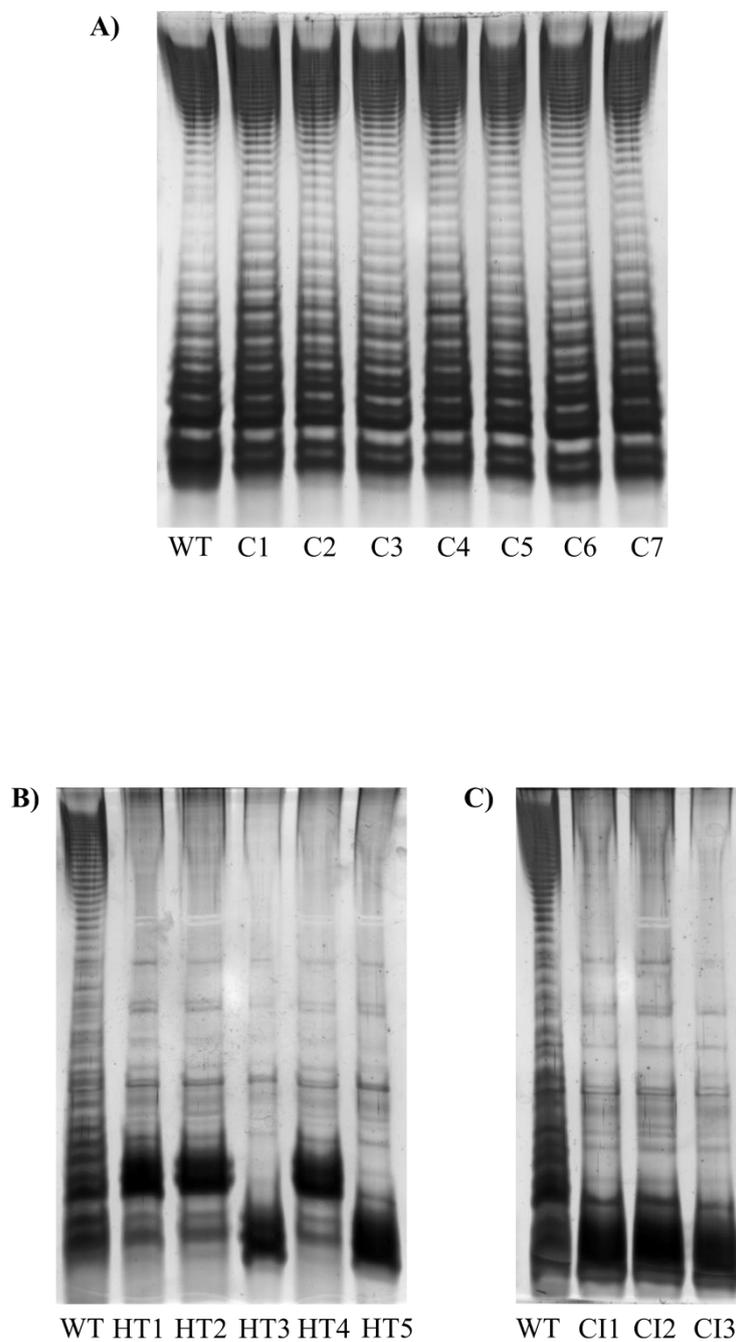


Figure 3.4. LPS phenotypes of the isolates resistant to bacteriophages (see Table 3.4.) obtained from (A) *in vivo* phage therapy studies, (B) treated cooked ham, and (C) infected *in vitro* cultures (C). WT, ATCC 14028 Rif^R susceptible strain.

Table 3.5. Crystal violet susceptibility of LPS mutants of LT2 strain, isolates resistant to bacteriophages, and isolates resistant to UAB_Phi78 and UAB_Phi87, but susceptible to UAB_Phi20.

Origin	Strain	Partial genotype	Diameter (mm) ^a
	ATCC 14028 Rif ^R	-	6.0 ± 0.0
LPS mutant strains	SL4807	<i>rfaB</i>	6.0 ± 0.0
	SA1627	<i>rfb</i>	8.3 ± 0.1
	SL428	<i>rfc</i>	8.0 ± 0.0
	SL3749	<i>rfaL</i>	9.7 ± 0.1
	SL3748	<i>rfaI</i>	8.7 ± 0.1
	SL3750	<i>rfaJ</i>	9.3 ± 0.1
	SL733	<i>rfaK</i>	9.7 ± 0.1
	SL1306	<i>galE</i>	10.0 ± 0.0
	SL3789	<i>rfaF</i>	12.3 ± 0.1
	SL3769	<i>rfaG</i>	13.7 ± 0.1
	SA1377	<i>rfaC</i>	16 ± 0.0
	SL1102	<i>rfaE</i>	14.7 ± 0.1
<i>In vivo</i>	C1		6.0 ± 0.0
	C2		7.0 ± 0.0
	C3		6.0 ± 0.0
	C4		6.0 ± 0.0
	C5		7.0 ± 0.0
	C6		7.0 ± 0.0
	C7		6.0 ± 0.0
	AC1 ^b		6.0 ± 0.0
	AC2 ^b		6.0 ± 0.0
	AC3 ^b		6.0 ± 0.0
	AC4 ^b		6.0 ± 0.0
	AC5 ^b		6.0 ± 0.0
	AT1 ^b		6.0 ± 0.0
	AT2 ^b		6.0 ± 0.0
	AT3 ^b		6.0 ± 0.0
	AT4 ^b		6.0 ± 0.0
Cooked ham	HT1		6.0 ± 0.0
	HT2		6.0 ± 0.0
	HT3		6.0 ± 0.0
	HT4		6.0 ± 0.0
	HT5		6.0 ± 0.0
<i>In vitro</i>	CI1		6.0 ± 0.0
	CI2		6.0 ± 0.0
	CI3		6.0 ± 0.0

^aDiameter of paper discs was 6 mm.^b Isolates with resistance to UAB_Phi78, susceptible to UAB_Phi20 and resistant to UAB_Phi87.

4.1.3.3. CRISPR *loci* sequence content

The potential role of the CRISPR-Cas system in resistance to bacteriophages UAB_Phi20, UAB_Phi78, and UAB_Phi87 was also examined. *S. Typhimurium* contains two CRISPR-Cas systems (Fabre *et al.*, 2012; Shariat *et al.*, 2015). Comparison of the sequences of the CRISPR1 and CRISPR2 loci (Material and methods, Section 3.8.9) of the 15 bacteriophage-resistant isolates with that of ATCC14028 failed to reveal any differences either in the content of the repeated sequences or in the acquisition of new spacer sequences. These results ruled out altered CRISPR sequences as the cause of phage resistance.

4.1.3.4. Genome sequencing and analysis

The genomes of 6 out of the 15 isolates resistant to the three bacteriophages (C2 and C5 from *in vivo*, HT5 from the treated cooked ham, and CI2 and CI3 from the *in vitro* infected cultures) and to UAB_Phi20 and UAB_Phi78 (HT1 from cooked ham) were selected for further sequencing and the sequences then compared to that of the wild-type in order to identify genetic variations conferring phage resistance. Mapping of all the genomes to the reference ATCC 14028 genome (GenBank CP001363.1) revealed several point mutations in the STM14_1424, STM14_1478; STM14_1964, STM14_2274; STM14_2439; STM14_2767, STM14_2859 (*nuoL*), STM14_3323, STM14_3324, and STM14_4922 (*cytR*) in all strains, including the wild-type (Table 3.6). Regions such as the *ccmGH* operon, characterized by a large number of variants and low coverage values, were identified but could not be resolved. This was also reported by Jarvik *et al.* (2010), who examined the evolutionary changes of different isolates of ATCC 14028 together with changes in the genes *nuoL*, *cytR*, and STM14_1964.

Figure 3.5 shows the circular representation of the genomes of the 6 resistant isolates and the ATCC 14028 wild-type chromosome.

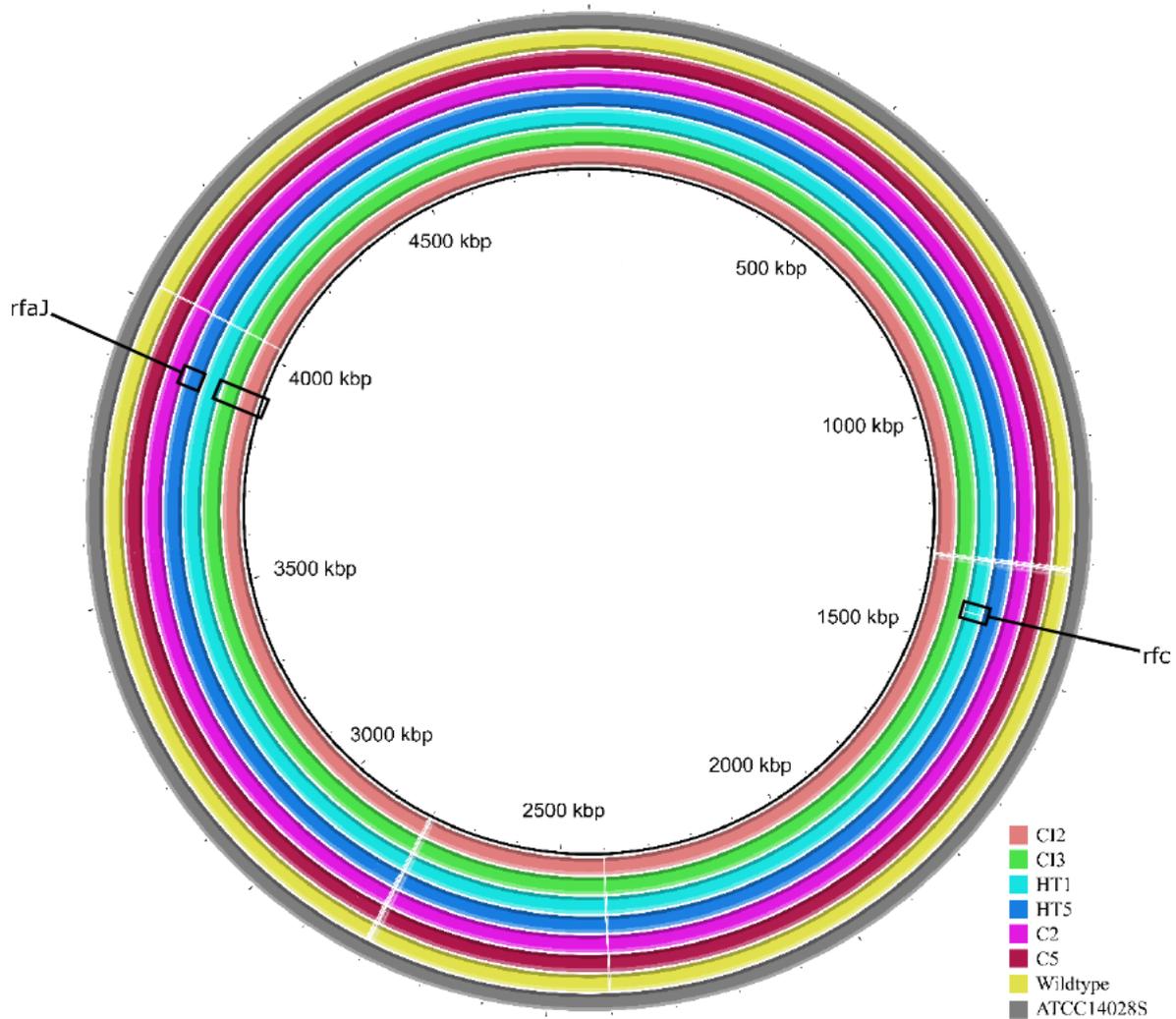


Figure 3.5. Circular representation of the chromosomes of six phage-resistant isolates (see Table 3.4) including the wild type and NCBI reference genomes using BRIG software (Alikhan *et al.*, 2011). Black boxes mark the estimated position of *rfc* deletion in HT1 genome and *rfaJ* mutations in CI2, CI3, and HT5 genomes.

Table 3.6. Variants identified in the genomes of all the *Salmonella* strains sequenced with respect to the genome of the NCBI reference strain ATCC14028s (GenBank CP001363.1).

Locus tag	Gene	Function ^a	CDS Position	Codon Change	Mutation type ^b	Protein effect ^c	wt	Variant Frequency (%) ^d											
								C2	C5	C12	CI3	HI1	HI5	AC2	AC3	AC5	AT2	AT4	
STM14_1424	Prophage <i>RecE</i>	Exodeoxyribonuclease VIII	281	GAT/G-T	D	FS	99.7	99.7	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.7	99.7	99.8	99.8	98.9
STM14_1478	Side tail fiber protein	Unknown	1875	AAT/AAA	Tv	S	99.4	99.4	99.2	99.8	99.2	99.7	99.5	99.4	99.7	99.7	99.7	99.7	100.0
STM14_1964	<i>ycdJ</i>	Cytoplasmic protein, unknown function	1084	ACG/GCG	Tt	S	99.7	99.7	99.5	99.8	99.8	99.4	99.5	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	100.0
STM14_2274	<i>RecE-like</i>	Exodeoxyribonuclease VIII	350	GGC/GAC	Tt	S	99.8	99.8	99.7	99.8	99.8	99.7	99.5	99.7	99.7	99.7	99.7	99.8	100.0
STM14_2439		Phage protein	264	AGT/AGC	Tt	M	99.8	99.8	99.2	99.8	99.8	99.7	99.7	99.4	99.7	99.7	99.7	99.8	100.0
			264	AAT/AA-I (tr)	I (tr)	FS	99.7	99.7	99.5	99.6	99.8	99.7	99.7	99.4	99.7	99.7	99.7	99.0	90.5
STM14_2767		Putative cytoplasmic protein, unknown function	139	AGC/TGC	Tv	S	99.7	99.7	99.8	99.7	99.5	99.8	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.1	100.0
			125	TTT/TAT	Tv	S	99.7	99.7	99.8	99.8	99.8	99.8	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.5	100.0
			64	TCG/GCG	Tv	S	99.4	99.4	99.4	99.5	99.7	99.7	99.7	99.6	99.7	99.6	99.6	99.7	100.0
STM14_2859	<i>moL</i>	Proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase subunit L	617	GTG/GCG	Tt	S	99.7	99.7	99.5	99.7	99.8	99.7	99.5	99.1	99.4	99.5	99.4	99.5	100.0
STM14_3323		Phosphotransferase system, pseudogene	300	TTT/TTG	Tv	S	99.7	99.7	99.7	99.7	99.8	99.7	99.4	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7
STM14_3224		Exodeoxyribonuclease VIII	1534	TAT/AAT	Tv	S	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.4	99.7	99.6	99.6	99.6	99.7	99.5	
			1538	CTG/CAG	Tv	S	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.0	99.7	99.6	99.6	99.6	99.4	100.0	
			127	AAA/GAA	Tt	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25.0
			135	CAG/CAA	Tt	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25.4
STM14_3335		Transposase IS3/IS911 family	139	CAC/TAC	Tt	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25.7
			150	CGA/CGC	Tv	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27.3
			153	AGC/AGT	Tt	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27.3
			225	CGT/CGC	Tt	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26.3

Table 3.6. Continued.

Locus tag	Gene	Function ^a	CDS Position	Codon Change	Mutation Type ^b	Protein effect ^c	wt	Variant Frequency (%) ^d												
								C2	C5	C12	C13	HT1	HT5	AC2	AC3	AC5	AT2	AT4		
STM14_3335		Transposase IS3/IS911 family	228	CAA/CAG	Tt	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28.0	27.6	
			246	GAG/GAA	Tt	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	52.1	56.2
			249	GAA/GAG	Tt	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	52.6	56.9
			255	GCC/GCT	Tt	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	54.0	58.7
			258	ATT/ATC	Tt	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	54.5	59.6
			264	CAG/CAA	Tt	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	57.7	63.2
STM14_3336		Putative transposase	15	TTC/TTT	Tt	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	63.8	66.1	
			18	ATC/ATT	Tt	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	63.6	66.8	
			41	AAI/AGC	S	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	59.3	60.8	
			51	GCC/GCA	Iv	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	57.8	58.9	
			378	AGC/AGT	Tt	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40.8	
			387	AAI/AAC	Tt	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	38.1	
STM14_4210	<i>yvhH</i>	Heat shock protein Hsp15	398	GTG/GCA	S	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	29.8		
			402	GGT/GGA	Iv	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30.4	
			287	ATG/-TG	D(tr)	FS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	91.4	
			742	ATA/AT-	D(tr)	FS	0	0	0	99.5	99.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			910	GAA/TAA	Iv	T	0	0	0	0	0	0	0	99.8	0	0	0	0	0	0
			114	CGI/CGC	Tt	M	99.7	99.7	99.4	99.4	99.7	99.8	99.7	99.5	99.7	99.7	99.7	99.7	99.5	100.0
STM14_4922	<i>cvrR</i>	Transcriptional regulator, LacI family	656	GAA/GTA	Tv	S	99.7	99.7	99.5	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.3	99.6	99.7	100.0	
			1565	TCT/TTT	Tt	S	83.5	0	0	99.5	99.7	0	0	0.0	0	0	0	0	0	
STM14_4990	<i>rpoB</i>	DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription of DNA into RNA using the four ribonucleoside triphosphates as substrates	1592	TCC/TTC	Tt	S	0	99.4	98.8	0	0	99.7	99.7	99.7	99.6	99.3	98.7	99.8		

Different variants were detected among the resistant isolates (Table 3.6) with respect to the ATCC 14028 Rif^R wild-type genome. HT1 (resistant to UAB_Phi78 and UAB_Phi20) contained a deletion of 2,557 bp that included the gene *rfc*, which encodes the O-antigen polymerase. In the wild-type genome, this region is flanked by two direct repeats of 114 bp (ATAGCGATTTTCGTCTGTGTCGAAGGTTGTGCGCCAATTTAGCAATGGTTGGCTAGATGGATACACAACACTCACTGTCAATAAATTCATTTTCTCTTTGTATGTGATCCTTGCGTA), located at the beginning of the gene STM14_1615 (nt position: 1419477–1419592) and the end of the gene STM14_1618 (nt position: 1422035–1422148) (Figure 3.6). This rearrangement involved the STM14_1615, *rfc*, STM14_1617, and STM14_1618 genes and the loss of one DR. The CI2, CI3 and HT5 genomes contained point mutations in the *rfaJ* gene, which encodes a protein involved in the addition of α 1, 2-linked glucose II residues to an unsubstituted α l-linked glucose residue at the non-reducing end of the acceptor LPS. A single base pair deletion at position 742 of the *rfaJ* gene that generated a premature stop codon (UAA) was found in the HT5 resistant variant (Figure 3.7). In the CI2 and CI3 resistant variants, an ochre stop (UAA) generated by a single base pair mutation (G by T) at position 910 of the *rfaJ* gene was found (Figure 3.7).

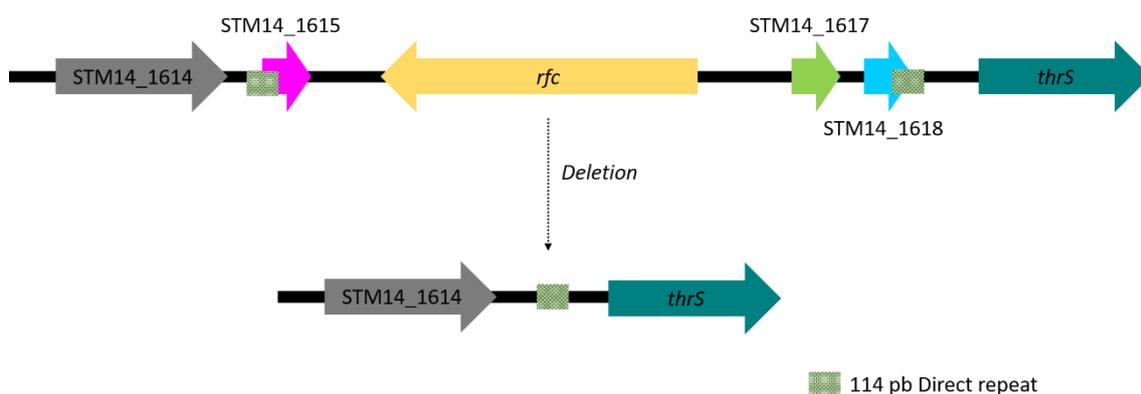


Figure 3.6. A scheme that shows the *rfc* deletion in HT1 isolate (resistant to UAB_Phi78 and UAB_Phi20) produced by the recombining of two direct repeats of 114 bp.

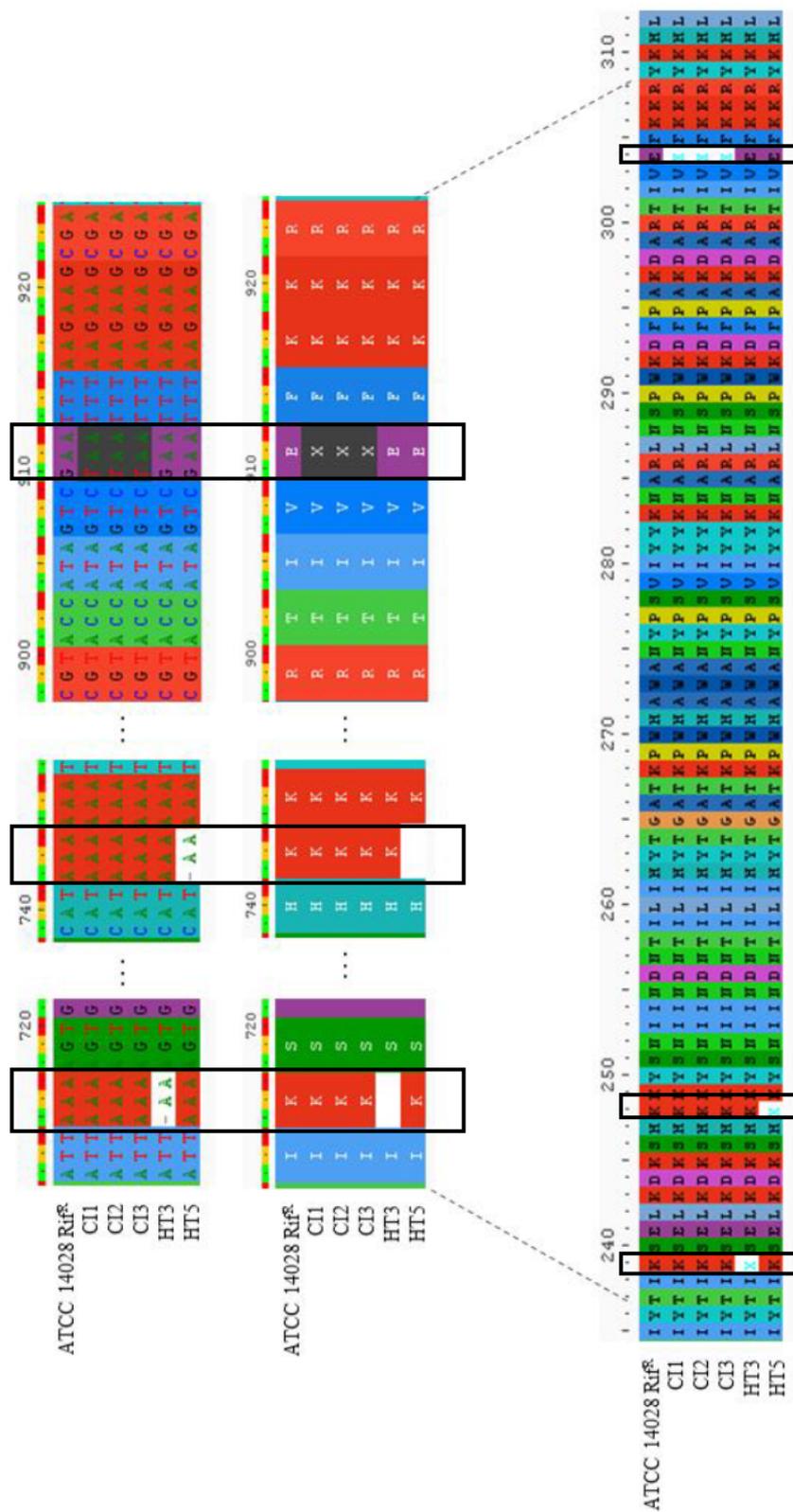


Figure 3.7. Alignment of *rfaJ* nucleotide and amino-acid sequences of wild type ATCC 14028 Rif^R and CI1, CI2, CI3, HT3 and HT5 isolates resistant to UAB_Phi20, UAB_Phi78, and UAB_Phi87 with Aliview software (Larsson, 2014). Boxes highlight single base pair deletion (A) in 715 and 742 position in HT3 and HT5, respectively, and a G to T mutation in 910 position in CI1, CI2 and CI3 strains.

Further amplification and Sanger sequencing confirmed that the changes detected in the *rfc* and *rfaJ* genes were not present in the wild-type strain, but had been acquired during treatment of the cooked ham with the cocktail (HT1 and HT5) and by *in vitro* infection of the cultures (CI2 and CI3). Considering these results, we additionally tested if changes detected in in the *rfc* and *rfaJ* genes were also present in the rest of resistant isolates that shared the same LPS profile. In this sense, HT1 share LPS phenotype with HT2, HT4 and LPS mutant SL428. Both, HT4 and SL428 also showed the *rfc* deletion described for HT1. However, in HT2 a punctual mutation (C →A) at position 219 of the *rfc* gene caused the appearance of an ochre codon (UAA) (Figure 3.8). On the other hand, CI1 which shared LPS phenotype with CI2 and CI3, also showed an ochre stop (UAA) generated by a single base pair mutation (G by T) at position 910 of the *rfaJ* gene (Figure 3.7). However, the HT3, that shares LPS phenotype with HT5, showed a single base pair deletion at position 715 of the *rfaJ* gene that generated a premature stop codon (UAA) (Figure 3.7).

