



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

**Studies of the molecular features of three *Salmonella* phages  
for use in phage therapy and of encapsulation methodologies  
to improve oral phage administration**

**Tesis Doctoral**

**Joan Colom Comas**

**Departament de Genètica i de Microbiologia**

**Bellaterra, 2016**





**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

**Studies of the molecular features of three *Salmonella* phages  
for use in phage therapy and of encapsulation methodologies  
to improve oral phage administration**

Tesis Doctoral con Menció Internacional presentada por **Joan Colom Comas**

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

Programa de Doctorado en **Microbiología**

Con el visto bueno de las Directoras de la Tesis

Dra. Montserrat Llagostera Casas

Dra. María Pilar Cortés Garmendia

Bellaterra, 2016



# SUMMARY



## Summary

Non-typhoidal *Salmonella*, one of the most common zoonotic pathogens, causes foodborne disease outbreaks in humans. Poultry is the major reservoir of this bacterium. Following the ban on the use of antibiotics as growth promoters in animal production, *Salmonella* infection in poultry has been mainly controlled through biosafety measures implemented in animal production facilities and through the use of vaccines, probiotics, prebiotics, and synbiotics. Although reduction in the prevalence of several *Salmonella* serovars was achieved between 2007 and 2012 in the European Union, these methods are insufficient such that phage therapy has gained increasing attention for *Salmonella* control. In previous work, we demonstrated that oral phage therapy using a cocktail containing three bacteriophages (UAB\_Phi20, UAB\_Phi78, and UAB\_Phi87) very efficiently reduces *Salmonella* colonization in specific pathogen free chickens. To better understand the efficacy and safety of these phages, we characterized their replication kinetics, genome ends, and transduction capability. The results showed that DNA replication was initiated 10 min after bacterial infection by UAB\_Phi78 and 20 min after infection by UAB\_Phi20 and UAB\_Phi87. UAB\_Phi20 and UAB\_Phi78 DNA was detected inside the cells for 40 min and that of UAB\_Phi87 for >120 min. The genome ends of the three phages differed and were included in specific DNA packaging strategies: *P22likevirus* headful (UAB\_Phi20), *SP6likevirus* direct terminal repeats (UAB\_Phi78), and *Felixounalikevirus* direct terminal repeats (UAB\_Phi87). None was able to promote transduction under the conditions of the assay used.

The inherent challenges to the oral administration of bacteriophages as therapeutic agents against intestinal pathogens are related to the lack of phage stability in the stomach and the short residence time in the intestinal tract, which together lower the efficiency of phage therapy. In this work, two methods for phage encapsulation have been developed. The advantages of phage therapy with the encapsulated phages has been studied in an animal

model (broiler/*Salmonella*) developed in this work that mimics the conditions of the farms. Encapsulation in cationic lipids yielded liposome-encapsulated phages with a mean diameter of 308.6 - 325.8 nm, a positive charge between +31.6 and +35.1 mV (pH 6.1), and an encapsulation efficiency yield of ~50%. In comparison, the mean diameter of the alginate-encapsulated phages ranged from 123.7 to 149.3  $\mu\text{m}$  and the encapsulation efficiencies were >90%. The two phage formulations are stable for  $\geq 6$  months when stored at 4°C. The titre of non-encapsulated phages in simulated gastric fluid (pH 2.8) decreased by 5.7–8.0  $\log_{10}$  after 60 min, whereas liposome- and alginate-encapsulated phages were significantly more stable, with losses of 3.7–5.4  $\log_{10}$  units and  $\leq 3.5 \log_{10}$ , respectively. Liposome and alginate- $\text{CaCO}_3$  encapsulations also significantly improved bacteriophage retention in the chicken intestinal tract compared to the non-encapsulated preparations. In broilers administered cocktails of encapsulated and non-encapsulated phages, the former were detected in 38.1% (liposome) and 71.4% (alginate- $\text{CaCO}_3$ ) of the animals after 72 h whereas the non-encapsulated phages were present in only 9.5%. In *in vitro* experiments, phage release from the liposomes and alginate- $\text{CaCO}_3$  capsules was triggered by the caecal contents of broilers and simulated intestinal fluid, respectively. In commercial broilers experimentally infected with *Salmonella*, daily administration of the three cocktails for 7 days post-infection conferred similar levels of protection against *Salmonella* colonization. Although protection by the non-encapsulated phages disappeared once treatment was stopped, the decrease of the *Salmonella* concentration provided by both encapsulated forms persisted for at least another week, thus showing the enhanced efficacy of encapsulated phages in phage therapy. The work describes the methodology used to obtain liposome and alginate- $\text{CaCO}_3$  phage encapsulation, which can be used with bacteriophages of different morphologies, and the advantages of both forms in overcoming the inherent drawbacks of orally administered phage therapy.



# RESUMEN



## Resumen

*Salmonella* no tifoidea, uno de los patógenos zoonóticos de mayor impacto, causa brotes en humanos debido al consumo de alimentos contaminados, siendo las aves de corral su principal reservorio. A raíz de la prohibición del uso de antibióticos como promotores del crecimiento en producción animal, se han aplicado diferentes medidas, como el uso de vacunas, probióticos, prebióticos y simbióticos, para el control de *Salmonella* en aves con una eficacia todavía limitada. Por ello, se ha planteado el uso de la terapia fágica como un medio alternativo de control de *Salmonella*.

Nuestro grupo demostró previamente que la terapia fágica oral, basada en un cóctel compuesto por los fagos UAB\_Phi20, UAB\_Phi78 y UAB\_Phi87, reduce eficientemente la colonización de *Salmonella* en un modelo de pollo de engorde libre de patógenos específicos. Para completar la caracterización de estos fagos, en el presente trabajo se ha determinado que el inicio de la replicación del DNA del fago UAB\_Phi78 se produce a los 10 min de la infección de *Salmonella*, siendo este tiempo de 20 min para los otros dos fagos. Se detectó DNA en células de *Salmonella* infectadas con los fagos UAB\_Phi20 y UAB\_Phi78 durante 40 min. Este tiempo fue de más de 120 min para el fago UAB\_Phi87. Los extremos del cromosoma del bacteriófago UAB\_Phi20 son permutaciones cíclicas y su mecanismo de empaquetamiento es el de llenado de cabeza de los fagos del género tipo P22. En cambio, los fagos UAB\_Phi78 y UAB\_Phi87 presentaron repeticiones terminales directas cortas en los extremos de sus cromosomas similares a las de los fagos de los géneros tipo SP6 (UAB\_Phi78) y tipo FelixO1 (UAB\_Phi87), respectivamente. Ninguno de los fagos fue capaz de promover transducción en las condiciones de ensayo utilizadas.

Los retos inherentes a la terapia fágica oral están relacionados con la falta de estabilidad del fago en el estómago y su reducido período de residencia en el tracto gastrointestinal. En este

trabajo se han desarrollado dos métodos de encapsulación de bacteriófagos (liposomas y alginato-CaCO<sub>3</sub>) y se ha estudiado si la terapia fágica con fagos encapsulados supera los inconvenientes indicados. Para este estudio, se ha desarrollado un modelo animal de experimentación (pollos de engorde/*Salmonella*) que mimetiza las condiciones de las granjas de producción.

La encapsulación en lípidos catiónicos permitió obtener fagos encapsulados con un diámetro de 308,6 a 325,8 nm, una carga positiva entre 31,6 y 35,1 mV (pH 6,1) y una eficiencia de encapsulación cercana al 50%. El diámetro medio de los fagos encapsulados en alginato-CaCO<sub>3</sub> varió entre 123,7 y 149,3  $\mu\text{m}$ , con eficiencias de encapsulación superiores al 90%. Además, ambas formulaciones son estables a 4°C como mínimo 6 meses. En fluido gástrico simulado (pH2,8), el título de los fagos sin encapsular disminuyó entre 5,7 y 8 log<sub>10</sub> tras 60 min, mientras que el de los fagos encapsulados en liposomas y alginato-CaCO<sub>3</sub> sólo disminuyó entre 3,7 y 5,4 log<sub>10</sub> y  $\leq 3,5$  log<sub>10</sub>, respectivamente. Los fagos encapsulados en liposomas o alginato-CaCO<sub>3</sub> se detectaron, respectivamente, en el 38,1% y el 71,4% de los animales a las 72 h y sólo en un 9,5% de los animales tratados con fagos no encapsulados. Además, el contenido cecal y el fluido intestinal simulado promueven la liberación de los fagos de las cápsulas lipídicas y de alginato-CaCO<sub>3</sub>, respectivamente. Finalmente, en experimentos de terapia fágica, la disminución de la concentración de *Salmonella* se prolongó como mínimo 7 días más en los animales tratados con fagos encapsulados que en los tratados con fagos no encapsulados tras la interrupción del tratamiento.

La metodología utilizada permite la encapsulación de bacteriófagos de diferentes morfologías en liposomas y alginato-CaCO<sub>3</sub> y muestra que la encapsulación mejora significativamente la terapia fágica oral.

# ÍNDICE



## Índice

1.	Introducción .....	1
1.1.	<i>Salmonella</i> : Características, patogenia y estrategias de control .....	1
1.1.1.	El género <i>Salmonella</i> .....	1
1.1.2.	Impacto de la salmonelosis no tifoidea en el ámbito sanitario y económico .....	6
1.1.3.	Control de <i>Salmonella</i> en las explotaciones avícolas de la Unión Europea .....	11
1.2.	Bacteriófagos .....	17
1.2.1.	Características generales y taxonomía de los bacteriófagos .....	18
1.2.2.	Ciclo biológico de los bacteriófagos.....	22
1.3.	Bacteriófagos de <i>Salmonella</i> .....	34
1.3.1.	Bacteriófagos del género tipo P22.....	35
1.3.2.	Bacteriófagos del género tipo SP6.....	37
1.3.3.	Bacteriófagos del género tipo FelixO1 .....	40
1.4.	Terapia fágica .....	41
1.4.1.	Aplicación de fagos para el control de patógenos en producción animal .....	47
1.4.2.	Productos comerciales basados en bacteriófagos .....	51
1.5.	Aplicación de la encapsulación en terapia fágica.....	53
2.	Objectives.....	61
3.	Material and methods.....	65
3.1.	Microbiological techniques .....	65
3.1.1.	Bacterial strains and growth conditions .....	65
3.1.2.	Bacteriophages and titration .....	65
3.1.3.	In vitro multiplication of bacteriophages.....	66
3.1.4.	Transduction assay.....	66
3.2.	Molecular Methods .....	67
3.2.1.	Bacteriophage DNA extraction.....	67
3.2.2.	Bacteriophage replication.....	68
3.2.3.	Identification of the bacteriophage chromosome ends .....	69
3.3.	Bacteriophage encapsulation methodology.....	70
3.3.1.	Encapsulation materials and techniques .....	70
3.3.2.	Encapsulation efficiency .....	71
3.4.	Lyophilization of encapsulated bacteriophages.....	72
3.5.	Bacteriophage stability in simulated gastric fluid .....	73
3.6.	Alginate-encapsulated phage release in simulated intestinal fluid.....	73

3.7.	Microscopy .....	74
3.8.	<i>In vivo</i> assays in broilers .....	75
3.8.1.	Bacteriophage retention in chicken caecum .....	76
3.8.2.	Bacteriophage therapy .....	77
3.8.3.	Liposome-encapsulated phage release by caecum content .....	78
3.9.	Bioinformatics analysis .....	78
3.10.	Statistical analysis.....	79
4.	Results .....	83
4.1.	Additional characterization of bacteriophages UAB_Phi20, UAB_Phi78 and UAB_Phi87 .....	83
4.1.1.	DNA replication of bacteriophages in <i>Salmonella</i> cells. ....	83
4.1.2.	Identification of the chromosomal ends and transduction ability of bacteriophages ...	84
4.2.	Liposome-encapsulated bacteriophages.....	88
4.2.1.	Characterization of the encapsulated bacteriophages .....	88
4.2.2.	Lyophilization of the liposome-encapsulated bacteriophages .....	91
4.2.3.	Encapsulated bacteriophage resistance to simulated gastric fluids .....	92
4.2.4.	Bacteriophage <i>in vivo</i> retention in chicken caecum .....	93
4.2.5.	Phage therapy against <i>Salmonella</i> in broiler chickens.....	94
4.2.6.	<i>In vitro</i> bacteriophage release by caecum content .....	97
4.3.	Alginate-encapsulated bacteriophages.....	97
4.3.1.	Characterization of alginate-encapsulated phages .....	97
4.3.2.	Lyophilisation of encapsulated bacteriophages .....	100
4.3.3.	Stability of the encapsulated bacteriophages in simulated gastric fluid.....	101
4.3.4.	Encapsulated phage release by simulated intestinal fluid .....	102
4.3.5.	<i>In vivo</i> retention of bacteriophage in chicken caecum .....	103
4.3.6.	Bacteriophage therapy against <i>Salmonella</i> infection in broiler chickens.....	104
5.	Discusión.....	109
5.1.	Características relevantes de la biología molecular de los bacteriófagos UAB_Phi20, UAB_Phi78 y UAB_Phi87 .....	109
5.2.	Optimización de la terapia fágica por vía oral .....	116
6.	Conclusions .....	133
7.	Bibliography .....	137
Anexo	.....	149
8.	Agraïments.....	167



# INTRODUCCIÓN



## 1. Introducción

### 1.1. Salmonella: Características, patogenia y estrategias de control

#### 1.1.1. El género *Salmonella*

El género *Salmonella* pertenece al phylum *Proteobacteria*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Enterobacteriales* y familia *Enterobacteriaceae*. Este grupo incluye bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, incapaces de metabolizar lactosa o sacarosa que, generalmente, son productores de sulfuro de hidrógeno y móviles con flagelación peritrica. *Salmonella* es una bacteria mesófila y neutrófila con un crecimiento óptimo a 37°C y pH 7, alcanzando sus células diámetros de entre 0,7 – 1,5 µm y longitudes de 2 a 5 µm. Sin embargo, también puede crecer en un rango de temperaturas de 7 a 45°C y de pH de 4,5 a 9,0 (1, 2). *Salmonella* presenta una distribución mundial habitando, indistintamente, el tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente o fría (3). Actualmente, el género *Salmonella* está dividido en dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. En 2005 se propuso una tercera especie, *Salmonella subterranea*, pero la Organización Mundial de la Salud concluyó que la bacteria descrita no pertenecía al género *Salmonella* (4). Dentro de la especie *S. enterica* se incluyen hasta seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (5). Cada subespecie tiene asociadas distintas serovariedades que se clasifican según el sistema de Kauffmann y White (4), en base a los antígenos O del lipopolisacárido (LPS), H (flagelar) y Vi (virulencia) que es un subtipo especial del antígeno K de las cápsulas. Hasta el presente se conocen más de 2.500 serovariedades y el 60% de ellas pertenecen a la subespecie *enterica*. Las cepas de esta última subespecie pueden colonizar aves y mamíferos, e incluyen a la mayoría de las serovariedades que causan enfermedad en humanos (6). Habitualmente, las serovariedades de *S. enterica* ssp. *enterica* son patógenos facultativos intracelulares que colonizan el tracto

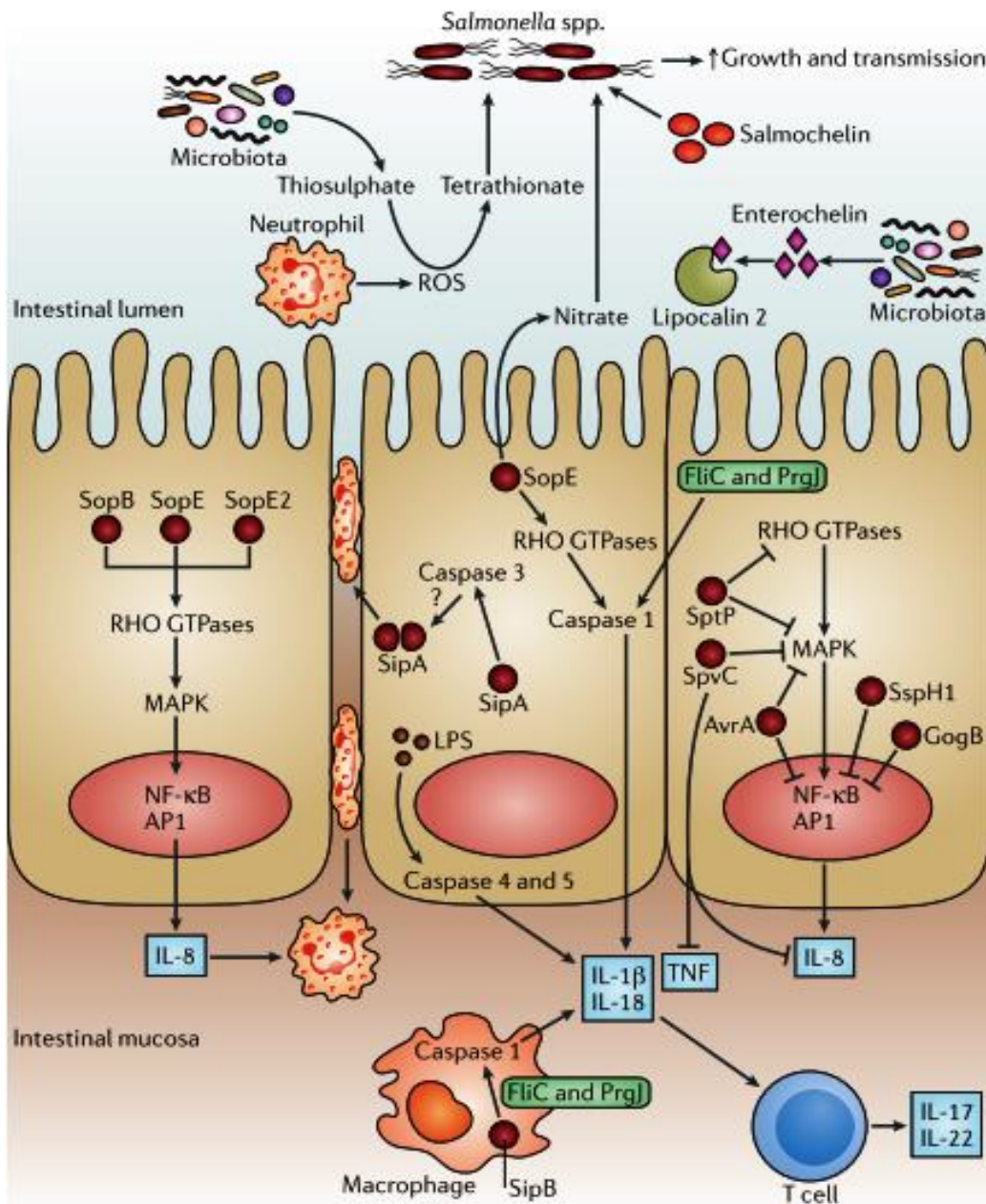
gastrointestinal con un rango de hospedador amplio o reducido; por ello, se pueden clasificar en función del grado de especificidad de hospedador. Normalmente, las serovariedades patógenas de *S. enterica* causan uno de los siguientes síntomas: fiebre entérica (tifoidea), enterocolitis/diarrea y bacteriemia, o bien dan lugar a portadores asintomáticos crónicos. La manifestación de la enfermedad depende de la susceptibilidad del hospedador y de la serovariedades de *S. enterica* (7). Las serovariedades más adaptadas sólo son capaces de infectar a una única especie animal y causan enfermedades sistémicas graves en hospedadores adultos y jóvenes (6), como, por ejemplo, *S. Typhi* y *S. Paratyphi*, que específicamente infectan a humanos. Sin embargo, la gran mayoría de las serovariedades infectan un amplio rango de hospedadores, siendo buenos ejemplos Enteritidis y Typhimurium (6, 8), las cuales suelen provocar enterocolitis, diarrea y dan lugar a portadores asintomáticos en individuos jóvenes (6).

Típicamente, las infecciones debidas a las especies y serovariedades de *S. enterica* se adquieren por vía oral, lo cual implica su paso por el estómago para poder seguir con el proceso infectivo, siendo este punto una barrera importante debido a su bajos pH. Por ese motivo, se requiere una cierta concentración de bacterias patógenas para desencadenar la enfermedad. Esta concentración dependerá de la serovariedad y del estado del hospedador, siendo  $10^5 - 10^6$  cfu/ml la dosis mínima infectiva en individuos sanos. En cambio, dicha dosis puede llegar a reducirse hasta  $10^3$  cfu/ml en individuos con cirugía gastrointestinal, acidez gástrica reducida, malnutrición o inmunodepresión (9, 10).

Una vez las células bacterianas han llegado al intestino, las serovariedades no tifoideas y tifoideas de *Salmonella* siguen distintas estrategias. En el caso de las no tifoideas, lo primordial es alcanzar una concentración lo suficientemente elevada que asegure su subsiguiente transmisión; factor que implica competir con la microbiota anaerobia estricta autóctona del intestino. Para superar este desafío, una pequeña fracción del patógeno ingerido utiliza su

motilidad mediante flagelos y los mecanismos de secreción tipo III (T3SS-1), codificados en la isla de patogenicidad 1 (SPI-1), para realizar la translocación de unas proteínas efectoras en el citoplasma de las células hospedadoras, que le permitirán invadir el epitelio de la parte terminal del íleon y el colon (11). Esta invasión de la mucosa se produce principalmente a través de fagocitos del lumen intestinal, células epiteliales y las células micropliegue que cubren los tejidos linfoides denominados placas de Peyer, siendo esta última opción la más frecuente. La presencia de *Salmonella* en el epitelio dispara la respuesta inmunitaria innata que promueve una inflamación aguda y la infiltración de neutrófilos (Figura 1). Durante este proceso, una parte de la población de *Salmonella* sobrevive en el tejido de la submucosa mediante la secreción de otras proteínas efectoras a través del T3SS-2 codificado en la isla de patogenicidad 2 (SPI-2), manteniendo así la inflamación durante varios días (11). De este modo, *Salmonella* consigue que la respuesta inflamatoria del hospedador produzca cambios en el ambiente del lumen del intestino, debido a la liberación de aceptores de electrones exógenos como tetrionato y nitrato (11). A su vez, y como respuesta a los patógenos entéricos, el intestino inflamado produce lipocalina-2 que se encarga de secuestrar el sideróforo enteroquelina de la microbiota del intestino; no obstante, *Salmonella* evita esta situación usando su propio sideróforo salmoquelina que escapa del secuestro (12) (Figura 1).

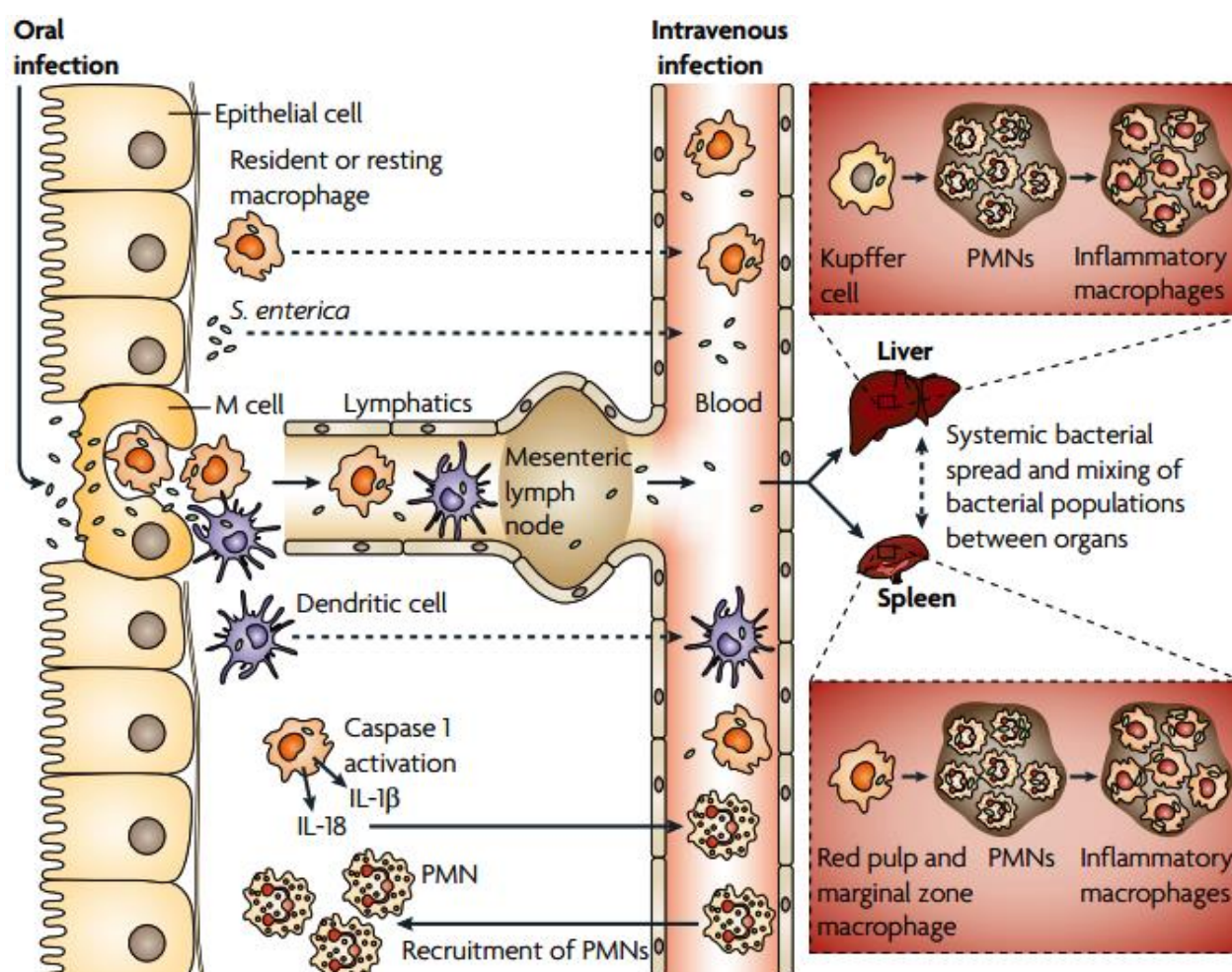
En conjunto, todos esos cambios potencian el crecimiento de la población de *Salmonella* en el lumen del intestino durante la gastroenteritis, permitiéndole adecuad una concentración adecuada para asegurar una transmisión fecal-oral exitosa (11). Además, esta situación puede generar un estado de portador asintomático, ya que las proteínas efectoras secretadas a través del T3SS-2 codificado en SPI-2 permiten la supervivencia, multiplicación y el movimiento intracelular de *Salmonella*, a través de la formación y mantenimiento de vacuolas específicas de *Salmonella*, las cuales pueden persistir durante días (13).



**Figura 1.** Esquema de la inflamación localizada en el tracto gastrointestinal inducida por *Salmonella* no tifoidea que promueve la proliferación del patógeno. (Tomado de la referencia 12).

Al contrario de lo descrito previamente, las serovariedades tifoideas de *S. enterica* no inducen una respuesta inmunitaria aguda en el tejido de la mucosa subyacente. Su polisacárido capsular, capaz de reducir la respuesta inflamatoria del intestino, combinado con la incapacidad

de producir cadenas largas de antígeno O y con la regulación diferenciada de los T3SS-1 genera una respuesta inflamatoria reducida en comparación con las serovariedades no tifoideas (12). Ello favorece que estos patógenos se extiendan por el torrente sanguíneo y lleguen a los órganos internos del hospedador causando una infección sistémica grave (Figura 2)



**Figura 2.** Esquema de las posibles vías de infección sistémica de *S. enterica*. El proceso se inicia con la invasión del epitelio intestinal y termina con la llegada de *Salmonella* al torrente sanguíneo antes de ser capturada por los fagocitos residentes en el bazo y el hígado. (Tomado de la referencia 136).

### 1.1.2. Impacto de la salmonelosis no tifoidea en el ámbito sanitario y económico

Las gastroenteritis causadas por *Salmonella* no tifoidea normalmente son limitadas, cursando con un cuadro de fiebre que se resuelve en 48 o 72 h y diarrea que puede persistir durante 3 o 7 días. La sintomatología descrita puede ser más grave en recién nacidos, niños, personas de edad avanzada o individuos inmunocomprometidos (15). En los países desarrollados, en los cuales hay un sistema activo y coordinado de vigilancia de enfermedades transmitidas por alimentos, la mayoría de aislados de *Salmonella* en humanos pertenecen a las serovariedades de *S. enterica* ssp. *enterica*, siendo especialmente frecuentes *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* (16). A nivel mundial, se estima que este grupo de patógenos provocan 93,8 millones de gastroenteritis con el resultado de 155.000 muertes y, aproximadamente, 80,3 millones derivan de una transmisión por la ingesta de alimentos contaminados (16). Se calcula que cada año en Estados Unidos (EE.UU.) ocurren 1 millón de casos de salmonelosis (15); este valor indica que *Salmonella* es el patógeno que lidera la lista de las bacterias transmitidas por alimentos en EE.UU. (Tabla 1), causando el mayor número de muertes anuales, hospitalizaciones y costes sanitarios (17).

En total, cada año en EE.UU., las infecciones de *Salmonella* no tifoidea producen 19.336 hospitalizaciones, las cuales suponen 3,3 mil millones de dólares en gastos médicos y pérdidas de productividad (17). Durante 2011, la Red de Vigilancia Activa de Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (*FoodNet*) confirmó 7.813 casos de infección por *Salmonella* en EE.UU., con una tasa de mortalidad del 0,37 y una incidencia de 16,45 por cada 100.000 habitantes, la cual fue muy similar a la detectada durante el periodo 2006-2008 (18). De entre los 7.813 aislados de *Salmonella*, las serovariedades más comunes fueron *Enteritidis* (18,2%), *Typhimurium* (12,6%) y *Newport* (12,3%) (Tabla 2) (18).



**Tabla 1.** Estimación anual del número de casos de enfermedades infecciosas transmitidas por alimentos en EE.UU.

Patógeno	Transmisión por alimentos (%)	Casos (media)
<i>Bacillus cereus</i>	100	63.400
<i>Brucella spp.</i>	50	839
<i>Campylobacter spp.</i>	80	845.024
<i>Clostridium botulinum</i>	100	55
<i>Clostridium perfringens</i>	100	965.958
STEC O157 <sup>1</sup>	68	63.153
STEC non-O157 <sup>1</sup>	82	112.752
Otras <i>Escherichia coli</i> patógenas	30	11.982
<i>Listeria monocytogenes</i>	99	1.591
<i>Mycobacterium bovis</i>	95	60
<i>Salmonella spp.</i> no tifoidea	94	1.027.561
<i>S. Typhi</i>	96	1.821
<i>Shigella spp.</i>	100	131.254
<i>Staphylococcus aureus</i>	100	241.148
<i>Streptococcus spp.</i> grupo A	100	11.217
<i>Vibrio cholerae</i> , toxigénico	100	84
<i>Vibrio vulnificus</i>	47	96
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	86	34.664
<i>Vibrio spp.</i>	57	17.564
<i>Yersinia enterocolitica</i>	90	97.656
<b>Subtotal</b>		<b>3.645.773</b>

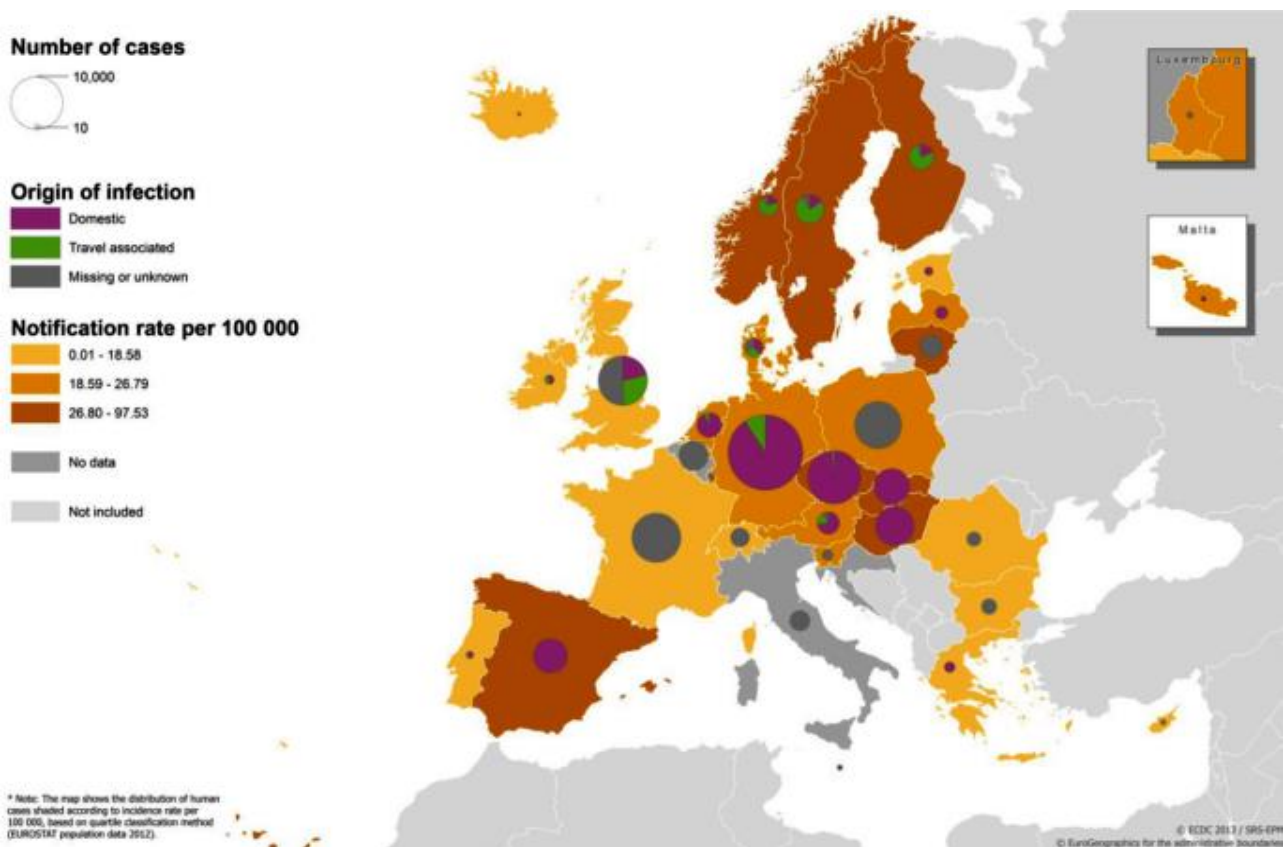
<sup>1</sup> *E. coli* productora de toxina shiga. (Adaptado de la referencia 16)

**Table 2.** Incidencia y número de infecciones confirmadas, provocadas por las 20 principales serovariedades de *Salmonella* en EE.UU.

