

2° Jornadas Latinoamericanas de Bacteriófagos

**22 Y 23 DE
NOVIEMBRE DE 2022**

Buenos Aires, Argentina

**RESÚMENES DE
PONENCIAS**



II JORNADAS LATINOAMERICANAS DE BACTERIOFAGOS

22 Y 23 de Noviembre de 2022 - Universidad Nacional de José C. Paz

COMITÉ ORGANIZADOR

Leticia Bentancor, Universidad Nacional de José C. Paz, Argentina

Paula Lucchesi, CIVETAN- CONICET, FCV, UNCPBA, Argentina

Alejandra Krüger, CIVETAN-CONICET, FCV, UNCPBA, Argentina

Mariana Piuri, IQUBICEN-CONICET, FCEN, UBA, Argentina

COMITÉ CIENTIFICO

Raul Raya, CERELA-CONICET, Argentina

Andrea Quiberoni, INLAIN-CONICET, Argentina

Alejandro Reyes, Universidad de Los Andes, Colombia

Roberto Bastías, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile

Maite Muniesa, Universidad de Barcelona, España

Martha Vives, Universidad de Los Andes, Colombia

Ricardo Morbidoni, Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

CONFERENCIA APERTURA

BACTERIOPHAGES: TINY KILLERS, LIVE SAVERS, AND DETECTIVES!

Martin J. Loessner

Institute of Food, Nutrition and Health, ETH Zurich, Switzerland

Bacteriophages are very useful as biocontrol agents for various foodborne pathogens, including *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, and others. We have recently demonstrated that application of carefully selected natural phage for infection and subsequent killing of undesired target bacteria in foods can be significantly expanded by design and engineering of synthetic bacteriophages, featuring many new possibilities. This approach is currently also developed for medical use, i.e., clinically relevant human infections caused by antibiotic-resistant bacteria.

Another strategy for harnessing the antibacterial activity of phages is the use of phage-encoded cell-wall hydrolases (endolysins), which are highly specific and very fast-acting enzymatic agents able to target and destroy bacteria. Our research aims to modify and optimize endolysins for applications in very different environments, from plant disease to animal and human health.

Considering to the need for rapid diagnostic procedures, the use of phage-encoded affinity proteins such as endolysin-derived cell wall binding domains and tail fibers emerged as a superior alternative to antibodies, especially in conjunction with immobilization on solid surfaces such as magnetic beads or sensor fibers. While CBD domains are highly suitable for Gram-positive bacterial cells, the tail fiber adhesins from phages infecting Gram-negative hosts offer the potential to expand this technology platform. Both approaches allow highly specific and very efficient recognition, immobilization, separation, and detection of individual bacterial targets. To increase sensitivity and speed, phage-protein capture and immobilization can be used in sandwich assays for enzyme-linked signal amplification.

In conclusion, phages and their components are not only highly suitable for pathogen biocontrol and therapy, but also serve as a perfect toolbox for harnessing the specificity of phage-host cell interactions for rapid diagnostics and detection.

BACTERIÓFAGOS EN LA INDUSTRIA

USO DE DERIVADOS DE LACTOSUERO: ¿UNA NUEVA PROBLEMÁTICA PARA LA INDUSTRIA LÁCTEA FERMENTATIVA?

Briggiler Marcó, M

1. Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-CONICET), Santiago del Estero 2829, Santa Fe, Argentina. mbriggs@fiq.unl.edu.ar

El agregado de derivados de suero de quesería, como Concentrado de Proteínas de Suero (CPS), en la elaboración de nuevos productos lácteos es actualmente utilizado por muchas industrias, con el objetivo de aumentar el rendimiento del proceso, elevar el valor nutricional y/o mejorar la textura del producto. Si embargo, estos derivados de lactosuero pueden ser portadores de fagos que, al ser adicionados en nuevas elaboraciones fermentativas, podrían infectar a las bacterias lácticas de los cultivos iniciadores usados, causando retraso o inhibición total de su actividad fermentativa, generando productos con características organolépticas no adecuadas e incluso poco seguros desde el punto de vista microbiológico. Es así que resulta indispensable visibilizar y dimensionar esta nueva problemática, desconocida hasta el momento en nuestro país. Para ello se realizó la detección y aislamiento de fagos a partir de muestras de CPS de distintos orígenes, utilizando cepas comerciales de *Streptococcus thermophilus*, la especie más comúnmente empleada en procesos fermentativos en Argentina. Fue posible aislar un elevado número de fagos en la mayoría de las muestras testeadas (80%) y con una notable diversidad entre ellos. En algunos casos, la concentración de los aislamientos estuvo cercana a aquellas consideradas riesgosas (superior a 10^5 UFP/g). De un total de 83 aislamientos, se pudieron diferenciar 73 fagos diferentes, de acuerdo al perfil de cepas hospedadoras y perfiles de restricción. Específicamente, una alta cantidad de fagos distintos fueron aislados de la misma muestra, lo que confirma la peligrosidad del uso de estos derivados como aditivos en procesos fermentativos. Un total de 7 fagos mostró una gran capacidad infectiva mientras que algunas cepas comerciales evidenciaron una elevada sensibilidad a fagos, lo que pone en evidencia el riesgo de utilizar estos derivados sin testeo previo. La mayoría de los fagos aislados pertenecieron al grupo *cos*, el más comúnmente encontrado en los ambientes de la industria láctea, pero también se aisló un elevado número de fagos pertenecientes a grupos genéticos recientemente reportados (como 5093). En base a los resultados obtenidos, los derivados de lactosuero utilizados como aditivos en los procesos de la industria láctea, se han transformado en una nueva fuente de ingreso de fagos a los procesos fermentativos. Es así que resultaría necesario realizar testeos permanentes, por parte de la industria láctea, de estos derivados sobre los fermentos que se usan en las elaboraciones, previo a su incorporación a las líneas de fermentación, con la finalidad de minimizar la posibilidad de infecciones que deriven en fallas en el proceso.

SISTEMAS CRISPR-CAS EN *LACTICASEIBACILLUS*: UNA SOLUCIÓN NATURAL PARA LA INDUSTRIA FERMENTATIVA.

Pujato, S.(1), Simonutti A. (1), Moineau, S. (2), Rousseau, G. (2), Mercanti, D. (1), Quiberoni, A. (1)

1. Instituto de Lactología Industrial (Universidad Nacional del Litoral - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), Facultad de Ingeniería Química, Santiago del Estero 2829, Santa Fe, Argentina
2. Département de biochimie, de microbiologie et de bio-informatique. Faculté des sciences et de génie 1045, avenue de la Médecine. Université Laval, Québec, Canada.

La industria láctea fermentativa se basa fundamentalmente en la actividad de las bacterias lácticas. Durante los procesos de elaboración, la actividad de las bacterias del *starter* puede verse retrasada por bacteriófagos. El ataque por dichos bacteriófagos causa la destrucción de las células bacterianas, obstaculizando el normal crecimiento y desarrollo de la fermentación.

Los sistemas CRISPR confieren inmunidad “adquirida”, específica de secuencia y heredable, frente a fagos y a otros elementos genéticos que resulten extraños e invasivos para la célula bacteriana, como por ejemplo los plásmidos. Un locus CRISPR está compuesto por secuencias cortas de ADN repetidas y altamente conservadas dentro de la agrupación, separadas por secuencias variables conocidas como espaciadores. El proceso de inmunización se basa en la incorporación de nuevos espaciadores en el locus CRISPR, provenientes de secuencias de fagos o plásmidos. Posteriormente, los CRISPR son transcritos en pequeños ARN (crARNs) que guían a un complejo de proteínas para cortar material genético “invasor” (Pujato y col, 2021). A pesar de la popularidad de la edición genómica basada en CRISPR-Cas9, hasta la fecha se han caracterizado pocos sistemas CRISPR endógenos.

El objetivo del presente trabajo fue seleccionar bacterias con potencial probiótico que contengan sistemas CRISPR-Cas activos y explorar la posibilidad de aprovechar esta tecnología de inmunización natural, con el fin de proveer a la industria una herramienta ‘*food-grade*’ para el desarrollo de cultivos mejorados en su resistencia a fagos. Para ello, se analizó la presencia de sistemas CRISPR-Cas de 49 cepas de *Lacticaseibacillus* perteneciente a la colección del INLAIN, secuenciándose 14 sistemas CRISPR-Cas. Para evaluar la funcionalidad del sistema CRISPR-Cas, se realizaron ensayos de interferencia, utilizando el plásmido pNZ123 más un inserto que contenía el primer espaciador de la cepa y la secuencia PAM (Motivo Adyacente al Protoespaciador) correspondiente al sistema CRISPR analizado.

El 52 % de las cepas de *Lacticaseibacillus* analizadas presentaron sistemas CRISPR-Cas en su genoma. De los 14 sistemas CRISPR-Cas secuenciados, 13 fueron sistemas CRISPR-Cas tipo II-A, evidenciándose entre 21 y 49 espaciadores. El 5 % de los espaciadores fueron similares a genomas fágicos o plásmidos. Solo 1 cepa presentó sistema CRISPR tipo I-E, con 79 espaciadores no reportados previamente. El 23 % de estos mostró una homología del 100 % con secuencias de fagos de *Lb. paracasei*.

Los ensayos de interferencia evidenciaron una alta funcionalidad del sistema CRISPR-Cas en las cepas de *Lacticaseibacillus* estudiadas. El sistema CRISPR tipo II-A mostró una mayor actividad del sistema en comparación con el sistema I-E. Estos resultados son prometedores, ya que la demostrada funcionalidad del sistema CRISPR permitiría obtener cepas probióticas de *Lacticaseibacillus* con la resistencia a fagos mejorada.

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE BACTERIÓFAGOS CON POTENCIAL USO COMO AGENTES BIOCONTROLADORES DE LA MARCHITEZ BACTERIANA CAUSADA POR *RALSTONIA SOLANACEARUM* EN CULTIVOS DE TOMATE.

Parra-Castro, P. (1); Valenzuela, M. (2); O'brien, J.(3); Rosales, M.(1)

1. Laboratorio Fitopatología Molecular, Depto. Ciencias Vegetales, Facultad Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.
2. Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental, Depto. de Química y Centro de Biotecnología Daniel Alkalay Lowitt, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile
3. Plant Development and Biotechnology Laboratory, Depto. Genética Molecular y Microbiología, Facultad Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

Ralstonia solanacearum, agente causal de la marchitez bacteriana, se caracteriza por invadir el tejido vascular, causar marchitez en follaje y provocar la muerte de la planta. Se ha reportado *R. solanacearum* filotipo IIB en cultivos de tomate en la zona norte, centro y en cultivos de papa en el sur de Chile. Evidenciando que las actuales medidas de control y manejo de la enfermedad no son eficaces. Por lo que, es necesario adoptar nuevas estrategias contra el patógeno en solanáceas. Los bacteriófagos se han descrito como posibles biocontroladores. Se propone como hipótesis que el uso de una combinación de bacteriófagos sistémicos, aislados desde cultivos de tomate que presentan *R. solanacearum*, tienen un potencial de ser utilizados como agentes biocontroladores de la marchitez bacteriana en tomates. Se plantea como objetivo realizar la búsqueda y aislamiento de fagos líticos desde muestras ambientales. Posteriormente, caracterizar biológica y molecularmente, lo que consiste en evaluar su estabilidad en diferentes condiciones como pH, temperatura y radiación UV. También, determinar morfología de los fagos y secuenciar el genoma. Además, determinar rango de hospedero utilizando una colección de *R. solanacearum*, otros fitopatógenos bacterianos y bacterias propias de la rizosfera. Finalmente, determinar capacidad de movimiento de los fagos en la planta y evaluar eficacia del biocontrol aplicando una formulación en plantas de tomate. Como resultado del procesamiento de muestras recolectadas desde suelo y material vegetal, proveniente de predios con cultivos de tomates, se logró identificar una diversidad de placas de lisis en presencia del huésped utilizando la técnica de doble capa de agar. Las placas de lisis fueron seleccionadas y purificadas, con la finalidad de asegurar la pureza de 15 fagos, los cuales fueron propagados y titulados. Con el propósito de realizar una diferenciación genómica con la enzima de restricción MseI, se extrajo ADN fágico y se obtuvieron seis patrones diferenciales de digestión entre los 15 fagos iniciales, de los cuales se seleccionaron seis para secuenciar. Utilizando microscopía electrónica de transmisión se logró observar la morfología de cinco de los seis fagos seleccionados, lo que permitió clasificar cuatro fagos pertenecientes a la familia *Podoviridae* y uno a *Myoviridae*. En los ensayos de rango de hospedero, se ha observado que los seis fagos tienen actividad lítica frente a 12 cepas de *R. solanacearum*, aisladas desde cultivos de tomates localizados en predios de las tres zonas geográficas de Chile. Además, mediante ensayos de cinética de lisis se evidenció una alta actividad lítica causando diferentes proporciones fago-bacteria. Se concluye de los resultados preliminares, la posibilidad de aislar e identificar bacteriófagos en muestras ambientales desde cultivos de tomates con antecedentes de la presencia del patógeno. Así mismo, se confirma la capacidad lítica de los fagos contra *R. solanacearum* en condiciones *in vitro*.

Financiamiento: FIA-PYT-2019-0157: “Herramientas de biotecnología y biología sintética en apoyo a la vigilancia, monitoreo y detección de patógenos relevantes en la producción y comercialización de semillas” (Financiamiento parcial). Beca ANID Doctorado Nacional Folio 21202610.

IMPACTO DEL REMODELAMIENTO DE LA ENVOLTURA EN LA EXPOSICIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS SOBRE LA SUPERFICIE DE BAL MEDIANTE LA ENDOLISINA DEL FAGO PL -1

Gordillo TB (1), Gradaschi V (1), Bockor SS (1), Allievi MC (1), Piuri M (1), Ruzal S (1), Palomino MM (1)

1. IQUIBICEN-CONICET-Universidad de Buenos Aires. Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, CABA, Argentina

Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL), han sido consideradas microorganismos con status GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros), asociados a la fermentación y preservación de alimentos. Además, muchas cepas presentan características probióticas. La endolisina del fago PL-1 de *Lactocaseibacillus paracasei* tiene una estructura bi-modular con un dominio catalítico con actividad muramidasa en su extremo N-terminal y un dominio de unión a pared celular (CBD) en su extremo C-terminal. Este último puede ser utilizado como dominio "carrier", para la exhibición en superficie de BAL de péptidos o proteínas de interés industrial y/o farmacéutico. El objetivo principal del presente trabajo es evaluar el CBD de la endolisina del fago PL-1 como dominio de anclaje para unir proteínas funcionales a la superficie de BAL no modificadas genéticamente y cómo los cambios en envoltura que surgen de una pre adaptación a condiciones de hipersalinidad podrían influir en esta unión. Para ello, en primer lugar, se produjo la proteína quimera GFP-CBDLys en un sistema de expresión heterólogo en *E. coli* para posteriormente realizar los ensayos de binding sobre la superficie de BAL. Los mismos fueron evaluados por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. De esta forma se consigue una formulación de grado alimentario que no contenga microorganismos genéticamente modificados, prevaleciendo el status seguro de los mismos. Por otro lado, hemos evaluado cómo influyen los cambios estructurales a nivel de envoltura en el binding del CBD cuando *L. paracasei* es pre crecido en presencia de distintas concentraciones de NaCl. Se ha observado un aumento significativo del binding de 2,5 veces cuando *L. paracasei* es pre crecido en MRS 0,75M. El análisis de expresión por medio de la técnica qPCR de distintos genes de síntesis de los principales polímeros de pared (CWPS y LTA) ha demostrado una inhibición en la expresión de los mismos cuando *L. paracasei* es pre adaptado en alta sal. Además, se estudió si las células decoradas en alta densidad con la proteína "carrier" como también las modificaciones que ocurren a partir de la pre adaptación en alta sal podrían influir en el proceso infeccioso fago-bacteria, para ello se realizaron cinéticas de adsorción de PL-1 a *L. paracasei* comparando condición control contra tres tipos celulares. Se observó que no hay diferencias en la cinética de adsorción de la cepa decorada con la proteína "carrier", sin embargo se observó una disminución significativa cuando la misma es precrecida en alta sal. Estos resultados destacan el potencial uso de microorganismos genéticamente no modificados para el delivery de biomoléculas mediada por el CBD de la endolisina del fago PL-1, se ha corroborado que el pre crecimiento en alta sal permite maximizar la exhibición de proteínas heterólogas sobre la superficie de BAL. Las modificaciones que ocurren a nivel de polímeros de pared a partir de análisis de expresión podrían explicar la optimización de la exhibición como también las diferencias observadas en las cinéticas de adsorción.

PLENARIA

FROM THE TREE OF LIFE TO THE CLOUD OF PHAGES; INSIGHTS INTO BACTERIOPHAGE EVOLUTION

Martha R.J. Clokie

Department of Genetics and Genome Biology, University of Leicester, UK

Bacteriophages are currently developed for therapeutic purposes 'independently' for each disease type and geographical location. For example, if phages are needed to remove *E. coli* found in urinary tract infections, large phage sets are isolated and tested on relevant host bacteria. Fairly lengthy processes are then followed where phages are characterised according to their phenotypes to select phages with the broadest host ranges within that species, maximum virulence and other desired required downstream properties. Genomes are checked to ensure phages don't encode integrases, toxins or other undesirable properties and phages are tested as pairs, or larger combinations.

Currently each time phages are developed for a specific bacterial species; this entire discovery and formulation process is repeated as there is no established way to apply knowledge between phages that target different bacterial species or even to transfer the knowledge to *E. coli* causing the disease in a different part of the body or to strains from a different country. To capitalise on many discrete observations, I have been developing ecological approaches to allow the identification of features common to therapeutically useful phages regardless of their host or geographical region.

I have been identifying signatures of good clinical efficacy in phage genomes, transcriptomes, proteomes and metabolomes and determining how these signatures map to bacteriophage ecological strategies that are suited to therapy. To better understand these features, together with colleagues I am establishing a 'cloud-based' framework to integrate all known phages for a given bacterial pathogen. We then compare the phages in a graph-based fashion to each other in order to identify how key phenotypes map to genotypes within specific groups, and how those properties that make the phages successful. Thus, future phages could be more easily selected or eliminated by searching within key 'clouds' or groups. I share how we have successfully used this approach to delve into the genomes of specific host systems and how it can hopefully this type of understanding can help accelerate and streamline phage therapy development.

References:

Rethinking Phage Ecology by Rooting it Within an Established Plant Framework. **Clokie MRJ**, Blasdel BG, Demars BOL, Sicheritz-Pontén T. *Phage* (New Rochelle). 2020 Sep 1;1(3):121-136. doi: 10.1089/phage.2020.0015. Epub 2020 Sep 16. PMID: 36147824 Free PMC article.

From Trees to Clouds: PhageClouds for Fast Comparison of ~640,000 Phage Genomic Sequences and Host-Centric Visualization Using Genomic Network Graphs. Rangel-Pineros G, Millard A, Michniewski S, Scanlan D, Sirén K, Reyes A, Petersen B, **Clokie MRJ**, Sicheritz-Pontén T. *Phage* (New Rochelle). 2021 Dec 1;2(4):194-203. doi: 10.1089/phage.2021.0008. Epub 2021 Dec 16. PMID: 36147515 Free PMC article.

Francesca E. Hodges, Thomas Sicheritz-Pontén, and **Clokie, MRJ**. The Effect of Oxygen Availability on Bacteriophage Infection: A Review. *PHAGE*. Mar 2021.16-25. <http://doi.org/10.1089/phage.2020.0041>

BACTERIÓFAGOS Y ENDOLISINAS COMO ALTERNATIVA AL USO DE ANTIBIÓTICOS

BACTERIÓFAGOS PARA EL CONTROL DE *SALMONELLA* EN EL SECTOR AVÍCOLA - EXPERIENCIAS EN COLOMBIA

Vives Florez, M.J. (1), en representación de los integrantes del grupo de trabajo en
Bacteriófagos (1).

1. Centro de Investigaciones Microbiológicas -CIMIC. Departamento de Ciencias Biológicas.
Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia.

Resumen

Este trabajo presenta un proyecto de investigación aplicada para la evaluación del potencial de la fagoterapia en el control de *Salmonella* sp. en la industria avícola colombiana, como alternativa a los antibióticos usados en dosis subterapéuticas. La investigación inició en el año 2012 con el aislamiento y caracterización de bacteriófagos para las cepas prevalentes en las zonas de mayor producción de pollo de engorde en el país (serovares Enteritidis, Typhimurium y Paratyphi B). Con base en datos de la biología básica de los bacteriófagos y algunos parámetros de estabilidad, se desarrolló un ensayo controlado en baterías que demostró la inocuidad de los bacteriófagos y permitió la obtención de una patente para el coctel SalmoFREE® compuesto por seis bacteriófagos seleccionados. Posteriormente se escalaron los ensayos en una granja en producción; los datos evidenciaron nuevamente la inocuidad de los bacteriófagos, dado que no se detectaron alteraciones en los parámetros de producción, y se mostró la reducción de la incidencia de *Salmonella* sp. en esta escala. Usando el ciego como muestra de análisis, se evaluó el impacto del uso de SalmoFREE® en la microbiota intestinal de los animales. Los resultados mostraron que el coctel de fagos no afecta el desarrollo de la estructura de la comunidad bacteriana, aunque si se observaron efectos puntuales (potencialmente benéficos) en la reducción del género *Campylobacter*, e incremento en *Butyricimonas*, *Helicobacter* y familia *Rikenellaceae*. Recientemente se han realizado experimentos para la evaluación del desempeño de los bacteriófagos en condiciones anaeróbicas, dado que esta será la situación que encuentren al llegar al intestino del animal. Usando el fago ϕ San23 y una cepa de *Salmonella* Enteritidis como modelo, se observó que la ausencia de oxígeno reduce el número de fagos producidos por ciclo de infección, incrementa el tiempo requerido para completar el ciclo viral, y se reduce la frecuencia de aparición de clones bacterianos resistentes al fago. El análisis transcriptómico indicó que el metabolismo de energía bacteriano sufre cambios drásticos con la infección viral (en aerobiosis), y que el perfil de expresión es diferente en anaerobiosis, evidenciando la importancia de considerar la disponibilidad de oxígeno en la interacción fago-bacteria. En conjunto, los resultados de estas investigaciones han permitido dar a conocer la fagoterapia como una alternativa viable y efectiva entre diversos sectores. La patente sobre SalmoFREE® fue licenciada a la *start-up* SciPhage S.A.S., empresa que ha gestionado exitosamente recursos para el montaje de una planta de producción y la realización de ensayos a escala en granjas de producción de huevo, expandiendo el potencial de aprovechamiento del coctel de fagos.

BACTERIÓFAGOS DE *SALMONELLA*: BIOLOGÍA, INTERACCIONES Y APLICACIÓN EN INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS

Rivera D (1), Álvarez D (2), Barrón-Montenegro R (2), Moreno-Switt A (2)

1. Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile
2. Escuela de Medicina Veterinaria, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

Salmonella es un patógeno de transmisión alimentaria que lidera los números de muertes y hospitalizaciones asociadas al consumo de alimentos contaminados. En el mundo se estiman anualmente 93 millones de casos de salmonelosis y 155.000 muertes a causadas por *Salmonella*. Junto con esto, este patógeno presenta una gran diversidad, con más de 2.600 serotipos con distribución global. El control de *Salmonella* es difícil y desafía a la industria, por lo que el desarrollo de nuevas estrategias basadas en bacteriófagos son cada día más prometedoras.

En Chile hemos estudiado bacteriófagos de *Salmonella* desde el 2014, donde se han aislado más de 400 fagos desde distintas fuentes de origen, como son aves comerciales, cerdos, terneros, aves silvestres, reptiles y ambiente. La colección se ha estudiado en términos de su rango de hospedero, siendo la mayoría de fagos aislados capaces de infectar *Salmonella* Enteritidis. En la diversidad de fagos se secuenciaron los genomas de 30 fagos los que representaron una diversidad de 7 géneros distintos, incluyendo *Lederbergvirus*, *Roufvirus*, *Felixunavirus*, *Tequintavirus*, *Uetakevirus*, *Kuttervirus*, y fagos sin clasificar. En ensayos posteriores se han estudiado las interacciones fago-*Salmonella* en distintos ambientes, donde se ha visto modelos de interacción dependiente del entorno. Finalmente, se ha avanzado en el estudio de aplicación de fagos en aves de producción y en carne de pollo, donde se observado disminución de *Salmonella* luego del tratamiento con bacteriófagos.

En conclusiones, el trabajo con bacteriófagos de *Salmonella* ha permitido avanzar en el conocimiento de la biología de los fagos y su potencial rol ecológico. Avanzar en el estudio de las interacciones es primordial para determinar las condiciones de uso y finalmente, las interacciones en sistemas complejos es un paso muy importante para avanzar en una fagoterapia racional.