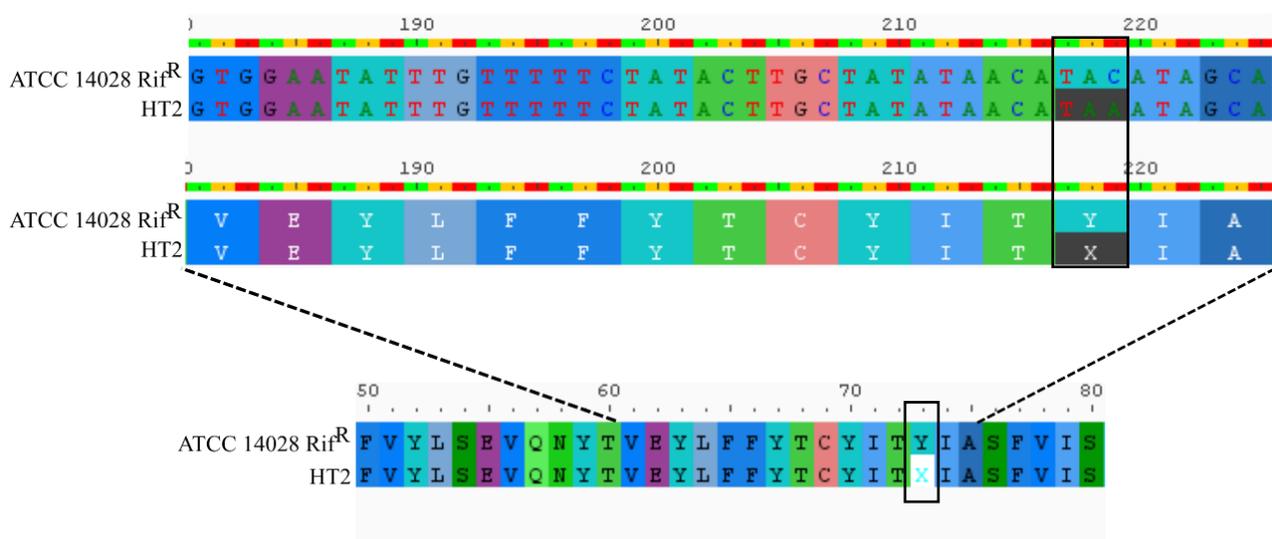


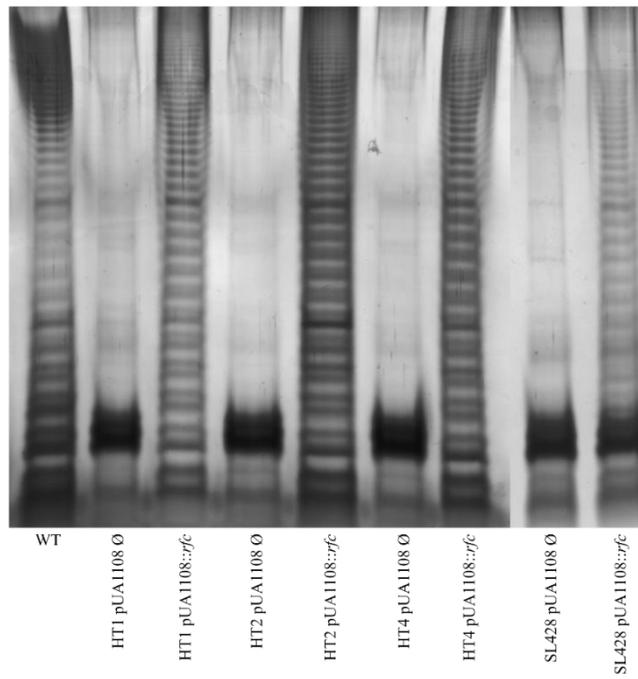
Figure 3.8. Alignment of *rfc* nucleotide and amino-acid sequences of wild type ATCC 14028 Rif^R and HT2 isolates resistant to UAB_Phi20, and UAB_Phi78 with Aliview software (Larsson, 2014). Boxes highlight single C to A mutation in 219 position.

Finally, among the resistant clones of the control groups from the *in vivo* studies, only a transversion was detected in isolate C2. It resulted in a punctual mutation (A→T) that implies an aminoacidic change (glutamine → leucine) in the *mgtA* gene (STM14_5349), which encodes a magnesium-translocating P-type ATPase (Table 3.6). There was no variation in the C5 genome compared to the wild-type. Thus, the mechanism of phage resistance in these isolates remains unclear.

4.1.3.5. *Trans* complementation of the LPS mutants *rfc* and *rfaJ*

Complementation studies were performed to confirm that the loss of *rfc* function in the HT1, HT2, and HT4 isolates was responsible for the acquisition of resistance to UAB_Phi20 and UAB_Phi78, and that the mutations in *rfaJ* detected in CI1, CI2, CI3, HT3 and HT5 caused resistance to UAB_Phi20, UAB_Phi78, and UAB_Phi87 phages. Thus, pUA1108::*rfc* or pUA1108::*rfaJ* in *trans* was used to transform the corresponding phage-resistant isolates. As a control, resistant variants were transformed with empty pUA1108 (Material and methods, Section 3.8.7). In all cases, susceptibility of the complemented *Salmonella* strains to UAB_Phi20, UAB_Phi78 and UAB_Phi87 bacteriophages was restored. Similarly, SDS-PAGE analysis showed that the LPS profiles of the complemented strains were identical to the LPS profile of the wild-type strain (Figure 3.9).

A)



B)

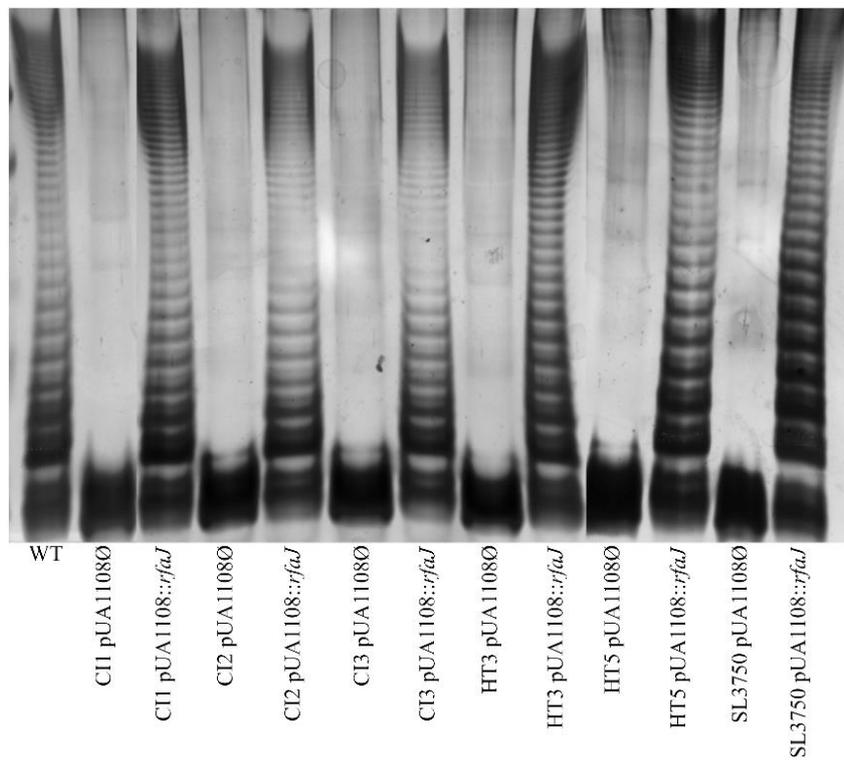


Figure 3.9. LPS profiles of (A) HT1, HT2, HT4 and (B) CI1, CI2, CI3, HT3 and HT5 isolates transformed with pUA1108::*rfc* and pUA1108::*rfkJ*, respectively, showing the restoring of LPS profile typical of the wild-type strain. SL428 (*rfc*-) and SL3750 (*rfkJ*-) mutants restored LPS profiles after complementation are included. WT, wild-type ATCC 14028 Rif^R, pUA1108Ø, empty pUA1108.

4.1.4. Characterization of the bacterial isolates with resistance to UAB_Phi78 infection obtained from *in vivo* studies

Thirty isolates isolated from the ceca of control (9 isolates) and treated (21 isolates) chickens that exhibited resistance to UAB_Phi78 (unchanged OD_{550 nm} values in the growth curve after infection) (Figure 3.2) were also resistant to UAB_Phi87 and susceptible to UAB_Phi20 (Table 3.2).

The efficiency of plating (EOP) and the plaque morphology resulting from UAB_Phi78 and UAB_Phi20 infection were determined in these isolates and the results compared to those obtained with the wild-type strain. Differences in the EOP values were recorded for both phages. In 24 out of 30 isolates, the EOP values for UAB_Phi78 and UAB_Phi20 phages were ≤ 0.5 , based on a comparison with the wild-type strain (Table 3.7). Three different plaque morphologies could be distinguished when UAB_Phi78 was titred on these isolates, as the plaques showed smaller sizes (2, 1, and 0.5 mm) and lacked the typical halo characteristic of the infected wild-type strain (Table 3.2). In 2 out of 30 isolates, smaller plaques (0.5 mm) than that typical of the infected wild-type strain were also obtained following infection with UAB_Phi20 (Figure 3.10).

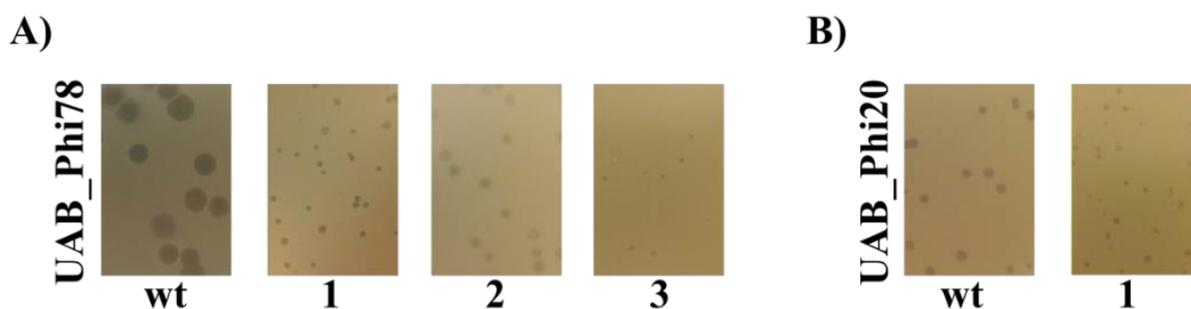


Figure 3.10. Plaque morphology of UAB_Phi78 (A) and UAB_Phi20 (B) in the isolates for *in vivo* experiments that showed resistance to UAB_Phi78 and UAB_Phi87, but susceptible to UAB_Phi20. Wild-type plaque morphology (wt) is shown for comparison.

Table 3.7. Efficiency of plating of UAB_Phi20 and UAB_Phi78 in the isolates from *in vivo* experiments with resistance to UAB_Phi78 and UAB_Phi87, but susceptible to UAB_Phi20, compared to wild-type ATCC 14028.

Group	Day	Animal	UAB_Phi78		UAB_Phi20	
			Average	SD	Average	SD
Control	8	3	0.2	0.01	0.5	0.07
	8	5	0.2	0.04	0.5	0.07
	15	1	0.9	0.12	0.5	0.03
	15	2	0.7	0.10	0.7	0.04
	15	2	0.8	0.05	0.6	0.12
	15	2	0.6	0.12	0.6	0.14
	15	2	0.6	0.13	0.8	0.11
	15	2	0.4	0.12	0.2	0.04
	15	2	0.7	0.08	0.6	0.07
Treated	1	7	0.5	0.05	0.6	0.04
	1	7	0.5	0.06	0.5	0.04
	8	3	0.5	0.07	0.4	0.05
	15	3	0.5	0.07	0.4	0.07
	15	3	0.4	0.05	0.4	0.03
	15	3	0.4	0.04	0.4	0.14
	15	3	0.5	0.12	0.4	0.07
	15	3	0.3	0.06	0.3	0.03
	15	3	0.4	0.03	0.4	0.09
	15	3	0.4	0.01	0.4	0.04
	15	3	0.4	0.07	0.4	0.08
	15	3	0.4	0.04	0.4	0.08
	15	3	0.2	0.05	0.3	0.04
	15	3	0.3	0.03	0.3	0.02
	15	3	0.4	0.04	0.3	0.04
	15	3	0.2	0.01	0.4	0.02
	15	3	0.3	0.05	0.3	0.09
	15	3	0.4	0.01	0.3	0.05
	15	3	0.3	0.01	0.3	0.05
15	3	0.4	0.06	0.3	0.09	
15	3	0.4	0.08	0.3	0.08	

SD, standard deviation

Nine isolates out of the 30 initially studied were selected based on the following features: i) origin (control and treatment group and animal), ii) EOP and iii) plaque morphology (Table 3.8), for a further characterization of the phage-resistance.

Table 3.8. Detail of efficiency of plating and plaque morphology of the nine selected *S. Typhimurium* ATCC 14028 Rif^R isolates with resistance to UAB_Phi78 and UAB_Phi87, but susceptible to UAB_Phi20.

Group	Day post-treatment	Animal	Isolate	UAB_Phi78		UAB_Phi20	
				EOP	Plaque morphology ^a	EOP	Plaque morphology ^b
Control	8	3	AC1	0.2 ± 0.01	3	0.5 ± 0.07	wt
		5	AC2*	0.2 ± 0.04	2	0.5 ± 0.07	1
	15	1	AC3*	0.9 ± 0.12	1	0.5 ± 0.03	wt
		2	AC4	0.8 ± 0.05	1	0.6 ± 0.12	wt
			AC5*	0.4 ± 0.12	1	0.2 ± 0.04	1
Treatment	1	7	AT1	0.5 ± 0.05	1	0.6 ± 0.04	wt
	8	3	AT2*	0.5 ± 0.07	1	0.4 ± 0.05	wt
			AT3	0.2 ± 0.01	1	0.4 ± 0.02	wt
	15	3	AT4*	0.2 ± 0.05	3	0.3 ± 0.04	wt

^a 1, clear plaque of 1 mm of size without halo; 2, clear plaque of 2 mm of size without halo; 3, clear plaque of 0.5 mm of size (see Figure 3.10).

^b wt, clear plaque of 1.5 mm of size; 1, clear plaque of 0.5 mm of size (see Figure 3.10).

* Isolates selected for further genome sequencing and analysis.

4.1.4.1. Bacteriophage infection kinetics

The nine isolates were first screened for their infection kinetics following infection with UAB_Phi20, UAB_Phi78, and UAB_Phi87 bacteriophages as well as their permeability to crystal violet, their LPS phenotype, and their CRISPR-Cas sequences. The infection kinetics were followed by measuring the OD_{550 nm} of the cultures, the titration of viable cells (CFU/mL) and bacteriophage production (PFU/mL), using the susceptible strain (ATCC14028 Rif^R) as the control. The behaviour of all nine isolates following infection with phage UAB_Phi78 was similar (Figure 3.11). No lysis was detected, as the OD_{550 nm} values remained invariable over time, although

Results

the number of viable cells decreased significantly. The concentration of bacteriophage following infection also remained unchanged, indicating the absence viral particle production (Figure 3.11).

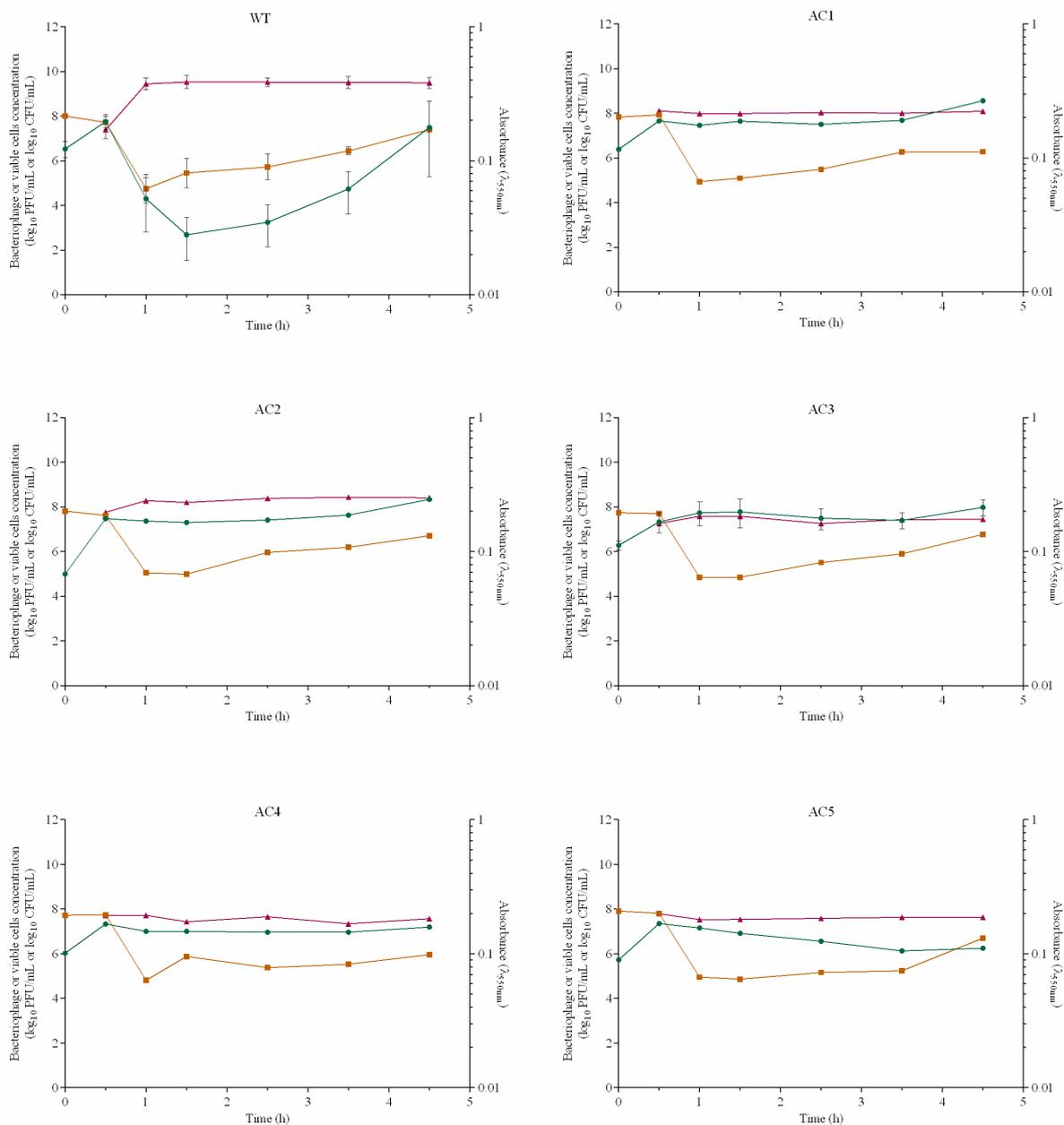


Figure 3.11. UAB_Phi78 bacteriophage infection kinetic upon infection of isolates from *in vivo* studies with resistance to UAB_Phi78 and UAB_Phi87, but susceptible to UAB_Phi20 (see Table 3.8). Absorbance is displayed in right-Y-axis and cell/phage concentration in left-Y-axis. Green colour shows OD_{550 nm} values, brown and lilac colours represent the *Salmonella* cell and phage concentration, respectively.

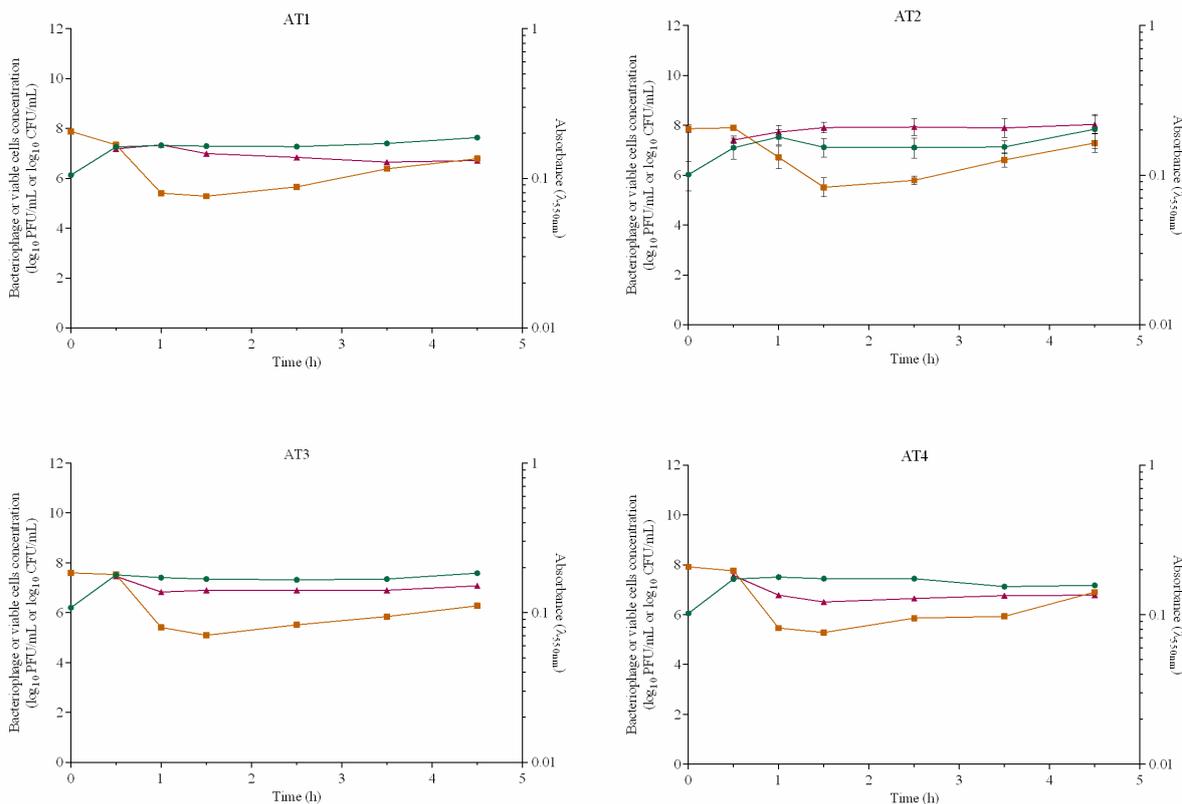


Figure 3.11. Continued.

By contrast, infection with bacteriophage UAB_Phi20 yielded a lytic effect similar to that observed in the wild-type strain, with the exception of the AC2 and AC5 isolates (Figure 3.12). The number of viable cells of isolate AC2 decreased but without cell lysis, as there was no change in the OD_{550 nm} values. With isolate AC5, lysis was slightly delayed and the number of viable cells decreased (Figure 3.12) compared to the wild-type strain. Finally, except isolate AC5, none of the isolates showed a significant decrease either in the OD_{550 nm} or in cell number and there was not production of phage particles over time when infected with UAB_Phi87 (Figure 3.13). The number of viable AC5 cells decreased 1 h after infection, as did the OD_{550 nm} values. The effect was greater than in the wild-type strain although without the production of viral particles. Overall, in these nine isolates UAB_Phi78 had a bactericidal but not a bacteriolytic effect whereas UAB_Phi20 was

Results

bacteriolytic, except in isolates AC2. All isolates except AC5 were resistant to bacteriophage UAB_Phi87.

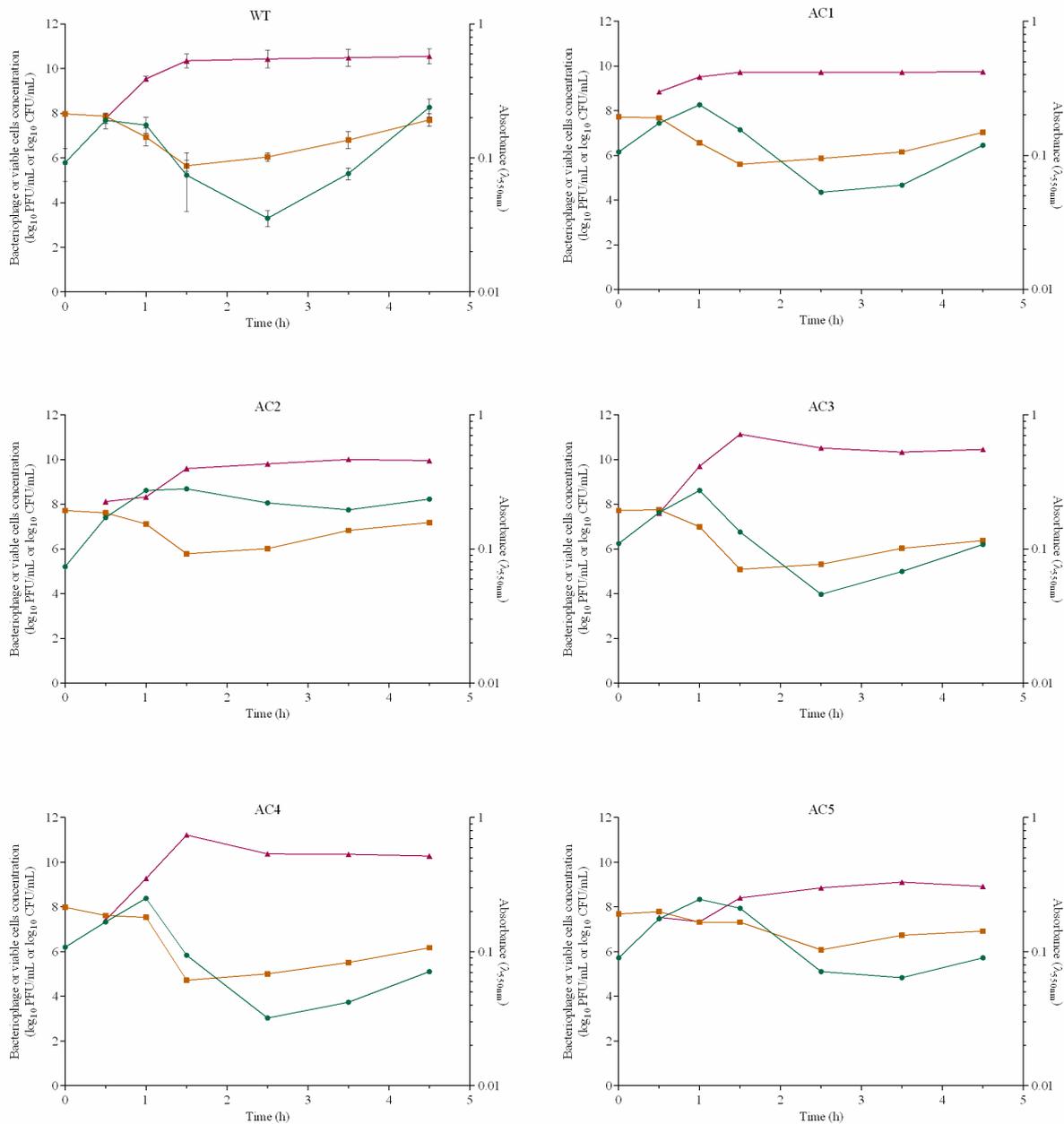


Figure 3.12. UAB_Phi20 bacteriophage infection kinetic upon infection of isolates from *in vivo* studies with resistance to UAB_Phi78 and UAB_Phi87, but susceptible to UAB_Phi20 (see Table 3.8). Absorbance is displayed in right-Y-axis and cell/phage concentration in left-Y-axis. Green colour shows OD_{550 nm} values, brown and lilac colours represent the *Salmonella* cell and phage concentration, respectively.