Posición		Serovariedad de <i>Salmonella</i>	Número de casos	Porcentaje respecto al total de casos de	Incidencia por 100.000 personas
2006-2010	2011				
1	1	Enteritidis	1.424	18,2	3,0
2	2	Typhimurium	981	12,6	2,1
3	3	Newport	959	12,3	2,0
4	4	Javiana	753	9,6	1,6
5	5	S. I 4, [5], 12:i:-	314	4,0	0,7
9	6	Muenchen	201	2,6	0,4
6	7	Heidelberg	169	2,2	0,4
7	8	Montevideo	150	1,9	0,3
11	9	Infantis	130	1,7	0,3
14	10	S. I 13, 23:b:-	119	1,5	0,3
12	11	Oranienburg	114	1,5	0,2
8	12	Saintpaul	113	1,4	0,2
10	13	Braenderup	110	1,4	0,2
16	14	Bareilly	108	1,4	0,2
13	15	Agona	73	0,9	0,2
15	16	Mississippi	69	0,9	0,1
17	17	Thompson	67	0,9	0,1
18	18	Typhi	63	0,8	0,1
25	19	Berta	52	0,7	0,1
22	20	Anatum	50	0,6	0,1
<b>Subtotal</b>			<b>6.019</b>	<b>77,0</b>	<b>12,7</b>
Otras serovariedades			1.182	15,1	2,5
Sin serotipar			332	4,2	0,7
Parcialmente serotipadas			208	2,7	0,4
Rugosas o inmóviles			72	0,9	0,2
<b>Total</b>			<b>7.813</b>	<b>100</b>	<b>16,4</b>

(Adaptado de la referencia 19)

En la Unión Europea (UE), la estimación de los casos provocados por *Salmonella* no tifoidea se elevó a un total de 5.065.000 en el año 2005, los cuales se relacionaron con 8.400 muertes (16) y con un coste, según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), de 3 mil millones de euros por año. No obstante, el número de casos de salmonelosis confirmados en humanos es muy inferior, ya que en 2012 hubo un total de 91.034, con una incidencia de 22,2 por cada 100.000 habitantes de la UE y la Asociación Europea de Libre Comercio (EFTA) (Figura 3) y una frecuencia de mortalidad del 0,14% (Tabla 3) (19).



**Figura 3.** Mapa de la distribución de los casos en humanos, tasas de notificación y origen de las infecciones humanas por salmonelosis no tifoidea en UE/EFTA en 2012, basado en un método de clasificación por cuartiles según la tasa de incidencia por 100.000 habitantes. (Tomado de la referencia 19).

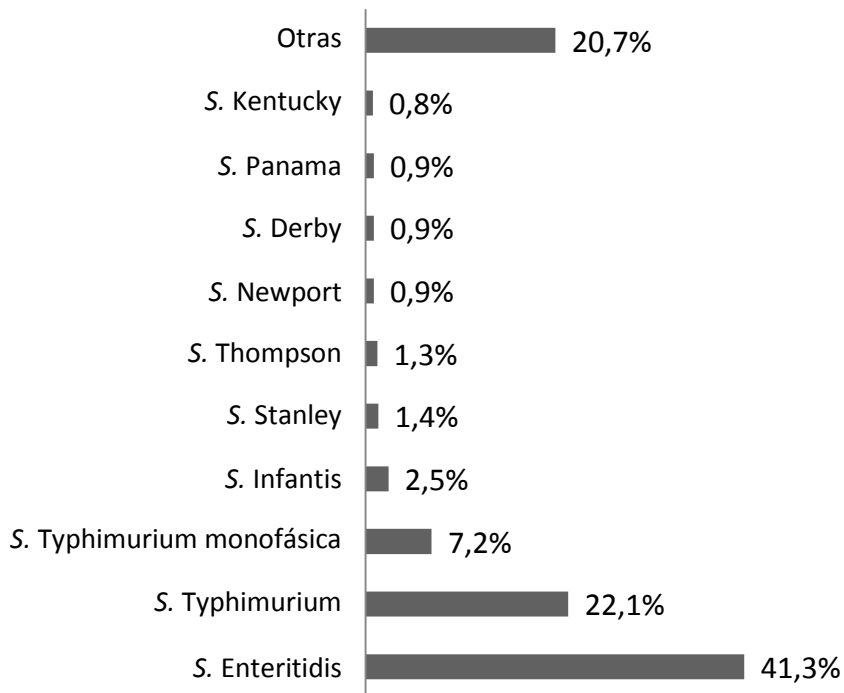
**Tabla 3.** Tasa de mortalidad de los casos de zoonosis confirmados en humanos en la UE durante 2012.

Enfermedad	Casos confirmados en humanos	Casos confirmados tratados (%)	Estados miembro con incidencia	Número de Muertes registradas	Mortalidad (%)
Campilobacteriosis	214.268	52,0	14	31	0,03
Salmonelosis	91.034	48,9	14	61	0,14
VTEC <sup>1</sup>	5.671	58,7	18	12	0,36
Listeriosis	1.642	67,7	18	198	17,8
Fiebre Q	643	56,1	12	1	0,28
Brucelosis	328	32,9	7	1	0,93
Triquinosis	301	72,4	7	0	0
Fiebre del Nilo	232	85,3	6	22	11,1
Rabia	2	100	2	2	100

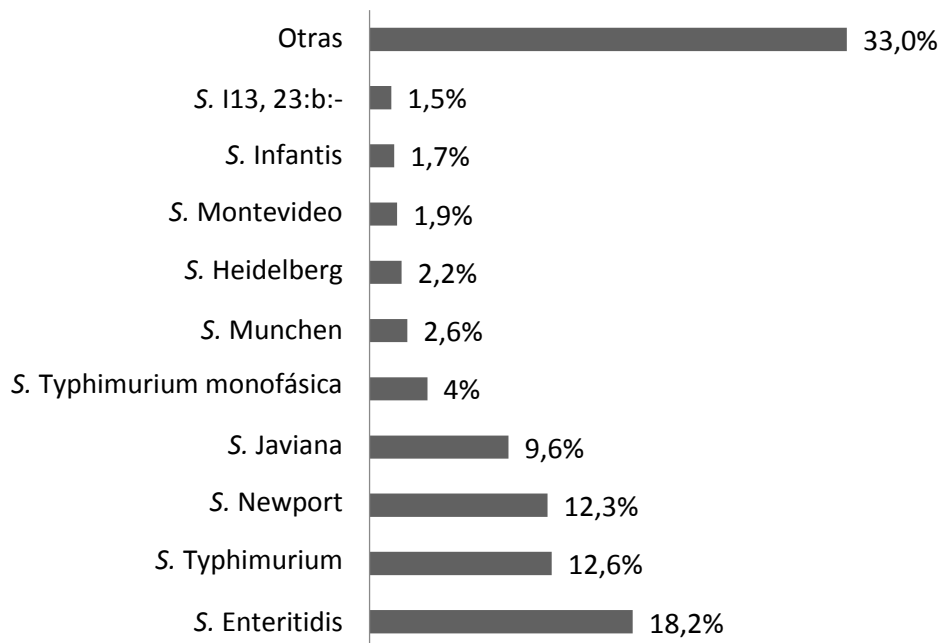
<sup>1</sup> *E. coli* productora de verocitotoxina. (Adaptado de la referencia 19).

Estos resultados demuestran que hay una disminución de la incidencia de *Salmonella* con 43.546 infecciones menos que en el año 2011 (19). Cabe destacar que, al igual que en EE.UU., hubo una tendencia estacional de casos confirmados de salmonelosis durante el periodo 2008-2012, con un claro incremento de su incidencia durante los meses de verano. Asimismo, e igual que en años anteriores, las serovariedades Enteritidis y Typhimurium fueron las más prevalentes en infecciones en humanos en 2012, con valores de 41,3% y 22,1%, respectivamente (Figura 4). Como consecuencia de varios brotes de gran extensión, la tercera serovariedad más reportada en infecciones humanas en la UE fue *S. Typhimurim* monofásica (7,2%), seguida por *S. Infantis* (2,5%) que fue la cuarta serovariedad más prevalente, mostrando un incremento notable de su presencia en los últimos cinco años (Figura 4).

A



B

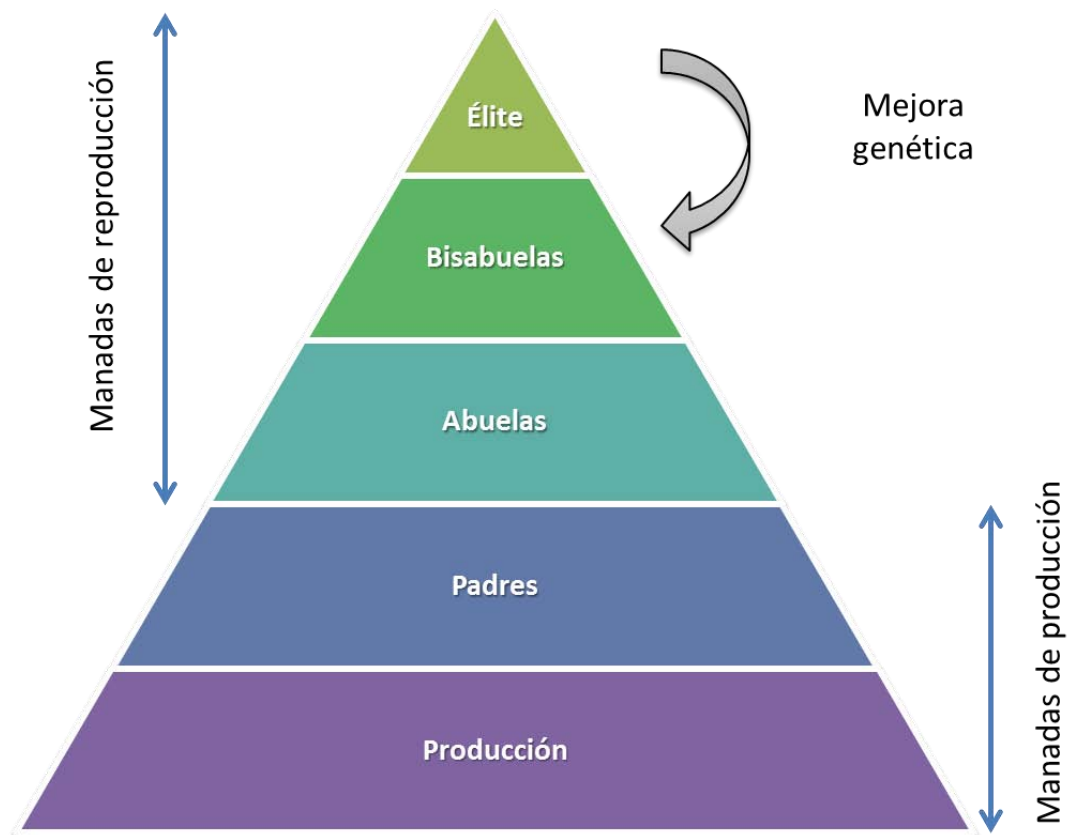


**Figura 4.** Prevalencia de las 10 serovariedades de *Salmonella* más frecuentes en infecciones en humanos en la UE (A) durante 2012 y en EE.UU. (B) a lo largo del año 2011. (Datos tomados de las referencias 19 y 20).

### 1.1.3. Control de *Salmonella* en las explotaciones avícolas de la Unión Europea

Se asume que la reducción del 4,7% de los casos de salmonelosis en la UE en 2012, respecto a 2011, es el resultado de los programas de control de *Salmonella* implantados en las explotaciones de *Gallus gallus*, factor que implícitamente indica que esta especie animal es el principal reservorio de este patógeno (19). En el caso de los productos derivados de pollos de engorde, el riesgo para la salud se ve exacerbado, ya que estos animales pueden ser portadores asintomáticos, conteniendo *Salmonella* en su intestino u órganos internos. La falta de síntomas clínicos durante la infección por *Salmonella*, facilita la diseminación del patógeno en las manadas de pollos de engorde, aumentando de esta manera la probabilidad de contaminaciones cruzadas durante su transporte, sacrificio y procesamiento en los mataderos.

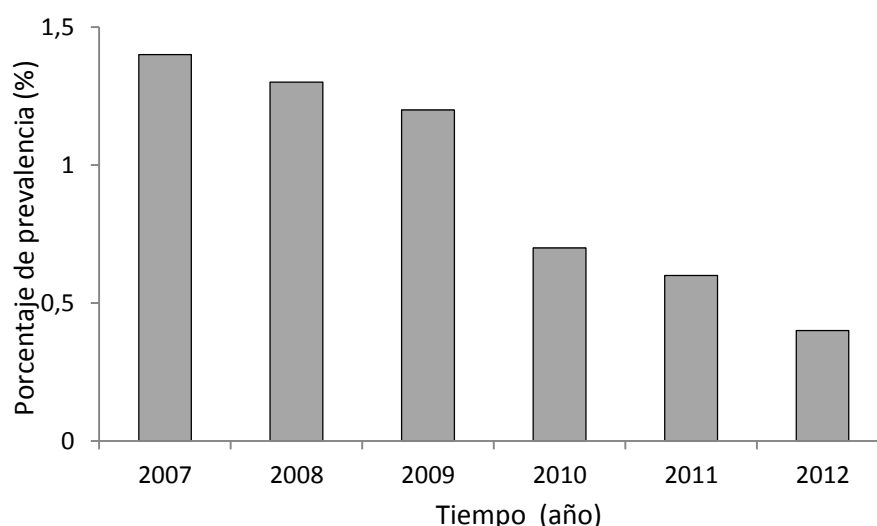
Para superar esa situación, la UE implementó el reglamento (CE) N° 2160/2003 (20) que obliga a establecer controles en todos sus Estados miembro de las serovariedades de *Salmonella* en determinados animales de producción. Los grupos de animales incluidos en este reglamento fueron las manadas de reproductoras, ponedoras y pollos de engorde de la especie *Gallus gallus* y, posteriormente, las reproductoras y pavos de engorde de *Meleagris gallopavo* (21). En este contexto, es importante considerar la estructura piramidal de la reproducción de las explotaciones avícolas (Figura 5). En la cúspide de la pirámide se encuentran las manadas de élite, seguidas de las bisabuelas y abuelas, todas ellas comprendidas en el grupo de reproductoras. Seguidamente, en la mitad de la jerarquía de la pirámide, se encuentran las manadas de padres y, finalmente, situadas en el último eslabón las productoras (Figura 5).



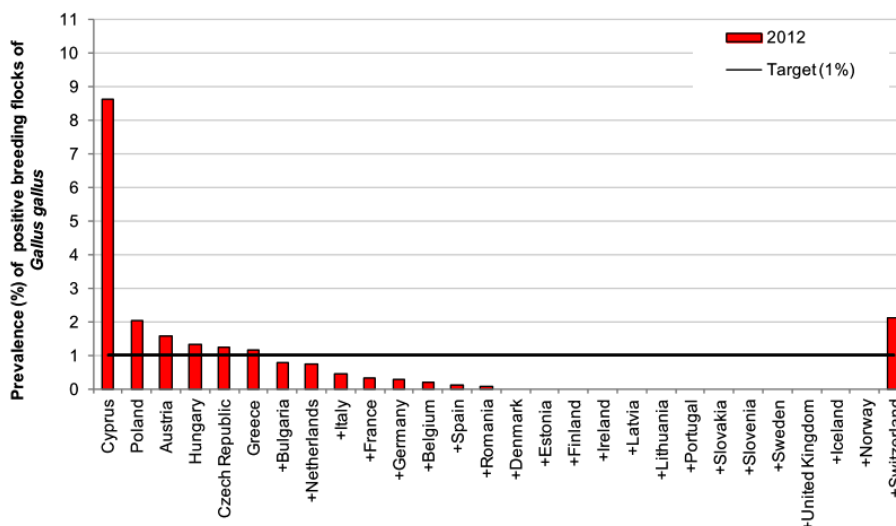
**Figura 5.** Pirámide de reproducción de las estirpes de producción de *Gallus gallus* comerciales. (Adaptado de la referencia 23).

En este tipo de crianza avícola, toda mejora genética se consigue mediante selección en las manadas reproductoras situadas en la parte alta de la pirámide, lo cual permite una rápida distribución y mantenimiento de las mejoras en las poblaciones aviares comerciales (22). De forma paralela, pero completamente involuntaria, la estructura piramidal de este sector junto con la contaminación de los criaderos y el comercio de reproductoras, abuelas y huevos para incubar, amplifica la transmisión vertical de *Salmonella* a las manadas de producción de engorde y huevo (22). De ahí la importancia de controlar y reducir la presencia de *Salmonella* en la parte alta de la pirámide de cría de aves comerciales.

Por ese motivo, en los reglamentos (CE) N° 2160/2003 (20) y (UE) N° 200/2010 (23), la UE marcó el objetivo de reducir a un 1% o menos el número de manadas de adultos reproductores positivos para las serovariedades Enteritidis, Typhimurium, Infantis, Virchow y Hadar de *Salmonella enterica*. Se estableció que para la detección de *Salmonella* en las manadas reproductoras debían realizarse un mínimo de tres muestreos durante la etapa de crianza y cada dos o tres semanas a lo largo del periodo de puesta. Los datos recolectados durante 2012 indican que el 2% de las manadas de reproducción de la UE presentaban *Salmonella* en algún momento del periodo de producción. La prevalencia de las cinco serovariedades específicas fue del 0,4% durante el año 2012, manteniéndose la tendencia descendente desde el 2007 (Figura 6). De dichas serovariedades, la más prevalente fue *S. Enteritidis* (0,2%), seguida de *S. Infantis* (0,095%) y *S. Typhimurium* (0,045%). En total, 19 de los Estados miembros y 3 de los no miembros consiguieron mantener la prevalencia de estas cinco serovariedades por debajo del 1% en 2012 (Figura 7). Asimismo, 11 Estados miembros y 2 no miembros reportaron que sus manadas de reproductoras estaban libres de las serovariedades objetivo.



**Figura 6.** Prevalencia de las serovariedades Enteritidis, Typhimurium, Infantis, Virchow y Hadar de *S. enterica* en manadas reproductoras de *Gallus gallus* positivas para *Salmonella* en la UE durante el periodo 2007-2012. (Datos tomados de la referencia 20).

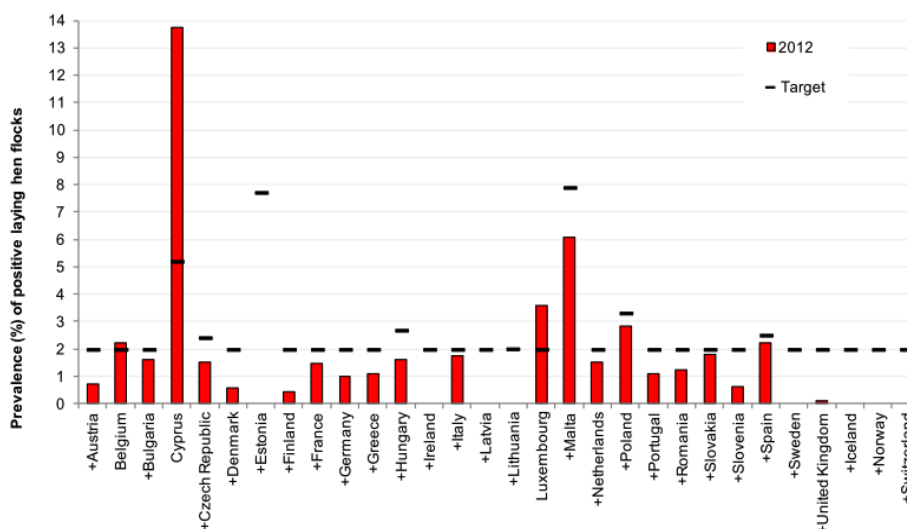


**Figura 7.** Prevalencia de las serovariedades Enteritidis, Typhimurium, Infantis, Virchow y Hadar de *S. enterica* en manadas reproductoras de *Gallus gallus* positivas para *Salmonella* en la UE durante 2012. El objetivo de prevalencia fue del 1% para los Estados miembros, Islandia, Noruega y Suiza. Los países que cumplieron con el objetivo se indican con el símbolo +. (Tomado de la referencia 20).

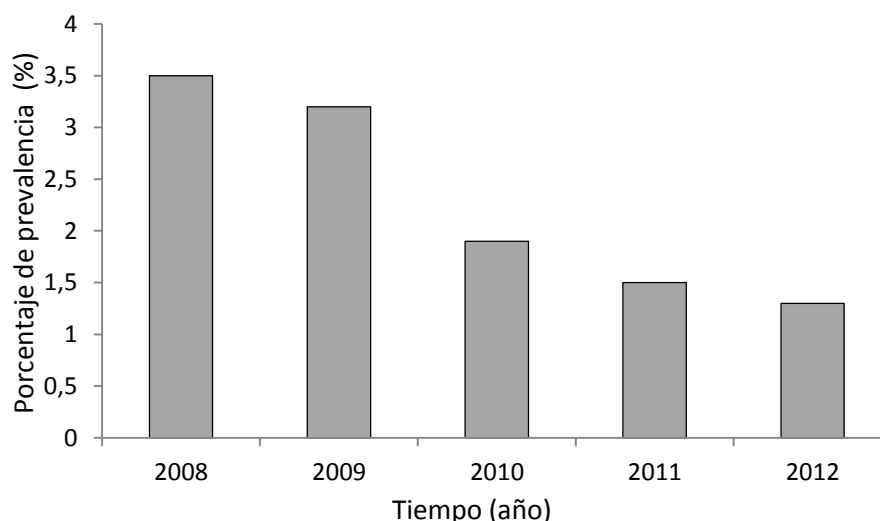
El mismo reglamento (CE) N° 2160/2003 (20) fue aplicado para el control de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* en gallinas ponedoras de *Gallus gallus* productoras de huevos para el consumo humano. Estos programas de control se basan en la adición de medidas de prevención, detección y control de *Salmonella* en las etapas importantes de la producción primaria de huevos. Con esa finalidad, dicha regulación incluye dos muestreos durante el periodo de cría, así como un muestreo cada 15 semanas en la etapa de producción, cuando la manada alcanza las 22-26 semanas de edad. El objetivo de prevalencia para las gallinas ponedoras se define en el reglamento (UE) N° 517/2011 (24) como un porcentaje mínimo anual de reducción, basado en el número de manadas adultas que fueron positivas para *S. Enteritidis* y/o *S. Typhimurium* al final del año anterior. Sin embargo, en los países con baja prevalencia, el umbral máximo de manadas positivas se fijó en el 2%. En 2012, 24 Estados miembros y 3 no miembros cumplieron con los objetivos de reducción (Figura 8), con una prevalencia global en la UE del 1,3%



siguiendo una tendencia descendente desde el año 2008 (Figura 9). *S. Enteritidis* fue más frecuente que *S. Typhimurium* en el conjunto de Estados miembro (1% frente a 0,3%), aunque en Finlandia, Francia e Italia la tendencia se invirtió.

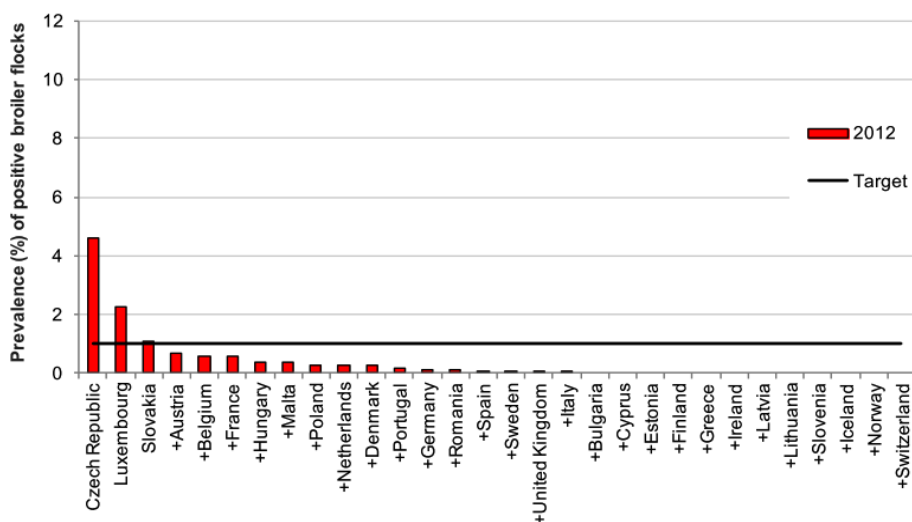


**Figura 8.** Prevalencia de *S. Enteritidis* y/o *S. Typhimurium* en las manadas de ponedoras de *Gallus gallus* positivas para *Salmonella* en la UE en 2012. Se muestra el objetivo de prevalencia establecido para cada Estado miembro, Islandia, Noruega y Suiza. Los países que cumplieron con el objetivo se indican el símbolo +. (Tomado de la referencia 20).

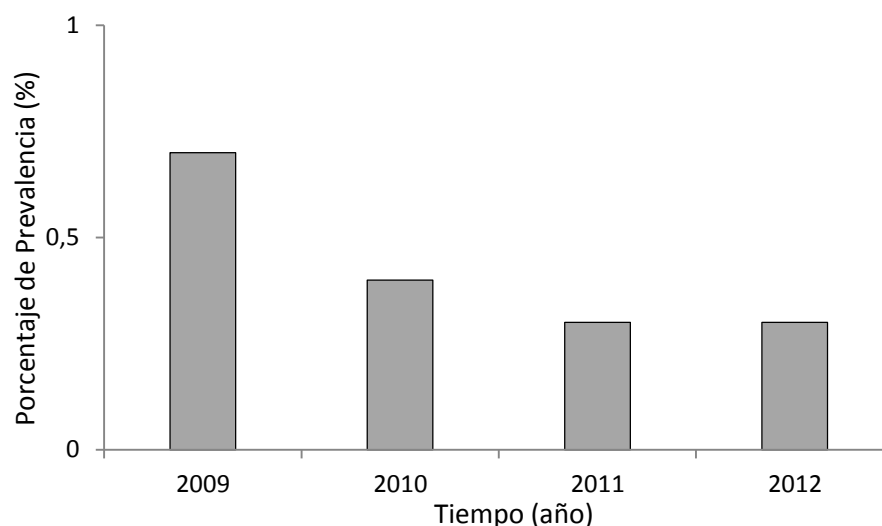


**Figura 9.** Prevalencia de *S. Enteritidis* y/o *S. Typhimurium* en las manadas de ponedoras *Gallus gallus* positivas para *Salmonella* en la UE durante el periodo 2008-2012. (Datos tomados de la referencia 20).

De la misma manera, desde el año 2009, el reglamento (CE) N° 2160/2003 (20) obliga a los Estados miembros a establecer controles de *Salmonella* en las manadas de pollos de engorde. En el reglamento (CE) N° 200/2012 (25) se establece el porcentaje máximo de manadas de pollos de engorde que pueden ser positivas para las serovariedades Enteritidis y/o Typhimurium (incluyendo *S. Typhimurium* monofásica) con un valor igual o inferior al 1%. En este caso, la detección de *Salmonella* se debe realizar dentro de las tres semanas previas al traslado de los pollos al matadero. Veinticuatro Estados miembros y 3 no miembros indicaron que el 1% o menos de sus manadas fueron positivas para *S. Enteritidis* y/o *S. Typhimurium*, cumpliendo la meta de prevalencia establecida (Figura 10). No obstante, después de la reducción durante el periodo 2009-2011 (Figura 11), la frecuencia de dichas serovariedades se mantuvo constante en 2012 (0,3%).



**Figura 10.** Prevalencia de *S. Enteritidis* y/o *S. Typhimurium* en las manadas de pollos de engorde de *Gallus gallus* positivas para *Salmonella* en la UE en 2012. Se muestra el objetivo de prevalencia establecido para los Estados miembros, Islandia, Noruega y Suiza. Los países que cumplieron con el objetivo se indican con un +. (Tomado de la referencia 20).



**Figura 11.** Prevalencia de *S. Enteritidis* y/o *S. Typhimurium* en manadas de pollos de engorde de *Gallus gallus* positivas para *Salmonella* en la UE durante el periodo 2008-2012. (Datos tomados de la referencia 20).

En general, los datos de este último informe de EFSA demuestran que las medidas establecidas por la UE han sido bastante eficientes en el control de las poblaciones de *Salmonella* de las manadas de *Gallus gallus*. No obstante, las mismas medidas se han aplicado en las manadas de reproductoras y de producción de pavos (*Meleagris gallopavo*), pero no han conseguido disminuir la prevalencia de *Salmonella* (19).

## 1.2. Bacteriófagos

Los bacteriófagos fueron descritos por primera vez, y casi simultáneamente, por Frederick Twort en 1915 (26) y Felix d'Hérelle en 1917 (27). F. Twort descubrió áreas vidriosas en sus colonias de *Staphylococcus* y determinó que no se obtenía crecimiento al intentar reaislar esas zonas. No obstante sus descubrimientos se abandonaron y ello permitió que F. d'Hérelle fuera quien publicara primero sus resultados (27). En 1926, este último autor ya destacó el potencial antibacteriano de los bacteriófagos y, por ello, promovió dos vertientes en el estudio de estos virus: una basada en su potencial como agentes terapéuticos (terapia fágica) y otra centrada en

descifrar su biología (28). No obstante, esa situación cambió con la llegada de los antibióticos, provocando que la terapia fágica quedara en desuso en los países occidentales, manteniéndose únicamente en algunos países del Este de Europa y en la antigua Unión Soviética (29). Sin embargo, el estudio de la biología de los bacteriófagos siguió adelante, contribuyendo de forma destacada al desarrollo de la Biología Molecular, marcando un hito importante con la completa secuenciación del genoma del bacteriófago  $\phi$ X174 (30) iniciándose así la era genómica. Actualmente, los estudios basados en terapia fágica están en auge debido al significativo incremento de bacterias resistentes a antibióticos como consecuencia de su uso clínico desmesurado y también de su aplicación en producción animal y agricultura.

### 1.2.1. Características generales y taxonomía de los bacteriófagos

Los bacteriófagos, denominados también fagos, son virus que únicamente infectan bacterias con una elevada especificidad de hospedador y que, como cualquier otro virus, dependen de los mecanismos celulares para poder multiplicarse. Las partículas fágicas o viriones contienen un genoma que puede ser DNA o RNA de cadena sencilla (ss) o doble (ds), dentro de una envuelta proteica o lipoproteica, conocida como cápside. En algunos casos, esta cápside está unida a una estructura proteica, denominada cola, la cual desempeña las funciones de reconocimiento del hospedador y de inyección del genoma vírico. Se estima que nuestro planeta puede albergar alrededor de  $10^{31}$  fagos (31), valor que les convierte en las entidades más abundantes e ubicuas de la Tierra. Se han aislado fagos en todos los ambientes donde sus hospedadores bacterianos están presentes, lo cual es una indicación de su gran diversidad (31).

