

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
Escuela de Tecnología Médica



TESIS PROFESIONAL

**Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en Bioanálisis Clínico
Molecular, Hematología y Medicina Transfusional**

**“ACTIVIDAD ANTIBIOPELÍCULA DE FAGOS LÍTICOS SOBRE *Staphylococcus aureus* METÍCILINO
RESISTENTE AISLADO DE INFECCIONES ASOCIADAS A LA ATENCIÓN EN SALUD”**

Alumno: Cristián Josías Moreno Victoriano

Tutora: MSc. María Teresa Ulloa Flores

Co-Tutor: Dr. Germán Hermosilla Díaz

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
Escuela de Tecnología Médica



TESIS PROFESIONAL

**Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en Bioanálisis Clínico
Molecular, Hematología y Medicina Transfusional**

**“ACTIVIDAD ANTIBIOPELÍCULA DE FAGOS LÍTICOS SOBRE *Staphylococcus aureus* METICILINO
RESISTENTE AISLADO DE INFECCIONES ASOCIADAS A LA ATENCIÓN EN SALUD”**

Alumno: Cristián Josías Moreno Victoriano

Tutora: MSc. María Teresa Ulloa Flores

Co-Tutor: Dr. Germán Hermosilla Díaz

Fecha: 17 de Julio de 2023

Acta de evaluación final de la tesis profesional



Santiago, 19 de octubre de 2023

ACTA CURSO TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

El **Sr. Cristian Josias Moreno Victoriano**, estudiante de Tecnología Médica con Mención en Bioanálisis Clínico Molecular, Hematología y Medicina Transfusional, cumpliendo con los requisitos establecidos en el plan de estudio, realizó durante el noveno semestre de la carrera, la Tesis Profesional titulada: **“ACTIVIDAD ANTIBIOPELÍCULA DE FAGOS LÍTICOS SOBRE *Staphylococcus aureus* METICILINO RESISTENTE AISLADO DE INFECCIONES ASOCIADAS A LA ATENCIÓN EN SALUD”**, dirigida por la **Profa. MSc. María Teresa Ulloa Flores** Directora Laboratorio Centro I+D+i Vertebral y el **Prof. Dr. Germán Hermosilla Díaz** académico del Programa de Microbiología y Micología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

La Escuela de Tecnología Médica designó para su corrección una Comisión integrada por el: **Prof. Gonzalo Osorio** y el **Prof. Victor García**, ambos académicos del Programa de Microbiología y Micología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

La calificación obtenida se detalla a continuación:

Corrector 1 Gonzalo Osorio	6.75	25%
Corrector 2 Victor García,	6.66	25%
Tutor(es) Guía:		
Evaluación intermedia	7.00	25%
Nota final tutor	6.80	25%
Nota final tesis profesional	6.80	

En consecuencia el estudiante **Cristian Josias Moreno Victoriano** aprueba satisfactoriamente la asignatura.



Profa. Rosana Muñoz Videla
Coordinador(a) curso
Trabajo de Investigación



HERNAN RODRIGO
TORRES RIVERA
15.932.579-2
19/10/2023 - 11:24
ESTE DOCUMENTO CONTIENE FIRMA ELECTRÓNICA AVANZADA
<https://cecepapel.uchile.cl/validacion/verificador>
CV: 65313c08051af3192a687ac4

Prof. Hernán Torres.
PEC curso
Trabajo de Investigación

Dedicatoria

Le dedico esta tesis a mi familia, tanto a mis padres como a mis hermanos. Cada vez que me sentí superado, cansado o desmotivado, pensaba en ellos, noche tras noche, prometiéndoles discretamente que superaría este proceso para llegar a ser el profesional que les he confiado y que sé que esperan de mí. Jamás los defraudaré, y gracias a ellos soy quien soy, y así también, muchas gracias por estar ahí para mí.

También le dedico esta tesis a mi polola Isidora Pizarro, por ser la persona que estuvo incondicionalmente allí, al lado mío, soportando mis frustraciones, enojos, cuestionamientos y un sinfín de emociones que sentí en este largo proceso. Sin pedírselo, ella quiso ser parte de esta etapa en mi profesión, ayudándome a encontrar las fuerzas y motivaciones que son necesarias para sacar esto adelante. Gracias por siempre escucharme, por estar ahí aunque no sea físicamente, por ser atenta conmigo y estar siempre preocupada. Gracias por ser tan tú.

Por último, le dedico esta tesis a Sergio Carrasco, Francisca Díaz y Pamela Cornejo, quienes estuvieron día a día alegrando mis días en el laboratorio, conversando y haciendo que este trabajo no fuera monótono. Sin ellos, hubiera sido totalmente distinta la estadía.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad de Chile por garantizar la realización de esta etapa experimental en mi formación profesional como Tecnólogo Médico.

Agradezco a la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile por los conocimientos entregados, por su análisis y la disposición de permitirme realizar una tesis fuera de la facultad.

Agradezco a COANIQUEM y Vertebral por permitirme desarrollar mi trabajo de investigación en sus dependencias, y por entregarme todo lo necesario.

Finalmente, agradezco profundamente a la profesora María Teresa Ulloa, quien fue mi tutora de tesis y que me guió por este largo camino, que resolvió mis dudas y que me formó para lograr ser un

profesional íntegro en el área de la investigación clínica. También agradezco al profesor German Hermosilla Díaz, quien fue mi cotutor de tesis y que al igual que la profesora María Teresa, me ayudó, resolvió dudas y me apoyó cuando lo necesite. Así también, agradezco a cada integrante de Vertebral, con especial énfasis en Camila Sanhueza, por ser mi tutora de laboratorio y quien me enseñó las metodologías y protocolos de trabajo internos, por su vocación y docencia.

Índice

1.- Resumen.....	4
2.- Introducción.....	5
2.1 - <i>Staphylococcus aureus</i>	5
2.2 - Resistencia de <i>S. aureus</i> a los antimicrobianos y su relevancia a nivel mundial.....	6
2.3 Factores de virulencia en <i>S. aureus</i>	10
2.4 - Biopelículas en <i>S. aureus</i>	11
2.5 - Fagos líticos y fagoterapia.....	13
2.6 - Problema de investigación.....	16
2.7 - Hipótesis de investigación.....	16
3.- Objetivo General.....	17
4.- Objetivos específicos.....	17
5.- Materiales y Métodos.....	18
5.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	18
5.2 Estudio de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas.....	19
5.3 Características de los fagos líticos.....	20
5.4 Identificación de cepas SAMR productoras de exopolisacárido.....	22
5.5 Identificación y categorización de cepas SAMR formadoras de biopelículas.....	24
5.6 Ensayo de prevención de formación de biopelículas de SAMR con fagos líticos.....	26
5.7 Ensayo de degradación de biopelículas preformadas de SAMR con fagos líticos.....	27
5.8 Análisis estadístico.....	28
6.- Resultados.....	29
6.1 Identificación y estudio de susceptibilidad antimicrobiana de cepas SAMR.....	29
6.2 Identificación de cepas SAMR productoras de exopolisacárido y formadoras de biopelículas.....	30
6.2.1 Cepas SAMR productoras de exopolisacáridos.....	30
6.2.2 Detección de cepas SAMR formadoras de biopelículas.....	31
6.3 Prevención de formación de biopelículas de SAMR con fagos líticos.....	32
6.4 Degradación de biopelículas preformadas de SAMR con fagos líticos.....	36
6.5 Análisis estadístico.....	41
7.- Discusión.....	46
7.1 Identificación y categorización de cepas SAMR productoras de biopelículas.....	46
7.2 Prevención de formación de biopelículas de SAMR por fagos líticos.....	47
7.3 Degradación de biopelículas preformadas de SAMR por fagos líticos.....	49

7.3 Limitaciones.....	50
8.- Conclusiones.....	51
8.1 Proyecciones.....	51
8.2 Propuestas de investigación.....	52
9.- Referencias bibliográficas.....	52
10.- Anexos.....	56

1.- Resumen

Staphylococcus aureus es un agente patógeno causante de múltiples infecciones, tanto de la comunidad como adquiridas en el ambiente intrahospitalario o asociado a la atención en salud (IAAS). Esta bacteria es capaz de formar biopelículas, y esta forma de vida le permite adquirir un fenotipo de resistencia a la respuesta inmune de los pacientes, desinfectantes y muy importantemente a los antimicrobianos. Además, *S. aureus* Meticilino Resistente, caracterizado por poseer resistencia a la gran mayoría de los betalactámicos de uso clínico, se encuentra en el ambiente intrahospitalario y causando infecciones, asociadas a biopelícula. Frente a esto, una alternativa terapéutica prometedora es el uso de fagos líticos, virus capaces de infectar y destruir específica y selectivamente a bacterias. No tan solo por su efecto lítico, los fagos tienen actividad antibiopelícula demostrada que permitiría abordar aquellas infecciones asociadas a bacterias productoras de biopelícula. En esta investigación, se estudió la capacidad de formación de biopelículas de 50 cepas SAMR-IAAS obtenidas de hospitales de las zonas Norte, Centro y Sur de Chile, y así también se categorizaron. El 100% de las cepas hizo biopelículas, y el 46% fueron formadoras fuertes de biopelículas. Adicionalmente, se estudió la actividad antibiopelícula de 8 fagos líticos de *S. aureus*, para evaluar la capacidad de prevención de formación de biopelículas de SAMR y la capacidad de degradar biopelículas preformadas de SAMR. El 75% de los fagos fueron capaces de prevenir significativamente la formación de biopelículas ($p < 0,001$), y el 25% de ellos degradó significativamente las biopelículas preformadas ($p < 0,001$). Los resultados mostraron que los fagos pueden ser usados como agentes terapéuticos contra las biopelículas de SAMR, y así combatir la resistencia antimicrobiana a nivel mundial. Este es el primer

estudio realizado en Chile y que sienta las bases del estudio de la actividad antibiopelícula de fagos líticos contra cepas SAMR de distintos hospitales regionales del país.

Palabras clave (5)

S. aureus Meticilino Resistente, biopelículas, fagos líticos, prevención, degradación.

2.- Introducción

2.1 - *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es una bacteria Gram positiva que tiene forma de coco y que se agrupa de una manera similar a un racimo de uvas (Del griego “Staphylo” que significa “uva” y “kokkos” que significa “baya o semilla”). Este microorganismo se caracteriza por producir un pigmento, observándose característicamente de color amarillo o dorado una vez aislado en un cultivo. Debido a ello, el médico alemán Friedrich J. Rosenbach nombró a la bacteria como *Staphylococcus aureus* (del latín “oro”). *S. aureus* crece en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (anaerobio facultativo), a diferentes temperaturas (entre 18-40°C), y su identificación en el laboratorio de microbiología se puede realizar haciendo una observación macroscópica de las colonias, tinción de Gram, prueba de la catalasa, coagulasa y DNasa, así como la determinación de sensibilidad a novobiocina y fermentación del manitol, o mediante usos de sistemas automatizados en base a pruebas fenotípicas como VITEK, o espectrometría de masas como MALDI-TOF (1, 2).

S. aureus es reconocido como uno de los principales patógenos oportunistas de la población humana, que causa una alta morbilidad y mortalidad. *S. aureus* se caracteriza por colonizar distintos sitios anatómicos del ser humano. Aproximadamente, el 20-30% de los humanos presenta de manera persistente a *S. aureus* en la zona de la nariz, y también puede encontrarse en la nasofaringe, axila, piel e intestino (3). No obstante, se identifican grupos que tienden a tener tasas más altas de

colonización, como son los funcionarios de la salud, diabéticos, usuarios con algún tipo de dispositivo de acceso vascular, pacientes hospitalizados e individuos inmunocomprometidos (1). Es importante reconocer que además de la colonización humana, *S. aureus* también coloniza y causa infección en mamíferos no humanos como vacas, erizos (Erinaceinae), ovejas, cerdos, cabras, caballos, conejos, entre otros animales (3). En algunas situaciones, la colonización constituye un factor de riesgo, debido a la relación entre la amplia gama de factores de virulencia que posee *S. aureus* y los factores que dependen del hospedero y que lo pueden hacer susceptible de sufrir una infección, como por ejemplo, condiciones de inmunosupresión (diabetes, consumo de fármacos, inmunodeficiencias primarias que afectan a los neutrófilos, etc.) (4). El repertorio de infecciones que produce *S. aureus* comprende desde infecciones de piel y tejidos blandos o IPTB (foliculitis, furúnculos, abscesos, síndrome de piel escaldada, impétigo, fascitis necrotizante) hasta infecciones invasivas como artritis séptica, osteomielitis, empiema pleural, y/o diseminadas que cursan con una evolución crónica, como bacteriemia, endocarditis, infección del tracto urinario, neumonía, tromboflebitis séptica, entre otros, las cuales son enfermedades que se correlacionan con el importante rol de la formación de biopelículas por parte de *S. aureus* (5, 6). Un dato que respalda fuertemente esta correlación, es entregado por los Institutos Nacionales de Salud (NIH), que indican que el 65% del total de infecciones por microorganismos y el 80% de las infecciones crónicas están asociadas a la formación de biopelículas (7).

2.2 - Resistencia de *S. aureus* a los antimicrobianos y su relevancia a nivel mundial

En 1928, Alexander Fleming descubrió un compuesto que era capaz de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus* que tenía cultivado en Placas de Petri, el cual es sintetizado y secretado por el hongo filamentoso *Penicillium notatum*. Años más tarde, en 1941, la industria farmacéutica logró aislar y purificar dicho compuesto químico, nombrado como penicilina, y comenzó a ser administrado

a pacientes que cursaban con infecciones por *Streptococcus* (8). Sin embargo, pocos años después, aparecieron cepas de *S. aureus* resistentes a la penicilina, mediado por el gen *blaZ* que codifica una β -lactamasa (penicilinas) que hidroliza el anillo β -lactámico de la penicilina. Más tarde, en 1959 aparecieron las isoxazolilpenicilinas, un grupo de penicilinas semisintéticas antiestafilocócicas que resisten la hidrólisis por la penicilinas (dentro de ellas la meticilina), pero poco tiempo después, en 1961 en Inglaterra, se describió por primera vez a *S. aureus* Meticilino Resistente (SAMR), el cual resiste el efecto farmacológico de este subgrupo de penicilinas y de otros betalactámicos (2). Posteriormente, se pudieron distinguir dos tipos de SAMR, aquellos que causan infecciones en el ambiente intrahospitalario o asociadas a la atención en salud (SAMR-IAAS o SAMR-AH) y a SAMR que se detecta en individuos que no han tenido atención médica previa y que, por ende, es adquirido en el ambiente extrahospitalario, o en la “comunidad” (SAMR-AC).

Datos de vigilancia epidemiológica chilena, como el “Boletín de Resistencia Antimicrobiana en Chile”, elaborado por el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) y el Programa de Control de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud del Ministerio de Salud de Chile (MINSAL), informa que hasta el año 2020, el porcentaje de cepas de *S. aureus* resistentes a la oxacilina (SAMR-IAAS) fue de un 43,3%. En este mismo documento se evidencia una disminución en la proporción de cepas resistentes a la oxacilina en años anteriores, sin embargo, en 2020 se observó una pequeña alza (9) (figura anexa n°1). Respecto a SAMR-AC, el boletín “Vigilancia de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente adquirido en la comunidad. Chile, 2012-2016” informó que, en el período comprendido entre 2012 a 2016, se estudiaron 1079 cepas de *S. aureus*, de las cuales 973 (90,18%) fueron confirmadas como SAMR. De estas cepas SAMR, el 29,4% (286/973) fueron positivas para la Leucocidina o Toxina de Pantón Valentine (PVL), confirmándose como SAMR-AC (10).

S. aureus adquirió el fenotipo “Meticilino Resistente” debido a la incorporación de un elemento genético independiente denominado Cassette Cromosomal Estafilocócico (por sus siglas en

inglés, SCC), el cual es un Elemento Genético Móvil (por sus siglas en inglés, MGE) responsable de la resistencia a betalactámicos en *S. aureus* e incluso a otras familias de antimicrobianos. Un MGE es un fragmento de ADN que puede contener genes que codifican para determinantes de resistencia, factores de virulencia (ej. toxinas, superantígenos, leucocidinas), y también codifican para enzimas que median su transferencia e integración al ADN del hospedero que recibe dicho MGE.

En el contexto genético, los MGE pueden transferirse de célula a célula, proceso conocido como Transferencia Genética Horizontal (TGH), que se diferencia de la Transferencia Genética Vertical (TGV), la cual corresponde a un proceso entre células madre e hijas. En *S. aureus*, los MGE reconocidos son: plásmidos, transposones (Tn), secuencias de inserción (IS), profagos, islas de patogenicidad y cassettes cromosomales estafilocócicos (11).

En lo que respecta a los Cassettes Cromosomales Estafilocócicos, se han identificado 12 tipos, de los cuales los SCC tipo I, II y III se encuentran generalmente en SAMR-IAAS, y por otro lado, los SCC tipo IV y V frecuentemente se encuentran en SAMR-AC. Estos SCC contienen el gen *mecA* (a excepción del SCC tipo XI que se asocia al ganado, que contiene el gen homólogo *mecC*) el cual codifica para una Proteína de Unión a Penicilina tipo 2a (PBP2a) que tiene una afinidad extremadamente baja a betalactámicos y ,por ende, confiere resistencia a dicha familia de antimicrobianos de uso clínico (tabla anexa n°1) (12).

S. aureus no solo presenta resistencia a betalactámicos, sino que también a otras familias de antimicrobianos que se usan en el tratamiento de infecciones causadas por esta bacteria, como las quinolonas, macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, tetraciclinas, e incluso, a un antimicrobiano que se usa a menudo en infecciones por SAMR, la vancomicina (13).

La vancomicina ha sido el antimicrobiano de elección para el tratamiento de infecciones graves por SAMR, sin embargo, en el año 1997 en Japón se notificó una susceptibilidad reducida a la vancomicina en aislados clínicos de *S. aureus* (VISA) (12). Además, antes de dicha notificación, se

había informado previamente de una disminución de la susceptibilidad a teicoplanina. Sumado a esto, se encuentran cepas de *S. aureus* con sensibilidad intermedia heterogénea a vancomicina (VISA heterogénea o h-VISA) las cuales se caracterizan por presentar poblaciones con susceptibilidad reducida a vancomicina, mientras que otras son sensibles, y también se han descrito algunas cepas de *S. aureus* Resistentes a Vancomicina (VRSA).

Los mecanismos de resistencia aún son controversiales, sin embargo, con el conocimiento actual se distinguen mecanismos de resistencia a vancomicina relacionados y no relacionados a *vanA*, el cual es un gen ubicado en el transposón Tn1546 proveniente de *Enterococcus* Resistente a Vancomicina. Los mecanismos no relacionados a *vanA* se asocian con cambios en la pared celular, actividad autolítica reducida, cambios en la maquinaria metabólica celular y mecanismos moleculares de resistencia a vancomicina con ausencia de genes *vanA* (modificaciones transcripcionales, mutaciones, proteínas de superficie relacionadas) (12, 14).