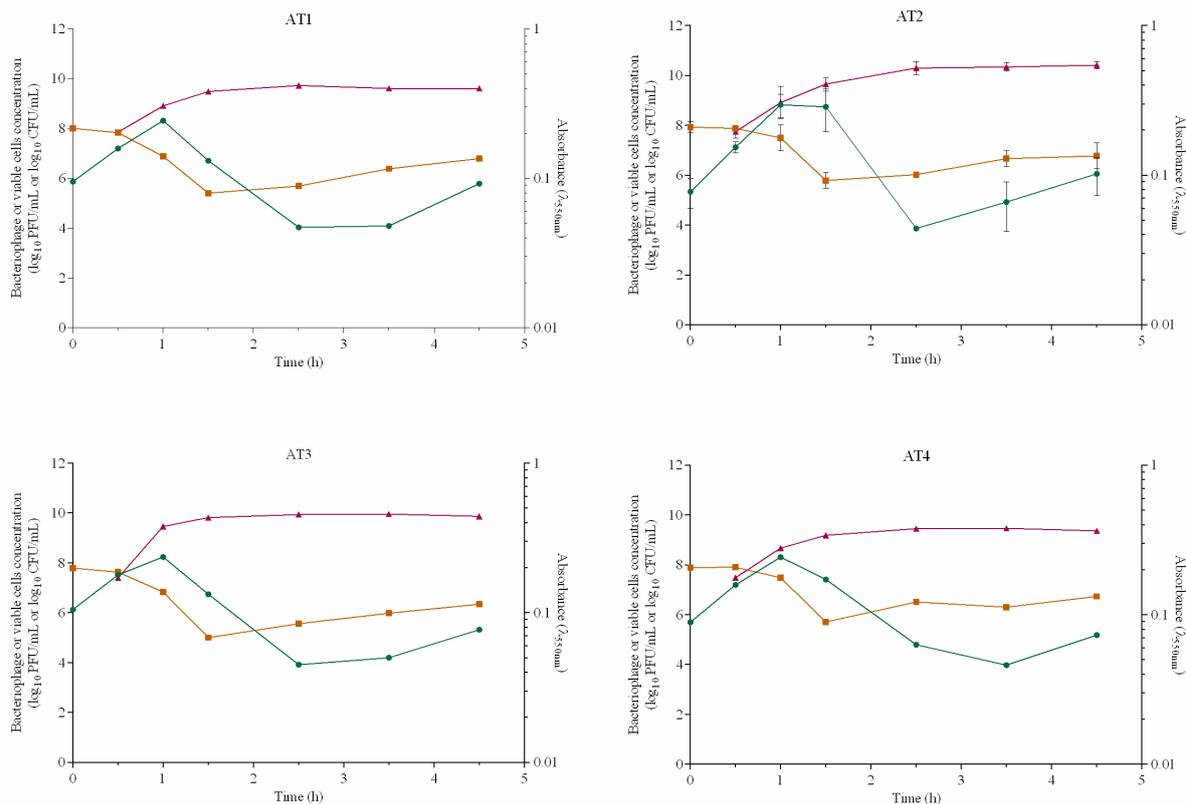


Figure 3.12. Continued.

4.1.4.2. Permeability to crystal violet

As observed with the phage-resistant isolates, in all nine isolates the diameter of growth inhibition was comparable to that associated with the phage-susceptible strain (Table 3.5).

4.1.4.3. LPS profile characterization

In addition, the LPS profiles of all isolates were similar to each other and to that of the susceptible strain ATCC14028 Rif^R (Figure 3.14).

4.1.4.4. CRISPR *loci* sequence content

Finally, the CRISPR1 and CRISPR2 *loci* sequences of the isolates were also similar to those of ATCC14028.

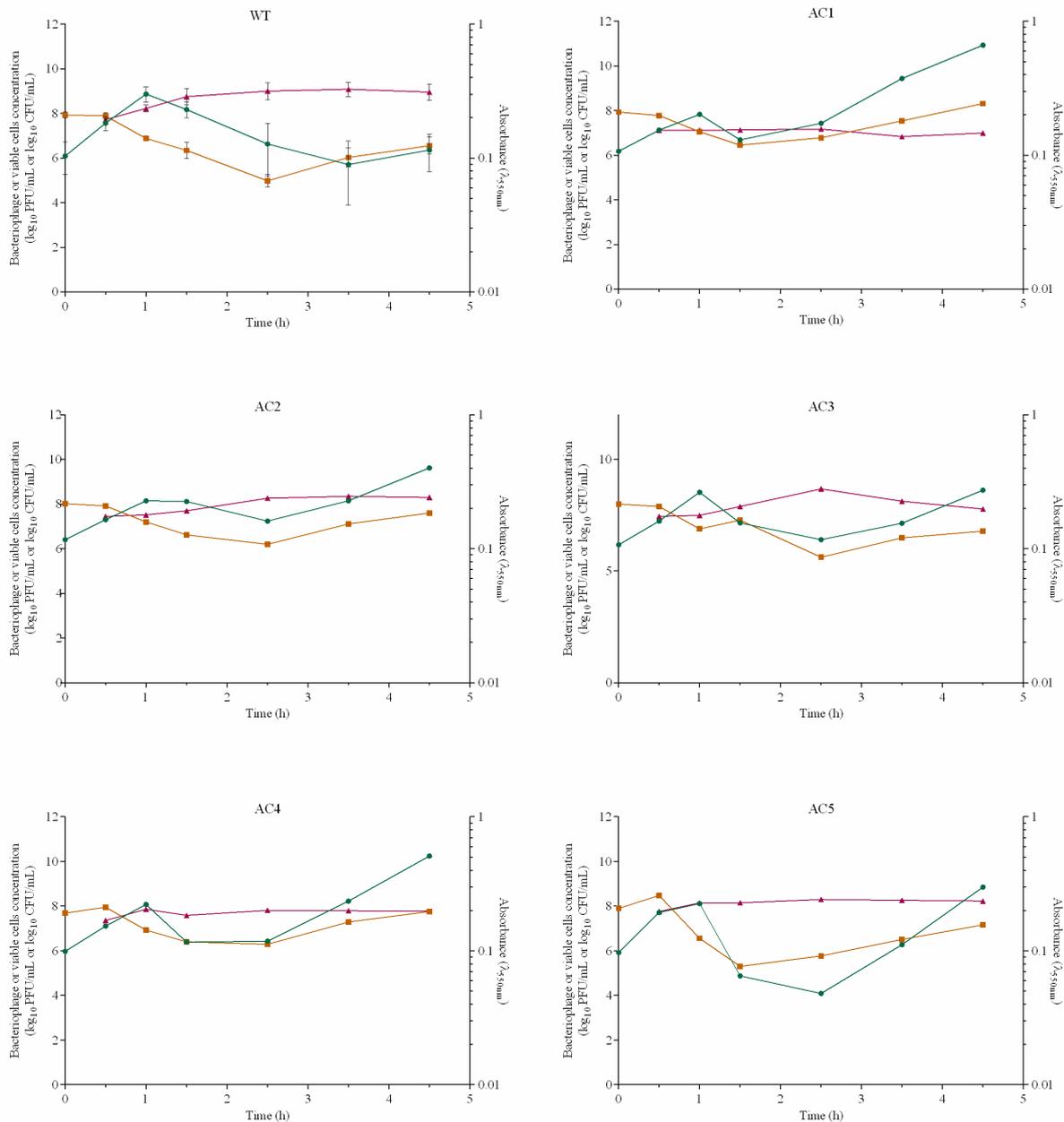


Figure 3.13. UAB_Phi87 bacteriophage infection kinetic upon infection of isolates from *in vivo* studies with resistance to UAB_Phi78 and UAB_Phi87, but susceptible to UAB_Phi20 (see Table 3.8). Absorbance is displayed in right-Y-axis and cell/phage concentration in left-Y-axis. Green colour shows OD_{550 nm} values, brown and lilac colours represent the *Salmonella* cell and phage concentration, respectively.

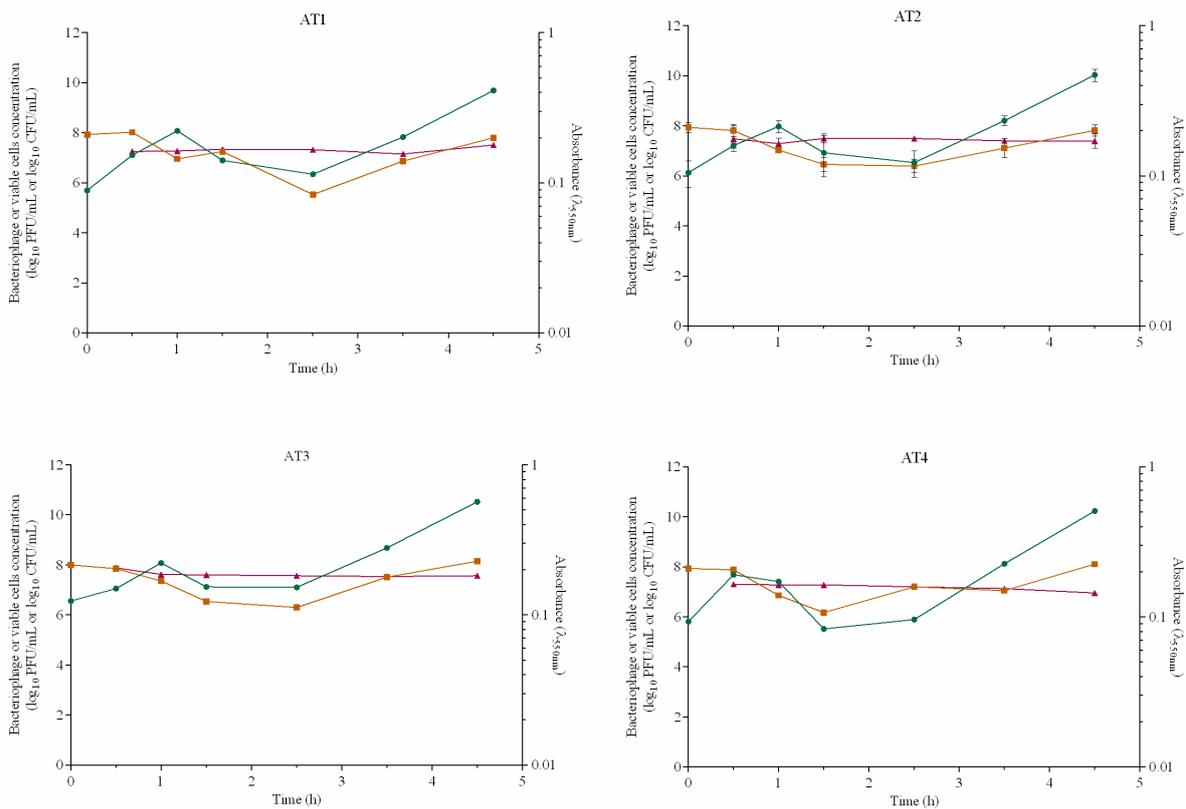


Figure 3.13. Continued.

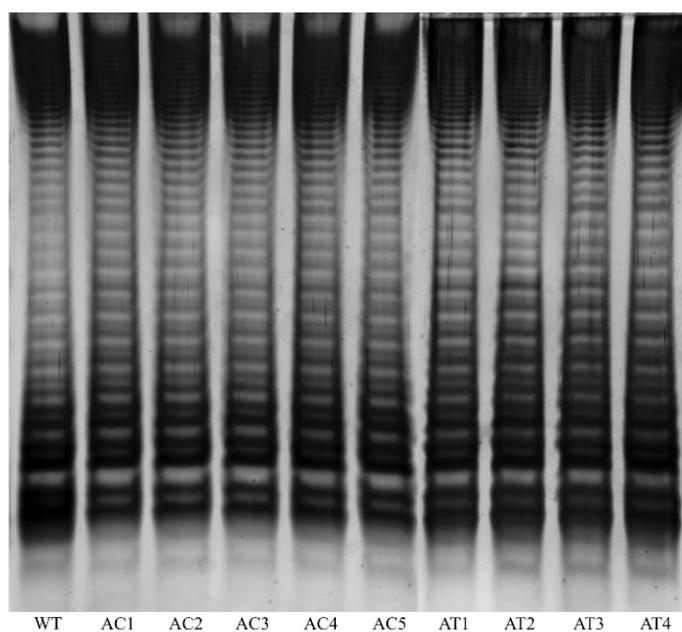


Figure 3.14. LPS phenotypes of the nine isolates with resistance to UAB_Phi78 and UAB_Phi87, but susceptible to UAB_Phi20, selected from *in vivo* studies. WT, ATCC 14028 Rif^R susceptible strain.

4.1.4.5. Bacteriophage DNA replication analysis by semi-quantitative PCR

The above results suggested that the behaviour of UAB_Phi78 with respect to infection (decrease in the number of viable cells, no lysis and no significant production of viral particles), EOP, and plaque morphology was caused by a post-infection phenomenon. Thus, five of the isolates exhibiting this behaviour (AC2, AC3, AC5, AT2, and AT4) (Table 3.8.) were chosen for further studies of bacteriophage DNA replication and the sequences of their genomes.

Semi-quantitative PCR was used to determine whether UAB_Phi78 DNA replication was affected after the stage of DNA injection. The wild-type strain was included as a control. Unlike the wild-type strain, in which UAB_Phi78 replication was detected until 20 min after infection, phage DNA in atypical isolates was amplified (detected inside *Salmonella* cells) until the end of the experiment (150 min) (Figure 3.15). Based on a comparison with the titration of free bacteriophages after infection and consistent with the results of DNA replication, the experiment showed that phage adsorption in the wild-type strain occurred after the first 10 min of infection and the production of new particles ($\geq 2 \log_{10}$) at 20 min. By contrast, after infection of AC2, AC3, AC5, AT2, and AT4, while phage adsorption could also be produced, based on a decrease in the phage titre ($\leq 1 \log_{10}$), new viral particles were scarcely produced (Figure 3.15).

4.1.4.6 Genome sequencing and analysis

Sequencing of the genomes of AC2, AC3, and AC5 (belonged to control chickens' group) and AT2 and AT4 (from treated chickens group) and comparison with the NCBI reference sequence revealed the same changes described for the wild-type and resistant strains (Table 3.6). While the genomes of AC2, AC3 and AC5 did not differ from the genome of the wild-type strain, several changes in the genome of AT2 were detected: i) several single nucleotide polymorphisms in STM14_3335, encoding a transposase of the IS3/IS911 family and ii) several variants in STM14_3336, encoding a putative transposase, that produced an amino acid change (Ala/Trp) and

gave rise to a truncated protein. However, none of these genes seems to be involved in the mechanisms of phage resistance. Similarly, the AT4 strain contained the same changes described for STM14_3335 and STM14_3336. In addition, a premature stop in the *yrfH* gene (STM14_4210), encoding the ribosome-associated heat shock protein Hsp15 was also found.

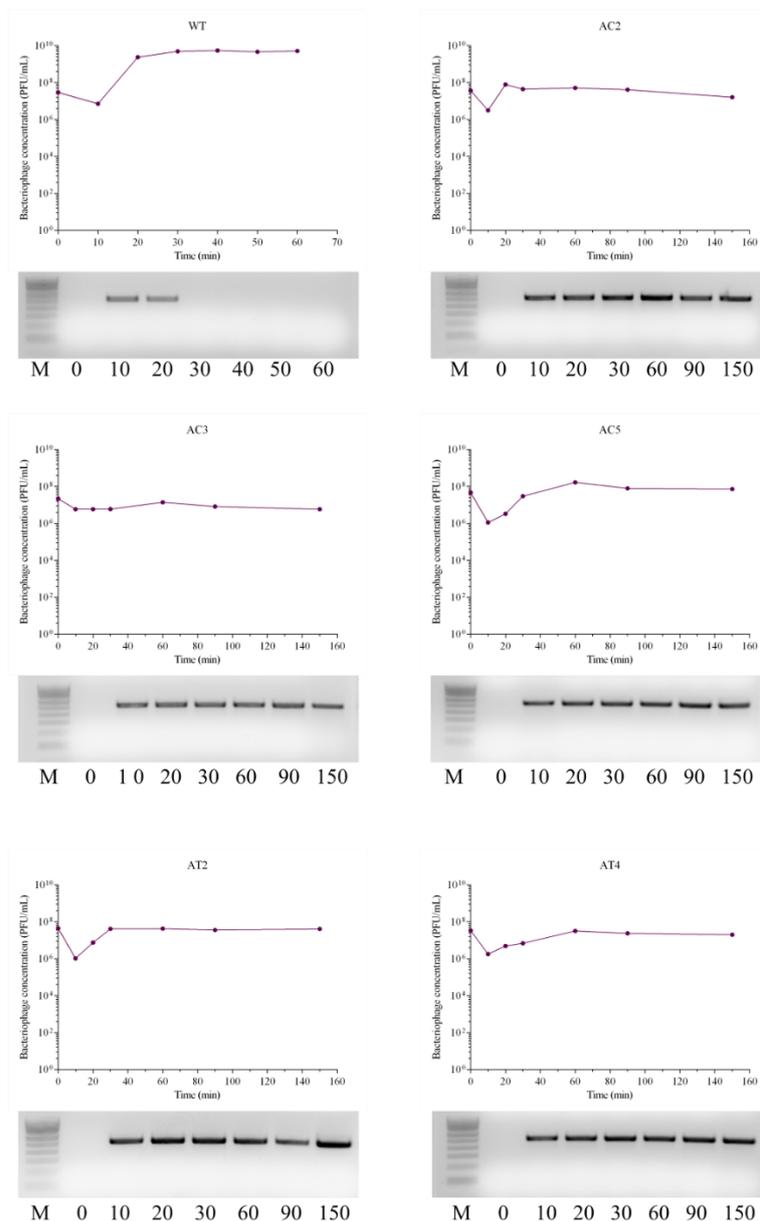


Figure 3.15. Semi-quantitative-PCR detection of UAB_Phi78 DNA replication inside the cells of AC2, AC3, AC5, AT2, and AT4 isolates. In addition, evolution of UAB_Phi78 concentration at the same times is shown and wild-type (WT) ATCC 14028 strain is included as control.

The genome maps of AC2, AC3, AC5, AT2, and AT4 strains, are shown in Figure 3.16.

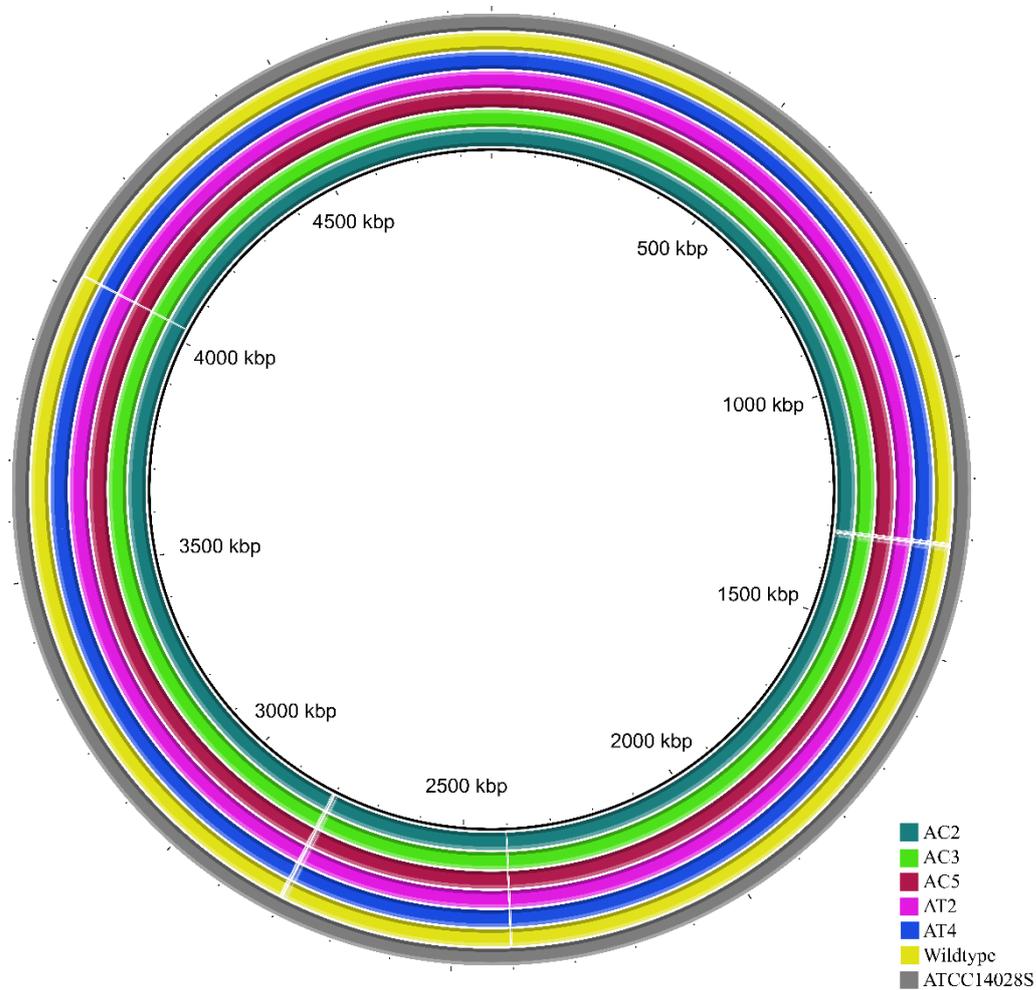


Figura 3.16. Circular representation of the five chromosomes belonged to isolates from *in vivo* experiments with resistance to UAB_Phi78 and UAB_Phi87, but susceptible to UAB_Phi20, (see Table 3.8) including the wild type and NCBI reference genomes using BRIG software (Alikhan *et al.*, 2011).

4.2. Biodistribution of bacteriophages

4.2.1 *In vivo* biodistribution of bacteriophages in murine model

The biodistribution of liposome-encapsulated and non-encapsulated labelled UAB_Phi20 bacteriophage was evaluated *in vivo* and *ex vivo* in mice. Data on the encapsulation of VTS-750-stained UAB_Phi20 phage indicated that the final product was a mixture containing ~46 % encapsulated and 54 % non-encapsulated UAB_Phi20 phages (Table 3.9). The size of the liposomes as estimated by DLS was 341.6 ± 8.6 nm with a zeta potential of $+ 34 \pm 5.0$ mV. Encapsulation was also confirmed by visualization of the nanocapsules on the cryo-TEM images and the three-dimensional (3D) spatial superimposition of the CLSM images showing the fluorescence of both the phages and liposomes (Figure 3.17.). The term “the product of phage encapsulation” (PPE) is used in the following to refer to this mixture.

Table 3.9. Determination of the encapsulation yield (%) of UAB_Phi20 after three independent experiments.

Experiments	Bacteriophage concentration (pfu/mL) ^a		Encapsulation yield (%)		
	Free	Total ^b	Individual	Mean	SD
1	7.1×10^{10}	1.3×10^{11}	44.5		
2	9.9×10^{10}	1.8×10^{11}	45.3	45.7	1.5
3	3.4×10^{10}	6.5×10^{10}	47.4		

^a Each value represents the average of three replicate plates.

^b Values obtained after treatment with bile salts.

Prior to the *in vivo* experiments, the RE of dilutions of VTS-750-stained UAB_Phi20 (5.8×10^{11} to 1.1×10^9 pfu/mL) was measured using the IVIS® Spectrum imaging system. Measurements of the same dilutions of PPE and VTS-750-stained UAB_Phi20 showed that, although a quenching effect occurred at higher bacteriophage concentrations, the correlations between fluorescence and

Results

the bacteriophage concentration were linear between 4.5×10^9 and 3.6×10^{10} pfu/mL for UAB_Phi20 phage and between 2.3×10^9 and 1.8×10^{10} pfu/mL for PPE. The FLI of the bacteriophage was higher (3.4 ± 1.1 times) than that of PPE, indicating that liposome encapsulation resulted in fluorescence attenuation, which was considered in subsequent *in vivo* measurements.