Desde el descubrimiento de los fagos, su clasificación taxonómica ha pasado por varias etapas. En la década de 1920 a 1930 se observó que diferentes tipos de fagos mostraban especificidad de hospedador bacteriano; ello estableció una clasificación basada en la tipificación de los fagos

(32). Posteriormente, la introducción de la microscopía electrónica permitió medir el tamaño físico de los fagos, conocer la longitud exacta de las fibras de su cola y determinar la simetría de su cápside, lo cual dio lugar a una taxonomía basada en morfotipos en la década de 1940 a 1950 (32). Durante la década de 1960 a 1970, los avances en los métodos bioquímicos para el aislamiento de ácidos nucleicos de fagos facilitaron la determinación del tamaño y tipo de ácido nucleico de sus genomas, lo cual añadió más información a la taxonomía de estas entidades (32). El primer intento mundial para clasificar sistemáticamente a los virus tuvo lugar en el Congreso Internacional de Microbiología que se celebró en Moscú en 1966. En esta reunión se fundó el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), cuya misión fue desarrollar un sistema taxonómico universal para todos los virus que infectan animales, plantas, hongos, bacterias y, más tarde, arqueas. A partir de su primer informe en 1971, el ICTV se ha reunido periódicamente para actualizar las definiciones y directrices de la taxonomía, habiendo publicado su última revisión en 2014. En la actualidad, el ICTV clasifica a los fagos en base a: el tipo de ácido nucleico, la morfología y la secuencia genómica (32). Hasta la fecha, la taxonomía de bacteriófagos del ICTV contiene 1 orden, 3 familias, 6 subfamilias y 67 géneros. La mayoría de fagos observados mediante microscopía electrónica desde 1959 (el 96,2% de 5.568), presentan cola y se clasifican en el orden *Caudovirales*. Los fagos pertenecientes a este orden contienen DNA de doble cadena, carecen de envuelta y tienen simetría binaria, debido a la simetría cúbica de sus cápsides y a la simetría helicoidal de sus colas (33). El orden se subdivide en tres familias en función del tipo de cola. La familia *Myoviridae* representa aproximadamente de 25% de este orden e incluye a los fagos que tienen una cola larga y contráctil. La familia *Siphoviridae* es la más amplia del orden *Caudovirales*, ya que contiene el 61% de los fagos de este orden y se caracterizan por tener una cola larga pero no contráctil. Por último, en la familia *Podoviridae*, se agrupan los fagos que presentan una cola corta, los cuales significan el 14% de

los fagos restantes del orden *Caudovirales*. El 3,8% restante de fagos se caracterizan por tener morfologías y ácidos nucleicos variados; por ello se han agrupado en 14 familias y 5 géneros flotantes, formando grupos filogenéticos independientes (Tabla 4) (34).

**Tabla 4.** Taxonomía de los bacteriófagos.

Morfología	Ácido nucleico	Grupo	Fago	Características relevantes
Con cola	dsDNA lineal	<i>Myoviridae</i>	T4	Cola larga contráctil
		<i>Siphoviridae</i>	$\lambda$	Cola larga no contráctil
		<i>Podoviridae</i>	P22	Cola corta
Poliédrica	ssDNA circular	<i>Microviridae</i>	$\phi$ X174	Capsómeros que sobresalen
	dsDNA circular, superhelicoidal	<i>Corticoviridae</i>	PM2	Cápside compleja con lípidos
	dsDNA circular	Grupo <i>STV1</i> *	STIV	Protuberancias en forma de torre
	dsDNA lineal	<i>Tectiviridae</i>	PRD1	Vesícula lipídica interna, pseudocola
		Grupo <i>SHI</i> *	SH1	Vesícula lipídica interna
	ssRNA lineal dsRNA lineal segmentado	<i>Leviviridae</i> <i>Cystoviridae</i>	MS2 $\Phi$ 6	Tipo poliovirus Envuelta lipídica
Filamentosa	ssDNA circular	<i>Inoviridae</i>	Fd MVL1	Filamentos largos Varillas cortas
	dsDNA lineal	<i>Lipothrixviridae</i> <i>Rudiviridae</i>	TTV1 SIRV-1	Envuelta lipídica Tipo TMV
	dsDNA circular superhelicoidal	<i>Plasmaviridae</i> <i>Fuselloviridae</i> <i>Guttaviridae</i>	L2 SSV1 SNDV	Envuelta lipídica sin cápside Forma de limón Forma de gota
Pleomórfica	dsDNA lineal superhelicoidal	<i>Salterprovirus</i>	His1	Forma de limón
	dsDNA lineal	<i>Ampullaviridae</i> *	ABV	Forma de botella
		<i>Globuloviridae</i> *	PSV	Tipo paramixovirus
	dsDNA circular	<i>Bicaudaviridae</i> *	ATV	Doble cola

\* Pendiente de clasificación. (Adaptado de la referencia 34)

Aun así, distintos autores postulan que este sistema de clasificación presenta debilidades, entre ellas destacan:

1. A pesar de que los fagos presentan un elevado mosaicismo, lo cual es indicativo de una transmisión horizontal, el actual sistema se basa en la transmisión vertical de características genéticas (32).
2. En el actual sistema de clasificación no se incluye la información genómica y proteómica de los bacteriófagos para definir los taxones, ya que estos únicamente se separan en función del tipo de ácido nucleico, sin contemplar los módulos y genes presentes en sus genomas (32).
3. Es un modelo que depende de la microscopía electrónica para asignar un fago a una familia taxonómica. Este punto es sobre todo problemático en la era de la metagenómica, en la cual se obtienen secuencias de fagos sin que se hayan aislado. Además, en otros casos, es posible que el fago sólo exista en forma de profago sin producir partículas víricas maduras (32).

Por ello, se han propuesto nuevos sistemas de taxonomía para bacteriófagos. Rohwer y Edwards plantearon en 2002 el denominado “árbol proteómico de fagos”. En su propuesta se comparan los proteomas fágicos completos para después generar una matriz de homología (32). Otra aproximación elaborada por un grupo del *Pittsburgh Bacteriophage Institute* sugiere que tal vez no sea posible tener un sistema taxonómico estrictamente jerárquico, dado el mosaicismo genético resultante de la transferencia genética horizontal entre los fagos (32). Finalmente, se ha propuesto un tercer sistema que se basa en la genómica comparada de los módulos estructurales de los bacteriófagos (32).

De todos modos, con la excepción de algunos casos notables, los tres enfoques anteriormente citados acabaron incluyendo a la mayoría de los fagos en los mismos grupos en los que actualmente están clasificados bajo las premisas del ICTV. Por ese motivo y por el reducido

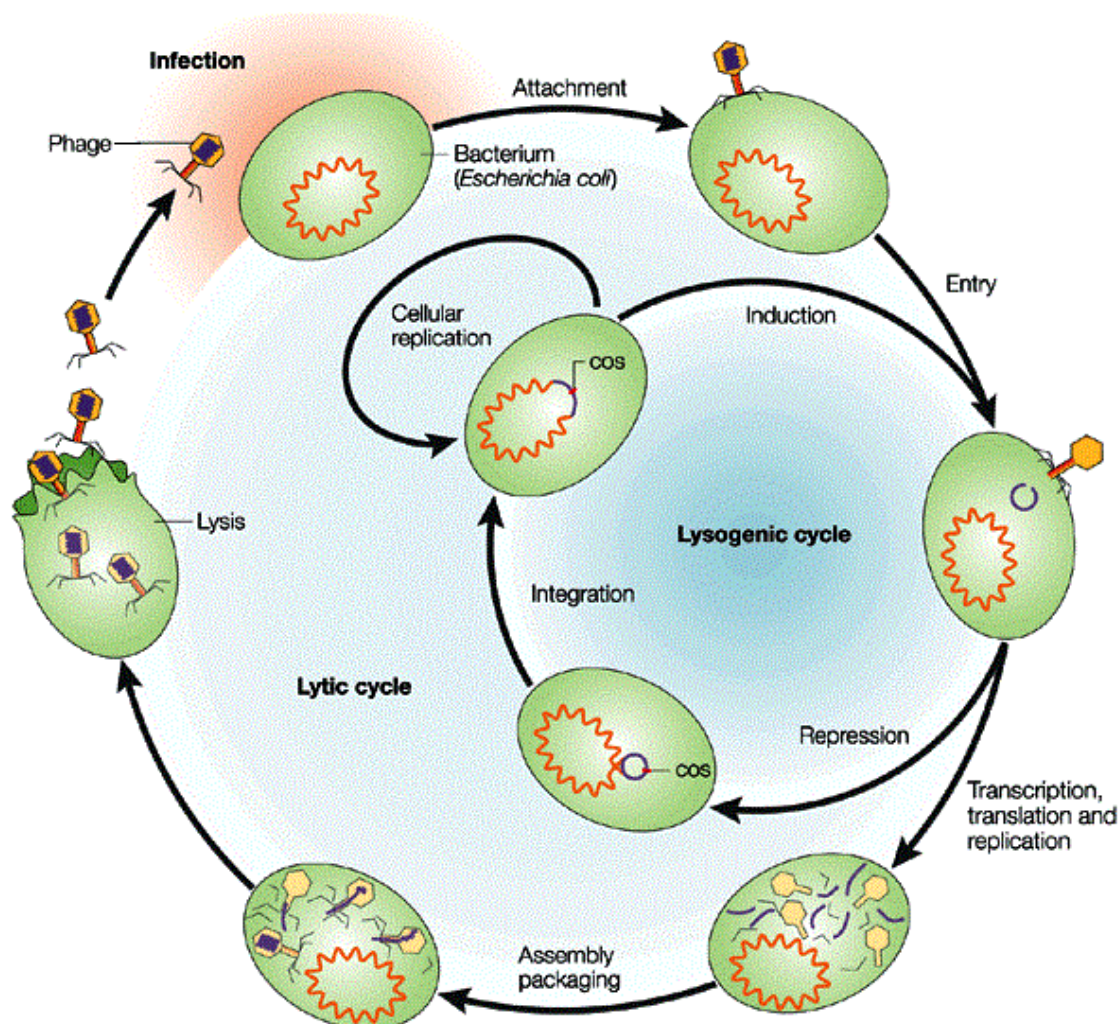
conocimiento actual de la genómica de muchos de los fagos, es prematuro intentar establecer otros criterios para un sistema universal de clasificación taxonómica de bacteriófagos.

### 1.2.2. Ciclo biológico de los bacteriófagos

Cuando un fago virulento infecta a una célula susceptible, desencadena un ciclo de producción fágica. Durante este ciclo, proteínas específicas del fago secuestran y reprograman el aparato biosintético de la célula hospedadora con el objetivo de promover la multiplicación vírica. Habitualmente, la producción vírica está muy organizada; empieza por la replicación del ácido nucleico para posteriormente producir las proteínas estructurales de la partícula fágica y, finalmente, liberar la progenie mediante una lisis bacteriana súbita, debida a la desestructuración de la pared y de la membrana celular. Este tipo de ciclo lítico es el único modo de multiplicación de los fagos virulentos; no obstante, en el caso de los bacteriófagos atemperados el ciclo infectivo puede desarrollarse de dos maneras diferentes (Figura 12). Cuando un fago atemperado infecta a su hospedador puede producirse el ciclo lítico o el denominado ciclo lisogénico. En este último, el fago permanece en un estado latente, llamado profago, sin llegar a lisar la célula. Un fago puede establecerse como profago a través de: i) integración del genoma fágico mediante el reconocimiento de unas secuencias específicas en el cromosoma bacteriano; ii) inserción del DNA fágico en el genoma del hospedador por acción de una transposasa codificada en el genoma del propio fago y iii) en forma de plásmido a nivel citoplasmático (35). En este estado de profago, la expresión génica está altamente reprimida y el DNA del profago se replica junto con el cromosoma bacteriano. Ciertas circunstancias o agentes externos, como la radiación ultravioleta, pueden inducir el ciclo lítico de los profagos, los cuales acabarán produciendo nuevos viriones infectivos. Durante dicha infección, puede producirse una escisión incorrecta del profago, de forma que se escinde parte del genoma bacteriano adyacente al lugar de integración del profago y se empaqueta en partículas víricas



infectivas. Ello es la base de la transducción especializada ya que, tras una nueva infección, dichas partículas víricas transmitirán genes bacterianos a un nuevo hospedador.

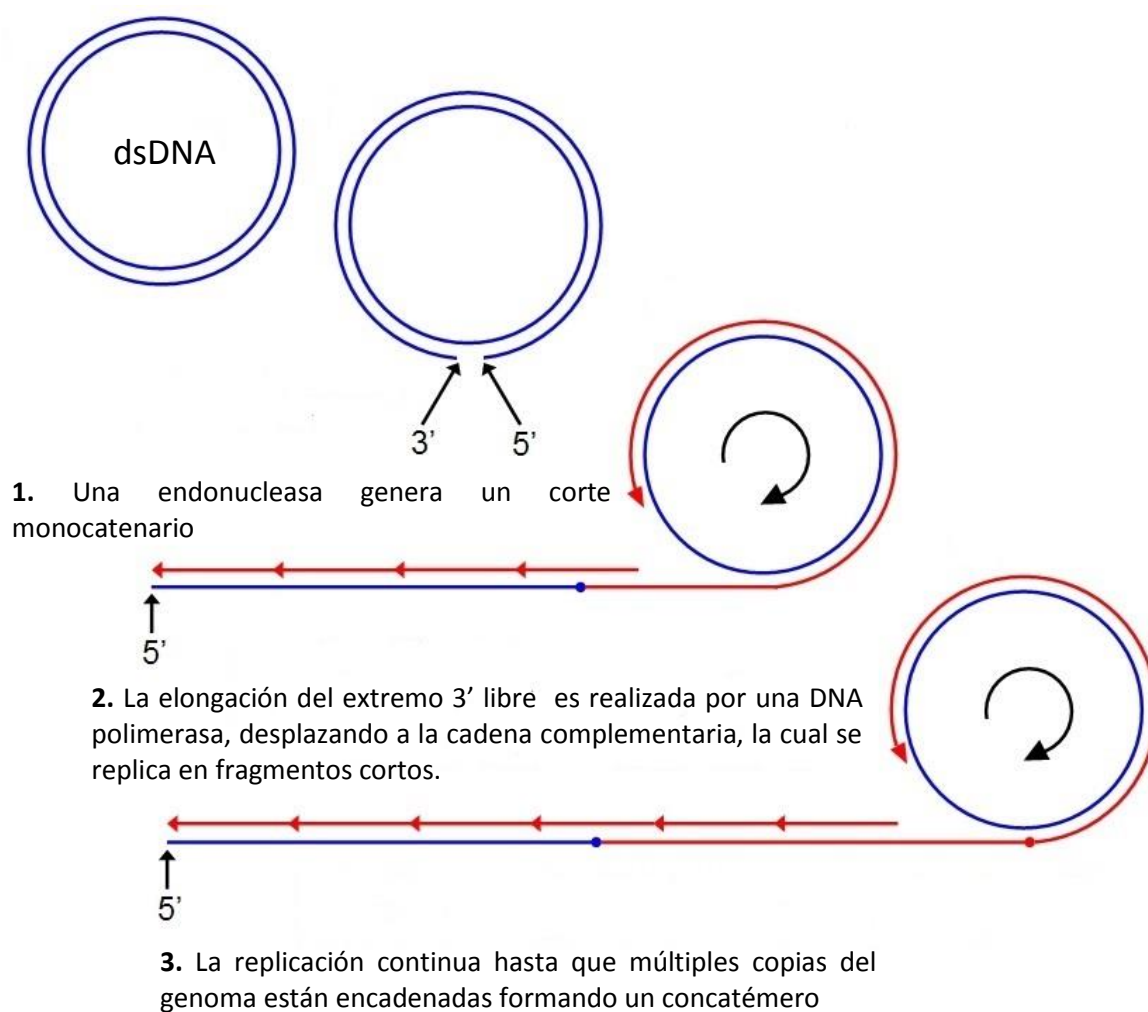


**Figura 12.** Representación esquemática del ciclo lítico o lisogénico de los bacteriófagos. (Tomado de la referencia 137).

El primer paso del ciclo infeccioso de un bacteriófago es el reconocimiento y adsorción del fago a la célula hospedadora. El proceso de adsorción por lo general consta de dos fases: una unión reversible al receptor, seguida de una irreversible y vinculante. Cabe señalar que los mecanismos moleculares de la interacción entre ambas etapas de adsorción son específicos

para cada sistema hospedador-fago y pueden variar significativamente entre representantes de diversos grupos taxonómicos. Las proteínas situadas en la base de la cola del fago son las encargadas de realizar el reconocimiento y la adsorción en los receptores de la célula hospedadora. Las fibras de la cola y las espículas son las que llevan a cabo la primera etapa de unión reversible, la cual continua con una unión irreversible gracias a cambios estructurales en las proteínas de la base de la cola (37). Ello propicia la siguiente fase del ciclo biológico de los fagos: la inyección del DNA en el citoplasma de la célula hospedadora. El experimento de Hershey y Chase con el fago T2 (38) condujo a la idea de que los fagos inyectan su DNA a través de un mecanismo similar al de una jeringa, sugiriendo que la fuente de energía que permitía la translocación del DNA en la célula era la presión debida a la alta compactación del genoma fágico dentro de la cápside de los fagos. Sin embargo, posteriormente se demostró que este modelo no es factible en fagos que presenten una cola corta, ya que su genoma terminaría en el medio extracelular o en el periplasma de la célula (39). Por ese motivo, los mecanismos de inyección también son específicos para cada fago o grupo de fagos y pueden estar vinculados al potencial electroquímico de la membrana, moléculas de ATP, acción de proteínas inyectoras, digestión enzimática del peptidoglicano de la pared o a varios de estos factores (37).

Una vez el genoma del bacteriófago se ha inyectado en el citoplasma bacteriano, se recirculariza, lo cual evita su degradación por acción de las exonucleasas bacterianas y permite que comience la multiplicación que es la siguiente fase del ciclo biológico vírico. Esta fase se inicia con la replicación del genoma fágico. Durante la replicación del DNA de la mayoría de fagos con cola se forman concatémeros que contienen múltiples unidades genómicas. Dichos concatémeros se originan mediante el mecanismo de replicación conocido como círculo rodante u otras estrategias más complejas (Figura 13) (40).



**Figura 13.** Representación esquemática de la estrategia de replicación fágica denominada circulo rodante (Adaptado de la referencia 41).

Entre los bacteriófagos sobre los que se conoce su mecanismo de replicación, sólo los siguientes tres grupos forman estructuras genómicas monoméricas tras su replicación: i) los fagos tipo P2 con genomas que presentan extremos cohesivos (*cos*), situándose las regiones de cadena sencilla en el extremo 5'; ii) los fagos tipo  $\phi$ 29, cuyo cromosoma queda covalentemente unido a proteínas y iii) los fagos tipo Mu con el genoma integrado en el cromosoma de la bacteria hospedadora (Tabla 5). Esta situación refleja que las diferencias inherentes al ciclo de replicación fágico dependerán, sobre todo, de los mecanismos que regulan su iniciación y de la presencia o ausencia de polimerasas específicas codificadas en los genomas de los

bacteriófagos, las cuales pueden presentar una mayor o menor capacidad de procesamiento (34).

**Tabla 5.** Estrategias de replicación de los fagos con cola y tipo de extremos de sus cromosomas.

Tipo de extremos cromosómicos		Fago	Estrategia de replicación
Extremos cohesivos	Protrusión de cadena simple a 5'	$\lambda$	Círculo rodante $\rightarrow$ concatémero
		P2	Circular $\rightarrow$ círculo
	Protrusión de cadena simple a 3'	HK97	Círculo rodante $\rightarrow$ concatémero
Permutación cíclica		T4	Compleja $\rightarrow$ concatémero
		P22	Círculo rodante $\rightarrow$ concatémero
		P1	Círculo rodante $\rightarrow$ concatémero
DNA del hospedador en los extremos		Mu	Transposición duplicativa en el DNA del hospedador
Repeticiones terminales	Cortas	T7	Lineal $\rightarrow$ concatémero
	Largas	SPO1	Compleja $\rightarrow$ concatémero
		T5	Compleja $\rightarrow$ concatémero
Proteínas unidas covalentemente		$\Phi$ 29	Cebada por proteínas Lineal $\rightarrow$ lineal

(Adaptado de la referencia 39).

Una vez se han sintetizado los concatémoros y las proteínas de la cápside y estas han formado la procápside, empieza la fase de empaquetamiento del DNA. Los bacteriófagos con cola contienen en sus viriones una molécula lineal de DNA de doble cadena, la cual se empaqueta mediante un proceso dinámico, acoplado a la formación de la cápside, en el que intervienen translocasas de DNA o motores moleculares similares. La translocación del DNA dentro de la procápside se inicia a través de la proteína portal que se sitúa en el vértice inferior de dicha procápside. Generalmente, además de las translocasas, el sistema también incluye unas

enzimas codificadas por los fagos, llamadas terminasas (40). Dichas enzimas constan de dos subunidades; una pequeña que se encarga del reconocimiento del DNA y otra mayor que se une a la proteína portal y corta los concatémeros generando los genomas víricos. Durante este proceso, debido a la escisión nucleotídica del DNA del concatémero, se generan unos extremos que están estrechamente relacionados con el proceso concreto del empaquetamiento del DNA. En función de la terminasa, el DNA fágico puede presentar seis tipos de extremos que se caracterizan por la presencia de: i) extremos cohesivos; ii) repeticiones terminales con permutación cíclica; iii) repeticiones terminales directas (en inglés *direct terminal repeat*; DTR) cortas y exactas; iv) DTR largas y exactas; v) DNA del hospedador en las secuencias terminales y vi) proteínas terminales unidas covalentemente al DNA (40). El único punto compartido en este proceso es el reconocimiento del DNA por parte de la terminasa. A partir de aquí, la situación varía en cada uno de los tipos mencionados anteriormente.

En el caso de los fagos que presentan repeticiones terminales con permutación cíclica, se produce inicialmente un primer corte en el concatémero en una región cercana a la secuencia de reconocimiento específica, denominada *pac*, pero es el volumen disponible en el interior de la cápside y no otra secuencia *pac*, la que determinará los siguientes puntos de corte de la terminasa. Por ello, este sistema de empaquetamiento recibe el nombre de llenado de cabeza (Figura 14). Las cápsides de los fagos que emplean dicha estrategia típicamente contienen entre un 102% y 110% de la longitud total del genoma, por lo que los cromosomas tienen repeticiones terminales directas que varían del 2% al 10% del contenido del genoma (40). Además, se cree que los extremos deben ser romos, ya que pueden ligarse a otros fragmentos de DNA con ese tipo terminación (40). El resultado final del empaquetamiento implica una permutación cíclica del genoma del bacteriófago en las repeticiones terminales. De todos modos, dicha permutación cíclica será parcial si las series de empaquetamiento empiezan

siempre y de forma precisa en una secuencia *pac*. De esa manera, las repeticiones terminales estarán distribuidas en una porción determinada del genoma que será cercana a la secuencia *pac*. No obstante, en algunos fagos, tras el reconocimiento de la secuencia *pac*, la terminasa se desplaza una cierta distancia antes de realizar el corte para iniciar el empaquetamiento (40). Ello supone una gran imprecisión en el inicio del procesamiento de los concatémeros y también implica que los extremos del genoma fágico que se empaqueta pueden ser todas o casi todas las regiones de una parte sustancial del genoma (40). En ambos casos, la función de esas repeticiones es esencial, ya que permite una recombinación homóloga tras la infección, hecho que conlleva la recircularización del genoma y el inicio de la replicación.

A diferencia de lo comentado anteriormente, otros grupos de fagos presentan regiones de DNA monocatenario en los extremos de sus cromosomas, siendo estas secuencias de igual longitud y complementarias entre sí. Tras la inyección del DNA, estas regiones monocatenarias hibridan permitiendo que la DNA ligasa del hospedador genere una molécula circular covalentemente cerrada. Por ello, los extremos del cromosoma de este tipo de fagos reciben el nombre de extremos cohesivos (*cos*). Dichos extremos pueden presentar regiones de DNA de cadena sencilla en sentido 5' o 3' de una longitud comprendida entre 7 y 19 nucleótidos (40). Tales extremos se generan cuando la terminasa reconoce una secuencia específica y realiza cortes escalonados en ambas cadenas de DNA durante su empaquetamiento. Así pues, en un concatémero, el primer corte generará el extremo derecho de un cromosoma y el extremo izquierdo del siguiente cromosoma a introducir en la procápside (Figura 14). Dicha estrategia produce extremos cohesivos que serán idénticos y estarán presentes en la misma posición del cromosoma del bacteriófago, dando lugar a un sistema de empaquetamiento de unidad genómica de longitud invariable.

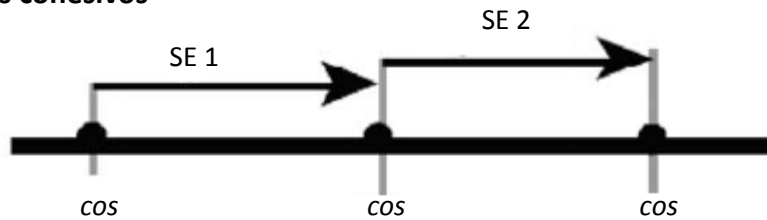
De forma similar, los fagos cuyos extremos presentan DTR exactas, ya sean cortas o largas, también contienen una unidad genómica invariable en su cápside. Estas repeticiones en sus extremos serán exactamente las mismas en todos los viriones, es decir, no se permutan. Actualmente, no se conoce el mecanismo por el cual se generan dichas repeticiones, pero al parecer sólo hay una copia de la repetición entre los genomas del concatémero. Ello sugiere que la región repetida se duplica antes o durante el empaquetamiento del genoma (Figura 14), dejando una región terminal roma (40). Los dos grupos indicados anteriormente para este tipo de extremos difieren en el tamaño de las repeticiones, siendo de unos cientos de pares de bases (pb) para el de extremos con DTR cortas y de muchas más pb para el de DTR largas, como la del fago T5 cuya DTR es de 10.139 pb (40).

De modo completamente diferente, los fagos tipo Mu replican su DNA por transposición y duplicación en el cromosoma del hospedador, hecho que comporta el empaquetamiento de genomas virales que están distribuidos aleatoriamente en el cromosoma bacteriano. Por ello, se cree que la terminasa de estos fagos reconoce una secuencia *pac* situada cerca del final del cromosoma fágico, desplazándose fuera de este para realizar un corte en el DNA bacteriano. Ello permite el inicio del empaquetamiento por llenado de cabeza y continuará hasta haber introducido todo el genoma vírico y 1.800 pb del cromosoma bacteriano en la cápside (42). Por lo tanto, cada virion presentará, unidas a ambos extremos de su genoma, unas secuencias únicas del cromosoma bacteriano, acabadas en corte roma (Figura 14) (40).

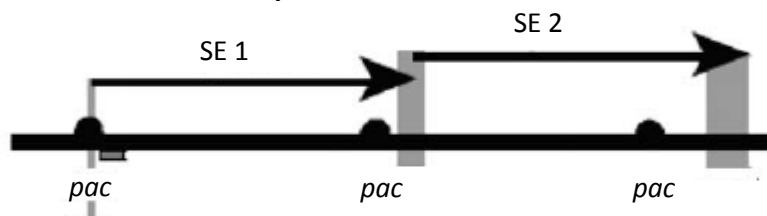
Por último, la estrategia de empaquetamiento que incluye proteínas terminales unidas covalentemente al DNA fue identificada en fagos de *Bacillus subtilis*, como el  $\phi 29$ . En este caso, las proteínas se encuentran unidas a los extremos 5' del DNA de los viriones y también a los cromosomas en replicación (43). Asimismo, se ha descrito la existencia de un RNA (pRNA), implicado en el proceso de empaquetamiento del DNA que interviene en el reconocimiento del

genoma fágico a empaquetar y en el consumo energético durante la translocación del DNA al interior de la procápside (43).

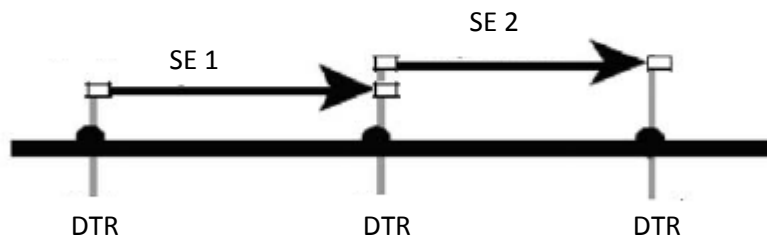
**A) Extremos cohesivos**



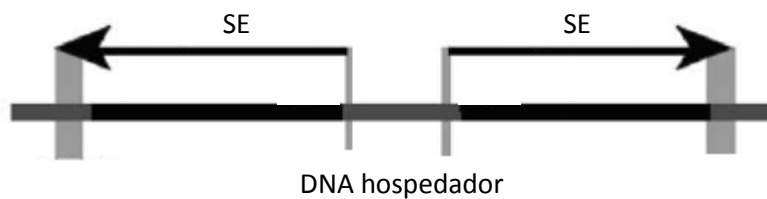
**B) Repeticiones terminales con permutación cíclica**



**C) Repeticiones directas sin permutación**



**D) DNA del hospedador**



**Figura 14.** Representación esquemática de las estrategias de empaquetamiento de los genomas fágicos: extremos cohesivos (A), repeticiones terminales con permutación cíclica (B), repeticiones terminales directas sin permutación (C) y DNA del hospedador en los extremos (D). SE, suceso de empaquetamiento. (Adaptado de la referencia 40).



Una vez el DNA ha sido completamente empaquetado, la cápside termina su maduración, proceso que finaliza con la unión de la cola a dicha cápside a través de la zona conectora, dando lugar a viriones infectivos (44). En este punto, el ciclo lítico llega a su última fase que normalmente acaba con la lisis del hospedador. Con anterioridad a la década de 1990 ya se estableció que la mayoría de fagos estudiados codificaban una actividad muraminidasa debida a una enzima que invariablemente se llamó liozima, en honor a la primera muraminidasa descubierta por A. Fleming (1922) en secreciones mucosas humanas (45). Más adelante, se estableció que la síntesis de estas liozimas tenía lugar al mismo tiempo que la formación de las proteínas de la cápside y que eran las responsables de la ruptura de la membrana celular cuando la maduración de los virus se había completado. Sin embargo, estudios recientes han puesto de manifiesto que esta concepción es errónea por varias razones: i) algunos fagos más sencillos no presentan esta enzima, ii) las liozimas fágicas son muy diversas y difieren entre los distintos grupos de fagos y iii) generalmente no guardan relación con la liozima clásica. Por todo ello, se acuñó el término endolisina para definir a estas enzimas fágicas. En algunos casos, como para el fago T7, la actividad muraminidasa se empieza a expresar desde el inicio de la infección y no de forma simultánea a la expresión de las proteínas estructurales del virion, señalando que la regulación de la lisis celular no está temporalmente relacionada con el proceso de ensamblaje viral (46).

En los fagos más sencillos, generalmente de DNA o RNA de cadena sencilla, el proceso de lisis está regulado por unas proteínas sin actividad muraminidasa que actúa impidiendo la biosíntesis del peptidoglicano bacteriano (47).

En el caso de los fagos de DNA de doble cadena que infectan hospedadores Gram negativos, la lisis celular sufre una regulación temporal muy cuidadosa en la que se distinguen tres fases específicas que permiten la destrucción de las tres barreras existentes en la célula: la

membrana citoplasmática, el peptidoglicano y la membrana externa. Para ello, son imprescindibles tres proteínas codificadas por el fago: endolisinas, holinas y *spanins*. Actualmente, se han descrito dos sistemas de lisis: el tipo canónico endolisina/holina y el basado en pinholinas/endolisinas-SAR (en inglés, *signal arrest release, SAR*) que presentan un péptido señal. Estas dos estrategias difieren a nivel de regulación, pero ambas acaban provocando la lisis celular (46).

En la lisis canónica, las holinas se distribuyen homogéneamente en forma de homodímero en el citoplasma o en la membrana citoplasmática de la bacteria (46). Del mismo modo, la endolisina, que presenta actividad transglicosilasa, también se acumula en el citoplasma como un monómero completamente activo. En un determinado momento, se dispara la actividad de las holinas, provocando una redistribución de dichas proteínas y la formación de agregados de cientos de moléculas que generan interrupciones masivas en la membrana citoplasmática, alcanzando tamaños de poro superiores a 1  $\mu\text{m}$  (48). A día de hoy no se conoce exactamente el factor desencadenante de la acción de las holinas, pero se cree que puede responder a cambios en la polarización de la membrana o a los niveles de acumulación de la proteína junto con antiholinas (46), las cuales actuarán como inhibidoras de la actividad de las holinas. Estos poros permitirán que la endolisina pase al periplasma para poder empezar a degradar el peptidoglicano del hospedador, actuando sobre todo en los puntos específicos donde se han acumulado las holinas.