PSEUDOMONAS FLUORESCENS SF4C PRODUCE DOS BACTERIOCINASTIPO COLA DE FAGO RETRÁCTILES CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA FRENTEA DIFERENTES BACTERIAS

López-Ramírez,V. (1); Gambetta,C. (1); Barrionuevo,L. (1); Asconapé, J. (1); Fischer,S. (1)

1. Instituto de Investigaciones Agrobiotecnológicas (INIAB),Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC)-CONICET

La mayoría de las cepas de *Pseudomonas* producen bacteriocinas tipo cola de fago denominadas tailocinas. Estas pueden ser contráctiles o flexibles dependiendo de su similitud a fagos de la familia *Myoviridae* o *Siphoviridae*, respectivamente. Las tailocinas poseen actividad antimicrobiana contra cepas específicas, incrementando el interés en su estudio debido a que son prometedoras como alternativa a los antibióticos convencionales. La especificidad de las tailocinas está dada por las fibras de la cola, que reconocen receptores en la superficie de la bacteria. La cepa *P. fluorescens* SF4c es una PGPR aislada en nuestro laboratorio, capaz de producir dos tailocinas. El objetivo de este trabajo fue construir y analizar mutantes en las tailocinas producidas por la cepa SF4c. Para la construcción de los mutantes se deletaron los genes estructurales de cada una de las tailocinas y fueron reemplazados por un casete de kanamicina. Un análisis proteómico de las cepas fue llevado a cabo por nano-HPLC, acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap. Las bacteriocinas de las dos mutantes fueron evaluadas contra diferentes cepas PGPR y fitopatógenas de los géneros *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Pantoea*. Por otra parte, análisis bioinformáticos de las tailocinas SF4c fueron llevados a cabo comparando las secuencias de nucleótidos de los genes estructurales de cada una de las tailocinas con el software MEGA. La predicción de fagos relacionados a las secuencias de tailocinas se realizó en PHASTER. Para conocer el tipo de fibras de la cola presentes en las tailocinas SF4c se comparó todo el cluster de las tailocinas con genes específicos de las fibras correspondientes a otras cepas donde ya han sido identificadas. Los mutantes obtenidos tienen diferente espectro de acción antimicrobiano: la tailocina 2 presenta mayor rango de acción contra cepas blancas evaluadas, comparado con la tailocina 1. La tailocina 2 inhibió 8 de las 9 cepas probadas; una de las cepas sensibles a dicha tailocina es *Xanthomonas vesicatoria* Xcv Bv5-4 causante de la enfermedad de la mancha en cultivos de tomate y otra es *Pantoea* spp. responsable de la bacteriosis en maíz. El estudio proteómico confirmó que cada uno de los mutantes es capaz de producir una única tailocina. El análisis bioinformático demostró que los genes estructurales de cada tailocina presentaron identidad con bacteriófagos de la familia *Myoviridae*, los cuales tienen largas colas retráctiles. Las bacteriocinas de la cepa SF4c se agruparon con otras tailocinas retráctiles de bacterias rizosféricas del género *Pseudomonas*. En conclusión, los resultados sugieren que la cepa *P. fluorescens* SF4c produce dos tipos de tailocinas retráctiles con diferentes espectros de acción. La tailocina 2 presenta actividad contra patógenos importantes en cultivos de interés agronómico, convirtiéndose en una posible herramienta biotecnológica para reducir la incidencia y severidad de fitopatógenos.

EVALUACIÓN DEL EFECTO ADITIVO DE BACTERIOFAGOS CONTRA *CUTIBACTERIUM ACNES* E ISOTRETINOÍNA EN UN MODELO DE CULTIVO CELULAR

Camacho, L.T (1); Gamba, D.A (2); Vives, M.J(1)

1. Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.
2. Departamento de Química, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

El acné vulgaris es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel, la cual afecta en mayor medida a la población entre 12 y 24 años, aunque puede llegar a afectar a personas de hasta 45 o más años de edad. Esta enfermedad tiene una alta prevalencia, causando diferentes problemas psicológicos y sociales. Actualmente, existen diferentes tratamientos tópicos y orales como los retinoides, los antibióticos, la isotretinoína, entre otros; los cuales han demostrado tener una gran eficacia en el control del acné. No obstante, se ha demostrado que estos presentan desventajas importantes como la aparición de resistencia a los antibióticos por parte del patógeno *Cutibacterium acnes* y la aparición de efectos secundarios en diferentes sistemas del organismo. Por ende, es necesario la búsqueda de nuevos tratamientos. Una de estas alternativas es el uso de bacteriófagos, los cuales causan la lisis celular del patógeno, reduciendo así su abundancia en los folículos pilosos. No obstante, no logran actuar sobre los otros factores etiológicos del acné. Por lo tanto, en esta investigación se propone generar una nueva alternativa, al usar bacteriófagos con moléculas de isotretinoína unidas a su superficie, con el propósito de generar un tratamiento localizado y dirigido, para reducir los efectos secundarios del medicamento, el cual contaría con actividad antiinflamatoria (isotretinoína) y antimicrobiana (bacteriófagos). Para esto, se emplearon una cepa de *C. acnes* denominada Pa6 y el bacteriófago PAc2, los cuales fueron aislados en investigaciones previas de pacientes con lesiones de acné. Asimismo, se llevaron a cabo diferentes procesos para seleccionar los blancos y lograr la unión estable de las moléculas de isotretinoína a las proteínas de cápside del bacteriófago, que llamamos bacteriófago decorado, y se realizaron ensayos de inocuidad de estos fagos por medio de pruebas de citotoxicidad *in vitro* en cultivos celulares de queratinocitos. Los resultados del análisis bioinformático mostraron que es posible realizar la unión por medio de la formación de enlaces ésteres, gracias al extremo carboxilo del fármaco y a los residuos hidroxilo de las proteínas estructurales del bacteriófago, lo cual se corroboró de manera experimental por medio de espectrofotometría UV (Información que se encuentra en proceso de protección de propiedad intelectual). De igual forma, se determinó que aunque el título viral del bacteriófago decorado disminuye, cambiando de $1.1 \cdot 10^{11}$ UFP/mL a $2.2 \cdot 10^5$ UFP/mL, este sigue teniendo la capacidad de infectar a la bacteria. En cuanto a los ensayos de inocuidad en el cultivo celular, se realizaron pruebas con el medicamento y el bacteriófago de manera individual y en la formación del complejo, los cuales mostraron que no se afecta la viabilidad de la línea celular. En conclusión, esta aproximación puede llegar a ser una gran alternativa a las terapias actuales contra el acné, ya que puede llegar a actuar sobre varios de los factores fisiopatológicos que causan la enfermedad y puede generar mayor seguridad para el paciente al reducir los efectos secundarios.

BIOLOGÍA ESTRUCTURAL DE BACTERIÓFAGOS

**CRYSTAL STRUCTURE OF THE C24 PROTEIN FROM THE ANTARCTIC BACTERIUM
BIZIONIA ARGENTINENSIS JUB59, A PUTATIVE LONG TAIL FIBER RECEPTOR-BINDING
TIP FROM A NOVEL TEMPERATE BACTERIOPHAGE**

Pellizza, L. (1); López, J.L. (2); Vázquez, S. (3); Sycz, G. (1); Guimarães, B.G. (4); Rinaldi, J. (1); Goldbaum, F.A. (1); Aran, M.(1); Mac Cormack, W.P. (3,5); Klinke, S. (1)

1. Fundación Instituto Leloir (IIBBA-CONICET), Buenos Aires, Argentina
2. Instituto de Bacteriología y Virología Molecular IBAVIM, UBA, Argentina
3. Instituto NANOBIOTEC, UBA, Argentina
4. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, Francia
5. Instituto Antártico Argentino, Buenos Aires, Argentina

Los bacteriófagos de cola son una de las entidades más abundantes en nuestro planeta. Sus espículas y fibras son clave en el reconocimiento y adsorción a la célula huésped, tienen una gran utilidad en aplicaciones biotecnológicas. Si bien existe información estructural detallada de las fibras de la cola de ciertos bacteriófagos, como por ejemplo el T4, la gran mayoría de los fagos carecen de una descripción estructural de sus fibras. En nuestro proyecto colaborativo estudiamos la flavobacteria marina *Bizionia argentinensis* JUB59, un microorganismo Gram-negativo que fue aislado de aguas superficiales en la Caleta Potter (Antártida Argentina) y cuyo genoma fue secuenciado. Hace unos años comenzamos un proyecto de genómica estructural para clasificar y estudiar aspectos funcionales de ciertas proteínas de esta bacteria, las cuales figuraban anotadas con función desconocida. En este contexto, y entre otros miembros, seleccionamos una proteína de 277 residuos que denominamos C24, cuya secuencia carecía de homología con proteínas de función conocida. Logramos resolver la estructura tridimensional de C24 por cristalografía de rayos X, observando una estructura trimérica de 89 kDa en forma de cohete con una longitud de 160 Å. La arquitectura de esta proteína tiene paralelismos con el extremo de unión al receptor ubicado en las fibras de la cola larga del fago T4, aunque con divergencias en la secuencia, tamaño, organización de los dominios, y número y tipo de cationes divalentes unidos. Pudimos confirmar el origen viral de C24 por métodos experimentales y bioinformáticos: (i) la secuencia de C24 está localizada en un profago detectado por el software “ACLAME Prophinder tool”, (ii) el antibiótico mitomicina C induce el ciclo lítico de un virus presente en el genoma bacteriano, el cual pudimos aislar y visualizar por microscopía electrónica de transmisión, observándose una morfología compatible con el orden *Caudovirales*, y (iii) estas partículas virales contienen el gen de C24 en su genoma. En conclusión, la estructura cristalina de C24, sumada a los experimentos de inducción y visualización, revelan que esta proteína sería el extremo de unión al receptor de un nuevo bacteriófago de cola presente como profago en *B. argentinensis* JUB59, brindando información útil para expandir el conocimiento actual de la maquinaria viral presente en los océanos.

Cita bibliográfica: Pellizza, L. et al. & Klinke, S. (2020). *Journal of Structural Biology* 212, 107595, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2020.107595>

CONFERENCIA CIERRE

FAGOS, UNA BREVE HISTORIA

Raya, R.R. (1)

1. Centro de Referencia para Lactobacilos, CERELA, CONICET NOA Sur, Chacabuco 145, San Miguel de Tucumán, T4000ILC, Tucumán, Argentina.

Los bacteriófagos (o fagos) son virus que infectan bacterias. Los fagos fueron (re)descubiertos por Felix d'Hérelle, en 1917, quien describió un *microbio invisible, filtrable y reproducibileal* que denominó "bacteriófago" (fago), y vislumbró la posibilidad de utilizarlo para el tratamiento de enfermedades infecciosas del hombre y animales. Las primeras imágenes de los fagos fueron publicadas a partir de 1940, tras la invención del microscopio electrónico, lo que explica el intenso debate suscitado, en la década de 1920, entre d'Hérelle y Jules Bordet sobre la función de los fagos en el sistema inmune y sobre la naturaleza de los mismos (virus versus enzimas autocatalíticas). Entre 1925-1939, se describieron, principalmente: el fenómeno de lisogenia; la existencia de varias especies de fagos; y la naturaleza núcleo-proteica de un fago purificado. En 1939, Emory Ellis y Max Delbrück determinaron por primera vez de manera cuantitativa la reproducción intracelular de un fago (período de latencia y *burst-size*; "one-step growth curve"). En 1944, el llamado "Phage Group", integrado principalmente por Delbrück, Salvador Luria y Alfred Hershey, concentró sus estudios en los fagos de la serie T; sus resultados más destacados fueron: i) el "test de fluctuación"; ii) la recombinación entre genomas de fagos y el primer mapa genético; iii) el experimento de Hershey-Chase; iv) la estructura lineal del gen, experimentos realizados por Benzer con mutantes rII del fago T4; v) el descubrimiento del fenómeno de restricción-modificación; y vi) los fenómenos de transducción generalizada y especializada. El uso del fago T2 permitió confirmar la existencia del ARN mensajero que se había propuesto para explicar el flujo de información de ADN a proteína. La lisogenia fue investigada por el grupo de Lwoff, en París, y explicada en sus características fundamentales durante la década de 1950. Así, los estudios mencionados llevaron a definir a los fagos como elementos genéticos transmisibles y sus resultados contribuyeron a unificar el campo de la genética bacteriana y a desarrollar un nuevo paradigma (la biología molecular). Posteriores estudios determinaron que los fagos son posiblemente las entidades biológicas más antiguas y sin duda las más abundantes, diversas y ubicuas que existen en la biosfera; por su capacidad lítica, se estima que son responsables de la muerte de aproximadamente el 20-40%/día de las bacterias de los océanos y, como vehículos en la transferencia horizontal de genes, juegan un papel determinante en la ecología y diversidad de las comunidades bacterianas. Los últimos descubrimientos de nuevos sistemas de inmunidad de las bacterias, más allá de los sistemas CRISPRs y de las enzimas de restricción, y de sistemas de comunicación entre los mismos fagos, ponen de manifiesto que la historia entre las interacciones bacterias-fagos está aún lejos de terminar.

CONFERENCIA APERTURA

AISLAMIENTO DE UN NUEVO GRUPO DE FAGOS CRASSPHAGE, INFECTIVOS PARABACTEROIDES INTESTINALIS

Gómez-Gómez, C.(1); Ramos-Barbero, MD. (1), Sala-Comorera, L. (1), Morales-Cortes, S(1); Vique, G. (1); Rodríguez-Rubio, L.(1); Ballesté, E. (1); Garcia-Aljaro, C. (1);
Muniesa, M.

1. Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística. Universitat de Barcelona.
Barcelona. Spain

Recientes estudios metagenómicos del contenido intestinal humano han revelado secuencias de ADN asociadas a un bacteriófago no identificado previamente, llamado CrAssphage, presente en la mayoría de los metagenomas fecales humanos analizados. Hasta el momento solo se han podido aislar cuatro fagos CrAssphage que infectan diferentes cepas de *Bacteroides*. A pesar de los numerosos genomas de fagos crAssphage disponibles en las bases de datos, el aislamiento de estos fagos es complejo, ya que en ocasiones no generan calvas de lisis, o generan calvas poco visibles. Ese es el motivo por el que hay pocos fagos aislados a nivel mundial, lo que lleva a un desconocimiento de su biología, rango de huéspedes, ciclo de vida y posibles diferencias morfológicas.

En este estudio se desarrolló una nueva estrategia basada en la propagación y selección de fagos virulentos que permitieron aislar y caracterizar 25 nuevos virus CrAssphage a partir de aguas residuales de diversas zonas de Cataluña (España). Para ello, se cuantificó mediante qPCR la presencia de CrAssphage en muestras de aguas residuales de diferentes plantas de tratamiento de agua residual. En aquellas muestras donde se obtuvieron mayores recuentos, se realizaron cultivos de enriquecimiento empleando diferentes cepas de *Bacteroides* como huéspedes. Tras la propagación, se evaluó de nuevo la cantidad de crAssphage, seleccionando las muestras y cepas huésped que generaron una propagación de los fagos. Entre las cepas ensayadas, tanto ambientales como clínicas, *B. intestinalis*, mostró los mejores resultados de propagación. Los crAssphage se propagaron de nuevo en sucesivos cultivos de enriquecimiento usando esta cepa, que fue además utilizada para el aislamiento de este virus a partir de calvas de lisis mediante ensayos de hibridación de calvas de lisis usando una sonda específica para CrAssphage. A partir de calvas positivas en la hibridación se aislaron 25 virus que presentaron una morfología tipo *Podoviridae* y que generaban unas calvas de lisis muy pequeñas y apenas visibles. Tras un posterior análisis bioinformático de los genomas obtenidos por secuenciación se concluye que los fagos tipo CrAssphage aislados son fagos no descritos anteriormente, muy similares entre sí pero con diferencias significativas a nivel genético, especialmente en regiones muy variables de su genoma que corresponden principalmente a fibras de la cola, endonucleasas y polimerasa. El reclutamiento en metagenomas de diversas partes del mundo permite observar la presencia de fagos crAssphage similares (aunque no idénticos) a los detectados en este estudio, con una prevalencia mayor que el fago CrAssphage 001, el primer aislado de este tipo.

Este estudio es el primero que ha permitido el aislamiento de un grupo numeroso de virus del tipo crAssphage. El aislamiento de nuevos CrAssphage permitirá mejorar su estudio, conocer su biología y optimizar su detección a fin de ser usados como marcadores de contaminación fecal de origen humano.

INTERACCIÓN BACTERÍOFAGO- HOSPEDADOR

INTERACTION NETWORKS BETWEEN VIBRIOS AND BACTERIOPHAGES

Araya, J. (1); García, K. (2); Espejo, D. (1); Higuera, G. (3); Fontúrbel, F. (1); Castillo, D. (4); Sepúlveda, F. (5); Alegría, M. (6) and Bastías, R. (1).

1. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile.
2. Universidad Autónoma de Chile, Chile.
3. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Chile.
4. Universidad SEL, Chile.
5. Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile.
6. Universidad de las Américas, Chile.

Los vibrios son uno de los grupos bacterianos más abundantes en el mar. Entre ellos se encuentran varias especies patógenas como *V. cholerae*, *V. parahemolyticus* o *V. alginolyticus*. La abundancia de estas bacterias depende de diferentes condiciones ambientales como la temperatura, la disponibilidad de nutrientes y la presencia de bacteriófagos.

Numerosos estudios muestran la influencia de los fagos sobre la ecología, evolución y virulencia de los vibrios. Sin embargo, la mayoría de estos trabajos se basa en parejas únicas de fago-bacteria, mientras que en el ambiente son múltiples fagos los que pueden infectar simultáneamente distintos vibrios. Estas redes de interacción entre vibrios y fagos pueden estudiarse a través de bioinformática o también con métodos de cultivos clásicos. En este caso se utilizó ambas estrategias para explorar distintos aspectos de la biología de vibrios, como son la distribución de profagos en distintas especies y por otro lado el efecto de la temperatura en las redes de infección entre vibrios y fagos.

Primero se evaluó la distribución de profagos portadores de la toxina *zot* en los genomas de distintos vibrios. A partir de un análisis de 4619 genomas de vibrios se encontró 2030 posibles profagos portadores de *zot* de 13 tipos distintos, presentes en 43 especies de *Vibrio*. Como era de esperarse, la mayoría de los profagos fueron encontrados en genomas de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*; sin embargo, al normalizar por el número de genomas secuenciados para cada especie, los profagos se encontraron preferentemente en especies como *V. antiquaries*, *V. diabolicus* o *V. alginolyticus*. Algunos profagos como CTX fueron encontrados en muy pocas especies (*V. cholerae*, *V. mimicus* y *A. fischeri*). En cambio, otros como phiVCY fueron encontrados en 28 especies de *Vibrio*, lo que sugiere que fagos de amplio rango de hospedero serían más relevantes en la diseminación de la toxina *zot* entre los distintos vibrios.

Para evaluar el efecto de la temperatura en las redes de infección entre vibrios y fagos, se aisló 29 fagos desde la bahía de Valparaíso (Chile), utilizando 40 vibrios como hospederos. Las redes de infección fueron determinadas a 20 °C y 25 °C usando la técnica de EOP. A 25 °C sólo 22 vibrios fueron infectados por los distintos fagos, generando una red de infección anidada (índice de anidamiento 30,59). Esta red se caracterizó por la presencia de fagos generalistas y fagos especialistas, con una conectancia de 2,74. A 20 °C algunos fagos cambiaron su rango de hospedero, alterando las propiedades de la red, lo que sugiere que la temperatura puede alterar la red de infección entre fagos y vibrios.

Estos resultados muestran la complejidad de interacciones entre vibrios y sus fagos, marcadas por la presencia de fagos especialistas y generalistas. Estudios futuros permitirán entender como estas interacciones pueden alterarse por otras condiciones ambientales o fenómenos como el calentamiento global.

ACTIVIDAD DEL COMPLEJO DE VIGILANCIA DE UN SISTEMA CRISPR-CAS DE TIPO I-F1 EN BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS Y CARACTERIZACIÓN DE SU ESTRUCTURA MODULAR

Quiroga C. (1)

1. Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica, Facultad de Medicina, UBA, CONICET, CABA, Argentina

Los sistemas CRISPR-Cas son considerados el sistema inmune adaptativo de las bacterias brindándoles protección frente a la invasión por elementos genéticos móviles, como fagos y plásmidos. Estos sistemas se encuentran en aprox. 80% de las arqueas y 45% de las bacterias; sin embargo, no se conservan a nivel de especie o género. Nuestro grupo está enfocado en estudiar la funcionalidad del sistema CRISPR-Cas de tipo I-F1 de *Shewanella xiamenensis* Sh95 y su potencial como herramienta de edición génica, así como también evaluar si estos sistemas pueden ser transferidos horizontalmente. En primer lugar, observamos que en presencia de secuencias CRISPRs sintéticas, que guían al sistema hasta los sitios de acción, éste es capaz de reconocer tanto un ADN foráneo como el propio cromosoma bacteriano, pudiendo promover la delección de un fragmento > a 100 kb. La acción de este sistema sobre plásmidos invasores también reveló la actividad de degradación, probablemente mediada por la nucleasa Cas2/3, tanto en la cepa nativa como en *E. coli*. Estos resultados nos permitieron confirmar que el sistema CRISPR-Cas de tipo I-F1 de la cepa Sh95 exhibe características particulares que podrían ser adaptadas para la curación de plásmidos y edición de genes en bacterias patógenas. Por otro lado, mediante el estudio de las estructuras modulares que comprenden a los sistemas CRISPR-Cas usando como modelo el género *Shewanella* pudimos determinar la variedad de sistemas presentes en un mismo género, identificar sitios específicos de inserción de los diversos módulos portadores de sistemas CRISPR-Cas, y evidenciar su relación con otros sistemas de defensa bacterianos, tales como toxina/antitoxina y restricción y modificación (RM). El análisis detallado de los entornos genéticos de los sistemas CRISPR-Cas analizados reveló la presencia de genes que codifican para proteínas de fagos, como *P4-like int*, *cro/cl* y *alpA*, que podrían estar formando un nuevo elemento del tipo P4, como fuera observado para otros sistemas anti-fagos, tales como retrones, RM y Gabija.

METAGENOMIC INSIGHT OF CRISPR STABILITY AT GLOBAL SCALE

Guerrero, Leandro D.

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres” (INGEBI-CONICET), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Las interacciones entre fagos y bacterias en el ambiente son uno de los factores más importantes que intervienen en el modelado de las comunidades microbianas. El estudio de estas interacciones *in situ* representa un enorme desafío, pero a la vez permite comprender mecanismos que no pueden ser observados a otra escala. Una de las herramientas que permite estudiar la relación fago-bacteria es el análisis de la información codificada en los sistemas CRISPR, utilizados por arqueas y bacterias como mecanismo de defensa frente a infecciones.

Estos sistemas están compuestos por enzimas denominadas Cas y arreglos de secuencias de ADN repetitivas intercaladas con secuencias espaciadoras provenientes de la degradación e incorporación al arreglo de ADN exógeno producto de infecciones previas. Los espaciadores llevan un registro cronológico y ordenado de las infecciones pasadas y en muchos casos su secuencia permite identificar el origen de dicha infección.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un sistema de estudio basado en la reconstrucción de los arreglos CRISPR a partir de datos metagenómicos provenientes de muestras ambientales. La información obtenida, sumada a la capacidad de reconstruir genomas tanto de bacterias como de fagos, nos ha permitido analizar con un alto grado de resolución las interacciones mediadas por CRISPR entre fagos y bacterias a escala global.

Utilizando datos metagenómicos provenientes de 66 plantas de tratamiento de efluentes de 19 países ubicados en distintas partes del mundo, reconstruimos más de 160 sistemas CRISPR diferentes y en muchos de los casos logramos identificar las bacterias portadoras y los fagos que las infectan. El análisis de las secuencias y estructura de los arreglos de espaciadores en los CRISPR nos permitió identificar su distribución en las distintas plantas alrededor del mundo. La presencia de arreglos idénticos pertenecientes a las mismas especies de bacterias en plantas ubicadas en distintos países y continentes, sugieren que para muchas bacterias los sistemas CRISPR se encuentran altamente conservados, y que la adquisición de los espaciadores más antiguos es previa al establecimiento de esas bacterias en las distintas plantas.

PLENARIA

LAS OMICAS DE FAGOS

Reyes A

Max Planck TandemGroup en Biología Computacional, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

Han pasado un poco más de 100 años del descubrimiento de los fagos y casi 20 años desde la aparición de los métodos de secuenciación masiva. Aun así, el uso de estos métodos para la caracterización de la diversidad viral está en sus inicios. En años recientes ha habido un incremento exponencial en el número de genomas virales disponibles y más aún, en el número de genomas virales ensamblados a partir de metagenomas (UViGs). La virología tradicional fundamentaba la clasificación de los virus en su morfología bajo microscopio y su hospedero o infección que causaba. Sin embargo, esta información no está disponible para ninguno de los fagos ensamblados a partir de metagenomas. Solo hasta hace muy poco tiempo, el ICTV ha permitido la inclusión y creación de taxones virales solamente basado en la secuencia genómica, lo que está causando una gran renovación de la taxonomía viral a una taxonomía basada solamente en características moleculares y genómicas. Esto tiene y tendrá unas consecuencias profundas en la forma como nombramos y clasificamos los virus y abre las puertas a una expansión de la diversidad conocida de los fagos.

Con el aumento en la disponibilidad de secuencias, el crecimiento exponencial de datos de viromas depositados en bases de datos públicas, la creación de nuevas herramientas computacionales para el análisis de estos datos toma cada vez mayor importancia. Herramientas y análisis que permitan entender más sobre los potenciales hospederos, relaciones filogenéticas con otros virus y el contenido génico y capacidades funcionales de estos virus. En nuestro grupo nos enfocamos en el desarrollo de estas herramientas y su aplicación en el análisis e interpretación de diferentes datos omicos virales.