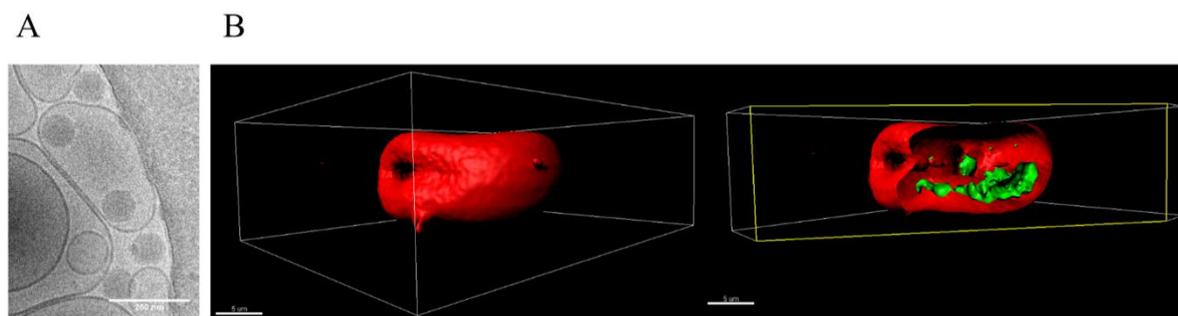


Figure 3.17. (A) Cryo-TEM image of liposome-encapsulated UAB_Phi20; (B) 3D confocal images of SYBR gold-labeled UAB_Phi20 encapsulated into fluorescent Dil-labeled liposome (red). 3D image of liposome surface is shown on the left and its cross-section images on the right. Scale bars, 5 μ m (Otero *et al.*, 2019).

In the *in vivo* experiments, single oral doses (1.3×10^{13} pfu/kg) of bacteriophage UAB_Phi20 and of PPE were administered to two groups of mice. Both preparations were well tolerated and did not cause significant body weight loss or adverse side effects in the mice. *In vivo* fluorescence imaging showed that, by 2.5 h post-administration, UAB_Phi20 had mainly accumulated in the gastrointestinal tract (stomach and intestinal system), decreasing slightly in these organs by 5.5 h post-administration (Figure 3.18). Similar results were achieved following PPE administration. In either case, the presence of phages in other tissues was not detected by *in vivo* fluorescence imaging.

The *ex vivo* FLI results confirmed those obtained *in vivo*, as they revealed the accumulation of UAB_Phi20 fluorescence (RE) in the stomach (Figure 3.19.A) and intestine (especially the cecum) in both groups of animals (Figure 3.19.B). Calculations of the RE/g of PPE (Figure 3.19.C) took into account the attenuation of the fluorescence observed in the *in vitro* measurements (3.4-fold). Thus, 3 and 6 h after treatment, the bacteriophages were mainly present in the stomach, and the

FLI (RE/g) of PPE was significantly higher than that of the non-encapsulated phage (Figure 3.19.C). In the intestine, FLI was maintained over time, with slightly larger numbers of bacteriophages present in mice treated with UAB_Phi20 than with PPE, both at 3 h and 6 h post-administration (Figure 3.19.C). In the spleen, liver, and kidney, as well as in muscle, the FLI in mice treated with UAB_Phi20 and PPE indicated a generally low and variable accumulation of the phages among replicates, attributable to the limit of detection of the imaging technique. Thus, at a concentration of stained bacteriophages $\leq 7 \log_{10}$ pfu/g, the imaging methodology did not allow discrimination between the autofluorescence of the mouse tissues and the fluorescence of the stained phages (data not shown).

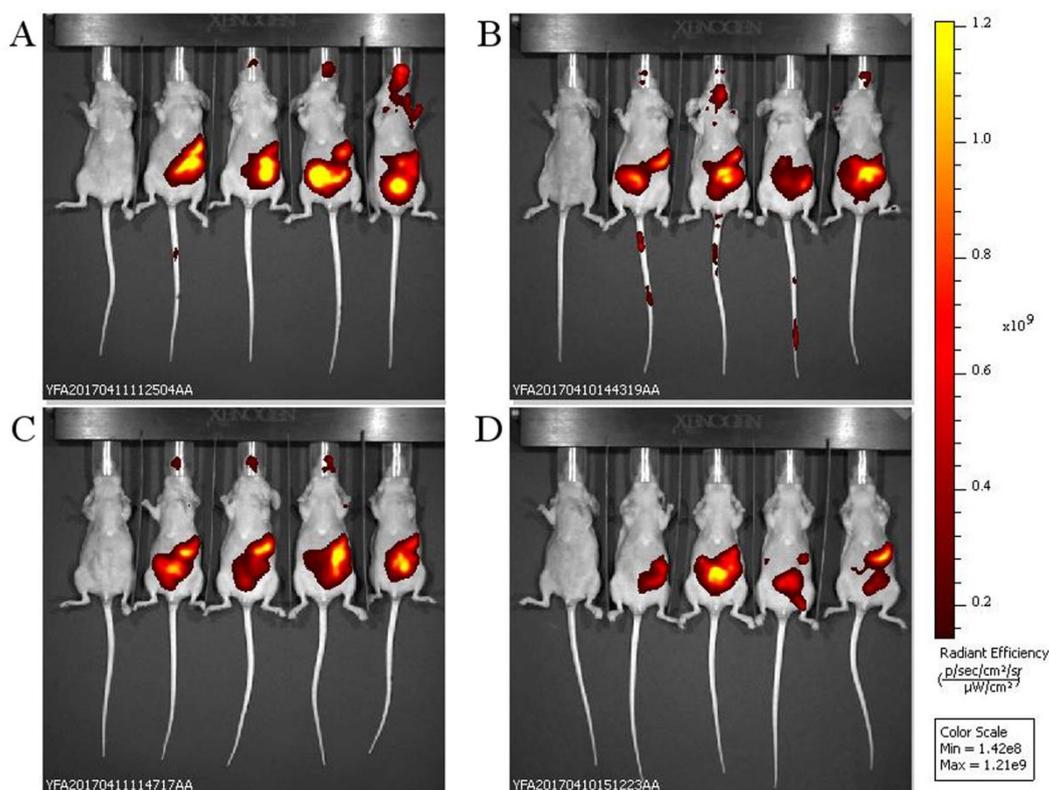


Figure 3.18. *In vivo* fluorescence images of the biodistribution in mice of VTS-750-stained UAB_Phi20: non-encapsulated phages (A, C) and the products of phage encapsulation (PPE) (B, D). The ventral side of each mouse was imaged 2.5 h (A, B) and 5.5 h (C, D) after oral administration of the phage preparations (n=4 mice per group). The pseudocolor scale bars are consistent for each corresponding view and show the relative changes over time (Otero *et al.*, 2019).

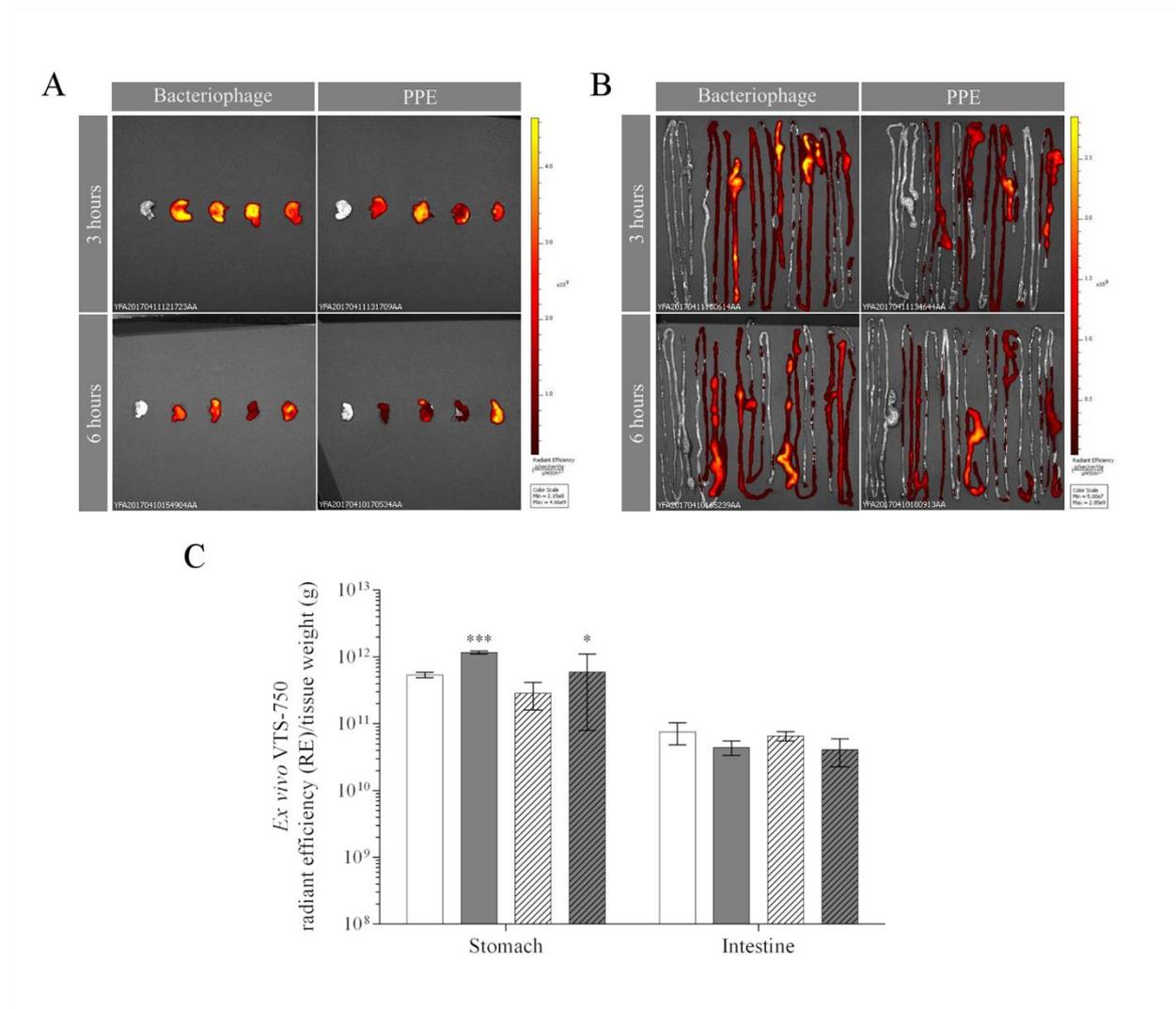


Figure 3.19. *Ex vivo* fluorescence of bacteriophages and PPE in the mouse stomach (A) and intestine (B) 3 h and 6 h post-administration. The dorsal view of both organs is shown. Pseudocolor scale bars are located on the right for each corresponding set of images. (C) Fluorescence accumulation (RE) per tissue weight (g) in the stomach and intestine 3 h (solid) and 6 h (dotted) after the administration of non-encapsulated phages (white) or PPE (gray). Values of RE/g of PPE were obtained after taking into account the fluorescence attenuation (3.4-fold) observed in the *in vitro* experiment. The significance of the RE/g values of the encapsulated vs. non-encapsulated phage is shown: *** $P < 0.001$ and * $P < 0.05$ (Otero *et al.*, 2019).

After the *ex vivo* FLI measurements, the tissues were weighed, homogenized in MgSO_4 (10 mM), and the bacteriophage concentration was determined, including the concentration of encapsulated bacteriophages present in the tissues of PPE-treated mice. The latter assessment was accomplished by titration of the phages in untreated tissues and in tissues treated with bile salts, as previously

described. This allowed calculation of the percentage of encapsulated phages present in each tissue (Table 3.10.). The results in the organs and tissues harvested 3 and 6 h post-administration showed that the encapsulated phages remained or had accumulated in the spleen ($68 \% \pm 8.6 \%$ and $69 \% \pm 7.6 \%$, respectively), stomach ($50 \% \pm 8.2 \%$ and $53 \% \pm 9.4 \%$, respectively), and muscle ($47 \% \pm 7.4 \%$ and $47 \% \pm 6.6 \%$, respectively). The corresponding percentages in the liver were lower ($38 \% \pm 6.3 \%$ and $23 \% \pm 1.6 \%$). By contrast, liposome-encapsulated bacteriophages were not found in either the intestine or the kidney, and the percentage in plasma was the lowest measured (Table 3.10).

Table 3.10. Bacteriophage concentrations in *ex vivo* organs obtained from mice orally administered bacteriophages and the products of phage encapsulation (PPE) (Otero *et al.*, 2019).

Organ	Time (h)	Bacteriophage	PPE	
		Concentration (\log_{10} pfu/g) ^a	Concentration (\log_{10} pfu/g) ^{a, b}	Percentage (%) ^a
Stomach	3	7.6 ± 0.2	10.0 ± 0.2^d	50 ± 8.2
	6	7.4 ± 0.6	9.9 ± 0.2^d	53 ± 9.4
Intestine	3	9.0 ± 0.2	9.2 ± 0.1	0 ± 0.0
	6	9.4 ± 0.2	9.2 ± 0.2	0 ± 0.0
Liver	3	7.2 ± 0.4	6.6 ± 0.2	38 ± 6.3
	6	7.3 ± 0.6^c	4.8 ± 0.7	23 ± 1.6
Spleen	3	6.6 ± 0.6^c	4.4 ± 0.1	68 ± 8.6
	6	5.4 ± 0.5	5.1 ± 0.9	69 ± 7.6
Kidney	3	7.6 ± 0.3^c	5.7 ± 0.2	0 ± 0.0
	6	6.5 ± 0.3^c	4.0 ± 0.1	0 ± 0.0
Muscle	3	6.1 ± 0.2	4.9 ± 0.7	47 ± 7.4
	6	6.4 ± 0.6^c	4.6 ± 0.4	47 ± 6.6
Plasma	3	4.9 ± 0.5	3.7 ± 0.9	21 ± 9.3
	6	5.1 ± 0.1	4.9 ± 0.3	17 ± 7.2

^a Each value is the average of four samples \pm standard deviation.

^b Values obtained in samples treated with bile salts.

^c Statistically significant difference between non-encapsulated and encapsulated phages ($P < 0.001$ at 3 h in the spleen and kidney and at 6 h in the liver and kidney; $P < 0.05$ at 6 h in muscle).

^d Statistically significant difference between encapsulated and non-encapsulated phage ($P < 0.001$).

The difference in the percentage of encapsulation at 3 and at 6 h was not significant.

The total phage concentrations in the organs and tissues of the two groups of animals are shown in Table 3.10. Throughout the study, phage concentrations in the stomach were significantly higher in PPE-treated mice than in mice treated with non-encapsulated phages, whereas the differences in the intestinal concentrations of the two phage preparations was not significant (Table 3.10). In other tissues and organs, the phage concentrations were higher in mice administered non-encapsulated phages. Specifically, the non-encapsulated phage concentration in the liver at 3 and 6 h was 7.2 ± 0.4 and $7.3 \pm 0.6 \log^{10}$ pfu/g, respectively. These levels were maintained over time, whereas in the PPE-treated mice the concentration in the liver decreased from $6.6 \pm 0.2 \log^{10}$ pfu/g at 3 h to $4.8 \pm 0.7 \log^{10}$ pfu/g at 6 h. In the kidney, the accumulation of non-encapsulated phages and PPE decreased between 3 and 6 h of administration, whereas a decrease in the spleen occurred only in mice treated with the former preparation. The phage concentration increased between 3 h and 6 h post-administration in the spleen of the PPE-treated mice and in the plasma of both groups. In muscle, phage accumulation was maintained over time in all of the treated mice (Table 3.10). All tissues from the untreated animals were negative for bacteriophages.

4.2.2 Transcytosis of bacteriophages across the *in vitro* intestinal barrier model

The transcytosis of UAB_Phi20 bacteriophage: i) non-encapsulated; ii) PPE; and iii) and encapsulated with alginate or alginate/CaCO₃ was assayed *in vitro* on an intestinal cell monolayer of Caco-2/HT29/Raji-B cells seeded in a Transwell® system to establish apical and basolateral sides (Material and methods, Section 3.5).

The TEER of the intestinal epithelial cell monolayers was measured before and after (48 h) bacteriophage inoculation. All TEER values were $> 300 \Omega/\text{cm}^2$, confirming the valid use of this method in the experiments. In addition, epithelial cell monolayer polarity and integrity were assessed by TEM, which revealed that the bacteriophages did not alter either the membrane stability of Caco-2 cells or the robustness of their tight junctions (Figure 3.20).

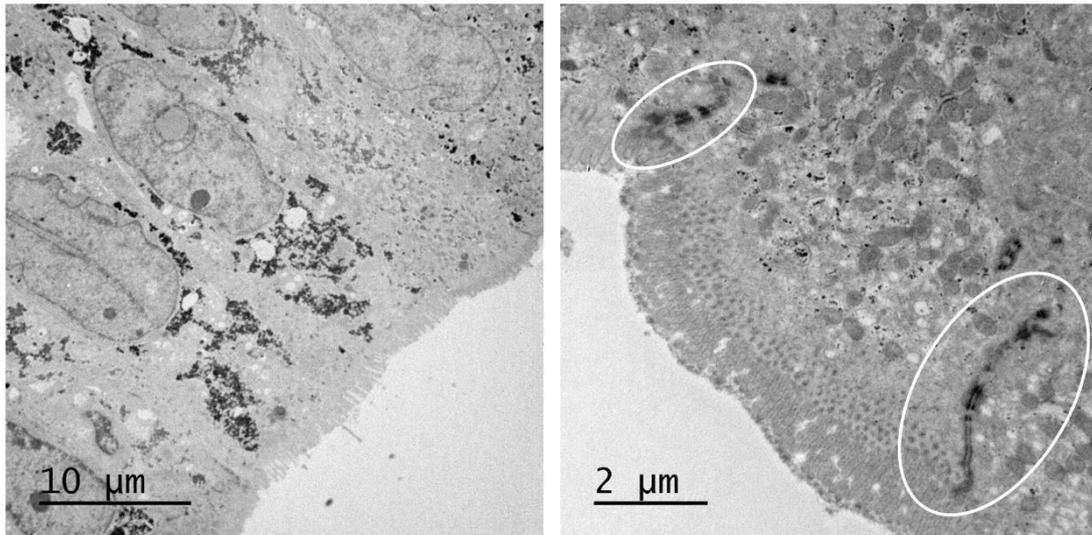


Figure 3.20. Epithelial cell monolayer TEM images after 48 h of incubation with the non-encapsulated bacteriophage. Tight junctions are indicated by a white ellipse. Scale bars are shown in the images (Otero *et al.*, 2019).

Transcytosis of the bacteriophages applied to the apical side of the intestinal epithelial cell monolayers was quantified at 2, 6, 24, and 48 h by plating the apical and basolateral contents onto LB5000 agar plates. The results showed that, after 2 h and 48 h, bacteriophage transcytosis in DMEM containing FBS ranged from 4.5 ± 0.0 to $5.5 \pm 0.1 \log_{10}$ pfu/mL and from 3.7 ± 0.3 to $4.2 \pm 0.3 \log_{10}$ pfu/mL at starting concentrations of 1×10^{10} pfu/mL and 1×10^7 pfu/mL, respectively (Figure 3.18). Because the amount of transcytosis was low, only the higher starting dose (1×10^{10} pfu/mL) was used in further experiments. Furthermore, the experiments were conducted in serum-free DMEM because FBS caused liposomal aggregation (data not shown).

Prior to the transcytosis experiments, we demonstrated that incubation of the PPE in DMEM at 37°C for 72 h did not modify either the titer or the percentage of encapsulation (around 46 % of the applied dose). Thus, under this condition, the transcytosis of UAB_Phi20 phages was similar that described above for a starting dose of 1×10^{10} pfu/mL. Accordingly, bacteriophage encapsulation did not significantly modify transcytosis at either 2 h or 48 h, based on values of 4.6 ± 0.5 and $4.8 \pm 0.4 \log_{10}$ pfu/mL, respectively (Figure 3.21).

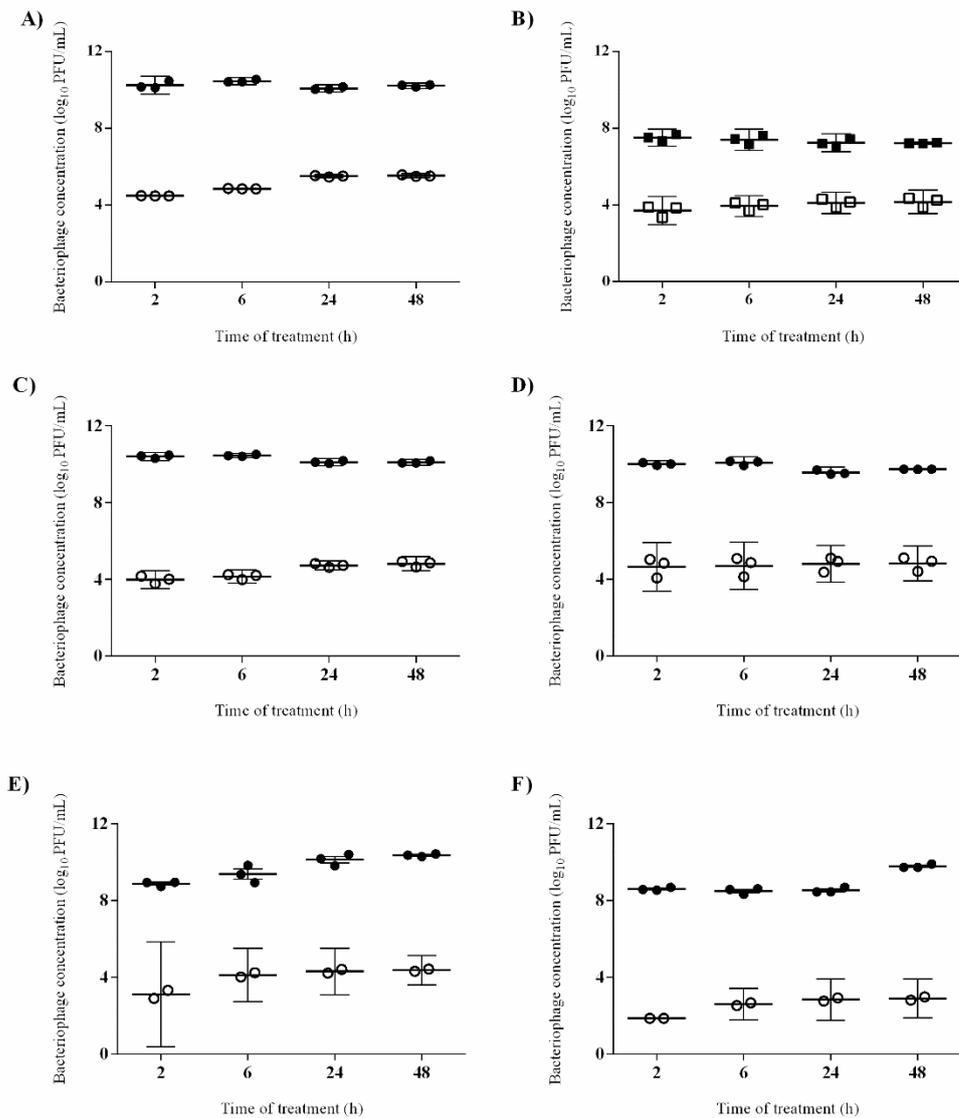


Figure 3.21. Transcytosis of non-encapsulated phage (A–C), PPE (D), alginate (E), and alginate/CaCO₃ (F) across an intestinal epithelial monolayer. The bacteriophage concentration was quantified 2, 6, 24, and 48 h post-inoculation by titration of the contents of the apical (black ●, ■) and basolateral (white ○, □) compartments. DMEM supplemented with FBS was used to study the non-encapsulated bacteriophages (A and B), alginate (E) and alginate/CaCO₃ (F). Instead, serum-free DMEM was used to compare the transcytosis of non-encapsulated phages (C) and PPE (D). The concentrations applied in the apical chamber were 1×10^{10} pfu/mL (circles) and 1×10^7 pfu/mL (squares). Scatter plots show the means; error bars represent the 95 % confidence intervals. The phage concentration in the basolateral chamber is the sum of the values obtained at each time point (Adapted from Otero *et al.*, 2019).

With respect to the alginate-encapsulated and alginate/CaCO₃-encapsulated bacteriophages, lower values of transcytosis to the commented before for the non-encapsulated and PPE were observed (Figure 3.21). In this sense, alginate-encapsulated bacteriophages transcytosis was statistically significantly lower than the non-encapsulated at 2, 6, 24 and 48 hours with values ranged from 3.1 ± 0.3 to 4.4 ± 0.1 at 2 h and 48h respectively and with respect the liposome-encapsulated ones at 2h post-inoculation (Figure 3.21). Lower concentrations of phages were detected along the time after application of alginate/CaCO₃-encapsulated bacteriophages with values ranged from 1.85 ± 0.00 to 2.89 ± 0.11 at 2h and 48h, respectively (Figure 3.21).

It should be noted that neither liposome nor alginate or alginate/CaCO₃-encapsulated bacteriophages were found in the basolateral compartment at any of the sampling times. Furthermore, the percentage of liposome-encapsulated phages in the apical section did not change during the experiment, regardless of the initially applied concentration (data not shown).

To visualize the transcytosis of bacteriophages through the cell monolayer, bacteriophage UAB_Phi20 was fluorescently labeled using SYBR gold and encapsulated in liposomes labeled with Vybrant Dil. Both the labeled phages and the labeled liposomes containing labeled phages were incubated with intestinal cell monolayers for 2 h. Figure 3.22 shows the CLSM images depicting the fluorescent signals corresponding to the cells (Figure 3.22.A), phages (Figure 3.22.B), and PPE (Figure 3.22.C) stratified across the barrier thickness, as revealed by the x, y, and z scans of the intestinal cell layer. In addition, three-dimensional images of a cross-section of the cell layer, created using the Imaris® software, showed the merging of the different fluorophores used for staining the cell membrane, nucleus, phages, and liposomes (Figure 3.23.). Non-encapsulated bacteriophages were seen inside the intestinal cells (Figure 3.23.A) and phages from the labeled PPE were present at high density on the cell surface and inside the cells (Figure 3.23.B-3.23.D).