En el sistema pinholina/endolisina-SAR, los dos primeros pasos de la lisis celular se desarrollan siguiendo un patrón un tanto distinto. Inicialmente, estas endolisinas-SAR se acumulan y se ligan a la membrana citoplasmática en una forma inactiva. Tras ser procesadas por una peptidasa SAR adoptan su configuración activa y pueden ser exportadas al periplasma celular sin necesidad de que haya canales formados por holinas. De esta forma, el fago evita una

actividad muraminidasa prematura que supondría un desastre para su multiplicación. La liberación de las endolisinas-SAR de la membrana citoplasmática se produce lentamente y en baja proporción de forma espontánea o rápidamente y en masa en respuesta a un cambio del potencial de dicha membrana (46). En este sistema, las pinholinas son las encargadas de generar ese cambio de potencial, formando poros nanométricos en la membrana citoplasmática (49), por lo que desempeñan solamente un papel de temporizador en la activación de las endolisinas-SAR, ya que estas pasarán a ser catalíticas una vez se hayan liberado (46).

El siguiente paso indispensable en la lisis celular de las bacterias Gram negativas es la destrucción de la membrana externa ya que, tras la degradación del peptidoglicano, dicha membrana puede permanecer estable por un periodo de tiempo indefinido sin necesidad de suplemento de cationes bivalentes en el medio (46). Así pues, las dos estrategias descritas anteriormente convergen en este punto, en el cual, las proteínas transmembrana conocidas como *spanins* juegan un papel clave. Existen dos tipos de *spanins*: unas que forman complejos de dos componentes (*i-spanin* y *o-spanin*) y otras, *u-spanin*, que dan lugar a complejos proteicos de un único componente. Por ahora, hay diversas hipótesis que intentan explicar cómo estas proteínas acaban disgregando la membrana externa (46), pero de momento el sistema más aceptado es la fusión de membranas. Se sabe que durante la fase de morfogénesis del bacteriófago, dichas proteínas se acumulan en la envuelta celular, quedando atrapadas en la red de peptidoglicano. Se ha propuesto que una vez este ha sido eliminado, las *spanins* sufren cambios de conformación que provocarán el acercamiento de las membranas citoplasmática y externa e inducirán su fusión (46), hecho que causará su interrupción y permitirá la liberación de la nueva progenie de fagos.

### 1.3. Bacteriófagos de *Salmonella*

Actualmente son muchos los bacteriófagos específicos de *Salmonella* que se han aislado e identificado. En los últimos análisis filogenéticos realizados por la ICTV en 2014, los fagos de *Salmonella* se incluyeron en 6 géneros tipo: P2, P22,  $\epsilon$ 15, lambda, SP6 y FelixO1 (Tabla 6) (50).

**Tabla 6.** Géneros de bacteriófagos con que contienen fagos de *Salmonella*.

Género	Ejemplos de fagos
Tipo P2	Fels-2 SopE $\phi$ PSP3
Tipo Lambda	Gifsy-1 Gifsy-2 Fels-1
Tipo P22	$\epsilon$ 34 ES18 P22 ST104 ST64T UAB_Phi20
Tipo $\epsilon$ 15	$\epsilon$ 15
Tipo SP6	SP6 UAB_Phi78
Tipo FelixO1	FelixO1 UAB_Phi87 SPT-1 FO1a FSL SP-010 FSL SP-012 FSL SP-107

Seguidamente, se comentan los géneros a los cuales pertenecen los fagos UAB\_Phi20, UAB\_Phi78 y UAB\_Phi87.

### 1.3.1. Bacteriófagos del género tipo P22

El fago mejor caracterizado de este género es el bacteriófago atemperado P22 con una cápside de unos 60 nanómetros (nm) unida a una cola corta (51) y un genoma de 43,5 kilobases (kb) que contiene la secuencia *pac* 5'-GAAGATTTATCTGAAGTCGTTA-3'. En el proceso de adsorción, la espícula de la cola de este fago reconoce las ramificaciones laterales del antígeno O del LPS de los serotipos A, B y D1 de *Salmonella* (52). Además, esta proteína posee actividad endorramnosidasa, factor que permite la degradación del antígeno O del LPS y la penetración del fago hasta la superficie de la membrana externa, lugar en el que se produce la unión irreversible a la célula para la posterior inyección del DNA. Una vez el genoma entra en el citoplasma del hospedador se recirculariza por las permutaciones cíclicas de sus extremos, mediante la acción de la proteína fágica Erf y las proteínas RecA y DNA girasa del hospedador. En este punto, el genoma de P22 puede empezar a replicar dando lugar a un ciclo lítico o lisogénico. La integración del profago tiene lugar en un gen de tRNA y es catalizada por una integrasa fágica que recombina las regiones *attB* del cromosoma bacteriano y *attP* del bacteriófago. Sin embargo, a diferencia del fago lambda, este proceso no requiere factores de integración del hospedador (52). En estado lisogénico, el fago P22 expresa tres sistemas diferentes que bloquean la superinfección por fagos homólogos: i) inmunidad conferida por el represor c2 evitando la replicación de fagos homoinmunes; ii) exclusión de la superinfección por los productos de los genes *sieA* y *sieB* que bloquean la inyección del DNA de otros fagos y iii) conversión lisogénica de la bacteria al provocar cambios químicos que modifican el antígeno O del LPS, evitando así la adsorción de otros fagos que reconocen el mismo receptor.

Otro miembro de este género es el fago atemperado ST104 que se descubrió como profago en la cepa DT104 de *S. Typhimurium*. Su genoma tiene un tamaño de 41,4 kb y codifica unas 65 proteínas que, en su mayoría, son muy parecidas a las de los fagos P22, ε34 y ST64T. Entre esas

proteínas destacan los sistemas de antirrestricción (*abc*), conversión lisogénica (*grt*), exclusión de la superinfección (*sie*) y los *loci nin* e *immC*. Además, su secuencia *pac* (5'-GAAGACTTATCTGAGGTCGTTA-3') es idéntica a la de los fagos ST64T y  $\epsilon$ 34. La proteína de antiterminación Gp24 exhibe un 96% de identidad con la del fago P22, hecho que sugiere que el control de la expresión temprana es similar en ambos fagos.

ST64T es un bacteriófago parecido a los anteriores que fue aislado al tratar la cepa *S. Typhimurium* DT64 con mitomicina C, en la cual se encontraba como profago. Posee una cápside de unos 50 nm y un genoma de 40,7 kb que contiene el operón *gtrABC* de conversión lisogénica (52). En su genoma, la región situada entre los genes *int* y *grtA* presenta una homología del 93% con el fago ST104 y del 99% con el fago P22, lo cual sugiere que la región de integración *attP* de los tres fagos es idéntica (52).

Otro miembro de este género es el fago  $\epsilon$ 34 que presenta una cápside isométrica de 62,5 nm y una cola corta de 5,5 nm, con un genoma de 40,3 kb que muestra un gran parecido en secuencia y distribución espacial con el del fago P22. Asimismo, el fago  $\epsilon$ 34 se caracteriza por ser capaz de infectar, lisogenizar y seroconvertir a cepas de *S. enterica* serovariedad Anatum, siendo su lugar de integración el gen *argU* de *Salmonella*, el cual codifica un tRNA (52). La espícula de su cola posee la capacidad de despolimerizar el LPS y una zona N-terminal idéntica a la de los fagos Sf6, P22, ST64T y ST104, lo cual indica que la maquinaria de la cola a la que se une la espícula está muy conservada en estos fagos (52).

Con una cápside de  $60 \pm 1,5$  nm y una cola corta de  $13 \pm 0,7$  nm, el fago UAB\_Phi20 fue morfológicamente clasificado dentro de la familia *Podoviridae*. Además, la comparación de su núcleo proteico reveló que comparte el 72% de las proteínas con el fago P22 y un 63-65% con las de los fagos ST64T y ST104, siendo estos valores suficientemente elevados como para poder

clasificarlo dentro del género tipo P22 (53). El genoma del fago UAB\_Phi20 presenta un tamaño de 41,8 kb con un contenido de guanina citosina (G+C) del 47,2%, valor que es algo inferior al de su hospedador (54). Su genoma consta de un módulo de lisogenia con proteínas implicadas en el establecimiento del ciclo lisogénico, conversión lisogénica, inmunidad, escisión y también una región *attP*. Asimismo, los productos de los genes *c2*, *cro* y *c3*, los cuales regulan la decisión entre lisis y lisogenia, presentan gran similitud con los del fago P22, al igual que los productos de los genes *mnt*, *arc* y *ant*, relacionados con el control y mantenimiento de la lisogenia. A pesar de ello, estudios previos demostraron que el fago UAB\_Phi20 es virulento, lo cual parece ser debido a la falta de las regiones de reconocimiento del activador C1 y el represor C2 cerca de los genes implicados en la elección del tipo de ciclo biológico, resultando en un fago con unas calvas claramente líticas con fondo transparente y capaz de clarificar los cultivos que infecta (54). Por otra parte, los productos de los genes relacionados con el metabolismo del DNA del fago UAB\_Phi20 son idénticos a los del fago ST104, detectándose aquellos implicados en la función anti-RecBCD, los genes *erf* y *arf* relacionados con la recombinación y recircularización del DNA y los que codifican proteínas necesarias para la replicación, como la primasa y la helicasa, siendo estas dos últimas similares a las del fago P22 (54). Además, el genoma del fago UAB\_Phi20 contiene un módulo de lisis que codifica una holina, una endolisina y dos endopeptidasas, todas ellas idénticas a las del fago P22. Las proteínas del fago UAB\_Phi20 implicadas en la morfogénesis, como terminasas, proteínas de la cápside, inyección del DNA y cola, presentan una alta similitud con las de los fagos P22, ST64T y ST104 (54).

### 1.3.2. Bacteriófagos del género tipo SP6

El bacteriófago SP6 consta de un genoma de 43,8 kb con unas DTR de 174 pb (55). Este bacteriófago, al igual que el fago T7 de *E. coli*, codifica en su genoma una RNA polimerasa propia que reconoce los promotores específicos del genoma del fago, siendo la responsable de

la expresión génica intermedia (replicación) y tardía (morfogénesis y lisis). A nivel molecular, la presencia de esta RNA polimerasa y de sus promotores fueron factores clave para definir el género tipo T7 (56), en el que inicialmente se incluyó al fago SP6. No obstante, el análisis y comparación de su núcleo genómico reveló que sólo comparte nueve genes con el fago T7, una proporción muy reducida comparada con los resultados obtenidos en otros fagos (52). Por ello, el ICTV definió el género tipo SP6. Otra característica interesante del fago SP6 es que su espícula presenta homología con la de los fagos P22, ST104 y ST64T. Sin embargo, esta identidad sólo se encuentra en la parte C-terminal de dicha proteína, responsable de la actividad endoramnosidasa (52).

El bacteriófago UAB\_Phi78, pertenece a la familia Podoviridae, con una cápside de  $66 \pm 1,7$  nm y una cola corta de  $14 \pm 0,7$  nm y su genoma es de 44,1 kb con un contenido de G+C del 47,41% (57). La comparación de su núcleo proteico demostró una similitud del 83% con el fago SP6, hecho que permitió su inclusión en el género tipo SP6 (53). Además, se han identificado terminadores rho-independientes localizados en las mismas posiciones en ambos genomas, aunque sus secuencias presentan una homología inferior al 56% (57). Los marcos abiertos de lectura (orf) del fago UAB\_Phi78 se han clasificado en tres grupos funcionales. El conjunto de genes metabólicos codifica proteínas muy similares a las del fago SP6, como la DNA polimerasa (Gp20), RNA polimerasa (Gp8), DNA primasa (Gp10), exonucleasa (Gp21), endonucleasa (Gp22) y DNA ligasa (Gp25). Aparte de estos genes, también codifica una proteína que es muy parecida a la Gp5 del fago SP6 que posiblemente tenga funciones de antirestricción, facilitando la multiplicación del fago en cepas de Salmonella que presenten un sistema de restricción de tipo I (57). El módulo de lisis celular es también muy similar al del fago SP6, codificando una holina (Gp47) y una endolisina (Gp44). Por último, el grupo de genes de ensamblaje y morfogénesis es el más heterogéneo, ya que ciertas proteínas como la terminasa, la proteína portal, espículas,



fibras de la cola y proteínas internas del virión son parecidas a las del fago SP6, mientras que otras muestran mayor identidad con las del fago KE1 de *E. coli*. Del mismo modo que el bacteriófago SP6, el fago UAB\_Phi78 codifica la proteína Gp49. Dicha proteína, está estrechamente relacionada con la espícula de la cola del fago P22 (Gp9), la cual, tal como se ha dicho anteriormente, posee actividad endorranosidasa (52). Por lo tanto, tal como ha sido propuesto para el bacteriófago SP6 (58), es probable que el antígeno O del LPS sea el receptor del fago UAB\_Phi78. Por otro lado, el orf56 del fago UAB\_Phi78 codifica una proteína hipotética con una alta identidad (96%) a la proteína Gp47 del fago SP6. Esta proteína podría estar relacionada con la capacidad del fago SP6 de infectar cepas rugosas y lisas de *S. Typhimurium* LT2. Por ello, se ha sugerido que el fago SP6 reconoce un segundo receptor diferente del antígeno O del LPS (58). De igual modo, el bacteriófago UAB\_Phi78 es capaz de infectar mutantes rugosos GalE<sup>-</sup> de *S. Typhimurium* LT2, pero no mutantes más profundos de LPS (manuscrito en preparación), lo cual indica que debe tener un segundo receptor situado en el núcleo del LPS. Las principales diferencias genómicas entre estos dos fagos se encuentran al inicio de la secuencia y en la región situada entre los genes de la DNA primasa y la DNA polimerasa del cromosoma del fago UAB\_Phi78, zonas que contienen genes que codifican proteínas sin función definida en las bases de datos. Además, el fago UAB\_Phi78 comparte el 80% y el 69% de su proteoma con el de los fagos de *E. coli* K1-5 y K1E, respectivamente (57).

Por último, cabe destacar el importante papel que este género de fagos ha desempeñado a nivel biotecnológico, ya que las RNA polimerasas y sus promotores han sido usados extensamente, debido a su elevada especificidad y eficiencia, en sistemas de clonación (pGEM) y de expresión proteica (pET y pALTER), así como, en la producción de RNA para sondas, de RNA de interferencia y de mRNA para traducción in vitro (52).

### 1.3.3. Bacteriófagos del género tipo FelixO1

Los fagos incluidos en este género forman parte de la familia *Myoviridae*, siendo el miembro más conocido el fago FelixO1, el cual fue aislado por primera vez por Felix y Callow (59). A nivel morfológico presenta una cápside de unos 73 nm de diámetro y una cola contráctil de 113 x 17 nm unida a seis fibras (52). Con un genoma de 86,2 kb y un porcentaje de G+C del 39%, su secuencia génica posee 131 *orf*, contiene 22 genes de tRNA y se especula que sus extremos contienen repeticiones terminales cortas directas y exactas (60). La baja proporción de G+C le confiere resistencia a enzimas de restricción que reconocen secuencias ricas en guanina y citosina (60). Su receptor celular son los residuos terminales de N-acetilglucosamina del núcleo del LPS, con lo cual únicamente los mutantes rugosos más profundos serán resistentes a la infección de este fago (52). La comparación de su núcleo génico reveló que comparte genes homólogos a los del fago  $\phi$ Ea21-4 (69 genes) de *Erwinia amylovora* y del fago wV8 (121 genes) de *E. coli* (60). Una comparación más extensa demostró que el fago FelixO1 presenta una secuencia y organización genómica muy parecida a la del fago wV8 de *E. coli*, mientras que su similitud con la del fago  $\phi$ Ea21-4 sólo se mantuvo en las regiones que codifican los genes de morfogénesis, replicación y metabolismo del DNA. En base a estas similitudes se propuso la formación del género tipo FelixO1. El análisis del núcleo proteico del fago UAB\_Phi87 reveló que presenta un 90% de homología con los fagos FelixO1 y wV8, así como un 75% con el del fago SA1 de *Staphylococcus aureus*. Ello permitió clasificar al fago UAB\_Phi87 en el género tipo FelixO1 (53), siendo por tanto miembro de la familia *Myoviridae* y presentando una cápside de  $68 \pm 2,7$  nm y una cola larga y contráctil de  $114 \pm 4,3$  nm (54). El genoma del fago UAB\_Phi87 es una molécula de 87,6 kb con un porcentaje de G+C del 38,9%, valor que, como en el caso del FelixO1, es claramente inferior al de *Salmonella* (52,2%) (54). Su genoma contiene 149 *orf*, de los cuales sólo 28 pudieron ser asignados a posibles funciones y fueron clasificados en tres

grupos funcionales. El primer grupo incluye genes relacionados con el metabolismo de nucleótidos que permiten la replicación de su genoma y el control de la maquinaria del hospedador. Entre estos genes se encuentran los que codifican la DNA polimerasa, primasa/helicasa, DNA ligasa y otras proteínas involucradas en el metabolismo, mostrando todas ellas una alta similitud con las de los fagos FelixO1, wV8 y SA1 (54). El segundo conjunto contiene los genes involucrados en la lisis celular, identificándose el que codifica la endolisina del fago pero, al igual que en el caso de FelixO1 (60), no fue posible encontrar un gen adyacente que codificara una holina (54). El tercer grupo, incluye todos los genes que codifican proteínas estructurales y de ensamblaje, todas ellas con una elevada similitud a las de los fagos FelixO1, wV8 y SA1. No obstante, igual que en el caso del FelixO1, sólo fue posible identificar la subunidad mayor de la terminasa con una similitud del 100% con la del FelixO1 (54). Igualmente, en el caso del fago FelixO1, esta enzima también guarda similitud con las de los fagos  $\phi$ Ea21-4, vW8, rV5 y algunos bacteriófagos del dominio *Archaea* (60). Asimismo, el genoma de UAB\_Phi87 contiene los genes *rIIA* y *rIIB* que están ampliamente distribuidos entre los fagos que forman parte de este grupo. Al mismo tiempo, también se identificó una *homing* endonucleasa en su genoma (manuscrito en preparación). Otros fagos tipo FelixO1 codifican varias endonucleasas de este tipo; por ejemplo, el propio FelixO1 contiene 6, mientras que el fago T4 llega a codificar 15. Al parecer, dichas enzimas podrían dar ventaja al fago durante infecciones mixtas, ya que son capaces de reconocer y cortar el DNA de un fago heterólogo (61).

#### 1.4. Terapia fágica

El concepto de la utilización terapéutica de los bacteriófagos para el tratamiento de las infecciones bacterianas empieza tras su descubrimiento por parte de F. d'Hérelle, quien en 1926 ya promovió la aplicación de estos virus como tratamiento antibacteriano, debido a su

capacidad para lisar el hospedador, su amplia distribución y su elevada especificidad (27). La aplicación de los fagos se propuso desde sus inicios como una terapia para el tratamiento de infecciones agudas y crónicas, generando un gran fervor en la era preantibiótica, con éxitos en campos como la dermatología, oftalmología, urología, estomatología, pediatría, otorrinolaringología y cirugía (62–64). Sin embargo, los primeros estudios de terapia fágica fueron ampliamente criticados por la falta de controles adecuados y resultados inconsistentes. La falta de reproducibilidad, combinada con muchos resultados contradictorios obtenidos en diferentes estudios publicados, llevó al Consejo de Farmacia y Química de la Asociación Médica de EE.UU. a la conclusión de que las evidencias del valor terapéutico de filtrados de fagos líticos eran en su mayor parte poco convincentes y, por ello, recomendó investigaciones adicionales para confirmar sus supuestos beneficios (65). Además, la introducción de las sulfamidas en 1930 y de la penicilina en la década de 1940 inició la era de los antibióticos, lo cual desplazó casi totalmente los estudios basados en terapia fágica en los países occidentales. No obstante, la terapia fágica permaneció como una área en desarrollo en países como la antigua Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas (URSS), Europa del Este y en menor medida en la India (65). No obstante, en las últimas 2-3 décadas, la emergencia y amplia distribución de bacterias resistentes a los antibióticos ha supuesto un importante desafío a nivel terapéutico, sobre todo debido a las limitadas opciones para tratar a las bacterias multirresistentes conocidas con el acrónimo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.*). Por ejemplo, en 2005 las infecciones causadas por MRSA (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) en EE.UU. se elevaron a 100.000 y causaron 20.000 muertes (65). Todo ello llevó a la comunidad científica a reflexionar sobre esta propuesta casi centenaria y a considerar de nuevo a los bacteriófagos como una opción viable para el tratamiento de enfermedades bacterianas infecciosas.

La aplicación de la terapia fágica en la actual coyuntura presenta numerosas ventajas. El mecanismo de acción de los bacteriófagos es completamente distinto al de los antibióticos, por ello son igualmente efectivos contra bacterias sensibles y resistentes a dichos antimicrobianos. Su alta especificidad limita su efecto a una única especie bacteriana e incluso a nivel de una determinada cepa. Esta especificidad evita los daños colaterales sobre la microbiota del paciente (66, 67), difiriendo completamente en este aspecto de los antibióticos y eludiendo la posible proliferación de patógenos secundarios. Además, los bacteriófagos no causan efectos secundarios durante su administración, probablemente debido a su incapacidad para interactuar con células de mamíferos, habiendo sido demostrada su tolerancia en varios modelos animales y también en pacientes y en voluntarios sanos (67). Al parecer, tras la administración por vía sistémica, los fagos se distribuyen ampliamente por el organismo llegando incluso a cruzar la barrera hematoencefálica, por lo que pueden ser válidos para el tratamiento de infecciones sistémicas y del sistema nervioso central (65). Además, diversos trabajos han demostrado que los fagos son capaces de infectar a las bacterias que conforman una biopelícula y que aquellos fagos que inducen la producción de despolimerasas tienen una clara ventaja, ya que pueden penetrar hasta sus zonas internas al degradar componentes de su matriz exopolimérica (68). Ello puede ser interesante para el tratamiento de infecciones crónicas y para la desinfección de material médico-quirúrgico, así como de superficies.

A nivel de costes, se ha postulado que la terapia fágica puede ser más económica que la antibiótica, si bien el tratamiento con fagos es de mayor duración (69). Ello, junto con su menor coste de producción, en comparación con el de los antibióticos, y su fácil aislamiento, hace que la terapia fágica sea también económicamente prometedora.

Otro aspecto destacable es su inocuidad a nivel ambiental. Ello es debido a dos factores: i) su composición basada en ácidos nucleicos y proteínas y ii) su rango de hospedador limitado,

sobre todo si se compara con el de los antibióticos. Dadas estas características, sus residuos no tendrían impacto ambiental y los fagos que se liberen al medio sólo afectarían a unas pocas especies bacterianas. Asimismo, los fagos que no estén adaptados al efecto deletéreo de diferentes factores ambientales, como la desecación o las temperaturas extremas, serán rápidamente inactivados. Además, puesto que los fagos no guardan relación con la emergencia de resistencia a antibióticos, su uso permitiría recuperar a medio plazo la acción terapéutica de antibióticos que actualmente casi no son utilizados, debido a que la mayoría de bacterias patógenas son resistentes a ellos. Además, se conseguiría un menor impacto de los residuos de antibióticos en el medio.

A pesar de todas las ventajas mencionadas anteriormente hay ciertos inconvenientes y limitaciones que deben ser considerados. Una de las principales desventajas de los bacteriófagos es la necesidad de determinar la etiología exacta del microorganismo causante de la infección, ya que su alta especificidad no les permite ser efectivos contra un amplio espectro de patógenos. Ello conlleva un consumo de tiempo que puede ser de vital importancia para el paciente, a la vez que también se producen costes derivados del diagnóstico. Sin embargo, esta situación puede solucionarse con las actuales innovaciones en el diagnóstico rápido de enfermedades (65). Ello también indica que el rango de hospedadores de los bacteriófagos seleccionados es un factor muy importante, siendo mejores candidatos aquellos que muestren una amplia actividad; es decir que infecten a un gran número de cepas de la misma especie bacteriana. Además, la formulación de los fagos en forma de cóctel también puede ayudar a incrementar su espectro de actividad y puede reducir el tiempo de espera antes de la aplicación del tratamiento.

Por otro lado, el uso de fagos en las infecciones agudas está limitado a los fagos virulentos, ya que los atemperados sólo provocarían una lisis parcial de las poblaciones de patógenos y

además, como se ha comentado anteriormente, pueden promover el intercambio genético mediante transducción especializada. Por otra parte, se ha demostrado que algunos fagos virulentos pueden promover, en determinadas condiciones experimentales, transducción generalizada, con lo que podrían transferir determinantes de patogenicidad y factores de virulencia e incluso resistencias a los antibióticos. Este fenómeno se debe a la imprecisión de los cortes realizados por las terminasas fágicas al empezar el empaquetamiento del DNA, pudiendo cortar y empaquetar el cromosoma bacteriano en lugar del genoma del bacteriófago (40). Esta situación es mucho más frecuente en fagos que empaquetan con el sistema de llenado de cabeza, ya que sus terminasas cometen errores de reconocimiento de la secuencia *pac* con mayor frecuencia (40). Por ello, es recomendable evitar el uso de bacteriófagos con esta estrategia de empaquetamiento o bien probar previamente que no muestran capacidad de transducción generalizada.

Otro aspecto importante a considerar son los posibles alérgenos, factores de virulencia o determinantes de patogenicidad que los fagos puedan codificar. Actualmente, muchas de las proteínas hipotéticas que codifican no presentan similitud con otras previamente descritas y, por ello, no es posible determinar *a priori* si tienen capacidad para provocar efectos secundarios indeseados.

Si bien, los fagos líticos podrían cumplir con el objetivo de lisar el agente causal de una infección aguda, su acción puede conllevar efectos indeseados en el caso de tratamientos contra bacterias Gram negativas, pues al lisarlas se libera lípido A, una endotoxina que forma parte del LPS de su pared, la cual causa una respuesta inflamatoria grave que puede acabar con un fallo multiorgánico. Este inconveniente obliga a conseguir lisados para terapia fágica purificados y libres de esta endotoxina para la terapia fágica contra estas bacterias.

Además, es importante considerar la respuesta del sistema inmune del enfermo frente a los fagos porque pueden ser reconocidos como un invasor y, por lo tanto, ser eliminados de la circulación sistémica para acabar acumulados en el bazo o el hígado, o bien ser inactivados por la respuesta inmunitaria adaptativa (70). Este último supuesto podría generar una disminución de la eficacia de la terapia fágica en sucesivos tratamientos.

Un último aspecto importante a tener en cuenta es la capacidad de adaptación de las bacterias, las cuales pueden desarrollar resistencia a los bacteriófagos que están siendo utilizados en el tratamiento. De hecho, hasta la actualidad se conocen cinco mecanismos de resistencia a fagos específicos. El más sencillo de ellos es la pérdida, modificación estructural o enmascaramiento del receptor para impedir la adsorción del bacteriófago. Los demás sistemas de resistencia incluyen: i) prevención de la inyección del DNA por sistemas de exclusión de la superinfección (Sie); ii) degradación del DNA del fago por acción de los sistemas de restricción-modificación bacteriana (RM); iii) sistema de defensa conocido como *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, junto con las proteínas Cas (CRISPR-Cas) y iv) bloqueo de la replicación, transcripción, traducción o ensamblaje de los viriones por acción del sistema de infección abortiva (Abi) (65). Aun así, la frecuencia de aislados de bacterias resistentes a fagos en estudios de terapia fágica *in vivo* es muy baja (71–73). Además, es posible aislar fagos tras pases infectivos sucesivos para seleccionar aquellos adaptados a infectar a las cepas bacterianas resistentes o bien seleccionar nuevos fagos capaces de infectarlas (65), superando de este modo el problema de las resistencias. Asimismo, otra posibilidad es la aplicación de distintos fagos combinados en cóctel, de modo que, en conjunto, presenten un efecto sinérgico que incremente su capacidad lítica contra el patógeno diana y dificulte la aparición de bacterias resistentes a los fagos.



En ese sentido, los fagos virulentos UAB\_Phi20, UAB\_Phi78 y UAB\_Phi87 de *Salmonella* cumplen con la mayoría de requisitos para ser empleados en terapia fágica. Los tres fagos mostraron un amplio rango de hospedador frente a una colección de cepas no relacionadas clonalmente de las serovariedades Enteritidis y Typhimurium de *Salmonella enterica* y su efecto lítico individual mejoró cuando se aplicaron en forma de cóctel (74, 75). Además, este cóctel también es capaz de lisar cultivos de las serovariedades Hadar, Infantis y Virchow de *Salmonella enterica* (54). Esta alta capacidad lítica fue ratificada *in vivo* con un importante efecto reductor de la concentración de *S. Typhimurium* ATCC14028 en un modelo de *Gallus gallus* libre de patógenos específicos (en inglés, *specific pathogen free*, SPF) (74). Además, sus genomas no presentaron ningún gen que, *a priori*, pueda relacionarse con factores de virulencia o potenciales alérgenos (54, 57).

#### 1.4.1. Aplicación de fagos para el control de patógenos en producción animal

Como se ha comentado anteriormente, la EFSA está realizando grandes esfuerzos para reducir la presencia de *Salmonella* en las explotaciones avícolas, sobre todo en los niveles más altos de la pirámide de producción aviar, ya que el riesgo de diseminación de *Salmonella* hacia niveles inferiores se ve favorecido por la estructura productiva de este sector. No obstante, ello no implica que no se preste atención a los niveles inferiores de dicha pirámide, en las cuales se obtienen los productos que van directamente al consumidor. Es cierto que las medidas tomadas a nivel de la UE han logrado una reducción o un estancamiento de la prevalencia de *Salmonella* en las explotaciones de *Gallus gallus*. Sin embargo, está claro que sin nuevas medidas adicionales será difícil reducir aún más los niveles de este patógeno zoonótico hasta conseguir su erradicación.

En esta línea muchos estudios indican que la terapia fágica podría ser una herramienta útil en el control de patógenos a nivel de producción animal. En aves de producción, los bacteriófagos han demostrado ser útiles contra una gran variedad de patógenos como *Escherichia coli* (76, 77), *Campylobacter* (78, 79) e incluso *Clostridium* (80). En el caso de *Salmonella* existen diferentes estudios que prueban la efectividad de los fagos, entre los que destacan los siguientes:

1. Andreatti Filho y colaboradores (81) aplicaron cócteles de fagos aislados de explotaciones aviares de engorde (CB4Ø) o de aguas residuales procedentes de depuradoras municipales (WT45Ø) para tratar pollos infectados experimentalmente con *S. Enteritidis*. Para realizar este estudio, los pollos de un día fueron infectados oralmente con *S. Enteritidis* a una concentración de  $9 \times 10^3$  cfu/animal y tratados 1 h más tarde con los cócteles CB4Ø, WT45Ø o una combinación de ambos, a una concentración de  $1 \times 10^8$  pfu/animal. Todos los tratamientos redujeron significativamente la concentración de *S. Enteritidis* en las amígdalas cecales a las 24 h del tratamiento, pero dicho efecto se abolió a las 48 h.
2. Toro y colaboradores (82) combinaron un cóctel de tres bacteriófagos de *Salmonella* con el método de la exclusión competitiva para reducir la concentración de *S. Typhimurium* en pollos experimentalmente infectados con esta bacteria. En uno de los experimentos, los pollos de 16 días fueron infectados oralmente el día 7 con *S. Typhimurium* a una concentración de  $3,9 \times 10^5$  cfu/animal. Asimismo, los animales fueron tratados los días 4, 5, 6, 18, 19 y 20 con el cóctel fágico a una concentración de  $5,4 \times 10^6$  pfu/animal. En el caso de recibir microbiota para la exclusión competitiva, esta fue inoculada el primer día de vida de los animales. Los resultados demostraron que a los 11 días los animales tratados con el cóctel fágico y también los tratados con la combinación de fagos y exclusión competitiva presentaban niveles de *Salmonella* significativamente inferiores a los del grupo control. No

obstante, en el día 21 posinfección el cóctel fágico no tuvo efecto y sólo se detectaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado con la combinación de fagos y exclusión competitiva.