En Chile, según el Boletín “Vigilancia de resistencia a vancomicina en bacterias que pueden producir Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS)”, desde 2014 a 2018 no se observaron cepas VISA, y tampoco cepas VRSA. No obstante, el boletín destaca que en el año 2015 se describió el primer aislamiento de una cepa h-VISA en una mujer de 62 años, hospitalizada, antecedentes mórbidos de diabetes mellitus, hipertensión arterial y Enfermedad Renal Crónica (ERC), que fue tratada previamente con vancomicina, dado que cursaba con osteomielitis por SAMR y además con dos episodios de bacteriemia (15).

El 27 de febrero de 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó su primera lista de patógenos prioritarios resistentes a los antimicrobianos (tabla anexa n°2), en la cual se incluyen bacterias que son consideradas peligrosas para la salud humana. Esta lista categoriza a dichos patógenos en prioridad crítica, alta y media. Para elaborar esta lista, la OMS consideró distintos criterios de inclusión, como por ejemplo, el grado de letalidad de las infecciones, requerimiento de

largas hospitalizaciones, frecuencia de la resistencia antimicrobiana, entre otros. *S. aureus* se encuentra en el grupo de prioridad 2 o elevada, y se incluyen las cepas SAMR, VISA y VRSA. La OMS elaboró esta lista con el objetivo de instar e impulsar a los gobiernos de todo el mundo a crear políticas y programas que favorezcan la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos, así como también la búsqueda y creación de nuevas alternativas terapéuticas novedosas para tratar las infecciones por este grupo de patógenos prioritarios causantes de infecciones graves y asociados a resistencia antimicrobiana (16).

2.3 Factores de virulencia en *S. aureus*

En *S. aureus* se identifican diversos factores de virulencia que promueven la infección, los cuales se pueden clasificar en 3 grupos: toxinas, factores de evasión inmune y factores de colonización. Por un lado, existen numerosas toxinas que ayudan a la patogenia de *S. aureus* y que también provocan intoxicaciones alimentarias, como por ejemplo la toxina α , enterotoxinas estafilocócicas, toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1), entre otros. Por otra parte, existen numerosos factores de evasión inmune que actúan en distintos puntos de la respuesta inmune comandada por el hospedero, sin embargo, se destaca por su importancia la Leucocidina de Pantón Valentine (PVL), la cual es una toxina de doble componente citolítica de neutrófilos y de otras células inmunes, que ayuda a identificar un SAMR-AC. En cuanto a factores de colonización, destacan los componentes de superficie microbiana que reconocen moléculas de matriz adhesiva (MSCRAMM), proteína de unión a fibronectina (FnBP) y proteína de unión a colágeno (Cna), entre muchos otros (17).

Los factores de virulencia en *S. aureus* generalmente están codificados en el genoma accesorio, entendido como el conjunto de genes accesorios aportados por MGE. No obstante, la expresión de estos genes está regulada tanto por factores reguladores específicos como por sistemas

reguladores globales. Dentro de estos sistemas reguladores globales, el más reconocido y ampliamente estudiado es Agr (regulador de genes accesorios) (17). Agr es un sistema de detección de *quórum*, y su activación depende de la concentración extracelular de un péptido autoinductor o AIP (tiolactona cíclica). Una vez que se alcanza una concentración suficiente de AIP extracelular, AgrA (proteína de unión a DNA) es fosforilada por AgrC (histidina quinasa ubicada en membrana) y se une al promotor P2 del operón *agrACDB*, favoreciendo la transcripción de un RNA mensajero denominado RNAlII, muy importante para la transcripción de distintos factores de virulencia de *S. aureus* (18).

Se ha visto que muchos clones de SAMR-AC tienen un sistema Agr muy activo, correlacionándose con una alta capacidad para producir toxinas y así garantizar su éxito en cuadros de IPTB e infecciones invasivas. Por el contrario, clones de SAMR-IAAS codifican para una modulina soluble en fenol (PSM) cuyo RNA mensajero inhibe la expresión de Agr, produciendo cantidades más bajas de toxinas y se prioriza la síntesis de adhesinas, las cuales son muy importantes para la fase inicial de la infección mediada por biopelículas. Además, se debe considerar que SAMR-IAAS se asocia frecuentemente a infecciones relacionadas a dispositivos médicos, y que a su vez dichas infecciones están relacionadas con la formación de biopelículas (12). Es importante mencionar que en un estudio se encontró que el 48% de cepas SAMR-IAAS tenían una función Agr reducida en comparación con un 3.5% de cepas SAMR-AC que tenían una función reducida de Agr (19).

2.4 - Biopelículas en *S. aureus*

El término “biopelícula” fue acuñado en 1978 por Costerton y otros, quienes la describieron como una comunidad microbiana estructurada adherida a una superficie y delimitada por una matriz extracelular. Esta matriz extracelular es de producción propia, y está formada por Sustancias Poliméricas Extracelulares (SPE) que comprenden polisacáridos (>80%), proteínas y ácidos nucleicos.

En *S. aureus*, destaca la Adhesina Intercelular de Polisacáridos (PIA), DNA extracelular (eDNA) y otras adhesinas como los principales constituyentes de la SPE de una biopelícula estafilocócica (20, 21, 22).

Se reconocen distintas etapas en la formación de biopelículas (figura anexa n°2). De hecho, distintos autores en la literatura la describen en 3, 4 o 5 pasos. Sin embargo, para *S. aureus*, se destacan 3 pasos esenciales en el ciclo de la biopelícula estafilocócica. La primera etapa consiste en la unión inicial, en la cual *S. aureus* se adhiere a una superficie biótica (por ejemplo, un tejido) o abiótica (por ejemplo, dispositivo médico) utilizando una variedad de factores de adhesión, colonización y crecimiento, que incluyen adhesinas superficiales unidas a sortasa, eDNA, ácidos teicoicos y lipoteicoicos, Proteína Asociada a Biopelícula (Bap), entre otros. La segunda etapa consiste en la producción de matriz extracelular y proliferación celular, en la cual *S. aureus* secreta todos los componentes esenciales para la formación de su biopelícula, y así también se adhiere fuertemente a la superficie, proliferando y organizándose en microcolonias. La tercera etapa consiste en la estructuración de la biopelícula y desprendimiento celular, en la cual la maduración se logra mediante una unión célula-célula y célula-matriz por adhesinas, y también por factores disruptivos como las nucleasas y tensioactivos como Modulinas Solubles en Fenol (PSM), procesos que permiten la estructuración tridimensional de la biopelícula y formación de verdaderos canales internos que hacen que la biopelícula funcione como un sistema digestivo generalizado. También, destacan los factores disruptivos codificados por el sistema Agr, entre ellos, proteasas y modulinas solubles en fenol, que permiten la disgregación de la biopelícula y dispersión de células planctónicas para que se adhieran en otros sitios, y así diseminarse y formar nuevas biopelículas (21).

La formación de biopelículas en *S. aureus* tiene su base genómica en un grupo de genes denominados “genes asociados a biopelícula” (figura anexa n°3). Entre estos, destacan genes que codifican proteínas de unión a fibrinógeno (*fib*) y proteínas de unión a fibronectina (*fnbA*, *fnbB*), genes

de adhesión intercelular (*icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*), factores de aglomeración (*clfA*, *clfB*), proteína de unión a elastina (*ebps*), proteína de unión a laminina (*eno*), y proteína de unión a colágeno (*cna*) (23).

La formación de biopelículas le permite a *S. aureus* adquirir distintas propiedades que le favorecen en muchos aspectos. Por ejemplo, le permite una mayor sobrevivencia frente a la desecación, capacidad de utilizar nutrientes y otras moléculas que quedan atrapadas en la SPE, retención de enzimas que permiten mayor capacidad de digestión, resistir y evadir la respuesta inmunológica del hospedero al esconder patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), e impedir la difusión de antimicrobianos al interior de la biopelícula por efectos de la SPE y disminuir su eficacia por la presencia de células persistentes y tolerantes (22).

Por último, se destacan dos acontecimientos importantes que son atinentes a las biopelículas, y más aún en *S. aureus*. Clínicamente, la biopelícula se asocia a un 60-80% de las infecciones en salud humana, y además, tiene una fuerte asociación con el establecimiento de infecciones persistentes crónicas. Esta, se forma en superficies biológicas como tejidos, y no biológicas, como dispositivos médicos, lo cual puede causar IPTB, endocarditis, osteomielitis, neumonía, entre otros (20). Además, se reconoce a la formación de biopelículas como un mecanismo de resistencia a antimicrobianos propiamente tal, ya que dentro del abanico de factores atribuibles, se destaca la penetración disminuida de antimicrobianos por la SPE, secreción y acumulación de enzimas que inactivan y/o modifican antimicrobianos (por ejemplo, β -lactamasas), actividad metabólica reducida con aparición de células persistentes y tolerantes, o también aumento de los fenómenos de TGH con adquisición de fenotipos de resistencia (24).

2.5 - Fagos líticos y fagoterapia

Los virus son microorganismos que se consideran parásitos intracelulares obligados debido a que requieren de la maquinaria metabólica de una célula hospedera para replicarse y diseminarse.

Dentro de los virus, se encuentran los bacteriófagos que son virus que infectan y replican específica y selectivamente en bacterias. Por esta razón, los bacteriófagos se plantean como una alternativa o herramienta útil, para combatir las infecciones bacterianas que afectan tanto al humano como a patógenos bacterianos que afectan sectores agrícolas, ganaderos y ambientales, en los cuales la presencia de bacterias y la formación de biopelículas, constituye un gran problema.

Dependiendo del ciclo de vida, en general, los fagos se clasifican en bacteriófagos virulentos o líticos, y bacteriófagos lisogénicos. Los fagos líticos requieren de la maquinaria celular para multiplicarse y alcanzar una masa crítica, momento en el cual lisa al hospedero y libera la progenie viral para amplificar y diseminar la infección. Por otro lado, los fagos lisogénicos integran su material genético en la bacteria, transformándose en profago y consecuentemente, aportando genes accesorios al genoma bacteriano, los cuales pueden estar relacionados a toxinas, determinantes de resistencia y factores de virulencia (25, 26).

Se distinguen distintas aplicaciones de los bacteriófagos como agentes terapéuticos, entre las cuales, destaca su relevancia a nivel clínico para tratar infecciones bacterianas. La “fagoterapia” o terapia con fagos consiste en el uso terapéutico de fagos líticos para tratar infecciones bacterianas, en su forma planctónica y asociada a biopelícula, que afectan al ser humano. La fagoterapia tuvo un fuerte desarrollo entre 1919 y 1940, sin embargo, luego de la llegada de la penicilina en 1944 esta línea terapéutica disminuyó su desarrollo. No obstante, en las últimas décadas, en el contexto de la resistencia antimicrobiana generalizada y con infecciones por bacterias multirresistentes difíciles de tratar (XDR), la fagoterapia ha vuelto a destacar como alternativa terapéutica distinta al uso de antimicrobianos convencionales, y es necesario investigar más respecto al tema (27, 28, 29, 30). De hecho, a diferencia de la terapia antimicrobiana convencional, la fagoterapia tiene ventajas que son prometedoras, pero también tiene limitaciones a considerar, que se resumen en la tabla anexa n°3 y n°4.

A pesar que la fagoterapia aún no se aplica rutinariamente en la clínica, salvo en algunos países de Europa del Este como Georgia, Polonia y Rusia, en otros países como Australia, Estados Unidos y algunos países de Europa, se han realizado ensayos clínicos en sus diferentes fases que comprenden el estudio del uso de cócteles de fagos para tratar infecciones por *S. aureus* y *P. aeruginosa* y con evidencia de eficacia y seguridad farmacológica (31). Así también, en 2019 la Food and Drug Administration (FDA) aprobó en Estados Unidos un ensayo clínico de fase I y II respecto a la administración intravenosa de bacteriófagos para tratar la infección por *S. aureus* de 10 pacientes con dispositivo de asistencia ventricular (32). Dentro de las ventajas de la fagoterapia, destaca su actividad antibiopelícula que presentan los fagos líticos contra aquellos conglomerados formados por bacterias, sobre todo aquellas que pertenecen al grupo ESKAPE, correspondiendo la “S” dentro del acrónimo a *S. aureus*, el cual es un patógeno de relevancia mundial, asociado a multirresistencia y a infecciones diseminadas, complicadas, invasivas y que se encuentran asociadas a biopelículas. Por lo tanto, es importante investigar cada arista de la fagoterapia, y dentro de ellas, la capacidad antibiopelícula representa gran interés (33).

2.6 - Fagos líticos y biopelículas

Los fagos líticos son capaces de destruir células bacterianas que funcionan como hospederos, y por tanto, previenen la formación de biopelículas. Además, se ha visto que algunos fagos son capaces de penetrar la SPE de una biopelícula y causar disrupción de ella, degradando biopelículas ya formadas (34). Los mecanismos por los cuales los fagos líticos pueden ocasionar dicho efecto en las biopelículas, son denominados “mecanismos de daño e interacción fago-biopelícula”, dentro de los cuales destaca: 1) Estimulación de bacterias para que produzcan enzimas degradantes de SPE, 2) Expresión de enzimas con actividad degradante de exopolisacáridos, 3) Difusión a través de canales circulatorios de la biopelícula para penetrar en las capas más internas, 4) Adsorción a apéndices

bacterianos de bacterias planctónicas móviles para penetrar la biopelícula (35). En este sentido, destacan las “armas” que tienen los fagos contra las bacterias planctónicas y biopelículas, como son las enzimas degradantes de exopolisacárido (despolimerasas tipo hidrolasas y liasas) y otros mecanismos como la liberación de peptidoglicano hidrolasa, inhibición de la comunicación célula-célula o detección de *quórum*, y síntesis de DNAsas que facilitan la disrupción de la SPE (36). Sin embargo, es necesario mencionar que así como el fago lítico tiene mecanismos de daño, el conglomerado de bacterias también responde con mecanismos de defensa. Es importante destacar que se ha visto que algunos fagos líticos incluso son capaces de promover la formación de biopelículas. Por lo tanto, se debe hacer un análisis exhaustivo respecto a qué fagos se utilizarían en la preparación de un cóctel para una fagoterapia dirigida contra biopelículas de una bacteria, idealmente, en base al estudio genotípico y fenotípico de la actividad antibiopelícula que presente el fago (37).

En la figura anexa n°4 se resumen los enfoques terapéuticos del uso de fagos frente a biopelículas.

2.7 - Problema de investigación

S. aureus es una bacteria capaz de producir biopelícula, lo que explica en parte, las infecciones persistentes, crónicas y recurrentes, su resistencia a antimicrobianos de uso clínico, además de su asociación a un amplio espectro de infecciones localizadas, invasivas y/o diseminadas, en las cuales media importantemente la biopelícula. Teniendo en cuenta estos antecedentes y la alternativa terapéutica que representan los fagos líticos, apoyado tanto por la literatura, como también por estudios previos realizados con una colección de fagos líticos, orientados a definir la formulación de un mejor cóctel para fines de disminución de carga bacteriana ambiental intrahospitalaria, en este proyecto se plantea la siguiente pregunta de investigación:

“Los fagos líticos de la colección de Vertebral, ¿Tienen actividad antibiopelícula sobre cepas de Staphylococcus aureus Meticilino Resistente aisladas de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud?”.

2.8 - Hipótesis de investigación

Al menos el 30% de los fagos líticos previenen la formación de biopelículas, y al menos el 20% degradan las biopelículas preformadas en superficies abióticas, por cepas SAMR aisladas de IAAS.

3.- Objetivo General

- Evaluar la actividad antibiopelícula de los fagos líticos sobre cepas SAMR aisladas de IAAS con capacidad de formar biopelículas en superficies abióticas.

4.- Objetivos específicos

- Identificar las cepas SAMR aislados de IAAS capaces de formar biopelículas en superficies abióticas.
- Determinar la capacidad de los fagos líticos de prevenir la formación de biopelículas en cepas SAMR que forman biopelículas en superficies abióticas.
- Determinar la capacidad de los fagos líticos de degradar biopelículas preformadas de cepas SAMR en superficies abióticas.

5.- Materiales y Métodos

Este estudio se llevó a cabo en el Centro de Investigación, Desarrollo e Innovación Vertebral, perteneciente a COANIQUEM, ubicado en la comuna de Pudahuel, Santiago de Chile. Se contó con 50 cepas clínicas de SAMR, con las cuales se procedió a realizar todos los experimentos. Los reactivos, materiales químicos, equipos, entre otros, se detallan en cada subpunto a continuación.

5.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Los aislados clínicos de *S. aureus* Meticilino Resistente (n=50) se obtuvieron de distintos hospitales clínicos de Chile y a partir de diferentes sitios de infección, los cuales ya habían sido estudiados e identificados como SAMR mediante métodos bioquímicos tradicionales o automatizados (Tabla anexa n°5). La autorización para el uso de las cepas para esta investigación, se enmarca en el proyecto marco de colaboración de Vertebral - Coaniquem con el Programa de Genómica Microbiana (GeRM) y del Núcleo Mileno (MICROB-R), Universidad Del Desarrollo, para la Investigación Colaborativa en la Línea Ciencia Aplicada (Documento anexo n°5). Las cepas estuvieron congeladas a -80°C en un criocongelador (Haier Biomedical, DW-86L338J, China) del laboratorio de Vertebral. Estas cepas se recuperaron en Agar Tripticasa Soja (TSA) (Becton, Dickinson and Company, Nueva Jersey, Estados Unidos) y se dejaron a 37°C durante 18-24 horas en incubadora (MMM group, Incucell 55, Alemania) con condiciones de atmósfera normal. Posteriormente, se procedió a reidentificar las cepas clínicas informadas como SAMR para confirmar el género, especie, y tipo de resistencia reportada previamente.

El género se determinó mediante observación macroscópica de las características de la colonia según su tamaño y morfología (colonias grandes, redondas, convexas y de color amarillo o blanquecino) en TSA, prueba de la catalasa y tinción de Gram con observación microscópica. La especie se determinó mediante prueba de la coagulasa en tubo y/o aglutinación en tarjeta de

reacción (Staphylect plus, Oxoid-ThermoFisher, Massachusetts, Estados Unidos), detección fenotípica de producción de DNAsa en agar DNAsa y fermentación del manitol en Agar Sal Manitol (ASM) (Becton, Dickinson and Company, Nueva Jersey, Estados Unidos).

5.2 Estudio de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas

Se llevó a cabo un estudio de susceptibilidad antimicrobiana mediante el método de Kirby Bauer en Agar Muller Hinton (AMH). Brevemente, a partir de un cultivo puro de 18-24 horas, se tomaron 3-4 colonias similares en tamaño y morfología, se resuspendieron en 1 mL de suero fisiológico (NaCl 0,9%) dispensado en un tubo y se homogeneizó en vórtex (Dlab, MX-S, China). Posteriormente, se midió la turbidez de la suspensión en un turbidímetro (DensiCHECK Plus, Biomerieux, Francia) de tal manera de obtener una suspensión McFarland 0,5. Luego, la turbidez se controló espectrofotométricamente a una $OD_{630\text{ nm}}$ entre 0,08 y 0,1. Una vez preparada la suspensión bacteriana, se empapó una tórula de algodón y se procedió a realizar una siembra en césped en un AMH (Becton, Dickinson and Company, Nueva Jersey, Estados Unidos). Posteriormente, se inocularon discos con antimicrobianos (Oxoid-Thermofisher, Massachusetts, Estados Unidos) sugeridos para el estudio de susceptibilidad de *S. aureus* por la guía M100, Ed 33., Clinical & Laboratory Standard Institute, 2023. Los antimicrobianos utilizados fueron: eritromicina (15 μg), clindamicina (2 μg), cefoxitina (30 μg), sulfametoxazol/trimetoprim (25 μg) y ciprofloxacino (5 μg). Se incubó el antibiograma a 37°C durante 18-24 horas en atmósfera normal, y se procedió a realizar la lectura y medición de los halos de inhibición con un haz de luz contra un fondo oscuro. La interpretación se realizó con los puntos de corte establecidos por la CLSI en el año 2023 para cada antimicrobiano.