DESARROLLOS COMERCIALES BASADOS EN BACTERIÓFAGOS

SCIPHAGE, MICROBIOLOGÍA DE PRECISIÓN PARA MEJORAR LA SALUD ANIMAL "SALMOFREE®, DE LA INVENCIÓN AL ALISTAMIENTO COMERCIAL"

Viviana Clavijo

Sciphage. Ciencia y tecnología de fagos, Bogotá, Colombia.

Sciphage es una empresa de base biotecnológica creada en el 2014. Fue fundada en Colombia como una *start-up* de la Universidad de los Andes por investigadores de la misma Universidad. Las motivaciones para su creación incluyeron: 1. Buscar en la ciencia una solución tangible, viable y sostenible a problemas globales con potencial de ser transferida y convertirse en una innovación y, 2. Crear nuevas oportunidades para profesionales de carreras científicas. En Sciphage desarrollamos bio-productos para reducir el uso de antibióticos y combatir el problema de la resistencia bacteriana mediante el uso de bacteriófagos. El *know-how* de la compañía es la caracterización y creación de mezclas óptimas de fagos para controlar problemas específicos causados por bacterias, ofreciendo una plataforma para el desarrollo de nuevos productos dirigidos. Nuestro primer producto, SalmoFree®, es una mezcla de fagos que controla *Salmonella* en la industria avícola y que, además, mejora la salud de las aves de producción. A través del desarrollo de SalmoFree®, se han abordado diferentes etapas y retos del desarrollo de producto y su transferencia tecnológica. Las primeras fases del desarrollo se realizaron en conjunto con la universidad de los Andes; estas etapas incluyeron desde el planteamiento del marco conceptual del desarrollo y la definición de la problemática de *Salmonella* en el sector, el diseño de la mezcla de bacteriófagos y todas las fases posteriores de caracterización y validación *in-vitro*. También se realizaron validaciones en aves de engorde tanto en ambiente controlado como en granjas comerciales. De manera paralela, Sciphage empezó a abordar otros componentes propios de la transferencia tecnológica; entre ellos, se definió la estrategia de protección intelectual y el modelo de negocio. También se han realizado actividades de validación comercial a través de diferentes acercamientos con clientes potenciales. En el 2019, Sciphage gana el programa de aceleración y escalamiento de GaneshaLab donde se logró estructurar un modelo de negocio sólido con la visión de la internacionalización de la empresa. En el año 2021, Sciphage obtiene la licencia exclusiva por parte de la Universidad de los Andes del coctel de fagos que compone SalmoFree®. Actualmente, Sciphage está ejecutando su alistamiento para la salida al mercado y ha realizado estudios de mercado y de validación comercial de mayor alcance. Se cuenta con un modelo de negocio perfeccionado con un segmento de mercado inicial claro y definido, con diseño de planta para empezar su montaje en el mes de diciembre 2022 y empezar a operar en el mes de febrero. Los primeros lotes serán lotes de prueba para validar en un entorno operativo real y en el mercado nicho inicial. Bajo este marco, se está abordando la barrera regulatoria para la solicitud de registro como fabricantes y como producto en el 2023. Toda esta ruta, ha permitido que Sciphage tenga definido su plan de crecimiento y amplíe su espectro de acción, y este adelantando trabajos con otros sectores como el sector acuícola y porcícola.

DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN INTRAMAMARIA PARA EL TRATAMIENTO DE MASTITIS EN VACAS LECHERAS

Bourilhon, P.(1); Zaburlin, D.(1); Dunand, E(1); Salame, M.(1)

1. Alytix S.A., Santa Fe, Argentina.

Mastitis bovina es una enfermedad multi-etiológica definida como la inflamación del parénquima de las glándulas mamarias de las vacas, se caracteriza por diferentes cambios físicos, químicos y bacteriológicos en la leche y por alteraciones patológicas en las glándulas. Existen dos tipos de mastitis, clínica y subclínica, diferenciándose principalmente en las manifestaciones y síntomas, mientras los casos clínicos se identifican por inflamación, enrojecimiento y dolor de la ubre de los animales y por cambios evidentes en la leche, en el caso de mastitis subclínica los signos de infección no son visibles a simple vista y su diagnóstico depende del análisis de muestras de leche como recuento de células somáticas (SCC) y análisis bacteriológico. Con una prevalencia en el mundo de alrededor del 15% de mastitis clínica (5% en Argentina) y del 43% de mastitis subclínica (56% en Argentina), las pérdidas económicas asociadas ascienden a 30 mil millones de dólares al año en el mundo (400 millones en Argentina). Éstas pérdidas se deben a la disminución del rendimiento y calidad de leche del rodeo, a la imposibilidad de comercializar la leche durante el período de tratamiento de los animales y, dependiendo del tratamiento, un tiempo posterior al mismo debido a la presencia de residuos de antibióticos, y a la pérdida o reemplazo de los animales afectados en el rodeo.

Los agentes infecciosos más comunes en este tipo de afecciones son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma* spp. y *Corynebacterium bovis* y otros microorganismos ambientales como *S. uberis*, *S. disgalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp. El tratamiento más utilizado para los casos de mastitis clínica es la aplicación de antimicrobianos, mientras que la mastitis subclínica no suele ser tratada en los períodos de lactancia del animal, sino al final de la misma en lo que se conoce como secado.

Este trabajo presenta el estado del desarrollo de una formulación intramamaria a base de bacteriófagos específicos contra *Staphylococcus aureus* para el tratamiento de mastitis subclínica en etapa de lactancia. Esta formulación consiste en un cóctel de cinco bacteriófagos aislados de diferentes fuentes ambientales el cuál fue evaluado *In Vitro* frente a diferentes cepas de interés aisladas y caracterizadas en la región y se realizó el ensayo de inocuidad en ratones BALB/c. Actualmente, se encuentra en estudios de selección de excipientes y estabilidades en diferentes condiciones para próximamente realizar los ensayos de inocuidad y eficacia en vacas Holstein. El desarrollo de terapias alternativas a los antibióticos para esta enfermedad, significaría un avance tecnológico fundamental para disminuir los costos directos e indirectos y para la disminución del uso de antibióticos con el fin de desacelerar la tasa de emergencia de resistencia por parte de las bacterias.

PHAGELAB: BIOTECNOLOGÍA GLOBAL PARA LA SALUD ANIMAL

Cifuentes, P.

Chief Technology Officer - PhageLab Chile SpA, Santiago, Chile.

PhageLab es una empresa de biotecnología dedicada al desarrollo de productos basados en bacteriófagos para la industria ganadera. En ese contexto, PhageLab desarrolló PhageIn, un aditivo alimenticio para prevenir las diarreas infecciosas en terneras de lechería producidas por *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* Luego de diversas pruebas de campo exitosas y una estrategia de propiedad intelectual sólida, desde 2021, esta formulación en polvo se comercializa a través de MSD en Chile, Brasil, Argentina y otros países de Latinoamérica. Además, PhageLab está trabajando en aplicaciones basadas en bacteriófagos para otras especies animales que componen la industria pecuaria, como cerdos, pollos y pavos. Para la expansión global, PhageLab cuenta con un equipo multidisciplinario de +100 profesionales e infraestructura y operaciones en Brasil y en España.

SESIÓN DE POSTERS

Poster	Título	Autores
1	CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ACTIVIDAD DE LYSA DEL BACTERIÓFAGO TM4	Payaslian, F.; Urdániz, E.; Mariano, M.; Piuri, M.
2	FAGECAPSULES, FORMULACIÓN DE SALMONELLA-FAGO CON LIBERACIÓN INTESTINAL DIRIGIDA, PARA EL CONTROL DE SALMONELLA INFANTIS EN AVES	Rivera D.; Fernando D.; Camila A.; González D.; Adell A.; Moreno-Switt A.
3	AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE FAGOS LÍTICOS DE BACTERIAS UROPATÓGENAS MULTIRRESISTENTES Y FORMADORAS DE BIOFILMS	Gutiérrez, M.V.; Echeverría, N.
4	AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN BACTERIÓFAGO LÍTICO CON POTENCIAL TERAPÉUTICO EN INFECCIONES POR KLEBSIELLA SP. MULTIDROGORRESISTENTE	Sáchenka Tordoya Pascual
5	CONSTANTES DE INACTIVACIÓN DE FAGOS DE BACTERIAS LÁCTICAS UTILIZANDO PINTURAS FOTOCATALÍTICAS	Jacob, M.F.; Quiberoni, A.; Ballari, M.M; Briggiler Marcó, M.
6	ΦK14, UN BACTERIÓFAGO AISLADO DE AGUAS SERVIDAS Y ESPECÍFICO DE <i>Vibrio cholerae</i>	Talledo, M.; Suárez, K.; Zumaeta, K.
7	ACTIVIDAD DE LOS FAGOS EN EL AMBIENTE DE LA MICROBIOTA INTESTINAL: EN BUSCA DE BIOMARCADORES DE UTILIDAD CLÍNICA PARA LA ENFERMEDAD POR HÍGADO GRASO ASOCIADO A DISFUNCIÓN METABÓLICA (MAFLD)	Mascardi, M.F.; Suárez, B.; Mazzini, F.N.; Ruda, V.M.; Marciano, S.; Casciato, P.; Narváez, A.; Haddad, L.; Anders, M.; Orozco, F.; Tamaroff, A.J.; Cook, F.; Gounarides, J.; Gutt, S.; Gadano, A.; Méndez García, C.; Marro, M.L.; Penas Steinhardt, A.; Trinks, J.
8	LOS SISTEMAS DE RESTRICCIÓN MODIFICACIÓN SON LOS COMPONENTES PRINCIPALES DE LAS DEFENSAS ANTIVIRALES DE BIZONIA ARGENTINENSIS JUB59, UNA BACTERIA ANTÁRTICA MARINA SUPERFICIAL	Nicolas Napolitano, Cecilia Quiroga, Walter Patricio Mac Cormack, José Luis López
9	MÚLTIPLES SISTEMAS DE DEFENSA ANTIVIRAL COMPONEN EL ARSENAL DEFENSIVO DE RHODOCOCCLUS SP. CEPA ADH, UNA BACTERIA ANTÁRTICA DEGRADADORA DE HIDROCARBUROS	Nicolas Napolitano, Cecilia Quiroga, Walter Patricio Mac Cormack, José Luis López
10	CARACTERIZACIÓN BACTERIÓFAGOS RECUPERADOS A PARTIR DE AGUAS RESIDUALES CONTRA CEPAS DE <i>Klebsiella pneumoniae</i> ST258	Nolivos, K.V; Tisalema, E.E; Garzón,D.R; Reyes, J. A; Cabezas, F.S
11	EXPRESIÓN DE SIALATO O-ACETIL ESTERASAS CODIFICADAS POR PROFAGOS Stx2a	Pascal, S.B.; Lucchesi, P.M.A.; Nieto Farías, M.V.; Krüger, A.
12	ANÁLISIS DE SISTEMAS CRISPR EN CEPAS REGIONALES DE <i>Streptococcus thermophilus</i>	Pedróñ, L., Pujato, S.A., Quiberoni, A., Mercanti, D.J.
13	AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS FRENTE A <i>K. pneumoniae</i> RESISTENTE A CARBAPENÉMICOS DEL GC258	Salazar-Ospina, L.; Téllez-Carrasquilla S., Villegas-Ospina P.A, López-Crespo J.D; Jiménez J. N
14	CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS RESISTENTES A BACTERIÓFAGOS DEL FITOPATÓGENO <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> , AGENTE CAUSAL DE LA PESTE NEGRA DEL NOGAL.	Retamales, J.; Herrera, A.; Blanco, M.F.; Castillo, D.; Bastias, R.
15	ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD DE COLIFAGOS EN EL ESTERO "EL SALADO" DE GUAYAQUIL COMO UNA ALTERNATIVA PARA EL CONTROL DE <i>Escherichia coli</i>	Toaquiza M. B., Maldonado-Alvarado P., Quito-Avila D., Montiel, M.
16	EXPLORACIÓN DE LA INTERACCIÓN TRIPARTITA ENTRE BACTERIÓFAGOS, <i>CUTIBACTERIUM ACNES</i> Y CÉLULAS DE LA PIEL	Farfán, J.C., Camacho, L.T., Vives, M.J.
17	ESTUDIO DE LA MAQUINARIA DE RECONOCIMIENTO DEL HOSPEDADOR EN EL FAGO J1 DE <i>LACTOBACILLUS CASEI</i>	Gradaschi, Victoria; Dieterle, Maria Eugenia; Gamarra, Marcelo Daniel; Modenutti, Carlos Pablo; Piuri, Mariana.
18	EFEECTO DEL TRATAMIENTO CON BACTERIÓFAGOS CONTRA <i>SALMONELLA INFANTIS</i> EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA PRODUCIDA POR EL HOSPEDERO Y EN LA MICROBIOTA INTESTINAL DEL POLLO BROILER	Álvarez, D.; Barrón-Montenegro, R.; Moreno-Switt, A..

19	USO DE CÓCTEL DE BACTERIÓFAGOS PARA EL CONTROL DE SALMONELLA TYPHIMURIUM EN CARNE DE POLLO.	García, V.; Aguilera, M.; Martínez, S.
20	DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFAGOS SOMÁTICOS EN EFLUENTES DE TAMBOS	DUALDE, Melany, JUÁREZ, Ana Elisa, LUCCHESI, Paula Maria Alejandra, KRÜGER, Alejandra
21	TÍTULO DEL PROYECTO: DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA INNOVADORA PARA COLOMBIA BASADA EN BACTERIÓFAGOS PARA EL MANEJO DE BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS Y BIOPELÍCULAS EN SALUD HUMANA Y AMBIENTAL	Salazar-Ospina, L.; Téllez-Carrasquilla S, Vanegas J.M; Roncancio A.G; Franco L; Hoyos J; Pino N.J; Jiménez J. N
22	APLICACIÓN DE BACTERIÓFAGOS EN LA REDUCCIÓN DE LA CARGA BACTERIANA POR Salmonella EN MUESTRAS DE TOMATE	Zumaeta, K.; Guillen, A.; Talledo, M.
23	AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DEL ENTEROBACTER PHAGE VB_EcRAM-01 ESPECÍFICO CONTRA EL COMPLEJO Enterobacter cloacae.	Victoria-Blanco, E.E., Querol-Audi, J., González-Gómez, J.P., Martínez, A.A., González, C., Castro del Campo, N., Chaidez-Quiroz, C., Gómez, L., Quiroz, E., Martínez-Torres, A.O.
24	PROFAGOS EN PSEUDOMONAS AERUGINOSA PRESENTAN PARALOGOS DE PROTEINAS REGULATORIAS DEL HOSPEDADOR: EL CASO DE LAS PROTEINAS DE UNION A ARN DE LA FAMILIA CSR-RSM.	Sobrero, P.M.; Weinsinger Calvo, M.; Ormazábal, A.; Palma, J.; Pierdominici-Sottile, G.; Valverde, C.
25	INACTIVACIÓN DE BACTERIOFAGOS MEDIANTE UV PARA LA POSTERIOR EVALUACIÓN DE ENZIMAS FÁGICAS	JUÁREZ, A. E.; KRÜGER, A.; RODRIGUEZ, V. A.; D'ANGELO, C.; POMARICO J. A.; LUCCHESI, P. M. A.
26	ROL DEL PROFAGO DE LA CEPA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA ID4365 EN LOS COLAPSOS POBLACIONALES DEBIDO A EXPLOTACIÓN DE EXOPROTEASAS DE SU HUÉSPED	Huelgas, D.; Cázarez, D.; García, R.
27	PATRONES TEMPORALES DEL VIRIOPLANCTON EN UNA LAGUNA PAMPEANA	Quiroga, M.V.; Malits, A.; Unrein F.
28	BACTERIOFAGOS AISLADOS DE LACTOSUERO: RESISTENCIA A TRATAMIENTOS DE SANITIZACIÓN	Briggiler Marcó M.; Guglielmotti D.; Oliver G.; Quiberoni A.; Suárez V.
29	FAGOS DE Streptococcus thermophilus AISLADOS DE YOGUR: VIRULENCIA, DIVERSIDAD GENÉTICA Y RESISTENCIA TÉRMICA	Marangon A.M.; Quiberoni A.; Guglielmotti D.
30	CONSTRUCCIÓN DE UN NUEVO MICOBACTERIÓFAGO REPORTERO LUMINISCENTE NANOLUC Y SU USO PARA LA EVALUACIÓN EXTRACELULAR IN VITRO DE DROGAS ANTITUBERCULOSAS	Ronconi, M.L.; Spatola Rossi, C.; Urdániz E. ; Durán, F.J.; Piuri, M.
31	AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS A PARTIR DE MUESTRAS DE CARNE PICADA PARA BIOCONTROL DE Escherichia coli PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA	RODRÍGUEZ, V.A.; KRÜGER, A.; LUCCHESI, P.M. A.
32	UTILIDAD DE FLUOMICOBACTERIOFAGOS PARA EL DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS GANGLIONAR EN PACIENTE HIV BAJO TRATAMIENTO ANTIFIMICO: REPORTE DE UN CASO.	Seijo AP, Matteo, Vázquez M, Costa N, Palmero JD, Piuri M.
33	USO DE FLUOMICOBACTERIOFAGOS PARA EL DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS EN MUESTRAS RESPIRATORIAS. COMPARACION ENTRE METODOS FENOTIPICOS.	Seijo AP, Matteo, Vázquez M, Costa N, Palmero JD, Piuri M.
34	ACTIVIDAD DESINFECTANTE DE BACTERIÓFAGOS EN SUPERFICIES DE HUEVOS	Ortiz, X.; Barrios, H.
35	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL CONTENIDO DE PROFAGOS PRESENTES EN CEPAS DE Streptococcus agalactiae RECUPERADAS DE UN ESTUDIO MULTICÉNTRICO DE ARGENTINA y COMPARACIÓN EN UN CONTEXTO GLOBAL	Verónica Kovacec, Mario Pajón, Tomás Poklepovich, Josefina Campos, Uzma Basit Khan, Dorota Jamroz, Stephen Bentley, Marta Mollerach, Sabrina Di Gregorio, Laura Bonofiglio.
36	RECUPERACIÓN VIRAL A PARTIR DE HORTALIZAS DE HOJA	Maidana-Kulesza, MN; Ontiveros, FB; Rajal, VB; Poma, HR.

37	CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE BACTERIÓFAGOS AISLADOS A PARTIR DE AGUAS RESIDUALES PROVENIENTES DE LA PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA DE LA CIUDAD DE PANAMÁ	Montalvo-Juárez M.A., Ramírez A., Hall G., González-Gómez J.P., Mejía F., Cornejo H., Querol Audi J., Castro N., Chaidez C, Martínez-Torres A.O..
38	EVALUACIÓN DE CÓCTEL DE BACTERIÓFAGOS CONTRA SALMONELLA INFANTIS MULTIRRESISTE A LOS ANTIBIÓTICOS	Barrón-Montenegro Rocío, Álvarez-Espejo Diana, Fredes-Garcia Diego, Martínez Cristóbal, Rivera Dácil, Dueñas Fernando, Moreno-Switt Andrea.
39	BACTERIOFAGOS CON EL POTENCIAL DE INACTIVAR ESCHERICHIA COLI EN MEDICINA VETERINARIA	Silva, B. G. B.; Silva, E. C.; Vila, M. M. D. C.; Fiol, F. S. D. ; e Balcão, V. M

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ACTIVIDAD DE LYSA DEL BACTERIÓFAGO TM4

Payaslian, F.(1,2); Urdániz, E.(1,2); Mariano, M.(1,2); Piuri, M.(1,2)

1. Departamento de Química Biológica, Universidad de Buenos Aires

2. IQUIBICEN, CONICET

TM4 es un bacteriófago que infecta micobacterias, incluidas *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*, entre otras. En su genoma, se identificó el casete que codifica para la maquinaria lítica de dicho fago, compuesta por las proteínas LysA, LysB y holina, codificadas putativamente por los loci gp29, gp30 y gp31, respectivamente

A través del análisis bioinformático pudimos establecer que LysA consta de 3 módulos; un dominio C-terminal que probablemente se une a la pared celular, un dominio central con gran similitud con una amidasa-2 y un dominio N-terminal propuesto para codificar una peptidasa.

El sitio catalítico del dominio amidasa se compone de tres residuos que coordinan un catión Zn - His226, His335 y Asp347 – y Glu290, residuo encargado de coordinar una molécula de agua.

Para poder evaluar el rol de cada uno de estos aminoácidos en la actividad de la proteína, se construyeron cuatro derivados de la proteína que contenían las siguientes mutaciones en cada uno de estos residuos clave: H226S, H335S, D347N y E290Q.

Las fracciones purificadas de LysA se incubaron con MDP, una molécula sintética que emula los enlaces del peptidoglicano. Los productos de la reacción se analizaron por HPLC-MS y se detectaron ácido N-acetil-murámico y dipéptido L-Ala-D-isoGlutamina, lo que confirma que LysA tiene una actividad amidasa, como se predijo *in silico*.

También evaluamos la capacidad de LysA para lisar *E. coli* o *M. smegmatis* desde adentro, monitoreando la densidad óptica de cultivos transformados con un plásmido que expresa LysA WT o cada una de las mutantes. Hubo una disminución significativa en la densidad óptica de los cultivos que expresaban la versión LysA WT pero no se observó lisis en ninguno de los mutantes. Estos resultados indican que los cuatro residuos previstos son esenciales para la función de la proteína *in vitro* tanto cuando se expresan en un huésped homólogo o heterólogo.

Por medio de la técnica de BRED generamos fagos derivados de TM4 que portaban las mutaciones E290Q o H266S. Curiosamente, no se encontraron diferencias en la eficiencia de la siembra entre las versiones mutadas del fago y el WT. Esto podría indicar que estas mutaciones no son suficientes para anular la lisis *in vivo* o que un gen crítico de endolisina está codificado en el genoma de TM4.

FAGECAPSULES, FORMULACIÓN DE SALMONELLA-FAGO CON LIBERACIÓN INTESTINAL DIRIGIDA, PARA EL CONTROL DE SALMONELLA INFANTIS EN AVES.

Rivera D.(1); Fernando D.(1); Camila A.(1); González D.(1); Adell A.(1); Moreno-Switt A.(2)

1. Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Andres Bello, Santiago, Chile.
2. Laboratorio de Inocuidad Alimentaria, Escuela Medicina Veterinaria, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago.

Introducción: *Salmonella* representa un problema importante para la producción avícola y la salud humana. Principalmente explicado por el consumo de carne de pollo contaminada con *Salmonella* Infantis (*S. Infantis*). Por ello, los bacteriófagos (fagos) aparecen como una alternativa para el biocontrol de *Salmonella*. Y para garantizar su efectividad, idealmente, deben ser administrados en cóctel y ser protegidos de la acción enzimática, cambios de pH, movimientos gástricos, los cuales podrían afectar su concentración y viabilidad.

Objetivo: Microencapsular un cóctel de 3 fagos líticos y específicos contra *S. Infantis*, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, para asegurar su liberación en intestino de pollos.

Métodos: Fueron seleccionados 3 fagos con amplio rango hospedero y específicos para lisar *S. Infantis*, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*. Posteriormente se probaron diferentes formulaciones microencapsuladas con liberación intestinal. Y se seleccionó como formulación más exitosa liposomas de lecitina-colesterol recubiertos con alginato= L/A, para ser aplicada en 3 grupos de pollos de engorde: A_B_C, mantenidos en una unidad de producción, con normas de bioseguridad, durante 46 días. Todos los grupos fueron inoculados por vía oral (con 1 mL de 10^7 UFC/mL de *S. enterica*) a los 40 días de producción. Posteriormente, entre los 40-45 días, se aplicaron las formulaciones (1 mL: 10^{10} UFC/cóctel) en el Grupo(A): fago microencapsulado; mientras que en el Grupo(B), fueron aplicados fagos no encapsulados siguiendo la misma metodología. Y el Grupo(C) control, fue inoculado con 1 mL de tampón SM. Los grupos se mantuvieron separados hasta terminar el ensayo.

Resultados: La formulación FageCapsuleS, estaba compuesta por 3 fagos de diferentes morfotipos: Siphoviral ($N^{\circ}=2$) y Mioviral ($N^{\circ}=1$), no transductores de genes de resistencia, con amplio rango de hospederos, escalabilidad satisfactoria y sin efecto antagónico.

La formulación seleccionada L/A mostró un 95,36% de encapsulación, una media del 66% de liberación *in vitro* a los 60 minutos y una eficacia *in vitro* del 68-95% en la reducción de *S. Infantis*. Esta formulación en el Grupo A mostró una reducción de 1,8 Log₁₀ de *S. Infantis*, en comparación con el Grupo B ($\leq 0,05$). Y también se observó una reducción de *S. Infantis* ($\leq 0,05$), entre el grupo experimental y el grupo C.

Conclusión: Este trabajo aporta antecedentes para mejorar la protección y liberación de fagos, y así maximizar su acción para el control de SE, en lugares de mayor frecuencia de colonización, como el intestino delgado y grueso de aves.