3. Los trabajos de Atterbury y colaboradores (71) se realizaron con los fagos  $\phi 151$ ,  $\phi 25$  y  $\phi 10$  de *Salmonella* aislados de heces y efluentes procedentes de 26 granjas, plantas de procesamiento de aves y plantas de tratamiento de aguas residuales. La experimentación animal se realizó con animales de 36 días, los cuales fueron inmediatamente distribuidos en diferentes grupos para ser infectados, por separado, con las serovariedades Enteritidis, Hadar y Typhimurium de *Salmonella enterica* a una dosis de  $1 \times 10^8$  cfu/animal. Dos días más tarde, los animales recibieron una dosis, por vía oral, de los fagos  $\phi 151$  (*S. Enteritidis*),  $\phi 25$  (*S. Hadar*) y  $\phi 10$  (*S. Typhimurium*) a una concentración de  $1 \times 10^9$  o  $1 \times 10^{11}$  pfu/animal. Estos experimentos *in vivo* mostraron que una dosis de fago de  $1 \times 10^9$  pfu/animal no tenía ningún efecto sobre la concentración de las distintas serovariedades de *Salmonella* en el ciego de los pollos. En cambio, a las 24 h de haber recibido el tratamiento de  $1 \times 10^{11}$  pfu/animal, se observaron reducciones significativas en los recuentos de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* en los animales tratados con los fagos  $\phi 151$  y  $\phi 10$ , respectivamente. Sin embargo, no hubo efecto alguno del tratamiento fágico frente a *S. Hadar*.
4. En el trabajo de Borie y colaboradores (83) se aislaron tres fagos líticos BP1, BP2 y BP3 de *Salmonella* desde aguas residuales de granjas de aves comerciales. Para la experimentación animal, los pollos fueron tratados el día 9 con el cóctel fágico a  $1 \times 10^8$  pfu/ml mediante pulverización o a través del agua de bebida y, posteriormente, se infectaron al día siguiente con *S. Enteritidis* a una concentración de  $9,6 \times 10^5$  cfu/ml. Los resultados del estudio demostraron que ambos sistemas de tratamiento fágico fueron efectivos, al observarse una

significativa reducción de la concentración de *Salmonella* en el intestino de los animales a las 24 h de la administración de los fagos.

5. En estudios previos realizados por nuestro grupo, Bardina y colaboradores (74, 75) aislaron un total de 55 fagos de *Salmonella* desde hisopos cloacales de pollo y cerdo procedentes de granjas de diferentes zonas geográficas de España. De esta colección fágica, se seleccionaron los fagos UAB\_Phi20, UAB\_Phi78 y UAB\_Phi87 en atención a su amplio rango de hospedadores y sus a patrones de restricción con EcoRI, EcoRV y HindIII (84) y se realizaron estudios de eficacia *in vivo* en un modelo de *Gallus gallus* SPF. En dicho estudio, se administró oralmente a animales de 6 días infectados con *S. Typhimurium* a una concentración de  $1 \times 10^5$  cfu/animal, una dosis de  $1 \times 10^{10}$  pfu/animal del cóctel fágico (1:1:1), siguiendo una pauta de dos inoculaciones por día durante 4 días y, posteriormente, una dosis diaria a los días 6, 8, 10, 13 y 15. Los resultados mostraron que, a diferencia de lo obtenido por otros estudios, dicha pauta de administración permitía prolongar en el tiempo el efecto de la terapia fágica, ya que la reducción de la concentración de *Salmonella* fue significativa hasta el día 17 en el que finalizó el experimento.

La pauta de administración y la concentración de fagos difieren entre los distintos trabajos comentados, lo cual dificulta la comparación de los resultados y complica el establecimiento de una dosis y pauta de tratamiento efectiva. Sin embargo, todos estos trabajos coinciden en el uso de suspensiones fágicas de título elevado, en mantener una multiplicidad de infección alta y en la administración del tratamiento antes de la completa colonización del tracto gastrointestinal por el patógeno. Todo ello sugiere que la administración oral de la terapia fágica para el control de bacterias entéricas presenta algunas dificultades a las cuales debe darse solución. Entre ellas, podría pensarse que los bacteriófagos tienen problemas para llegar al intestino a elevadas concentraciones y que su retención en el tracto gastrointestinal es baja,

por lo cual es necesario administrar una elevada concentración fágica y un tratamiento continuo (71, 74).

#### 1.4.2. Productos comerciales basados en bacteriófagos

En la actualidad existen en el mercado diversos productos basados en fagos para el control de patógenos, centrados principalmente en seguridad alimentaria, aunque algunos de ellos tienen aplicación veterinaria y humana y se encuentran en distintas fases clínicas de estudio (Tabla 7).

**Tabla 7.** Productos comerciales basados en bacteriófagos destinados al control de patógenos.

Empresa	Nombre del producto	Microorganismo Diana	Aplicación	
Intralytix	ListShield	<i>Listeria monocytogenes</i>	Alimentos e instalaciones de procesamiento de alimentos	
	EcoShield	<i>Escherichia coli</i> O157:H7		
	Salmofresh	<i>Salmonella enterica</i>		
	ShigActive	<i>Shigella spp.</i>	Probiótico	
	INT-401	<i>Clostridium perfringens</i>	Pollos de engorde	
Omnilytics Inc.	AgriPhage	<i>Xanthomonas campestris</i> <i>Pseudomonas syringae</i>	Cultivo de hortalizas	
Microeos	Listex	<i>Listeria monocytogenes</i>	Alimentos e instalaciones de procesamiento de alimentos	
	Salmonex	<i>Salmonella enterica</i>		
CJ CheilJedang Corporation	Biotector	<i>Salmonella gallinarum</i> y <i>Salmonella pullorum</i>	Aditivo en el pienso de aves	
AmpliPhi Biosciences Corporation	Ampliphage-001 (Fase preclínica)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tratamiento de infecciones en paciente con fibrosis quística	
	Ampliphage-002 (Fase preclínica)	<i>Staphylococcus aureus</i>	Tratamiento de heridas e infecciones de la piel	
	Ampliphage-004 (Fase preclínica)	<i>Clostridium difficile</i>	Tratamiento de infecciones intestinales	
Novolytics	NOVO12	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Tratamiento tópico de infecciones causadas por MRSA	
JSC Biochimpharm	Phagesit	<i>Shigella spp., Salmonella spp., Escherichia coli, Proteus spp., Staphylococcus spp., Pseudomonas spp., Enterococcus spp.</i>	Tratamiento o profilaxis de enfermedades del tracto gastrointestinal	
		<i>Streptococcus spp., Staphylococcus spp., Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Proteus spp.</i>		
	Phagyo	<i>Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Proteus spp.</i>	Tratamiento de infecciones purulentas	
	Phagedys	<i>Shigella spp.</i>	Tratamiento de disentería	
	Phagetyph	<i>Salmonella enterica</i>	Tratamiento de fiebre entérica	
	Phagestaph	<i>Staphylococcus aureus</i>	Tratamiento de infecciones purulentas	
	Phagesal	<i>Salmonella spp.</i>	Tratamiento salmonelosis de los grupos A,B, C, D, E	
	Phagepy	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tratamiento de infecciones purulentas	
	Gangagen Biotechnologies	StaphTAME (Fase clínica 1)	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Eliminación de la colonización nasal

(Adaptado de la referencia 81)

La forma de aplicación que se considera más apropiada para la administración de bacteriófagos contra patógenos entéricos en animales de producción es a través del pienso o del agua de bebida, pero, por ahora, sólo existe un producto comercial basado en bacteriófagos que se administra a pollos de engorde mediante el pienso. El producto en cuestión se denomina *Biotector*, lo comercializa *CJ CheilJedang Corporation* y ha sido diseñado para la prevención de las infecciones causadas por *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* en estos animales ([www.cjbio.net](http://www.cjbio.net)) (Tabla 7).

Además de las empresas mencionadas en la Tabla 7, existen otras que están todavía en fase de desarrollo de productos de este tipo. Algunos ejemplos son: i) Targanta Therapeutics, originalmente fundada en 1997 como PhageTech (Massachusetts, EE.UU.); ii) Blaze Veanture Technologies (Herfordshire, Reino Unido), empresa que está desarrollando productos de desinfección para material hospitalario basados en bacteriófagos activos contra MRSA; iii) New Horizons Diagnostics (Maryland, EE.UU.), al parecer con especial interés en desarrollar enzibióticos a partir de las enzimas líticas de los bacteriófagos; iv) Phage International (California EE.UU.), fundada en 2004 para explotar los productos de terapia fágica producidos en Georgia; v) Viridax (Florida EE.UU.), centrada en incrementar la especificidad de las formulaciones de fagos con la finalidad de direccionar y concentrar sus efectos en los tejidos o células diana e vi) Innophage (Porto, Portugal), *spin-off* del Instituto de Biotecnología de la Universidad Católica de Porto que trabaja en la producción de bacteriófagos para el control de infecciones bacterianas (85).

Por otro lado, hay tres instituciones de relevante interés que se centran en la investigación y la aplicación de bacteriófagos para el tratamiento de pacientes: *Phage therapy Center* (Tbilisi, Georgia), *NOVOMED Integrative Medicine Center* (Tbilisi, Georgia) y *Phage Therapy Unit* del *Medical Center of the Institute of Immunology and Experimental Therapy PAS* (Wroclaw, Poland).

Esta expansión en la investigación y desarrollo de productos basados en fagos, ha llevado a la concepción de que, con el tiempo, estos productos podrían llegar a remplazar a los antibióticos. No obstante, la terapia fágica no debe entenderse como una estrategia alternativa a las ya existentes, sino como una estrategia complementaria para el control de patógenos (86) que, en algunos casos, puede convertirse en el tipo de terapia predominante.

### 1.5. Aplicación de la encapsulación en terapia fágica

La protección y liberación controlada de compuestos bioactivos en el momento y lugar adecuado es un concepto muy interesante que últimamente se ha enfocado a través de la nano y microencapsulación, siendo ambas tecnologías muy prometedoras, ya que presentan capacidad para atrapar compuestos bioactivos. Actualmente, existen diversas estrategias para la encapsulación, algunas de las cuales podrían ser apropiadas para la encapsulación de bacteriófagos:

1. Las emulsificaciones son dispersiones coloidales que comprenden dos líquidos inmiscibles, uno de los cuales se dispersa en el otro, generando gotas de tamaños entre 50 y 1.000 nm (87). Por lo tanto, esta técnica ofrece un gran potencial para la encapsulación de sustancias solubles en aceite.
2. La técnica de coacervación es un método físico-químico que se basa en la separación de fases en un proceso de tres pasos. El primero de ellos consiste en la formación de tres fases químicamente inmiscibles (una fase líquida, una sustancia a encapsular y un material de cobertura). El siguiente paso es la deposición del material polimérico líquido que formará la cubierta alrededor del compuesto a encapsular. La última etapa consiste en dejar secar la cubierta de la cápsula. Dicha técnica permite la formación de cápsulas de entre 100 y 600 nm (88), aunque para su formación hace falta emplear surfactantes o glutaraldehído.

3. La técnica de inclusión molecular se basa en una asociación supramolecular de un ligando (elemento a encapsular) en un material de cubierta a través de enlaces de hidrogeno, fuerzas de Van der Waals o una entropía impulsada por un efecto hidrofóbico (88). Con este tipo de encapsulación se pueden llegar a obtener cápsulas nanométricas, aunque conseguir entidades moleculares con cavidades adecuadas para la encapsulación es complicado.
4. Otra técnica de encapsulación es la precipitación, que de hecho es una emulsión espontánea con dos fases: i) una interna, la cual contiene el polímero y la sustancia a encapsular, disuelta en un solvente orgánico y ii) una fase continua formada por agua y un agente emulsionante. Para completar el proceso, la fase interna se deposita por goteo en la fase continua, hecho que provoca la difusión del solvente orgánico en el agua de la fase continua, con lo cual se consigue la precipitación del polímero y la formación de la cápsula. Con este sistema se pueden producir cápsulas de 27 nm (88).
5. La evaporación de disolvente-emulsión es una técnica parecida a la anterior, en la cual se emulsiona un polímero (disuelto en un solvente orgánico) en una fase acuosa para, posteriormente, evaporar el solvente orgánico y provocar la precipitación del polímero en forma de nanoesferas (88). El tamaño de las cápsulas puede ser modulado, modificando la velocidad de agitación, el tipo y la cantidad del agente dispersante, la viscosidad de la fase orgánica y acuosa y, por último, la temperatura (88).
6. La denominada encapsulación con fluidos supercríticos emplea fluidos que exhiben propiedades intermedias entre líquidos y gases, estado que se consigue cuando un compuesto está por encima de su punto termodinámico crítico. Esta técnica se basa en la disolución del compuesto bioactivo y el polímero en un fluido supercrítico. Posteriormente, se pulveriza la mezcla a través de una boquilla, hecho que provoca la evaporación del fluido



supercrítico y la precipitación de las cápsulas (88). Los fluidos supercríticos suelen ser empleados para la encapsulación de compuestos térmicamente sensibles mediante un proceso similar a la pulverización por secado (88).

7. El secado por atomización se basa en la transformación de un fluido en material sólido, atomizándolo en forma de gotas minúsculas en un medio de secado en caliente. La distribución del tamaño de las partículas obtenidas por este método puede llegar a ser de 80 nm (88). El proceso consta de dos fases. La primera es la preparación del material a encapsular en una solución de encapsulación y, la segunda, es la atomización y deshidratación de las partículas atomizadas (89).
8. En la gelificación ionotrópica, la formación de la cubierta de las cápsulas tiene lugar por una reacción de gelificación iónica entre un polisacárido y un ion de carga opuesta, situación que permite la polimerización del polisacárido, formándose un gel sólido. Para poder dar lugar a la reacción, la solución que contenga el polisacárido y la sustancia a encapsular, deberá ponerse en contacto con una solución de gelificación que suele estar formada por cationes bivalentes. Dicha técnica permite la obtención de un diámetro mínimo de capsulas de hasta 50  $\mu\text{m}$  (88).
9. Para la inclusión en liposomas se utilizan moléculas anfipáticas que poseen sitios hidrofóbicos, generalmente fosfolípidos. Cuando el material a encapsular es hidrofílico, se adiciona a la fase acuosa, mientras que los lipofílicos se agregan al solvente orgánico empleado para disolver los fosfolípidos (89).

De todas las técnicas descritas, las de gelificación ionotrópica e inclusión en liposomas son las más sencillas y adecuadas para la encapsulación de bacteriófagos, ya que no se requiere el uso de compuestos surfactantes ni disolventes orgánicos y, además, permiten el uso de materiales biocompatibles para la formación de las cápsulas.

Algunos materiales pueden ser más adecuados que otros para la encapsulación de los bacteriófagos. Así, por ejemplo, los lípidos pueden ser idóneos, ya que son biocompatibles y presentan las siguientes características: i) son una barrera de protones (90), lo cual debería proteger a los bacteriófagos del bajo pH gástrico; ii) son promotores de la mucoadhesividad (91), la cual se debe a la carga positiva de su superficie, y puede potencialmente prolongar el período de residencia de los bacteriófagos en el tracto intestinal; iii) las cápsulas de lípidos podrían degradarse por acción de las sales biliares, lo que permitiría la liberación de los bacteriófagos encapsulados en el lugar deseado (81); iv) es posible obtener cápsulas de tamaño nanométrico, lo cual facilitaría la administración de los bacteriófagos a través del agua de bebida o mezclados con el alimento y v) podrían difundir a través de la mucosa intestinal, facilitando su interacción y posible absorción por parte del epitelio intestinal y las células M de las placas de Peyer (92), lo cual, a su vez, aumentaría su efectividad a nivel sistémico.

Para la encapsulación en lípidos se emplea la metodología de la inclusión, ya que el uso de reacciones hidrofóbicas permite obtener vesículas multilamelares, unilamelares o liposomas. Normalmente, estos sistemas se utilizan para encapsular moléculas pequeñas, característica que no comparten los bacteriófagos, ya que estos son entidades complejas compuestas de cientos de proteínas y ácido nucleico. Por ello, la encapsulación en vesículas lipídicas debe realizarse en sistemas que permitan la obtención de vesículas multilamelares o unilamelares grandes de alrededor de 1  $\mu\text{m}$  (en inglés *large multilaminar vesicles*, LMV), para incrementar la eficiencia de encapsulación. Si es necesario, posteriormente se puede ajustar el tamaño de las LMV mediante extrusión, ya que las vesículas de dimensiones nanométricas presentan mayor estabilidad. Para la formación de vesículas, una mezcla de lípidos disuelta en algún solvente orgánico se deshidrata sobre una superficie de vidrio, formando una fina capa lipídica. A continuación, se hidrata con agua, sacarosa, u otra solución no electrolítica y se agita

suavemente, lo cual provoca que las láminas de lípido empiecen a separarse de la superficie y que finalmente acaben desprendiéndose formando LMV. Esta técnica se conoce como hidratación de la película lipídica, si bien existen modificaciones de la misma como la electroformación (93) o la hidratación gel-asistida (94).

Aparte de los lípidos, también debe considerarse al alginato como un material biocompatible adecuado para la encapsulación de bacteriófagos, ya que se han obtenido buenos resultados de encapsulación con el fago FelixO1. Además la elevada viscosidad que se obtiene con este polímero le confiere propiedades mucoadhesivas (95). Asimismo, pueden conseguirse cápsulas de alginato que contengan antiácidos y pueden funcionalizarse con otros materiales para mejorar sus propiedades mucoadhesivas y también para modificar la cinética de liberación de bacteriófagos. El alginato es un polímero que permite la encapsulación mediante la técnica de gelificación ionotrópica. El gel de alginato se forma gradualmente a través de la reacción entre el calcio y los residuos de ácido glucurónico de las cadenas del alginato, formándose una estructura que se conoce como *eggbox* y que es apropiada para atrapar moléculas de más de 10.000 daltons, ya que las moléculas de masa inferior difundirían a través de la pared de la cápsula. Las actuales estrategias de encapsulación mediante gelificación ionotrópica son el goteo, la pulverización y la atomización por secado, cada una de las cuales da lugar a cápsulas de distinto tamaño. A pesar de ello, todas se basan en el uso de dos soluciones. La primera es la solución de encapsulación que contiene el alginato y el material a encapsular, mientras que la segunda es la solución de gelificación, la cual está formada por cloruro de calcio y permite la polimerización del alginato (96).

Son pocos los trabajos publicados hasta el momento en los que se utilice alguno de los materiales comentados anteriormente para la encapsulación de los bacteriófagos. La mayoría de los trabajos utiliza la encapsulación de fagos en alginato, con la finalidad de aumentar su

estabilidad en ambientes ácidos y su liberación en el intestino. A este respecto, cabe citar los siguientes estudios i) encapsulación del fago FelixO1 en alginato-quitosano, obteniéndose cápsulas de un diámetro de 780  $\mu\text{m}$  (97); ii) encapsulación de los fagos CA933P y 933 de *E. coli* O157:H7 en alginato-pectina, generándose cápsulas de 1 mm de diámetro (98); iii) obtención de cápsulas de  $\text{CaCO}_3$  con el fago K de *S. aureus* de 900  $\mu\text{m}$  de diámetro (99) y iv) utilización de alginato-proteínas del suero para obtener cápsulas del fago T4 de 0,5 a 3  $\mu\text{m}$  de diámetro. No obstante, se han publicado otros trabajos con los mismos objetivos pero empleando metacrilato para la encapsulación de los fagos rV5, wV7, wV8 y wV11 de *E. coli* O157:H7 (100). Aparte de los trabajos mencionados, se han publicado dos estudios más con finalidades distintas. El primero se basa en la encapsulación de fagos específicos de *S. aureus* y *P. aeruginosa* en matrices de ácido poli(láctico-co-glicólico) para la producción de microesferas adecuadas para la inhalación (101); mientras que en el segundo, el fago modelo  $\lambda\text{eyfp}$  de *E. coli* y el fago TM4 de *Mycobacterium* se encapsularon en liposomas para desarrollar un sistema de terapia fágica frente a patógenos intracelulares (102). Cabe destacar que, si bien todos los trabajos mencionados prueban que pueden utilizarse diferentes metodologías para la encapsulación de bacteriófagos, ninguno de ellos demuestra la mayor eficacia de la terapia de fagos encapsulados *in vivo*. Únicamente, en un trabajo publicado en 2011 se muestra que el tratamiento oral con microcápsulas de alginato que contienen fagos es una medida efectiva para la reducción de la colonización y deposición de *Salmonella* en cerdos (103).

Como conclusión, la encapsulación es una estrategia prometedora para mejorar el uso de la terapia fágica oral contra patógenos bacterianos entéricos, si bien existe todavía un gran desconocimiento sobre sus bondades en modelos de experimentación animal.

# OBJECTIVES



## 2. Objectives

Non-typhoidal *Salmonella* is a zoonotic pathogen that commonly affects human and animal health and causes important economic losses worldwide. *Salmonella* infection of poultry may be asymptomatic, allowing the bacterium to readily disseminate within the flock (104). The probability of contamination during the transport, slaughter, and processing of poultry products is therefore high and in turn increases the likelihood of human disease, due to the consumption of contaminated food (105).

After the use of antibiotics as growth promoters in animal production was banned (106), several measures to control *Salmonella* infection in broilers were adopted (107, 108), but their effectiveness has been limited. Consequently, oral phage therapy has gained increasing interest as a means to reduce *Salmonella* populations in poultry. Several studies in poultry have shown that phages effectively reduce gut colonization by *Salmonella enterica* (71, 74, 81–83). In the study conducted by our group, colonization by *Salmonella* was successfully reduced in *Gallus gallus* SPF administered cocktail composed of three phages, UAB\_Phi20, UAB\_Phi78, and UAB\_Phi87 (74). However, oral phage therapy has several drawbacks. These are related to the natural barriers of the host, which hinder phage access to the final target and reduce its activity. In addition, the development of a safe and effective phage therapy also requires a detailed understanding of the relevant biological characteristics of the bacteriophages. This was the aim of the work described in this dissertation. The specific objectives are the following:

1. To expand current knowledge of the molecular biology of the bacteriophages UAB\_Phi20, UAB\_Phi78, and UAB\_Phi87 in order to gain insights into their replication kinetics and packaging strategy during their infective cycle. This will in turn allow confirmation of their suitability and safety as therapeutic agents.

2. To develop nano- and microencapsulation methodologies that improve bacteriophage effectiveness in oral phage therapy.



# MATERIALS AND METHODS



### 3. Material and methods

#### 3.1. Microbiological techniques

##### 3.1.1. Bacterial strains and growth conditions

*Salmonella* Typhimurium LB5000 (SGSC181; University of Calgary) was used for the propagation of phages UAB\_Phi20, UAB\_Phi78, and UAB\_Phi87. A spontaneous rifampicin resistant mutant (Rif<sup>R</sup>) of *S. Typhimurium* ATCC14028 (Universitat Autònoma de Barcelona) was used for the colonization of the animals. All bacterial strains were grown in Luria-Bertani (LB) broth or on LB agar plates for 18 h at 37°C. Viable counts of *S. Typhimurium* ATCC14028 Rif<sup>R</sup> were determined by plating the adequate dilutions on xylose lysine deoxycholate plates (XLD; Laboratorios Conda, Spain) supplemented with rifampicin (75 µg/ml), followed by incubation at 37°C for 18 h.

For the transduction assays, phages were propagated on *S. Typhimurium* LT2 strain (J.L. Ingraham, University of California). A tryptophan auxotrophic spontaneous mutant (Trp<sup>-</sup>) of *S. Typhimurium* LT2 (Universitat Autònoma de Barcelona) named UA1219 was used as recipient. Both strains were grown in LB broth or in Vogel Bonner (VB) minimal media plates (Merck, Mollet del Vallès, Spain) supplemented with glucose 0.2% and when necessary with tryptophan 10% (Sigma-aldrich, St.Louis, MO, USA).

##### 3.1.2. Bacteriophages and titration

Bacteriophages UAB\_Phi20, UAB\_Phi78 and UAB\_Phi87 were used. In addition the bacteriophages P22 (ATCC 19585-B1) and P22<sup>int7</sup> (J.L. Ingraham, University of California) were used as positive controls in transduction experiments. The phage titre was determined by plating serial dilutions (1:10) onto lawns of *S. Typhimurium* strains using LB plates, by means of

the double agar layer method (109). When needed, LB plates were supplemented with rifampicin (75 µg/ml).

### 3.1.3. *In vitro* multiplication of bacteriophages

Phage lysate was obtained by infecting exponential-phase cultures of *S. Typhimurium* strains LB5000 or LT2 grown in LB broth at an input multiplicity of infection ( $MOI_{input}$ ; ratio of added phages to added bacteria) of 0.01 (110). After 5-h incubation at 37°C, the culture was centrifuged at  $10,414 \times g$  for 10 min. The supernatant was collected and then filtered first through 0.45-µm and then through 0.22-µm syringe polyestersulfone (PES) filters (Millipore, Carrigtwohill, Ireland) and phage titre was determined.

When high titre of phage lysate was required, 50 ml of *Salmonella* cultures in LB broth at an initial optical density at 550 nm ( $OD_{550}$ ) of 0.2 was prepared and incubated at 37°C with agitation until an  $OD_{550}$  of 1 was obtained. The culture was infected with the appropriate phage at a  $MOI_{input}$  of 0.01, and the suspension was then incubated at 37°C for 12 to 14 h (109). Finally, the lysate was recovered by centrifugation as described above. The phage lysate was concentrated by ultracentrifugation (Optima™ L-80, Beckman, CA, USA) in an 80Ti rotor (Beckman, CA, USA) at 4°C ( $68,584 \times g$ ) for 2 h (111). The pellet was resuspended in aqueous  $MgSO_4$  (10 mM, pH 6.1) with overnight shaking. The resulting phage suspension was filtered through 0.45-µm PES filters (Millipore, Carrigtwohill, Ireland) and then stored at 4°C. The phage titre was determined as described above.

### 3.1.4. Transduction assay

The transduction capability of bacteriophages UAB\_Phi20, UAB\_Phi78, and UAB\_Phi87 was determined using *S. Typhimurium* strain UA1219 deficient in tryptophan synthesis as receptor.

Bacteriophages were propagated on *S. Typhimurium* strain LT2 and the titre was determined. For transduction, a culture of the mutant strain was grown in LB broth at 37°C until an  $OD_{550}=0.3$  was reached. Afterwards, the culture was centrifugated and the pellet was resuspended in  $MgSO_4$  (10 mM). Fifty  $\mu$ l of bacteriophage lysate diluted in  $MgSO_4$  (10 mM) were added to 0.5 ml of the bacterial suspension to reach a  $MOI_{input}$  of 1 and 0.01. The mixture was incubated at 37°C for 20 min without shaking (112) after which 0.1 ml of each transduction mixture was plated on VB plates supplemented with 0.2% glucose (Merck, Mollet del Vallès, Spain). The spontaneous reversion was also determined. After a 48-h incubation at 37°C, colonies were counted and the transduction frequency was calculated. Control of transduction using phages P22wt and P22int7 was also performed. Viable counts of the receptor strains were determined by plating appropriate dilutions thereof on VB minimum medium supplemented with glucose (0.2%) and tryptophan (10%), as indicated.

## 3.2. Molecular Methods

### 3.2.1. Bacteriophage DNA extraction

High-titre ( $10^{11}$ - $10^{12}$  pfu/ml in  $MgSO_4$  10 mM) bacteriophage lysates were obtained by ultracentrifugation at  $51,000 \times g$  for 2 h (Optima™ L-80, Beckman, CA, USA) for each phage (109). Bacteriophage DNA was isolated using a phenol-chloroform method (109), with slight modifications. The resulting suspension was treated with DNase I (80 U/ml; Roche, Barcelona, Spain) and RNase I (80  $\mu$ g/ml; Roche, Barcelona, Spain) at 37°C for 2 h. Following the addition of 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 200  $\mu$ g proteinase K (Roche, Barcelona, Spain)/ml, the phage suspension was incubated at 56°C for 2 h. Phage DNA was then extracted using phenol:chloroform and precipitated in ethanol. DNA integrity was checked by using a 0.7% agarose gel electrophoresis stained with Red Safe 1x (Intron Biotechnology, Seongnam-Si,

Korea) and quantified spectrophotometrically using a NanoDrop ND 1000 instrument (Thermo Scientific, DE, USA).

### 3.2.2. Bacteriophage replication

Exponential cultures of *S. Typhimurium* strain LB5000 grown at 37°C in LB broth ( $OD_{550} \approx 0.250$ ) were infected with the appropriate bacteriophage at a  $MOI_{input}$  of 1. The bacteriophage lysates had been previously treated with 4  $\mu$ l DNase (Roche, Barcelona, Spain)/ml and 2  $\mu$ l RNase (Roche, Barcelona, Spain)/ml to avoid DNA cross-contamination. Five ml of the infected cultures were sampled at different times (from 0 to 50 min, every 10 min; or from 0 to 120 min, every 20 min). The samples were filtered through sterile 0.45- $\mu$ m nitrocellulose membrane filters (Millipore, Carrigtwohill, Ireland) and washed twice with 5 ml of cold  $MgSO_4$  (10 mM). Bacterial cells retained on the filter were resuspended in 1 ml of cold  $MgSO_4$  and immediately stored at -80°C. Bacterial DNA was obtained using the Easy DNA kit (Invitrogen, Alcobendas, Spain) according to the manufacturer's instructions and quantified using a NanoDrop instrument. The presence or absence in *Salmonella* cells of DNA belonging to the infecting bacteriophage particles was determined using a semiquantitative polymerase chain reaction (PCR). Twenty amplification cycles were performed using the primer pairs specific for each bacteriophage (Table 8). The resulting PCR products were loaded on a 1% agarose gel stained with Red Safe 1x (Intron Biotechnology, Seongnam-Si, Korea) and  $\phi$ X174 digested with HinfI as the DNA marker.

**Table 8.** Primers used for the detection of bacteriophage DNA during *Salmonella* cells infection.

Bacteriophage	Primer Name	Sequence (5'-3')
UAB_Phi20	GP18up	TTAGATGAACGAAATTTTGGTGGT
	GP18rv	CCGAAATGGAATGGTCTGG
UAB_Phi78	GP13up	TATGGCTGGCAAATCTAAGGAGT
	GP13rv	ACCACCAAATTTTCGTTTCATCTAA
UAB_Phi87	ORF131up	CAAACTTCCTCTTCATCCGTATC
	ORF131rv	GCTGCTGGCATTCTCCCTATC

### 3.2.3. Identification of the bacteriophage chromosome ends

DNA of phages UAB\_Phi78 and UAB\_Phi87 was treated with exonuclease Bal31, as described elsewhere (113). Briefly, 30 µg of bacteriophage DNA was treated with 0.5 units of Bal31 nuclease (Takara, Saint-Germain-en-Laye, France)/µg at 30°C at different incubation times. The reaction was stopped by the addition of 10 µl of EDTA (20 mM) followed by heating at 65°C for 5 min. The DNA was purified using phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation (109), after which 1 µg was digested with HindIII (phage UAB\_Phi78) and SpeI (phage UAB\_Phi87) enzymes (New England Biolabs, Hitchin, UK) and analyzed by agarose gel electrophoresis (1%). Those fragments that disappeared were isolated and purified (GE Healthcare Ltd., UK). *In silico* restriction of UAB\_Phi78 and UAB\_Phi87 genomes with the adequate cutting site were performed in order to identify the sequence of the disappeared fragments. Following, different primers were designed for sequencing the recovered and purified fragments. Finally, in attention to the sequences obtained, a set of primers matching a few hundred nucleotides away from the putative ends were used to sequence the chromosomal ends using the genome of both phages as template. (Table 9).

**Table 9.** Primers used for the determination of the short direct terminal repeats of UAB\_Phi78 and UAB\_Phi87.

Bacteriophage	Primer Name	Sequence (5'-3')
UAB_Phi78	ExtrUP78	GTAACCTAGTGTTGACAAGG
	ExtrDw78	GATGTCGTAGGCAAGGA
UAB_Phi87	P2007	CTATCGAATCCTTATACAATCTC
	P4005	TAGGGTCTTTGAAGGAACTG

On the other hand, restriction of phage UAB\_Phi20 DNA with EcoRI enzyme was done to ascertain the type of chromosomal ends of this phage.

### 3.3. Bacteriophage encapsulation methodology

#### 3.3.1. Encapsulation materials and techniques

The phages were encapsulated in lipids using the thin-film hydration method (114). A lipid mixture of 1,2-dilauroyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine (DLPC), cholesteryl polyethylene glycol 600 sebacate (Chol-PEG600), cholesterol (Chol), and cholesteryl 3 $\beta$ -N (dimethylaminoethyl)carbamate hydrochloride (cholesteryl) was used (1:0.1:0.2:0.7 molar ratio). Briefly, after each lipid was dissolved in chloroform (100 mg/ml), a solution containing 106  $\mu$ l of DLPC, 17  $\mu$ l of cholesterol-PEG600, 13  $\mu$ l of Chol, and 64  $\mu$ l of cholesteryl was prepared under sterile conditions. The total lipid concentration was 17 mM. The organic solvent was removed under vacuum and nitrogen to afford a dry lipid film, which was then hydrated with 2 ml of the appropriate aqueous suspension of phage (either UAB\_Phi20, UAB\_Phi78 or UAB\_Phi87) at a concentration of  $10^{11}$  pfu/ml under stirring for 1 h. Under these conditions, the stacks of liquid crystalline lipid bilayers become fluid and swell, resulting in their detachment during agitation and their self-closure to form LMV. Unilamellar vesicles were obtained by homogenizing the LMV suspension using an extruder (Lipex Biomembranes, Vancouver, Canada) and a polycarbonate membrane (pore size, 400 nm).