5.3 Características de los fagos líticos

Las características genéticas de los fagos líticos de la colección perteneciente al Centro de Investigación, Desarrollo e Innovación Vertebral se describen en la tabla anexa n°6.

Brevemente, se dispuso de 8 fagos líticos para *S. aureus*, con títulos $>10^{10}$ UFP/mL. Todos contaron con una caracterización física mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) realizada en la Pontificia Universidad Católica de Chile (PUC), y una caracterización molecular mediante secuenciación y análisis bioinformático realizado en el Centro Austral de Tecnología Genómica de la Universidad de Magallanes (UMAG), a partir del cual se determinó la familia de los fagos, género, tamaño del genoma viral (Kpb) y la presencia de genes no deseados (genes asociados a toxinas, determinantes de resistencia antimicrobiana y factores de virulencia). Por otro lado, con la herramienta de predicción BACPHLIP (v0.9.6) se predijo el estilo de vida de los fagos, en donde todos ellos presentaron un comportamiento lítico.

El grupo de fagos líticos 3, 4, 7 y 8 pertenecen al género *Kayvirus* (grupo 1) muestra que genéticamente se parecen entre sí, al igual que el caso del grupo de fagos líticos 1, 2, 5 y 6 pertenecientes al género *Rosenblumvirus* (grupo 2). Si bien presentan un tamaño genómico similar, lo cual sugiere la posibilidad de que se trate de los mismos fagos o que sean clonalmente relacionados, para efectos de esta tesis fueron considerados como distintos. Las razones por las cuales se decidió esto son las diferencias fenotípicas que presentan estos fagos, en cuanto a la estabilidad térmica, actividad en rango de pH y rango de hospedero. A continuación, se resume la información respecto a dichos antecedentes, los cuales corresponden a resultados de estudios previos (datos no publicados) y que se consideraron en esta investigación como base para el estudio de actividad antibiopelícula.

- Estabilidad térmica: En la escala Celsius (°C), los fagos del grupo 2 mostraron diferencias entre sí en los títulos dependiendo de la temperatura. Se destaca que los fagos 1 y 5 a los 25°C disminuyeron sus títulos. Lo mismo ocurrió con los fagos del grupo 1, en que, por ejemplo, los

fagos 4, 7 y 8 mantuvieron constantes sus títulos a 25°C, pero el fago 4 mantuvo una estabilidad a todas las temperaturas, a diferencia del fago 7 que >35°C no se pudo determinar los títulos.

- Estabilidad en pH: Los fagos 4, 7 y 8 del grupo 1 mostraron diferencias de estabilidad en pH con el fago 3, ya que este último a pH 10 ya no era detectable, a diferencia del fago 4, 7 y 8. Por otro lado, los fagos del grupo 2 mostraron diferencias en base al pH y tiempo a lo largo de todo el experimento.
- Rango de Hospedero (RH): El fago 3, respecto a los fagos 4, 7 y 8 que también son *Kayvirus*, muestra una potente actividad lítica contra 2 cepas de *S. aureus*. Por otro lado, los fagos 3, 7 y 8 tienen una buena actividad lítica contra una cepa de *S. aureus*, a diferencia del fago 4 que tiene una baja actividad lítica. Los fagos 1, 2, 5 y 6, que pertenecen al género *Rosenblumvirus*, también presentan actividad lítica variable. Por ejemplo, el fago 6 es el único que actúa con buena actividad lítica sobre una cepa de *S. aureus*, mientras que los otros muestran una escasa lisis. Así también, el fago 2 tiene una potente actividad lítica sobre una cepa de *S. aureus*, en comparación de los fagos 1, 5 y 6 que no tienen lisis sobre dicha cepa.

Adicionalmente, en el Laboratorio Vertebral, se evaluó la inocuidad de los 8 fagos líticos en células eucariontes, utilizando para ello, la línea celular de Células Embrionarias de Riñón Humano (HEK), en donde se comprobó la inocuidad de dichos fagos líticos frente a células humanas. Los resultados obtenidos demostraron una viabilidad celular >97% (datos no publicados).

Para los ensayos de prevención de formación de biopelículas y ensayos de degradación de biopelículas ya formadas, se utilizaron estos 8 fagos líticos a títulos de 10^8 UFP/mL. Para ello, se trabajó con el protocolo de titulación de fagos elaborado por el laboratorio Vertebral, el cual se describe a continuación. Brevemente, se sembró una cepa de *S. aureus* hospedera para el fago a titular agregando 20 μ L en 5 mL de TSB. Esta siembra se hizo usando dos protocolos ; 1. Se incubó la

cepa durante 3-4 horas a partir de la mañana, para luego utilizar dicha cepa en fase exponencial, lo cual fue determinado mediante la confección de una curva de crecimiento bacteriano previo. 2: se realizó un cultivo durante toda la noche u “OverNight” (ON) a 37°C en condiciones de atmósfera normal. Posteriormente, dependiendo de la fase de crecimiento del cultivo, se agregó 200 µL de éste a 3,5 mL de Agar Blando Trypticasa Soja, si la suspensión bacteriana proviene de un cultivo exponencial, ó 50 µL si la suspensión bacteriana proviene de un cultivo ON. Se homogeneizó en vórtex durante 3-4 segundos. Posteriormente, se agregó la mezcla de bacteria en agar blando en una placa Petri con TSA. Se distribuyó la mezcla en toda la placa para lograr una superficie homogénea y lo más lisa posible, para luego secar por 15 minutos. Se agregaron “spots” de 10 µL de fago diluido con factor en base 10, desde 10^{-1} hasta 10^{-7} , preparados en tubos eppendorf con 450 µL de PBS. Todo este procedimiento se realizó bajo gabinete de bioseguridad clase IIA. Se dejó secar 10 minutos las placas Petri abiertas dentro del gabinete, para luego incubar a 37°C por 24 horas con la placa de Petri en posición hacia arriba. Para cada ensayo se realizó el conteo de placas de lisis y se reportó el resultado como UFP/mL. En la tabla n°1 se muestran los resultados de la titulación de los 8 fagos líticos, para comprobar que se encontrasen a títulos de 10^8 UFP/mL.

Tabla n°1: Títulos de 8 fagos líticos de *S. aureus*.

Fago	Recuento de PFU	Dilución	Volumen inoculado	PFU/mL
1	3,6	10^{-6}	10 uL	$3,6 \times 10^8$
2	9,3	10^{-6}	10 uL	$9,3 \times 10^8$
3	14	10^{-5}	10 uL	$1,4 \times 10^8$
4	14,6	10^{-5}	10 uL	$1,46 \times 10^8$
5	93,3	10^{-5}	10 uL	$9,33 \times 10^8$
6	26,6	10^{-5}	10 uL	$2,66 \times 10^8$
7	10	10^{-5}	10 uL	1×10^8
8	5	10^{-6}	10 uL	5×10^8

5.4 Identificación de cepas SAMR productoras de exopolisacárido

Para pesquisar e identificar qué cepas SAMR producen exopolisacárido, componente esencial de la sustancia polimérica extracelular de las biopelículas, y que por ende nos permite predecir la formación de biopelículas por parte de una cepa, se utilizó Agar Rojo Congo (ARC). La tinción Rojo

Congo que contiene este medio se une a los exopolisacáridos producidos por una colonia bacteriana, dando lugar a un precipitado de color negro y con una colonia de aspecto cristalino y seco. Por otro lado, colonias bacterianas negativas para la producción de exopolisacárido tienen un aspecto liso, de color rosado (38, 39).

Brevemente, para elaborar ARC se utilizó Caldo Infusión Cerebro Corazón (caldo BHI) (Biokar diagnostics, Rue Des 40 Mines, Francia), agar-agar (Becton, Dickinson and Company, Nueva Jersey, Estados Unidos), tinción Rojo Congo (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos), sacarosa (Becton, Dickinson and Company, Nueva Jersey, Estados Unidos) y agua destilada estéril. Se siguieron las recomendaciones indicadas por Ferreira et al. (2014) (40), pero con leves modificaciones. Se pesó cada reactivo para un volumen final de 800 mL. Se agregó 28 g de Caldo BHI, 12 g de agar-agar y 0,64 g de Rojo Congo a 700 mL de agua destilada estéril. Esta solución se autoclavó a 121°C durante 15 minutos. Por separado (para evitar caramelización del caldo), se pesaron 40 g de sacarosa y se agregaron a 100 mL de agua destilada estéril. Se procedió a homogeneizar la solución de sacarosa y agua destilada estéril en agitador magnético. Posteriormente, se agregaron estos 100 mL a los 700 mL de los otros reactivos en agua destilada estéril, para obtener un volumen final de 800 mL y así tener finalmente el agar rojo congo suplementado con sacarosa, la cual fue filtrada utilizando una jeringa y filtro estéril con membrana y tamaño de poro de 0,22 μm (Jet Biofil, China).

En este ensayo se sembraron las 50 cepas en estudio, y se ocupó como control positivo la cepa *S. aureus* ATCC 25923, y como control negativo una cepa de *Yersinia enterocolitica*. Se hizo lectura de los resultados de la siembra a las 24 horas de incubación, a 37°C, en atmósfera normal y en aerobiosis.

5.5 Identificación y categorización de cepas SAMR formadoras de biopelículas

Para identificar las cepas SAMR capaces de formar biopelículas en superficies abióticas, se utilizaron protocolos descritos previamente, con leves modificaciones (23, 38, 41, 42, 43, 44). Para identificar y categorizar las cepas formadoras de biopelículas, se desarrolló el “ensayo de formación de biopelículas en medio líquido”. Brevemente, se sembró una cepa extraída del criocongelador en TSA, incubado en atmósfera aeróbica, durante 18-24 horas a 37°C. Posteriormente, se seleccionaron 3-4 colonias idénticas en tamaño y morfología, y se suspendieron en Caldo Tripticasa Soja (TSB) y se incubó en shaker o agitación durante 4 horas a 37°C con 150 rpm de agitación (tiempo determinado mediante confección de curva de calibración para la cepa de *S. aureus* ATCC 25923 (Figura anexa 6). Pasadas las 4 horas de incubación, se midió la absorbancia de la suspensión en espectrofotómetro con una longitud de onda de 630 nm, para ajustar la turbidez a un McFarland 0,5. Una vez ajustada la concentración, se procedió a diluir 1/100 la suspensión bacteriana con TSB glucosado (TSBg) al 0,5% p/v, para tener una concentración final de aproximadamente 10⁶ UFC/mL. Esto mismo se procedió a realizar con el control positivo (*S. aureus* ATCC 25923) (American Type Culture Collection, Manassas Virginia 20110-2209).

Una vez preparada la suspensión de bacterias, se cargó una microplaca de titulación de cultivo de tejidos (NEST Biotechnology, Wuxi, China) con 200 µL de la suspensión bacteriana en triplicado, seguido de 200 µL de suspensión bacteriana del control positivo (*S. aureus* ATCC 25923) en triplicado, y 200 µL de control negativo (TSBg) en sextuplicado. Posteriormente, la microplaca cargada se incubó a 35-37°C durante 48 horas, sin agitación (estático) y en aerobiosis.

Finalmente, se procedió a determinar la biomasa de la biopelícula producida por la cepa con el “Ensayo de Cristal Violeta”. Brevemente, en un gabinete de bioseguridad clase IIA (BIOBASE, BSC-700IIA2-Z, China) se realizaron los siguientes pasos: eliminar el remanente de medio de la microplaca de titulación en un contenedor para residuos biológicos mediante inversión y sacudida de

la microplaca, 20 veces, y luego se secó utilizando papel absorbente con la microplaca boca abajo. Lavar los pocillos inoculados con la suspensión bacteriana utilizando 300 μ L de PBS, luego eliminar el PBS mediante inversión y agitación de la microplaca, secar y repetir este procedimiento dos veces más (tres veces en total). Luego del lavado, se fijó la biopelícula agregando 150 μ L de metanol (CHEMIX, Farmalatina, Chile) y se dejó actuar por 20 minutos, para luego eliminar mediante vertimiento, agitación y finalmente secar la microplaca. Posteriormente, se dejó secar la biopelícula formada en el pocillo para culminar la fijación, posicionando la microplaca boca abajo y apoyada en sus dos extremos laterales con unas plataformas para dar altura, y así permitir que el flujo de aire laminar del gabinete de bioseguridad seque las biopelículas. Este proceso de secado comprendió una duración de 2 horas y 30 minutos. Una vez secadas las microplacas con biopelículas, se añadió 150 μ L de Cristal Violeta al 0.1% p/v (CHEMIX, Farmalatina, Chile) y se dejó actuar por 15 minutos a temperatura ambiente, para luego eliminar la tinción por vertimiento, y posteriormente realizar un nuevo proceso de lavado con PBS, agregando 300 μ L y realizándose tres veces. A continuación, se agregó 150 μ L de etanol absoluto (100%) (Merck, Darmstadt, Alemania) para eluir el Cristal Violeta adherido a la biomasa y células que conforman la biopelícula fijada en el pocillo, dejando actuar por 45-50 minutos en condiciones estáticas y dejando la microplaca con su respectiva tapa para evitar la evaporación del etanol absoluto. Una vez finalizado el período de elución, se midió la absorbancia del Cristal Violeta suspendido en los pocillos en un espectrofotómetro (BioTek® 800™ TS Absorbance Reader) con un filtro de 570 nm. El protocolo de medición de $OD_{570\text{ nm}}$ comprende 3 mediciones en distintos períodos de tiempo, en un tiempo final de 2 minutos, para el cual se utiliza un filtro de 570 nm de longitud de onda, para pesquisar y medir la absorbancia del Cristal Violeta a dicha longitud de onda y así medir indirectamente la cantidad de biopelícula formada. Los resultados se anotaron en la aplicación de hojas de cálculo de Google, Drive.

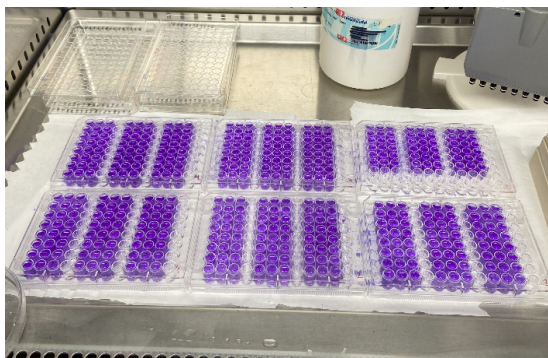


Figura n°1: Ensayo con Cristal Violeta (CV) para determinación de biomasa de la biopelícula formada en la microplaca de titulación. Este ensayo fue utilizado para el ensayo de formación de biopelículas, ensayo de prevención de formación de biopelículas y ensayo de degradación de biopelículas preformadas.

Además de identificar qué cepas SAMR formaron biopelículas, se determinó el grado de formación de biopelículas de cada cepa, categorizándolas como cepas no formadoras de biopelícula, formadoras débiles, formadoras moderadas y formadoras fuertes. Esta categorización, se realizó obteniendo un valor de Densidad Óptica de corte que permite establecer la categoría a la cual pertenecen las cepas. Esta Densidad Óptica de corte (ODc) se calculó siguiendo las recomendaciones establecidas por Stepanovic et al. (2007) (38, 45, 46). Brevemente, se calculó el promedio y la desviación estándar de las absorbancias del control negativo intracorrída analítica. Con estos valores, se calculó la ODc con la siguiente fórmula: $ODc = \text{Promedio } OD_{570} \text{ Control Negativo} + 3\sigma$

En la tabla n°2 se observan los rangos de absorbancia para las distintas categorías.

Tabla n°2: Categorías de cepas formadoras de biopelículas según OD medida y rango calculado (38, 45)

OD _{570nm} de corte (ODc) de la cepa	Categoría de la cepa
OD medida ≤ ODc	No formadora de biopelícula
ODc < OD medida ≤ 2 ODc	Formadora débil de biopelícula
2 ODc < OD medida ≤ 4 ODc	Formadora moderada de biopelícula
OD medida > 4 ODc	Formadora fuerte de biopelícula

5.6 Ensayo de prevención de formación de biopelículas de SAMR con fagos líticos

El ensayo de prevención de formación de biopelículas se desarrolló en base a lo descrito por otros autores (47, 48, 49).

Para este ensayo, se seleccionaron las cepas SAMR categorizadas como formadoras fuertes de biopelícula (n=23) y se sometieron a los 8 fagos líticos con títulos de 10^8 UFP/mL a una Multiplicidad de Infección (MOI) de 50 y 100. Brevemente, se aplicó el siguiente protocolo de formación de biopelículas en medio sólido: Sembrar la cepa a estudiar en TSA, aeróbicamente, durante 18-24 horas a 35-37°C. Después de verificar la pureza del cultivo, seleccionar colonias que sean morfológicamente idénticas y suspender en suero fisiológico al 0,9%. Preparar una suspensión a un McFarland 0,5 ($\sim 10^8$ UFC/mL) con turbidímetro y posteriormente ajustarla con espectrofotómetro a 630 nm. Diluir la suspensión bacteriana 1/50 y 1/100 con TSBg al 0,5% para tener una concentración de 10^7 UFC/mL y 10^6 UFC/mL respectivamente:

1. Dilución 1/50 (para MOI 50): 40 μ L de suspensión bacteriana + 1960 μ L TSBg
2. Dilución 1/100 (para MOI 100): 20 μ L de suspensión bacteriana + 1980 μ L TSBg

Posteriormente, se cargó la microplaca con las suspensiones bacterianas y se llevó a incubar. Para ello, se agregaron 100 μ L de cada suspensión bacteriana diluida en microplaca de titulación, en triplicado. Luego, se agregaron 50 μ L de fago con títulos de 10^8 UFP/mL en cada pocillo donde hay suspensión bacteriana diluida, salvo los pocillos donde van los controles (suspensiones bacterianas no tratadas). En ellos, se agregaron 50 μ L de PBS. Luego, la microplaca cargada se llevó a incubar por 18-24 horas a 35-37°C en condición estática y en aerobiosis. Al día siguiente, se determinó la biomasa de la biopelícula tratada con fago y no tratada mediante el ensayo de Cristal Violeta descrito en el punto 5.5 “Identificación y categorización de cepas SAMR formadoras de biopelículas”.