Fuentes de financiamiento y agradecimientos: FONDEF IDEA I+DID18I10235 FageCapsuleS. También agradecemos a la Asociación de Exportadores de Carnes de Chile A.G., ChileCarne.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE FAGOS LÍTICOS DE BACTERIAS UROPATÓGENAS MULTIRRESISTENTES Y FORMADORAS DE BIOFILMS

Gutiérrez, M.V.(1) ; Echeverría, N.(1)

1. Laboratorio de Virología Molecular del Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Las enfermedades del tracto urinario (UTIs) son algunas de las infecciones más comunes en humanos, y constituyen una gran preocupación para los sistemas de salud pública en todo el mundo. En los últimos años, el nivel de resistencia a drogas aumentó drásticamente, lo que dificulta la elección de un tratamiento eficaz. Esta dificultad se debe al surgimiento de patógenos multirresistentes (resistentes a múltiples drogas – MDR), así como por la capacidad de algunos de ellos de formar biofilms. La pérdida de efectividad de los antibióticos hace necesaria la búsqueda de tratamientos alternativos, como el uso de bacteriófagos (fagos). Éstos son virus que infectan bacterias vía dos tipos de ciclos: lítico o lisogénico. Los fagos líticos son potencialmente útiles en terapia fágica. Considerando que hasta la fecha no existen estudios en Uruguay que aborden esta alternativa, el objetivo de este trabajo es la búsqueda, el aislamiento y la caracterización *in vitro* de fagos líticos con actividad frente a diferentes bacterias uropatogénicas aisladas en nuestro país y que presenten un perfil MDR o la capacidad de formar biofilms, como un abordaje inicial para identificar potenciales agentes bioterapéuticos. Una vez aislados y purificados, se caracterizará el rango de huésped, su estabilidad térmica y a diferentes pHs. De ser oportuno, también se podrían realizar estudios para evaluar el potencial sinérgico de un tratamiento con fagos y antibióticos. El mayor impacto de este trabajo se dará en torno al avance del conocimiento básico sobre los fagos existentes en nuestro entorno y que tienen actividad bactericida contra patógenos humanos. A su vez, se espera que este trabajo represente el inicio de estudios que en el futuro puedan contribuir con estrategias antimicrobianas alternativas en Uruguay.

Palabras claves: bacteriófagos, multirresistencia, biofilms

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN BACTERIÓFAGO LÍTICO CON POTENCIAL TERAPÉUTICO EN INFECCIONES POR *KLEBSIELLA* SP. MULTIDROGORRESISTENTE

Sáchenka Tordoya Pascual (1)

1. Laboratorio de Bacteriófagos. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú

La resistencia a los antimicrobianos representa una problemática que ha ido en aumento a través de los años, puesto que genera altos grados de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Por ello, el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias multidrogorresistentes se ha convertido en un verdadero reto debido al fracaso terapéutico que existe gracias a la aparición de estas superbacterias, las cuales se encuentran catalogadas dentro de lo que se conoce como grupo ESKAPE. Bajo este contexto, los bacteriófagos se postulan como una de las alternativas más prometedoras en la lucha contra la resistencia microbiana en una época en la que los antibióticos han perdido eficacia.

Por tal motivo, el objetivo del presente proyecto de investigación es evaluar el potencial de los bacteriófagos como agentes terapéuticos contra infecciones causadas por cepas multidrogorresistentes de *Klebsiella* sp.

Para tal fin, se obtuvieron 10 cepas de *Klebsiella* sp. de origen clínico y se evaluó el perfil de susceptibilidad antimicrobiana que presentaban frente a diferentes familias de antibióticos, eligiéndose aquellas cepas que presentaran el perfil más resistente.

Para el aislamiento del bacteriófago se recolectaron dos litros de agua proveniente del río Rímac y con una bomba de vacío se filtraron 200 ml del agua recolectada para eliminar los residuos orgánicos. Acto seguido, se enfrentaron las cepas A3721, K8460 y K9862 con el filtrado de agua de río, dejándose incubar a 37°C durante 24 horas.

Posteriormente, el caldo de enfrentamiento correspondiente a cada una de las cepas, se centrifugó a 4400 rpm por 20 minutos a 4°C y se procedió a filtrar haciendo uso de filtros de membrana de 0.22 µm. A continuación, se llevó a cabo un "spot test" para revelar la presencia de bacteriófagos, obteniéndose un resultado positivo para el filtrado proveniente de la cepa K8460. A partir de este filtrado, se realizó la purificación del bacteriófago haciendo uso de la técnica de la bicapa de agar, proceso que consistió en realizar diluciones seriadas del filtrado para luego enfrentar al fago con la cepa hospedera en un tubo estéril, al cual se le agregó agar BHI al 75% y el contenido fue vertido en una placa Petri que contenía una fina capa de agar BHI al 100%, dejándose incubar a 37°C por 24 horas. Luego, se tomó una placa de lisis y se transfirió a un tubo de microcentrifuga con solución salina, se agitó en vortex durante 10 minutos y se centrifugó a 4400 rpm durante 20 minutos a 4°C para proceder a filtrar.

Este procedimiento se repitió cuatro veces para asegurar la pureza del bacteriófago que fue denominado ØMT84601 y el filtrado obtenido se almacenó a 4°C para la posterior caracterización del bacteriófago.

De esta forma, el presente proyecto busca fomentar el estudio y uso de bacteriófagos en el campo de la salud como una alternativa en el tratamiento de enfermedades, así como también busca explotar el potencial de estos virus en el campo de la biotecnología.

CONSTANTES DE INACTIVACIÓN DE FAGOS DE BACTERIAS LÁCTICAS UTILIZANDO PINTURAS FOTOCATALÍTICAS

Jacob, M.F. (1); Quiberoni, A. (1); Ballari, M.M (2); Briggiler Marcó, M. (1)

1. Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL -CONICET), Santa Fe, Argentina.
2. Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC, UNL - CONICET), Santa Fe, Argentina. mbriggs@fiq.unl.edu.ar

Las infecciones fágicas sobre bacterias lácticas (BAL) y probióticas usadas en la industria láctea fermentativa constituyen una de las principales causas de fallas en la acidificación de los cultivos y/o desempeño de su rol benéfico para la salud, derivando en severas consecuencias tecnológicas y comerciales. La presencia de fagos en estos ambientes de elaboración no puede evitarse debido a su ingreso a través de la leche cruda e ingredientes y permanencia de los mismos en bioaerosoles. Es así que el objetivo de este trabajo fue investigar estrategias de inactivación para 16 fagos de BAL utilizando pinturas fotocatalíticas irradiadas con luz visible. Las suspensiones fágicas fueron diluidas en agua destilada estéril (1:10, alcanzando 10^5 - 10^7 Unidades Formadoras de Placas, UFP/mL), depositadas y secadas sobre placas de vidrio borosilicato recubiertas con pintura fotocatalítica (formuladas con TiO_2 anatasa dopado con carbono, 18 % p/p) que presenta actividad fotocatalítica en el espectro UV-Visible ($\lambda = 360$ a 720 nm). Posteriormente, las placas fueron colocadas dentro de un reactor e irradiadas durante un tiempo total de 20 h, tomando muestras a intervalos establecidos y cuantificando los fagos mediante el método de la doble capa agarizada. De acuerdo a una cinética de inactivación de primer orden, se realizó una regresión exponencial de los resultados obtenidos (UFP/mL vs. tiempo) y se calculó la constante de inactivación total (k_T) que combina una constante de inactivación fotocatalítica, k_{PH} , y una de inactivación no fotocatalítica, k_{NPH} (esta última determinada realizando ensayos únicamente en presencia de luz pero sin pintura). Los ensayos se realizaron a humedad y temperatura constantes (80%, 30°C). Según los resultados obtenidos, 8 de los fagos ensayados se inactivaron completamente en tiempos relativamente cortos (entre 1 y 4 horas de tratamiento, con reducciones de 2,3- 5,1 órdenes log). Para los fagos restantes se logró una inactivación parcial, con tiempos y reducciones logarítmicas variables dependiendo del fago. Las constantes de inactivación total variaron entre 0,30 y 7,52 h^{-1} , los valores de k_{PH} entre 0,05 y 6,79 h^{-1} y los de k_{NPH} entre 0 y 1,95 h^{-1} . Se demostró que las pinturas fotocatalíticas son efectivas en tiempos relativamente cortos para la inactivación de fagos de BAL, encontrando un comportamiento variable dependiendo el fago. En particular, algunos fagos mostraron elevada inactivación fotoquímica (sólo en presencia de radiación) siendo baja la inactivación fotocatalítica (radiación + pintura). La aplicación de estas pinturas sobre diversas superficies y paredes en los ambientes de producción y utilizando el propio sistema de iluminación de la planta contribuiría significativamente con la reducción de la carga viral de los bioaerosoles limitando la posibilidad de diseminación de los viriones por los ambientes de las plantas industriales y disminuyendo de esta manera el riesgo de ataques fágicos y sus consecuencias.

ΦK14, UN BACTERIÓFAGO AISLADO DE AGUAS SERVIDAS Y ESPECÍFICO DE *Vibrio cholerae*

Talledo, M.(1); Suárez, K. (1); Zumaeta, K(1).

1. Laboratorio de Bacteriófagos, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Los vibriones son microorganismos bastante comunes en ambientes marinos y estuarinos. Asimismo, es posible encontrarlos en aguas servidas. Un número de ellos puede ser patógeno para los humanos y también para organismos marinos. Las infecciones por *Vibrio* aumentan en muchos constituyendo una amenaza para la salud pública y también para actividades como la acuicultura. Sumado a ello, hay que considerar el creciente número de casos de resistencia a antibióticos en las especies de esta bacteria, por lo que se deben considerar alternativas de lucha contra este agente, como es el uso de bacteriófagos líticos. Por ello, la caracterización de estos virus es crucial.

El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar un bacteriófago con actividad lítica y específico para *Vibrio cholerae*.

Se tomaron muestras de aguas residuales procedentes de la planta de tratamiento de aguas La Taboada, en el Callao, Perú. Se procedió al enriquecimiento de muestras en agua peptonada alcalina a pH 8,6 y luego al aislamiento de *Vibrio cholerae* en medio TCBS. Para el aislamiento y purificación del bacteriófago ΦK14 se realizaron las pruebas de enfrentamiento en caldo, goteo, propagación y titulación. La caracterización microbiológica de ΦK14 incluyó la evaluación del rango de hospedero, la multiplicidad de infección óptima, la curva de un paso y la microscopía electrónica. La caracterización fisicoquímica determinó la estabilidad del virus a diferentes condiciones del entorno (temperatura, pH y sensibilidad al cloroformo).

ΦK14 es altamente específico, infectando solo a cepas de *Vibrio cholerae*, de un total de 14 especies ensayadas. Presenta una multiplicidad de infección (MOI) óptima de 0.001. Al análisis de la curva de crecimiento de un paso, presenta un período latente de 15 minutos, exhibiendo un tamaño de explosión de 50 UFP/célula infectada. La estabilidad térmica de esta partícula viral se mantuvo a 40 °C, 50 °C y 60 °C, decayendo a temperaturas de 70 °C y 80 °C. Los ensayos realizados no mostraron sensibilidad al cloroformo. El virus pierde estabilidad a pH 3 y se mantiene intacto de pH 7 a pH 9, siendo su punto más estable a pH 8. La microscopía electrónica indica que ΦK14 pertenece a la familia Myoviridae, presentando una cabeza isométrica de 90 nm de altura por 70 de ancho, un cuello y una cola contráctil de 80 nm, una placa base clara y fibras ligeramente visibles.

En conclusión, este estudio demostró que las aguas residuales de una planta de tratamiento de agua son una buena fuente de bacteriófagos infecciosos para *Vibrio cholerae*, presentando características compatibles con un virus de perfil útil en aplicaciones diversas contra el patógeno colérico.

ACTIVIDAD DE LOS FAGOS EN EL AMBIENTE DE LA MICROBIOTA INTESTINAL: EN BUSCA DE BIOMARCADORES DE UTILIDAD CLÍNICA PARA LA ENFERMEDAD POR HÍGADO GRASO ASOCIADO A DISFUNCIÓN METABÓLICA (MAFLD)

Mascardi, M.F.(1,2); Suárez, B.(1,2); Mazzini, F.N.(1); Ruda, V.M.(3); Marciano, S.(4); Casciato, P.(2,4); Narváez, A.(4); Haddad, L.(4); Anders, M.(5); Orozco, F.(5); Tamaroff, A.J. (6); Cook, F.(7); Gounarides, J.(7); Gutt, S.(6); Gadano, A.(4); Méndez García, C.(8); Marro, M.L.(9); Penas Steinhardt, A.(2,10);Trinks, J.(1,2)

1. Instituto de Medicina Traslacional e Ingeniería Biomédica (IMTIB), CONICET-Instituto Universitario del Hospital Italiano-Hospital Italiano de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
2. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
3. Biotherapeutic and Analytical Technologies, Novartis Institutes for Biomedical Research, Cambridge, MA, United States of America.
4. Servicio de Hepatología, Hospital Italiano de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
5. Servicio de Hepatología, Hospital Alemán. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
6. Servicio de Nutrición, Hospital Italiano de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
7. Analytical Sciences & Imaging Department, Novartis Institutes for Biomedical Research, Cambridge, MA, United States of America.
8. Chemical Biology & Therapeutics Department, Novartis Institutes for Biomedical Research, Cambridge, MA, United States of America.
9. Cardiovascular and Metabolic Disease Area, Novartis Institutes for Biomedical Research, Cambridge, MA, United States of America.
10. Universidad Nacional de Luján, Departamento de Ciencias Básicas, Laboratorio de Genómica Computacional, Luján, Buenos Aires, Argentina.

El microbioma intestinal es una reconocida fuente de biomarcadores no invasivos para el diagnóstico y pronóstico de la MAFLD, pero son escasos los estudios sobre el aporte de los fagos en dicha búsqueda. Nuestro objetivo fue identificar potenciales biomarcadores del transcriptoma fágico asociados con la MAFLD.

Se obtuvieron muestras de materia fecal y sangre de 19 voluntarios sanos (VS) y 33 pacientes con MAFLD [12 con esteatosis (ES) y 21 con esteatohepatitis (EH)]. Se genotipificó el SNP rs738409 del gen humano PNPLA3 (PNPLA3-SNP), cuyo genotipo GG está asociado a mayor riesgo de MAFLD. Se extrajo el ARN de la muestra de materia fecal y se secuenció. Se usó DESeq2-v4.1 para identificar genes de fagos diferencialmente expresados (DEGs) según el estatus clínico (MAFLD vs VS), el estadio de MAFLD (EH vs ES) y el PNPLA3-SNP (GG vs GC/CC). Estos DEGs fágicos se agruparon de acuerdo a la taxonomía viral y a las familias y filos bacterianos comúnmente infectados. También, se analizó el enriquecimiento ontológico-funcional de los DEGs. Se construyeron redes de correlación ponderada de los transcriptomas bacteriano, humano y fágico con Hmisc-v4.7-0, igraph-v1.2.7 y Cytoscape. Se calcularon *scores* de centralidad para inferir la relevancia regulatoria de cada nodo en la red.

Dentro del transcriptoma viral, la proporción de genes expresados correspondientes a fagos fue mayor en MAFLD (39%) y EH (41%) al comparar con VS (17%; $p < 1E-5$) y ES (17,3%; $p < 1E-5$), respectivamente. La expresión de la familia *Microviridae* fue mayor en MAFLD, EH y PNPLA3-GG (FDR < 0,01). La actividad de la familia *Autographiviridae* fue menor en MAFLD (FDR < 0,01), y la expresión de las familias *Myoviridae*, *Podoviridae* y *Siphoviridae* fue menor en PNPLA3-GG (FDR < 0,01).

Los procesos biológicos asociados al ciclo de replicación de los fagos y señalización de receptores símil-Toll se encontraron fuertemente enriquecidos en MAFLD al comparar con HV. En cambio, los mismos estaban subrepresentados en EH y PNPLA3-GG al comparar con ES y PNPLA3-GC/CC, respectivamente.

En los pacientes con EH, la expresión de fagos que infectan bacterias de las familias *Oscillospiraceae* ($q = 1,65E-3$), *Bacteroidaceae* ($q = 2,45E-3$), *Tannerellaceae* ($q = 5,33E-3$), *Lactobacillaceae* ($q = 8,96E-3$) y *Streptococcaceae* ($q = 0,82E-3$), y de los filos Firmicutes ($q = 1,83E-4$) y Bacteroidetes ($q = 1,44E-3$) fue significativamente menor respecto a ES.

Las correlaciones inter-reino más fuertes en la red de MAFLD se observaron entre transcriptos del fago *Mushuy Desulfobacteraceae bacterium*, mientras que el coeficiente de correlación más alto en la red de EH se observó entre transcriptos del fago de *Shigella* SflV y *Roseburia intestinalis*. En ambas redes, los transcriptos del fago *Mushu* presentaron los scores de centralidad más altos.

En conclusión, se identificaron firmas moleculares derivadas de las interacciones de fagos y bacterias del microbioma intestinal que podrían utilizarse como biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de la MAFLD.

**LOS SISTEMAS DE RESTRICCIÓN MODIFICACIÓN SON LOS COMPONENTES
PRINCIPALES DE LAS DEFENSAS ANTIVIRALES DE *BIZIONIA ARGENTINENSIS* JUB59,
UNA BACTERIA ANTÁRTICA MARINA SUPERFICIAL**

Nicolas Napolitano (1,4), Cecilia Quiroga (2), Walter Patricio Mac Cormack (1,4), José Luis López (1)

1. IBAVIM, UBA, Argentina
2. IMPaM-CONICET-UBA, Argentina
3. NANOBIOTEC, CONICET- UBA, Argentina
4. Instituto Antártico Argentino (IAA), Argentina.

Introducción. Las bacterias ambientales antárticas, escasamente exploradas en su contenido de profagos y sistemas de defensa, podrían mostrar un nuevo espectro genético de virus y defensas. Nuestro trabajo estudia la coevolución virus-hospedador de *Bizionia argentinensis* JUB59, una bacteria psicotolerante aislada de las aguas superficiales marinas de caleta Potter, Antártida y un profago que la parasita. *B. argentinensis* JUB59 fue aislada y secuenciada íntegramente en Argentina como parte del proyecto Genoma Blanco, un proyecto interinstitucional público-privado (DNA-IAA y otras). Como parte de aquel proyecto se expresaron y caracterizaron estructuralmente diferentes proteínas de función desconocida. Dentro de ellas se caracterizó la estructura cristalina de una proteína denominada C24, una proteína estructural y genéticamente homóloga a la fibra de la cola de un fago. Posteriormente se pudo demostrar que efectivamente dicha C24 era una proteína estructural de un profago inducible con Mitomicina C.

Objetivos. Nuestra hipótesis de trabajo fue, si existe un profago inducible en *B. argentinensis* JUB59, la bacteria debería tener un sistema de defensa contra las infecciones. Teniendo en cuenta esto, nuestra pregunta objetivo fue ¿Qué tipos de sistema de defensa antiviral posee *B. argentinensis* JUB59?

Materiales y métodos. Para el análisis *in silico* de los sistemas de defensa antiviral presentes en el genoma de *B. argentinensis* JUB59 se utilizaron los programas bioinformáticos PADLOC (<https://padloc.otago.ac.nz/padloc/submit/>) y DefenseFinder (<https://defensefinder.mdmparis-lab.com/>). Los genes identificados fueron seleccionados con E values $< 10^{-4}$ y porcentajes de cobertura >60 %.

Resultados. El análisis *in silico* de los sistemas de defensa antiviral presentes en el genoma de *B. argentinensis* JUB59, con ambos programas, reveló la presencia de un sistema Pycsar en el contig 2 (acceso AFXZ01000002), un sistema RM tipo I en el contig 22 (acceso AFXZ01000020), sistema RM tipo II en el contig 32 (acceso AFXZ01000027) y un retrón tipo III en el contig 71 (acceso AFXZ01000051). Por su parte, el programa DefenseFinder también encontró un sistema RM tipo II en el contig 20 (acceso AFXZ01000018) y un sistema RM tipo IIG en el contig 29 (acceso AFXZ01000025). Ninguno de los programas identificó genes pertenecientes al sistema CRISPR Cas. El rango de los E value de las identificaciones estuvo comprendido entre $4,8^{-13}$ y $6,9^{-166}$. El porcentaje de cobertura fue de 78,1 - 99,9 %.

Conclusiones. La dispersión de los sistemas de defensa identificados en diferentes contigos del genoma sugiere que los mismos no estarían estructurados en forma de islas. La inexistencia de sistema CRISPR Cas es congruente con lo previamente descrito; independientemente de la existencia de un profago, *Bizionia argentinensis* JUB59 no posee dicho sistema. No obstante, la existencia de diversos sistemas de restricción y modificación le podrían proporcionar una defensa antiviral adecuada.

MÚLTIPLES SISTEMAS DE DEFENSA ANTIVIRAL COMPONEN EL ARSENAL DEFENSIVO DE *RHODOCOCCUS* SP. CEPA ADH, UNA BACTERIA ANTÁRTICA DEGRADADORA DE HIDROCARBUROS

Nicolas Napolitano (1,4), Cecilia Quiroga (2), Walter Patricio Mac Cormack (1,4), José Luis López (1)

1. IBAVIM, UBA, Argentina
2. IMPaM-CONICET-UBA, Argentina
3. NANOBIOTEC, CONICET- UBA, Argentina
4. Instituto Antártico Argentino (IAA), Argentina.

Este trabajo estudia la coevolución virus-hospedador de *Rhodococcus* sp. cepa ADH y un profago que la parasita. *Rhodococcus* sp. cepa ADH es una bacteria psicotolerante, aislada de suelo antártico contaminado con hidrocarburos en la base Carlini, Antártida. Esta cepa es degradadora de hidrocarburos. El análisis *in silico* de *Rhodococcus* sp. cepa ADH, utilizando ACLAME Prophinder, reveló la existencia de un profago en el contig 10 (accesión LJIS01000120.1). Además, se detectó un sistema CRISPR-Cas de tipo IVB, utilizando CRISPRCas Typer en el contig 38 (acceso, LJIS01000092.1).

Dado que la función biológica de CRISPR Cas tipo IV-B es controversial la hipótesis de trabajo fue, si existe un profago en *Rhodococcus* sp. cepa ADH, la bacteria debe tener un sistema adicional de defensa contra las infecciones virales. Entonces, ¿qué tipos de sistema de defensa antiviral posee *Rhodococcus* sp. cepa ADH?

Para el análisis *in silico* de los sistemas de defensa antiviral presentes en el genoma *Rhodococcus* sp. cepa ADH se utilizaron los programas bioinformáticos en línea PADLOC y Defense Finder. Los genes identificados fueron seleccionados con E values $< 10^{-4}$. y porcentajes de cobertura $>60\%$.

Los dos programas identificaron genes asociados con sistemas de defensa antiviral en el genoma de la cepa ADH. Además del sistema CRISPRCas Tipo IV-B, ambos programas detectaron un sistema Hachiman tipo I en el mismo contig; también ambos programas detectaron un sistema Wadjet en el contig 20 (acceso LJIS01000110.1). Adicionalmente, solo el programa Defense Finder también identificó un sistema Rosmer en el contig 51 (acceso LJIS01000079.1), un sistema AbiEii en el contig 46 (acceso LJIS01000084.1), un sistema RM tipo III en el contig 31 (acceso AFXZ01000099) y un sistema DISARM en el contig 10 (accesión LJIS01000120.1). Por otro lado, el programa PADLOC identificó un retrón en el contig 24 (acceso AFXZ01000106.1), un sistema dGTPasa en el contig 14 (acceso AFXZ01000116.1), un sistema RM Tipo IIG en el contig 10 (accesión LJIS01000120.1) y un sistema RM tipo II en el contig 2 (acceso AFXZ01000128). El rango de los E value de las identificaciones estuvo comprendido entre $3,6^{-11}$ y $2,7^{-247}$. El porcentaje de cobertura fue de 62 - 99,1 %.

Existen múltiples tipos de sistemas de defensa en el genoma de la cepa ADH, sumados al CRISPRCas Tipo IV-B. La co-localización de CRISPR Cas IV-B en el mismo contig con Hachiman tipo 1 sugiere la existencia de una isla de defensa. Notoriamente, el sistema RM Tipo IIG del contig 10 colocaliza con el profago previamente descrito. Este hecho sugiere que los fagos efectivamente son vehículo de los propios sistemas de defensa. En el mismo contig 10, a su vez, se localiza un sistema DISARM. Finalmente, los resultados muestran islas de defensa antiviral en ADH que le permiten evolucionar frente a infecciones por fagos en el ambiente polucionado por hidrocarburos del que fue aislada.

CARACTERIZACIÓN BACTERIÓFAGOS RECUPERADOS A PARTIR DE AGUAS RESIDUALES CONTRA CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae* ST258

Nolivos, K.V(1);Tisalema, E.E(1); Garzón,D.R(2); Reyes, J. A (1,2); Cabezas, F.S(2*)

1. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador (UCE) Quito, Ecuador.
2. Instituto de Microbiología, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales (COCIBA), Universidad San Francisco de Quito (USFQ), Quito, Ecuador.