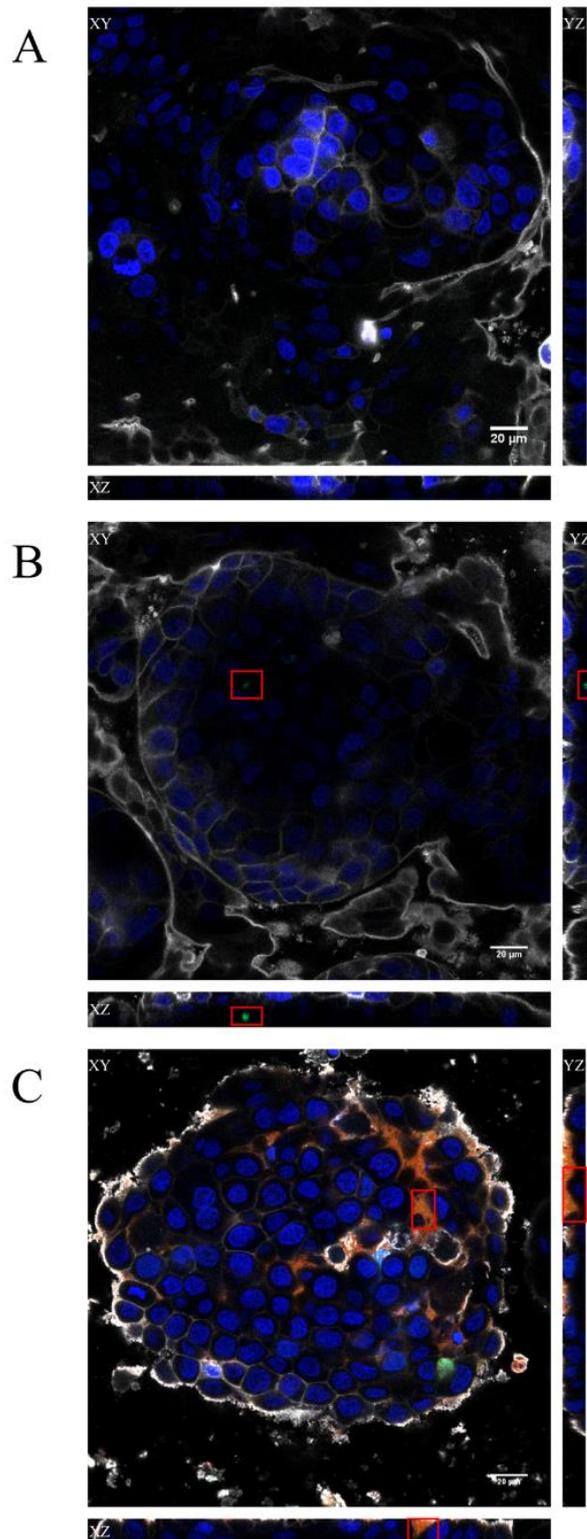


Figure 3.22. Confocal images of the *x*, *y*, and *z* scans of the *in vitro* Caco-2/HT29/Raji-B lymphocytes co-culture model. The results obtained with the non-treated (A), bacteriophage-treated (B) and PPE (C) treated cultures at 2 h are shown. Cell nuclei were stained with Hoechst 33242 (blue), bacteriophages with SYBR gold (green), and liposomes with Vybrant Dil (red). The plasma membrane was stained with CellMask DeepRed (gray). Red squares indicate the regions where the stained phages (B) or PPE (C) were visualized. Scale bars, 20 μm (Otero *et al.*, 2019).

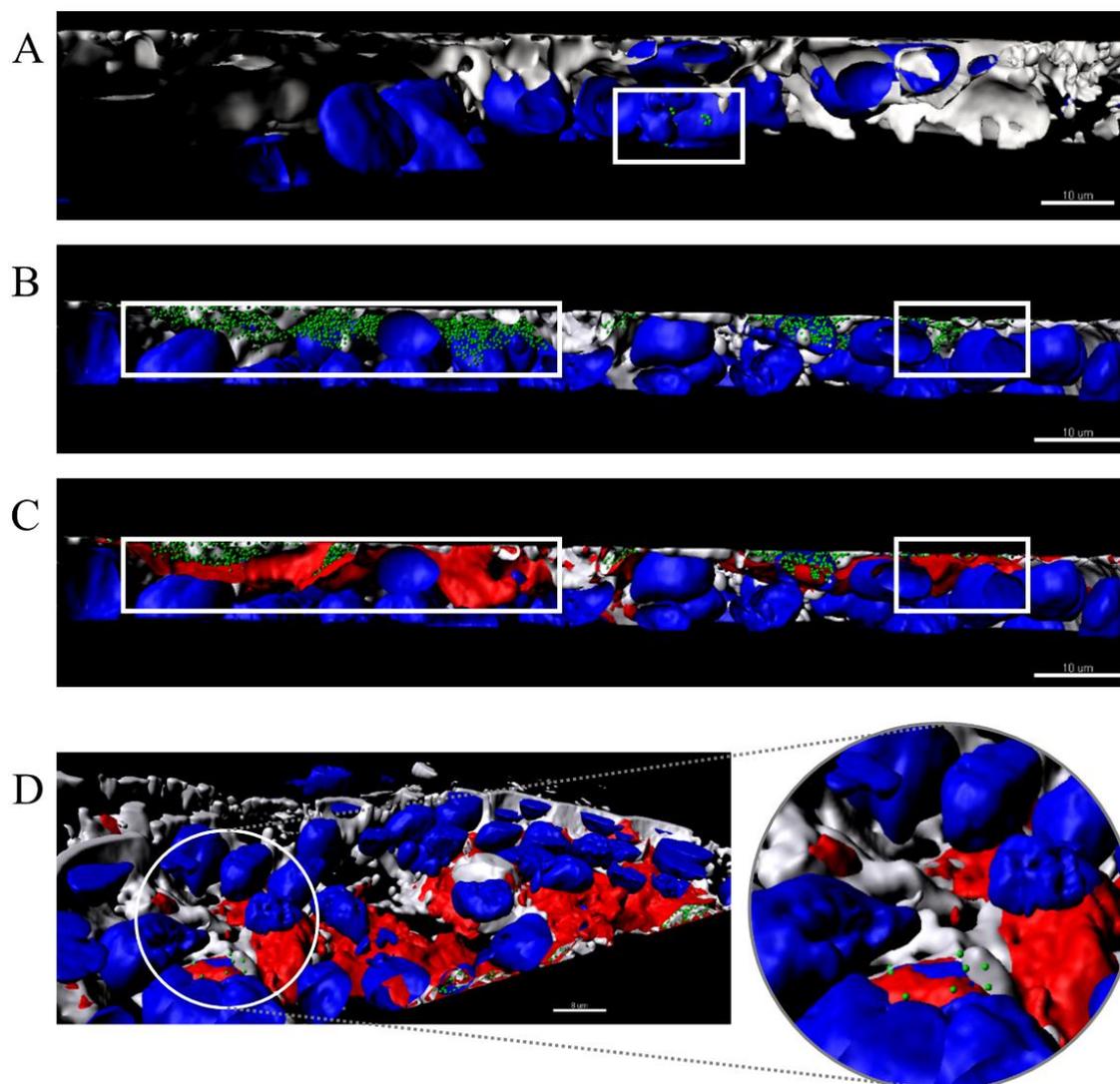


Figure 3.23. Three-dimensional images of a cross-section of the intestinal barrier model based on a Caco-2/HT29/Raji-B lymphocytes co-culture treated with bacteriophages (A) and PPE (B–D). Cell nuclei were stained with Hoechst 33242 (blue), bacteriophages with SYBR gold (green), and liposomes with Vybrant Dil (red). The plasma membrane was stained with CellMask DeepRed (gray). (A) Non-encapsulated phages (green) are seen inside the cells. (B and C) Stained PPE in different phases. (B) Only encapsulated phages (green) are shown inside the cells (gray, membrane and blue, cell nuclei). (C) Merging of all labels with the liposomes (red) covering the encapsulated phages detailed in (B). The white square indicates the non-encapsulated phages (A), the encapsulated phages (B), and liposome capsule (C). (D) A detail of the basolateral side of the intestinal barrier (sited in the upper side of the image) shows the presence of liposomes (red) inside the cells. The enlarged image shows phages released from the liposomes. Scale bars, 8 μm (Otero *et al.*, 2019).

The latter observation reflected adherence of the liposomes containing the labeled phages, which was corroborated by the coincidence of the fluorescence emitted by the stained phages and liposomes. In addition, aggregation of the liposomes resulted in the formation of very large (μm) bacteriophage-containing masses (Figure 3.23.C). These aggregates were mainly embedded in the cell membrane or remained on the cell surface, but some were also seen inside the cells (Figure 3.23.C). Figure 3.23.D shows the presence of liposomes inside the cells with a detail of the basolateral side of the cell culture (sited in the upper side of the image) and bacteriophages released from the liposomes are also seen in this figure.

4.2.3. Cytokine expression after incubation of phages in epithelium cells

The induction of the expression of different cytokines by epithelial cells exposed to non-encapsulated bacteriophages (5×10^9 pfu/well) was assayed by qPCR and the results were compared with the basal expression level in cells incubated with DMEM. In addition, both the levels obtained following induction by LPS (positive control) and cell debris were studied. The mRNA levels of *IL-2*, *IL-4*, *IL-12/p40*, and *IL-17a* were below the limit of detection for all conditions tested. After 48 h, the mRNA levels of *IL-6*, *GM-CSF*, *CxCLI/GRO α* , *TNF α* ($P < 0.0001$) and of *MIF* and *IFN γ* ($P < 0.05$) were significantly induced in cells incubated with bacteriophage. In cells treated with purified cell debris, the induction of *IL-6*, *GM-CSF* and *TNF α* mRNA was significant ($P < 0.05$) as was that of *CxCLI/GRO α* ($P < 0.0001$), although induction was weaker than that produced by phage, except for *GM-CSF*. Finally, LPS significantly induced the expression of *IL-6*, *GM-CSF*, and *CxCLI/GRO α* ($P < 0.0001$) and *MIF* ($P < 0.05$), with almost identical response levels for these cytokines except *GM-CSF* and *MIF* (slightly higher levels) (Figure 3.24).

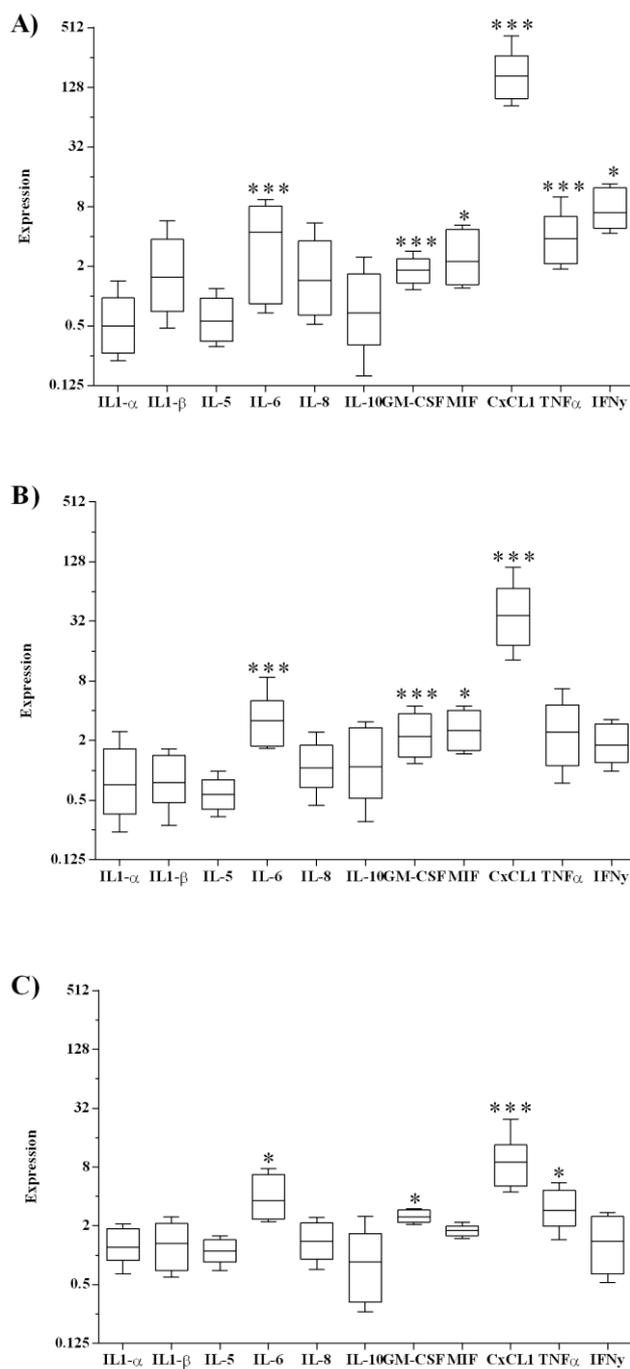


Figure 3.24. Relative expression of different cytokine mRNAs in human intestinal cell monolayers after 48h of exposure with bacteriophages (A), LPS (B) and cell purified debris (C). Asterisks (*) indicate the significant difference with respect the basal expression of cells in DMEM (***, $P < 0.0001$; *, $P < 0.05$) analyzed with REST software.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

La cada vez más frecuente aparición y expansión de bacterias resistentes a múltiples antimicrobianos ha provocado que se reevalúe la aplicación terapéutica de los bacteriófagos. Las ventajas que confiere el uso de bacteriófagos líticos frente al uso de los antimicrobianos tradicionales incluyen su capacidad para auto-replicarse y su alta especificidad hacia la bacteria diana, evitando de esta manera la afectación de la propia microbiota del hospedador. Esto ha conllevado la cada vez más extendida aplicación de los bacteriófagos en medicina veterinaria y humana, así como en la industria alimentaria (Young y Gill, 2015; Vandenhoevel *et al.*, 2015; Cooper *et al.*, 2016; Górski *et al.*, 2016; Pelfrene *et al.*, 2016; Abedon *et al.*, 2017; Cortés y Llagostera, 2017). Sin embargo, la aplicación de bacteriófagos como antimicrobianos todavía tiene que solventar una serie de cuestiones claves para su estandarización e implantación. Además de algunos requisitos mínimos como el uso de bacteriófagos estrictamente líticos, la confirmación de la actividad antimicrobiana frente al patógeno diana, y la eliminación de los restos celulares y endotoxinas de las preparaciones fágicas, otros aspectos claves deberían ser evaluados en profundidad. Entre ellos destacarían la emergencia de la resistencia a bacteriófagos, la farmacocinética y farmacodinámica, o la interacción con el sistema inmune del hospedador (Gordillo Altamirano and Barr, 2009).

En el presente trabajo se ha pretendido profundizar en dos aspectos de especial relevancia en terapia fágica como son la emergencia de la resistencia a bacteriófagos en diferentes condiciones y en segundo lugar, el estudio de la biodistribución y transcitosis de bacteriófagos encapsulados en liposomas tras su administración por vía oral en un modelo murino.

5.1. Emergencia y caracterización de la resistencia a bacteriófagos

Las bacterias poseen la capacidad de desarrollar diferentes mecanismos de resistencia a los bacteriófagos. Dichos mecanismos pueden afectar a cualquier etapa del ciclo lítico de los

bacteriófagos, desde su adsorción hasta la liberación de la progenie vírica. De entre ellos, los más reportados en la bibliografía son la pérdida o modificación del receptor celular, evadiendo así la adsorción fágica (Labrie *et al.*, 2010). Así mismo, las bacterias pueden bloquear la inyección del DNA vírico, romper el DNA del fago mediante los sistemas de restricción-modificación, CRISPR-Cas o DISARM, o impedir la replicación del DNA mediante el sistema BREX (Labrie *et al.*, 2010; Goldfarb *et al.*, 2015; Ofir *et al.*, 2018; Azam y Tanji, 2019). Además, computacionalmente se ha predicho la existencia de múltiples sistemas de defensa cuyos mecanismos de acción se desconocen actualmente (Doron *et al.*, 2018). Por otro lado, las infecciones abortivas, o sistemas Abi, intervienen en diferentes etapas del ciclo multiplicativo y causan la muerte celular, sin producción de progenie vírica. Pese a que los mecanismos moleculares de los sistemas Abi son muy desconocidos, en general, intervienen proteínas que participan en procesos metabólicos esenciales y que se activan con la infección del bacteriófago (Labrie *et al.*, 2010; Dy *et al.*, 2014). De todos ellos, la pérdida del receptor celular es considerado el principal mecanismo de resistencia a los bacteriófagos (Levin y Bull, 2004). Para identificar los receptores de los fagos estudiados en este trabajo, se partió de los datos derivados del análisis de la secuencia de sus genomas, realizado en estudios previos por nuestro grupo de investigación (Bardina *et al.*, 2016). Dichos análisis revelaron que los genomas de los fagos UAB_Phi20, UAB_Phi78 y UAB_Phi87 mostraban una elevada similitud con los de los fagos P22, SP6 y FélixO1, respectivamente (Bardina *et al.*, 2016), los cuales se absorben a nivel del LPS de *Salmonella* (Iwashita and Kanegasaki, 1973; Hudson *et al.*, 1978; Tu *et al.*, 2017). Para comprobar si los receptores de los tres fagos estudiados estaban presentes en dicha molécula, se utilizó una colección de cepas de *Salmonella* con mutaciones en diferentes genes implicados en la síntesis del LPS (Tabla 2.1). De esta forma se observó que el bacteriófago UAB_Phi20 únicamente era capaz de infectar cepas de *Salmonella* cuyo LPS contenga el antígeno O (Figura 3.1). Esto sugiere que el fago UAB_Phi20 se absorbe a la misma región del LPS que el bacteriófago P22, el cual al reconocer el receptor produce la rotura de la unión α -ramnosil 1-3 galactosa de la segunda subunidad del antígeno O (Iwashita and Kanegasaki,

1973). En cambio, el bacteriófago UAB_Phi87 si era capaz de infectar cepas de *Salmonella* cuyo LPS carece de antígeno O, pero no aquellas cuyo LPS carece de la ramificación de N-acetilglucosamina unida a la glucosa terminal del núcleo del LPS de *Salmonella* (Figura 3.1), lo que indica que UAB_Phi87 se absorbe a dicha ramificación, al igual que lo descrito en el bacteriófago Felix O1 (Hudson *et al.*, 1978). Finalmente, el bacteriófago UAB_Phi78 infectaba con la misma eficiencia todas las cepas con quimiotipo LPS liso y la cepa *galE*- (Figura 3.1). Esto indicaría que el fago UAB_Phi78 puede reconocer el antígeno O del LPS pero que su receptor se encuentra en una región profunda del núcleo exterior del LPS, probablemente en la primera glucosa del núcleo del LPS, ya que el fago no puede infectar la cepa cuyo LPS carece de dicho residuo (*rfaG*-), así como de la ramificación de galactosa unida a este. Además, UAB_Phi78 también es capaz de infectar, aunque con menor eficiencia y con morfología de calva diferente, los mutantes *rfb*-, *rfaJ*-, y *rfaC*- con quimiotipos Ra, Rb2 y rugoso profundo Re, respectivamente (Figure 3.1). Todo ello sugiere que el fago UAB_Phi78 podría tener un segundo receptor en la superficie celular de forma similar a lo descrito en el caso del bacteriófago SP6. Dicho bacteriófago reconoce el antígeno O y se une también probablemente a la región interna del núcleo del LPS (lípidos A-KDO) (Tu *et al.*, 2017). Teniendo en cuenta que los tres bacteriófagos se unen al LPS y que el bacteriófago que se une a una región más interna era el bacteriófago UAB_Phi78, se eligió dicho bacteriófago para el primer cribado del estudio de la resistencia a los bacteriófagos del cóctel, ya que se esperaba que todos los resistentes a UAB_Phi78 también lo fuesen a UAB_Phi20 y UAB_Phi87.

Tal y como se ha producido tras el uso de los antimicrobianos, existe el riesgo que tras la aplicación de los bacteriófagos emerjan células bacterianas resistentes a los mismos. No obstante, ciertos aspectos como la capacidad de los bacteriófagos de coevolucionar junto con el hospedador y superar la resistencia bacteriana, el hecho que el desarrollo de la resistencia pueda comprometer la viabilidad y la virulencia de la célula bacteriana, o que el uso de terapias basadas en cócteles de bacteriófagos pueda prevenir el desarrollo de resistencia (Levin y Bull 2004, Oechslin, 2018),

deben ser tenidos en cuenta. La detección de la resistencia a bacteriófagos fundamentalmente se ha producido en cultivos bacterianos *in vitro* (Dennehy, 2012). Sin embargo, las condiciones de cultivo son muy diferentes a las que pueden encontrarse en una situación *in vivo* lo que puede influir en la diferente frecuencia de aparición de la resistencia. Así, en los cultivos *in vitro* las células se cultivan en medios de cultivo ricos y en condiciones de monocultivo bacteriano. En cambio, *in vivo*, las células pueden encontrarse en un entorno limitante de recursos y en competición con otras especies bacterianas, además, de precisar de factores de virulencia requeridos para la colonización e infección (Baümle *et al.*, 2000). Considerando lo anterior y para intentar esclarecer si la resistencia bacteriana a los bacteriófagos diferiría en función de su ámbito de aplicación, se estudió la emergencia de la resistencia de *Salmonella* a un cóctel de tres bacteriófagos (UAB_Phi20, UAB_Phi78 y UAB_Phi87) en 3 escenarios diferentes: i) cultivos bacterianos infectados *in vitro*, ii) terapia fágica *in vivo* de pollos previamente colonizados con *Salmonella*, y iii) biocontrol de alimentos previamente contaminados con *Salmonella*.

La primera observación a destacar de este estudio es la diferencia en la frecuencia de aparición de resistencia a los bacteriófagos del cóctel en los tres tipos de experimentación realizados. Así, en los cultivos *in vitro* infectados con el cóctel fue donde se obtuvo un mayor porcentaje de aislamientos resistentes (hasta un 92 % de los aislamientos obtenidos tras 24h de infección) y la resistencia se desarrolló con mayor rapidez (tras 4 h de la infección en un 49 % de los aislamientos recuperados). No se observó desarrollo de resistencia espontánea a los fagos en los cultivos control no infectados ni a tiempo 0 h de la infección de los cultivos. En el caso del jamón cocido infectado con *Salmonella*, tampoco se observó resistencia espontánea en los controles no tratados. En este caso, el porcentaje de aislamientos resistentes fue inferior (3,2 % del total) y de ellos sólo el 1,4 % fueron resistentes a los 3 fagos. El resto (1,8 %), mostraron resistencia a UAB_Phi78 y UAB_Phi20, pero no a UAB_Phi87. Se ha de resaltar especialmente lo encontrado en los experimentos *in vivo*, donde no se obtuvo ningún aislamiento resistente a los bacteriófagos del

cóctel en los animales tratados. En cambio, un 8,5 % de los aislamientos del grupo control fueron resistentes a los tres fagos del cóctel. Porcentajes similares han sido descritos por algunos autores (Hurley *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2010). En concreto, Carvalho y colaboradores (2010) lo relaciona al hecho de que la expresión del antígeno O puede modularse y verse influida por señales recibidas durante el tránsito intestinal. Hay que mencionar además que tanto en el grupo control como en el tratado se detectó un pequeño porcentaje de aislamientos (1,3 y 3,3 %, respectivamente) que mostraron un fenotipo de resistencia frente a UAB_Phi78 que se caracteriza por no dar lugar a lisis celular. Además, estos aislados mostraron resistencia al fago UAB_Phi87 y susceptibilidad al UAB_Phi20. Este fenotipo no se encontró en los aislamientos procedentes de los estudios *in vitro* y jamón cocido.

En bibliografía existen trabajos que, en mayor o menor medida, tratan de determinar la emergencia de bacterias resistentes a los fagos en diferentes condiciones con resultados similares a lo encontrado en este trabajo. Si bien se ha de mencionar que resulta difícil la comparación de los resultados debido a las diferentes condiciones de tratamiento y los diferentes microorganismos y fagos estudiados. No obstante, diversos trabajos han descrito la generación de mutantes resistentes a bacteriófagos en cultivos *in vitro* infectados con cócteles con diferentes bacteriófagos a lo largo del período de incubación (Tanji *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2017; Bai *et al.*, 2019; Petsong *et al.*, 2019), aunque todos destacan el hecho de que el desarrollo de la resistencia es más lento cuando se compara el uso de cócteles respecto a los fagos individuales. De forma similar a lo descrito en este trabajo, diferentes estudios de biocontrol en carne contaminada con diferentes microorganismos y aplicando fagos individuales o cócteles apenas detectaron desarrollo de resistencia a bacteriófagos (Abuladze *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2016; Tomat *et al.*, 2018). Por último, con referencia a los experimentos *in vivo* realizados en pollos con diferentes microorganismos, se han descrito resultados dispares. Por un lado, algunos estudios no detectan células resistentes tras el tratamiento con fagos de forma similar a la descrita en el presente trabajo (Maura *et al.*, 2012; Maura and Debarbieux, 2012). En otros casos, la resistencia se detecta tras el

contacto con fagos individuales o cócteles, aunque con valores dispares. Así, en un estudio realizado por Atterbury y colaboradores (2007), en pollos infectados con *S. Enteritidis*, *S. Hadar* o *S. Typhimurium* y tratados respectivamente con bacteriófagos de forma individual encontraron valores de resistencia del 1,9 – 29,7 % en los grupos control, y de 10 al 88 % en los animales tratados en función de la dosis de bacteriófago administrada. Otros estudios realizados en pollos previamente infectados con *Campylobacter jejuni* revelan porcentajes inferiores. Así, Loc Carrillo y colaboradores (2005) detectó un 4 % de aislados resistentes al bacteriófago utilizado de forma individual como terapia. Mientras que dos trabajos que utilizan cócteles de bacteriófagos detectaron porcentajes de emergencia de resistencia del 13 % (Carvalho *et al.*, 2010) o del 8,98 % (Fischer *et al.*, 2013). En estos trabajos destacaron que en el grupo control no tratado con los fagos no detectaron resistencia a los bacteriófagos (Loc Carrillo *et al.*, 2005) o prácticamente inexistente (0,23 %; Fischer *et al.*, 2013) o de un 6 % en el caso de Carvalho y colaboradores (2010).