5.7 Ensayo de degradación de biopelículas preformadas de SAMR con fagos líticos

El ensayo de degradación de biopelículas preformadas se desarrolló en base a lo descrito por otros autores (47, 49, 50, 51). Para este ensayo, también se utilizaron las cepas SAMR categorizadas como formadoras fuertes de biopelícula (n=23) y se sometieron a los 8 fagos líticos con títulos de 10^8

UFP/mL, también con una MOI de 50 y 100. Brevemente, se aplicó un protocolo de formación de biopelículas en medio sólido descrito en el punto 5.6 “Ensayo de prevención de formación de biopelículas”, y posteriormente se procedió a cargar las microplacas de titulación con las suspensiones bacterianas diluidas agregando 100 μ L en los pocillos y llevando a incubar a 35-37°C durante 18-24 horas en condición estática y en aerobiosis. Una vez completada la incubación para la formación de biopelículas, se eliminó el remanente de medio por vertimiento de la microplaca en contenedor de bioseguridad. Posteriormente, se lavaron los pocillos con biopelícula con PBS para eliminar bacterias planctónicas, agregando 300 μ L y repitiendo 3 veces el lavado. Luego del lavado, se agregaron 50 μ L de fago con título de 10^8 UFP/mL a cada pocillo donde se formó la biopelícula, y a las biopelículas controles (no tratadas) se les agregó 50 μ L de PBS. Esto se llevó a incubar a 35-37°C durante 18-24 horas en condición estática y en aerobiosis. Luego de esta segunda incubación, se determinó la cantidad de biomasa en las biopelículas tratadas con fagos y las no tratadas (PBS) mediante el ensayo de Cristal Violeta descrito en los puntos 5.5 y 5.6 de *Materiales y Métodos*.

5.8 Análisis estadístico

Cada ensayo se realizó por triplicado, consignando media y desviación estándar. Para establecer la significancia estadística de la reducción de la biopelícula en cada tratamiento con los diferentes fagos, se aplicó una prueba no paramétrica de Wilcoxon. Los valores $p \leq 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos para todos los casos (52, 53, 54, 55).

6.- Resultados

6.1 Identificación y estudio de susceptibilidad antimicrobiana de cepas SAMR

Se confirmó la especie *Staphylococcus aureus* de las 50 cepas bacterianas dispuestas por el laboratorio Vertebral, COANIQUEM. Se utilizaron métodos microbiológicos tradicionales, descritos en el punto 5.1 de la sección “Material y Métodos”. En la Tabla n°3 se pueden ver los resultados.

Tabla n°3: Identificación fenotípica de 50 cepas de SAMR aisladas de IAAS.

Cepa	Tinción de Gram	Catalasa	Coagulasa	DNAsa	Manitol
SA171	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA172	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA174	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA175	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA176	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA177	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA178	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA179	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA180	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA181	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA182	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA183	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA184	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA185	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA186	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA187	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA189	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA190	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA191	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA192	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA193	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA194	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA195	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA196	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA197	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA198	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA199	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA200	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA201	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA202	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA203	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA204	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA205	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA206	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA207	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA208	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA209	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA210	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA211	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA212	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA213	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA214	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA215	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA216	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA217	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA218	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA219	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA221	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA222	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+
SA223	Cocos G+ en racimo	+	+	+	+

Una vez confirmada la identificación de las cepas como *S. aureus*, se realizó un antibiograma por el método de Kirby Bauer, bajo las normas del manual M100 de la CLSI: “Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing”, edición 33 (2023). Se confirmó que las 50 cepas son resistentes a la Cefoxitina (30 µg), por lo que todas las cepas fueron definidas como *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR). Por otro lado, 5/50 (10%) de las cepas, presentaron un fenotipo MLSb, de resistencia inducible a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina b (cepas SA178, SA193, SA196, SA199 y SA204). Sólo la cepa SA222 (2%) fue resistente a sulfametoxazol/trimetoprim. Los resultados del antibiograma de las 50 cepas se encuentran en la tabla n°4.

Tabla n°4: Estudio de susceptibilidad antimicrobiana de 50 cepas de SAMR aisladas de IAAS.

Cepa	FOX (30 µg)		E (15 µg)		DA (2 µg)		CIP (5 µg)		SXT (25 µg)	
	Halo de inhibición (mm)	Interpretación	Halo de inhibición (mm)	Interpretación	Halo de inhibición (mm)	Interpretación	Halo de inhibición (mm)	Interpretación	Halo de inhibición (mm)	Interpretación
SA171	13	R	6	R	6	R	10	R	27	S
SA172	11	R	11	R	6	R	11	R	28	S
SA174	15	R	28	S	26	S	30	S	30	S
SA175	6	R	6	R	6	R	6	R	28	S
SA176	11	R	6	R	6	R	13	R	26	S
SA177	6	R	6	R	6	R	6	R	29	S
SA178	15	R	27	S	27	S	21	S	29	S
SA179	15	R	6	R	6	R	6	R	32	S
SA180	15	R	6	R	6	R	12	R	31	S
SA181	20	R	6	R	6	R	6	R	26	S
SA182	16	R	29	S	28	S	32	S	30	S
SA183	19	R	10	R	28	S	14	R	31	S
SA184	6	R	6	R	6	R	6	R	29	S
SA185	11	R	21	R	19	I	21	S	26	S
SA186	6	R	6	R	6	R	6	R	23	S
SA187	6	R	6	R	6	R	6	R	30	S
SA189	8	R	6	R	6	R	6	R	29	S
SA190	13	R	6	R	6	R	6	R	30	S
SA191	14	R	6	R	6	R	6	R	34	S
SA192	7	R	6	R	6	R	6	R	25	S
SA193	16	R	6	R	6	R	6	R	34	S
SA194	6	R	6	R	6	R	6	R	27	S
SA195	8	R	6	R	6	R	6	R	28	S
SA196	16	R	6	R	6	R	6	R	31	S
SA197	11	R	6	R	6	R	6	R	30	S
SA198	12	R	6	R	6	R	6	R	26	S
SA199	15	R	6	R	26	R	10	R	28	S
SA200	15	R	6	R	6	R	6	R	28	S
SA201	15	R	26	S	26	S	6	R	29	S
SA202	6	R	6	R	6	R	9	R	29	S
SA203	14	R	25	S	25	S	29	S	31	S
SA204	15	R	6	R	26	R	28	S	23	S
SA205	11	R	6	R	6	R	6	R	27	S
SA206	14	R	25	S	26	S	27	S	30	S
SA207	15	R	10	R	28	S	30	S	29	S
SA208	17	R	25	S	25	S	25	S	24	S
SA209	15	R	24	S	24	S	26	S	24	S
SA210	8	R	6	R	6	R	11	R	26	S
SA211	6	R	6	R	6	R	6	R	28	S
SA212	9	R	6	R	6	R	9	R	32	S
SA213	6	R	6	R	6	R	9	R	28	S
SA214	6	R	6	R	6	R	10	R	28	S
SA215	10	R	6	R	6	R	10	R	30	S
SA216	8	R	6	R	6	R	12	R	29	S
SA217	13	R	6	R	6	R	6	R	25	S
SA218	20	R	28	S	27	S	28	S	29	S
SA219	17	R	27	S	27	S	28	S	30	S
SA221	16	R	10	R	24	S	17	I	28	S
SA222	6	R	6	R	6	R	10	R	6	R
SA223	16	R	28	S	27	S	27	S	23	S

FOX = cefoxitina; E = eritromicina; DA = clindamicina; CIP = ciprofloxacino; SXT = sulfametoxazol/trimetoprim.

6.2 Identificación de cepas SAMR productoras de exopolisacárido y formadoras de biopelículas

6.2.1 Cepas SAMR productoras de exopolisacáridos

Para determinar qué cepas producen exopolisacárido, un componente esencial de la SPE (Sustancias Poliméricas Extracelulares) de una biopelícula, se utilizó la técnica de Agar Rojo Congo. Esta técnica permite revelar de manera temprana la producción de este componente de matriz, el que es considerado un predictor de si una cepa bacteriana puede o no desarrollar biopelícula (38, 39).

Los resultados mostraron que todas las cepas de SAMR (n=50) producen exopolisacáridos. Los controles positivos y negativos se comportaron de acuerdo a lo esperado, produciendo un precipitado de color negro en el primer caso y ausencia de precipitado para el segundo. Este ensayo es un método cualitativo, y por ende, no permite cuantificar la cantidad de exopolisacárido que produce la cepa. En la figura n°2 se puede ver un ejemplo de producción de exopolisacárido en Agar Rojo Congo (Ver figura anexa n°8 para el resto de las cepas).



Figura n°2: SA180, SA181, SA182 y SA183 en agar Rojo Congo (ARC). Control positivo en el cuadrante inferior de la placa (*S. aureus* ATCC 25923); Control negativo en el cuadrante superior de la placa (*Y. enterocolitica*). La producción de exopolisacárido se observa como un precipitado de color negro. Las cepas no productoras de exopolisacárido se ven de un color rosado a rojo pálido, sin precipitado negro.

Los resultados de este estudio se complementaron con la técnica de microplaca de titulación de poliestireno y determinación de biomasa con cristal violeta, para determinar la capacidad de formación de biopelículas y cantidad de la biomasa formada para categorizar las cepas.

6.2.2 Detección de cepas SAMR formadoras de biopelículas

El estudio de formación y categorización de biopelículas en superficie abiótica evidenció que el total de las 50 cepas estudiadas fueron productoras de biopelículas.

Al aplicar los puntos de categorización de cepas formadoras de biopelículas según Stepanovic et al. (2007) (41), los resultados muestran que: 14 cepas son formadoras débiles de biopelículas (28%), 13 cepas son formadoras moderadas de biopelículas (26%), y 23 cepas son formadoras fuertes de biopelículas (46%), lo cual se puede observar en la tabla n°5 y figura n°3.

Tabla n°5: Identificación de cepas SAMR formadoras de biopelículas y categorización de la capacidad de formación.

Categorización	Cepas
Formadora débil de biopelícula	SA171, SA172, SA175, SA176, SA177, SA194, SA200, SA202, SA205, SA210, SA211, SA212, SA213, SA214,
Formadora moderada de biopelícula	SA180, SA181, SA183, SA189, SA191, SA203, SA204, SA206, SA207, SA208, SA219, SA222, SA223
Formadora fuerte de biopelícula	SA174, SA178, SA179, SA182, SA184, SA185, SA186, SA187, SA190, SA192, SA193, SA195, SA196, SA197, SA198, SA199, SA201, SA209, SA215, SA216, SA217, SA218, SA221

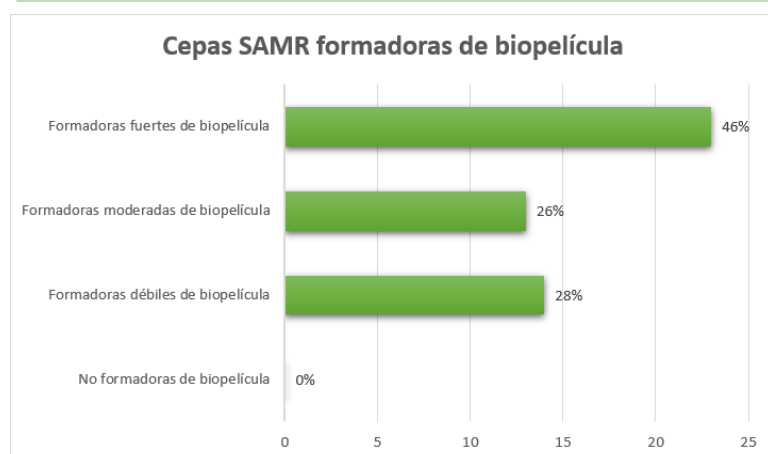
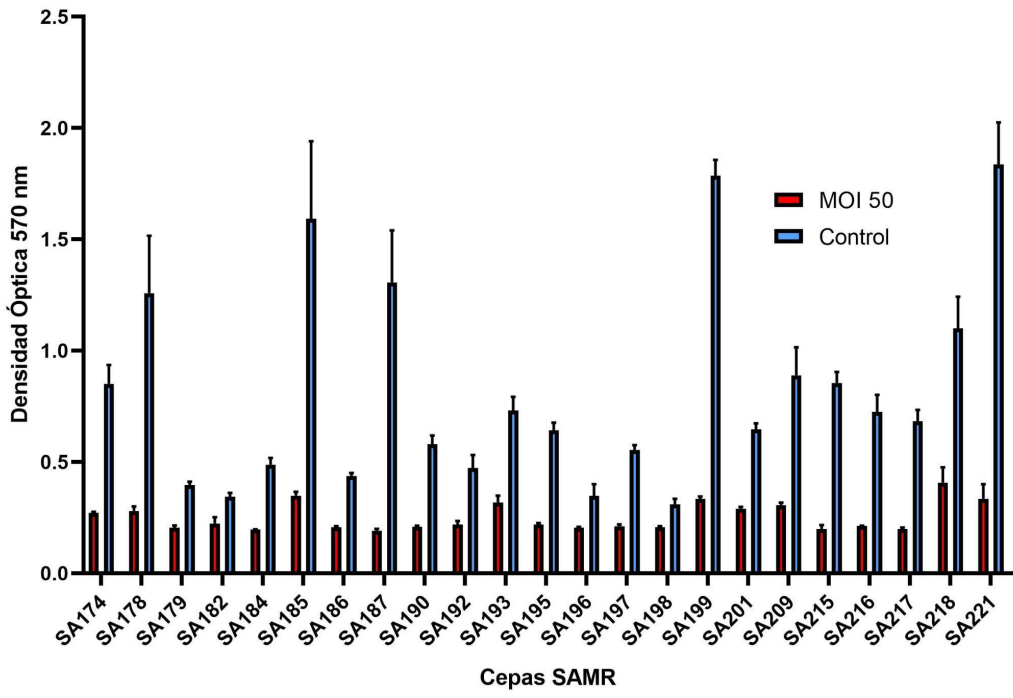


Figura n°3: Porcentajes en la categorización de cepas SAMR formadoras de biopelículas F es fuerte; M es moderado; D es débil; NF es no formador

6.3 Prevención de formación de biopelículas de SAMR con fagos líticos

Para este ensayo se llevó a cabo el estudio de prevención e inhibición temprana de la formación de biopelículas a las 24 horas con fagos líticos, utilizando 8 fagos e incluyendo sólo las cepas formadoras fuertes de biopelículas (n=23). En las figuras n°4 y n°5 se muestran los resultados obtenidos del ensayo de prevención de formación de biopelículas utilizando los fagos 3 y 8 a modo de ejemplo, con cada cepa formadora fuerte de biopelícula, en donde se grafica la densidad óptica a 570 nm de la biopelícula formada por cada cepa en el eje Y, tratada y no tratada (control), a una MOI de 50 y MOI 100 en el eje X. En la tabla n°6 se muestran los porcentajes de disminución de biomasa de biopelícula, para cada fago, a distintas MOI (MOI 50 y MOI 100).

Prevención de formación de biopelículas - Fago 3



Prevención de formación de biopelículas - Fago 3

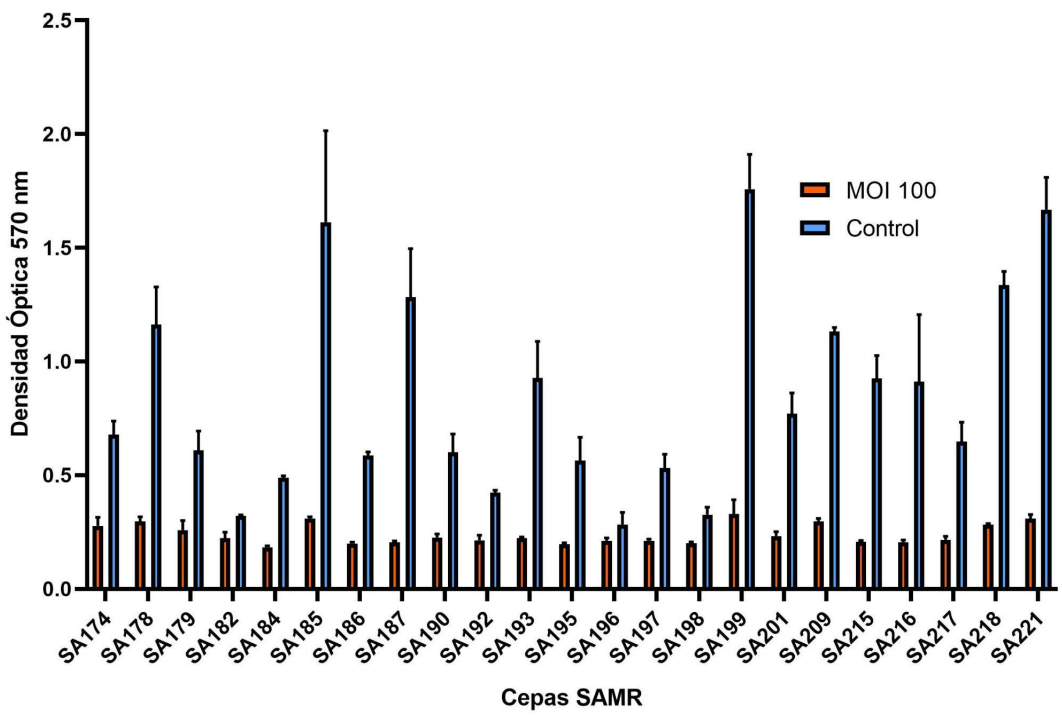
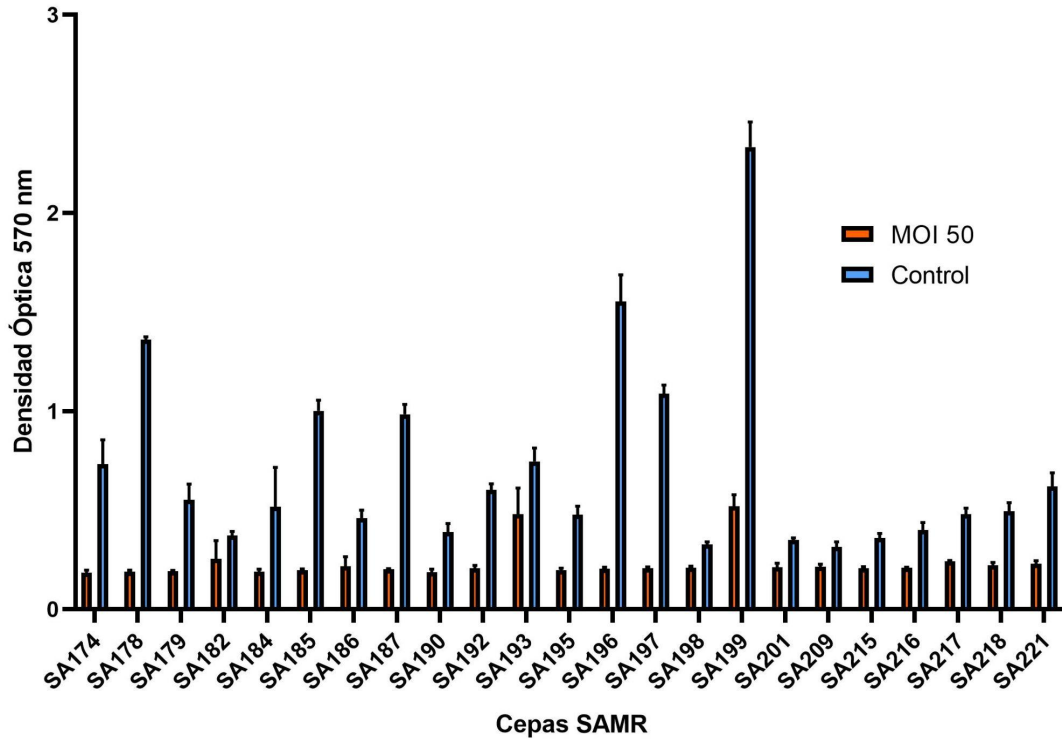


Figura n°4: Prevención de formación de biopelículas de SAMR con fago 3, a MOI 50 y MOI 100, con las 23 cepas formadoras fuertes de biopelículas.