*Autor correspondiente: sebasytu@hotmail.com

RESUMEN

La creciente y rápida diseminación a nivel mundial de cepas bacterianas multidrogasresistentes (MDR) ha obligado a la comunidad científica a buscar alternativas antimicrobianas económicas y de fácil acceso, como el uso de bacteriófagos o “fagos”. Por tanto, el objetivo de nuestro estudio fue obtener perfiles fenotípicos y genómicos de fagos con capacidad lítica en cepas de *Klebsiella pneumoniae* pertenecientes al Complejo Clonal 258 (CC258), especialmente del linaje ST258, responsables de múltiples brotes hospitalarios. Las muestras se recogieron de distintos puntos de la ciudad de Quito, Ecuador. Se utilizaron técnicas microbiología clásica, secuenciación de última generación (NGS) y análisis bioinformático. Se recuperaron los fagos *Klebsiella_virus_K751*, *Klebsiella_virus_T751* y *Klebsiella_virus_T765* nombrados de acuerdo a la nomenclatura del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV). Dentro de las principales características fenotípicas se incluyó que infectaron a una variedad de enterobacterias, sin embargo, para este estudio se restringió a dos cepas de *Klebsiella pneumoniae* ST258 con la presencia de placas de lisis de 1 a 2 mm de diámetro, se conservaron viables en un rango de pH 3 a 11 y a temperaturas entre -16 a 60°C con una hora de exposición, además presentaron periodos de latencia entre 35-40 minutos, tamaño de explosión de 6 a 44 UFP/célula y velocidad de adsorción de orden 10^{-10} mL/min al infectar a una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/uL del hospedador con una MOI aproximada de 0,47. Taxonómicamente fueron clasificados dentro del género *Taipeivirus* (*Caudoviricetes: Caudovirales: Ackermannviridae*), por lo tanto, era previsto que sus genomas presenten un tamaño aproximado de 157 kpb compuestos de alrededor de 200 genes, un contenido promedio de GC 46.4%, la presencia de ARNt, endolisinas y ausencia de genes asociados a ciclo lisogénico. Los fagos recuperados podrían ser objeto de estudios futuros mucho más profundos que aumentarían su valor como alternativas terapéuticas en el tratamiento de infecciones nosocomiales causadas por patógenos MDR especialmente por *K. pneumoniae*ST258.

Palabras claves: *Klebsiellapneumoniae*ST258, *Ackermannviridae*, multirresistencia, bacteriófagos líticos.

EXPRESIÓN DE SIALATO O-ACETIL ESTERASAS CODIFICADAS POR PROFAGOS Stx2a

Pascal, S.B. (1); Lucchesi, P.M.A. (1); Nieto Farías, M.V, (1); Krüger, A (1).

1. Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN, CONICET-CIC-UNCPBA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, Buenos Aires, Argentina.

La producción de toxinas Shiga (Stx), codificada y regulada por bacteriófagos, es el principal factor de virulencia de un grupo de cepas *E. coli* que pueden causar severas enfermedades en el hombre, como colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. Las Stxs comprenden una familia que contiene varios subtipos diferencialmente asociados a manifestaciones clínicas. Las cepas productoras de la toxina Stx2a son altamente virulentas y causan las enfermedades más severas. Los análisis genómicos de los profagos Stx muestran una considerable variabilidad genética y un alto porcentaje de genes con funciones desconocidas. En estudios de profagos Stx2a, se identificó la presencia de un gen que codifica para una sialato O-acetilesterasa. Esta enzima (NanS-p) presenta un dominio catalítico (SASA) homólogo a la esterasa bacteriana de *E. coli* (NanS) con actividad frente a los ácidos siálicos, pero además posee un dominio N-terminal (DUF1737) y otro C-terminal. El gen *nanS-p* se encuentra localizado inmediatamente aguas abajo del operón *stx* y aguas arriba de los genes que median la lisis bacteriana. Esta ubicación sugiere que *nanS-p* está regulado y es cotranscrito con los genes tardíos del fago. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar si la expresión de estas sialato O-acetilesterasas aumenta bajo condiciones que inducen el ciclo lítico de fagos. Se cuantificó la expresión génica relativa de 14 cepas STEC *stx2a*-positivas utilizando la técnica de qPCR. Por medio de análisis bioinformáticos, se diseñaron *primers* que permiten la amplificación de la región DUF-SASA de subtipos de *nanS-p* presentes principalmente en profagos Stx y se utilizaron *primers* descriptos en la bibliografía para la amplificación del gen de referencia *tufA*. Se utilizó ADNc preparado previamente a partir de los cultivos de STEC inducidos (0,5 µg/ml de mitomicina C) y no inducidos, que había sido empleado para determinar la expresión de *stx* y está conservado a -20°C. Las curvas estándares se realizaron con diluciones seriadas de un *pool* de muestras de ADNc. Para cada reacción se utilizó 10 µl de FastStart Universal SYBR Green Master Rox (Roche Diagnostics GmbH) y 4 µl de muestra (ADNc) diluida 1/10. Las reacciones se realizaron en un equipo StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Los resultados se analizaron por el método $\Delta\Delta CT$. Se observó un aumento en la expresión de NanSp bajo tratamiento con mitomicina C, en niveles entre 1 a 2 Log. La excepción fue la cepa 355, la cual previamente tampoco había mostrado expresión de Stx2a. Los resultados obtenidos confirmaron que el gen *nanS-p* se ve expresado tanto en condiciones que inducen el ciclo lítico como en estado basal y que la expresión de este gen aumenta en condiciones que inducen el ciclo lítico. Este aumento ocurre en órdenes de magnitud comparables a *stx2a*, el cual se encuentra aguas arriba de *nanS-p* y está orientado en la misma dirección transcripcional.

ANÁLISIS DE SISTEMAS CRISPR EN CEPAS REGIONALES DE *Streptococcus thermophilus*

Pedrón, L.(1), Pujato, S.A. (1), Quiberoni, A. (1), Mercanti, D.J. (1)

1. Instituto de Lactología Industrial (INLAIN) – (Universidad Nacional del Litoral-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), Santiago del Estero 2829, Santa Fe, Argentina.

Los fagos, virus que infectan bacterias, existen en todo ecosistema donde aquellas se encuentren presentes. La fermentación con bacterias lácticas (BAL) se emplea para mejorar la conservación de la leche, y se realiza industrialmente en la elaboración de productos de consumo masivo (yogur, leches fermentadas y quesos). Por razones de control y estandarización de calidad, fermentos naturales han sido progresivamente reemplazados por cepas seleccionadas en la industria láctea, lo que convirtió a los fagos en la causa más común de fallas en fermentaciones a gran escala. *Streptococcus thermophilus* es la especie de BAL más importante en Argentina, y si bien existe una gran variedad de mecanismos bacterianos de fagorresistencia, los sistemas CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) son por lejos los más relevantes en esta especie, siendo muy bien estudiados a escala global. Sin embargo, no hay datos relevantes relativos a cepas regionales, a pesar del uso tan extensivo de *S. thermophilus* en Argentina. Un locus CRISPR contiene una secuencia líder, y repeticiones (*repeats*) intercaladas con secuencias cortas (*spacers*) provenientes de virus u otro ADN invasor. Los *spacers* incorporados luego de una infección fágica generan moléculas de ARN, que ante la detección de una secuencia específica complementaria de ADN viral forman un complejo con proteínas Cas (*CRISPR associated*) y lo digieren, impidiendo la infección; de este modo, los CRISPR resultan sistemas inmunes procariontes. En el presente trabajo se analizó la presencia de los sistemas CRISPR conocidos y activos en *S. thermophilus* (CRISPR1 y CRISPR3), mediante PCR empleando primers universales (CR1F/CR1R y CR3F/CR3R), en 40 cepas aisladas y/o empleadas en nuestro país. De estas, 21 (53%) poseen el sistema CRISPR1 y 28 (70%) el sistema CRISPR3, de las cuales 13 (33%) poseen ambos sistemas. Solo 4 cepas (10%) no poseen ninguno de los dos sistemas CRISPR. Para todas las cepas positivas, se purificaron los productos de PCR y se secuenciaron (Macrogen, Seúl, Corea). Las secuencias crudas se analizaron y ensamblaron utilizando Staden (v2.0.0b9). La comparación con bases de datos se realizó mediante Nucleotide BLAST. Hasta el momento, se secuenciaron completamente 6 de las 21 cepas positivas para CRISPR1 y 18 de las 28 cepas positivas para CRISPR3. El contenido de *spacers* para cada cepa fue determinado mediante la herramienta online CRISPR-Cas Finder; el número de *spacers* varió entre 2 y 23 para CRISPR1 y entre 12 y 20 para CRISPR3. La mayoría de los *spacers* obtenidos fueron encontrados en genomas de cepas de *S. thermophilus* presentes en bases de datos online. Los resultados obtenidos permiten conocer los sistemas CRISPR-Cas presentes en cepas regionales de *S. thermophilus*, como un primer paso destinado a la obtención de cepas con fagorresistencia mejorada de interés para la industria láctea nacional.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS FRENTE A *K. pneumoniae* RESISTENTE A CARBAPENÉMICOS DEL GC258

Salazar-Ospina, L. (1); Téllez-Carrasquilla S. (1), Villegas-Ospina P.A (1), López-Crespo J.D (1); Jiménez J. N (1)

1. Grupo de Investigación en Microbiología básica y aplicada (MICROBA). Escuela de Microbiología. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Ante la crisis de la resistencia bacteriana se ha renovado el interés en los bacteriófagos como una alternativa de gran potencial para el manejo de bacterias resistentes a los antibióticos, como es el caso de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos productora de KPC. Este microorganismo es considerado una amenaza urgente debido a la falta de opciones terapéuticas y el alto número de infecciones que ocasiona; siendo el grupo clonal (GC)258 el principal clon asociado con su diseminación alrededor del mundo (3). Este trabajo describe el aislamiento y caracterización de bacteriófagos líticos frente a *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos.

Se realizó un estudio de tipo experimental. Para el aislamiento de los bacteriófagos se recolectaron muestras de agua residual hospitalaria y comunitaria de la ciudad de Medellín. El aislamiento de los bacteriófagos se realizó utilizando la técnica de agar en doble capa utilizando dos bacterias hospederas de *K. pneumoniae* pertenecientes al GC258 (ST258 y ST512). Se seleccionaron las unidades formadoras de placa (UFP) con aspecto traslúcido, las cuales fueron aisladas y concentradas. Para determinar la especificidad de infección de los bacteriófagos aislados, se evaluó el rango de hospedero mediante la prueba de la gota en 89 aislados de diferentes géneros y especies bacterianas. Se realizó una evaluación inter-especie en 31 aislados (*K. oxytoca*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. coli*, *Aeromonas spp*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *E. cloacae*, *Ralstonia paucula* y *S. aureus*) y una evaluación intra-especie en 58 aislados de *K. pneumoniae*; 13 aislados sensibles y 45 resistentes a carbapenémicos con diferentes características clonales (GC258 [n=24], ST307 [n=13] y ST14 [n=8]).

En total se aislaron 8 bacteriófagos activos contra aislados de *K. pneumoniae* resistente a los carbapenémicos. Con relación a los resultados del rango de hospedero se observó que los bacteriófagos no presentaron actividad lítica frente al 93,5% (29/31) de las cepas pertenecientes a otras especies, lo que indica una alta especificidad frente a *K. pneumoniae*. Por otro lado, la evaluación intra-especie evidenció que 3 bacteriófagos tuvieron una mayor actividad lítica frente a aislados de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos pertenecientes al GC258. Los bacteriófagos F3, F4 y F14 tuvieron actividad frente al 41.6 % (10/24), 41.6% (10/24) y al 66.6% (16/24) de las cepas de *K. pneumoniae* GC258 evaluadas, respectivamente. Ningún bacteriófago evaluado presentó actividad contra *K. pneumoniae* del ST-307 y siete bacteriófagos tuvieron actividad solo frente a un único aislado de *K. pneumoniae* del ST14.

Este trabajo permitió el aislamiento de bacteriófagos con alta especificidad frente a *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos del CG258, lo cual constituye hallazgos prometedores para el control de este clon de gran importancia a nivel local y mundial.

Financiación: MINCIENCIAS código 111589785393

**CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS RESISTENTES A BACTERIOFAGOS DEL
FITOPATÓGENO *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, AGENTE CAUSAL DE LA PESTE
NEGRA DEL NOGAL.**

Retamales, J.(1*); Herrera, A.(2); Blanco, M.F.(2); Castillo, D.(3); Bastias, R(4).

1. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad de las Américas, Viña del Mar-Chile;
*jretamales@udla.cl
2. Centro de Biotecnología Vegetal, Universidad Andrés Bello, Santiago-Chile;
3. Instituto de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias Biomédicas, Universidad SEK, Santiago-Chile;
4. Instituto de Biología, P. Universidad Católica de Valparaíso, Chile.

Xanthomonas arboricola pv. *juglandis* (Xaj) es el agente etiológico de la peste negra del nogal y responsable de generar hasta un 80% de pérdidas en la producción de nueces. Actualmente, los principales tratamientos para el control de esta enfermedad están basados en el uso de compuestos cúpricos y antibióticos, práctica que ha favorecido el surgimiento de versiones de Xaj resistentes a estos compuestos. El uso de bacteriófagos surge entonces como una alternativa de control ante esta situación. Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que el uso de bacteriófagos contra Xaj reduce significativamente la sintomatología tanto *in vitro* como en condiciones de campo. No obstante, la posible aparición de bacterias resistentes a estos bacteriófagos es un escenario posible que puede mermar el uso de la fagoterapia. Por esta razón, hemos caracterizado a nivel bioquímico y genómico clones de Xaj resistentes a bacteriófagos (Xaj^{F-R}), así como su fitness en la virulencia sobre diferentes modelos vegetales. Inicialmente, se obtuvieron dos morfotipos de colonias de Xaj^{F-R} que se distinguen por presentar colonias pequeñas (SmC) y grandes mucoides (BC). El material genético de ambos morfotipos de Xaj^{F-R} fue secuenciado y sometido a análisis de genómica comparativa contra su cepa parental. Ambos morfotipos de Xaj^{F-R} fueron caracterizados en base a curva de crecimiento microbiano, pruebas bioquímicas convencionales, perfiles de proteínas de membrana externa (OMPs) y lipolisacáridos (LPS), así como a pruebas de formación de biofilm y de movilidad *in vitro*. En adición, la virulencia de ambos morfotipos de Xaj^{F-R} fue evaluada en frutos inmaduros de nogal y se determinó la expresión relativa de vías de señalización vegetal en *Arabidopsis thaliana* col-0 mediante RT-qPCR. A la luz de nuestros resultados, podemos señalar que no se evidencian variaciones significativas de las características bioquímicas entre SmC y BC, incluso ambas comparadas respecto a su cepa parental. Más bien, existen claras diferencias en la capacidad de formar biofilm y en los perfiles de OMPs y LPS. Estos resultados concuerdan con algunas mutaciones detectadas a partir de genómica comparativa. Por otro lado, es importante destacar, que los cambios detectados en SmC y BC no son suficientes para disminuir el índice de severidad detectado en frutos inmaduros de nogal respecto de la cepa parental, como ocurre en otros modelos de relación fago-bacteria. Más aún, ambos morfotipos de Xaj^{F-R} son capaces de activar las vías de señalización PR1 y PDF1 en *A. thaliana*, presentando valores comparables respecto de la cepa parental. En resumen, estos antecedentes ponen de manifiesto la necesidad de desarrollar formulaciones efectivas de bacteriófagos en mezclas (cocktail) que permitan disminuir la aparición de poblaciones resistentes a bacteriófagos en Xaj y de esta manera fortalecer la fagoterapia como estrategia de control de la peste negra del nogal.

Financiamiento: Proyecto FONDECYT de Postdoctorado n°3180660, CONICYT (ANID)-Chile.

**ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD DE COLIFAGOS EN EL ESTERO “EL SALADO” DE
GUAYAQUIL COMO UNA ALTERNATIVA PARA EL CONTROL DE *Escherichia coli***

Toaquiza M. B.(1), Maldonado-Alvarado P. (1), Quito-AvilaD.(2), Montiel, M.(2)

1. Escuela Nacional Politécnica (EPN), Departamento de Ciencia de Alimentos y Biotecnología (DECAB), Ladrón de Guevara E11-253, P.O. Box 17-01-2759, Quito, Ecuador.
2. Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Facultad de Ciencias de la Vida (FCV), Campus Gustavo Galindo Km 30.5 Vía Perimetral, P. O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador.

RESUMEN

Los bacteriófagos, virus que infectan bacterias, han sido propuestos como una alternativa biológica en el control de infecciones asociadas a este grupo microbiano. Su búsqueda en ambientes ha sido cada vez más difundida, pero existen pocos estudios en aguas tropicales. El presente estudio tuvo como objetivo determinar la diversidad de bacteriófagos que infectan *Escherichia coli* en diferentes zonas del Estero “El Salado”, ubicado en la ciudad de Guayaquil, Ecuador, e investigar su potencial como biocontroladores. Mediante la técnica de capa simple, sugerida por la EPA y utilizando la cepa de *E. coli* ATCC 15597 como huésped, se realizó la cuantificación de fagos a partir de muestras de agua y sedimentos recolectadas en tres zonas del Estero Salado: Norte-Oeste, Sur-Este y Oeste. En la zona Norte-Oeste se reportó la presencia de colifagos entre 6 a 201 UFP/100 mL en agua, 0 a 2600 UFP/100 g de sedimento; igualmente en esta zona se apreció 8 y 5 tipos de calvas diferentes según su morfología entre muestras de agua y sedimento, respectivamente. En la zona Sur-Este la concentración de fagos se encontró entre 6 a 1776 UFP/100 mL de agua y 100 a 200 UFP/100 g de sedimentos, además se identificó 8 y 2 calvas diferentes para muestras de agua y sedimentos, respectivamente. En la zona Oeste no se detectó colifagos en las muestras recolectadas. Mediante técnicas moleculares se ha identificado la presencia de un bacteriófago lítico perteneciente al género *felix01 virus*, familia *Podoviridae*. Los resultados mostraron una gran diversidad de bacteriófagos de *E. coli* con actividad lítica, siendo promisorio su posible uso en el control de esta especie bacteriana.

Palabras Clave: bacteriófagos, biocontrol, *Escherichia coli*, Ecuador

Temática: Biodiversidad

Nombres y Apellidos del Expositor: María Belén Toaquiza Vilca

Correo electrónico del Expositor: maria.toaquiza@epn.edu.ec

EXPLORACIÓN DE LA INTERACCIÓN TRIPARTITA ENTRE BACTERIOFAGOS, CUTIBACTERIUM ACNES Y CÉLULAS DE LA PIEL

Farfán, J.C.(1), Camacho, L.T.(1), Vives, M.J.(1)

1. Universidad de Los Andes, Departamento de Ciencias Biológicas, Bogotá, Colombia

El acné es una de las enfermedades más prevalentes en todo el mundo, caracterizada por su naturaleza inflamatoria. Diferentes factores convergen en su patogénesis, incluyendo el desbalance microbiano causado por una alta presencia de la bacteria *Cutibacterium acnes*, filotipo IA₁. El tratamiento para el acné está enfocado en la disminución de la inflamación. Los antibióticos usados para tratar esta enfermedad no solo tienen un efecto anti-bacterial sino también propiedades anti-inflamatorias. No obstante, algunos tratamientos para el acné presentan efectos adversos. Además, en el caso de los antibióticos, se ha reportado incremento a la resistencia a estos. Debido a esta problemática, es importante buscar nuevas alternativas de tratamiento. Se ha planteado a la fagoterapia como terapia para el acné, debido a la acción antibacteriana de los bacteriófagos líticos. Además, se ha encontrado que algunos fagos pueden tener actividades inmunomoduladoras, inclusive anti-inflamatorias. Mediante lisis bacteriana, los fagos podrían disminuir respuestas inflamatorias asociadas. Por otro lado, también se ha observado que los fagos pueden interactuar directamente con componentes de la respuesta inmune. En el caso de la fagoterapia para el acné se ha reportado disminución en la inflamación asociada a la inoculación de *C. acnes* en piel de ratones. Sin embargo, aún no se conoce bien qué tipo de interacciones dan lugar a estas respuestas y el número de estudios al respecto es aún muy escaso. El objetivo de este estudio fue explorar el efecto de los fagos sobre queratinocitos humanos colonizados con *C. acnes* IA₁. Inicialmente se determinó el efecto de la inoculación de *C. acnes* sobre la viabilidad de los queratinocitos, inoculando diferentes concentraciones de la bacteria a queratinocitos a una densidad de 5000 células/pozo. Posteriormente, se realizó un experimento en el que se colonizaron queratinocitos con *C. acnes* y se trataron con cuatro fagos efectivos contra esta bacteria, utilizando diferentes multiplicidades de infección. Se incluyó en este experimento un control de queratinocitos no colonizados a los cuales se les inocularon los fagos en estudio. Se encontró que una densidad celular bacteriana de 10⁵ UFC/mL afecta significativamente la viabilidad de los queratinocitos, mientras que entre 10⁴ y 10¹ UFC/mL no hay efecto significativo. Con respecto a la inoculación de fagos a queratinocitos, se observó que dos de estos no tienen efecto en la viabilidad celular. También, se reportó en general un mayor porcentaje de viabilidad celular de los queratinocitos colonizados tratados con fagos, con respecto a los que no fueron tratados. Para algunos casos, este efecto parece depender del título viral del fago, que entre mayor sea tiene mejor efecto en la viabilidad celular. Actualmente están en curso ensayos de viabilidad celular del tratamiento con fagos en un modelo tridimensional de piel. Los resultados de este estudio ampliarán el conocimiento sobre el efecto de los fagos en la producción de moléculas de señalización del sistema inmunológico, y como esto puede ser usado en beneficio del tratamiento de enfermedades inflamatorias como el acné.

ESTUDIO DE LA MAQUINARIA DE RECONOCIMIENTO DEL HOSPEDADOR EN EL FAGO J1 DE *LACTOBACILLUS CASEI*

Gradaschi, Victoria (1,2); Dieterle, Maria Eugenia (1,2); Gamarra, Marcelo Daniel (1,2);
Modenutti, Carlos Pablo (1,2); Piuri, Mariana (1,2).

1. Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA
2. Instituto de Química Biológica, CONICET

Los bacteriófagos presentan una alta especificidad para reconocer a sus hospedadores. La maquinaria de reconocimiento interactúa específicamente con diferentes componentes presentes en la envoltura bacteriana. Este trabajo se propone aportar a la caracterización del sistema de reconocimiento fago-hospedador en el bacteriófago J-1 de *Lactobacillus casei*.

Nuestros resultados previos indican que las proteínas de la placa base Dit (Distal Tail Protein) y Tal (Tail Associated Lysozyme), tienen un rol importante en el proceso. En el caso de Dit, se demostró que presenta, al menos, un módulo de unión a carbohidratos (CBM2) que participa como antirreceptor para el reconocimiento de la cepa *Lactobacillus casei* BL23.

Además, se observó que los CWPS (polisacáridos de la pared celular) extraídos de *L. casei* BL23 pueden inhibir la adsorción del fago J-1, y que cuando esta capa se elimina de la superficie bacteriana, el fago ya no puede adherirse a la bacteria. Estos resultados apuntan a que los CWPS podrían funcionar como los receptores bacterianos.

En base a la similitud estructural con otras lectinas, se identificó un sitio putativo de unión a carbohidratos (CBS) en el CBM2, y a través de experimentos de acoplamiento y simulaciones de dinámica molecular utilizando las diferentes variantes de CWPS, se identificaron residuos claves involucrados en la interacción proteína-ligando. Se realizaron mutaciones en los aminoácidos seleccionados *in silico* y se analizó la variación de la capacidad de unión a *L. casei* BL23 de proteínas de fusión GFP-CBM2 que contenían esas mutaciones. El análisis del efecto de las mutaciones en la unión de la proteína se realizó por microscopía de fluorescencia y por citometría de flujo.

Adicionalmente, se evaluó la unión de una fusión GFP- Tal a la superficie de *L. casei* BL23. Nuestros resultados preliminares indican que esta proteína puede unirse a la envoltura bacteriana reforzando la idea de su participación en el proceso de reconocimiento. Mediante un análisis bioinformático se realizó la búsqueda de dominios en Tal que pudieran estar involucrados en la unión y se predijo un posible RBP en la región C-terminal. Se construyó una fusión de la región C-terminal de Tal con GFP para repetir el ensayo de unión a la superficie de la bacteria y evaluar su rol.

La adsorción es un paso clave para la propagación de los fagos y el conocimiento y el desarrollo de estrategias para la inhibición de este proceso podrían usarse para prevenir infecciones en la industria láctea.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON BACTERIÓFAGOS CONTRA *SALMONELLA* INFANTIS EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA PRODUCIDA POR EL HOSPEDERO Y EN LA MICROBIOTA INTESTINAL DEL POLLO BROILER

Álvarez, D. (1); Barrón-Montenegro, R. (1); Moreno-Switt, A. (1).