The methodology employed for the encapsulation of phages using alginate-CaCO<sub>3</sub> followed a previously described protocol with slight variations (97, 99). Briefly, 500 mg of CaCO<sub>3</sub> (1%) and 900 mg of alginate (1.8%) were added to 50 ml of each phage suspension in 10 mM MgSO<sub>4</sub> at a concentration of  $10^{11}$  pfu/ml. This mixture was stirred overnight to allow a proper homogenization until a final encapsulation solution of alginate at 1.8%, 1% CaCO<sub>3</sub> and phage at



$10^{11}$  pfu/ml was obtained. At the same time, a bath for the alginate gelification was prepared. For that, 150 ml of  $\text{CaCl}_2$  at 1.8% were poured into a 17 cm diameter concave container. Then, the former solution was sprayed into the  $\text{CaCl}_2$  bath using a nozzle B-290 (Buchi, Flawil, Switzerland) at a pressure of 2.7 bar and a pumping speed of 1.5 ml/min. After that, the gelified capsules were hardened being maintained in the bath during 90 min with slow stirring. Thereafter, all capsules obtained were centrifuged and washed thrice with  $\text{MgSO}_4$  10 mM at 700 rpm for 5 min and resuspended in  $\text{MgSO}_4$  10 mM at final volume of 50 ml.

Particle size distributions of lipid vesicles were determined using a dynamic light scattering (DLS) analyzer combined with non-invasive backscatter technology (Malvern Zetasizer, Malvern Instruments, UK). For alginate capsules, granulometric assays based on laser diffraction (LD) were performed due to their micrometric size (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, UK). In both cases, the samples (1 ml) were measured without dilution directly thereafter, and the mean of three different measurements was taken as the mean diameter. The stability of the liposome-encapsulated phages was examined by measuring their zeta potential by an electrophoretic mobility and light scattering analyser (Malvern Zetasizer, Malvern Instruments, UK). The samples were placed into the cuvettes and measured without dilution immediately thereafter. The mean of three different experiments was taken as the mean zeta potential of the dispersed system.

### 3.3.2. Encapsulation efficiency

The encapsulation efficiency of the liposome-encapsulated phages was calculated according to the equation  $EE (\%) = 100 - (C_{\text{free}}/C_{\text{total}}) \times 100$ , where EE is encapsulation efficiency,  $C_{\text{total}}$  is the total phage concentration, and  $C_{\text{free}}$  is the concentration of free phages. To quantify  $C_{\text{total}}$ , 0.5 ml of liposome-encapsulated phages was treated with 0.5 ml of bile salts (50 mM) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) to disrupt the liposomes. A preliminary experiment confirmed that this

concentration had no significant effect on the infectivity of the phages. The double agar layer method was used to plate appropriate dilutions of the samples onto LB plates with *S. Typhimurium* strain LB5000, and the  $C_{\text{total}}$  was then determined. To quantify  $C_{\text{free}}$ , the titre of liposome-encapsulated phages was directly enumerated by plating serial dilutions (1:10) with strain LB5000.

The same EE equation was used to determine the alginate encapsulation efficiency. However, in this case  $C_{\text{total}}$  was obtained by direct titration of the alginate-encapsulated phages on strain LB5000. The divalent ions are essential for the stability of the alginate capsules therefore their degradation when plating might be a consequence of the sequestration of divalent ions during the gelification of the double agar layer. To quantify  $C_{\text{free}}$ , 0.5 ml of alginate-encapsulated phage was filtered through 0.22- $\mu\text{m}$  syringe PES filter to retain the encapsulated phages. Then, the eluted volume was titered.

The same methods were used to determine the stability of liposome and alginate-encapsulated phages that were stored at 4°C for 6 months.

### 3.4. Lyophilization of encapsulated bacteriophages

For the long-term storage of the encapsulated phages, different cryoprotectants were added during the capsules synthesis. For lyophilisation of liposome-encapsulated phages, the dried lipid film was hydrated with a suspension containing the phages and trehalose at a lipid/carbohydrate ratio of 1:5 mM (3,2% wt/v). Otherwise, during the preparation of the alginate-encapsulated phages the cryoprotectants trehalose (10%), mannitol (1.8%) or sucrose (4%) plus powdered milk (15%) were mixed with the encapsulation solution previous to the spraying procedure.

The resulting cryoprotected encapsulated phages were frozen at -80°C for 2 h and then lyophilized at -40°C for 48 h using a Cryodos 50 (Telstar, Terrassa, Spain). For comparison, non-

encapsulated phages were also lyophilized with the cryoprotectants mentioned above. When needed, the lyophilized samples were resuspended in aqueous  $\text{MgSO}_4$  (10 mM) and the phage titre was determined by the double agar layer method.

### 3.5. Bacteriophage stability in simulated gastric fluid

The encapsulated phages were tested for their stability in simulated gastric fluid (SGF) solution (pH 2.8), comprising pepsin (3 mg/ml; Sigma-Aldrich, MO, USA) in 0.85% NaCl (115). In all cases, 0.1 ml of encapsulated phages was added to 10 ml of the simulated gastric fluid solution. No change in pH occurred when liposome-encapsulated phages were added, while a buffering effect was observed in the case of alginate-encapsulated phages, from 2.8 to 3.8. The samples were then incubated in a water bath at 42°C with agitation for 1 h to mimic the conditions of the avian stomach. To determine the total phage concentration, aliquots were taken at 0, 30 and 60 min. The liposome-encapsulated phages were treated with bile salts (50 mM) and plated as described previously, whereas any treatment was necessary for the alginate-encapsulated phages. The same procedure, but without any treatment, was used to test the non-encapsulated phages.

### 3.6. Alginate-encapsulated phage release in simulated intestinal fluid

Phage release from alginate capsules was characterized in simulated intestinal fluid (SIF) solution (pH 8.0), comprising pancreatine (1 mg/ml) (Sigma-Aldrich, MO, USA), bile salts (10 mM) and NaCl (0.85%) (115). To perform this, a suspension of alginate-encapsulated phages at a concentration of  $1 \times 10^9$  pfu/ml was incubated in SIF using a water bath at 42°C with agitation to emulate the conditions of the avian intestine. To determine the total phage concentration, aliquots were taken at 0, 20 and 40 min, and titered as described previously. The phages

released from the capsules were determined by titration of the eluted volume after filtering through 0.22- $\mu\text{m}$  syringe PES filter (Millipore, Carrigtwohill, Ireland).

### 3.7. Microscopy

Liposome integrity (morphology and lamellarity) was examined by cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) using a JEOL-JEM 1400 microscope (JEOL, Japan). The samples were prepared in a controlled environment vitrification system. A 5- $\mu\text{l}$  aliquot of each encapsulated phage was deposited onto carbon-coated film meshes supported by standard copper TEM grids. After 30 s, the grids were gently blotted with a double layer of filter paper to obtain a thin film (thickness: 20–400 nm), plunged into liquid ethane at its freezing point ( $-180^\circ\text{C}$ ), and then transferred into liquid nitrogen ( $-196^\circ\text{C}$ ), where they were stored until use. At that time, the vitrified specimens were transferred to the microscope using a cryo-transfer and its workstation (Gatan 626 DH, Gatan, US).

To confirm that the phages had indeed been encapsulated, fluorescently labeled samples were observed by laser confocal microscopy using a Leica TCS SP5 confocal microscopy (Leica Microsystems, Germany). Phages were stained by adding 0.02 of 100 X SYBR gold (Molecular Probes, OR, USA) to 10 ml of phages suspended in  $\text{MgSO}_4$  (10 mM) at a concentration of  $10^{11}$  pfu/ml. After an overnight incubation in the dark (116), the phages were ultrafiltered and washed three times at  $5,000 \times g$  using Amicon ultra 50K tubes (Millipore, Carrigtwohill, Ireland). The fluorescent SYBR gold-labeled phages were encapsulated using the thin-film hydration method described above and using the DLPC-Chol-PEG-Chol-cholesteryl lipid mixture incorporating the Vybrant Dil phospholipid-labeling solution (10  $\mu\text{L}$  of Vybrant Dil per 20 mg lipid). In this case, the liposomes were not extruded through a membrane, as the resulting particles would have been below the resolution limit of the microscope. A 30- $\mu\text{l}$  sample was placed on a coated glass slide and observed in resonance scanning of Leica TCS SP5 confocal

microscope (Leica Microsystems, Germany) due to the fast Brownian movement of the samples.

The SYBR gold-labeled phages were also encapsulated in alginate using the same spraying method described previously, but adding to the mixture 10% of fluorescently labeled alginate with 4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI). Alginate labelling was performed as previously described changing fluoresceinamine for DAPI (117). Samples of 30- $\mu$ l were observed in Leica TCS SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Germany), but without the resonance scanning mode as the size of this type of capsules was big enough to reduce their Brownian movement. In some cases, the alginate capsules were characterized using optical microscopy.

### 3.8. *In vivo* assays in broilers

Both the intestinal residence time and the effectiveness of a cocktail of either liposome-encapsulated, alginate-encapsulated or non-encapsulated phages against *Salmonella* was evaluated *in vivo* in commercial broilers (*Gallus gallus*, Ross strain 308; Terra-Avant S.A., Girona, Spain), using an experimental model that mimics the farm conditions. The animals were treated in agreement with the guidelines of the Comissió d'Ètica en l'Experimentació Animal i Humana (CEEAH) of the Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). The study was approved and assigned the authorization number 1953.

Newly hatched chickens were purchased and subsequently transported to a biosafety level 2 animal testing facility at the UAB's Servei de Granges i Camps Experimentals (Cerdanyola del Vallès, Spain). The broilers were housed in pens with food and water supplied *ad libitum*. In an attempt to simulate farm conditions and increase the feeding impulse of the animals, they were kept under 23 h/1 h light/dark cycles using green and blue light (118). The temperature was

maintained between 30-32°C during the first week and reduced at 26°C for the rest of the experiment. Prior to each of the experiments, tissue samples were obtained from two euthanized chickens and tested using enrichment protocols to confirm that they were free of *Salmonella* and phages. For the detection of *Salmonella*, homogenized tissues were incubated in buffered peptone water (BPW; Merck, Darmstadt, Germany) at 37°C for 18 h, after which 0.2 ml of this suspension was inoculated in 2 ml of Müller-Kauffman selective broth (Merck, Darmstadt, Germany). Following a 24-h incubation at 37°C, 0.1 ml of this culture was plated onto XLD plates, and after additional 24-h of incubation at 37°C, the presence of *Salmonella* was checked.

Phages were detected as previously reported (119). Briefly, 0.2 ml of each homogenate was added to a 2-ml culture of *S. Typhimurium* ATCC14028 Rif<sup>R</sup> in LB at an OD<sub>550</sub> of 0.2. After a 24-h incubation at 37°C, the presence of phages was determined by spotting 10 µL of the above described suspensions onto lawns of *S. Typhimurium* ATCC14028 Rif<sup>R</sup>. The plates were incubated at 37°C for 24 h, and bacterial lysis was then evaluated.

The broiler treatment with bacteriophages was based on the oral administration of 100 µl of a cocktail containing either the liposome-encapsulated, alginate-encapsulated or the non-encapsulated phages to the broilers. The cocktail comprised a 1:1:1 mixture of the three phages (UAB\_Phi20, UAB\_Phi78, and UAB\_Phi87) at a concentration of 10<sup>11</sup> pfu/ml in MgSO<sub>4</sub> buffer without any antacid. All oral inoculations were performed using a curved oral-dosing needle (75 mm; 16 gauge, Veterinary instrumentation, Sheffield, UK).

### 3.8.1. Bacteriophage retention in chicken caecum

The intestinal residence time of a cocktail of either encapsulated or non-encapsulated phages was determined over 72 h. In order to avoid cross-contaminations, three sequential independent experiments were conducted with groups of 63 1-day-old chickens for each

experiment that were housed in a poultry pen. At time zero, the group was treated with 100  $\mu$ l of the desired phage cocktail. In all cases, the dose was  $10^{10}$  pfu/animal. After 2, 48, and 72 h, 21 animals were euthanized and caecum samples were collected. For phage quantification, serial dilutions of homogenized caecum samples were plated onto a lawn of *S. Typhimurium* ATCC14028 Rif<sup>R</sup> using the double agar layer method and then incubated at 37°C for 24 h. The titration of liposome-encapsulated samples was done without the bile salts treatment, as it was expected that the concentration of bile salts in the broilers intestinal tract would trigger the release of phages. In the same way, the alginate-encapsulated phages concentration was determined without previous filtering of the samples, as it was likely that the alkaline pH along the small and large intestine would have elicited the release of the encapsulated phages.

When direct detection of phages was not possible, the enrichment procedure was carried out as detailed above.

### 3.8.2. Bacteriophage therapy

Bacteriophage therapy against *Salmonella* was assessed over 17 days in chickens orally administered with 100  $\mu$ l of the different phage cocktails. The animals were orally infected on day 0 with 100  $\mu$ l of a suspension of *S. Typhimurium* ATCC14028 Rif<sup>R</sup> in LB medium at a dose of  $10^7$  cfu/animal. Four sequential experiments were conducted with groups of 84 recently hatched commercial broilers (*Gallus gallus*, Ross strain 308) for each experiment and housed in pens. Group 1, which controlled for *Salmonella* colonization, was untreated. Groups 2, 3, and 4 received the non-encapsulated, liposome-encapsulated and alginate-encapsulated phages, respectively. In all cases, phages in an oral dose of  $10^{10}$  pfu/animal were administered once daily for 8 days, from day -1 to day 7 post-infection with *Salmonella*. The control group was orally inoculated over the same 8 days with an aqueous suspension of MgSO<sub>4</sub> (10 mM). In each group, 14 chickens were euthanized on days 1, 3, 6, 8, 10, and 15 post-infection, and caecum

samples were obtained for *Salmonella* and phages quantification. To count *Salmonella*, the tissues were weighed, resuspended in 4 ml of BPW, and then mechanically homogenized for 15 min. Serial dilutions of the homogenates were plated on XLD agar plates (Laboratorios Conda, Madrid, Spain) supplemented with rifampicin (75 µg/ml). For phage enumeration a spot test and a subsequent exact titration were performed plating onto LB plates supplemented with rifampicin (75 µg/ml) with *S. Typhimurium* ATCC14028 Rif<sup>R</sup>. After incubation at 37°C for 24 h, the number of colonies of *Salmonella* and phage plaques was recorded. For each treatment, the reduction in bacteria was calculated by subtracting their mean caecal concentration (expressed in log<sub>10</sub> units) in groups 2, 3 and 4 from the mean value of the control (group 1).

### 3.8.3. Liposome-encapsulated phage release by caecum content

Phage release from liposomes in the caecum was studied in 12 1-day-old chickens maintained in pens as described above. After 15 days, the animals were euthanized and the contents of their caeca were harvested. For each phage, 990 µl of caecal content was mixed with 10 µl of liposome-encapsulated phages at a concentration of 10<sup>11</sup> pfu/ml and incubated at 42°C, the body temperature of the chickens. Phage concentration over time was determined by plating the appropriate dilutions using the double agar layer method.

## 3.9. Bioinformatics analysis

Bacteriophage primer design was conducted using the software package DNASTar (DNASTar inc., MA, US). UGENE (Unipro, Novosibirsk, Russia) software was used for restriction mapping of phage genomes, finding repeated regions and analysing the similarity of *pac* sequences. For all genome sequence acquisition and comparisons, the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> database was used.



Phylogenetic analysis of phage large terminase subunit sequences was conducted using MEGA6 for Windows (<http://www.megasoftware.net/mega.php>). The tree based on Neighbour-joining method was generated from a multiple alignment (gap opening penalty, 10; gap extension penalty, 1; and gap separation distance, 0). In order to obtain the tree the parameters were set as following: i) the model/method was set as number of differences; ii) gaps/missing data treatment, was established as complete deletion and iii) the random number generator seed and bootstrap trails were set at 111 and 1,000, respectively (120). Finally, the condensed tree was displayed with a bootstrap cut-off value of 70%.

### 3.10. Statistical analysis

All results were analyzed using IBM SPSS software. For normally distributed samples, analysis of variance (ANOVA) and Student's *t* test were applied; in cases of non-normal distribution, the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used. The polydispersity index (PDI), defined as the square of the ratio of the standard deviation to the mean diameter, was determined as a measure of the width of the particle size distribution.



# RESULTS



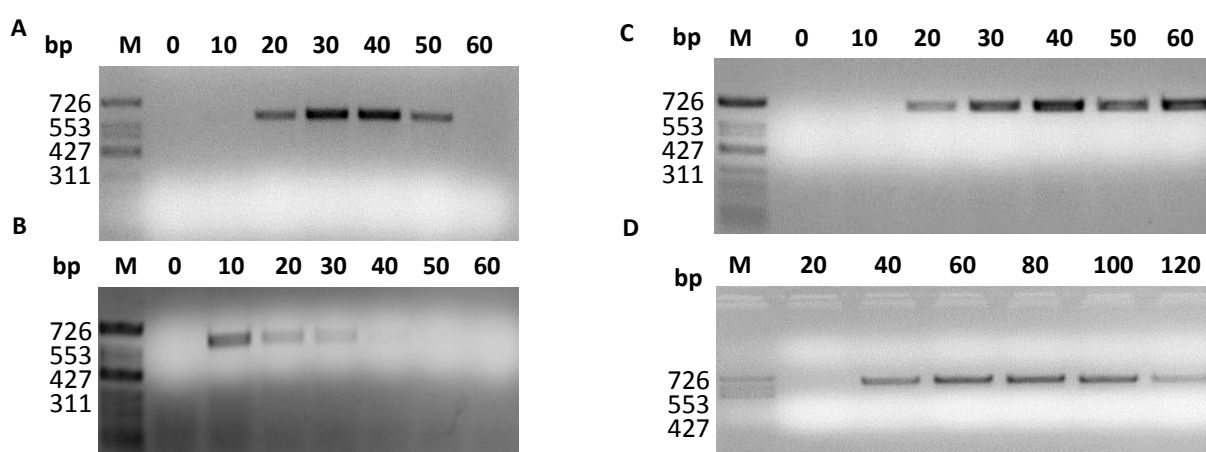
## 4. Results

### 4.1. Additional characterization of bacteriophages UAB\_Phi20, UAB\_Phi78 and UAB\_Phi87

One of the focus of interest of this dissertation was the study of two molecular aspects of bacteriophages UAB\_Phi20, UAB\_Phi78 and UAB\_Phi87 relating to their biology and thus with their suitability and safety as therapeutic agents. Firstly, the DNA replication of the three phages was examined. In addition, we identified and characterised their chromosomal ends and packaging strategies as well as their transduction capabilities.

#### 4.1.1. DNA replication of bacteriophages in *Salmonella* cells.

The duration of phage DNA replication inside *Salmonella* cells was determined by PCR. The results showed that phage UAB\_Phi78 DNA was detected 10 min after bacterial infection and DNA of phages UAB\_Phi20 and UAB\_Phi87 20 min after the infection (Figure 15). No PCR products were obtained from bacteriophage UAB\_Phi78 50 min after the infection, whereas DNA amplification was detected from phages UAB\_Phi20 and UAB\_Phi87 60 min and 120 min, respectively, after bacterial infection (Figure 15).

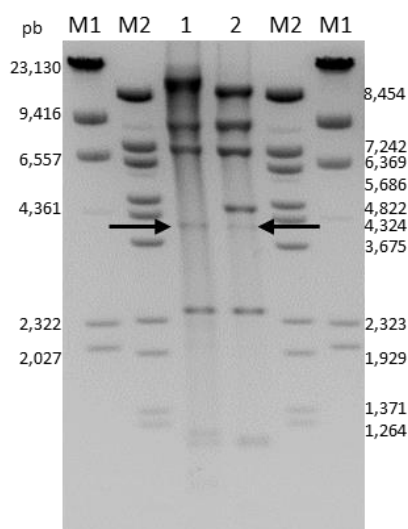


**Figure 15.** Detection by PCR of DNA of bacteriophages UAB\_Phi20 (A), UAB\_Phi78 (B), and UAB\_Phi87 (C and D) after infection of *S. Typhimurium* LB5000 cells at times from 0 to 120 min. M: Marker lane containing  $\phi$ X174 digested with *Hin*I. Sizes base pairs (bp) are indicated on the left side of each image.

#### 4.1.2. Identification of the chromosomal ends and transduction ability of bacteriophages

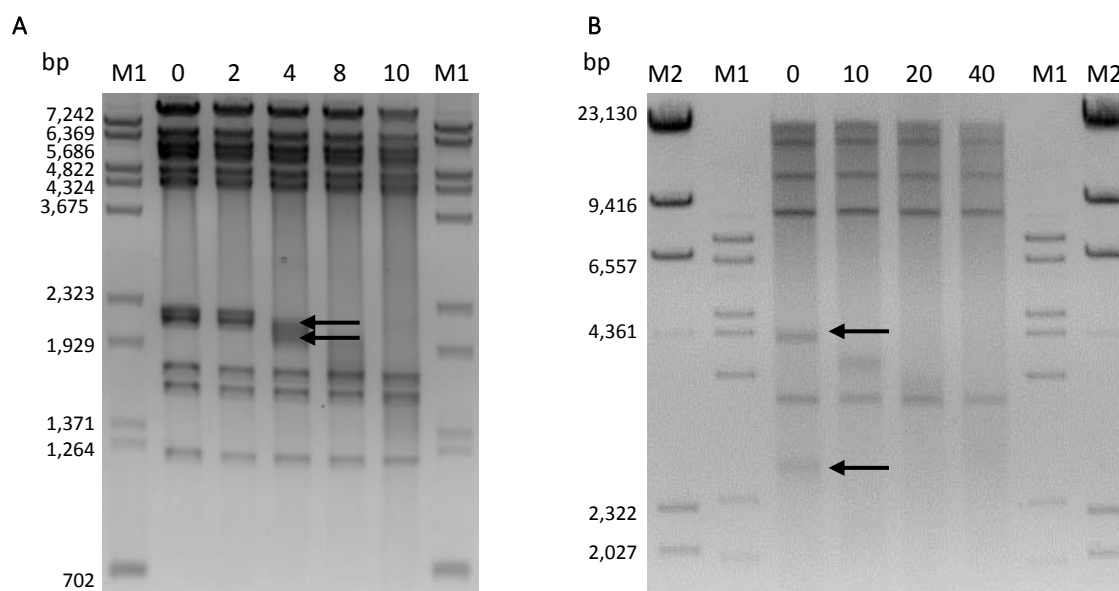
In previous studies, our group did not find evidence of the presence of *cos* ends in the chromosomes of phages UAB\_Phi20, UAB\_Phi78 and UAB\_Phi87 (54, 57). Therefore, the type of the chromosomal ends and the DNA packaging strategies of these three phages remained unknown. These features were elucidated experimentally and the results are described below.

Because of the high similarity of the phage UAB\_Phi20 genome with those of bacteriophages belonging to the *P22likevirus* genus, we performed an *in silico* search for the *pac* sequence of phage UAB\_Phi20. The sequence 5'-GAAGACTTATCTGAGGTCGTTA-3' was identified as the possible *pac* site of this phage. In addition, the under-representation of a 4,007-bp DNA fragment (Figure 16), probably containing *pac* sequence, was detected in the EcoRI-digested UAB\_Phi20 genome (Figure 16), probably containing *pac* sequence, was detected in the EcoRI-digested UAB\_Phi20 genome (Figure 16). A band of the same size was detected for P22 phage, which is characteristic of the chromosomal ends of bacteriophages that exhibit headful packaging strategies, such as P22 (40).



**Figure 16.** Dna restriction profile of phages UAB\_Phi20 (2) and P22 (1) after digestion with EcoRI enzyme. Lambda DNA digested with HindIII (M1) or BstEII (M2) were used as molecular markers. Sizes (bp) are indicated on both sides of the image. Arrows indicate the 4,007-bp fragment containing the *pac* sequence.

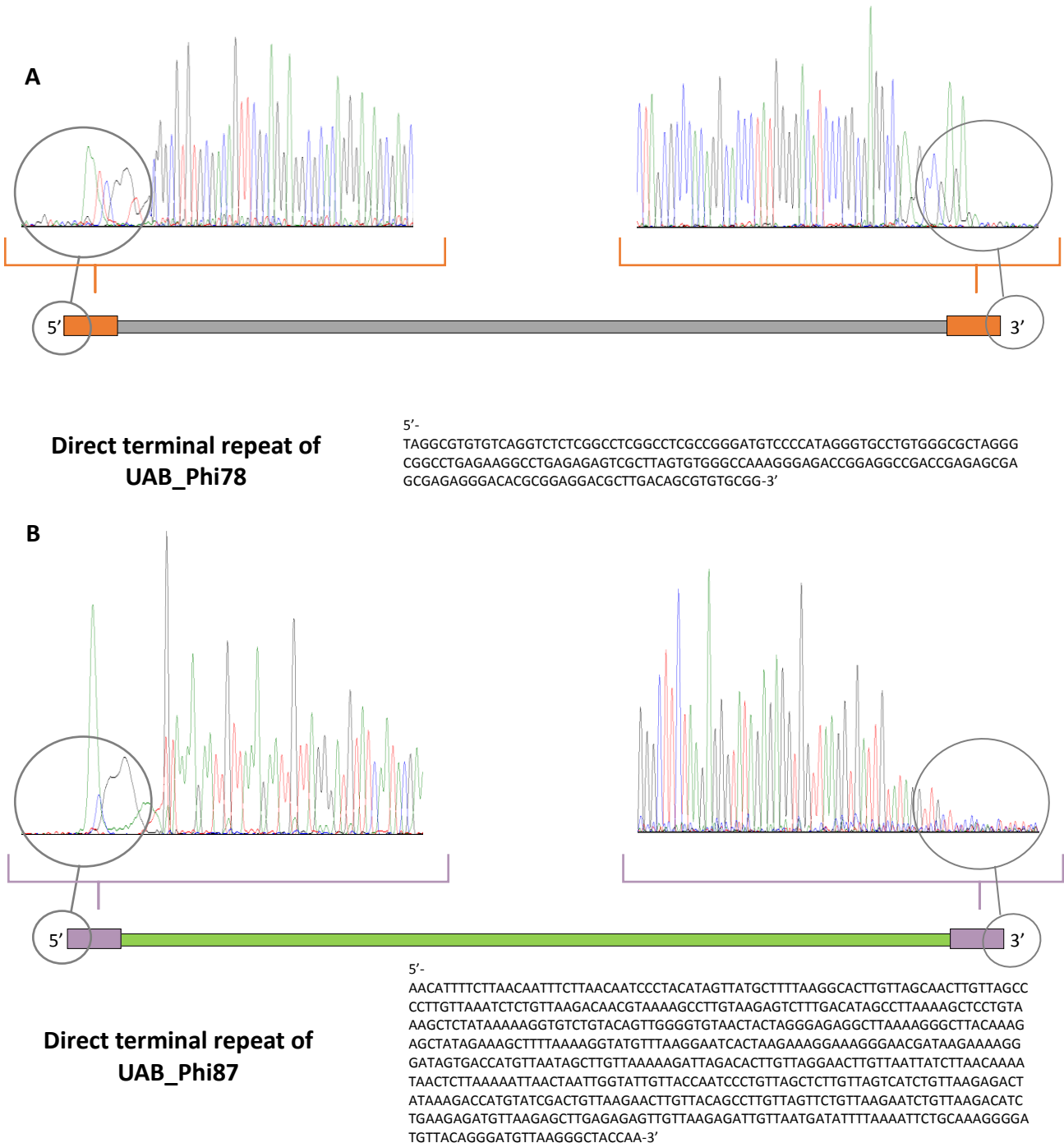
Phage UAB\_Phi78 DNA was subjected to time-limited exonuclease Bal31 digestion followed by HindIII restriction, which resulted in the disappearance of two fragments of 2,212 and 2,109 bp (Figure 17). A similar treatment of phage UAB\_Phi87 DNA but using SpeI enzyme identified two simultaneously degraded fragments of 4,322 and 2,819 bp (Figure 17).



**Figure 17.** Time-limited digestion of UAB\_Phi78 (A) and UAB\_Phi87 (B) DNA with Bal31 exonuclease followed by digestion with HindIII and SpeI, respectively. Arrows indicate the sequentially degraded DNA bands. The time (min) of Bal31 treatment is indicated on the top. Marker lanes contain  $\lambda$  DNA digested with BstEII (M1) or with HindIII (M2). Sizes (bp) are indicated on the left side of the image.

These data indicated that the degraded fragments contained the chromosomal ends of the respective bacteriophages. To identify the DNA sequences of the Bal31-degraded fragments, an *in silico* restriction of phages UAB\_Phi78 and UAB\_Phi87 genomes was performed using the HindIII and SpeI cutting sites, respectively. Specific primers were then designed and used to sequence the recovered and purified restriction fragments as templates. The primers that displayed drop-offs of the sequencing signal were selected and used to confirm the results, by sequencing the respective phage genome as a template, which again revealed the typical

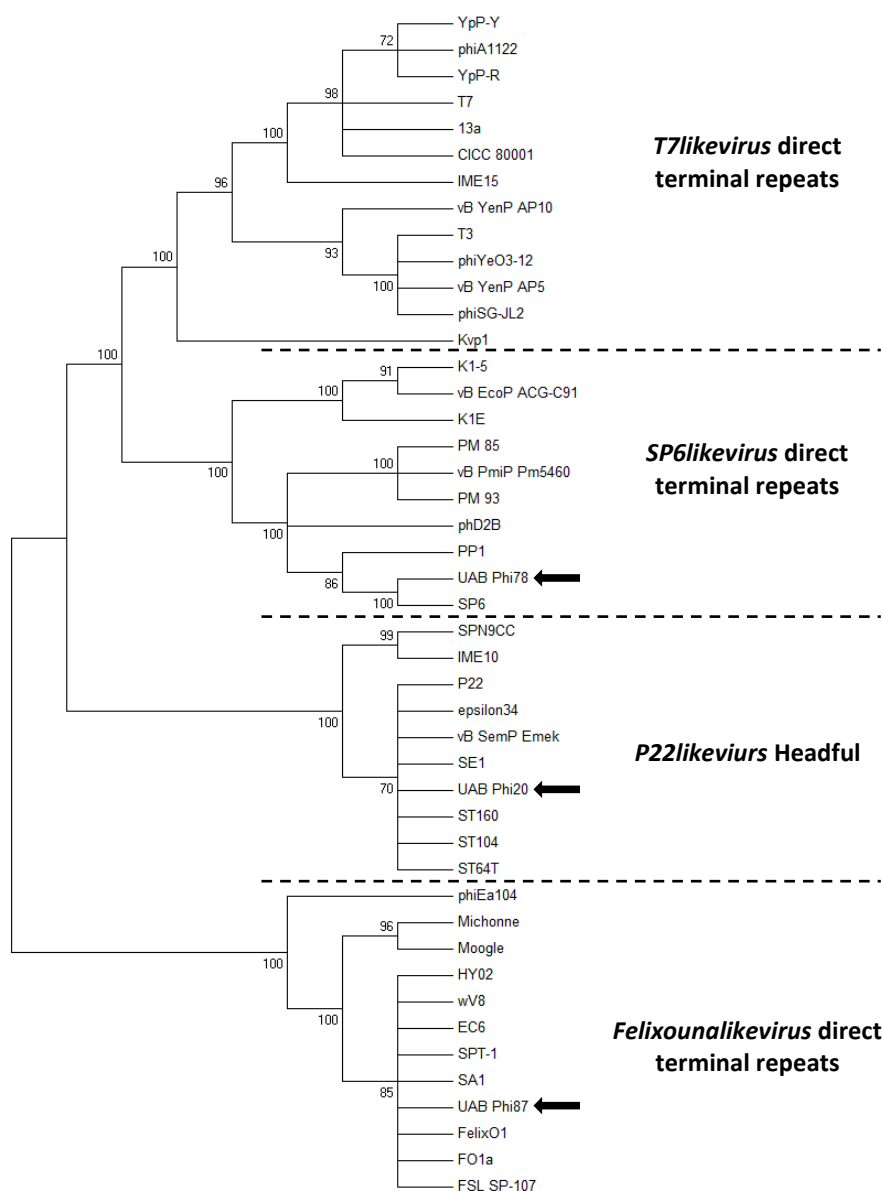
sudden drop-offs of the sequencing signal (Figure 18). Analysis of the obtained sequences identified short DTR of 179 bp and 608 bp for UAB\_Phi78 and UAB\_Phi87, respectively (Figure 18).



**Figure 18.** Sequencing the chromosomal ends of bacteriophages UAB\_Phi78 (A) and UAB\_Phi87 (B). The sequences of the short direct terminal repeats identified in both chromosomes are shown.



A neighbour-joining tree was constructed to compare the amino acid sequences of the large terminase subunits of UAB\_Phi20, UAB\_Phi78 and UAB\_Phi87 with those of other, previously described bacteriophages. Four clusters were identified, with the terminases of UAB\_Phi20, UAB\_Phi78 and UAB\_Phi87 grouping together with those of phages sharing the same type of genome ends (Figure 19).