Prevención de formación de biopelículas - Fago 8



Prevención de formación de biopelículas - Fago 8

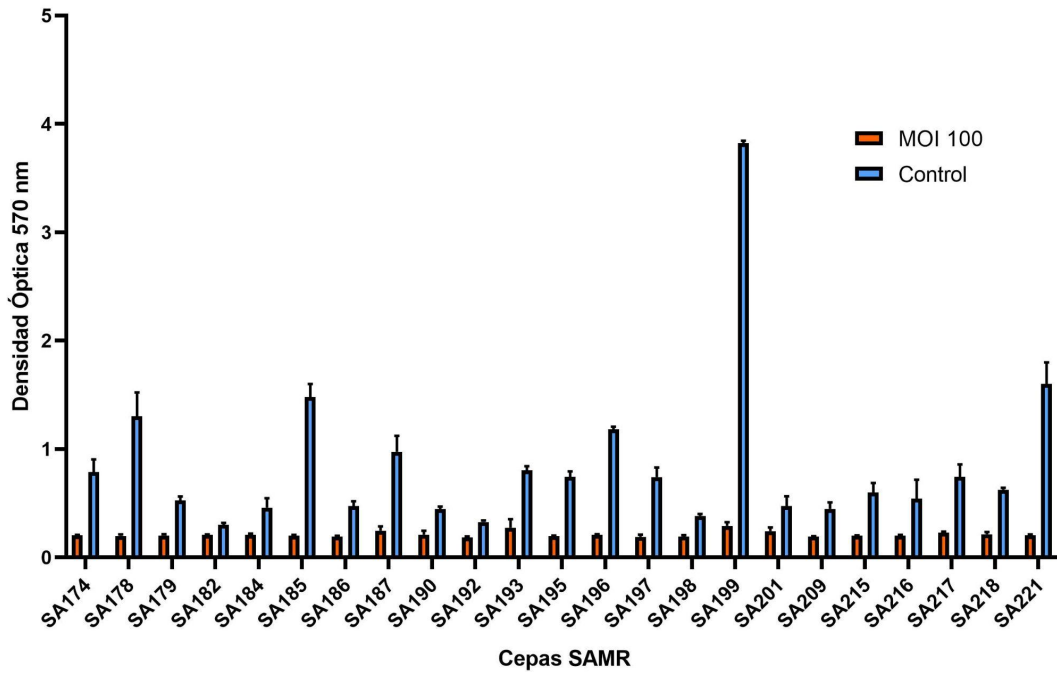


Figura n°5: Prevención de formación de biopelículas de SAMR con fago 8, a MOI 50 y MOI 100, con las 23 cepas formadoras fuertes de biopelículas.

Tabla n°6: Porcentajes de disminución de biomasa en el ensayo de prevención de formación de biopelículas, tratada con cada fago, a MOI 50 y MOI 100.

Ensayo de Prevención de Biopelículas de SAMR mediante fagos líticos		
Fago	MOI 50	MOI 100
1	34,20%(*)	29,35%
2	35,37%	30,29%
3	62,85%	65,16%
4	54,57%	54,28%
5	-6,38%	9,58%
6	-12,59%	0,72%
7	56,61%	61,32%
8	58,92%	65,97%

(*) El porcentaje de disminución fue calculado al dividir el promedio de la absorbancia de los casos tratados con fago y el promedio de la absorbancia de los casos controles, multiplicado por 100.

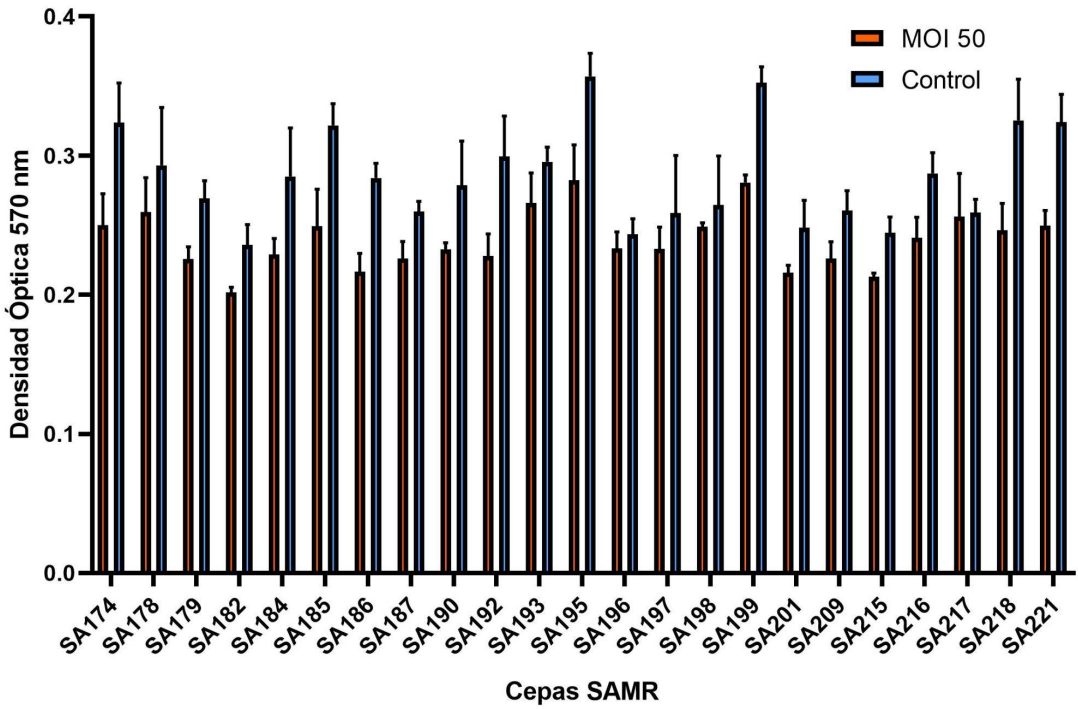
En el ensayo de prevención, se obtuvo que los fagos 1, 2, 3, 4, 7 y 8 (75%) evidenciaron una disminución en la biomasa de la biopelícula tratada respecto a su control, destacándose los fagos 3, 7 y 8 por su alta reducción de biomasa, que va de un 56,61% a un 65,97%. Por otro lado, los fagos 5 y 6 (25%) no fueron capaces de prevenir la formación de biopelículas, mostrando los valores más bajos de inhibición de biomasa (MOI 100), o incluso de forma inversa, favoreciendo el crecimiento de una biopelícula (MOI 50). Respecto de la MOI, se observaron leves diferencias entre la MOI 50 y MOI 100, con una tendencia a una mejor actividad de prevención a MOI 100 para los fagos que presentan mejor actividad (fago 3, 7 y 8).

6.4 Degradación de biopelículas preformadas de SAMR con fagos líticos

El ensayo de degradación de biopelículas preformadas con fagos líticos, comprendió la utilización de biopelículas formadas a las 24 horas. Se repitieron las mismas condiciones de

tratamiento del ensayo previo, y así también las condiciones de incubación. En las figuras n°6 y n°7 se muestran los resultados obtenidos del ensayo de degradación de biopelículas preformadas utilizando los fagos 1 y 7, con las 23 cepas SAMR formadoras fuertes de biopelícula. En la tabla n°7 se muestran los promedios de porcentaje de disminución de biomasa de biopelícula, para cada fago, a distintas MOI (MOI 50 y MOI 100).

Degradación de biopelículas - Fago 1



Degradación de biopelículas - Fago 1

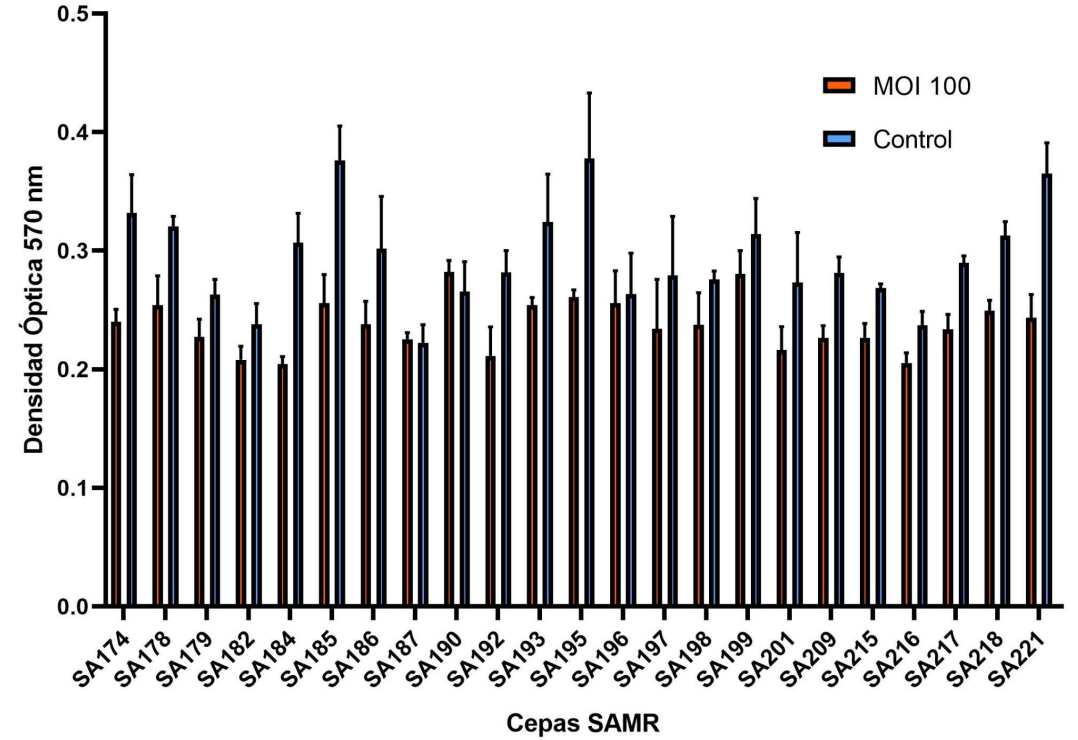
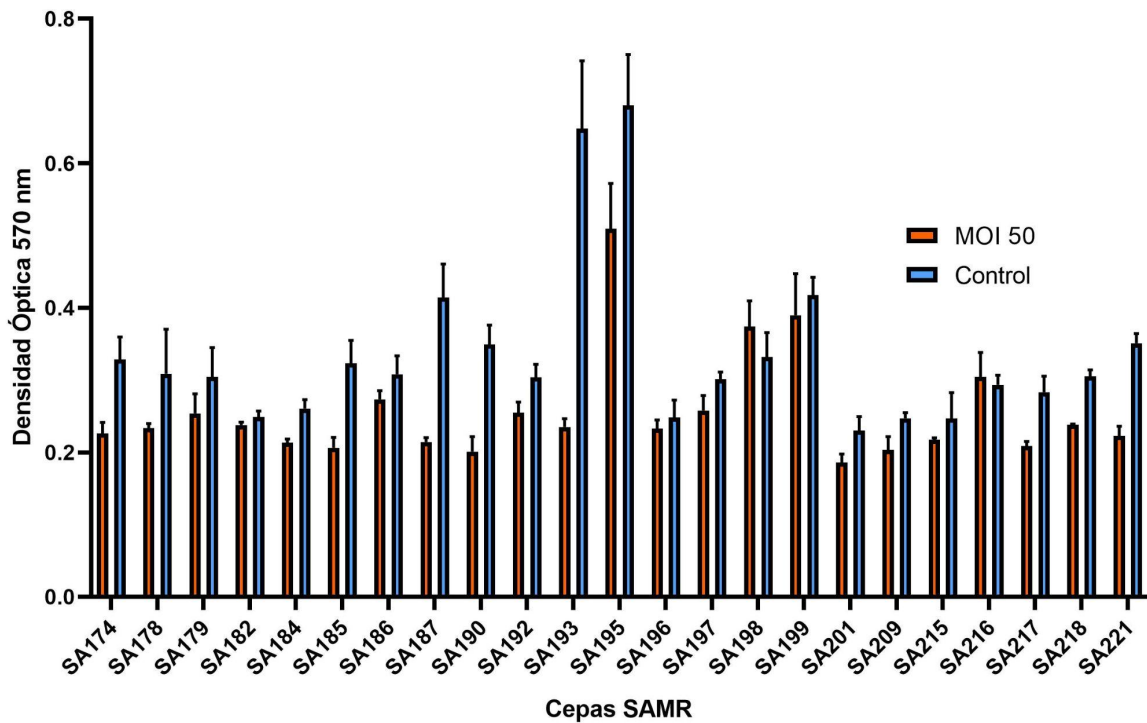


Figura n°6: Degradación de biopelículas preformadas de SAMR con fago 1, a MOI 50 y MOI 100, con las 23 cepas formadoras fuertes de biopelículas.

Degradación de biopelículas - Fago 7



Degradación de biopelículas - Fago 7

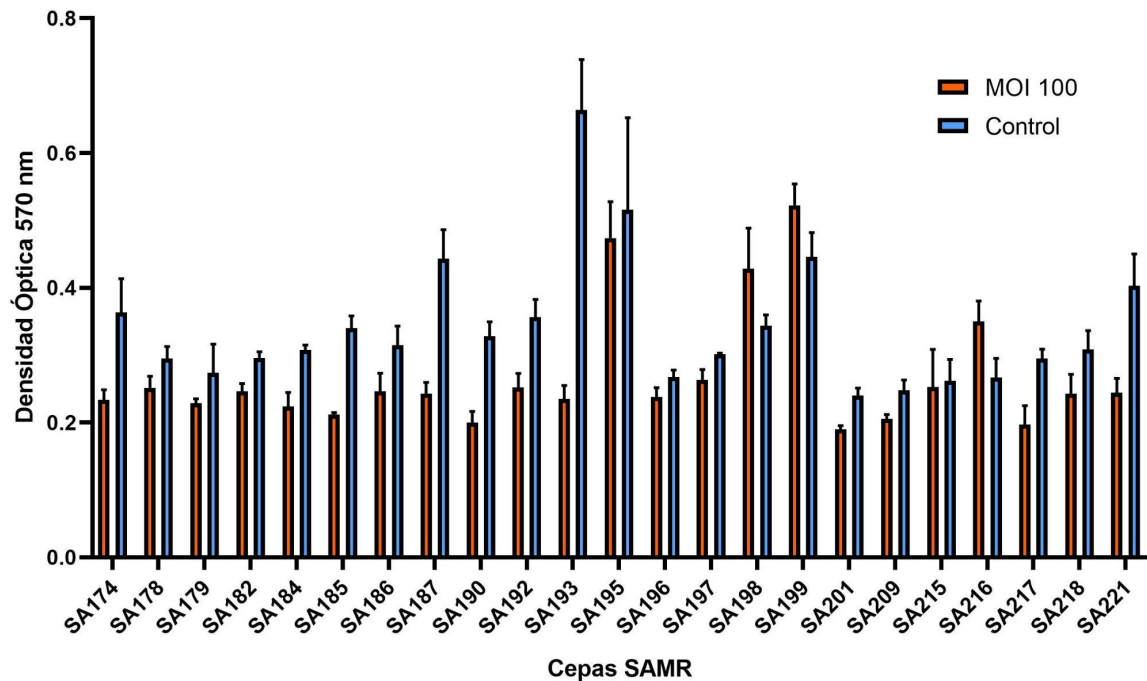


Figura n°7: Degradación de biopelículas preformadas de SAMR con fago 7, a MOI 50 y MOI 100, con las 23 cepas formadoras fuertes de biopelículas.

Tabla n°7: Porcentajes de disminución de biomasa en el ensayo de degradación de biopelículas preformadas, tratada con cada fago, a MOI 50 y MOI 100.

Ensayo de Degradación de Biopelículas de SAMR mediante fagos líticos		
Fago	MOI 50 (*)	MOI 100 (*)
1	15,62%	18,14%
2	4,42%	6,01%
3	-1,84%	-4,62%
4	0,49%	3,48%
5	8,31%	7,86%
6	4,74%	5,67%
7	20,99%	19,24%
8	1,59%	-6,19%

(*) El porcentaje de disminución fue calculado al dividir el promedio de la absorbancia de los casos tratados con fago y el promedio de la absorbancia de los casos controles, multiplicado por 100.

Los resultados del ensayo de degradación, evidenciaron que los fagos 1 y 7 (2/8; 25%) son los que presentaron mejor capacidad para degradar biopelícula preformada, con un porcentaje de disminución de biomasa que fluctuó entre los 15,62% a 20,99%. El fago 1 mostró su mejor capacidad de degradación a un MOI 100 (18,14%), mientras que el fago 7 tuvo mejor comportamiento a un MOI 50 (20,99%). Por otro lado, los fagos 5, 6, 2, 8 y 4 (ordenados decrecientemente según su actividad) mostraron una reducida capacidad para degradar biopelícula. De estos, sólo los fagos 6, 2 y 4 exhibieron una mejor capacidad para degradar biopelículas a un MOI 100. Por último, el fago 3 no fue capaz de degradar biopelícula en ninguno de los 2 MOI ensayados.

6.5 Análisis estadístico

Prevención de formación de biopelículas de SAMR con fagos líticos

En las tablas n°8 y n°9 se muestran los resultados del análisis estadístico utilizando la prueba de Wilcoxon, la cual es una prueba no paramétrica utilizada cuando no se puede suponer una normalidad de dichas muestras, y que permite comparar el resultado de dos variables relacionadas y determinar si existe una diferencia estadísticamente significativa entre ellas. Para esta prueba, se trabajó con un $\alpha = 0,05$.

El análisis estadístico demostró que para el ensayo de prevención de formación de biopelículas, 6/8 fagos (1, 2, 3, 4, 7 y 8) (75%) mostraron una reducción significativa de la biomasa de la biopelícula respecto a su control, tanto para una MOI de 50 como para una MOI 100.

Tabla n°8: Análisis estadístico para el ensayo de prevención de formación de biopelículas de SAMR, a MOI 50, utilizando prueba de Wilcoxon.