1. Laboratorio de Inocuidad Alimentaria, Escuela Medicina Veterinaria, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

El serotipo de *Salmonella* Infantis (SI) es causante de un problema de salud pública emergente asociado a la producción avícola mundial y que posee transmisión zoonótica por alimentos en humanos. Estudios reportaron que cepas de SI aisladas de humanos, pollos broiler y carne de pollo fueron resistentes a múltiples antibióticos. Los bacteriófagos o fagos líticos se caracterizan por ser virus que infectan y lisan bacterias; estos pueden ser usados como biocontrol de bacterias de forma segura para reducir la carga bacteriana y además como alternativa al uso de antibióticos en pollos broiler. Los efectos del tratamiento con fagos contra SI en la respuesta inflamatoria (RI) y en la microbiota en el hospedero animal están parcialmente elucidados. Nosotros hipotetizamos que ***el tratamiento con fagos contra SI reduce la infección bacteriana e induce una respuesta anti-inflamatoria en cultivos celulares y en pollos broiler y no provoca alteración en la microbiota intestinal de pollos broiler***. Para comprobar nuestra hipótesis nosotros planteamos los siguientes objetivos: **Objetivo 1: Caracterizar el efecto del fago en la integridad celular, infección bacteriana y respuesta inflamatoria en cultivos celulares infectados con SI.** Se infectarán células Caco-2 y HT29-MTX con una cepa SI y con el fago vB_Si_SF20. Se cuantificará la adhesión e invasión de SI a la célula (UFC) y el título del fago (UFP). Se cuantificarán las citoquinas y quimioquinas inflamatorias por ELISA y RT-qPCR. Se evaluará la integridad epitelial por microscopia de fluorescencia. **Objetivo 2: Determinar el efecto del fago en la integridad epitelial, infección bacteriana y respuesta inflamatoria de los pollos broiler infectados con SI.** Se evaluarán pollos broiler infectados con SI y tratados vía oral con el fago SF20-2 al día 18 previo a la infección con SI. Al día 21 los animales serán infectados con SI y desde el día 22 al día 26 recibirán una dosis diaria del fago SF20-2. A los días 19, 23, 25, 27, 31 y 42 se tomarán muestras (bazo, hígado e intestino) para determinar UFP y UFC; sangre para evaluar RI por ELISA; se evaluarán citoquinas y quimioquinas inflamatorias por RT-qPCR (pool de bazo, intestino e hígado); se realizarán análisis histopatológicos (bazo e intestino). **Objetivo 3: Evaluar el impacto del tratamiento con el fago contra SI en la microbiota intestinal de pollos broiler.** Se utilizarán los mismos animales y tiempos de muestreo descritos en el objetivo 2 para tomar hisopos cloacales, a los cuales se les realizará la extracción de ADN y se amplificará el gen ARNr 16S por PCR. Los amplicones se secuenciarán usando la plataforma Illumina MiSeq. Posteriormente, se realizarán análisis bioinformáticos. A través de estos estudios, estableceremos un modelo de uso de fagos en producción animal, que cuente con respaldo científico robusto en cuanto a inocuidad y seguridad. Esperamos generar información importante hacia una fagoterapia segura para reducir SI en la producción avícola.

USO DE CÓCTEL DE BACTERIÓFAGOS PARA EL CONTROL DE SALMONELLA TYPHIMURIUM EN CARNE DE POLLO.

García, V.(1, 2); Aguilera, M.(1); Martínez, S.(1)

1. Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad Tecnológica, Universidad de Santiago de Chile. Santiago, Chile.
2. Centro de Estudio en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Santiago (CECTA-USACH), Santiago, Chile.

Las enfermedades transmitidas por alimentos son de gran importancia para la salud pública, debido al alto número de casos que ocurren cada año. Para ello la industria de los alimentos ha implementado distintas estrategias de control las que incluyen el uso de antibióticos, vacunas, etc. Sin embargo, estas no han logrado eliminar los patógenos en la industria por lo cual se requieren nuevas estrategias de control.

Dentro de los patógenos de mayor relevancia en la industria se encuentra *Salmonella* spp. Un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo que produce una gastroenteritis denominada Salmonellosis. A pesar de que ha sido un patógeno blanco de control para la industria, al día de hoy sigue produciendo importantes gastos en el sistema de salud mundial. Más aún, el uso de antibióticos para su control tanto a nivel humano como en salud animal ha provocado que muchas de las cepas presentes en alimentos sean resistentes a estos agentes lo cual transforma a este patógeno en un problema aún mayor. En este contexto el control de microorganismos en la producción y distribución de alimentos utilizando bacteriófagos es una alternativa a explorar.

Para ellos aislamos 20 bacteriófagos de *Salmonella* spp, de los cuales seleccionamos 5 debido a al tamaño de su explosión viral, a la diversidad morfológica y genética: 3 de ellos pertenecen a la familia *Siphoviridae* y 2 a *Microviridae*. Este cóctel fue probado en carne de pollo infectada con *Salmonella* Typhimurium observando una disminución de 1,8 unidades log cFU/g luego de 48 horas a 10°C, temperatura de distribución de la carne de pollo. Por otro lado, también se observa actividad antimicrobiana en carne de pollo a otras temperaturas (30 y 22°C) abriendo la posibilidad de aplicar este cóctel en otras matrices alimentarias.

Agradecimientos: Proyecto DICYT 021971GM_ DAS y DICYT apoyo asistencia a eventos

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFAGOS SOMÁTICOS EN EFLUENTES DE TAMBOS

DUALDE, Melany (1), JUÁREZ, Ana Elisa(1), LUCCHESI, Paula Maria Alejandra (1), KRÜGER, Alejandra (1)

1. Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN-CONICET-CIC-UNCPBA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, Buenos Aires, Argentina.
mdualde@vet.unicen.edu.ar

La actividad del ordeño genera grandes volúmenes de efluentes que contienen elevados porcentajes de materia orgánica, nutrientes y sales; así como también pueden incluir metales pesados, restos de productos veterinarios y patógenos. Si estos efluentes alcanzan los cursos de agua superficiales y subterráneos degradan su calidad y constituyen una amenaza para el medio ambiente y la salud. Por ello, actualmente se busca obtener mayor información de la problemática de los residuos generados que contribuya a las alternativas de gestión y monitoreo. Los colifagos somáticos son bacteriófagos que infectan a *E. coli* a través del reconocimiento de receptores ubicados en su pared celular. Dadas sus características, como por ejemplo su persistencia en el agua y su resistencia a tratamientos de aguas residuales similares a las de los virus, autoridades regulatorias de distintos países han propuesto incluir a los colifagos como indicadores de calidad del agua y en el monitoreo de calidad microbiológica de aguas residuales y de efluentes tratados. Nuestro objetivo fue evaluar la presencia y determinar los niveles de colifagos somáticos en efluentes líquidos y sólidos de tambos de la Cuenca Mar y Sierras. Se recolectaron muestras de líquidos y sólidos de los efluentes no tratados, a la salida del tambo, en 16 establecimientos. Se siguieron procedimientos para la detección y cuantificación de fagos similares a los establecidos para muestras de agua en la norma ISO 10705-2:2000. Para determinar presencia/ausencia en 1 ml o 1 g de muestra, se tomó la alícuota correspondiente y se incubó *overnight* con la cepa hospedadora *E. coli* WG5. Luego se analizaron gotas de este cultivo (previo tratamiento con cloroformo) por el método de *spot test*. En paralelo, se realizó la enumeración de unidades formadoras de placas (UFP)/ml o UFP/g. Para ello, se centrifugaron las muestras de efluentes líquidos y diluciones 1/10 en LB de las muestras sólidas y se procesaron alícuotas de los sobrenadantes por el método de doble capa. En todos los ensayos se incluyó el fago ϕ 174 como control. Se detectó la presencia de colifagos somáticos en todas las muestras. Los efluentes líquidos mostraron títulos entre $1,06 \times 10^2$ y $2,20 \times 10^5$ UFP/ml de muestra, con una mediana de $7,35 \times 10^3$ UFP/ml y los efluentes sólidos entre $3,80 \times 10^2$ y $1,65 \times 10^6$ UFP/g de muestra, con una mediana de $7,20 \times 10^3$ UFP/g. En la gran mayoría de las muestras se observaron dos o más morfologías diferentes de placas de lisis, sugiriendo la presencia de distintos colifagos. Los niveles de colifagos somáticos detectados en los efluentes de tambo se encuentran dentro del rango informado por otros estudios en materia fecal de bovinos y en aguas residuales de mataderos, como también a los reportados en aguas domiciliarias no tratadas. Los resultados de este trabajo sugieren que los colifagos podrían evaluarse como una opción para controlar la eficiencia de tratamientos de los efluentes originados por la actividad lechera.

TÍTULO DEL PROYECTO: DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA INNOVADORA PARA COLOMBIA BASADA EN BACTERIOFAGOS PARA EL MANEJO DE BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS Y BIOPELÍCULAS EN SALUD HUMANA Y AMBIENTAL

Salazar-Ospina, L. (1); Téllez-Carrasquilla S (1), Vanegas J.M (1, 2); Roncancio A.G (1, 3); Franco L (3); Hoyos J (4); Pino N.J (1); Jiménez J. N (1)

1. Grupo de Investigación en Microbiología básica y aplicada (MICROBA). Escuela de Microbiología. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
2. Universidad pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia
3. Clínica cardio VID, Medellín, Colombia
4. Oncólogos de Occidente, Medellín, Colombia.

La resistencia bacteriana constituye un problema grave de salud pública mundial, con un gran impacto en el incremento de la mortalidad, la estancia hospitalaria y los costos de atención en salud. Así mismo, estas bacterias han adquirido la capacidad de persistir en diferentes entornos mediante la formación de biopelículas; lo cual, dificulta aún más el tratamiento antibiótico y la acción de los desinfectantes en el entorno. Esta problemática no solo se ha restringido al ámbito clínico, el uso de antibióticos en diferentes actividades antropogénicas ha ocasionado un incremento de bacterias resistentes en el entorno ambiental y los cuerpos de agua se han convertido en reservorios importantes de estos microorganismos, los cuales son considerados contaminantes emergentes. Además, la formación de biopelículas representa serias limitaciones para el tratamiento de aguas residuales y para los sistemas de distribución de agua potable, lo que promueve el mantenimiento de patógenos de importancia clínica en estos lugares.

Por todo lo anterior, es necesaria la búsqueda de alternativas diferentes a los antimicrobianos, que posibiliten el control de bacterias resistentes y biopelículas no solo en el entorno clínico; si no, a nivel ambiental. En este sentido, los bacteriófagos surgen como una opción efectiva para el control de estos microorganismos, debido a su alta especificidad, inocuidad y baja presión de selección de la microbiota. Estos organismos son los más abundantes en la tierra y han sido empleados desde su descubrimiento para el tratamiento de infecciones bacterianas sobre todo en Europa y la antigua Unión Soviética; sin embargo, su uso fue dejado en el olvido, especialmente en países occidentales, debido al descubrimiento y auge de los antibióticos. El uso de los bacteriófagos ha vuelto a renacer dada la emergencia de diferentes mecanismos de resistencia y las opciones limitadas de tratamiento de estos microorganismos. En la actualidad, los bacteriófagos se han empleado para el tratamiento de infecciones en humanos; además, su uso ha alcanzado logros importantes en campos de la industria alimenticia y la agricultura. A pesar de que Colombia se considera un lugar endémico para la circulación de bacterias resistentes, las investigaciones en este contexto son escasas. Por lo anterior, el proyecto tiene como objetivo desarrollar una estrategia innovadora para Colombia, basada en la utilización de bacteriófagos para el manejo de bacterias resistentes a antibióticos y biopelículas en salud humana y ambiental. Este proyecto fomenta la investigación tecnológica alrededor de un problema prioritario de salud, contempla la búsqueda de bacteriófagos líticos activos contra bacterias resistentes de importancia clínica (*Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenémicos (KPC), *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina); y la evaluación de su eficacia a nivel de laboratorio para el control de bacterias en superficies, aguas residuales, y para la remoción de biopelículas en dispositivos médicos y en sistemas de distribución de agua potable.

Financiación: MINCIENCIAS código 111589785393

APLICACIÓN DE BACTERIÓFAGOS EN LA REDUCCIÓN DE LA CARGA BACTERIANA POR *Salmonella* EN MUESTRAS DE TOMATE

Zumaeta, K.(1,2); Guillen, A.(1); Talledo, M.(1)

1. Laboratorio de Bacteriófagos, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
2. Departamento de Ingeniería Química, EEBE, Universidad Politécnica de Cataluña, Barcelona, España.

Los miembros del género *Salmonella* pueden ser considerados como uno de los microorganismos patógenos que más toxiinfecciones alimentarias produce. La resistencia a antibióticos que esta bacteria ha desarrollado estimula la búsqueda de alternativas efectivas para su tratamiento, una de las cuales es el uso de bacteriófagos. Este estudio tuvo por objetivo reducir la carga bacteriana en muestras de tomate utilizando un cóctel de bacteriófagos contra *Salmonella*.

Los ensayos en tomate se realizaron preparando cortes de 1 cm³ de tomates, el mismo que fue rociado con un inóculo de la bacteria patógena probada en fase logarítmica de crecimiento. Dependiendo del ensayo, se aplicó solo tomate, solo bacteria, solo fago, (controles) o la bacteria y el bacteriófago sobre la muestra de tomate. Se realizaron cuantificaciones: una abordó el recuento de bacterias (método de incorporación, UFC/mL) y otra el recuento de placas de lisis (virus, por el método de bicapa de agar, UFP/mL). Las cuantificaciones se realizaron al inicio del experimento y a las tres, seis, nueve y doce horas de inoculado el alimento. Los ensayos se basaron en diluciones decimales seriadas, de las cuales se ensayaron las tres últimas diluciones por duplicado. Cada instancia se repitió en tres oportunidades, generando tres experimentos independientes en cada caso.

El efecto reductor en tomate para *Salmonella enterica* ser. Typhi. muestra que cuando se enfrentó *Salmonella enterica* ser. Typhi con el cóctel de bacteriófagos, se observó una reducción de la cantidad de bacterias sobre todo a las 9 horas (1.2 X 10⁶ UFC/mL; 1.12 x 10⁸ UFP/mL), alcanzando una reducción de hasta dos órdenes de magnitud respecto a la muestra sin cóctel de bacteriófagos.

El cóctel de bacteriófagos presenta una capacidad reductora sobre *Salmonella enterica* ser. Typhi y podría representar una herramienta útil para el control de agentes contaminantes en alimentos.

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DEL ENTEROBACTER PHAGE
 VB_EcRAM-01 ESPECÍFICO CONTRA EL COMPLEJO *Enterobacter cloacae*.**

Victoria-Blanco, E.E.(1,2,3,4,7), Querol-Audi, J.(3,4,7), González-Gómez, J.P.(5),
Martínez, A.A.(6,7), González, C.(1,6), Castro del Campo, N.(5), Chaidez-Quiroz, C.(5),
Gómez, L.(8), Quiroz, E.(1[†]), Martínez-Torres, A.O.(3,4).

1. Departamento de Microbiología Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá, Panamá, Panamá.
2. Programa de Maestría en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá, Panamá, Panamá.
3. Laboratorio de Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA), Universidad de Panamá, Panamá, Panamá.
4. Laboratorio de Microbiología de Aguas (LAMA), Universidad de Panamá, Panamá, Panamá.
5. Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIIA), Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), Carretera a Eldorado Km 5.5, Campo El Diez, 80110, Culiacán, Sinaloa, México.
6. Departamento de Investigación en Genómica y Proteómica, Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Panamá, Panamá.
7. Sistema Nacional de Investigación (SNI), Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT), Panamá, Panamá.
8. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá, Panamá, Panamá.

[†] In memoriam

Los bacteriófagos son de gran interés, ya que, por su naturaleza, ha sido posible su utilización en la industria alimentaria para controlar patógenos bacterianos y también se han propuesto para el tratamiento de enfermedades bacterianas en animales/humanos. *Enterobacter cloacae* es una de las principales causas de infecciones extraintestinales que se adquieren en los hospitales. Es por esta razón que este estudio tuvo como objetivo El objetivo de este estudio fue caracterizar genómicamente fagos aislados en aguas residuales de Río Abajo contra el Complejo *E. cloacae*.

La caracterización genómica se realizó mediante Secuenciación de Nueva Generación para lograr ensamblar y anotar el genoma completo del virus. La caracterización genómica, reveló que el Enterobacter phage vB_EcRAM-01, es un miofago de 178.477 kpb con contenido de 45.8% de G+C y 294 genes presentes que codifican proteínas estructurales, adsorción a las células, inyección de ADN y enzimas líticas. Este genoma posee 2 ARNt: el ARNt-Met (cat) el cual posee 77 bases y 55.8% de G+C, y el ARNt-Gly (tcc) con 76 bases y 47.4% de G+C. Además de estos también posee genes de holinas y endolisinas, e hidrolasas y además, no se encontraron genes asociados a lisogenia como las integrasas, transposasas, o excisionasas. El análisis filogenético utilizando el método Genome BLAST Distance Phylogeny en los entornos recomendados para virus procarióticos sugiere que este fago pudo divergir de un ancestro en común, pero ha sufrido múltiples eventos de sustitución de nucleótidos. El Análisis de Identidad de Nucleótidos del Enterobacter phage vB_EcRAM-01 utilizando los 25 genomas con mayor homología en GenBank también nos indicó que nuestro fago no comparte más del 95% de identidad de nucleótidos con

los genomas reportados, por lo que podría representar un nuevo género dentro de la subfamilia *Tevenvirinae* (*Pseudotevenvirus*). La secuencia completa del Enterobacter phage vB_EcRAM-01 se ha depositado en el GenBank con el número de acceso [OL551674](#) y el acceso BioSample [SAMN23426491](#). Se puede acceder a los datos sin procesar a través del número SRA [SRR18344380](#).

Estas características (las relaciones genéticas de este género y ante la ausencia de genes de lisogenia), hace que el Enterobacter phage vB_EcRAM-01 sea un excelente candidato potencial para aplicaciones clínicas o fagoterapia, así como posible agente de biocontrol en la industria alimentaria.

Palabras clave: bacteriófagos, Complejo *E. cloacae*, caracterización molecular, secuenciación de nueva generación, ensamblado *de novo*, Pseudotevenvirus.

PROFAGOS EN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PRESENTAN PARALOGOS DE PROTEINAS REGULATORIAS DEL HOSPEDADOR: EL CASO DE LAS PROTEINAS DE UNION A ARN DE LA FAMILIA CSR-RSM.

Sobrero, P.M.(1); Weinsinger Calvo, M. (1); Ormazábal, A. (2); Palma, J. (2); Pierdominici-Sottile, G.(2); Valverde, C.(1)

1. Laboratorio de Fisiología y Genética de Bacterias Beneficiosas para las Plantas (LFGBBP), Centro de Bioquímica y Microbiología del Suelo, Universidad Nacional de Quilmes.
2. Unidad de Físicoquímica, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes.

Los elementos genéticos móviles son un importante acervo de novedosas funciones biológicas, vinculadas principalmente a la replicación del mismo y su perpetuación dentro del hospedador bacteriano. En nuestro laboratorio, hemos estudiado durante mucho tiempo a la regulación a nivel post-transcripcional mediada por la familia de proteínas de unión a ARN de la familia Csr-Rsm. Estas proteínas operan, principalmente, como represores traduccionales. Esta actividad biológica es antagonizada por la expresión de un grupo de ARN regulatorios del tipo “imitadores moleculares” que desplazan a las proteínas represoras de los ARN mensajeros, posibilitando su traducción. Mediante un análisis de genómica comparativa (basándonos en criterios secuenciales, estructurales y de sintenia) hemos logrado identificar 9 subfamilias de proteínas tipo Csr-Rsm dentro del género *Pseudomonas*. La familia denominada RsmM nos llamó la atención, ya que estos parálogos son específicos del complejo *aeruginosa*, encontrándose en 1 de cada 5 genomas dentro de la base de datos Pseudomonas.org que pertenecen al mencionado complejo. El entorno genético de RsmM sugiere fuertemente que el mismo se encuentra dentro de profagos, lo que hemos confirmado mediante comparaciones secuenciales del *loci* y por la presencia de este parálogo en genomas de fagos líticos y temperados que infectan *Pseudomonas aeruginosa*. Mediante la utilización de oligonucleótidos específicos para *rsmM*, hemos detectado la presencia de productos específicos en 6 de 55 aislamientos clínicos provenientes de esputos de pacientes fibroquísticos. Estos resultados sugieren que la presencia de este parálogo no es una excentricidad dentro de este complejo, sino una característica con una incidencia significativa. En un intento de caracterizar la biología de esta subfamilia, realizamos predicciones mediante técnicas *in silico*. A través de la rutina *alphafold*, obtuvimos una predicción estructural de RsmM, encontrando los plegamientos y las superficies electrostáticas clásicas para una proteína de unión a ARN. También hemos realizado un análisis por Dinámica Molecular, observando que el inusual dominio C-terminal extendido posee un movimiento de “pinza” sobre la superficie de interacción con el ARN. Los resultados presentados hasta el momento nos permiten hipotetizar que la presencia de este inusual parálogo dentro de bacteriófagos y profagos, podrían operar sobre las redes regulatorias existentes en el hospedador; de manera que esto ofrezca una ventaja adaptativa que maximice el *fitness* del elemento genético móvil.

INACTIVACIÓN DE BACTERIOFAGOS MEDIANTE UV PARA LA POSTERIOR EVALUACIÓN DE ENZIMAS FÁGICAS

JUÁREZ, A. E. (1); KRÜGER, A. (1); RODRIGUEZ, V. A.(1) ; D' ANGELO, C. (2); POMARICO J. A. (2); LUCCHESI, P. M. A. (1).

1. Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN-CONICET-CIC-UNCPBA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, Buenos Aires, Argentina. anajuarez@vet.unicen.edu.ar
2. Centro de Investigación en Física e Ingeniería del Centro de la Pcia de Buenos Aires (CIFICEN-CONICET-CIC-UNCPBA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, Buenos Aires, Argentina

La apremiante necesidad de desarrollar estrategias de control de bacterias alternativas al uso de antimicrobianos ha dado relevancia al empleo de bacteriófagos y enzimas fágicas. Para evidenciar la presencia de estas enzimas y otros componentes antibacterianos útiles para biocontrol, se requieren estrategias que permitan una evaluación de la actividad antibacteriana independiente de la replicación fágica. Se sabe que la luz ultravioleta (UV) daña los ácidos nucleicos impidiendo la replicación del ADN y la transcripción del ARN, lo que finalmente causa la inactivación de los microorganismos y, aunque otros componentes pueden resultar dañados, también pueden mantenerse actividades enzimáticas. En base a esto, el tratamiento con luz UV permitiría inferir la presencia de componentes con acción antimicrobiana. Nos propusimos como objetivo evaluar las condiciones necesarias para lograr la inactivación de bacteriófagos, aislados por nuestro grupo de trabajo, que presentan actividad lítica contra *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. Dado que la luz UV tiene limitada capacidad de penetrar en un líquido, colocamos 500 µl de la suspensión del fago L7.3 (stock de alto título fágico, $\sim 1 \times 10^{10}$ UFP/ml) de manera que forme una capa muy delgada sobre las placas de Petri de vidrio utilizadas. Realizamos un primer ensayo en el que evaluamos 3 tratamientos con luz UV de una longitud de 254 nm a una intensidad de 0,041 W/cm² (T1: 5' de exposición sin agitación; T2: 20" de exposición sin agitación; T3: 1'40" de exposición realizando 2 agitaciones intermedias de forma manual) así como un control sin tratar (stock fágico colocado en placa de Petri sin exponer a luz UV). Se realizó un ensayo en doble capa de agar y un *spot test* para cuantificar los fagos que conservaron su infectividad, colocando diferentes diluciones de los fagos tratados y del control, empleando la cepa *E. coli* DH5α como hospedadora. Posteriormente, se realizó un nuevo ensayo con mayor tiempo de exposición a luz UV (5' 20 ") y agitaciones manuales cada 20" (T4). Se observaron disminuciones de ufp de ~ 2 log por efecto del tratamiento T1, 1 log por T2 y ≥ 9 log por T3 y T4. En estos 2 últimos tratamientos, se observó efecto lítico sin presencia de placas de lisis con las menores diluciones de la suspensión tratada, en el ensayo de *spot test*. Este estudio permitió identificar tratamientos con luz UV eficaces para inactivar este fago y continuar detectando actividad lítica. Dadas las características de la luz UV, se destaca la importancia de la agitación durante el tratamiento.

PALABRAS CLAVE: LUZ UV, BACTERIÓFAGOS, ENZIMAS FÁGICAS, BIOCONTROL

ROL DEL PROFAGO DE LA CEPA DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ID4365 EN LOS COLAPSOS POBLACIONALES DEBIDO A EXPLOTACIÓN DE EXOPROTEASAS DE SU HUÉSPED

Huelgas, D. (1); Cázarez, D. (2); García, R. (1)

1. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México
2. Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram-negativo con una amplia distribución ambiental. Los sistemas de percepción de quórum (QS) en *P. aeruginosa* controlan la producción de exoproteasas, y los individuos productores de estas enzimas son comúnmente explotados por mutantes en genes como *lasR* o *rhIR*. A estos últimos se les conoce como *cheaters* de exoproteasa. Estas variantes son usualmente seleccionadas en la población durante experimentos de evolución *in vitro* en medios con una proteína, como la caseína, como única fuente de carbono y pueden causar colapsos poblacionales a medida que su proporción supera la de los individuos productores. Sin embargo, estas variantes pueden ser controladas por factores tales como la piocianina.