Las diferencias encontradas en la emergencia de la resistencia en las diferentes condiciones valoradas en nuestro estudio pueden atribuirse a diferentes motivos. En el caso del estudio *in vivo*, varios factores han podido influir de forma concomitante o independiente para no detectar aislamientos resistentes en los animales tratados con el cóctel de bacteriófagos. Por un lado, estaría la tasa de generación de mutación espontánea que podría ser responsable de la resistencia detectada en los animales no tratados junto con la disminución de la concentración de *Salmonella* causada por el cóctel de fagos. Este hecho podría haber influido en la oportunidad de detectar aislamientos resistentes ya que la concentración de *Salmonella* era aproximadamente $3\log_{10}$ superior en los animales control comparada con la detectada en los animales tratados (Colom *et al.*, 2015). Por otro lado, el descenso de la población de *Salmonella* por efecto de la terapia sería suficiente como para ser controlado por el sistema inmune del hospedador, facilitando en este caso la eventual ausencia de células resistentes. Debe considerarse, además, que en un ambiente *in vivo*, las bacterias resistentes tendrían que competir con la microbiota circundante por el nicho y los

nutrientes y el desarrollo de la resistencia a bacteriófagos implica un coste energético a la bacteria unido a una disminución de su virulencia (Levin y Bull, 2004). Por último, se ha postulado que el estado metabólico de las bacterias no es uniforme a lo largo de su tránsito por el intestino, lo cual puede provocar que la bacteria muestre resistencia transitoria a los bacteriófagos durante la terapia fágica (Maura and Debarbiex, 2012; De Sordi *et al.*, 2019). Con respecto a la baja frecuencia de resistencia en el alimento tratado con el cóctel, varios aspectos deben también considerarse como el descenso de la población producido desde un inicio por un efecto de “muerte por nadie” que, como se ha descrito para el estudio *in vivo*, disminuiría la oportunidad de encontrar mutantes resistentes. Además, al tratarse de una superficie sólida dificultaría con el tiempo el encuentro fago-bacteria dependiente de la movilidad de ambos. Además, la temperatura de tratamiento (4°C) podría influir en una disminución importante de la actividad metabólica de *Salmonella*, lo que influiría en la posibilidad de replicación de los bacteriófagos y de entrar en contacto con nuevas células bacterianas. Esto último podría explicar también la no detección de mutantes resistentes espontáneos en los alimentos control no tratados. Por último, en los cultivos líquidos, todo lo mencionado anteriormente no se produce. En este caso, además, la evolución de las bacterias en continuo contacto con los bacteriófagos unido a la progresión geométrica de la población bacteriana durante el tiempo de incubación facilitaría el desarrollo de la resistencia a los fagos. En el presente estudio, la aplicación de un cóctel de tres bacteriófagos parece no influir en la aparición de la resistencia. Cabe mencionar que en bibliografía se ha descrito el hecho de que la utilización de cócteles con fagos que reconozcan diferentes receptores disminuye esta posibilidad (Tanji *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2019). En este trabajo, los tres bacteriófagos reconocen diferentes receptores, pero todos ellos vinculados con el LPS. Es probable que, a pesar de ello, se fuera produciendo alguna alteración en esta molécula en la cepa de *Salmonella* utilizada a lo largo del tiempo de incubación que hubiera ido bloqueando el acceso a los diferentes receptores, causando al final la pérdida de susceptibilidad a los fagos utilizados.

Con el fin de elucidar la causa de la resistencia a los fagos, y como ya como se ha comentado en el apartado de resultados (ver apartado 4.1.3), se seleccionaron diferentes aislamientos resistentes a los tres o dos bacteriófagos del cóctel de los diferentes estudios para realizar una caracterización más profunda (Tabla 3.4). Igualmente, también se escogieron diversos aislamientos procedentes de los grupos control y tratados de los estudios *in vivo* (Tabla 3.8) para caracterizar la causa de la resistencia a UAB_Phi78 encontrada manifestada por una invariabilidad de la densidad óptica de los cultivos, disminución de la viabilidad celular y no producción de progenie vírica.

Con referencia a los aislamientos resistentes, también se mostraron diferencias en cuanto a la causa de la misma en función de su procedencia. Así, de los cultivos *in vitro* se seleccionó un aislamiento resistente de cada uno de los tiempos de infección estudiado (CI1, CI2, y CI3). Dichos aislamientos mostraron un perfil de LPS similar y alterado respecto al de la cepa salvaje. Además, cuando se comparó dicho perfil con el de las cepas mutantes de LPS utilizadas de control, se observó que dicho perfil era similar al de los mutantes en los genes *rfaL* (SL3749), *rfaK* (SL733), *rfaJ* (SL3750) o *rfaI* (SL3748), cuyo LPS está truncado en diferentes niveles del núcleo externo (Figuras 3.3 y 3.4 C). Esto indicaba que la afectación de alguno de dichos genes podía ser la causa de la resistencia. La secuenciación del genoma de dos de los tres aislamientos (CI2 y CI3), así como la posterior amplificación y secuenciación del aislado CI1, reveló la existencia de una mutación de una única base en el gen *rfaJ*, cambio que introduce un codón stop prematuro en el marco de lectura (Figura 3.7). La complementación en *trans* de dichos aislados con un plásmido portador del gen *rfaJ* salvaje, revertió el fenotipo resistente a sensible y el perfil de LPS salvaje (Figura 3.9 B). Por tanto, se pudo confirmar que la causa de la resistencia a los tres bacteriófagos *in vitro*, fue la pérdida del receptor del bacteriófago, en este caso la mutación en el gen que codifica la proteína RfaJ. Esta proteína es una glicosil transferasa que participa en la síntesis del LPS, concretamente en la adición de la glucosa II del núcleo externo (Schaitman y Klena, 1993). Este resultado además coincidiría con lo observado al inicio del estudio respecto a la caracterización de los receptores de

los bacteriófagos empleados, dado que UAB_Phi20 y UAB_Phi87 no infectaban al mutante *rfaJ*- (SL3750) y UAB_Phi78 lo hacía con dificultad.

Por lo que respecta a los aislamientos resistentes procedentes del tratamiento de las lonchas de jamón cocido, se estudiaron dos con resistencia a los 3 bacteriófagos (HT3 y HT5) y tres resistentes a UAB_Phi78 y a UAB_Phi20, pero sensibles a UAB_Phi87 (HT1, HT2 y HT4). Los dos primeros mostraron un perfil de LPS similar entre ellos y al mostrado por los aislamientos CI1, CI2 y CI3 comentado anteriormente. La secuenciación del genoma del aislado HT5 reveló la delección de una única base en la posición 742 del gen *rfaJ*, dando lugar a la generación prematura de un codón STOP. La amplificación y secuenciación del gen *rfaJ* del aislado HT3 también mostró la presencia de un codón STOP prematuro debido a la delección de una única base en la posición 715 de dicho gen (Figura 3.7). En cambio, los clones HT1, HT2 y HT4 mostraron un perfil de LPS diferente de los anteriores, pero similar al de la cepa SL428 (mutante en el gen *rfc*) (Figura 3.4 B). La secuenciación del genoma del aislado HT1, así como la posterior amplificación y secuenciación de los aislados HT2 y HT4, revelaron alteraciones que conllevaban a la alteración de la función del gen *rfc*. Los aislados HT1 y HT4 mostraron una delección de 2,5 kb de la región del gen *rfc* y de algunos genes adyacentes (Figuras 3.5 y 3.6), mientras que el aislado HT2 tenía una mutación puntual en el gen *rfc*, la cual generó un codón STOP prematuro (Figura 3.8). La complementación *in trans* de todos los aislados con los genes *rfc* (HT1, HT2, y HT4) y *rfaJ* (HT3 y HT5), revertió el fenotipo resistente a sensible, además de recuperar el perfil de LPS salvaje (Figura 3.9). Por tanto, se pudo confirmar que la causa de la resistencia a UAB_Phi20 y UAB_Phi78, fue la pérdida del receptor de los bacteriófagos, en este caso la mutación en el gen *rfc*, que codifica la polimerasa del antígeno O (Schaitman y Klena, 1993). Igualmente, estos resultados reforzaban lo obtenido en los primeros estudios de caracterización de los receptores de los bacteriófagos.

La causa de la resistencia a los bacteriófagos de los aislamientos de los cultivos *in vitro* y del estudio de biocontrol en las lonchas de jamón era, por tanto, la pérdida o modificación del LPS que contenía el receptor de los fagos.

Por lo que hace referencia a los aislamientos resistentes a los bacteriófagos encontrados en los animales control sin tratamiento, los siete escogidos para una caracterización más profunda (Tabla 3.4), no mostraron cambios en su LPS que justificara dicha resistencia. Igualmente, no se detectaron cambios en los *loci* CRISPR de *Salmonella*, lo que permitiría descartar los mecanismos de inmunidad mediada por los sistemas CRISPR-Cas. El genoma de dos de los siete aislamientos resistentes (C2 y C5, Tabla 3.4) fue secuenciado. En el caso de la cepa C2, únicamente se detectó un cambio puntual que dio lugar al cambio de un aminoácido en el gen *mgtA*, que codifica una ATPasa de translocación de magnesio de tipo P (Tabla 3.6). Mientras que en el genoma del aislado resistente C5 no se encontró ningún cambio respecto al de la cepa parental salvaje. Por tanto, en estos aislamientos no se ha podido identificar ninguna variación en el genoma que explique el desarrollo de la resistencia a los tres bacteriófagos del cóctel.

Por otro lado, por lo que hace referencia a los 30 aislados del estudio *in vivo* que mostraron un fenotipo de resistencia al ser infectados con el bacteriófago UAB_Phi78, siendo sensibles a UAB_Phi20 y resistentes a UAB_Phi87, en un principio se detectó que mostraban una EOP alterada y morfologías de calva diferentes con los bacteriófagos UAB_Phi78 y UAB_Phi20 respecto a la cepa salvaje (Tabla 3.7; Figura 3.10). Estos resultados revelaban que los bacteriófagos UAB_Phi20 y UAB_Phi78 eran capaces de absorberse a los receptores celulares, aunque la eficiencia de plaqueo de ambos bacteriófagos disminuyó de manera importante. En función de las características ya mencionadas en el apartado de resultados 4.1.4., se escogieron 9 de dichos aislamientos para intentar caracterizar la causa de dicho comportamiento (Tabla 3.8). Tras una primera caracterización no se observó alteración del fenotipo de LPS comparado con el de la cepa salvaje (Figura 3.14), ni tampoco cambios en los *loci* CRISPR de *Salmonella*, de forma similar a

lo comentado en el párrafo anterior respecto a los aislamientos resistentes a los fagos. Al ser infectados cultivos líquidos de dichas cepas con el fago UAB_Phi78 todos mostraron el mismo comportamiento. No se detectó lisis celular dado que los valores de $DO_{550\text{ nm}}$ permanecían invariables tras la infección, aunque sí se observaba una disminución significativa del número de células viables. Igualmente, no se observó producción de partículas víricas (Figura 3.11). Respecto al bacteriófago UAB_Phi20, sólo dos de los aislados (AC2 y AC5, procedentes del grupo control) mostraron un comportamiento diferente al de la cepa salvaje tras la infección de los cultivos. Así, en el caso de AC2, el efecto era similar al observado con el fago UAB_Phi78 con disminución en el número de viables, pero sin detectar alteración en la curva de $DO_{550\text{ nm}}$. En cambio, el aislado AC5 se comportó de forma similar a la cepa salvaje, aunque el efecto del fago mostraba un retraso en el tiempo. Cabe destacar que estos dos aislamientos mostraron una morfología de calva más pequeña que la habitual del bacteriófago UAB_Phi20 en la cepa salvaje (Tabla 3.8 y Figura 3.10). Respecto al bacteriófago UAB_Phi87, todos los aislamientos mostraron resistencia excepto uno (AC5), en el cual el fago ejercía un mayor efecto en descenso de número de viables y $DO_{550\text{ nm}}$ que la cepa salvaje, aunque sin producción de partículas fágicas (Figura 3.13).

Por lo que se puede concluir de estos estudios, parecería que el bacteriófago UAB_Phi20 ejercería un efecto bacteriolítico en todos los aislamientos, a excepción del aislado AC2 donde el efecto sería bactericida y no bacteriolítico. Así, el bacteriófago es capaz de realizar un ciclo infectivo completo y producir nuevas partículas fágicas (excepto en el caso de AC5). En cambio, el bacteriófago UAB_Phi78 ejerce un efecto bactericida, pero no bacteriolítico. El bacteriófago UAB_Phi78 es capaz de absorberse al receptor celular y probablemente también se lleve a cabo la inyección del DNA del fago, teniendo en cuenta que la infección causa la muerte celular. Sin embargo, la ausencia de producción de nuevas partículas fágicas, sugeriría que existe un fenómeno que impide o retrasa la proliferación del bacteriófago en alguna de las etapas del ciclo infectivo posterior a la inyección del DNA. Por ello, se realizó un estudio basado en una PCR semi-

cuantitativa para intentar determinar si el DNA del bacteriófago UAB_Phi78 una vez inyectado se replicaba en el interior de estas cepas. Lo que se observó fue que en todos los casos incluida la cepa salvaje, el DNA se detectaba en el interior de la célula a los 10 min de la infección (Figura 3.15). En la cepa salvaje, pasado 30 min de la infección, el DNA del fago ya no se detectaba, lo que indicaba la liberación de la progenie viral, tal y como también se observaba al cuantificar la concentración de la misma. Sin embargo, por lo que hace referencia en los aislados con fenotipo atípico, el DNA del fago se detectó hasta el final del experimento (150 min después de realizada la infección). Estos resultados sugieren que una vez inyectado el DNA viral este permanece en el interior de las células sin ser degradado por el sistema de restricción. Además, no se detectó aumento en la concentración del bacteriófagos que respaldara liberación de progenie vírica. Estos resultados podrían sugerir que en estos aislamientos existiría un mecanismo posterior a la replicación del DNA que estaría interrumpiendo la proliferación y liberación de nuevas partículas víricas.

Con los datos obtenidos hasta ahora, el mecanismo de resistencia más probable que conferiría el fenotipo observado sería un sistema de infección abortiva, o sistema Abi (Hyman y Abedon, 2010; Labrie *et al.*, 2010). Las células pueden utilizar sistemas suicidas para abortar la propagación del fago utilizando los sistemas de infección abortiva, que bloquean la propagación de los bacteriófagos a expensas de las células infectadas. Es un mecanismo de defensa posinfección que bloquea pasos importantes para la multiplicación del bacteriófago como la replicación, transcripción o traducción (Labrie *et al.*, 2010). La bacteria infectada no sobrevive y prácticamente no hay liberación de la progenie vírica, protegiendo la población bacteriana clonal. La definición de los sistemas Abi, es una definición fenotípica y los mecanismos moleculares son muy desconocidos.

Con la finalidad de dilucidar cuál sería la causa del comportamiento de estas cepas, se secuenció el genoma de cinco aislados (AC2, AC3, AC5, AT2, y AT4) (Tabla 3.8). El análisis de las

secuencias de los genomas de las cepas AC2, AC3 y AC5, procedentes de animales del grupo control, no reveló ningún cambio comparado con el genoma de cepa parental salvaje (Figura 3.16). Sin embargo, los genomas de las cepas AT2 y AT4 presentaron múltiples cambios puntuales en los genes STM14_3335 y STM14_3336, que codifican dos transposasas putativas pertenecientes a la familia de transposasas IS3 (Tabla 3.6). De estos cambios puntuales, tan solo 2 transiciones dieron lugar a un cambio aminoacídico en el gen STM14_3335 del aislado AT4, mientras que en el gen STM14_3336 se detectaron 2 cambios aminoacídicos en el aislado AT4 y tan solo 1 en AT2 (Tabla 3.6). Los marcos de lectura de los genes STM14_3335 y STM14_3336 están superpuestos, de forma que el codón ATG del segundo está codificado en el codón STOP del primero. Esta disposición de los genes coincidiría con la estructuración de la transposasa OrfAB de la familia IS3 (Siguier *et al.*, 2014), en las que el gen STM14_3335 y STM14_3336 codificarían los productos génicos OrfA y OrfB, respectivamente. Además, desde la posición -1 del marco de lectura de las regiones superpuestas se genera la proteína OrfAB, la cual actúa como la transposasa IS3 (Sekine *et al.*, 1997). Aunque las funciones exactas de OrfA y OrfB son todavía desconocidas, sí que se ha planteado que OrfA o la proteína OrfAB podrían actuar inhibiendo las reacciones promovidas por la transposasa (Sekine *et al.*, 1997). Por otro lado, en el gen *yrfH*, que codifica la proteína Hsp15 de choque térmico, del aislado AT4 se encontró una delección que generó un STOP prematuro en la proteína. Las proteínas Hsp15 se diferencian de otras proteínas de choque térmico, las cuales normalmente actúan como chaperonas o proteasas, en que tiene un motivo α L de unión a RNA (Korber *et al.*, 2000). En *E. coli* la proteína Hsp15 se une a la subunidad 50S del ribosoma libre y portador de la cadena aminoacídica emergente, participando en la transducción mediante el reciclaje de las subunidades 50S del ribosoma (Korber *et al.*, 2000).

Sin embargo, y con los datos obtenidos hasta ahora, no es posible asociar la alteración de los genes STM14_3335, STM14_3336, o *yrfH* con un posible mecanismo de resistencia como el sistema Abi. Por tanto, la causa de la resistencia a UAB_Phi78 y UAB_Phi87 de estos aislamientos es

desconocida. Es posible que se hayan producido reordenamientos en el genoma que con los análisis realizados en este trabajo no se hayan podido determinar.

Como resumen de todo lo comentado, este estudio revela que, la emergencia de la resistencia a los bacteriófagos es diferente y superior en cultivos *in vitro*, donde el contacto fago-bacteria puede producirse con mayor frecuencia, que en otro tipo de ambientes como los alimentos o el tracto intestinal de pollos, donde el desarrollo de mecanismos de resistencia a los bacteriófagos suponen un importante coste para la viabilidad bacteriana en ambientes que pueden resultar hostiles para la misma y donde ha de competir por los recursos con otras poblaciones bacterianas. Además, *in vivo* las células de *Salmonella* están en contacto con la microbiota intestinal, lo que podría facilitar la captación de DNA exógeno tales como elementos móviles o plásmidos, y con ello la adquisición de nuevos genes de resistencia a bacteriófagos. Así mismo, se demuestra que los mecanismos de resistencia que se pueden desarrollar no son uniformes y pueden depender del escenario de aplicación de los bacteriófagos. En este estudio, el mecanismo de resistencia que se selecciona en los cultivos *in vitro* o en los alimentos tratados es la pérdida del LPS, esto no es lo que se encuentra *in vivo*. Probablemente, la necesidad de disponer de un LPS completo para ejercer su virulencia provocaría que las células de *Salmonella* desarrollaran otros tipos de mecanismos de evasión de la acción de los bacteriófagos. La existencia de células resistentes en animales no tratados, sin la presión selectiva de los bacteriófagos, sugeriría la preexistencia natural de dicho mecanismo de resistencia. Por otro lado, tanto en los animales tratados como en los procedentes del grupo control, se encuentra una población de *Salmonella* resistente al bacteriófago UAB_Phi78, que apuntaría a la posible implicación de un sistema Abi que dificultaría la propagación de dicho bacteriófago *in vivo*.

Todo lo mostrado en este trabajo refuerza el potencial que presenta la terapia fágica aplicada en diferentes ambientes, además plantea la necesidad de utilizar cócteles que contengan bacteriófagos que reconozcan diferentes receptores en el hospedador diana, lo que disminuirá la oportunidad del

desarrollo de resistencia. Igualmente, demuestra la necesidad de abordar los estudios de resistencia desde un punto de vista más amplio, no sólo enfocándolos en estudios *in vitro*.

5.2. Biodistribución de bacteriófagos

Entre las diferentes vías de administración de los bacteriófagos, la vía oral se ha planteado como la más adecuada para la terapia con fagos en humanos y animales (Zelasko *et al.*, 2017). Sus ventajas en comparación con otras vías de administración parenteral incluyen la facilidad de administración, una inmunogenicidad potencialmente baja y una mayor comodidad para el paciente, entre otras (Zelasko *et al.*, 2017). Sin embargo, la terapia de fago oral plantea varios desafíos. Los fagos generalmente carecen de estabilidad en el ambiente extremadamente ácido del estómago (Jonczyk *et al.*, 2011), y su tiempo de residencia en el intestino es muy limitado. Este aspecto podría influir en cómo los fagos difunden en el tracto digestivo y llegan a los órganos internos. Estrategias como la encapsulación de los bacteriófagos podrían solventar estas limitaciones. En este sentido, un estudio previo de nuestro grupo evidenció que la encapsulación de los bacteriófagos en liposomas (Colom *et al.*, 2015) aumentaba su estabilidad en fluido gástrico simulado (pH 2,8). Además, permitía su detección tras 72h de su administración oral en un 38,1 % de pollos de engorde frente a un 9,5 % de pollos a los que se administró bacteriófagos no encapsulados. Igualmente, su uso mejoraba significativamente la eficacia de la terapia fágica oral en la protección prolongada de aves contra *Salmonella* (Colom *et al.*, 2015). Tomando como referencia esos resultados, en el presente trabajo de tesis se pretendió investigar si los bacteriófagos encapsulados en liposomas podrían adherirse al epitelio intestinal y determinar su capacidad para cruzar dicha barrera. El comportamiento de los fagos encapsulados se estudió en un modelo de ratón atímico sin pelo utilizando una metodología no invasiva basada en la visualización de bacteriófagos marcados con un fluoróforo y administrados por vía oral en una sola dosis. Aunque la intención original del trabajo fue determinar la biodistribución de los fagos encapsulados en

pollos, diversos problemas técnicos relacionados con la autofluorescencia del plumón impidieron el desarrollo de este modelo.

En el estudio *in vivo*, la fluorescencia emitida proporcionó una clara visualización de los bacteriófagos en el tracto gastrointestinal del ratón (estómago e intestino) (Figura 3.18). El análisis *ex vivo* de los bacteriófagos marcados con fluorescencia en los órganos extraídos de los ratones reveló además un aumento en la concentración de los fagos en el estómago, pero no en el intestino, 3 h después de la administración del PPE (*product of phage encapsulation*) (Figura 3.19C). Además, la acumulación en el estómago se mantuvo durante al menos 3 h más, aunque la concentración de fagos disminuyó en todas las condiciones (Figura 3.19C). La concentración de los bacteriófagos marcados en los órganos examinados *ex vivo*, determinada mediante técnicas microbiológicas convencionales, confirmó el efecto de la encapsulación sobre la acumulación de fagos en el estómago a las 3 y 6 h, es decir, la ausencia de una disminución en la concentración de bacteriófagos (Tabla 3.10). Se ha de destacar que, mientras el 50 % de los fagos presentes en el estómago estaban encapsulados, no se detectaron fagos encapsulados en el intestino (Tabla 3.10). En un estudio previo de nuestro grupo realizado en un modelo de pollo, se demostró que la mezcla de lípidos catiónicos utilizada en la encapsulación protegía a los bacteriófagos contra el pH ácido en condiciones gástricas simuladas y que los bacteriófagos encapsulados incubados con contenido cecal se liberaban de las cápsulas. Si bien los fagos encapsulados en liposomas se detectaron 72 h después de la administración de una dosis única a pollos no infectados, los bacteriófagos no encapsulados apenas estaban presentes (Colom *et al.*, 2015). Por lo tanto, se planteaba la hipótesis de una alta capacidad de retención de los bacteriófagos encapsulados en el estómago que permitiera un lento suministro y la presencia continua de los bacteriófagos en el intestino, contribuyendo así a una exitosa y prolongada terapia fágica oral. Los datos *in vivo* y *ex vivo* presentados en este documento proporcionan un respaldo adicional a esta hipótesis.

A pesar de estos resultados prometedores, no se pudieron observar bacteriófagos marcados con fluoróforos, *in vivo* o *ex vivo*, en órganos o tejidos distintos a los mencionados anteriormente,

debido a que las concentraciones de los bacteriófagos estaban por debajo del límite de detección del sistema de imagen IVIS ($\sim 7 \log_{10}$ pfu/g). En un futuro, por tanto, se necesitarían realizar estudios adicionales empleando quizá un fluoróforo diferente, una mayor concentración de fagos o un sistema de visualización más potente para mejorar la detección de los fagos. Con referencia a lo publicado en la bibliografía, muy pocos estudios han referido la visualización *ex vivo* o *in vivo* de bacteriófagos en modelos vivos. Además, en dichos estudios, se utilizaban fagos marcados o modificados para administrar productos de origen farmacéutico mediante inyección intravenosa (Kelly *et al.*, 2006; Kaźmierczak *et al.*, 2014). De manera similar a lo observado en este trabajo, los resultados de esos estudios demostraron la utilidad de las imágenes moleculares para rastrear los fagos en el interior de los sistemas vivos.