Fago	Estadística	MOI 50	Control	p*
1	Media	0,506	0,801	
	Mediana	0,306	0,660	<0,001
	D. estándar	0,582	0,560	
2	Media	0,514	0,801	
	Mediana	0,379	0,660	<0,001
	D. estándar	0,528	0,560	
3	Media	0,252	0,819	
	Mediana	0,219	0,683	<0,001
	D. estándar	0,063	0,456	
4	Media	0,328	0,819	
	Mediana	0,235	0,683	<0,001
	D. estándar	0,207	0,456	

5	Media	0,727	0,680	
	Mediana	0,533	0,528	0,92
	D. estándar	0,585	0,421	
6	Media	0,763	0,680	
	Mediana	0,668	0,528	0,18
	D. estándar	0,517	0,421	
7	Media	0,279	0,718	
	Mediana	0,196	0,518	<0,001
	D. estándar	0,274	0,488	
8	Media	0,234	0,718	
	Mediana	0,208	0,518	<0,001
	D. estándar	0,086	0,488	

En rojo se destacan aquellos resultados en donde el cambio de la biomasa de la biopelícula, medido en densidad óptica, fue estadísticamente significativo.

Tabla n°9 - Análisis estadístico para el ensayo de prevención de formación de biopelículas de SAMR, a MOI 100, utilizando prueba de Wilcoxon.

Fago	Estadística	MOI 100	Control	p*
1	Media	0,625	0,922	
	Mediana	0,391	0,678	<0,001
	D. estándar	0,665	0,707	
2	Media	0,659	0,922	
	Mediana	0,358	0,678	<0,001
	D. estándar	0,642	0,707	
3	Media	0,240	0,850	
	Mediana	0,223	0,679	<0,001
	D. estándar	0,044	0,443	
4	Media	0,345	0,850	

	Mediana	0,222	0,679	<0,001
	D. estándar	0,293	0,443	
5	Media	0,684	0,728	
	Mediana	0,550	0,553	0,06
	D. estándar	0,538	0,467	
6	Media	0,741	0,728	
	Mediana	0,556	0,553	0,83
	D. estándar	0,579	0,467	
7	Media	0,358	0,860	
	Mediana	0,196	0,624	<0,001
	D. estándar	0,643	0,739	
8	Media	0,213	0,860	
	Mediana	0,203	0,624	<0,001
	D. estándar	0,027	0,739	

En rojo se destacan aquellos resultados en donde el cambio de la biomasa de la biopelícula, medido en densidad óptica, fue estadísticamente significativo.

Degradación de biopelículas preformadas de SAMR con fagos líticos

En las tablas n°10 y n°11 se muestran los resultados de los análisis estadísticos para el ensayo de degradación de biopelículas preformadas. Brevemente, a una MOI de 50, los fagos 1, 2, 5 y 7 mostraron una reducción significativa de la biomasa de la biopelícula generada respecto a su control. Por otro lado, a una MOI de 100, los fagos 1, 2, 5, 6 y 7 mostraron una reducción significativa de la biomasa respecto a su control.

Tabla n°10: Análisis estadístico para el ensayo de degradación de biopelículas preformadas de SAMR, a MOI 50, utilizando prueba de Wilcoxon.

Fago	Estadística	MOI 50	Control	p*
1	Media	0,240	0,286	

	Mediana	0,233	0,284	<0,001
	D. estándar	0,021	0,035	
2	Media	0,273	0,286	
	Mediana	0,261	0,284	0,01
	D. estándar	0,036	0,035	
3	Media	0,298	0,308	
	Mediana	0,299	0,284	0,39
	D. estándar	0,052	0,132	
4	Media	0,292	0,308	
	Mediana	0,282	0,284	0,39
	D. estándar	0,051	0,132	
5	Media	0,420	0,461	
	Mediana	0,395	0,426	0,03
	D. estándar	0,134	0,137	
6	Media	0,433	0,461	
	Mediana	0,422	0,426	0,11
	D. estándar	0,108	0,137	
7	Media	0,256	0,336	
	Mediana	0,233	0,305	<0,001
	D. estándar	0,075	0,114	
8	Media	0,312	0,336	
	Mediana	0,271	0,305	0,13
	D. estándar	0,116	0,114	

En rojo se destacan aquellos resultados en donde el cambio de la biomasa de la biopelícula, medido en densidad óptica, fue estadísticamente significativo.

Tabla n°11: Análisis estadístico para el ensayo de degradación de biopelículas preformadas de SAMR, a MOI 100, utilizando prueba de Wilcoxon.

Fago	Estadística	MOI 100	Control	p*
1	Media	0,238	0,294	
	Mediana	0,238	0,282	<0,001
	D. estándar	0,022	0,042	
2	Media	0,274	0,294	
	Mediana	0,270	0,282	<0,001
	D. estándar	0,027	0,042	
3	Media	0,327	0,334	
	Mediana	0,294	0,287	0,20
	D. estándar	0,105	0,210	
4	Media	0,296	0,334	
	Mediana	0,286	0,287	0,29
	D. estándar	0,057	0,210	
5	Media	0,441	0,481	
	Mediana	0,433	0,461	0,048
	D. estándar	0,140	0,137	
6	Media	0,451	0,481	
	Mediana	0,449	0,461	0,03
	D. estándar	0,126	0,137	
7	Media	0,269	0,343	
	Mediana	0,243	0,309	<0,001
	D. estándar	0,089	0,098	
8	Media	0,345	0,343	
	Mediana	0,278	0,309	0,54
	D. estándar	0,165	0,098	

En rojo se destacan aquellos resultados en donde el cambio de la biomasa de la biopelícula, medido en densidad óptica, fue estadísticamente significativo.

7.- Discusión

7.1 Identificación y categorización de cepas SAMR productoras de biopelículas

Para esta investigación, primero se identificó y categorizó las cepas que son capaces de formar biopelículas. Mediante Agar Rojo Congo (ARC), se determinó que el 100% de las cepas SAMR produjeron exopolisacáridos, de forma análoga a lo reportado por Ferreira et al. (2014) quien demostró que de 64 cepas de *S. aureus*, el 100% produjo exopolisacáridos (40). Sin embargo, en otro estudio, Manandhar et al. (2018) reportó que de 131 cepas SAMR sólo el 1,52% dió positivo para la producción de exopolisacárido, lo cual contrastó con los resultados del Método en Tubo (MT) y Microplaca de Titulación de Poliestireno (MTP), los cuales dieron porcentajes más altos de positividad para formación de biopelícula (28% y 43,5%, respectivamente) (56). Una posible explicación a las diferencias observadas con los ensayos de Manandhar et al. (2018), podría ser la composición diferente del medio de cultivo y/o condiciones de incubación especiales no reportadas por la autora. Posterior al estudio en ARC, se procedió a identificar las cepas formadoras de biopelículas a través del método MTP. En este estudio, los resultados de MTP mostraron buena correlación con los obtenidos en el ensayo de ARC, dado que todas las cepas que produjeron exopolisacáridos, también fueron capaces de formar biopelículas. El grado de formación de biopelículas fue variable, y predominaron las cepas fuertes (46%). De manera similar, Oyama et al. (2016) informó que de 20 cepas SAMR, el 100% produjo biopelículas y el 50% de ellas fueron fuertes (57). Así también, Saud et al. (2023) reportó que de 109 cepas SAMR, el 71,56% de ellas formó biopelículas, y el 48,71% eran formadoras fuertes (58). En otro estudio, Niek et al. (2021) estudió 36 cepas SAMR, encontrando que el 100% produjo biopelículas y el 91,7% de ellas fueron formadoras fuertes (59). Por otro lado, Boudet et al. (2021) informó que de 35 cepas SAMR, el 100% formó biopelículas y el 27% fueron formadoras fuertes (60).

Aunque hay diferencias entre los resultados publicados por estos estudios, es interesante destacar que en las cepas SAMR, hay una fracción importante de cepas formadoras fuertes de biopelículas, lo cual clínicamente se podría relacionar a la patogenia de SAMR y favorecer las infecciones crónicas, persistentes y recurrentes.

Además de los estudios fenotípicos, sería interesante incluir la detección de genes asociados a la formación de biopelícula, lo cual permitiría correlacionar la base genética de las biopelículas y su expresión fenotípica en distintas matrices y condiciones, y posteriormente estudiar la influencia del micro y macroambiente que rodea la cepa y cómo estos determinan la formación de biopelículas, ya sea estudiando la formación en distintas condiciones de incubación (medio de cultivo, temperatura, tiempo, modelo estático/dinámico).

7.2 Prevención de formación de biopelículas de SAMR por fagos líticos

Una vez identificadas y categorizadas las cepas productoras de biopelículas, se seleccionaron aquellas cepas formadoras fuertes (n=23) y se investigó la capacidad de 8 fagos líticos para prevenir la formación de biopelículas. En el estudio de interacción de fagos y biopelículas, se describe que la prevención o inhibición de una biopelícula, ocurre en las etapas iniciales del ciclo de una biopelícula, y comprende tanto la fase planctónica de una bacteria, como su adhesión reversible e irreversible a una matriz. Por lo tanto, dentro de los mecanismos de prevención se considera también el efecto lítico *per se* de un fago, el cual favorece el efecto antibiopelícula Abedon et al. (2021) (61).

En este estudio, el 75% de los fagos mostró una significativa actividad de prevención de la formación de biopelículas, lo cual se evidenció en una menor producción de biomasa de las cepas coincubadas con fagos respecto a las cepas control, no incubadas con fagos (56,61%-65,97%). Estudios previos de prevención de la formación de biopelículas en *S. aureus*, mediante la acción de fagos líticos, muestran variación en los porcentajes de prevención medidos en biomasa (63, 64), lo

cual puede ser atribuible a diferencias en el RH de los fagos y a las condiciones de incubación del ensayo (que son variable entre estudios), lo cual probablemente explicaría en parte por qué los datos son dispares.

Nuestros resultados de prevención en la formación de biopelículas concuerdan con lo descrito en la literatura, en la cual en general los fagos tienen un mejor rendimiento de actividad antibiopelícula en las etapas iniciales del ciclo de una biopelícula en comparación de las etapas posteriores, tal como lo señala Tkhilaishvili et al. (2020), quien indica que la prevención de la formación de biopelículas con fagos líticos se considera la mejor estrategia para reducir su aparición, por el hecho de que una biopelícula ya establecida o preformada es más difícil de erradicar (62).

7.3 Degradación de biopelículas preformadas de SAMR por fagos líticos

Posterior al estudio de prevención de biopelículas, se procedió a investigar la degradación de biopelículas preformadas de *S. aureus*. Nuestro estudio permitió dilucidar que el 25% de los fagos tuvo una degradación significativa de la biomasa de la biopelícula, resultado que difiere a lo reportado por Gutierrez et al. (2015), quien comunicó que el 100% de los fagos (n=2) degradó biopelículas de 51 cepas de *S. aureus* (65). Además, Totten et al. (2022) notificó que el 33% de ellos produjo una reducción significativa en la biomasa de la biopelícula de 122 cepas de *S. aureus* (66).

Se observa una heterogeneidad en cuanto a la capacidad de los fagos para degradar biopelículas preformadas por *S. aureus*. Cabe hacer notar que en esta etapa del ciclo de una biopelícula, el componente más importante y que le plantea dificultades a un fago, molécula o compuesto, para penetrarla es la SPE. Por lo tanto, aquellos fagos que sinteticen y/o tengan en su estructura una despolimerasa, eventualmente podrían tener mayor facilidad para degradar biopelículas a comparación de aquellos fagos que no sinteticen despolimerasas. Sin embargo, tal como destaca Bielecka et al. (2021), pese a que un fago produzca despolimerasa libre o asociada a su

estructura, la función de esta depende de la cantidad y tipo de polisacárido, puesto que algunas degradan bien la SPE, pero no el polisacárido capsular de una cepa bacteriana. Por lo tanto, el sintetizar despolimerasas no asegura una degradación, y a su vez, que un fago no sintetice despolimerasas no necesariamente significa que sea incapaz de degradar biopelículas (67).

Finalmente, nuestros resultados respaldan lo reportado en la literatura, respecto a que los fagos tendrían una menor actividad antibiopelícula en la degradación de una biopelícula preformada, que en la inhibición de su formación, lo cual depende de las características del fago y su capacidad de degradación asociada a enzimas, así como de la composición de polisacáridos de la biopelícula.

Para complementar el estudio de la degradación de biopelículas por parte de un fago lítico y mejorar su interpretación, sería interesante investigar previamente la constitución genética de un fago y si este posee genes que codifiquen despolimerasas, así como también estudiar la expresión fenotípica de esta, interacciones y condiciones óptimas para su función catalítica. Por otro lado, ensayos de interacción fago-biopelículas deberían considerar estandarizar algunos parámetros experimentales con el propósito de homogeneizar los resultados y permitir comparación, como por ejemplo aquellos asociados a las características biológicas de un fago: 1) la curva de crecimiento de un solo paso de un fago, 2) el tamaño de explosión del fago a estudiar, 3) el rango de hospedero del fago, 4) la cinética de la actividad de prevención, 5) estandarización de las condiciones de incubación, títulos del fago y concentración de la bacteria.

Algunas preguntas que subyacen a la experimentación *in vitro* llevada a cabo en esta investigación, son: ¿Por qué se usaron fagos que tienen poca o nula capacidad lítica en la bacteria? y ¿El efecto antibiopelícula fue un efecto inespecífico de menor viabilidad celular bacteriana? En respuesta a la primera pregunta, la decisión de estudiar fagos que pudieran tener un rango de hospedero limitado, o con una leve actividad lítica, se basa en que la actividad lítica planctónica de un fago es independiente de la actividad enzimática degradante de matriz extracelular que posea. En otras palabras, son vías

independientes de destrucción de componentes producidos por la bacteria y de lisis celular propiamente tal. Por ello, que un fago tenga una leve actividad lítica planctónica no implica su descarte automático, y debe ser probado en estudios de susceptibilidad de biopelículas, ya que podría presentarse una actividad degradante, más no una actividad lítica, lo cual puede ser visualizado mediante estudios de degradación de matriz con anticuerpos marcados, y en contraste, con estudios de determinación de viabilidad celular, como por ejemplo, el ensayo con XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida).

En respuesta a la segunda pregunta, el efecto antibiopelícula comprende varias etapas, de las cuales destaca la prevención, control y degradación de biopelículas. El control, entendido como el período en que los fagos funcionan como interferentes en la acumulación de células planctónicas y matriz extracelular, permite el impedimento de mayor formación de biopelícula. Por lo tanto, el efecto de los fagos sobre las bacterias es llevar a una menor viabilidad celular para evitar una formación posterior de biopelículas, más no la viabilidad celular de una bacteria impida la formación de biopelículas. De hecho, las cepas bacterianas a estudiar primero son cultivadas en medios enriquecidos y no selectivos ni diferenciales, de tal manera de otorgarle un ambiente en que ellas puedan expresar su mayor cantidad de factores y encontrarse metabólicamente activas (61).

7.3 Limitaciones

Algunas limitaciones de este trabajo de investigación se relacionan con lo reportado por Abedon et al. (2021) (61). Para la identificación de cepas formadoras de biopelículas, sólo se utilizó un punto de tiempo para la determinación de la biomasa (punto final), fijado a las 48 horas de incubación (41). Las principales limitantes para no haber hecho un estudio cinético fueron el alto requerimiento de tiempo y lo laborioso del método, considerando el tener que trabajar con 50 cepas bacterianas.

En segundo lugar, la determinación de la cantidad de biopelícula fue realizada con el ensayo de cristal violeta, el cual solo permite cuantificar la biomasa. Este ensayo podría no ser tan preciso,

debido a que sólo mide biomasa (conjunto de células viables, no viables y matriz extracelular), por lo que de forma complementaria sería útil emplear otro método que mida biopelícula formada.

En tercer lugar, se caracterizó la actividad antibiopelícula de los 8 fagos líticos sólo en condiciones estáticas, por 24 horas y a temperatura de 35-37°C. Las razones por las cuales no se emplearon otras condiciones, como distinta temperatura de incubación, otros tiempos de medición y trabajar concomitantemente con un modelo dinámico, fueron la laboriosidad compleja y la alta demanda de tiempo.

8.- Conclusiones

Se estudiaron 50 cepas SAMR chilenas obtenidas de las zonas Norte, Centro y Sur del país, las cuales fueron capaces de formar biopelículas en una matriz abiótica de poliestireno, y de ellas, el 46% fueron caracterizadas como formadoras fuertes de biopelículas.

Los 8 fagos líticos del laboratorio Vertebral (COANIQUEM) fueron probados contra biopelículas de las cepas SAMR formadoras fuertes de biopelícula para determinar su actividad antibiopelícula, de los cuales el 75% tuvo una actividad de prevención y el 25% tuvo una actividad de degradación de biopelículas preformadas.

Los resultados permiten demostrar que de este grupo de fagos, algunos de ellos califican para ser parte de un cóctel de fagos que se dirija contra bacterias de importancia clínica que forman biopelículas, como *S. aureus*, para ser usados como una alternativa terapéutica al uso de antimicrobianos convencionales, y así combatir la falla terapéutica y el aumento de comorbilidades, la resistencia antimicrobiana y el costo excesivo asociado al gasto de insumos médicos causado por bacterias multirresistentes. Este estudio sienta las bases del comienzo del estudio de la interacción fago-biopelícula a partir de fagos y cepas bacterianas chilenas, y la promoción de los fagos líticos como una alternativa terapéutica útil, prometedora y natural.

8.1 Proyecciones

En estudios posteriores, los resultados podrían ser optimizados estudiando cuantitativamente las biopelículas utilizando más de una técnica, como por ejemplo, determinación de biomasa por ensayo de CV y determinación de viabilidad mediante recuento de colonias.

Los resultados de la actividad antibiopelícula de los fagos puede ser mejorada al ser estudiada bajo distintas condiciones de temperatura, utilización tanto de modelos estáticos como dinámicos, títulos estandarizados, y utilizando MOI más amplias. A su vez, es conveniente que la visualización de la actividad antibiopelícula de los fagos sea mediante un estudio cinético (determinaciones en diferentes puntos de tiempo), pues el eventual surgimiento de mutantes insensibles a bacteriófagos (MIB) durante el ensayo podrían entorpecer los resultados de las determinaciones de punto final. También, la actividad antibiopelícula de los fagos puede ser interpretada de una manera más acabada al conocer la capacidad codificante de despolimerasa, lo cual se podría hacer previamente haciendo un estudio genotípico y tamizaje fenotípico de degradación de SPE por parte de estas enzimas.

8.2 Propuestas de investigación

Como ideas para futuras investigaciones relacionadas al estudio de las biopelículas, interacción fago-biopelícula y actividad antibiopelícula de los fagos líticos, sería interesante estudiar el antagonismo en la formación de biopelículas de *S. aureus* con algún otro microorganismo causante de infecciones asociadas a biopelículas y que se encuentran en el ambiente intrahospitalario. Así también, evaluar la actividad antibiopelícula de un cóctel de fagos, compuesto por fagos que tengan actividad de prevención y otros que tengan actividad degradante, sobre biopelículas de *S. aureus*. También, estudiar el sinergismo de fagos líticos y antibióticos contra biopelículas de *S. aureus*. Por último, estudiar las posibles interferencias que podrían haber al aplicar fagos solos y un cóctel de

fagos sobre una biopelícula compuesta por más de una cepa de *S. aureus*, y así también, por distintas especies de *Staphylococcus*, como *S. aureus* y *S. epidermidis*.