Este fenómeno ha sido estudiado en cepas de referencia como PAO1 y PA14 pero no en aislados ambientales de *P. aeruginosa*. La cepa ID4365 es un aislado del océano Índico que presenta una mutación natural en *lasR*, sobreproduce piocianina con respecto a PAO1 y además es lisógena. En este trabajo se investigó el rol que tienen los profagos de ID4365 en los colapsos poblacionales de su huésped debido a la producción de exoproteasas. Se llevaron a cabo experimentos de evolución *in vitro* en caseína con 2 cultivos de la cepa ID4365. En cada pase par y el inicial de 48 hrs. cada uno se determinó crecimiento celular, células viables, título de bacteriófagos, actividad caseinolítica y producción de piocianina. El conteo de bacteriófagos se hizo mediante goteos en ensayo de doble agar.

En el primer cultivo de ID4365, se observó un colapso temprano (pase 7) a un título de fagos de 5.4×10^7 PFU/mL. El segundo cultivo presentó un colapso en un pase tardío (pase 34) a un título de 2.8×10^5 PFU/mL. En ambos cultivos (CFU/mL), el conteo de células viables no presentó alguna relación lineal con el título de fago. En el primer cultivo, la producción de piocianina (D.O. 495 nm) desde el pase 1 hasta el 6 fue muy baja (promedio = 0.0042) y el título de fagos en promedio fue de 5.59×10^7 . En el segundo cultivo, la producción piocianina en el pase 1 al 10 fue en promedio de 0.023 y el título de fago de 3.27×10^6 PFU/mL; del pase 12 al 20 el promedio de producción de piocianina fue de 0.03 y el título de fago de 7.6×10^2 PFU/mL y del pase 22 al 30 el promedio de piocianina fue de 0.0028 y de fago fue de 8.37×10^4 . El porcentaje de colonias con poca o nula actividad caseinolítica llega hasta el 90% en el pase 6 del primer cultivo, mientras que en el segundo cultivo oscila entre el 20% hasta el 90% y no existe alguna relación lineal entre esta variable y el título de fago en ambos cultivos.

En conclusión, hasta el momento el papel que tiene la inducción de profagos en los colapsos poblacionales debido a la explotación de exoproteasas en el huésped no ha sido explorada y es probable que en la cepa ID4365 haya algún mecanismo en el cual esté involucrada la producción de piocianina en la represión de la inducción del profago lo cual evita un colapso temprano.

PATRONES TEMPORALES DEL VIRIOPLANCTON EN UNA LAGUNA PAMPEANA

Quiroga, M.V.(1); Malits, A.(2); Unrein F.(1)

1. Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH, UNSAM-CONICET), Chascomús, Argentina.
2. Centro Austral de Investigaciones Científicas (CADIC, CONICET), Ushuaia, Argentina.

Los virus son la entidad biológica más abundante del planeta. La mayoría de los virus acuáticos son bacteriófagos que pueden matar, reprogramar y alterar genéticamente a las bacterias, con importantes implicancias en los ciclos biogeoquímicos. En particular, la lisis vírica genera una transferencia de nutrientes desde los organismos heterótrofos y autótrofos del bucle microbiano al pool de materia orgánica disuelta, proceso conocido como *viral shunt*. Por lo tanto, los virus impactan significativamente en las tramas tróficas y el funcionamiento ecosistémico de los ambientes acuáticos. El objetivo del presente trabajo es estudiar la dinámica temporal del virioplancton en la laguna Chascomús durante más de dos años (agosto 2017–marzo 2020, muestreos quincenales), y su relación con los factores ambientales y los hospedadores unicelulares más abundantes del plancton (bacterias heterótrofas -BH, picocianobacterias -Pcy y piceucariotas -Peuk). Las abundancias de las distintas comunidades se cuantificaron utilizando citometría de flujo. Además, se realizaron mensualmente experimentos de producción vírica siguiendo la metodología de reducción viral entre los meses de julio 2019 y febrero 2020.

La laguna presentó abundancias totales en el rango de $3\text{-}7 \cdot 10^8$ *Virus Like Particles (VLP)* ml^{-1} . Se cuantificaron tres componentes de la comunidad del virioplancton: *low*, *medium* y *high VLP*, que identifican poblaciones virales citométricas con bajo, medio y alto contenido de ácidos nucleicos, respectivamente. En función de éstas, el virioplancton presentó estructuras comunitarias contrastantes en verano e invierno. Un análisis de partición de varianza reveló que la temperatura, la profundidad de la columna de agua y el oxígeno disuelto, y la interacción de éstas con la abundancia de BH y Pcy, explican un alto porcentaje de la variación temporal de la estructura del virioplancton. Utilizando modelos aditivos generalizados (GAM) encontramos patrones estacionales significativos para las abundancias de *medium* y *high VLP*, con máximos en verano y mínimos en invierno. A su vez, pudimos modelar la abundancia de estas dos poblaciones virales citométricas utilizando la temperatura, profundidad de la columna de agua y abundancia de BH, representando potenciales efectos estacionales, de dilución-concentración y de disponibilidad de hospedadores, respectivamente. En concordancia con estos patrones temporales, la producción viral *in situ* estimada en Chascomús también mostró una marcada estacionalidad con valores mínimos en invierno, julio 2019: mediana $9.5 \cdot 10^7$ *VLP* $(\text{ml } 24\text{h})^{-1}$, y máximos a fines de primavera y comienzo de verano, enero 2020: mediana $7.2 \cdot 10^8$ *VLP* $(\text{ml } 24\text{h})^{-1}$. No se detectó producción viral lisogénica en los meses estudiados.

Las abundancias del virioplancton así como la producción viral en esta laguna pampeana se encuentran dentro de los máximos valores registrados para aguas continentales, lo que supone un alto impacto de los virus en su funcionamiento ecosistémico.

BACTERIOFAGOS AISLADOS DE LACTOSUERO: RESISTENCIA A TRATAMIENTOS DE SANITIZACIÓN

Briggiler Marcó M.(1); Guglielmotti D.(1); Oliver G.(1); Quiberoni A. (1); Suárez V. (1)

1. Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-CONICET), Santiago del Estero 2829, 3000 Santa Fe, Argentina. mbriggs@fiq.unl.edu.ar

La presencia de fagos de bacterias lácticas (BAL) en derivados de suero en polvo se vuelve peligrosa cuando estos compuestos son utilizados, con diferentes propósitos, como aditivos en procesos lácteos fermentativos. Estos fagos pueden infectar las cepas del fermento y detener la transformación buscada, no obteniéndose el producto final y acarreado a la industria pérdidas económicas considerables. Estudios recientes realizados por nuestro grupo de trabajo demostraron que los derivados de lactosuero, más específicamente CPS (Concentrados de Proteínas de Suero, procedentes de distintos orígenes) son portadores de fagos infectivos de *Streptococcus thermophilus*, especie utilizada mayoritariamente en nuestro país para elaborar productos lácteos fermentados. Estos fagos fueron aislados en algunos casos en concentraciones elevadas. El objetivo de este trabajo fue estudiar, sobre algunos fagos seleccionados, la eficiencia de distintos tratamientos de sanitización (térmicos y químicos) usualmente utilizados en nuestra industria láctea, a fin de aportar conocimiento y herramientas concretas para el diseño o modificación de procesos (en lo que fuese posible) y minimizar, de este modo, riesgos de infecciones fágicas cuando se utilizan estos compuestos (CPS) como aditivos en procesos fermentativos. Se estudió la resistencia intrínseca (en *buffer* TMG, Tris-Magnesio-Gelatina) de 17 fagos infectivos, a tratamientos térmicos de 75, 80 y 85 °C durante 5 min y frente a 8 biocidas (de uso en laboratorio o planta), ensayados según indicaciones del fabricante o en concentraciones recomendadas. Los fagos estudiados pertenecen a tres grupos genéticos diferentes (*cos*, *pac* y 5093). En relación a la resistencia térmica, los resultados demostraron que los tratamientos de pasteurización usados en leche cruda y suero de quesería destinado a producción de CPS no inhiben a la mayoría de los fagos estudiados; de hecho, fueron necesarios tratamientos más energéticos (85 °C - 5 min) para la eliminación completa de la población en todos los casos. En general, los fagos *pac* fueron más sensibles que los *cos* y éstos a su vez, más sensibles que los 5093. De acuerdo a estos resultados sería aconsejable evaluar, en base al producto a ser elaborado, la posibilidad de intensificar el tratamiento térmico realizado a la materia prima de manera de lograr un mejor control de estas infecciones. Por otra parte, se observó una gran variabilidad en el comportamiento de los fagos frente a ciertos biocidas, y es evidente que no se puede generalizar en relación a la capacidad de inactivación de los mismos. Consecuentemente, es recomendable realizar un examen cuidadoso y regular de los biocidas disponibles frente a nuevos fagos emergentes, juntamente con la implementación de un diagrama de rotación de compuestos utilizados para aumentar la eficiencia de desinfección.

**FAGOS DE *Streptococcus thermophilus* AISLADOS DE YOGUR:
VIRULENCIA, DIVERSIDAD GENÉTICA Y RESISTENCIA TÉRMICA**

Marangon A.M.(1); Quiberoni A.(1); Guglielmotti D. (1)

1. Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-CONICET), Santiago del Estero 2829, 3000 Santa Fe, Argentina. dgugliel@fiq.unl.edu.ar

La elaboración de yogur se basa en la actividad de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. El desarrollo de estos cultivos puede verse retrasado por diversos factores, entre los que se destacan las infecciones por bacteriofagos (fagos). Con el objetivo de enfrentar racionalmente la problemática, algunas empresas han sumado protocolos de monitoreo fágico en zonas críticas del proceso, así como en materia prima e insumos. Para que el diseño de estos protocolos sea apropiado es indispensable conocer las características de los fagos detectados y aislados. Además, se sabe que la capacidad evolutiva de estos fagos es muy grande, por lo que estudiar su ecología en los ambientes de procesamiento podría facilitar la selección de las nuevas alternativas tecnológicas a proponer. En este trabajo se estudiaron 25 fagos de *S. thermophilus* aislados por nuestro grupo entre 2002 y 2017, a partir de producciones de yogur de una importante industria láctea. Los objetivos de este trabajo fueron: (i) determinar la virulencia de los fagos aislados frente a cepas comerciales de *S. thermophilus*, (ii) caracterizar los fagos genéticamente, (iii) analizar la frecuencia y permanencia en la planta y (iv) estudiar su resistencia térmica. El estudio del perfil de hospedadores (mediante Test de turbidez y Spot test) reveló que estos fagos son capaces de infectar entre 2 y 5 de las 8 cepas comerciales analizadas. Por su parte, 3 de las 8 cepas son infectadas por 24 de los 25 fagos, demostrando una gran sensibilidad fágica. La diversidad genética de los fagos se analizó mediante la obtención de los perfiles de restricción de sus genomas (usando las enzimas HindIII, EcoRV y EcoRI). Además, se determinó la pertenencia a alguno de los grupos genéticos (*cos*, *pac*, 5093 y 987) definidos al día de hoy, aplicando una metodología PCR multiplex. El análisis de los perfiles de restricción permitió reunirlos en 10 grupos distintos. Fagos pertenecientes a tres de estos grupos se aislaron en repetidas ocasiones en el transcurso de varios años, indicando una elevada persistencia en el ambiente de elaboración. La PCR multiplex permitió clasificar los fagos en dos grupos genéticos, correspondiendo 16 fagos al grupo *cos* (Moineuvirus) y 9 al grupo *pac* (Brussowvirus). Luego del tratamiento térmico aplicado (72 °C – 45 min) a los fagos suspendidos en caldo de cultivo (M17) o leche descremada reconstituida estéril (LDR), aún fue posible recuperar partículas virales infectivas, demostrando que no se logró la inactivación total de la población fágica. Además, se observó un efecto protector de la leche, ya que los recuentos fueron mayores en este medio en comparación con el caldo de cultivo. Estos resultados permiten analizar la diversidad y evolución ecológica de fagos de *S. thermophilus* en el ambiente industrial y también modificar/diseñar, con herramientas apropiadas, diversas estrategias de sanitización de materias primas e insumos usados en la planta elaboradora.

CONSTRUCCIÓN DE UN NUEVO MICOBACTERIÓFAGO REPORTERO LUMINISCENTE NANOLUC Y SU USO PARA LA EVALUACIÓN EXTRACELULAR *IN VITRO* DE DROGAS ANTITUBERCULOSAS

Ronconi, M.L. (1) ; Spatola Rossi, C. (2) ; Urdániz E. (2) ; Durán, F.J. (1) ; Piuri, M. (2)

1. UMYMFOR – Depto. Química Orgánica, FCEN, CONICET-UBA. Buenos Aires, Argentina.
2. Lab. Bacteriófagos y Aplicaciones Biotecnológicas, Depto. Química Biológica, FCEN, UBA. Buenos Aires, Argentina.

Frente al alarmante incremento de los casos de tuberculosis y otras micobacterias reportados cada año por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en paralelo con el aumento de aislamientos resistentes a drogas de primera y segunda línea, es inminente la necesidad de nuevos agentes terapéuticos con blancos de acción diferentes a los conocidos. Junto a esto, es de vital importancia implementar ensayos de evaluación de drogas de forma eficaz y rápida para acortar los tiempos y decidir las rutas sintéticas de los análogos evaluados. El uso de micobacteriófagos reporteros como método de detección de la actividad antimicobacteriana resulta práctico, sensible, rápido y de bajo costo.

Con este fin, se propuso construir un nuevo micobacteriófago reportero que acarrea un gen que codifica para la enzima luminiscente NanoLuc de pequeño tamaño, estable, monomérica y ATP-independiente. Estas ventajas la hacen eficaz para su empleo como reportero para la evaluación extracelular *in vitro* de compuestos antituberculosos (anti-TB) y ensayos de High Throughput Screening (HTS).

La construcción del micobacteriófago se realizó mediante la incorporación del gen de la luciferasa *Nluc* (Promega) en el fásmidio phAE159 que fue empleado previamente como base en la construcción de fagos reporteros fluorescentes. Se llevó a cabo una estrategia de clonado mediante la cual se reemplazó el plásmido pYUB328 presente en el phAE159 con el plásmido pYUB54::*hsp60-RBSgp9-NanoLuc* que permite el empaquetamiento *in vitro* en el fago lambda. Posterior a la transducción de *E. coli* y selección de los clones recombinantes, el ADN recuperado se empleó para transformar *M. smegmatis* mc² 155 y obtener playas de lisis.

Luego de evaluar la funcionalidad del nuevo fago expresando la enzima NanoLuc, se obtuvo un stock de alto título (5×10^{12} UFP/mL) que se empleó para optimizar la infección de *M. tuberculosis* mc² 6230 en formato de microplaca de 96 pocillos. Se evaluaron las condiciones de cantidad de inóculo, multiplicidad de infección (MOI, relación fago/bacteria), tiempo de incubación con la droga y tiempo de infección óptimas para lograr la máxima señal luminiscente utilizando un luminómetro. Las mismas resultaron ser de 1×10^7 UFC a MOI 5, con un tiempo de 48 hs de preincubación con la droga y 48 hs infección con el fago. La relación Señal: *Background* (S/B) para el fago NanoLuc fue de 52:1 en comparación a una relación 5:1 obtenida previamente con los fagos reporteros fluorescentes, aumentando considerablemente la ventana activa del ensayo para la evaluación de drogas anti-tuberculosas.

El nuevo fago NanoLuc podría convertirse en una poderosa herramienta para el HTS de drogas anti-TB en la industria farmacéutica. Actualmente, se están realizando ensayos con compuestos conocidos y sintetizados en nuestro grupo de investigación para evaluar su actividad, resultando ser de suma preeminencia la operatividad y rapidez en la obtención de una pronta respuesta, acortando los tiempos en la búsqueda de candidatos líderes.

AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS A PARTIR DE MUESTRAS DE CARNE PICADA PARA BIOCONTROL DE *Escherichia coli* PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA

RODRÍGUEZ, V.A. (1); KRÜGER, A. (1); LUCCHESI, P.M. A. (1).

1. Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN-CONICET-CIC-UNCPBA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, Argentina.

varodriguez@vet.unicen.edu.ar

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es un patógeno alimentario emergente a nivel mundial y los bovinos son su principal reservorio. Distintos estudios han mostrado que una proporción importante de la carne en frigoríficos y comercios minoristas se encuentra contaminada con STEC. Esta contaminación puede ocurrir por contacto con el cuero o el contenido intestinal durante la faena o con superficies y equipos contaminados. Además, la formación de *biofilms* sobre diferentes superficies favorece la persistencia de la bacteria en la industria alimentaria. Los síntomas de una infección con STEC suelen ser calambres abdominales y diarrea, la cual puede progresar a sanguinolenta y, en casos más graves, conducir al desarrollo de síndrome urémico hemolítico (SUH), una enfermedad endémica en Argentina. Existen distintos serogrupos de STEC asociados a enfermedades graves; el aislado a nivel mundial con mayor frecuencia es O157, seguido por O26, O103, O111, O121 y O145. Muchos investigadores han encontrado a los bacteriófagos y a las enzimas fágicas como herramientas interesantes, efectivas y seguras para resolver problemas asociados a patógenos en el sector de los alimentos. Dado que los bacteriófagos siguen rutas de diseminación en el medio ambiente similares a las de sus hospedadores, la mejor estrategia es buscarlos en lugares donde se encuentra el patógeno de interés. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue aislar, a partir de carne picada, bacteriófagos para el control de cepas STEC de diferentes serogrupos. Se tomaron un total de 22 muestras de carne provenientes de diferentes carnicerías ubicadas en la ciudad de Tandil. Las muestras se pre-incubaron durante 16 h en caldo LB suplementado con 10 mM de CaCl₂. Luego de tratarlas con cloroformo y centrifugarlas, los sobrenadantes se ensayaron sobre 16 cepas STEC aisladas de bovinos (n=9) y de productos cárnicos (n=7) (serogrupos O26, O91, O103, O111, O113, O145, O157, O174) mediante la técnica de *spot test*. Posteriormente, se confirmó la presencia de bacteriófagos en las muestras que mostraron efecto lítico empleando el método de doble capa de agar. Se obtuvieron sobrenadantes con efecto lítico sobre una o más cepas STEC a partir de 13 muestras y se identificaron 9 bacteriófagos que producen placas de lisis translúcidas sobre cepas STEC. Además, tres de ellos mostraron un halo alrededor de las placas de lisis que sugiere la presencia de polisacárido-depolimerasas. Aunque son indispensables estudios posteriores, los bacteriófagos identificados representan una posible alternativa para el biocontrol de STEC, algunos de los cuales además codificarían polisacárido-depolimerasas que serían útiles para el control de *biofilms*.

UTILIDAD DE FLUOMICOBACTERIOFAGOS PARA EL DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS GANGLIONAR EN PACIENTE HIV BAJO TRATAMIENTO ANTIFIMICO: REPORTE DE UN CASO

Seijo AP(1,2), Matteo (2), Vázquez M(2), Costa N(2), Palmero JD(2), Piuri M(1).

1. Laboratorio de bacteriófagos y aplicaciones biotecnológicas. Departamento de Química Biológica- IQUIBICEN CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, CABA, Argentina.
2. Laboratorio de las micobacterias Abel Cetrangolo, Instituto de Tisioneumonología Raúl F. Vaccarezza, Hospital de Infecciosas Dr. F. J. Muñiz, Buenos Aires, Argentina

El diagnóstico de tuberculosis en muestras clínicas diferentes a esputo continúa siendo un gran desafío. Aproximadamente 10-25% de la tuberculosis se presenta con formas extrapulmonares, y estas muestras suelen ser paucibacilares. Los Fluomicobacteriófagos (Fmbt) tiene la capacidad de infectar específicamente a bacterias del género *Mycobacterium* spp. Ha sido demostrado su utilidad para el diagnóstico en muestras respiratorias, pero su utilidad en muestras diferentes a esputo aún no ha sido explorada. Describimos un caso de TB diseminada en paciente HIV/SIDA bajo tratamiento anti fímico con diagnóstico de TB en biopsia de ganglio cervical a través de la utilización de Fmbt.

Caso Clínico: Paciente de 25 años con diagnóstico de HIV transmisión vertical, CD4 89 cel/ul (7%) CV 50000 copias/ml en tratamiento con FTC/TDF/DRVr/RAL mala adherencia, Sífilis secundaria tratada, internación en el año 2020 por Tuberculosis diseminada, realizado tratamiento antifímico de forma incompleta en dos oportunidades, reiniciando tratamiento con 4 drogas de primera línea (HREZ) el 3/4/2022. Concurre a guardia en Jul-2022 por presentar fiebre, astenia y drenaje de material purulento a nivel de ganglio cervical. Refiere nuevo abandono de tratamiento en jun-2022 por intolerancia oral. Ante la posibilidad de recaída de la enfermedad por mala adherencia vs resistencia antibiótica se tomó nueva muestra de ganglio cervical el cual presento baciloscopia positiva ++ con bacilos rotos en directo y cultivo pendiente.

Materiales y métodos: Se centrifugo el remante de líquido de punción-aspiración de ganglio cervical a 4000rpm por 12 minutos. Se suspendió el pellet en 400 μ l de PBS (buffer fosfato salino) dividiéndolo en 4 alícuotas de 100 μ l. A cada tubo se adicione 150 μ l de medio 7H9 +OADC(2X). Las determinaciones se completaron de la siguiente manera: Control con 50 μ l de PBS. PNB: 50 μ l de una solución de PNB (ácido para-nitro benzoico) 3 mg/ml. RIF: 50 μ l de una solución de Rifampicina 24 μ g/ml, INH 10 μ l de una solución 3 μ g /ml. Se incubaron a 37°C durante 96 hs. Se infecto con 50 μ l de fago mCherrybomb (10^{10} UFP/ml) incubando a 37°C por 12hs. Se fijaron con 350 μ l de paraformaldehído 4% durante 3 hs. Finalmente se centrifugo a 4000 rpm por 5min resuspendiendose el pellet en 10 μ l de PBS para su observación en microscopio de fluorescencia.

Resultados y discusión: Se obtuvo fluorescencia en la muestra control, por lo que se consideran bacilos viables. No se observó fluorescencia para PNB, Isoniazida y Rifampicina. Su clasificación final fue: *M. tuberculosis* Sensible SIRI sensible. Los resultados obtenidos fueron confirmados luego por cultivo en MIGT y Lowenstein Jensen. Se presento un caso de fallo terapéutico con posibilidad de resistencia a drogas de primera línea (INH) y (RIF) por sus múltiples abandonos. Es interesante señalar que se pudo determinar en la sensibilidad a INH y RIF en una muestra extrapulmonar en solo 5 días, lo que permitiría tomar conductas terapéuticas adecuadas.

USO DE FLUOMICOBACTERIOFAGOS PARA EL DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS EN MUESTRAS RESPIRATORIAS. COMPARACION ENTRE METODOS FENOTIPIICOS.

Seijo AP (1,2), Matteo (2), Vázquez M (2), Costa N (2), Palmero JD (2), Piuri M(1).

1. Laboratorio de bacteriófagos y aplicaciones biotecnológicas. Departamento de Química Biológica- IQUIBICEN CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, CABA, Argentina.
2. Laboratorio de las micobacterias Abel Cetrangolo, Instituto de Tisioneumonología Raúl F. Vaccarezza, Hospital de Infecciosas Dr. F. J. Muñiz, Buenos Aires, Argentina

La tuberculosis (TB) es la principal causa de mortalidad por un agente infeccioso. Se estima que más de 1.7 billones (22% población mundial) están infectados con TB^{1,2}. Los Fluomicobacteriófagos (Fmbt) tienen la capacidad de infectar específicamente a bacterias del género *Mycobacterium* spp. Hemos demostrado que los FmbT pueden ser empleados con éxito para la detección de *M. tuberculosis* en muestras respiratorias y determinar resistencia a Rifampicina³. El objetivo de este trabajo es ampliar los datos para reforzar la utilidad de los Fmbt en el diagnóstico de la TB pulmonar, así como comparar el tiempo de diagnóstico con otros métodos fenotípicos.

Materiales y métodos: Se centrifugó el remanente de esputo procesado a 4000 rpm por 12 minutos. Se resuspendió el pellet en 300 μ l de PBS (buffer fosfato salino) dividiéndolo en 3 alícuotas de 100 μ l. A cada tubo se adicionó 150 μ l de medio 7H9 +OADC(2X). Las determinaciones se completaron de la siguiente manera: Control con 50 μ l de PBS. PNB: 50 μ l de una solución de PNB (ácido para-nitro benzoico) 3 mg/ml. RIF: 50 μ l de una solución de Rifampicina 24 μ g/ml. Se incubaron a 37°C durante 96 hs. Infectándose con 50 μ l de una suspensión de fago mCherrybomb (10^{10} UFP/ml) incubando a 37°C por un mínimo de 12hs. Se fijaron con 350 μ l de paraformaldehído 4% durante 3 hs. Finalmente se centrifugó a 4000 rpm por 5 min resuspendiéndose el pellet en 10 μ l de PBS para su observación en microscopio de fluorescencia.

Resultados y Discusión: De las muestras analizadas se obtuvieron 19 resultados positivos empleando muestras de esputo. Ninguna de las 19 muestras fue positiva en presencia de PNB por lo que se clasificaron como *M.tuberculosis* confirmándose luego por cultivo, el PNB permite diferenciar micobacterias del complejo TB (MTB) de no tuberculosas (MNT), lo cual resulta particularmente atractivo considerando que muchas de las muestras provenían de pacientes HIV/SIDA donde el diagnóstico para diferenciar entre MTB y MNT suele ser un desafío. Solo una muestra de esputo presentó resistencia a (RIF), la cual no se confirmó aún por otros métodos. Por otro lado, dos muestras que se informaron sensibles a RIF por FmbT, fueron resistentes en MGIT. Esto podría deberse a que el esputo es una muestra poco homogénea y los remanentes del esputo que utilizamos con Fmbt probablemente no presenten la misma carga bacilar que el esputo inicial con el cual se procesaron las muestras para baciloscopia y cultivo. Los resultados empleando Fmbt se obtuvieron a los 5 días (96 hs incubación + 24 hs infección). Se calculó la media de positividad en días para MGIT siendo de 6,81 (mediana/moda =7).