Por otra parte, varios autores han descrito la presencia y persistencia de bacteriófagos no encapsulados en el hígado, el bazo, el riñón y sangre (Dabrowska *et al.*, 2005; Górski y Weber-Dabrowska, 2005; Górski *et al.*, 2006; Hamzeh-Mivehroud *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2009; Miedzybrodzki *et al.*, 2017). En el presente trabajo de tesis, se planteaba la cuestión de si los bacteriófagos encapsulados podrían cruzar la barrera intestinal para llegar a los órganos y tejidos internos, como ya se había observado en el caso de los bacteriófagos no encapsulados. Los fagos encapsulados en liposomas preparados para su uso en este trabajo mostraron un tamaño de $341,6 \pm 8,6$ nm, un potencial zeta de $+34 \pm 5,0$ mV y una formulación que incluía colesterol y colesteril polietilenglicol 600 Sebacate (Colom *et al.*, 2015). Por lo tanto, y respecto a lo referido en la bibliografía, los liposomas tenían un tamaño (<500 nm) que permitía su captación celular (Jung *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2016; Neves *et al.*, 2016) mientras que el colesterol o polietilenglicol de su formulación mejoraba su estabilidad en el sistema circulatorio, reduciendo la probabilidad de su eliminación por el sistema reticuloendotelial (Bozzuto y Molinari, 2015; Sercombe *et al.*, 2015). Además, el carácter hidrofóbico y carga positiva de las cápsulas favorecería su adhesión a la mucosa, lo que conllevaría una mayor captación celular y liberación al sistema linfático (Jung *et al.*, 2000; Sercombe *et al.*, 2015; Ahn and Park, 2016). Los datos de los estudios *ex vivo* mostraron

que la concentración de fagos que alcanzaron el hígado, el riñón e incluso el músculo dentro de las 6 h posteriores a su administración fue significativamente mayor en los ratones que recibieron los bacteriófagos no encapsulados que en los ratones tratados con PPE (Tabla 3.10). En bazo y riñón dicha diferencia se produjo también a las 3 h de la administración de los bacteriófagos. Este resultado sugiere que la barrera intestinal es atravesada con más facilidad por los fagos no encapsulados que los encapsulados. Además, la capa lipídica de los fagos parecía favorecer su acumulación en ciertos órganos y tejidos, como lo sugiere el porcentaje de fagos encapsulados presentes en el bazo (68.0 ± 8.6), hígado (38.4 ± 6.3) y músculo (47.0 ± 7.4) de los ratones 3 h después de la administración del PPE. Por el contrario, no se detectaron fagos encapsulados en el riñón y apenas de forma apreciable en plasma (Tabla 3.10). En función de lo descrito en bibliografía, este sería el primer estudio que conseguiría detectar bacteriófagos encapsulados en liposomas en diversos órganos internos tras ser administrados por vía oral. Aunque existe un trabajo de Singla y colaboradores (Singla *et al.*, 2016) en el que detectaron fagos encapsulados en liposomas en pulmones, hígado, riñón y bazo de ratones BALB/c después de 6 h, su administración fue realizada mediante inyección intraperitoneal. Esto podría explicar las diferencias respecto a este estudio.

Los resultados *in vivo* y *ex vivo* obtenidos en el modelo de ratón indicaron que los bacteriófagos encapsulados se acumularon de manera preferente en el estómago, al menos durante las primeras 6 h tras su administración, y que después de llegar al intestino translocaron a otros órganos y tejidos. La translocación parece ser un proceso rápido dado que no se encontraron fagos encapsulados en el intestino a las 3 h de su administración oral. Sin embargo, no se puede descartar la presencia continuada de bacteriófagos encapsulados en el intestino dado que la homogeneización del tejido intestinal en $MgSO_4$ realizada durante los experimentos *ex vivo*, produce la rotura de las cápsulas lipídicas en un proceso mediado por las sales biliares intestinales de los ratones. No obstante, sí se encontraron bacteriófagos encapsulados en los órganos internos, incluyendo el bazo, el hígado y el músculo.

La capacidad de los fagos encapsulados en liposomas para superar la barrera intestinal se estudió más a fondo en un modelo *in vitro* basado en un co-cultivo de células intestinales Caco-2 y HT29 con linfocitos Raji-B. Este modelo simula la barrera intestinal y, por tanto, permitiría comparar la capacidad de permeación de las nanopartículas de lípidos con los hallazgos obtenidos en los estudios *in vivo* (Antunes *et al.*, 2013). Los datos de este trabajo mostraron que la presencia de los fagos no encapsulados no afectaba la integridad de las uniones de las células intestinales (Figura 3.20) y que su transcitosis a través de la barrera intestinal mostraba valores muy bajos (Figura 3.22A-C). No obstante, la visualización del proceso mediante microscopía laser confocal reveló la presencia de bacteriófagos en el citosol de las células intestinales (Figura 3.23B y 3.23C). Cabe mencionar que utilizando una dosis inicial de fago de 1×10^7 pfu/ml, nuestros resultados de transcitosis coincidieron con los obtenidos con el bacteriófago P22 en células MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) por Nguyen y colaboradores (Nguyen *et al.*, 2017). Esto ratifica que el modelo utilizado en este estudio puede emplearse en otras investigaciones de transcitosis de bacteriófagos.

El porcentaje de bacteriófagos que cruzaron la membrana después de la administración del PPE también fue bajo (Figura 3.23D) y no se pudieron detectar bacteriófagos encapsulados en el compartimento basolateral usando métodos microbiológicos convencionales (datos no mostrados). Sin embargo, en este modelo, se observaron cápsulas de liposomas adheridas a la superficie celular formando agregados, incrustados en la membrana celular, e incluso dentro de las células (Figura 3.23C y 3.23D). El conjunto de estas observaciones y la detección de bacteriófagos dentro de los liposomas sugirió que los liposomas protegían a los fagos de su eliminación por excreción del tracto intestinal. Tras la liberación eventual de los bacteriófagos de las cápsulas de liposomas, estos podrían sufrir transcitosis. Desafortunadamente, sin embargo, estos resultados no pudieron compararse con los obtenidos en el modelo *in vivo* porque la membrana creada con el sistema *Transwell* obviamente no reproduce el sistema abierto del tracto intestinal, entre otras diferencias.

Tomados en conjunto, los resultados obtenidos sugieren que los fagos encapsulados en liposomas administrados por vía oral permanecen en el estómago y que la encapsulación protege a los fagos hasta su liberación. Además, cuando los fagos encapsulados alcanzan el intestino, la adherencia a la pared intestinal los protege temporalmente tanto de la acción de las sales biliares como de la eliminación por excreción. La hipótesis es que los liposomas y los fagos que contienen muy probablemente alcanzan los órganos internos a través del duodeno, el segmento del intestino delgado con la tasa de absorción más alta (Oliveira *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2016; Van Den Abeele *et al.*, 2017). Esta región contiene células M, cuyas características (alta capacidad de transcitosis, pocos lisosomas, glucocálix mucoso más delgado) (Kou *et al.*, 2013; He *et al.*, 2019) favorecen el acceso, la captación y el transporte de tanto las cápsulas de liposomas cargadas positivamente como de los bacteriófagos sin encapsular a los tejidos linfoides subyacentes, aunque por diferentes mecanismos (des Rieux *et al.*, 2006; Kou *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2016), mejorando así la disponibilidad sistémica de los bacteriófagos. La acumulación de fagos encapsulados en el estómago y su adherencia a la pared intestinal explicaría las observaciones realizadas por nuestro grupo de una mayor eficacia a largo plazo de la terapia con fagos utilizando fagos encapsulados en liposomas (Colom *et al.*, 2015).

Por otra parte, en un estudio previo de nuestro grupo se demostró que la encapsulación en alginato con CaCO_3 también protegía a los bacteriófagos de las condiciones ácidas del sistema gastrointestinal y aumentaba su tiempo de residencia en el ciego de pollos de engorde (Colom *et al.*, 2017). Por ello, se decidió estudiar la capacidad de los bacteriófagos encapsulados en alginato con y sin CaCO_3 de atravesar dicha barrera intestinal. Los resultados obtenidos demostraron que la transcitosis es estadísticamente inferior a la de los fagos no encapsulados o encapsulados en liposomas (Figura 3.21). Sin embargo, cabe destacar que las microcápsulas de alginato se depositaron sobre las células intestinales, formando una capa homogénea de bacteriófagos encapsulados (datos no mostrados). Esto, juntamente con la capacidad mucoadhesiva del alginato

(George y Abraham, 2006), podría explicar la elevada retención de los bacteriófagos encapsulados en alginato en el intestino.

Por último, utilizando el modelo de células intestinales basado en un triple co-cultivo de linfocitos Caco-2, HT29 y células Raji-B, se estudió la posible modificación en la expresión de citoquinas por los bacteriófagos sin encapsular tras 48 h de contacto. La comparación del efecto provocado por el fago y los respectivos controles (LPS y restos celulares) mostró que, en todas las situaciones, la expresión de los genes *IL-6*, *GM-CSF* y *CxCL1/GRO α* se indujo significativamente, aunque con ligeras diferencias entre ellos (Figura 3.24). Además, después del tratamiento con fagos y LPS, se observó un ligero aumento de la expresión del gen *MIF* y de *TNF α* después de la incubación con los fagos y restos celulares. El bacteriófago indujo específicamente la expresión de *IFN γ* . Como se ha discutido recientemente (Dufour *et al.*, 2016; Khan Mirzaei *et al.*, 2016), la expresión o producción de algunas citoquinas por los bacteriófagos podría atribuirse a potenciales restos celulares contaminantes, a pesar de que en este estudio se aplicaron diferentes procesos de purificación. Los resultados obtenidos coincidirían en cierto modo con otros trabajos previos de cultivo de células *in vitro*. Así, Khan Mirzaei y colaboradores (2016) detectaron la producción de *IL-6*, *IL-10* y *TNF α* en células mononucleares de sangre periférica o *IL-8*, *CXCL-1/GRO α* y *MIF* en células HT-29 aplicando concentraciones altas similares de un fago de *Escherichia coli*. Además, Shiley y colaboradores (2017) describieron la inducción de *IL-6* y *TNF α* en células pulmonares de mamíferos por un fago específico de *Pseudomonas aeruginosa* y otros fagos de *P. aeruginosa* también fueron capaces de inducir *IL-6*, *CXCL-1* y *TNF α* , entre otras citoquinas, en células mononucleares de sangre periférica (Van Belleghem *et al.*, 2017). Finalmente, también se ha referido una inducción significativa de *IFN γ* en macrófagos de pollo después de la exposición al bacteriófago P22 (Park *et al.*, 2013). Lo que se evidencia en este y otros estudios es la inducción de ciertas citoquinas antiinflamatorias como, por ejemplo, *IFN γ* (Górski *et al.*, 2018) e *IL-6* (Lee *et al.*, 2010), asociados a la inmunidad innata, que podrían ayudar a las células huésped a superar una posible infección bacteriana. Asimismo, también muestra la complejidad del proceso de

Discusión

purificación de los bacteriófagos y cómo esto puede influir en la respuesta de las citoquinas y en sus futuras aplicaciones.

CONCLUSIONS

6. CONCLUSIONS

The main conclusions that can be drawn from this work are:

1. The UAB_Phi20 bacteriophage receptor is found in the O-antigen of *S. enterica* LPS, the UAB_Phi87 receptor in the LPS core, and the UAB_Phi78 receptor in a deeper region of the core.
2. In cultures of *S. Typhimurium* ATCC14028 infected with a cocktail composed of bacteriophages UAB_Phi20, UAB_Phi78 and UAB_Phi87 and then incubated for 24 h at 37 C, 92 % of the recovered clones were resistant to phage UAB_Phi78 and to the other two bacteriophages. Resistance was probably due to the loss of the RfaJ protein (glycosyltransferase), which is involved in the synthesis of LPS.
3. In ham slices contaminated with *S. Typhimurium* ATCC14028 and treated with the phage cocktail, 3.2 % of the recovered clones were resistant to bacteriophage UAB_Phi78. Including 1.4 % that were also resistant to phages UAB_Phi20 and UAB_Phi87 and 1.8 % with additional resistance only to phage UAB_Phi20. For bacteria resistant to the three phages, resistance was probably due to a mutation in the *rfaJ* gene. In cells resistant to both UAB_Phi78 and UAB_Phi20, resistance likely resulted from changes in the *rfc* gene encoding the O-antigen polymerase.
4. In phage therapy studies in the broiler model, no UAB_Phi78-resistant clone was isolated from animals contaminated with *S. Typhimurium* ATCC14028 and treated with the phage cocktail. By contrast, 8.5 % of the isolates in the control group were resistant to UAB_Phi78 phage and to the other two bacteriophages. Although the mechanism of that resistance is unknown, both the loss of LPS and immunity mediated by *Salmonella* CRISPR-Cas systems can be ruled out.
5. Also in the phage therapy studies in the broiler model, 1.3 % of the clones isolated in control animals and 3.3 % of those isolated in the group treated with the phage cocktail were resistant to bacteriophage UAB_Phi78. This phage exerted a bactericidal but not a bacteriolytic effect,

without production of phage progeny, which suggests an abortive infection as the resistance mechanism. However, these clones were resistant to bacteriophage UAB_Phi87 by an as yet undetermined mechanism.

6. Studies of the emergence of bacterial resistance to bacteriophages *in vitro*, in food, and *in vivo* revealed: i) a low percentage of resistant clones isolated in food and *in vivo*, ii) that the main mechanism of resistance *in vitro* and in food involves changes in phage receptors, and iii) that resistance *in vivo* was probably due to abortive infection or an as yet uncharacterized processes. These findings show that data on phage resistance *in vitro* cannot be extrapolated to other scenarios. Studies on the emergence of resistance to different bacteriophage-bacteria combinations *in vivo* and in food are therefore needed.
7. *In vivo* imaging system (IVIS Spectrum) showed that liposome-encapsulated bacteriophages accumulate in the stomach for a minimum of 6 h after their oral administration to athymic nude female mice.
8. In those mice, *ex vivo* conventional culture methods revealed the presence of liposome-encapsulated phages not only in the stomach but also in the spleen, liver, and in muscle.
9. An *in vitro* model of the human intestinal barrier evidenced: (i) that bacteriophages are able to translocate and (ii) the adherence of liposome-containing phages to the cell membrane and their presence embedded in the membrane.
10. In the same model, the addition of bacteriophages induced the expression of anti-inflammatory cytokines associated with the innate immune response.
11. The *in vivo* and *in vitro* human intestinal barrier models corroborate our hypothesis that the more potent effect over time of oral phage therapy with liposome-encapsulated vs. non-encapsulated bacteriophages is due to a greater capacity for adherence to the intestinal epithelium as well as a slow translocation ability, which contribute to a longer residence time in the intestine and, similarly, in other internal organs.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Abedon, S. T., Kuhl, S. J., Blasdel, B. G., y Kutter, E. M. (2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, 1(2), 66–85.

Abedon, S. T. (2015). Phage therapy of pulmonary infections. *Bacteriophage*, 5(1), e1020260.

Abedon, S. T., García, P., Mullany, P., y Aminov, R. (2017). Editorial: Phage Therapy: Past, Present and Future. *Frontiers in Microbiology*, 8, 981.

Abuladze, T., Li, M., Menetrez, M. Y., Dean, T., Senecal, A., y Sulakvelidze, A. (2008). Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(20), 6230–6238.

Ackermann, H.-W. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 152(2), 227–243.

Ackermann., H. W. (2011). Bacteriophage Taxonomy. *Microbiology Australia*, 90–94.

Ahn, H., y Park, J.-H. (2016). Liposomal delivery systems for intestinal lymphatic drug transport. *Biomaterials Research*, 20(1), 36.

Alikhan, N.-F., Petty, N. K., Ben Zakour, N. L., y Beatson, S. A. (2011). BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics*, 12(1), 402.

Antunes, F., Andrade, F., Araújo, F., Ferreira, D., y Sarmiento, B. (2013). Establishment of a triple co-culture *in vitro* cell models to study intestinal absorption of peptide drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 83(3), 427–435.

Atterbury, R. J., Van Bergen, M. A. P., Ortiz, F., Lovell, M. A., Harris, J. A., De Boer, A., y Barrow, P. A. (2007). Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4543–4549.

- Azam, A. H., y Tanji, Y. (2019). Bacteriophage-host arm race: an update on the mechanism of phage resistance in bacteria and revenge of the phage with the perspective for phage therapy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(5), 2121–2131.
- Bahrami, B., Macfarlane, S., y Macfarlane, G. T. (2010). Induction of cytokine formation by human intestinal bacteria in gut epithelial cell lines. *Journal of Applied Microbiology*, 110(1), 353-363.
- Bai, J., Jeon, B., y Ryu, S. (2019). Effective inhibition of *Salmonella* Typhimurium in fresh produce by a phage cocktail targeting multiple host receptors. *Food Microbiology*, 77, 52–60.
- Bardina, C., Spricigo, D. A., Cortés, P., y Llagostera, M. (2012). Significance of the bacteriophage treatment schedule in reducing *Salmonella* colonization of poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(18), 6600–6607.
- Bardina, C., Colom, J., Spricigo, D. A., Otero, J., Sánchez-Osuna, M., Cortés, P., y Llagostera, M. (2016). Genomics of three new bacteriophages useful in the biocontrol of *Salmonella*. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Barr, J. J. (2017). A bacteriophages journey through the human body. *Immunological Reviews*, 279(1), 106–122.
- Bäumler A. J., Tsohis R. M. and Heffron F. (2000). Virulence mechanisms of *Salmonella* and their genetic basis. En Wray C., and Wray A. (Ed.), *Salmonella in domestic animals* (57-72). Wallingford, United Kingdom: CABI Published.
- Bennett-Guerrero, E., McIntosh, T. J., Barclay, G. R., Snyder, D. S., Gibbs, R. J., Mythen, M. G., y Poxton, I. R. (2000). Preparation and preclinical evaluation of a novel liposomal complete-core lipopolysaccharide vaccine. *Infection and Immunity*, 68(11), 6202.
- Bertozi-Silva, J., Storms, Z., y Sauvageau, D. (2016). Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiology Letters*, 363(4), fnw002.
- Blaschke, V., Reich, K., Blaschke, S., Zipprich, S., y Neumann, C. (2000). Rapid quantitation of proinflammatory and chemoattractant cytokine expression in small tissue samples and monocyte-

- derived dendritic cells: validation of a new real-time RT-PCR technology. *Journal of Immunology Methods*, 246(1-2), 79–90.
- Bozzuto, G., y Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 975.
- Buendia-Claveria, A. M., Moussaid, A., Ollero, F. J., Vinardell, J. M., Torres, A., Moreno, J., y Ruiz-Sainz, J. E. (2003). A *purL* mutant of *Sinorhizobium fredii* HH103 is symbiotically defective and altered in its lipopolysaccharide. *Microbiology*, 149(7), 1807–1818.
- Carvalho, C. M., Gannon, B. W., Halfhide, D. E., Santos, S. B., Hayes, C. M., Roe, J. M., y Azeredo, J. (2010). The *in vivo* efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens. *BMC Microbiology*, 10, 232.
- Casey, E., van Sinderen, D., Mahony, J., Casey, E., Van Sinderen, D., y Mahony, J. (2018). *In vitro* characteristics of phages to guide “Real Life” phage therapy suitability. *Viruses*, 10(4), 163.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). U.S. Department of Health and Human Services. (2018). *Surveillance for foodborne disease outbreaks, United States, 2016, Annual Report*.
- Chan, R. K., Botstein, D., Watanabe, T., y Ogata, Y. (1972). Specialized transduction of tetracycline resistance by phage P22 in *Salmonella* Typhimurium. II. Properties of a high-frequency-transducing lysate. *Virology*, 50(3), 883–898.
- Colom, J., Cano-Sarabia, M., Otero, J., Cortés, P., MasPOCH, D., y Llagostera, M. (2015). Liposome-encapsulated bacteriophages for enhanced oral phage therapy against *Salmonella* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(14), 4841–4849.
- Colom, J. (2016). Studies of the molecular features of three *Salmonella* phages for use in phage therapy and of encapsulation methodologies to improve oral phage administration. Universidad Autónoma de Barcelona, España.

- Colom, J., Cano-Sarabia, M., Otero, J., Arriñez-Soriano, J., Cortés, P., MasPOCH, D., y Llagostera, M. (2017). Microencapsulation with alginate/CaCO₃: A strategy for improved phage therapy. *Scientific Reports*, 7.
- Cooper, C. J., Khan Mirzaei, M., y Nilsson, A. S. (2016). Adapting Drug Approval Pathways for Bacteriophage-Based Therapeutics. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1209.
- Cortés, P., Spricigo, D. A., Bardina, C., y Llagostera, M. (2015). Remarkable diversity of *Salmonella* bacteriophages in swine and poultry. *FEMS Microbiology Letters*, 362(2), 1–7.
- Cortés, P., y Llagostera, M. (2017). Phage therapy in food hygiene. En J. M. Lorenzo Rodríguez y F. J. Carballo García (Ed.), *Strategies for Obtaining Healthier Foods* (47 – 89). Nueva York, USA: Nova Science Publishers. 47–89.
- Cortés, P., Cano-Sarabia, M., Colom, J., Otero, J., MasPOCH, D., y Llagostera, M. (2018). Nano/Micro formulations for bacteriophage delivery. *Methods in Molecular Biology*, 1693.
- Couvin, D., Bernheim, A., Toffano-Nioche, C., Touchon, M., Michalik, J., Néron, B., y Pourcel, C. (2018). CRISPRCasFinder, an update of CRISRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W246–W251.
- Dabrowska, K., Switala-Jelen, K., Opolski, A., Weber-Dabrowska, B., y Gorski, A. (2005). Bacteriophage penetration in vertebrates. *Journal of Applied Microbiology*, 98(1), 7–13.
- Darling, A. C. E., Mau, B., Blattner, F. R., y Perna, N. T. (2004). Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research*, 14(7), 1394–1403.
- Darling, A. E., Mau, B., y Perna, N. T. (2010). progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLOS ONE*, 5(6), e11147.
- Dennehy, J. J. (2012). What Can Phages Tell Us about Host-Pathogen Coevolution? *International Journal of Evolutionary Biology*, 2012.

- De Sordi, L., Lourenço, M., y Debarbieux, L. (2019). The battle within: interactions of bacteriophages and bacteria in the gastrointestinal tract. *Cell Host and Microbe*, 25(2), 210–218.
- des Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M., Schneider, Y. J., y Préat, V. (2006). Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *Journal of Controlled Release*, 116(1), 1–27.
- Doron, S., Melamed, S., Ofir, G., Leavitt, A., Lopatina, A., Keren, M., y Sorek, R. (2018). Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. *Science*, 359(6379), eaar 4120.
- Dower, W. J., Miller, J. F., y Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, 16(13), 6127–6145.
- Dufour, N., Henry, M., Ricard, J., y Debarbieux, L. (2016). Commentary: morphologically distinct *Escherichia coli* bacteriophages differ in their efficacy and ability to stimulate cytokine release *in vitro*. *Frontiers in Microbiology*, 7(1029).
- Dy, R. L., Przybilski, R., Semeijn, K., Salmond, G. P. C., y Fineran, P. C. (2014). A widespread bacteriophage abortive infection system functions through a Type IV toxin-antitoxin mechanism. *Nucleic Acids Research*, 42(7), 4590–4605.
- Ellermeier, C. D., y Schlauch, J. M. (2006). The genus *Salmonella*. En M. Dworkin (Ed.) *The Prokaryotes* (pp. 123–158). New York, USA: Springer.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 16(12).
- Fabre, L., Zhang, J., Guigon, G., Le Hello, S., Guibert, V., Accou-Demartin, M., y Weill, F. X. (2012). CRISPR typing and subtyping for improved laboratory surveillance of *Salmonella* infections. *PLOS ONE*, 7(5), e36995.

- Fischer, S., Kittler, S., Klein, G., y Glünder, G. (2013). Impact of a single phage and a phage cocktail application in broilers on reduction of *Campylobacter jejuni* and development of resistance. *PLOS ONE*, 8(10), e78543.
- Furfaro, L. L., Payne, M. S., y Chang, B. J. (2018). Bacteriophage therapy: clinical trials and regulatory hurdles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 376.
- Furrie, E., Macfarlane, S., Cummings, J. H., y Macfarlane, G. T. (2004). Systemic antibodies towards mucosal bacteria in ulcerative colitis and Crohn's disease differentially activate the innate immune response. *Gut*, 53(1), 91–98.
- García-Rodríguez, A., Vila, L., Cortés, C., Hernández, A., y Marcos, R. (2018). Exploring the usefulness of the complex *in vitro* intestinal epithelial model Caco-2/HT29/Raji-B in nanotoxicology. *Food and Chemical Toxicology*, 113, 162–170.
- George, M., y Abraham, T. E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. *Journal of Controlled Release*, 114(1), 1–14.
- Godde, J. S., y Bickerton, A. (2006). The repetitive DNA elements called CRISPRs and their associated genes: evidence of horizontal transfer among prokaryotes. *Journal of Molecular Evolution*, 62(6), 718–729.
- Goldfarb, T., Sberro, H., Weinstock, E., Cohen, O., Doron, S., Charpak-Amikam, Y., y Sorek, R. (2015). BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes. *EMBO Journal*, 34(2), 169–183.
- Gordillo Altamirano, F. L., y Barr, J. J. (2019). Phage therapy in the postantibiotic era. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2), e00066–18.
- Górski, A., y Weber-Dabrowska, B. (2005). The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(5), 511–519.
- Górski, A., Wazna, E., Dabrowska, B.W., Dabrowska, K., Switala-Jelen, K., y Miedzybrodzki, R. (2006). Bacteriophage translocation. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 46(3), 313–319.