9.- Referencias bibliográficas

1. Tracey A, Taylor, Chandrashekar G. Unakal. *Staphylococcus aureus* Infection [Internet]. 2022 [cited 2023 Jun 4]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>
2. Zhu Li. A Review of *Staphylococcus aureus* and the Emergence of Drug-Resistant Problem. *Adv Microbiol* [Internet]. 2018 Jan [cited 2023 Jun 4];8. Available from: <https://www.scirp.org/journal/paperinformation.aspx?paperid=82160>
3. Howden BP, Giulieri SG, Wong Fok Lung T, Baines SL, Sharkey LK, Lee JYH, et al. *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2023;21(6):380–95. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00852-y>
4. M G. *Staphylococcus aureus*: A brief review. *International Journal of Veterinary Science and Research* [Internet]. 2018 Nov 28;020–2. Available from: <https://www.peertechz.com/articles/IJVS-4-131.php>
5. C TSY, S DJ, Emily E, L HT, G FV. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2015 May 27;28(3):603–61. Available from: <https://doi.org/10.1128/cmr.00134-14>
6. Foster TJ, Geoghegan JA. Chapter 37 - *Staphylococcus aureus*. In: Tang YW, Sussman M, Liu D, Poxton I, Schwartzman J, editors. *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)* [Internet]. Boston: Academic Press; 2015. p. 655–74. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123971692000378>
7. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, et al. Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association* [Internet]. 2018;81(1):7–11. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1726490117302587>
8. American Chemical Society, Royal Society of Chemistry. The discovery and development of penicillin [Internet]. 1st ed. Vol. 1. London; 1999 [cited 2023 Jun 4]. 1–11 p. Available from: <https://www.acs.org/education/whatischemistry/landmarks/historia-quimica/descubrimiento-desarrollo-penicilina.html#arriba>
9. Instituto de Salud Pública de Chile. BOLETÍN DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA. 2022 [cited 2023 Jun 4];1–29. Available from: https://www.ispch.cl/wp-content/uploads/2022/09/BoletinRAM_FINAL-1-1.pdf
10. Instituto de Salud Pública de Chile. Vigilancia de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente adquirido en la comunidad. Chile, 2012 – 2016. 2017 Oct [cited 2023 Jun 4];1–16. Available from: [https://www.ispch.cl/sites/default/files/BoletinStahylococcusResistente-20062018A%20\(1\).pdf](https://www.ispch.cl/sites/default/files/BoletinStahylococcusResistente-20062018A%20(1).pdf)
11. Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2010/07/29. 2010 Sep;67(18):3057–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20668911>
12. Lee AS, de Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers* [Internet]. 2018;4(1):18033. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>
13. Mukherjee R, Priyadarshini A, Pandey RP, Raj VS. Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus*. In: Aqib A, editor. *Insights Into Drug Resistance in Staphylococcus aureus* [Internet]. Rijeka: IntechOpen; 2021. p. Ch. 5. Available from: <https://doi.org/10.5772/intechopen.96888>
14. P HB, K DJ, R JPD, P ST, Lindsay GM. Reduced Vancomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus*, Including Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Strains: Resistance Mechanisms, Laboratory Detection, and Clinical Implications. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2010 Jan 1;23(1):99–139. Available from: <https://doi.org/10.1128/cmr.00042-09>
15. Instituto de Salud Pública de Chile. Vigilancia de resistencia a vancomicina en bacterias que pueden producir Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS). 2019 Nov [cited 2023 Jun 4];1–21. Available from: https://www.ispch.cl/sites/default/files/Bolet%C3%ADnIAAS-24012020A_0.pdf
16. Organización Mundial de la Salud. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [Internet]. 2017 [cited 2023 Jun 4]. p. 1–1. Available from: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

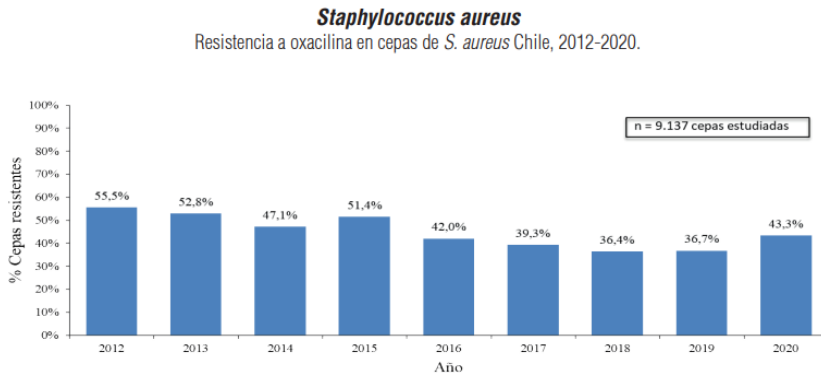
17. Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence* [Internet]. 2021 Dec;12(1):547–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33522395>
18. Foster TJ, Geoghegan JA. Chapter 37 - *Staphylococcus aureus*. In: Tang YW, Sussman M, Liu D, Poxton I, Schwartzman J, editors. *Molecular Medical Microbiology* (Second Edition) [Internet]. Boston: Academic Press; 2015. p. 655–74. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123971692000378>
19. Tsuji BT, Rybak MJ, Cheung CM, Amjad M, Kaatz GW. Community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a comparison of molecular epidemiology and antimicrobial activities of various agents. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2007;58(1):41–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889306004275>
20. Peng Q, Tang X, Dong W, Sun N, Yuan W. A Review of Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* and Its Regulation Mechanism. *Antibiotics* [Internet]. 2023;12(1). Available from: <https://www.mdpi.com/2079-6382/12/1/12>
21. Katrin S, R HA. *Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [Internet]. 2020 Aug 12;84(3):10.1128/mnbr.00026-19. Available from: <https://doi.org/10.1128/mnbr.00026-19>
22. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2016;14(9):563–75. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
23. Idrees M, Sawant S, Karodia N, Rahman A. *Staphylococcus aureus* Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2021;18(14). Available from: <https://www.mdpi.com/1660-4601/18/14/7602>
24. P DODM, M FB, J KT, A HPN, A SM, A BS, et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2020 May 13;33(3):10.1128/cmr.00181-19. Available from: <https://doi.org/10.1128/cmr.00181-19>
25. Soressa Bakala G, Motuma D. Review of bacteriophage and its applications. *International Journal of Veterinary Science and Research* [Internet]. 2022 Sep 27;8(3):133–47. Available from: <https://www.peertechzpublications.org/articles/IJVS-8-226.php>
26. São-José C, Costa AR, Melo LDR. Editorial: Bacteriophages and Their Lytic Enzymes as Alternative Antibacterial Therapies in the Age of Antibiotic Resistance. *Front Microbiol* [Internet]. 2022;13. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.884176>
27. Madeline Barron. Phage therapy: past, present and future. *American Society for Microbiology* [Internet]. 2022 Aug 31 [cited 2023 Jul 15];1–1. Available from: <https://asm.org/Articles/2022/August/Phage-Therapy-Past,-Present-and-Future>
28. Ye M, Sun M, Huang D, Zhang Z, Zhang H, Zhang S, et al. A review of bacteriophage therapy for pathogenic bacteria inactivation in the soil environment. *Environ Int* [Internet]. 2019;129:488–96. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412019305410>
29. Haq IU, Chaudhry WN, Akhtar MN, Andleeb S, Qadri I. Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Virol J* [Internet]. 2012;9(1):9. Available from: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-9>
30. Casey E, Van Sinderen D, Mahony J. In Vitro Characteristics of Phages to Guide ‘Real Life’ Phage Therapy Suitability. *Viruses* [Internet]. 2018;10(4). Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/10/4/163>
31. Maimaiti Z, Li Z, Xu C, Chen J, Chai W. Global trends and hotspots of phage therapy for bacterial infection: A bibliometric visualized analysis from 2001 to 2021. *Front Microbiol* [Internet]. 2023 Jan 9;13:1067803. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36699585>
32. Voelker R. FDA Approves Bacteriophage Trial. *JAMA* [Internet]. 2019 Feb 19;321(7):638. Available from: <https://doi.org/10.1001/jama.2019.0510>
33. Liu D, Van Bellegheem JD, de Vries CR, Burgener E, Chen Q, Manasherob R, et al. The Safety and Toxicity of Phage Therapy: A Review of Animal and Clinical Studies. *Viruses* [Internet]. 2021;13(7). Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/7/1268>
34. Chang C, Yu X, Guo W, Guo C, Guo X, Li Q, et al. Bacteriophage-Mediated Control of Biofilm: A Promising New Dawn for the Future. *Front Microbiol* [Internet]. 2022;13. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.825828>
35. Amankwah S, Abdella K, Kassa T. Bacterial Biofilm Destruction: A Focused Review On The Recent Use of Phage-Based Strategies With Other Antibiofilm Agents. *Nanotechnol Sci Appl* [Internet]. 2021 Sep 14;14:161–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34548785>

36. Visnapuu A, der Gucht M, Wagemans J, Lavigne R. Deconstructing the Phage–Bacterial Biofilm Interaction as a Basis to Establish New Antibiofilm Strategies. *Viruses* [Internet]. 2022;14(5). Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/14/5/1057>
37. Pires DP, Melo LDR, Azeredo J. Understanding the Complex Phage-Host Interactions in Biofilm Communities. *Annu Rev Virol* [Internet]. 2021 Sep 29;8(1):73–94. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-091919-074222>
38. Banerjee S, Das S, Rai C, Bhattacharyya S, Roy A. EVALUATION OF DETECTION METHODS OF BIOFILM FORMATION BY BACILLUS CEREUS AND STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATES FROM FOODS. 2018 May 1;
39. Diana Sanchez. Universidad de Extremadura. 2022 [cited 2023 Jul 15]. p. 1–1 AGAR ROJO Congo. Available from: <https://www.studocu.com/es/document/universidad-de-extremadura/patologia-infecciosa-i/agar-rojo-congo/34137203>
40. Ferreira AA, Tette PAS, Mendonça RCS, Soares A de S, Carvalho MM De. Detection of exopolysaccharide production and biofilm-related genes in *Staphylococcus* spp. isolated from a poultry processing plant. *Food Science and Technology (Campinas)* [Internet]. 2014 Dec [cited 2023 Jul 16];34(4):710–6. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612014000400010&lng=en&nrm=iso&tlng=en
41. STEPANOVIĆ S, VUKOVIĆ D, HOLA V, BONAVENTURA GDI, DJUKIĆ S, ĆIRKOVIĆ I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* [Internet]. 2007 Aug 1;115(8):891–9. Available from: https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
42. Chen Q, Xie S, Lou X, Cheng S, Liu X, Zheng W, et al. Biofilm formation and prevalence of adhesion genes among *Staphylococcus aureus* isolates from different food sources. *Microbiologypopen* [Internet]. 2020 Jan 1;9(1):e00946. Available from: <https://doi.org/10.1002/mbo3.946>
43. Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR, et al. Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol* [Internet]. 2017 May 4;43(3):313–51. Available from: <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>
44. Díez-García M, Capita R, Alonso-Calleja C. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiol* [Internet]. 2012;31(2):173–80. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002012000676>
45. Hamad PA. Phenotypic and Molecular Detection of Biofilm Formation in Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Isolated from Different Clinical Sources in Erbil City. *Mediterr J Hematol Infect Dis* [Internet]. 2023 Mar 1;15(1):e2023016–e2023016. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36908866>
46. Rodríguez-Lázaro D, Alonso-Calleja C, Oniciuc EA, Capita R, Gallego D, González-Machado C, et al. Characterization of Biofilms Formed by Foodborne Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol* [Internet]. 2018;9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.03004>
47. El-Atrees DM, El-Kased RF, Abbas AM, Yassien MA. Characterization and anti-biofilm activity of bacteriophages against urinary tract *Enterococcus faecalis* isolates. *Sci Rep* [Internet]. 2022;12(1):13048. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17275-z>
48. Goodarzi F, Hallajzadeh M, Sholeh M, Talebi M, Pirhajati Mahabadi V, Amirnozafari N. Anti-biofilm Activity of a Lytic Phage Against Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis*. *Iran J Pathol* [Internet]. 2022/08/12. 2022;17(3):285–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36247507>
49. Wiguna OD, Waturangi DE, Yogiara. Bacteriophage DW-EC with the capability to destruct and inhibit biofilm formed by several pathogenic bacteria. *Sci Rep* [Internet]. 2022;12(1):18539. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22042-1>
50. Kim SG, Jun JW, Giri SS, Yun S, Kim HJ, Kim SW, et al. Isolation and characterisation of pVa-21, a giant bacteriophage with anti-biofilm potential against *Vibrio alginolyticus*. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):6284. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42681-1>
51. Latka A, Drulis-Kawa Z. Advantages and limitations of microtiter biofilm assays in the model of antibiofilm activity of *Klebsiella* phage KP34 and its depolymerase. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):20338. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77198-5>
52. Drilling A, Morales S, Jardeleza C, Vreugde S, Speck P, Wormald PJ. Bacteriophage Reduces Biofilm of *Staphylococcus Aureus* Ex Vivo Isolates from Chronic Rhinosinusitis Patients. *Am J Rhinol Allergy* [Internet]. 2014 Jan 1;28(1):3–11. Available from: <https://doi.org/10.2500/ajra.2014.28.4001>

53. Abou Zeid AA, Swelim MA, Reda FM, Abd El Haveez AM, Nasr-Eldin MA. Effectiveness of Four Lytic Phages Against Biofilm-Producing and Multidrug-Resistant *Escherichia Coli*. *Benha Journal of Applied Sciences* [Internet]. 2021;6(1):53–65. Available from: https://bjas.journals.ekb.eg/article_167708.html
54. Ali Gharieb RM, Saad MF, Mohamed AS, Tartor YH. Characterization of two novel lytic bacteriophages for reducing biofilms of zoonotic multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and controlling their growth in milk. *LWT* [Internet]. 2020;124:109145. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364382030133X>
55. Liu S, Hon K, Bouras GS, Psaltis AJ, Shearwin K, Wormald PJ, et al. APTC-C-SA01: A Novel Bacteriophage Cocktail Targeting *Staphylococcus aureus* and MRSA Biofilms. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022;23(11). Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/11/6116>
56. Manandhar S, Singh A, Varma A, Pandey S, Shrivastava N. Biofilm Producing Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates Augmented Prevalence of Antibiotic Resistant Cases in Tertiary Care Hospitals of Nepal. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 Nov 27;9:2749. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30538678>
57. Oyama T, Miyazaki M, Yoshimura M, Takata T, Ohjimi H, Jimi S. Biofilm-Forming Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Survive in Kupffer Cells and Exhibit High Virulence in Mice. *Toxins (Basel)* [Internet]. 2016 Jun 30;8(7):198. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27376326>
58. Saud B, Khatri G, Amatya N, Paudel G, Shrestha V. Methicillin-Resistant and Biofilm-Producing *Staphylococcus aureus* in Nasal Carriage among Health Care Workers and Medical Students. *Can J Infect Dis Med Microbiol* [Internet]. 2023 Jan 4;2023:8424486. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36644335>
59. Niek WK, Teh CSJ, Idris N, Thong KL, Ngoi ST, Ponnampalavanar SSL. Investigation of biofilm formation in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with bacteraemia in a tertiary hospital. *Folia Microbiol (Praha)* [Internet]. 2021;66(5):741–9. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12223-021-00877-x>
60. Boudet A, Sorlin P, Pouget C, Chiron R, Lavigne JP, Dunyach-Remy C, et al. Biofilm Formation in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated in Cystic Fibrosis Patients Is Strain-Dependent and Differentially Influenced by Antibiotics. *Front Microbiol* [Internet]. 2021;12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.750489>
61. Abedon ST, Danis-Wlodarczyk KM, Wozniak DJ, Sullivan MB. Improving Phage-Biofilm In Vitro Experimentation. *Viruses* [Internet]. 2021 Jun 19;13(6):1175. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34205417>
62. Tkhaishvili T, Wang L, Tavanti A, Trampuz A, Di Luca M. Antibacterial Efficacy of Two Commercially Available Bacteriophage Formulations, Staphylococcal Bacteriophage and PYO Bacteriophage, Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Prevention and Eradication of Biofilm Formation and Control of a Systemic Infection of *Galleria mellonella* Larvae. *Front Microbiol* [Internet]. 2020;11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00110>
63. Alves DR, Gaudion A, Bean JE, Perez Esteban P, Arnot TC, Harper DR, et al. Combined use of bacteriophage K and a novel bacteriophage to reduce *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2014/08/22. 2014 Nov;80(21):6694–703. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25149517>
64. Ramirez-Sanchez C, Attai H, Van Tyne D, Shields RK, Yerushalmy O, Hazan R, et al. 1276. Assessment of Anti-biofilm Activity of *Staphylococcus aureus* Bacteriophages Against Clinical Isolates from Patients with Left Ventricular Assist Device Infections. *Open Forum Infect Dis* [Internet]. 2021 Nov 1;8(Supplement_1):S726–7. Available from: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab466.1468>
65. Diana G, Dieter V, Beatriz M, Ana R, Rob L, Pilar G. Two Phages, phiPLA-RODI and phiPLA-C1C, Lyse Mono- and Dual-Species Staphylococcal Biofilms. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2015 May 15;81(10):3336–48. Available from: <https://doi.org/10.1128/AEM.03560-14>
66. Totten KMC, Patel R. Phage Activity against Planktonic and Biofilm *Staphylococcus aureus* Periprosthetic Joint Infection Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2021/10/18. 2022 Jan 18;66(1):e0187921–e0187921. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34662191>
67. Topka-Bielecka G, Dydecka A, Necel A, Bloch S, Nejman-Faleńczyk B, Węgrzyn G, et al. Bacteriophage-Derived Depolymerases against Bacterial Biofilm. *Antibiotics (Basel)* [Internet]. 2021 Feb 10;10(2):175. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33578658>

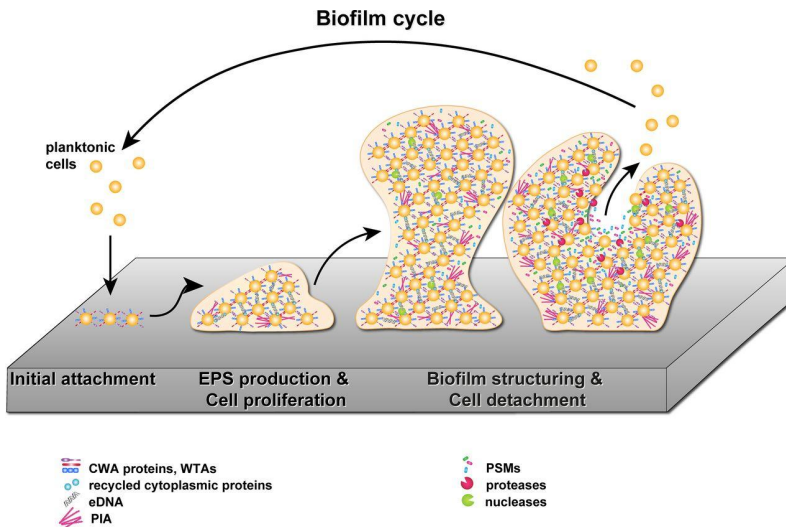
10.- Anexos

Figura anexa n°1 - Resistencia a oxacilina en cepas de *S. aureus*, serie 2012 a 2020