Conclusión: Si bien estos resultados son preliminares nuestro método muestra una de las ventajas más claras: disminuir el tiempo de diagnóstico con un método fenotípico (solo 5 días) permitiendo evaluar sensibilidad a drogas anti fímicas y a un costo mucho menor comparado al MGIT. Es necesaria la realización de estudios multicéntricos para posicionar a los Fmbt como nuevo método diagnóstico para la TB.

1. Jong BC, Antonio M, Gagneux S. *Mycobacterium africanum*--review of an important cause of human tuberculosis in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4:e744.

2. Hoube RM, Dodd PJ. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. *PLoS Med* 2016; 13:e1002152.

3. Rondon L, Piuri M y Col. Fluoromicobacteriophages Can Detect Viable *Mycobacterium tuberculosis* and Determine Phenotypic Rifampicin Resistance in 3–5 Days From Sputum Collection. *Front. Microbiol.* 05 July 2018 Sec. Infectious Agents and Disease.

ACTIVIDAD DESINFECTANTE DE BACTERIÓFAGOS EN SUPERFICIES DE HUEVOS

Ortiz, X. (1); Barrios, H. (1)

1. Universidad Nacional de Luján, Departamento de Ciencias Básicas, Luján, Argentina.

El objetivo de la industria avícola de reproductoras es la obtención del mayor número posible de pollitos viables de un día, y para disminuir al máximo las condiciones adversas a las que puede enfrentarse el embrión se deben cumplir estrategias adecuadas en el manejo de los huevos para minimizar la contaminación de la cáscara. Los bacteriófagos son virus que infectan y lisan bacterias. Son inocuos para la salud del ser humano, plantas y animales, y su actividad lítica junto a la característica de ser huésped específico los ubica como alternativa terapéutica y profiláctica frente a patógenos como *Salmonella*. Para evaluar la eficacia de un cóctel de bacteriófagos como una herramienta desinfectante sobre superficies de huevos, se contaminaron experimentalmente 24 huevos no embrionados sumergiéndolos en cultivos de una cepa de *Salmonella* Enteritidis (SE) de concentración 10^{10} unidad formadora de colonias/ml (UFC/ml). Se dejaron secar en flujo laminar y posteriormente se aplicaron los siguientes tratamientos por aspersión (6 huevos por tratamiento): cóctel de tres fagos que lisan *Salmonella* (F) de 10^{12} unidad formadora de placas/ml (UFP/ml), desinfectante de amonio cuaternario (D), mezcla de fagos y desinfectante (M) preparado con los componentes en igual volumen, y se dejó un grupo control (C) que no recibió tratamiento. Nuevamente se dejó secar en flujo laminar, y a las 2 horas y 24 horas post tratamiento con un hisopo de arrastre embebido en solución fisiológica (SF) se tomaron muestras de una superficie de 4 cm^2 que se colocó en frascos con 50 ml de SF, para luego realizar el recuento en placa (de XLD) para determinar la concentración de la bacteria, y por spot test se comprobó la presencia de fagos. En el recuento microbiano en los huevos a las 2 hs (en logaritmo (UFC/cm²)) los tratamientos difieren significativamente con el control (ANOVA, con un nivel de significancia del 95 %) pero no entre ellos. 24 hs postratamiento y haberlos dejado a temperatura ambiente, se repitió el recuento y solo se contó UFC en 3 superficies control, 1 de mezcla y 2 de fagos. Todos resultaron menores a 30 colonias. En todas las superficies donde se aplicó el cóctel de fagos se encontraron presentes a las 2 hs postratamiento (título entre 10^{11} y 10^6) mientras que en la mezcla el título fue menor (entre 10^4 y 10^2). A las 24 hs solo se encontraron fagos en 3 tratados con el cóctel y 2 de la mezcla. Aunque en la industria la desinfección en seco del huevo fértil con paraformaldehído se prefiere porque disminuye la humedad con respecto al método por aspersión, el uso de un cóctel de fagos demostró en este ensayo su eficacia para disminuir la carga bacteriana de superficies contaminadas experimentalmente. Por lo tanto, se podrían utilizar fagos como una herramienta complementaria para el control de microorganismos sobre superficies, y de ese modo evitar el empleo masivo de tratamientos químicos que pueden favorecer la selección y proliferación de bacterias resistentes.

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL CONTENIDO DE PROFAGOS PRESENTES EN CEPAS DE *Streptococcus agalactiae* RECUPERADAS DE UN ESTUDIO MULTICÉNTRICO DE ARGENTINA y COMPARACIÓN EN UN CONTEXTO GLOBAL

Verónica Kovacec (1), Mario Pajón (1), Tomás Poklepovich (2), Josefina Campos (2), Uzma Basit Khan (3), Dorota Jamrozy (3), Stephen Bentley (3), Marta Mollerach (1,4), Sabrina Di Gregorio (1), Laura Bonofiglio (1,4,*)

1. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Instituto de Bacteriología y Virología Molecular. Buenos Aires, Argentina.
 2. Plataforma de Genómica y Bioinformática, INEI-ANLIS, Malbrán, Buenos Aires, Argentina.
 3. Wellcome Sanger Institute, Cambridgeshire, Reino Unido.
 4. CONICET, Argentina.
- *lbonofi@ffyb.uba.ar

El rol de los profagos en la epidemiología de *Streptococcus agalactiae* (EGB) aún se encuentra en estudio. El objetivo de este trabajo fue caracterizar el contenido de profagos de 365 cepas de EGB recuperadas de infecciones invasivas, urinarias y de tamizaje prenatal en humanos, recolectadas en el marco de un Estudio Nacional Multicéntrico de Argentina (realizado entre 2014 y 2015), en el contexto de los datos epidemiológicos y genómicos de dichas cepas y de otros genomas de EGB disponibles en bases de datos

La secuenciación del genoma completo se realizó con tecnología Illumina y los ensamblajes *de novo* se realizaron con SPAdes. Adicionalmente, 103 ensamblajes de EGB aislados en humanos en 17 países (5 continentes) fueron obtenidos de NCBI. Todos los ensamblajes fueron anotados con Prokka. Se construyó un árbol filogenético de SNPs de genoma *core* utilizando Roary, SNP-sites y IQTREE. Se determinaron los serotipos mediante BLASTn de genes capsulares de referencia (Sheppard, 2016) y se asignaron MLST y complejo clonal (CC) con PubMLST. Se utilizó ABRicate para la búsqueda de determinantes de resistencia antibiótica (DRA), factores de virulencia (FV) y replicones plasmídicos (RP). La detección y clasificación de profagos se realizó según grupo profágico (A-F) por PCR *in silico* (según van der Mee-Marquet, 2018) y/o según tipo de integrasa (GBSint) por BLASTx contra una base de datos de GBSint (según Crestani, 2020). Se utilizó Microreact para la visualización integral de los resultados.

El análisis filogenético evidenció que las cepas de EGB argentinas se encuentran relacionadas con cepas de otras partes del mundo. Se hallaron entre 1 a 4 profagos en el 83% de las cepas, que fueron clasificados en al menos 15 tipos profágicos diferentes. Se encontraron diferencias en la distribución de profagos según el origen de los aislamientos, siendo las cepas provenientes de infecciones invasivas en neonatos las que tuvieron menor cantidad de profagos. En todos los casos los tipos profágicos más frecuentes fueron el A y el E/GBSint3. Asimismo, se detectó variación en el contenido de profagos según el serotipo y CC. La mayor cantidad de profagos por cepa se encontró en CC17, CC19 y serotipo III y la menor cantidad en CC23 y serotipo Ia. Los profagos tipo A se encontraron en su mayoría en los CC1, CC12 y CC19 y serotipos V y Ib, mientras que los profagos tipo E/GBSint3 se encontraron en su mayoría en los CC23 y CC452 y serotipo Ia. No se encontró relación entre la presencia de DRA, VF o RP y presencia de profagos.

Este es el primer reporte del contenido de profagos en aislamientos de EGB representativos de la epidemiología de este patógeno en Argentina. Es destacable que las cepas de EGB argentinas y sus profagos están relacionados con los circulantes en otras partes del mundo. La detección de mayor cantidad de profagos en CC virulentos sugeriría que estos cumplen un rol en la diseminación de las cepas de EGB, lo que debería ser corroborado mediante nuevos abordajes.

RECUPERACIÓN VIRAL A PARTIR DE HORTALIZAS DE HOJA

Maidana-Kulesza, MN (1); Ontiveros, FB (2); Rajal, VB (1,3); Poma, HR (1)

1. Instituto de Investigaciones para la Industria Química (UNSa-CONICET), Salta, Argentina.
2. Facultad de Ciencias Naturales, UNSa, Salta, Argentina.
3. Facultad de Ingeniería, UNSa, Salta, Argentina

Dada la alta prevalencia de virus entéricos en matrices acuosas que pueden ser empleadas para el riego de alimentos que se consumen crudos, como por ejemplo las hortalizas de hoja, se recomienda la realización de análisis profundos para una mayor seguridad alimentaria. Sin embargo, el Código Alimentario Argentino no contempla el análisis de virus gastroentéricos en alimentos y por lo tanto no existe una metodología oficial ni estandarizada para dicho análisis, por lo cual en Argentina no se disponen de datos sobre este escenario epidemiológico de contaminación y contagio. El objetivo de este trabajo fue comparar metodologías de recuperación viral a partir de hortalizas de hoja con el fin de seleccionar la de mayor eficiencia para futuros trabajos. Se eligieron a los bacteriófagos PP7 (RNA) y P22(DNA) como modelos virales debido a su fácil manipulación, obtención de grandes títulos y a su inocuidad para la salud humana. Se inocularon tres diferentes concentraciones de los bacteriófagos en muestras de lechuga y rúcula y se trabajó por triplicado. Se evaluaron tres buffers de elución: extracto de carne al 3%(BE) pH 9,5, Tris HCl 100 mM- Glicina 50 mM-Extracto de carne 3% (TGBE) pH 9,5 y Glicina (Gly) 0,25 N pH 9,5. Luego de la elución y la separación de los residuos vegetales, se compararon dos técnicas de concentración: la precipitación con polietilenglicol 20000 PM (PEG) 8% (p/v) y 0,3 M de NaCl y la floculación orgánica con leche desnatada, usando una solución prefloculada de leche desnatada (1% p/v). Se centrifugó para lograr la precipitación de los bacteriófagos y el pellet obtenido fue resuspendido en PBS 1X. Se realizó la extracción de ácidos nucleicos mediante el método Fenol-Cloroformo-Isoamilico (25:24:1) y se efectuó la detección viral cuantitativa mediante qPCR y RT-qPCR, empleando sistemas previamente validados. Con la combinación TGBE-PEG se obtuvo la mayor recuperación para ambos virus, siendo el buffer de glicina el menos eficiente. De hecho, esa combinación permitió la recuperación de hasta un 97,2 %. Por otro lado, el método de la floculación orgánica con leche desnatada no fue eficiente como método de recuperación para ambos virus, mostrando porcentajes muy bajos (<10 %), pero logrando una mejora en los porcentajes cuando se trabajó con buffer de glicina. El desarrollo de este trabajo permitió establecer la elución con buffer TGBE y la precipitación con PEG como la metodología más eficiente de recuperación viral en este tipo de matriz alimentaria. Además, la recuperación es posible tanto a altas como bajas concentraciones, aspecto que resulta de importancia para la vigilancia epidemiológica de virus entéricos, puesto que estos presentan una dosis infectiva baja (1-10 partículas). Nuevamente, se hace evidente la importancia del trabajo con bacteriófagos y la gran amplitud y variedad de sus aplicaciones en la investigación científica.

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE BACTERIÓFAGOS AISLADOS A PARTIR DE AGUAS RESIDUALES PROVENIENTES DE LA PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA DE LA CIUDAD DE PANAMÁ

Montalvo-Juárez M.A.(1,3,4), Ramírez A.(2,3,4), Hall G. (2,3,4), González-Gómez J.P. (5), Mejía F.(1,3,4), Cornejo H. (2,3,4), Querol Audi J. (1,3,4), Castro N. (5), Chaidez C (5), Martínez-Torres A.O.(2,3,4).

1. Programa de Maestría en Microbiología Ambiental, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, Universidad de Panamá, Panamá, Panamá.
2. Licenciatura en Biología con Orientación en Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, Universidad de Panamá, Panamá, Panamá.
3. Laboratorio de Microbiología Experimental y Aplicada, Universidad de Panamá, Panamá, Panamá.
4. Laboratorio de Microbiología de Aguas, Universidad de Panamá, Panamá, Panamá.
5. Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Culiacán, Sinaloa, México.

La vulnerabilidad en salud, resultado de infecciones por un creciente número de bacterias multirresistentes, el uso indiscriminado de antibióticos en salud animal, los ineficientes métodos para la desinfección y sanitización en las cadenas de producción, aunado a la complejidad, toxicidad y efectos secundarios que pueden acarrear los nuevos productos farmacológicos y bactericidas, son problemática de escala mundial, que han tomado fuerza en los últimos años, y que requiere de soluciones oportunas y eficientes. En Panamá, los estudios sobre bacteriófagos y su posible utilidad como alternativa a la terapia antimicrobiana y/o control biológico son escasos. El objetivo de este proyecto es aislar, cuantificar, caracterizar biológica y genotípicamente bacteriófagos que posean actividad lítica contra cepas bacterianas multirresistentes ambientales y clínicas a partir de aguas residuales provenientes de la planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) de la ciudad de Panamá. Se seleccionaron para el aislamiento bacteriófagos aplicables a cepas de referencia de *E. coli* (ATCC 8739, 11229 y 15597), *Salmonella* enterica. (ATCC 29934, 9842 y 14028) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027). Se aplicaron ensayos basados en las técnicas de doble capa de agar en el aislamiento, purificación y caracterización biológica. Se realizaron procesos de enriquecimiento selectivo y posteriormente se realizaron entre 3 a 5 rondas de purificación con el fin de obtener bacteriófagos puros. Para la caracterización biológica se evaluó su sensibilidad al cloroformo, pH, luz UV y temperatura. Para la caracterización genética se realizaron extracciones de ADN, se verificó la integridad del ADN por electroforesis en gel de agarosa, y la pureza y concentración con un espectrofotómetro de microvolúmenes (NanoDrop). Se secuenció el genoma completo de cada fago aislado para cada cepa ATCC utilizando tecnología Illumina. La calidad de las secuencias obtenidas fue evaluada con FastQC versión 0.72 y se está realizando el ensamblaje “de novo” utilizando el software SPAdes versión 3.12.0. La secuencia ensamblada fue anotada utilizando la herramienta RAS kit (RASTtk) y VIGOR4 del Centro de Recursos de Bioinformática Bacteriana y Viral (BV-BRC). Se construyó un árbol filogenético basado en las secuencias más relacionadas con el bacteriófago investigado. Para ello se realizó un BLAST de genomas completos homólogos y se construyó un árbol con la herramienta IQtree. La caracterización biológica identificó 5 bacteriófagos sensibles al cloroformo, para la exposición a la luz UV de onda corta a una distancia de 20 cm a intervalos de tiempo de 20s, 40s, 60s y 90s sensibilidades intermedias a muy sensibles con una reducción significativa en la formación de unidades formadoras de placa y la peculiaridad de que el bacteriófago para la cepa 14028 aumentó su número de placas de lisis; los bacteriófagos fueron sensibles a pH ácido con un desarrollo eficiente a pH alcalino; la temperatura óptima se determinó en 37°C

con un rango temperatura de desarrollo aceptable entre 25°C y 50°C. El ADN secuenciado, fue analizado con diferentes herramientas bioinformáticas determinado la estructura del genoma y anotando las proteínas para las que codifica su material genético, se construyó un árbol filogenético el cual ubicó por ejemplo al bacteriófago Escherichia phage 15MA597 como un posible nuevo bacteriófago dentro del Orden: *Caudoviricetes*, Familia: *Myoviridae*, Subfamilia: *Tevenvirinae*, Género: *Mosivirus*. Actualmente, se están realizando análisis complementarios que permitan determinar las posibilidades de emplear los bacteriófagos aislados en cócteles que tengan utilidad clínica o procesos de sanitización. Se aislaron cepas ambientales de *E. coli* y *Salmonella* spp. de las mismas muestras de agua residual y se analizó su perfil de sensibilidad, obteniendo algunas cepas resistentes a distintos antibióticos. Se observaron algunas de las cepas de *Salmonella* spp. que tienen BLEE del tipo Cefotaximasa y algunas con carbapenemasa positivas, lo que nos indica que podrían ser *Salmonella infantis*. También, en cepas de *E. coli* se observaron BLEE positivas. En el rango hospedero se observó que de las 17 cepas de *E. coli* ambientales, la cepa EcAR B19-4 fue sensible al bacteriófago ATCC-15597, las cepas EcAR B19-4 y EcAR C10-1 sensibles al fago ATCC-11229 y las cepas EcAR B19-4, EcAR C10-1, EcAR C15-2 y EcAR B25-1 sensibles al fago ATCC-8739. En todos los casos con placas de lisis de apariencia turbia. Para el caso de las 12 cepas de *Salmonella* spp. ambientales, las cepas SLAR I14-3 y SLAR A22-7 resultaron sensibles al fago ATCC-9842, con placas de lisis turbias. Las cepas SLAR C22-3 y SLAR A22-7 sensibles al fago ATCC-14028 con placas de lisis turbias, y la cepa SLAR I14-3 sensible a este fago, pero con una placa de lisis claramente marcada. Finalmente, se logró concluir que es posible aislar de las aguas residuales bacteriófagos con actividad lítica frente a cepas ATCC y cepas silvestres de *E. coli* y *Salmonella* spp.

EVALUACIÓN DE CÓCTEL DE BACTERIÓFAGOS CONTRA SALMONELLA INFANTIS MULTIRRESISTE A LOS ANTIBIÓTICOS

Barrón-Montenegro Rocío (1), Álvarez-Espejo Diana (1), Fredes-García Diego (1), Martínez Cristóbal (1), Rivera Dácil (2), Dueñas Fernando (2), Moreno-Switt Andrea (1).

1. Laboratorio de Inocuidad Alimentaria, Escuela Medicina Veterinaria, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago.
2. Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile.

Salmonella spp. es conocida por ser un patógeno alimentario a nivel mundial, causante de 155.000 muertes al año. Desde la última década el serovar Infantis ha aumentado su incidencia en granjas y pollo ya procesado, con altos niveles de resistencia a los antimicrobianos, por la presencia de un mega plásmido, que confiere resistencia a antibióticos y desinfectantes. Esto genera una necesidad en términos de biocontrol para la industria con un alto impacto económico en Chile, por lo que en este trabajo se aborda la generación de un coctel de bacteriófagos como biocontrol de *S. Infantis*. Se propuso como objetivo del trabajo la caracterización genómica de bacteriófagos y generación de una herramienta de biocontrol basada en bacteriófagos para reducir *Salmonella* Infantis. En 6 fagos que infectan *Salmonella* Infantis (F1, F2, F3, F4, F5 y F6), se caracterizó la morfología por medio de microscopía electrónica de transmisión (TEM), se secuenció el genoma completo, procesamiento y anotación de los genomas. Se analizó el rango de hospedero con 9 cepas de distinto origen de aislamiento de *S. Infantis* y 22 aislados de serovares distintos de *S. enterica*. Se realizaron curvas de lisis de los fagos individuales y en cóctel de 3 fagos seleccionados por 7 horas a una MOI de 10 y 100 en tres réplicas biológicas, realizando medición de Densidad óptica (DO) y recuento de unidades formadoras de colonia (UFC/mL) cada hora. Las imágenes TEM mostraron para todos los fagos una capsida icosaédrica, siendo los fagos F2, F4, F5 y F6 con colas largas rectas y el fago F1 con cola larga flexible. Se clasificaron los fagos en base a su rango de hospedero, donde se observó que los fagos F1, F2 y F3 lisaron, 8, 8 y 7 cepas de *S. Infantis* respectivamente. Por otro lado, al testear los 22 serovares, se clasificaron los fagos F1, F2 y F3 como de amplio rango hospedero, generando una lisis de 20, 15, 13 serovares, fagos con los que se continuó trabajando, el fago F1 lisó además a *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, serovares de relevancia clínica en Chile. Taxonómicamente fago F2 es del género *Felixounavirus* y los F1 y F3 al género *Tlsvirus*, teniendo ambos un tamaño de genoma aproximado de 46 kpb y el fago F2 de 89 kpb, respectivamente los genes predichos son 78, 145 y 77 (F1, F2 y F3). Las curvas de lisis de los fagos individuales redujeron el crecimiento de *S. Infantis* en promedio para la MOI 10 fue de 4.03, 4.73 Log CFU/mL para los fagos F1 y F2 respectivamente. Luego se aumentó la MOI a 100, observándose una reducción en el crecimiento de *S. Infantis* en promedio de 4.82, 5.00 y 4.98 Log CFU/mL respectivamente para los fagos F1, F2 y F3 comparado con el control. Finalmente, en la evaluación del coctel de F1, F2 y F3, redujo en 9.6 Log UFC/mL a las 6 horas de infección en comparación con la curva control de *S. Infantis* PM57 con una MOI 100 ($p < 0.05$). Los tres fagos seleccionados que conformaron el coctel, fueron capaces de reducir significativamente a *Salmonella* Infantis en condiciones de cultivo. Por lo que tendrían el potencial de ser una estrategia de biocontrol para *S. Infantis* multirresistente, con eventual aplicación en carne de pollo para prevenir salmonelosis.

BACTERIOFAGOS CON EL POTENCIAL DE INACTIVAR *ESCHERICHIA COLI* EN MEDICINA VETERINARIA

Silva, B. G. B. (1); Silva, E.C. (1); Vila, M. M. D. C. (1); Fiol, F. S. D. (1);
e Balcão, V. M. (1,2)

1. PhageLab – Laboratório de Biofilmes e Bacteriófagos, Universidade de Sorocaba, Sorocaba/SP, Brasil.
2. Departamentode Biologia e CESAM, Universidade de Aveiro, Campus Universitário de Santiago, Aveiro, Portugal.

El uso indiscriminado de antibióticos ha resultado en la selección y resistencia bacteriana, lo que ha dado lugar a terapias tóxicas y de alto costo, con la aparición de cepas multirresistentes. *Escherichia coli* es uno de los microorganismos más prevalentes en infecciones bacterianas en ambientes veterinarios, siendo frecuentemente asociado con infecciones del sistema reproductivo de varias especies animales. En este contexto, la terapia con fagos es una opción de tratamiento potencial para infecciones bacterianas, con resultados prometedores. El objetivo de la investigación aquí descrita fue aislar, caracterizar y probar, en ensayos *ex-vivo*, fagos líticos para *E. coli*, con vistas a posibles aplicaciones en medicina veterinaria. Para ello se llevaron a cabo los siguientes pasos: 1) aislamiento de bacteriófagos líticos del efluente del Hospital Veterinario UNISO (Sorocaba/SP, Brasil) para *E. coli* (CEFAR CCCD-E003) y su propagación 2) caracterización fisicoquímica y biológica de bacteriófagos; 3) formulación de un cóctel con los bacteriófagos aislados y análisis de su efectividad *in vitro* en células planctónicas, y *ex vivo*, en aislamientos uterinos recolectados después de ovariectomía; 4) formulación de un sistema de administración para el cóctel de bacteriófagos, a base de óvulos vaginales. Los bacteriófagos aislados se caracterizaron a partir de curvas de crecimiento sincrónico de ciclo único (OSGC), donde se evaluaron los parámetros de crecimiento de las partículas de bacteriófagos aisladas. En base a estos resultados, el fago vB_EcM_US_11 mostró sus periodos de eclipse, latente, de acumulación intracelular y tamaño de explosión de bacteriófago como 20 min, 40 min, 20 min y 105,36 viriones/célula huésped, respectivamente. En el caso del fago vB_EcM_US_21, el período de eclipse, latente, de acumulación intracelular y el tamaño de explosión del bacteriófago fueron 36 min, 48 min, 12 min y 9,69 viriones/célula huésped. En los ensayos de adsorción se evaluó la unión de las partículas del bacteriófago a la célula huésped, y para ambos fagos, después de 130 min de ensayo prácticamente el 75% de las partículas del fago habían sido adsorbidas a las células huésped bacterianas. En las curvas de inactivación bacteriana producidas con el cóctel de fagos, se pudo comprobar que un valor de MOI 10 es efectivo para evitar el crecimiento de las bacterias durante las primeras 6 h del ensayo, con una reducción de 5 log en la carga bacteriana en este periodo de tiempo. El análisis de los resultados de los ensayos de inactivación bacteriana *ex vivo* indicó un buen potencial para la infección de las células huésped por bacteriófagos y la reducción concomitante de la carga bacteriana, presentando así la terapia con fagos como una alternativa prometedora a la terapia antimicrobiana convencional.