**Figure 19.** Neighbor-joining tree of the large terminase subunits of bacteriophages UAB\_Phi20, UAB\_Phi78, and UAB\_Phi87 (indicated by black arrows) and comparison with other model phages with known packaging mechanisms. Bootstrap values for 1,000 trials are indicated near the bifurcation nodes.

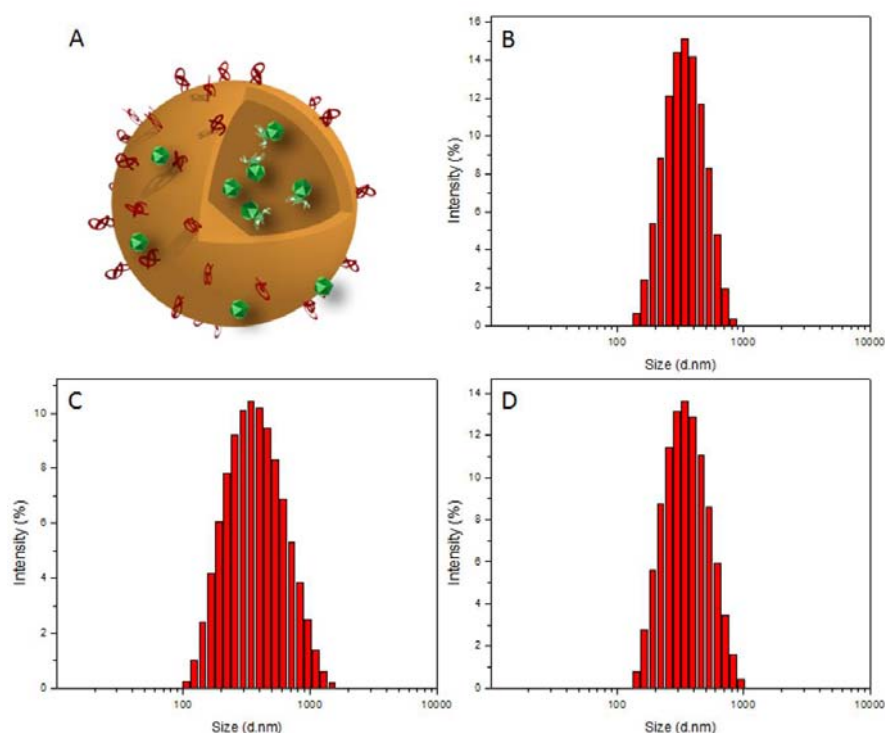
In attention to the results obtained, the large terminase of UAB\_Phi20 clustered with the *P22likevirus* headful group, that of UAB\_Phi78 with the cluster containing *SP6likevirus* short DTR, and that of UAB\_Phi87 with the group that included the *Felixounalikevirus* short DTR (Figure 19).

The transduction of bacterial DNA by bacteriophages is closely related to the DNA packaging strategy of the phage. For example, headful packaging is more prone to generate this type of genetic event (48). In this work, the transduction ability of phages UAB\_Phi20, UAB\_Phi78 and UAB\_Phi87 at  $MOI_{input}$  values of 1 and 0.01 was tested using the tryptophan marker. No evidence of transduction was seen in any case. Under similar conditions and at  $MOI_{input}$  of 1 and 0.01, the transduction frequencies for the same genetic marker were  $1.1 \times 10^{-6}$  and  $1.4 \times 10^{-6}$  for *P22int7* and  $5.2 \times 10^{-7}$  and  $1.1 \times 10^{-6}$  for *P22wt*, respectively.

## 4.2. Liposome-encapsulated bacteriophages

### 4.2.1. Characterization of the encapsulated bacteriophages

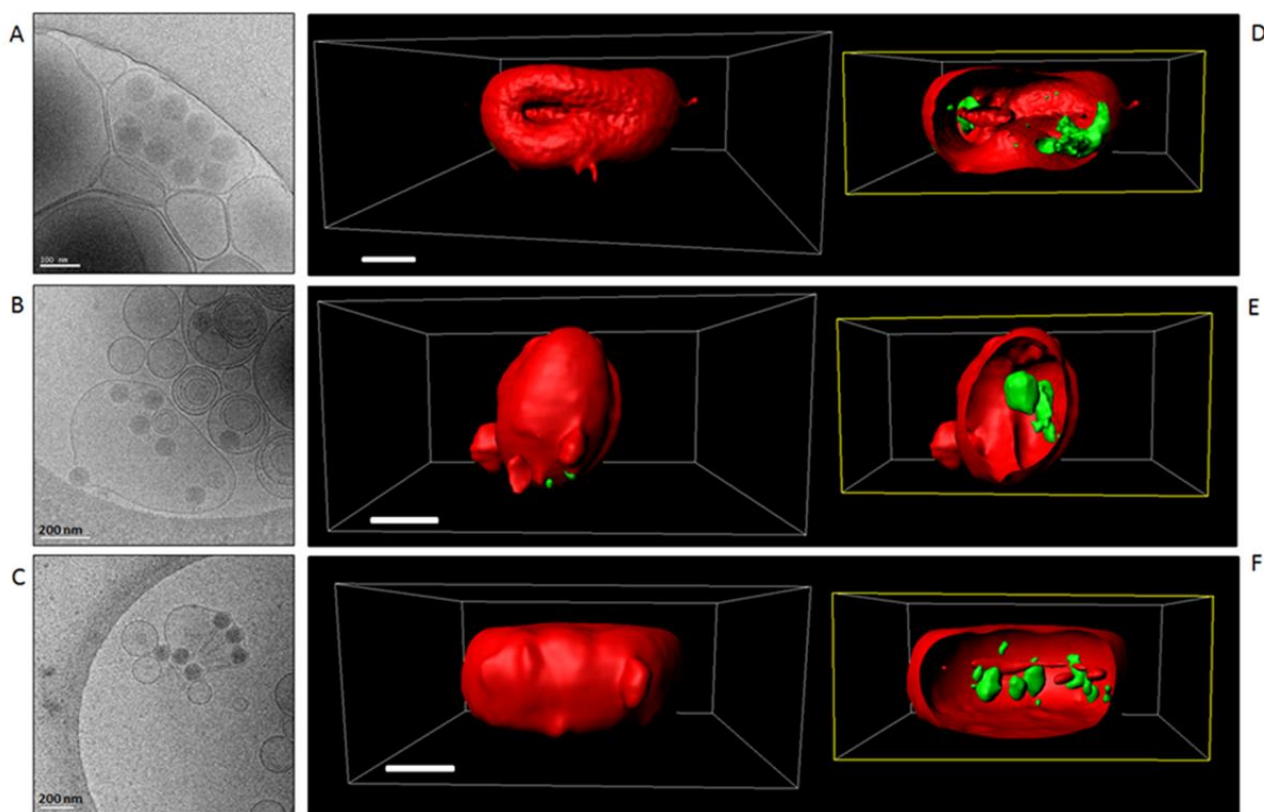
Each virulent phage (UAB\_Phi20, UAB\_Phi78, or UAB\_Phi87) (74, 75) was separately encapsulated into liposomes and characterized. DLS indicated that the mean size of the liposome-encapsulated phages was  $308.6 \pm 20.9$  nm for UAB\_Phi20 (Pdl = 0.14),  $320.6 \pm 15.2$  nm for UAB\_Phi78 (Pdl = 0.21), and  $325.8 \pm 23.1$  nm for UAB\_Phi87 (Pdl = 0.18) (Figure 20). The surface charges of the liposome-encapsulated phages, determined by measuring their zeta potential at pH 6.1, were  $+35.1 \pm 1.0$  mV,  $+33.0 \pm 2.1$  mV, and  $+31.6 \pm 1.3$  mV, respectively. The morphology and structure of the resulting liposome-encapsulated phages were imaged by cryo-TEM.



**Figure 20.** (A) Schematic representation of the liposome-encapsulated bacteriophage system, showing the presence of bacteriophages (green) encapsulated inside liposomes or attached to their external surfaces. (B to D) Particle size distribution plots for the liposome-encapsulated bacteriophages UAB\_Phi20 (B), UAB\_Phi78 (C) and UAB\_Phi87 (D), as measured by dynamic light scattering.

As shown in Figure 21 A to C, the phages were encapsulated in unilamellar liposomes. The number of encapsulated phages in a single liposome varied; empty liposomes and non-encapsulated phages were also observed. In the latter, most were attached to the external surface of the liposome. The sizes of the liposomes as determined by cryo-TEM were consistent with those estimated by DLS (Figure 21). The encapsulation efficiency of each phage was determined by preparing six independent encapsulation batches. The encapsulation yields (expressed as a percentage) were  $49\% \pm 2.4$  for UAB\_Phi20,  $48\% \pm 6.4$  for UAB\_Phi78, and  $47\% \pm 5.1$  for UAB\_Phi87 (Table 10). To further characterize the physicochemical structure of the liposome-encapsulated phages, they were labeled with SYBR gold and encapsulated into DiI-labeled liposomes. Figure 21 D to F shows the three dimensional (3D) spatial superimposition of the fluorescence intensities of SYBR-gold-labelled UAB\_Phi20, UAB\_Phi78, and UAB\_Phi87

phages (in green) and those of the DiI-labelled liposomes (in red). The images confirmed that each type of phage had indeed been encapsulated inside the liposomes. Then, the stability of the encapsulated phages was tested, that is, the extent to which the phages remained inside the liposomes. To this end, both the DLS characteristics and zeta potentials of the freshly encapsulated phages were determined, together with the encapsulation efficiency. In addition, samples of each freshly encapsulated phage were cold-stored at 4°C for 6 months and subsequently characterized as described above. However, measures of DLS and zeta potential were only recorded for a three months period (121). No significant differences were found in the values of any of the parameter between the fresh and cold-stored encapsulated phages (Table 10).



**Figure 21.** Cryo-TEM images of liposome-encapsulated bacteriophages: UAB\_Phi20 (A), UAB\_Phi78 (B) and UAB\_Phi87 (C). (D to F) 3D confocal microscopy images of SYBR gold-labeled phages UAB\_Phi20 (D), UAB\_Phi78 (E) and UAB\_Phi87 (F) (green) encapsulated into fluorescent DiI-labeled liposomes (red). 3D images of the liposome surface are shown on the left, and the corresponding cross-sectional images on the right. Scale bars are 5  $\mu\text{m}$ .

**Table 10.** Percentage (%) of liposome-encapsulated phages after their storage at 4°C for 6 months.

Bacteriophage	Fresh <sup>a</sup>	Stored at 4°C <sup>a</sup>	
		Three months	Six months
UAB_Phi20	49 ± 2.4	59 ± 9.2	47 ± 3.8
UAB_Phi78	48 ± 6.4	55 ± 3.8	46 ± 2.6
UAB_Phi87	47 ± 5.1	43 ± 2.7	54 ± 6.5

<sup>a</sup> Each value represents the average from three independent experiments ± standard deviation.

#### 4.2.2. Lyophilization of the liposome-encapsulated bacteriophages

With the goal of obtaining a stable product suitable for long-term storage and easily administered in animal water or feed, the effect of the lyophilization procedure on liposome-encapsulated phages was evaluated. Prior to lyophilization, the cryoprotectant trehalose (97) was added to the phage-containing suspension during the synthetic hydration step. Non-encapsulated phages were also lyophilized, for the purpose of comparison. After lyophilization, each resulting powder was reconstituted by resuspension in aqueous 10 mM MgSO<sub>4</sub>, and the phage total titre was determined after a treatment with bile salts. Table 11 shows the titres expressed as a percentage of both the non-encapsulated and encapsulated phages after lyophilization with respect to the titres before lyophilization. The values of the encapsulated phages were consistently much higher than those of the corresponding non-encapsulated phages ( $P < 0.05$ ): roughly 82% and 84% versus 22% and 47% for encapsulated and non-encapsulated UAB\_Phi20 and UAB\_Phi87, respectively. In the third phage, UAB\_Phi78, which was extremely sensitive to lyophilization, the variation between the values obtained for

encapsulated and non-encapsulated forms pre- and post-lyophilization was much greater: 15% versus 2%, respectively (Table 11).

**Table 11.** Influence of the lyophilization on the infectivity of bacteriophages.

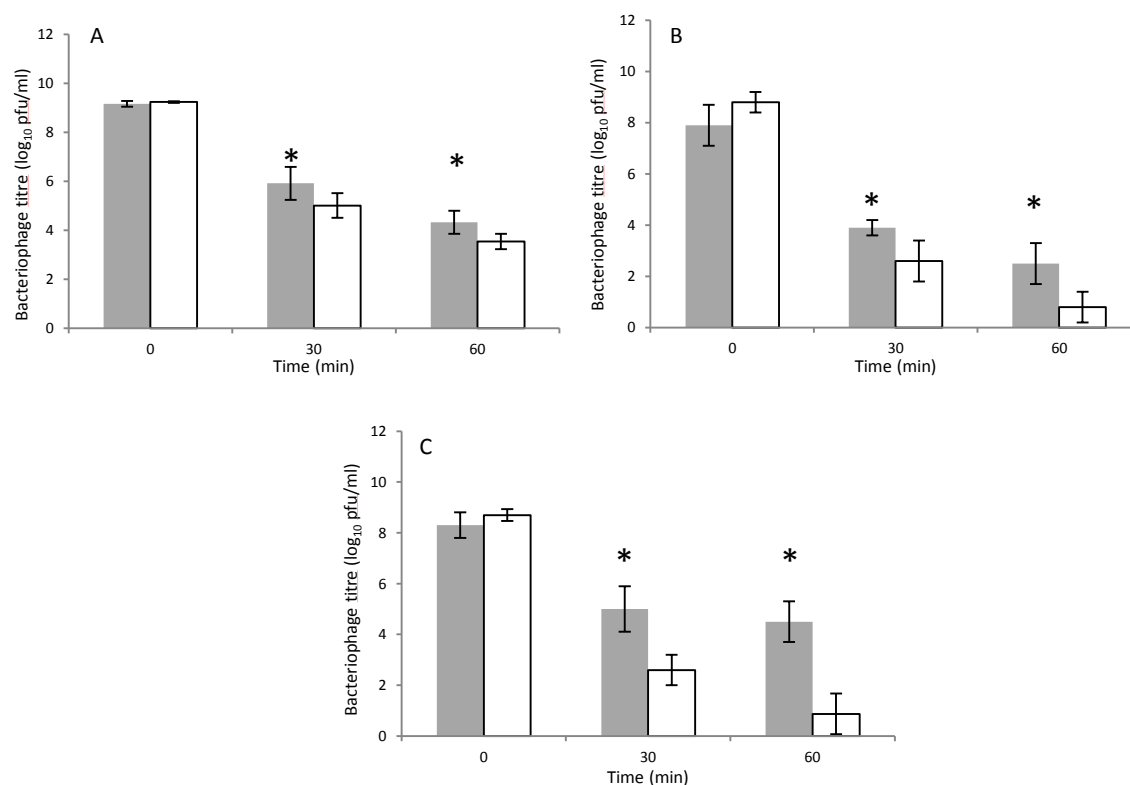
Bacteriophage	Liposome-encapsulation	Titre (%) <sup>a</sup>
UAB_Phi20	No	22.0 ± 13.4
	Yes	82.3 ± 15.4*
UAB_Phi78	No	2.0 ± 1.5
	Yes	15.1 ± 9.6*
UAB_Phi87	No	47.5 ± 12.1
	Yes	84.4 ± 16.9*

<sup>a</sup> The value represents percentage of the titre after lyophilization with respect to the titre before lyophilization. Each value is the average from six independent experiments ± standard error. \*  $P < 0.05$

#### 4.2.3. Encapsulated bacteriophage resistance to simulated gastric fluids

The acid stability of liposome-encapsulated and non-encapsulated phages were tested in simulated gastric fluid (SGF) at pH 2.8 for 60 min. For the non-encapsulated phages (Figure 22), after 30 min of incubation, titre losses of 4.2 log<sub>10</sub> (UAB\_Phi20), 6.2 log<sub>10</sub> (UAB\_Phi78) and 6.1 log<sub>10</sub> (UAB\_Phi87) were recorded. Further decreases occurred after 60 min: 5.7 log<sub>10</sub> (UAB\_Phi20), 8.0 log<sub>10</sub> (UAB\_Phi78), and 7.8 log<sub>10</sub> (UAB\_Phi87). In contrast, all three encapsulated phages were less prone to acidic degradation at both time points (Figure 22) ( $P < 0.05$ ). Thus, the titre losses after 30 min of incubation were 3.2 log<sub>10</sub> (UAB\_Phi20), 4.0 log<sub>10</sub> (UAB\_Phi78) and 3.3 log<sub>10</sub> (UAB\_Phi87). After 60 min of incubation, losses of 4.8 log<sub>10</sub>

(UAB\_Phi20), 5.4 log<sub>10</sub> (UAB\_Phi78), and 3.7 log<sub>10</sub> (UAB\_Phi87) were recorded. All encapsulated titre values were obtained after a treatment with bile salts.

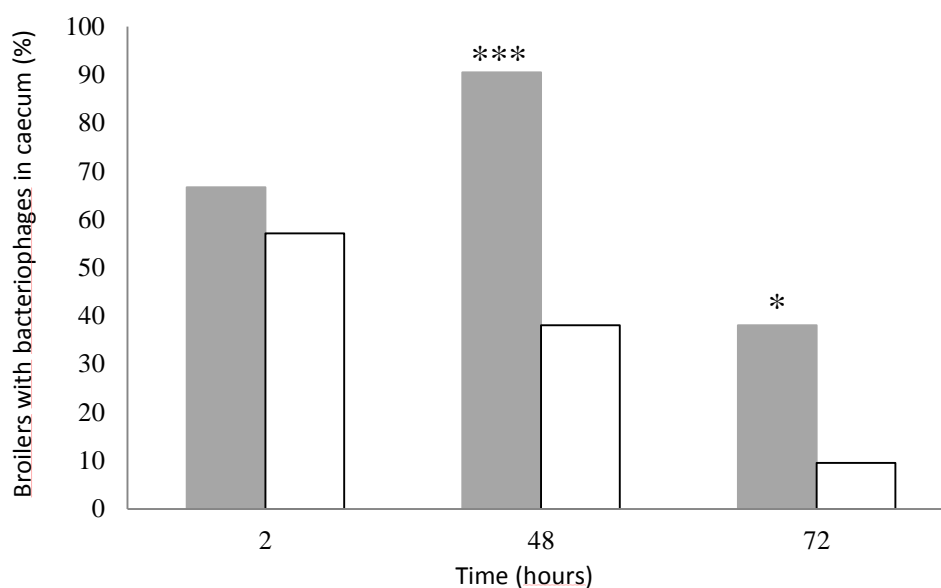


**Figure 22.** Stability of the non-encapsulated (white bars) and liposome-encapsulated bacteriophages (gray bars) in simulated gastric fluid (pH 2.8). (A) UAB\_Phi20, (B) UAB\_Phi78, and (C) UAB\_Phi87. Each value is the average from six independent experiments  $\pm$  standard deviation. \*,  $P < 0.05$ .

#### 4.2.4. Bacteriophage *in vivo* retention in chicken caecum

It was studied whether the intestinal residence time of phages UAB\_Phi20, UAB\_Phi78, and UAB\_Phi87 *in vivo* in broilers was prolonged by their encapsulation in cationic liposomes. For that purpose, two phage cocktails were prepared: one comprising a 1:1:1 mixture of the three liposome-encapsulated phages and the other a 1:1:1 mixture of the three non-encapsulated phages. In both cases, the final concentration was 10<sup>11</sup> pfu/ml. Figure 23 shows the percentage of chickens from each treatment group that contained phages in the caecum at each of the three time points tested (2, 48 and 72 h). After 2 h, there was no significant difference between

the two groups: 66.7% of the chickens administered the encapsulated phages versus 57.1% of those receiving the non-encapsulated phages. However, after 48 and 72 h the differences were significant: 90.5% versus 38.1% ( $P < 0.001$ ) and 38.1% versus 9.5% ( $P < 0.05$ ), respectively.



**Figure 23.** Persistence of non-encapsulated (white bars) and liposome-encapsulated (gray bars) bacteriophages in the caeca of broilers. \*  $P < 0.05$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

#### 4.2.5. Phage therapy against *Salmonella* in broiler chickens

The therapeutic efficacies of the two cocktails composed by the three non-encapsulated and liposome-encapsulated phages against *Salmonella* colonization in commercial broiler chickens were tested. As shown in Table 12, caecal *Salmonella* concentrations were lower in the two treated groups than in the untreated control group, but the two types of cocktails differed in their long-term efficacies. Thus, within the first 6 days post-infection (during which the broilers received their respective cocktails), the decreases in the *Salmonella* concentration in both treated groups were similar and significant compared to the control. The difference in the



decrease in *Salmonella* concentration between the non-encapsulated and control groups was significant until day 8, the first day in which treatment was no longer administered (reduction of 1.5 log<sub>10</sub>;  $P < 0.05$ ). In contrast, the differences between the encapsulated and control groups were significant until the end of the experiment (day 15;  $P < 0.001$ ). In this case, the reductions on days 8, 10, and 15 were 3.8, 3.9, and 1.5 log units, respectively. Moreover, when the efficacies of the two treatments were compared statistically, the reduction in *Salmonella* achieved using the encapsulated phages was significantly greater from day 8 ( $P < 0.05$ ) until the end of the experiment (day 15;  $P < 0.001$ ).

**Table 12.** *Salmonella* concentration in the caeca of broilers treated with liposome-encapsulated and non-encapsulated bacteriophages.

Day post-infection	<i>Salmonella</i> concentration in caecum (log <sub>10</sub> cfu/g) <sup>a</sup>		
	Control group	Encapsulated group	Non-encapsulated group
1	5.8 ± 0.7	3.8 ± 1.2 <sup>b</sup>	2.9 ± 2.3 <sup>b</sup>
3	6.6 ± 0.5	3.3 ± 2.6 <sup>b</sup>	3.3 ± 2.7 <sup>b</sup>
6	6.9 ± 0.8	3.2 ± 2.6 <sup>b</sup>	4.1 ± 2.1 <sup>b</sup>
8	6.7 ± 0.5	2.9 ± 2.8 <sup>b,c</sup>	5.2 ± 2.2 <sup>b</sup>
10	6.4 ± 1.0	2.5 ± 2.8 <sup>b,c</sup>	5.7 ± 1.9
15	5.2 ± 1.3	3.7 ± 1.4 <sup>b,c</sup>	6.3 ± 1.0

<sup>a</sup> Each value is the average from 14 caecum samples ± standard deviation.

<sup>b</sup> Statistical significance between the control and each treated group ( $P < 0.001$  at days 1 to 6;  $P < 0.001$  at day 8, 10 and 15 for encapsulated group, and  $P < 0.05$  at day 8 for non-encapsulated group).

<sup>c</sup> Statistical significance between the two treated groups ( $P < 0.05$  at days 8 and 10, and  $P < 0.001$  at day 15).

Phage concentrations in both treatment groups were very similar during the seven days of administration with values between 4.2 and 5.3 log units (Table 13). Only on day 1 post-infection the concentration of encapsulated phage was significantly higher than the non-encapsulated one ( $P < 0.05$ ). When the treatment was stopped (day 8) the concentration of the phages in the caeca started to decrease in the encapsulated group whereas the concentration of non-encapsulated phage remained stable, and increased at the end of the experiment (day 15;  $P < 0.05$ ).

**Table 13.** Bacteriophage concentration in the caeca of broilers treated with encapsulated and non-encapsulated bacteriophages.

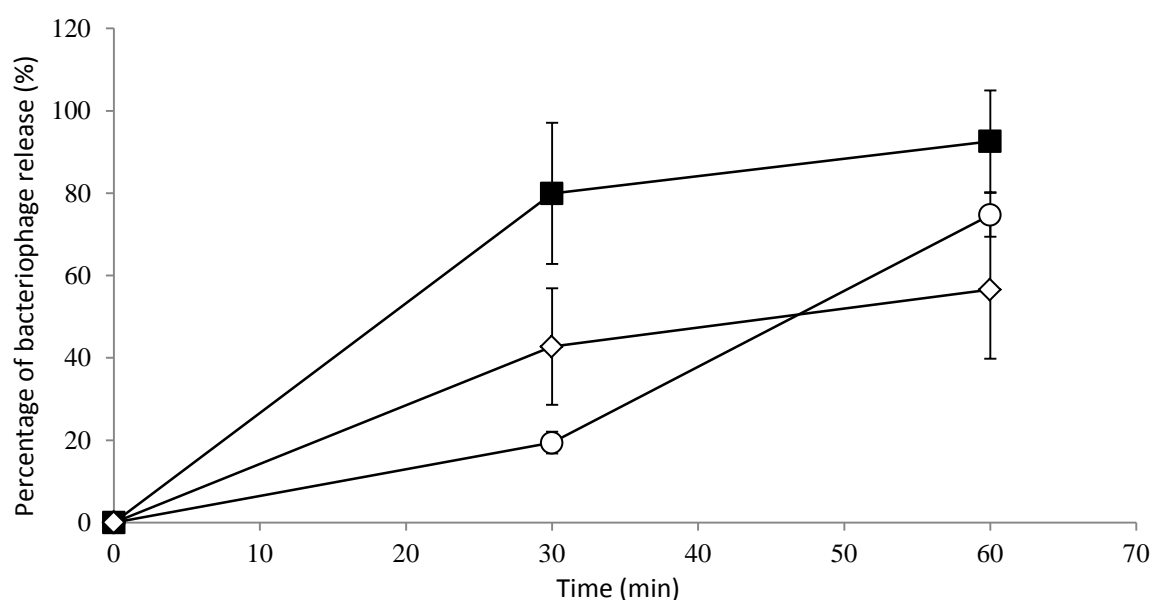
Days post-infection	Bacteriophage concentration in caecum ( $\log_{10}$ pfu/g) <sup>a</sup>	
	Encapsulated group	Non-encapsulated group
1	5.3 ± 0.5 <sup>b</sup>	4.2 ± 0.6
3	4.6 ± 1.4	4.7 ± 1.7
6	4.3 ± 0.7	4.0 ± 0.8
8	4.4 ± 0.7	4.2 ± 2.1
10	2.9 ± 1.4	4.4 ± 2.7
15	1.7 ± 2.3	5.1 ± 2.2 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Each value is the average from 14 caecum samples ± standard deviation.

<sup>b</sup> Statistical significance between the encapsulated and non-encapsulated groups ( $P < 0.05$ ).

#### 4.2.6. *In vitro* bacteriophage release by caecum content

The kinetic of the release of phages encapsulated in liposomes for up to 60 min with the caecal contents of the chickens was determined. After 30 min, the percentages of released phages were  $19.4\% \pm 2.6$ ,  $80\% \pm 17.2$ , and  $42.7\% \pm 14.1$  for UAB\_Phi20, UAB\_Phi78, and UAB\_Phi87, respectively (Figure 24). After 60 min, the corresponding percentages were  $74.7\% \pm 5.4$ ,  $92.6\% \pm 12.4$ , and  $56.6\% \pm 16.7$  (Figure 24).



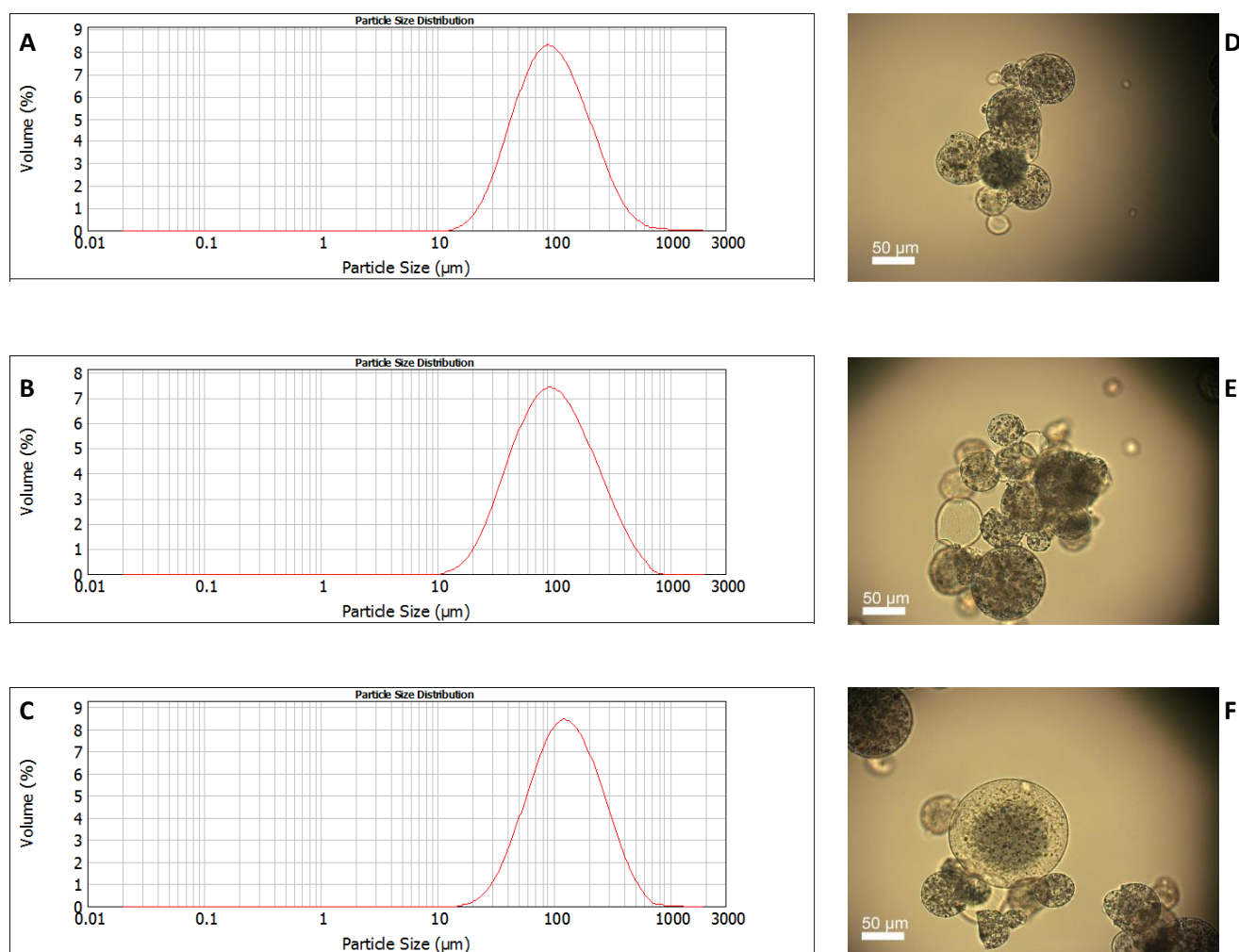
**Figure 24.** *In vitro* release of liposome-encapsulated bacteriophages UAB\_Phi20 (○), UAB\_Phi78 (■), and UAB\_Phi87 (◇) by the caecal contents of the chickens. Each value is the average from six independent experiments  $\pm$  standard deviation.

#### 4.3. Alginate-encapsulated bacteriophages

##### 4.3.1. Characterization of alginate-encapsulated phages

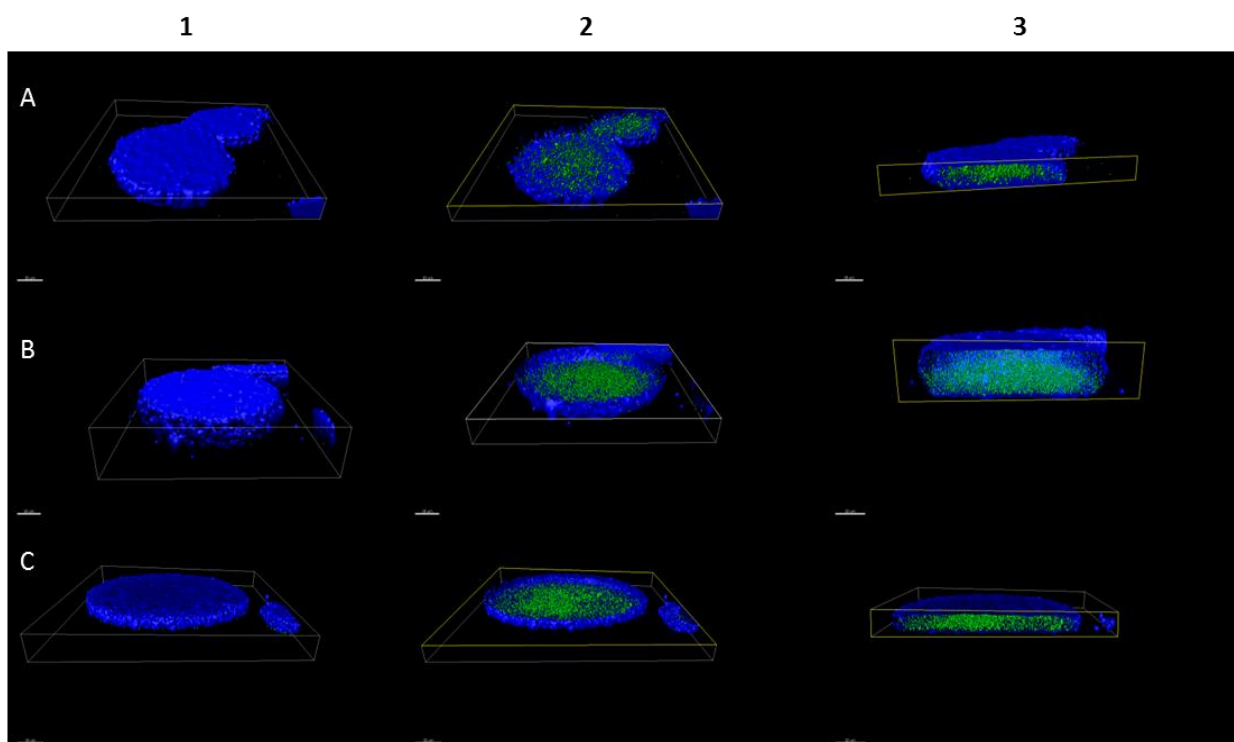
The three bacteriophages were encapsulated separately into alginate-CaCO<sub>3</sub> and their properties then characterized. The mean size of the alginate-encapsulated phages was  $123.7 \pm$

8.6  $\mu\text{m}$  for UAB\_Phi20,  $141.3 \pm 16.0 \mu\text{m}$  for UAB\_Phi78, and  $149.3 \pm 6.0 \mu\text{m}$  for UAB\_Phi87, as determined by laser diffraction (LD) (Figure 25).