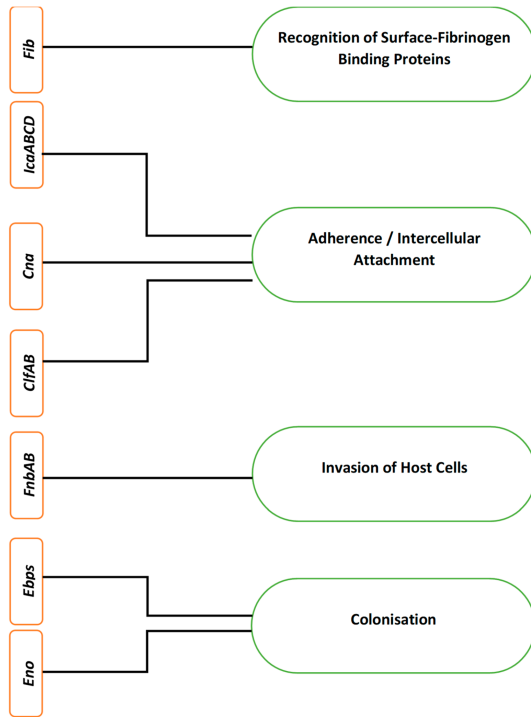
*Instituto de Salud Pública de Chile. BOLETÍN DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA. 2022 [cited 2023 Jun 4];1-29. Available from: https://www.ispch.cl/wp-content/uploads/2022/09/BoletinRAM_FINAL-1-1.pdf

Figura anexa n°2 - Ciclo de la biopelícula de *Staphylococcus*



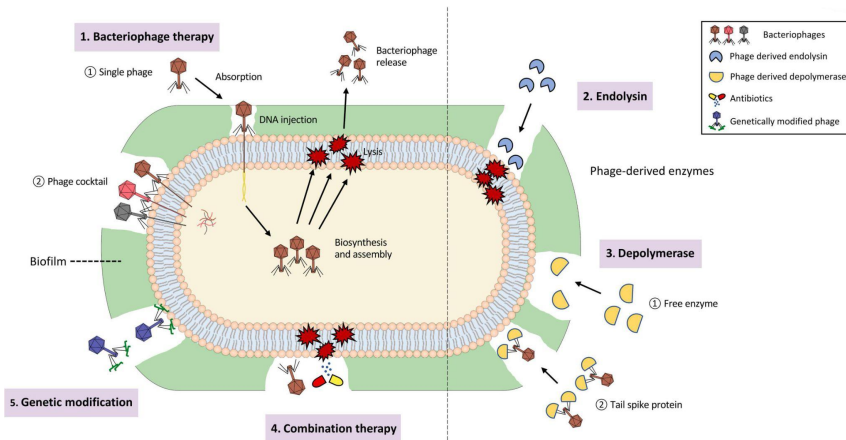
*Katrin S, R HA. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. Microbiology and Molecular Biology Reviews [Internet]. 2020 Aug 12;84(3):10.1128/membr.00026-19. Available from: <https://doi.org/10.1128/membr.00026-19>.

Figura anexa n°3 - Diferentes genes y su relación en la formación de biopelículas de *S. aureus*



*Idrees M, Sawant S, Karodia N, Rahman A. Staphylococcus aureus Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies. Int J Environ Res Public Health [Internet]. 2021;18(14). Available from: <https://www.mdpi.com/1660-4601/18/14/7602>.

Figura anexa n°4 - Eliminación de biopelículas utilizando fagos y enzimas derivadas de fago



*Chang C, Yu X, Guo W, Guo C, Guo X, Li Q, et al. Bacteriophage-Mediated Control of Biofilm: A Promising New Dawn for the Future. Front Microbiol [Internet]. 2022;13. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.825828>.

Documento anexo n°5 - “Construyendo partnerships para fortalecer la investigación en heridas y quemaduras”



PROGRAMA

1er Workshop Científico UDD-COANIQUEM:

“Construyendo partnerships para fortalecer la investigación en heridas y quemaduras”

Fecha: 28 de abril 2022

Horario: 9:00 am – 13:30 pm

Participantes: Estudiantes de PhD DCIM, directores e Investigadores de Centros, Programas ICIM y Facultad de Medicina, Investigadores de otras Facultades de la UDD, estudiantes de PhD de otros programas de la UDD, Investigadores y profesionales de la salud Coaniquem, e interesados a trabajar en esta temática.

Directores del programa:

Dra. Cecilia Vial, Instituto de Ciencias e Innovación en Medicina, Universidad del Desarrollo.
Dr. Orlando Flores, Subdirección de Investigación, COANIQUEM

Lugar: Auditorio Aula Magna.

Objetivos:

- Generar una mirada integral de colaboración en investigación entre ambas instituciones, en la línea de investigación de heridas y quemaduras.
- Proponer instancias de trabajo colaborativo para desarrollar investigación concreta y con impacto a los pacientes y a la sociedad.

Metodología:

Ambas instituciones han designado 4 áreas temáticas de interés, en las cuales existe una pareja de líderes representado a cada organización: **Ciencia Aplicada, Epidemiología, Clínica/Heridas, Rehabilitación.**

Las funciones de los líderes son: a) Preparar una presentación de no más de 10 minutos que muestre muy sucintamente experiencias institucionales de investigación en esa área específica, b) promover la generación de ideas a través de la identificación de algunos tópicos en los que se podría generar nueva evidencia y c) convocar a un grupo pequeño (3 o 4) de investigadores que pudieran facilitar la generación Las primeras horas de la mañana, será una **jornada abierta para toda la comunidad**, dónde se discutirán las líneas de desarrollo definidas por cada grupo conjunta de ideas de investigación.

Desde las 12:00 del día en adelante, la **jornada será cerrada** para los grupos invitados a trabajar en las líneas, dónde deberán presentar ideas concretas a desarrollar en el futuro.

Los líderes propuestos para cada área temática son:

Ciencias Aplicadas:

COANIQUEM María Teresa Ulloa: TM; MSc. Vertebral I+D+i Coaniquem. Profesora Asociada de Microbiología, F. de Medicina Universidad de Chile. Área de investigación: resistencia a los antibióticos y vigilancia epidemiológica. Investigadora en los Proyectos Vertebral asociados a Fagos CORFO L1, L2, L3. Capacitación en fagos: Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology en Tbilisi, Georgia. Laboratory Dra. Elizabeth Kutter, Biology of Phage, Evergreen State College.USA. Phages Group Bélgica, Bruselas, Laboratory for Molecular & Cellular Technology, Burn Wound Centre, Queen Astrid Military Hospital, Brussels. (mulloa@coaniquem.org)

UDD Jose Munita: Médico cirujano, Universidad de Los Andes. Clinical fellow (Advanced academic track) en Enfermedades Infecciosas y Post-Doctoral fellow, University of Texas Health Science Center at Houston. Director del Instituto de Ciencias e Innovación en Medicina (ICIM). Profesor adjunto y Director de investigación de proyectos internacionales de CARMIG (Center for Antimicrobial Resistance and Microbial Genomics), McGovern Medical School, University of Texas Health Science Center at Houston, TX, USA. Director Microb-R (Núcleo Mileno para la Investigación Colaborativa en Resistencia Antimicrobiana. Líneas de investigación: genómica microbiana y mecanismos de resistencia bacteriana a antimicrobianos. josemunita@udd.cl

Epidemiología:

COANIQUEM Rodrigo Fuentes: MSc, Epidemiólogo. Dirección de Extension, Docencia e Investigación (DEDI).

UDD Alexandra Obach: PhD en Antropología Social y Cultural, Universidad de Barcelona, Magister en Estudios de Género, Universidad de Chile. Magister en Estudios Avanzados en Antropología Social y Cultural, Universidad de Barcelona, Antropóloga, Universidad de Chile. Directora del Programa de Estudios Sociales en Salud (PROESSA) del ICIM. Línea de investigación: Estudio de la interculturalidad, el género y las identidades en diferentes contextos. Salud de Adolescente y Jóvenes. aobach@udd.cl

Clínica/heridas:

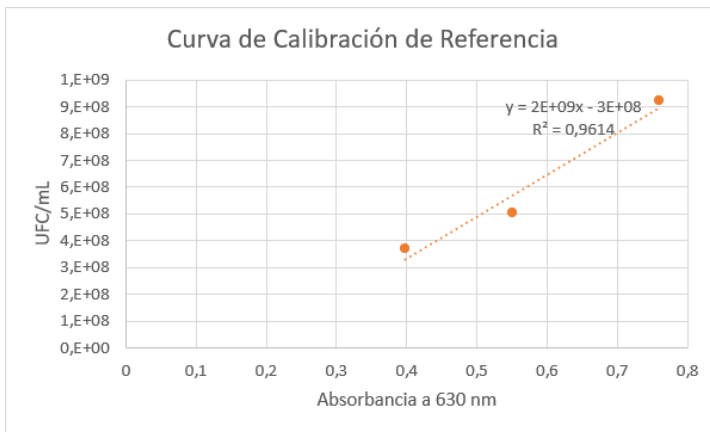
COANIQUEM Claudia Ramírez: EU Enfermera docencia, asesora técnica de manejo avanzado de heridas.

UDD Marcelo Ezquer: PhD en Biología, Mención Fisiología, U. Nacional de Cuyo. Argentina. Lic. en Biología Molecular, U. Nacional de San Luis, Argentina. Director Centro de Medicina Regenerativa, Facultad de Medicina Clínica Alemana Universidad del Desarrollo. Docente e investigador, Facultad de Medicina Clínica Alemana Universidad del Desarrollo. Miembro del Comité de Doctorado de Ciencias Médicas, Facultad de Medicina Clínica Alemana Universidad del Desarrollo. Línea de investigación: Mesenchymal Stem Cells. mezquer@udd.cl

Rehabilitación:

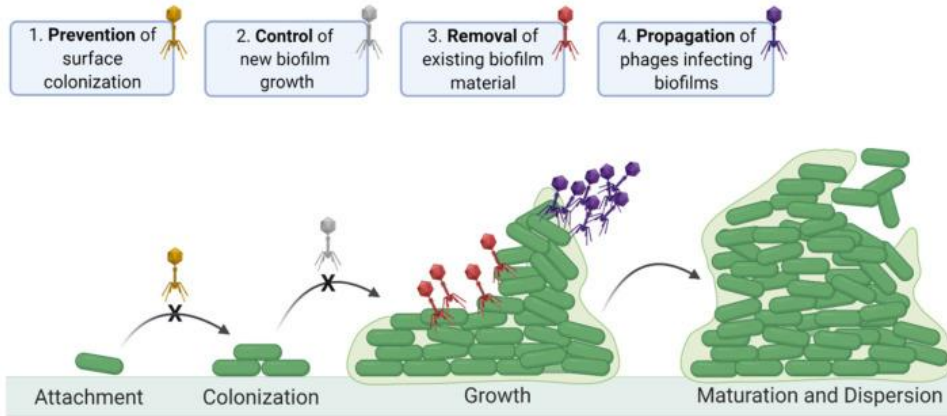
COANIQUEM Jenniffer García: MPhil, PhD © Coordinadora práctica basada en evidencia. Terapeuta Ocupacional, Universidad de Chile. Máster en investigación y PhD © The University of Queensland,

Figura anexa n°6 - Curva de calibración de cepa de referencia (*S. aureus* ATCC 25923)



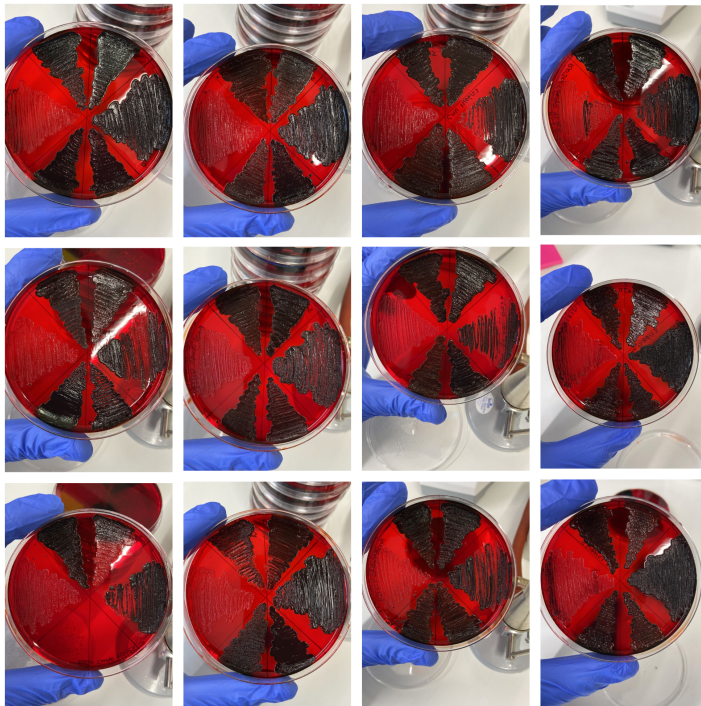
*Elaboración propia

Figura anexa n°7 - Diferentes aspectos de las interacciones fago-biopelícula



Referencia: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8234374/>

Figura anexa n°8 - Cepas SAMR sembradas en Agar Rojo Congo



*Elaboración propia

Tabla anexa n°1 - Tipos de SCCmec actualmente identificados en cepas de *S. aureus*

SCCmec types	<i>mec</i> determinant	<i>ccr</i> gene complexes ^a	<i>mec</i> gene complexes	High-prevalence setting
I	<i>mecA</i>	1 (A1B1)	B	HA-MRSA
II	<i>mecA</i>	2 (A2B2)	A	HA-MRSA
III	<i>mecA</i>	3 (A3B3)	A	HA-MRSA
IV	<i>mecA</i>	2 (A2B2)	B	CA-MRSA and HA-MRSA
V	<i>mecA</i>	5 (C1)	C2	CA-MRSA and HA-MRSA
VI	<i>mecA</i>	4 (A4B4)	B	HA-MRSA
VII	<i>mecA</i>	5 (C1)	C1	NA ^b
VIII	<i>mecA</i>	4 (A4B4)	A	NA ^b
IX	<i>mecA</i>	1 (A1B1)	C2	NA ^b
X	<i>mecA</i>	7 (A1B6)	C1	NA ^b
XI	<i>mecC</i>	8 (A1B3)	E	LA-MRSA
XII	<i>mecA</i>	9 (C2)	C2	NA ^b

*Lee AS, de Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers* [Internet]. 2018;4(1):18033. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>

Tabla anexa n°2 - Listado de patógenos prioritarios por la OMS

Prioridad 1: CRÍTICA
<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenémicos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenémicos
Enterobacteriales resistentes a carbapenémicos y productores de BLEE
Prioridad 2: ELEVADA
<i>Enterococcus faecium</i> resistente a la vancomicina
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la metilina y con sensibilidad disminuida a la vancomicina
<i>Helicobacter pylori</i> resistente a claritromicina
<i>Campylobacter spp.</i> resistente a fluoroquinolonas
<i>Salmonella spp.</i> resistente a fluoroquinolonas

Neisseria gonorrhoeae resistente a cefalosporinas y fluoroquinolonas

Prioridad 3: MEDIA

Streptococcus pneumoniae con susceptibilidad disminuida a la penicilina

Haemophilus influenzae resistente a la ampicilina

Shigella spp. resistente a fluoroquinolonas

*Organización Mundial de la Salud. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [Internet]. 2017 [cited 2023 Jun 4]. p. 1–1. Available from: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.

Tabla anexa n°3 - Potenciales beneficios de la fagoterapia respecto a la terapia con antibióticos

Table 1: Potential benefits of bacteriophage therapy against antibiotic therapy [153].

Characteristics features	phage therapy	Antibiotics treatment
Specificity	Highly specific	Wide range of action
Toxicity	Almost totally non-toxic	Variable levels of toxicity ranging from mild to severe
Biofilm penetration	Effective penetrating ability	Unable to penetrate except in high doses
Possibility of resistance	Almost non-existent	High possibility of resistance
Simplicity of administration	not require repeated doses	Require repeated doses
Cost of treatment	Cheaper	more expensive

*Soressa Bakala G, Motuma D. Review of bacteriophage and its applications. International Journal of Veterinary Science and Research [Internet]. 2022 Sep 27;8(3):133–47. Available from: <https://peertechpublications.com/articles/IJVS-8-226.pdf>

Tabla anexa n°4 - Ventajas y limitaciones de los bacteriófagos en el biocontrol

Table2: benefits and limitations of bacteriophage as a biocontrol [86].

Pros	Cons
Phages are a natural product	Not entire bacteriophages make a good biocontrol agent, e.g. temperate phages.
Specific only targets problem foodborne bacterial pathogens	May not guarantee full well-being of foods if the foods are contaminated by a mixture of pathogen
Effective in killing targeted bacteria	Their theoretical use is constrained by a small host range; A mixture of bacteriophages can be used to get around this restriction
Single dose application	Despite lytic phages' capacity to infect new hosts, residual activity has not been seen on food; this may be because food surfaces are physically inaccessible to lytic phages.
limited possibility for resistance and absence of antibiotic cross-resistance	bacteriophage resistant bacterial strains can emerge, but using a cocktail is shown to reduce the phage resistance
Comparable simplicity of preparation and application and rapid discovery	
Little inherent toxicity and no negative effects on the environment	
does not affect the food's rheological, nutritional, or organoleptic qualities	

*Soressa Bakala G, Motuma D. Review of bacteriophage and its applications. International Journal of Veterinary Science and Research [Internet]. 2022 Sep 27;8(3):133–47. Available from: <https://peertechzpublications.com/articles/IJVS-8-226.pdf>

Tabla anexa n°5 - Sitio de infección y número de cepas de *S. aureus* colectadas de hospitales de la Zona Norte, Zona Sur y Región Metropolitana de Chile.

Sitio de infección	Número de cepas
Sangre	25
Tejidos	21
Líquidos estériles	4

*Elaboración propia

Tabla anexa n°6 - Características genéticas relevantes del análisis bioinformático de bacteriófagos de *S. aureus* de la colección de fagos líticos del laboratorio Vertebral

Fago	Familia	Género	Tamaño (Kpb)	Presencia genes no deseados ⁽¹⁾	Estilo de vida ⁽²⁾
1	Rountreeviridae	<i>Rosenblumvirus</i>	17.2	No	Lítico
2	Rountreeviridae	<i>Rosenblumvirus</i>	17.1	No	Lítico
3	Herelleviridae	<i>Kayvirus</i>	153.9	No	Lítico
4	Herelleviridae	<i>Kayvirus</i>	165.6	No	Lítico
5	Rountreeviridae	<i>Rosenblumvirus</i>	17.2	No	Lítico
6	Rountreeviridae	<i>Rosenblumvirus</i>	17.3	No	Lítico
7	Herelleviridae	<i>Kayvirus</i>	154.9	No	Lítico
8	Herelleviridae	<i>Kayvirus</i>	154.9	No	Lítico

*Elaboración propia

(1) Toxinas, genes de resistencia antibiótica y factores de virulencia

(2) Predicción del estilo de vida se utilizó la herramienta de predicción BACPHLIP (v0.9.6)