- Górski, A., Międzybrodzki, R., Weber-Dąbrowska, B., Fortuna, W., Letkiewicz, S., Rogóż, P., y Borysowski, J. (2016). Phage therapy: combating infections with potential for evolving from merely a treatment for complications to targeting diseases. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1515.
- Górski, A., Międzybrodzki, R., Łobocka, M., Głowacka-Rutkowska, A., Bednarek, A., Borysowski, J., y Scheres, J. (2018). Phage therapy: what have we learned? *Viruses*, 10(6), E288.
- Green, M. R., y Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Nueva York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Grenier, D. (1991). Hemin-binding property of *Porphyromonas gingivalis* outer membranes. *FEMS Microbiology Letters*, 77(1), 45–50.
- Grenier, D., y Bélanger, M. (1991). Protective effect of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles against bactericidal activity of human serum. *Infection and Immunity*, 59(9), 3004–3008.
- Grimont P.A.D., Grimont F., and Bouvet P. (2000). Taxonomy of the Genus *Salmonella*. En Wray C., and Wray A. (Ed.), *Salmonella* in domestic animals (1-17). Wallingford, United Kingdom: CABI Published.
- Grimont, P. A. D., y Weill, F. X. (2007). WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*: Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9th edition.
- Grissa, I., Vergnaud, G., y Pourcel, C. (2007). CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Research*, 35, W52-W57.
- Guttman B., Raya R., y Kutter E. (2005). Basic Phage Biology. En E. Kutter y A. Sulakvelidze (Ed.) *Bacteriophages: Biology and Applications*, (29-66). Florida, USA: CRC Press.
- Hamzeh-Mivehroud, M., Mahmoudpour, A., Rezazadeh, H., y Dastmalchi, S. (2008). Non-specific translocation of peptide-displaying bacteriophage particles across the gastrointestinal barrier. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70(2), 577–581.

- Haraga, A., Ohlson, M. B., y Miller, S. I. (2008). *Salmonellae* interplay with host cells. *Nature Reviews Microbiology*, 6(1), 53–66.
- He, H., Lu, Y., Qi, J., Zhu, Q., Chen, Z., y Wu, W. (2019). Adapting liposomes for oral drug delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 9(1), 36–48.
- Hitchcock, P. J., y Brown, T. M. (1983). Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Bacteriology*, 154(1), 269–277.
- Hong, Y., Schmidt, K., Marks, D., Hatter, S., Marshall, A., Albino, L., y Ebner, P. (2016). Treatment of *Salmonella* -contaminated eggs and pork with a broad-spectrum, single bacteriophage: Assessment of efficacy and resistance development. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13(12), 679–688.
- Hudson, H. P., Lindberg, A. A., y Stocker, B. A. D. (1978). Lipopolysaccharide core defects in *Salmonella* Typhimurium mutants which are resistant to Felix O phage but retain smooth character. *Journal of General Microbiology*, 109, 97–112.
- Humphrey T. (2000). Public-health aspects of *Salmonella* infection. En Wray C., and Wray A. (Ed.), *Salmonella in domestic animals* (245-263). Wallingford, United Kingdom: CABI Published.
- Hurley, A., Maurer, J. J., y Lee, M. D. (2008). Using bacteriophages to modulate *Salmonella* colonization of the chicken's gastrointestinal tract: lessons learned from *in silico* and *in vivo* modeling. *Avian Diseases*, 52(4), 599–607.
- Huys, I., Pirnay, J.-P., Lavigne, R., Jennes, S., De Vos, D., Casteels, M., y Verbeken, G. (2013). Paving a regulatory pathway for phage therapy. Europe should muster the resources to financially, technically and legally support the introduction of phage therapy. *EMBO Reports*, 14(11), 951–954.
- Hyman, P., y Abedon, S. T. (2010). Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in Applied Microbiology*, 70, 217–248.

- Iwashita, S., y Kanegasaki, S. (1973). Smooth specific phage adsorption: endorhamnosidase activity of tail parts of P22. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 55(2), 403–409.
- Jarvik, T., Smillie, C., Groisman, E. A., y Ochman, H. (2010). Short-term signatures of evolutionary change in the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028 genome. *Journal of Bacteriology*, 192(2), 560–567.
- Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., y Górski, A. (2011). The influence of external factors on bacteriophages - review. *Folia Microbiologica*, 56(3), 191–200.
- Jung, H. C., Eckmann, L., Yang, S. K., Panja, A., Fierer, J., Morzycka-Wroblewska, E., y Kagnoff, M. F. (1995). A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *Journal of Clinical Investigation*, 95(1), 55–65.
- Jung, T., Kamm, W., Breitenbach, A., Kaiserling, E., Xiao, J., y Kissel, T. (2000). Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1), 147–160.
- Kaźmierczak, Z., Piotrowicz, A., Owczarek, B., Hodyra, K., Miernikiewicz, P., Lecion, D., y Dąbrowska, K. (2014). Molecular imaging of T4 phage in mammalian tissues and cells. *Bacteriophage*, 4(2), e28364.
- Kelly, K. A., Waterman, P., y Weissleder, R. (2006). *In vivo* imaging of molecularly targeted phage. *Neoplasia*, 8(12), 1011–1018.
- Khan Mirzaei, M., y Nilsson, A. S. (2015). Isolation of phages for phage therapy: A comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. *PLOS ONE*, 10(3), 1–13.
- Khan Mirzaei, M., Haileselassie, Y., Navis, M., Cooper, C., Sverremark-Ekström, E., y Nilsson, A. S. (2016). Morphologically distinct *Escherichia coli* bacteriophages differ in their efficacy and ability to stimulate cytokine release *in vitro*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 437.

- Khan Mirzaei, M., y Maurice, C. F. (2017). Ménage à trois in the human gut: interactions between host, bacteria and phages. *Nature Reviews Microbiology*, 15(7), 397–408.
- Korber, P., Stahl, J. M., Nierhaus, K. H., y Bardwell, J. C. A. (2000). Hsp15: a ribosome-associated heat shock protein. *The EMBO Journal*, 19(4), 741–748.
- Kou, L., Sun, J., Zhai, Y., y He, Z. (2013). The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(1), 1–10.
- Kutter E. (2009) Phage host range and efficiency of plating. En Clokie M.R. y Kropinski A.M. (Ed.), Bacteriophages. *Methods in Molecular Biology* (141 - 149). Nueva Jersey, USA: Humana Press.
- Labrie, S. J., Samson, J. E., y Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), 317–327.
- LaRock, D. L., Chaudhary, A., y Miller, S. I. (2015). *Salmonellae* interactions with host processes. *Nature Reviews Microbiology*, 13(14), 192 – 205.
- Larsson, A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, 30(22), 3276–3278.
- Leitner, L., Sybesma, W., Chanishvili, N., Goderdzishvili, M., Chkhotua, A., Ujmajuridze, A. y Kessler, T. M. (2017). Bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *BMC Urology*, 17(1), 90.
- Lee, S. H., Lillehoj, H. S., Hong, Y. H., Jang, S. I., Lillehoj, E. P., Ionescu, C., y Bravo, D. (2010). *In vitro* effects of plant and mushroom extracts on immunological function of chicken lymphocytes and macrophages. *British Poultry Science*, 51(2), 213–221.
- Le Minor, L., y Popoff, M. Y. (1987). Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*: Request for an opinion. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37(4), 465–468.

- Lesse, A. J., Campagnari, A. A., Bittner, W. E., y Apicella, M. A. (1990). Increased resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides utilizing tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Immunological Methods*, 126(1), 109–117.
- Levin, B. R., y Bull, J. J. (2004). Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 166–173.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079.
- Li, H., Chen, M., Su, Z., Sun, M., y Ping, Q. (2016). Size-exclusive effect of nanostructured lipid carriers on oral drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 511(1), 524–537.
- Lindberg, A. A. (1973). Bacteriophage Receptors. *Annual Review of Microbiology*, 27(1), 205–241.
- Loc Carrillo, C., Atterbury, R. J., Dillon, E., Scott, A., Connerton, I. F., y Connerton, P. L. (2005). Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6554 – 6563.
- Maaser, C., Eckmann, L., Paesold, G., Kim, H. S., y Kagnoff, M. F. (2002). Ubiquitous production of macrophage migration inhibitory factor by human gastric and intestinal epithelium. *Gastroenterology*, 122(3), 667–680.
- Maron, D. M., y Ames, B. N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, 113(3–4), 173–215.
- Maura, D., Morello, E., du Merle, L., Bomme, P., Le Bouguéneq, C., y Debarbieux, L. (2012). Intestinal colonization by enteroaggregative *Escherichia coli* supports long-term bacteriophage replication in mice. *Environmental Microbiology*, 14(8), 1844–1854.
- Maura, D., y Debarbieux, L. (2012). On the interactions between virulent bacteriophages and bacteria in the gut. *Bacteriophage*, 2(4), 229 – 233.

- Mayola, A., Irazoki, O., Martínez, I. A., Petrov, D., Menolascina, F., Stocker, R., Reyes-Darias, J. A., Krell, T., Barbé, J. y Campoy, S. (2014). RecA protein plays a role in the chemotactic response and chemoreceptor clustering of *Salmonella enterica*. *PLOS ONE*, 9(8), e105578.
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytzky, A., y DePristo, M. A. (2010). The genome analysis toolkit: a map reduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 20(9), 1297.
- Medina-Ruiz, L. (2012). Implicación del sistema SOS y de la proteína RecA en el proceso infectivo de *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. Universitat Autònoma de Barcelona, España.
- Międzybrodzki, R., Borysowski, J., Weber-Dąbrowska, B., Fortuna, W., Letkiewicz, S., Szufnarowski, K., y Górski, A. (2012). Clinical Aspects of Phage Therapy. En Łobocka M. y Szybalski W. (Ed.), *Advances in virus research* (Vol. 83, pp. 73–121). Londres, Reino Unido: Elsevier.
- Międzybrodzki, R., Kłak, M., Jończyk-Matysiak, E., Bubak, B., Wójcik, A., Kaszowska, M., y Górski, A. (2017). Means to facilitate the overcoming of gastric juice barrier by a therapeutic staphylococcal bacteriophage A5/80. *Frontiers in Microbiology*, 8, 467.
- Mojica, F. J. M., Juez, G., y Rodriguez-Valera, F. (1993). Transcription at different salinities of *Haloferox mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular Microbiology*, 9(3), 613–621.
- Moreno Switt, A. I., Sulakvelidze, A., Wiedmann, M., Kropinski, A. M., Wishart, D. S., Poppe, C., y Liang, Y. (2015). *Salmonella* Phages and Prophages: Genomics, Taxonomy, and Applied Aspects. En H. Schatten y A. Eisenstark (Ed.) *Salmonella: Methods and Protocols* (237–287). Nueva York, USA: Humana Press.
- Mortelmans, K., y Zeiger, E. (2000). The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455, 29 – 60.

- Neves, A. R., Queiroz, J. F., Costa Lima, S. A., Figueiredo, F., Fernandes, R., y Reis, S. (2016). Cellular uptake and transcytosis of lipid-based nanoparticles across the intestinal barrier: Relevance for oral drug delivery. *Journal of Colloid and Interface Science*, 463, 258–265.
- Nguyen, S., Baker, K., Padman, B. S., Patwa, R., Dunstan, R. A., Weston, T. A., y Barr, J. J. (2017). Bacteriophage transcytosis provides a mechanism to cross epithelial cell layers. *mBio*, 8(6), e01874-17.
- Nobrega, F. L., Vlot, M., de Jonge, P. A., Dreesens, L. L., Beaumont, H. J. E., Lavigne, R., y Brouns, S. J. J. (2018). Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nature Reviews Microbiology*, 16(12), 760–773.
- Novick, R. P., Christie, G. E., y Penadés, J. R. (2010). The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 8(8), 541–551.
- Oechslin, F. (2018). Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy. *Viruses*, 10(7), 351.
- Ofir, G., Melamed, S., Sberro, H., Mukamel, Z., Silverman, S., Yaakov, G., y Sorek, R. (2018). DISARM is a widespread bacterial defence system with broad anti-phage activities. *Nature Microbiology*, 3(1), 90–98.
- Oliveira, A., Sereno, R., Nicolau, A., y Azeredo, J. (2009). The influence of the mode of administration in the dissemination of three coliphages in chickens. *Poultry Science*, 88(4), 728–733.
- Otero, J., García-Rodríguez, A., Cano-Sarabia, M., Maspocho, D., Marcos, R., Cortés, P., y Llagostera, M. (2019). Biodistribution of liposome-encapsulated bacteriophages and their transcytosis during oral phage therapy. *Frontiers in Microbiology*, 10, 689.
- Park, S. H., Biswas, D., Lingbeck, J., Koo, O. K., y Ricke, S. C. (2013). Enhancement of chicken macrophage cytokine response to *Salmonella* Typhimurium when combined with bacteriophage P22. *FEMS Microbiology Letters*, 339(2), 137–144.

- Pelfrene, E., Willebrand, E., Cavaleiro Sanches, A., Sebris, Z., y Cavaleri, M. (2016). Bacteriophage therapy: a regulatory perspective. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(8), 2071–2074.
- Pereira, C., Moreirinha, C., Lewicka, M., Almeida, P., Clemente, C., Cunha, Â., y Almeida, A. (2016). Bacteriophages with potential to inactivate *Salmonella* Typhimurium: Use of single phage suspensions and phage cocktails. *Virus Research*, 220, 179–192.
- Pereira, C., Moreirinha, C., Lewicka, M., Almeida, P., Clemente, C., Romalde, J. L., y Almeida, A. (2017). Characterization and *in vitro* evaluation of new bacteriophages for the biocontrol of *Escherichia coli*. *Virus Research*, 227, 171–182.
- Petsong, K., Benjakul, S., Chaturongakul, S., Switt, A. I. M., y Vongkamjan, K. (2019). Lysis profiles of *Salmonella* phages on *Salmonella* isolates from various sources and efficiency of a phage cocktail against *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*. *Microorganisms*, 7(4).
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., y Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), e36.
- Rakhuba, D. V., Kolomiets, E. I., Dey, E. S., y Novik, G. I. (2010). Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish Journal of Microbiology*, 59(3), 145–155.
- Rhoads, D. D., Wolcott, R. D., Kuskowski, M. A., Wolcott, B. M., Ward, L. S., y Sulakvelidze, A. (2009). Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *Journal of Wound Care*, 18(6), 237–243.
- Rivera-Chávez, F., y Bäumlér, A. J. (2015). The pyromaniac inside you: *Salmonella* metabolism in the host gut. *Annual Review of Microbiology*, 69(1), 31–48.

- Ryan, M. P., O'Dwyer, J., y Adley, C. C. (2017). Evaluation of the complex nomenclature of the clinically and veterinary significant pathogen *Salmonella*. *BioMed Research International*, 2017, 3782182.
- Sarker, S. A., Sultana, S., Reuteler, G., Moine, D., Descombes, P., Charton, F., y Brüßow, H. (2016). Oral phage therapy of acute bacterial diarrhea with two coliphage preparations: A randomized trial in children from Bangladesh. *EBioMedicine*, 4, 124–137.
- Schnaitman, C. A., y Klena, J. D. (1993). Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiological Reviews*, 57(3), 655–682.
- Seed, K. D. (2015). Battling phages: how bacteria defend against viral attack. *PLOS Pathogens*, 11(6), e1004847.
- Sekine, Y., Izumi, K., Mizuno, T., y Ohtsubo, E. (1997). Inhibition of transpositional recombination by OrfA and OrfB proteins encoded by insertion sequence IS3. *Genes to Cell: Devoted to Molecular y Cellular Mechanisms*, 2(9), 547–557.
- Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S. Y., Sood, A. K., y Hua, S. (2015). Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 286.
- Shariat, N., Timme, R. E., Pettengill, J. B., Barrangou, R., y Dudley, E. G. (2015). Characterization and evolution of *Salmonella* CRISPR-Cas systems. *Microbiology*, 161(2), 374–386.
- Sharma, M. (2013). Lytic bacteriophages. *Bacteriophage*, 3(2), e25518.
- Sharma, S., Chatterjee, S., Datta, S., Prasad, R., Dubey, D., Prasad, R. K., y Vairale, M. G. (2017). Bacteriophages and its applications: an overview. *Folia Microbiologica*, 62(1), 17–55.
- Shiley, J. R., Comfort, K. K., y Robinson, J. B. (2017). Immunogenicity and antimicrobial effectiveness of *Pseudomonas aeruginosa* specific bacteriophage in a human lung *in vitro* model. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(21), 7977–7985.
- Siguié, P., Gourbeyre, E., y Chandler, M. (2014). Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5), 865–891.

- Singla, S., Harjai, K., Katare, O. P., y Chhibber, S. (2016). Encapsulation of bacteriophage in liposome accentuates its entry in to macrophage and shields it from neutralizing antibodies. *PLOS ONE*, *11*(4), 1–16.
- Spricigo, D. A., Bardina, C., Cortés, P., y Llagostera, M. (2013). Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry. *International Journal of Food Microbiology*, *165*(2), 169–174.
- Sugihara, T., Kobori, A., Imaeda, H., Tsujikawa, T., Amagase, K., Takeuchi, K., Fujiyama, Y., y Andoh, A. (2010). The increased mucosal mRNA expressions of complement C3 and interleukin-17 in inflammatory bowel disease. *Clinical and Experimental Immunology*, *160*(3), 386–393.
- Tanji, Y., Shimada, T., Yoichi, M., Miyanaga, K., Hori, K., y Unno, H. (2004). Toward rational control of *Escherichia coli* O157:H7 by a phage cocktail. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *64*(2), 270–274.
- Tindall, B. J., Grimont, P. A. D., Garrity, G. M., Euzé, J. P., Tindall, C. B. J., y De, B. (2005). Taxonomic note nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *55*(1), 521 – 524.
- Tomat, D., Casabonne, C., Aquili, V., Balagué, C., y Quiberoni, A. (2018). Evaluation of a novel cocktail of six lytic bacteriophages against Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in broth, milk and meat. *Food Microbiology*, *76*, 434–442.
- Torres-Barceló, C. (2018). Phage therapy faces evolutionary challenges. *Viruses*, *10*(6), 323.
- Tu, J., Park, T., Morado, D. R., Hughes, K. T., Molineux, I. J., y Liu, J. (2017). Dual host specificity of phage SP6 is facilitated by tailspike rotation. *Virology*, *507*, 206–215.
- Van Belleghem, J. D., Merabishvili, M., Vergauwen, B., Lavigne, R., y Vanechoutte, M. (2017). A comparative study of different strategies for removal of endotoxins from bacteriophage preparations. *Journal of Microbiological Methods*, *132*, 153–159.

- Van Den Abeele, J., Rubbens, J., Brouwers, J., y Augustijns, P. (2017). The dynamic gastric environment and its impact on drug and formulation behaviour. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96, 207–231.
- Vandenheuveel, D., Lavigne, R., y Brüssow, H. (2015). Bacteriophage therapy: advances in formulation strategies and human clinical trials. *Annual Review of Virology*, 2(1), 599–618.
- Viazis, S., Akhtar, M., Feirtag, J., y Diez-González, F. (2011). Reduction of *Escherichia coli* O157: H7 viability on leafy green vegetables by treatment with a bacteriophage mixture and trans-cinnamaldehyde. *Food Microbiology*, 28(1), 149–157.
- Wiedemann, A., Virlogeux-Payant, I., Chaussé, A.-M., Schikora, A., y Velge, P. (2015). Interactions of *Salmonella* with animals and plants. *Frontiers in Microbiology*, 5, 791.
- World Health Organization (WHO). (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.
- Wright, A., Hawkins, C. H., Änggård, E. E., y Harper, D. R. (2009). A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clinical Otolaryngology*, 34(4), 349–357.
- Yang, S., Eckmann, L., Panja, A., & Kagnoff, M. (1997). Differential and regulated expression of C-X-C, C-C, and C-chemokines by human colon epithelial cells. *Gastroenterology*, 113(4), 1214–1223.
- Young, R. (2014). Phage lysis: three steps, three choices, one outcome. *Journal of Microbiology*, 52(3), 243–258.
- Young, R., y Gill, J. J. (2015). Phage therapy redux--What is to be done? *Science*, 350(6265), 1163–1164.
- Yu, M., Yang, Y., Zhu, C., Guo, S., y Gan, Y. (2016). Advances in the transepithelial transport of nanoparticles. *Drug Discovery Today*, 21(7), 1155–1161.
- Zelasko, S., Gorski, A., y Dabrowska, K. (2017). Delivering phage therapy *per os*: benefits and barriers. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 15(2), 167–179.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dar la gracias a mis directoras, las Dras. Montserrat Llagostera Casas y María Pilar Cortés Garmendia, por su apoyo durante estos 7 años, por su paciencia y por presionarme en los momentos importantes, pero, sobre todo, por darme alas y creer en mí.

Montse, son muchas las cosas que podría decir, pero nunca olvidaré el día que me dijiste “Tú tienes que hacer investigación” cuando solo era una alumna de 3º de Grado y que supuso el comienzo de mi carrera investigadora.

Pilar, han sido muchos los momentos vividos juntas, algunos malos, pero miles de buenos. Gracias por el trabajo codo con codo y por las largas jornadas. Gracias por los momentos de charla agradable y, sobre todo, por el apoyo incondicional y los consejos desinteresados. Y no me puedo olvidar los momentos de cabezonería, nos hemos ido a juntar dos buenas piezas!!!

Jordi Barbé, en primer lugar, gracias por permitirme formar parte del Grupo de Microbiología Molecular. Pero, sobre todo, gracias por las bromas de las manzanas y las peras, Romy Scheneider, y las sempiternas alusiones al *FAP*.

En especial me gustaría dar las gracias al Dr. Daniel Maspoch y a la Dra. Mary Cano del grupo NanoUp del ICN por permitirme usar sus instalaciones y por la formación intensiva en encapsulación. Este trabajo no habría sido posible sin ellos, ni tampoco sin la desinteresada ayuda de todas las chicas del ICN. Muchas gracias.

También debo agradecer su colaboración al Dr. Ricard Marcos y a Alba García del grupo de Mutagénesis del Departamento de Genética y de Microbiología de la UAB, gracias a ellos hemos podido hacer experimentos esenciales para este trabajo.

Susana Campoy, gracias por formar parte del *team* pollitos. Y gracias, sobre todo, por plantar en mi joven cerebro la semillita de la microbiología molecular con tus clases.

Agradecimientos

Jesús Aranda, gracias por tu forma de ser tan práctica, por llamarlo de alguna manera..., y por tu ayuda siempre que la he necesitado.

Joan Ruiz, tu ayuda es inestimable, pero lo más importante es que durante estos años siempre has tenido un ratito para mí cuando lo he necesitado, gracias a ti he ahorrado mucho dinero en psicólogos...

Susana Escribano, son demasiadas las cosas buenas que podría decir y ninguna mala. Gracias por ser la mejor técnica, pero, sobre todo, por ser amiga. El trabajo ha sido muy duro, pero siempre acompañado de risas. No hay mejor forma de trabajar, y en los peores momentos siempre nos quedaba el *Fago Nuestro*. Por cierto, ¿cómo va el recuento de LB? ¿ya he gastado los 1000 L que te pedí hace un par de años? Probablemente sí...

Joan, gracias por los grandes momentos vividos, buenos y malos. Me has enseñado prácticamente todo lo que sé de fagos, incluidas las fullerías. Han sido muchos los festivos trabajando, pero en el fondo eran tan divertidos (con algún que otro *striptease* involuntario, pollitos voladores que no volaban...). Gracias por compartir conmigo una época que, creo, ha sido muy importante para ambos.

Miquel, gracias por ser y estar. Eres una persona muy especial y sé que te espera un futuro brillante. A nivel personal has sido uno de mis pilares en el laboratorio, han sido muchos los momentos vividos, pero no puedo dejar de mencionar tus debates filosóficos, esos que solo a ti se te ocurren y que tantas risas nos han ocasionado. Y gracias por engordar conmigo a base de galletas, chocolate, y todo lo que Montse nos va trayendo.

Oihane, juntas hemos vivido los peores momentos, pero también los MEJORES. Son tantos los recuerdos: las fiestas, *Jennifire*, tu intento de bricolaje casero... Tu ausencia se nota, *Radiopatio* ya no es lo mismo sin ti.

María, Jordi y Eli, gracias a los tres por esas comidas divertidas llenas de conversaciones surrealistas y por los momentos de diversión.

Marc y Eloi, los infiltrados de ambientales, gracias por compartir un poco de vuestro mundo friki conmigo, por el apoyo durante estos años y por estar siempre disponibles para los momentos de quejas y lamentos.

Gracias a mis *esclavitos* Marc, Caterina, Julia y Sandra; por su capacidad de trabajo, entusiasmo y risas. Mención especial para Ángela, que siempre será *la niña nueva*.

Eu gostaria de agradecer a Dra. Joana Azeredo do grupo Biofilm do Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho em Portugal por me receber no LPhage e por me ensinar uma maneira diferente de fazer ciência. No meu estágio no LPhage, conheci muitas pessoas especiais que me receberam como mais uma, muito obrigada por tudo. Mais tenho de agradecer especialmente ao Hugo Oliveira, foram meses muito bons em que aprendemos muitas coisas novas juntos.

Pero todo isto non sería posible sen a inestimable axuda e o cariño dos meus. Son moitos os anos que vivo lonxe, anos nos que a morriña pola miña terra e a miña xente sempre estivo nun recuncho da miña mente. Teño que dar as grazas especialmente a miña nai, polo seu inestimable esforzo. *Nanana*, sen ti nunca chegaría ata onde hoxe me atopo, es un exemplo para todas. Sari, separámonos nun momento difícil, pero pese a todo, sempre estiveches para min. Lía e Paola, que probablemente a día de hoxe nin sequera saibades que raios é isto dunha tese, grazas por comprender os meses de ausencia, e perdón por todos os momentos que non podía xogar por estares no ordenador *outra vez*. Ao resto da familia, grazas polo apoio e agarimo incondicional.

Finalmente, y no menos importante, gracias a *mi otra familia*: Eva, Rita, Anna, Sandra, Noelia, Sara, Uri, Laia. Gracias por aguantar mis quejas y lloros, pero sobre todo por los momentos de distracción y diversión.