**Figure 25.** Laser diffraction (LD) was used to obtain particle size distribution plots of alginate-encapsulated bacteriophages UAB\_Phi20 (A), UAB\_Phi78 (B), and UAB\_Phi87 (C). (D–F) Optical microscopy images of the corresponding bacteriophage. Scale bars, 50  $\mu\text{m}$ .

The physicochemical structure of the alginate-encapsulated phages was characterized by labeling both the phage and the alginate with SYBR gold or DAPI, respectively. Figure 26 shows the 3D spatial superimposition of the fluorescence intensities of the SYBR-gold-labeled (green) and DAPI-labeled (blue). The images confirmed that all of the phages had been properly encapsulated in the alginate- $\text{CaCO}_3$  capsules.



**Figure 26.** 3D confocal microscopy images of SYBR-gold-labeled bacteriophages UAB\_Phi20 (A), UAB\_Phi78 (B), and UAB\_Phi87 (C) (green) encapsulated in DAPI-labeled alginate capsules (blue). 3D images of the capsules are shown on the left (1), and the corresponding cross-sectional images in the middle (2) and on the right (3). Scale bars, 30  $\mu\text{m}$ .

The encapsulation yields, determined from triplicate encapsulations, were  $93\% \pm 1.5$  for UAB\_Phi20,  $99\% \pm 0.1$  for UAB\_Phi78, and  $99\% \pm 0.7$  for UAB\_Phi87 (Table 14). In addition, the stability of the alginate-encapsulated phages was evaluated by storing freshly encapsulated phages at  $4^{\circ}\text{C}$  for 6 months and then again measuring the percentage of encapsulated phages. As shown in Table 14, the encapsulation percentage of cold-stored UAB\_Phi20 and UAB\_Phi78 were slightly lower than those of freshly encapsulated phages, whereas this value was almost unaltered for the cold-stored encapsulated UAB\_Phi87 phage. This experiment demonstrated the stability of the alginate capsules when stored at  $4^{\circ}\text{C}$  for 6 months.

**Table 14.** Percentage of (%) alginate-encapsulated phages after their storage at 4°C for 6 months.

Bacteriophage	Fresh <sup>a</sup>	Stored at 4°C <sup>a</sup>	
		Three months	Six months
UAB_Phi20	98 ± 1.5	84 ± 0.7	74 ± 8.6
UAB_Phi78	99 ± 0.1	89 ± 2.3	73 ± 4.2
UAB_Phi87	99 ± 0.7	92 ± 5.9	94 ± 5.2

<sup>a</sup> Each value represents the average from three independent experiments ± standard deviation.

#### 4.3.2. Lyophilisation of encapsulated bacteriophages

Alginate capsules containing UAB\_Phi20 phage were lyophilized to obtain a powder-based product suitable for long-term storage and mixing with animal feed. To protect the phage during the freeze-drying process, trehalose (97), mannitol, or sucrose plus powdered milk was added as a cryoprotectant (88) to the mixture of alginate, CaCO<sub>3</sub>, and phage. Likewise, the non-encapsulated UAB\_Phi20 phage was also lyophilized using the same cryoprotectants. The powders obtained by lyophilization were reconstituted in aqueous MgSO<sub>4</sub> (10 mM) and the phage titre was then determined. Table 15 shows the remaining percentage titre of alginate-encapsulated or non-encapsulated UAB\_Phi20 phage after lyophilisation. This process dramatically decreased the titres of the alginate-encapsulated and non-encapsulated UAB\_Phi20 phage, regardless of the cryoprotectant used. In fact, cryoprotection was more effective (>10 fold) in non-encapsulated than in encapsulated bacteriophage UAB\_Phi20.

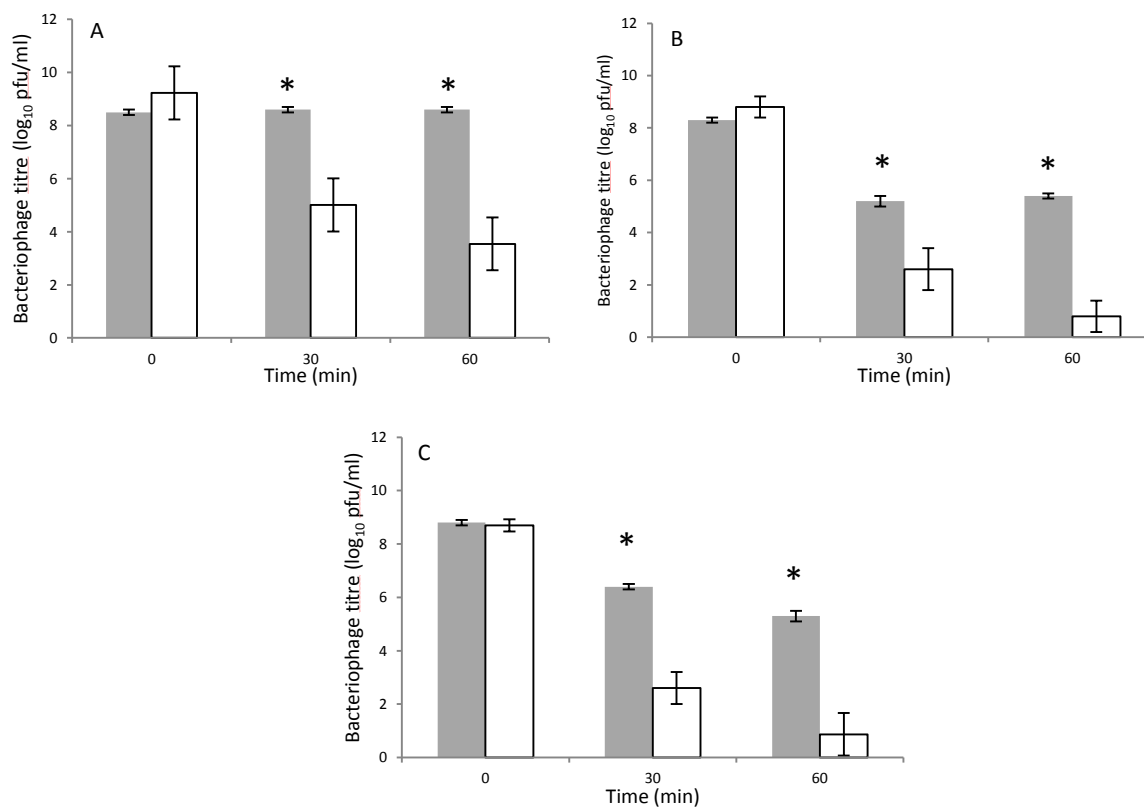
**Table 15.** Protective effect of several cryoprotectants on UAB\_Phi20 infectivity during lyophilisation procedure.

Cryoprotectant	Alginate-encapsulation	Titre (%) <sup>a</sup>
Trehalose	No	23.9 ± 5.2
	Yes	2.0 ± 1.0
Mannitol	No	22.1 ± 1.7
	Yes	2.3 ± 1.2
Sucrose + powdered milk	No	24.6 ± 3.7
	Yes	2.5 ± 0.9

<sup>a</sup> The value represents the percentage of the titre after lyophilization with respect to the titre before lyophilization. Each value is the average from three independent experiments ± standard deviation.

#### 4.3.3. Stability of the encapsulated bacteriophages in simulated gastric fluid

The acid stability of alginate-encapsulated phages was tested in simulated gastric fluid (SGF) at pH 2.8 for 60 min. The values of the non-encapsulated phages used for comparison were the same as reported in Sect. 4.2.3. The alginate-encapsulated phages proved to be much more stable under acidic conditions than their non-encapsulated counterparts (Figure 27) ( $P < 0.05$ ). Thus, titre losses of phage UAB\_Phi78 and phage UAB\_Phi87 after 30 min of incubation were 3.1 and 2.4 log<sub>10</sub>, respectively. After 60 min of incubation, these values were 2.9 and 3.5 log<sub>10</sub>. Remarkably, there was no reduction in the titre of UAB\_Phi20 after a 60-min incubation with SGF.

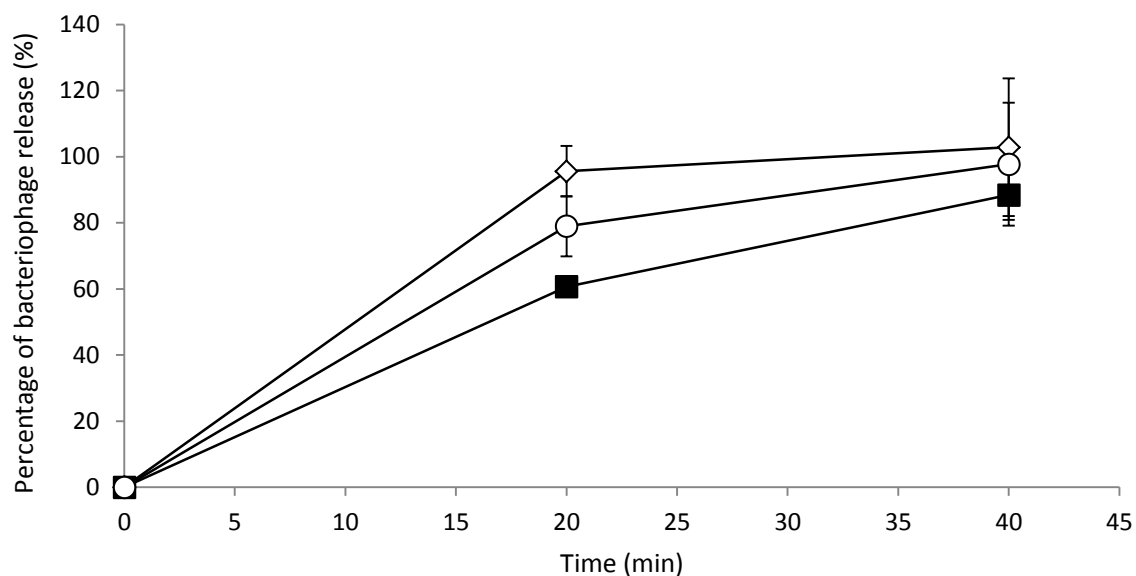


**Figure 27.** Stability of the non-encapsulated (white bars) and alginate-encapsulated (gray bars) bacteriophages in simulated gastric fluid (pH 2.8). (A) UAB\_Phi20, (B) UAB\_Phi78, and (C) UAB\_Phi87. Each value is the average of six independent experiments  $\pm$  standard deviation. \* $P < 0.05$ .

#### 4.3.4. Encapsulated phage release by simulated intestinal fluid

The kinetics of phage release from alginate-CaCO<sub>3</sub> capsules incubated for up to 40 min with simulated intestinal fluid (SIF) was determined. After 20 min of incubation in SIF, the percentage of release of UAB\_Phi20, UAB\_Phi78, and UAB\_Phi87 was 79.0%  $\pm$  9.1, 60.7%  $\pm$  2.4, and 95.6%  $\pm$  7.6, respectively (Figure 28) whereas after 40 min, the release was almost complete for all phages (percentages of 97.7%  $\pm$  18.6, 88.4%  $\pm$  7.6, and 100%  $\pm$  20.8, respectively) (Figure 28).

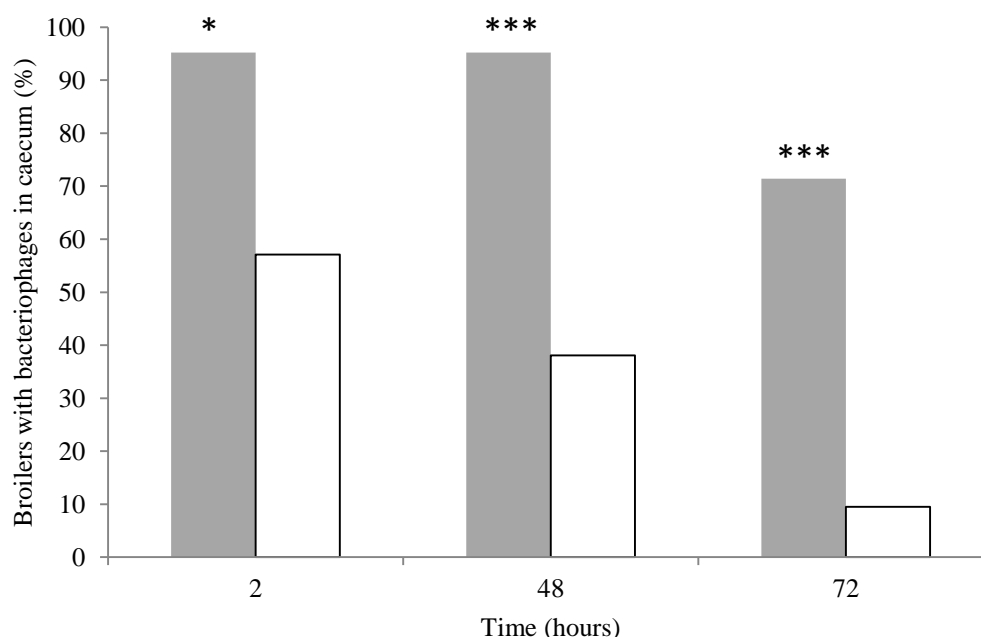




**Figure 28.** *In vitro* release of alginate-encapsulated bacteriophages UAB\_Phi20 (○), UAB\_Phi78 (■), and UAB\_Phi87 (◇) incubated in simulated intestinal fluid. Each value is the average of three independent experiments  $\pm$  standard deviation.

#### 4.3.5. *In vivo* retention of bacteriophage in chicken caecum

The residence time of alginate-encapsulated UAB\_Phi20, UAB\_Phi78, and UAB\_Phi87 bacteriophages in the caecum of broilers was studied. Preparation of the phage cocktail used was similar to that described for liposome-encapsulated phages. The values of the non-encapsulated phages used for comparison were those described in Sect. 4.2.4. The residence time of the non-encapsulated and alginate-encapsulated phages differed significantly at all three time points tested. Thus, after 2 h the encapsulated phages were retained in 95.2% of the chickens whereas the non-encapsulated phages were retained in only 57.1% ( $P < 0.05$ ) (Figure 29). After 48 and 72 h the differences were still significant ( $P < 0.001$ ): 95.2% versus 38.1% and 71.4% versus 9.5%, respectively (Figure 29).



**Figure 29.** Persistence of non-encapsulated (white bars) and alginate-encapsulated (gray bars) bacteriophages in the caeca of broilers. \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$

#### 4.3.6. Bacteriophage therapy against *Salmonella* infection in broiler chickens

The efficacy of two cocktails prepared from the three non-encapsulated and alginate-encapsulated phages against *Salmonella* infection of commercial broiler chickens was examined. The values of *Salmonella* concentration in the control and non-encapsulated groups were the same as reported in Sect. 4.2.5. The results showed that the caecal *Salmonella* concentration was lower in both phage treated groups than in the untreated control group, but the two cocktails differed in their long-term efficacies (Table 16). Thus, within the first 6 days post-infection, the reductions in the *Salmonella* concentration in both treated groups were similar and significant compared to the control ( $P < 0.001$ ). Thereafter, the reduction in the *Salmonella* concentration in chickens administered the cocktail of non-encapsulated phages was significant until day 8, the first day after treatment cessation (1.5  $\log_{10}$  reduction;  $P < 0.05$ ). By contrast, the protection achieved with the cocktail of encapsulated phages versus the untreated control group was significant until day 15 post-infection (days 8 and 10:  $P < 0.001$ ;

day 15:  $P < 0.05$ ), with reductions in *Salmonella* counts on days 8, 10, and 15, of 3.6, 3.4, and 1.7  $\log_{10}$ , respectively. In addition, the decrease of *Salmonella* in chickens treated with the alginate-encapsulated cocktail was significantly greater from day 8 until the end of the experiment (days 8 and 10:  $P < 0.001$ ; day 15:  $P < 0.05$ ) when compared with the non-encapsulated ones. However, on day 1 post-infection, a larger reduction of *Salmonella* counts was obtained with the non-encapsulated phages ( $P < 0.05$ ). Moreover, the phage concentration was higher in chickens in the non-encapsulated group than in those in the alginate-encapsulated group (4.0–5.1  $\log_{10}$  versus 0.2–3.8  $\log_{10}$ , respectively) (Table 17), but the difference was significant only on day 15 post-infection ( $P < 0.001$ ).

**Table 16.** *Salmonella* concentration in the caeca of broilers treated with alginate-encapsulated and non-encapsulated bacteriophages.

Day post-infection	<i>Salmonella</i> concentration in caecum ( $\log_{10}$ cfu/g) <sup>a</sup>		
	Control group	Encapsulated group	Non-encapsulated group
1	5.8 ± 0.7	4.5 ± 1.4 <sup>b</sup>	2.9 ± 2.3 <sup>b,c</sup>
3	6.6 ± 0.5	4.0 ± 1.5 <sup>b</sup>	3.3 ± 2.7 <sup>b</sup>
6	6.9 ± 0.8	3.8 ± 2.2 <sup>b</sup>	4.1 ± 2.1 <sup>b</sup>
8	6.7 ± 0.5	3.1 ± 2.5 <sup>b,c</sup>	5.2 ± 2.2 <sup>b</sup>
10	6.4 ± 1.0	3.0 ± 0.9 <sup>b,c</sup>	5.7 ± 1.9
15	5.2 ± 1.3	3.5 ± 2.1 <sup>b,c</sup>	6.3 ± 1.0

<sup>a</sup> Each value is the average from 14 caecum samples ± standard deviation.

<sup>b</sup> Statistical significance between the control and each treated group ( $P < 0.001$  at days 1 to 6; for  $P < 0.001$  at days 8 and 10 for the encapsulated group, and  $P < 0.05$  at day 8 for non-encapsulated group and at day 15 for encapsulated group).

<sup>c</sup> Statistical significance between the two treated groups  $P < 0.05$  at days 1 and 8, and  $P < 0.001$  on days 10 and 15.

**Table 17.** Bacteriophage concentrations in the caeca of broilers treated with alginate-encapsulated and non-encapsulated bacteriophages.

Days post-infection	Bacteriophage concentration in caecum ( $\log_{10}$ pfu/g) <sup>a</sup>	
	Encapsulated group	Non-encapsulated group
1	3.8 ± 1.0	4.2 ± 0.6
3	3.5 ± 1.0	4.7 ± 1.7
6	3.6 ± 1.4	4.0 ± 0.8
8	3.8 ± 1.2	4.2 ± 2.1
10	3.0 ± 1.7	4.4 ± 2.7
15	0.2 ± 0.6	5.1 ± 2.2 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>, Each value is the average from 14 caecum samples ± standard deviation.

<sup>b</sup>, Statistical significance between the encapsulated and non-encapsulated groups ( $P < 0.001$ ).

# DISCUSIÓN



## 5. Discusión

Los patógenos entéricos como *Salmonella* siguen siendo un problema relevante en el ámbito de producción animal. Por ello, el desarrollo de productos basados en bacteriófagos capaces de reducir o eliminar a este patógeno, puede contribuir a mejorar la seguridad de los productos derivados de explotaciones animales, a la vez que tendrían un impacto económico positivo en este sector productivo. En este sentido, se requieren estudios que generen el máximo conocimiento sobre la biología molecular y las formulaciones de bacteriófagos para mejorar su eficacia en terapia fágica y garantizar, al mismo tiempo, su inocuidad.

### 5.1. Características relevantes de la biología molecular de los bacteriófagos UAB\_Phi20, UAB\_Phi78 y UAB\_Phi87

Como se ha comentado en la introducción de esta memoria, los fagos virulentos de *Salmonella* UAB\_Phi20, UAB\_Phi78 y UAB\_Phi87 fueron aislados y caracterizados previamente por nuestro grupo. Estos trabajos demostraron que el genoma de los fagos UAB\_Phi20, UAB\_Phi78 y UAB\_Phi87 no codifica determinantes de virulencia conocidos (54, 57) y que un cóctel integrado por los tres fagos redujo significativamente la concentración de *Salmonella* en el ciego de pollos SPF (74, 75). En estos estudios, también se determinó que las constantes de adsorción de los tres fagos al infectar *S. Typhimurium* fueron muy similares, con valores de  $1,2 \times 10^{-9}$ ,  $1,2 \times 10^{-9}$  y  $1,1 \times 10^{-9}$  ml cfu<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> para los fagos UAB\_Phi20, UAB\_Phi78 y UAB\_Phi87, respectivamente (54, 57). Sin embargo, el tamaño de explosión fue de 95 y 87,7 pfu/cel para los fagos UAB\_Phi20 y UAB\_Phi78, mientras que el del fago UAB\_Phi87 fue de 55 pfu/cel (54, 57). También es importante señalar que el genoma de los fagos UAB\_Phi78 y UAB\_Phi87 codifica su propia DNA polimerasa (54, 57), mientras que la replicación del DNA del fago UAB\_Phi20 debe depender de la DNA polimerasa III de *Salmonella*. No obstante, se desconocen ciertos aspectos cruciales de su biología como son las bases moleculares que están vinculadas a las distintas

cinéticas que presentan dichos fagos al infectar y clarificar cultivos de *Salmonella* y también cuál es el sistema de empaquetamiento que utilizan y si son capaces de promover transducción generalizada. Por lo que se refiere al primer aspecto, se hipotetizó que, dado que la constante de adsorción de los tres fagos es del mismo orden, el hecho de que el tiempo de clarificación de los cultivos fuera distinto para cada uno de ellos podría reflejar características diferentes en su replicación. En este sentido, los resultados obtenidos revelaron que, tras su adsorción e inyección de su DNA, el fago UAB\_Phi78 fue el primero en iniciar su replicación, detectándose su DNA a los 10 min de infectar los cultivos, mientras que el DNA de los fagos UAB\_Phi20 y UAB\_Phi87 no fue amplificado hasta los 20 min de la infección (Figura 15). La diferencia de 10 min que se observa entre el inicio de la fase de replicación del bacteriófago UAB\_Phi78 y el de los otros dos fagos podría atribuirse al hecho de que este fago, al igual que los fagos T7 de *E. coli* y SP6 de *Salmonella* (52), codifica una RNA polimerasa. Se ha descrito que la RNA polimerasa del fago T7 posee una elevada eficiencia y especificidad por los promotores de la expresión génica intermedia la cual incluye genes relacionados con la replicación como la propia DNA polimerasa del fago (52). De hecho, esta característica ha sido la base del desarrollo de determinados sistemas de clonación y de vectores de expresión proteica (52). Según lo comentado anteriormente, es posible pensar que la RNA polimerasa del fago UAB\_Phi78 sea la responsable de una rápida transcripción de la DNA polimerasa propia de este fago y de que inicie su replicación antes que los otros dos fagos estudiados. Por otra parte, aunque existe un retraso de 10 min entre el inicio de la replicación del DNA del fago UAB\_Phi20, respecto al fago UAB\_Phi78, la replicación tiene una duración similar (Figura 15). Dado que el tamaño de explosión de ambos fagos y las dimensiones de sus genomas son del mismo orden, puede pensarse que la procesividad de la DNA polimerasa del fago UAB\_Phi78 es muy similar a la de *Salmonella* que es la que interviene en la replicación del fago UAB\_Phi20.



En el caso del fago UAB\_Phi87, los resultados indicaron que la duración de la replicación se prolonga más de 120 min (Figura 15). Este tiempo es muy superior al que se esperaría si la procesividad de su DNA polimerasa fuera la misma que las que intervienen en la replicación de los otros dos fagos estudiados. Así, dado que el tamaño del genoma del fago UAB\_Phi87 es el doble del de los otros dos fagos, sería esperable que se detectara la amplificación del DNA fágico hasta los 80 min de infección aproximadamente; tiempo muy inferior a los 120 min observados. Este resultado podría estar relacionado con la regulación de la lisis bacteriana. Se ha descrito que algunos fagos, como T4, son capaces de inhibir la lisis bacteriana de forma indefinida, en función de la cantidad de partículas víricas que hay en el entorno de la célula infectada (122, 123), ya que se inhibe la lisis cuando una célula infectada por el fago T4 sufre una reinfección por otra partícula infectiva de T4 a los 5 min de la primera infección (124). Se ha demostrado que, tras la adsorción del bacteriófago T4 reinfectante, la membrana citoplasmática no se perfora para permitir la inyección del DNA fágico, sino que se produce la expulsión de dicho DNA al periplasma de la bacteria hospedadora (124). De algún modo, esta infección abortiva activa a la proteína RI que, a su vez, inhibe la actividad de la holina del fago T4. Esta situación se mantiene siempre y cuando la célula sea reinfectada a intervalos de tiempo inferiores a 10 min. Si ello ocurriera durante un largo periodo de tiempo, la inhibición de la actividad de la holina sería indefinida y se acumularían viriones en el citoplasma celular hasta un valor 10 veces superior al normal (125). Además, el genoma del bacteriófago T4, al igual que el bacteriófago UAB\_Phi87, contiene también los genes *rIIA* y *rIIB*, habiéndose sugerido que sus productos podrían estar relacionados con la inhibición de la lisis comentada anteriormente (124). Por ello, podría pensarse que el prolongado tiempo de replicación detectado para este fago puede estar relacionado con un fenómeno de este tipo.

Los resultados obtenidos en la replicación concuerdan claramente con el hecho de que la lisis de los cultivos bacterianos infectados a una misma  $MOI_{input}$  con estos fagos tenga lugar a tiempos distintos, siendo el fago UAB\_Phi78 el primero en lizarlos y el fago UAB\_Phi87 el último en producir la clarificación de dichos cultivos.

Por lo que se refiere al segundo aspecto estudiado en este trabajo, debe considerarse que, una vez se han obtenido los concatémeros de los genomas fágicos, las terminasas son las encargadas de su procesamiento y también de participar en el proceso de su empaquetamiento. Como se ha indicado en la introducción de esta memoria, estas enzimas están formadas por dos subunidades: una pequeña que se encarga del reconocimiento de secuencias específicas en el genoma del fago y otra mayor que corta el DNA fágico tras su reconocimiento. Esta última es la responsable de generar los extremos de los cromosomas fágicos que contienen los viriones. Trabajos anteriores realizados por nuestro grupo demostraron que los tres fagos estudiados no tenían extremos *cos*, por ello dichos extremos únicamente podían presentar permutaciones cíclicas o bien DTR. La elevada similitud del genoma del fago UAB\_Phi20 con algunos de los fagos del género tipo P22, sugirió que su mecanismo de empaquetamiento debía ser por llenado de cabeza y también que los extremos de su cromosoma debían ser permutaciones cíclicas. Esto se vio reforzado cuando se identificó una secuencia *pac* (5'-GAAGACTTATCTGAGGTCGTTA-3') en su genoma que difería sólo en dos nucleótidos respecto a la secuencia *pac* (5'-GAAGATTTATCTGAAGTCGTTA-3') del fago P22 (126). La mayoría de los fagos que utilizan el mecanismo de empaquetamiento del DNA de llenado de cabeza presentan un fragmento submolar en sus perfiles de restricción que típicamente contiene la secuencia *pac* (40). La banda de restricción correspondiente a dicho fragmento es de una menor intensidad, ya que sólo se genera en el primer evento de cada serie de empaquetamiento de DNA y, únicamente, está presente en aquellos fagos que poseen una

terminasa que corta en la secuencia *pac* o cerca de esta. No obstante, existe otro grupo de fagos, como el fago ES18 de *Salmonella* y el fago sf6 de *Shigella flexneri*, que también empaquetan su DNA por llenado de cabeza, pero poseen unas terminasas que, tras el reconocimiento de la secuencia *pac*, se desplazan una distancia sustancial antes de realizar el corte en el concatémero y dar comienzo al empaquetamiento (127, 128). En estos casos, es muy difícil observar un fragmento submolar en los perfiles de restricción, debido a la imprecisión del corte de dichas terminasas. Los resultados obtenidos tras la digestión del DNA del fago UAB\_Phi20 con la enzima EcoRI mostraron que en el perfil de restricción obtenido se podía observar un fragmento submolar de 4.007 pb, del mismo tamaño que el descrito en el caso del fago P22 (40) (Figura 16). Por lo tanto, el conjunto de estos resultados indican que el fago UAB\_Phi20 utiliza un sistema de empaquetamiento muy similar al de P22 y que su terminasa debe reconocer una secuencia *pac* casi idéntica a la de este fago.

Con el objetivo de determinar si los fagos UAB\_Phi78 y UAB\_Phi87 presentaban DTR en el extremo de sus cromosomas, su DNA fue tratado con Bal31 y posteriormente digerido con las enzimas HindIII y SpeI, respectivamente. En ambos casos se observó la degradación simultánea de dos fragmentos de DNA en su perfil de restricción (Figura 17), lo cual es típico de fagos cuyo genoma presenta en sus extremos DTR sin permutaciones cíclicas. El siguiente paso fue identificar la secuencia de dichas DTR a través de la localización de los fragmentos que se degradaban en estudios de restricción *in silico* de los genomas de ambos fagos. Ello nos permitió identificar las secuencias de estas bandas y diseñar diversos pares de cebadores para secuenciarlas y poder corroborar que las secuencias obtenidas *in silico* eran las correctas. Finalmente, mediante la secuenciación del DNA genómico de ambos fagos se identificaron dichas DTR, las cuales presentaron un tamaño de 179 pb para el fago UAB\_Phi78 y de 608 pb para el fago UAB\_Phi87. Ello nos permitió llegar a la conclusión que el tamaño del DNA

contenido en los viriones de los fagos UAB\_Phi78 y UAB\_Phi87 es de 44,1 kb y de 87,6 kb, respectivamente.

Se ha descrito que, si se comparan las secuencias aminoacídicas de las subunidades mayores de las terminasas, es posible agrupar a los fagos en función del tipo de extremo generado tras el corte introducido por estas enzimas (128). Por tanto, un estudio de estas características permite predecir la estructura terminal del cromosoma fágico en el virión, aunque no se disponga de evidencias experimentales previas (128). Para averiguar si esta predicción se cumplía con los bacteriófagos estudiados en este trabajo, se comparó la secuencia de la subunidad mayor de las terminasas de los fagos UAB\_Phi20, UAB\_Phi78 y UAB\_Phi87 con la de fagos de distintos géneros, los cuales presentan extremos que pueden agruparse en: i) repeticiones terminales con permutación cíclica del género tipo P22; y ii) DTR cortas de los géneros tipo T7, SP6 y FelixO1. Dicha comparación mostró que el fago UAB\_Phi20 se ubica en el grupo de fagos con empaquetamiento por llenado de cabeza del género tipo P22. Asimismo, el fago UAB\_Phi78 se incluyó en el grupo de fagos del género tipo SP6, lo cual está de acuerdo con que presente una DTR de un tamaño similar a la del fago SP6 de *Salmonella* de 174 pb (55). Finalmente, el fago UAB\_Phi87 se agrupó en el género tipo FelixO1, cuyos fagos, como el FO1a de *Salmonella*, presentan repeticiones terminales de más de 500 pb (129). (Figura 19). Así pues, los resultados de esta predicción concuerdan totalmente con los anteriormente indicados y corroboran que el fago UAB\_Phi20 se incluyera en el género tipo P22 y los fagos UAB\_Phi78 y UAB\_Phi87 en los géneros tipo SP6 y tipo FelixO1, respectivamente. Por otra parte, cabe también resaltar que en la Figura 19 se observa claramente que los fagos con DTR cortas de los géneros tipo T7 y tipo SP6 pertenecen a dos grupos distintos, lo cual coincide plenamente con la última clasificación de la ICTV, en la cual se separaron en dos los fagos que anteriormente pertenecían al género tipo T7 (50).

Actualmente está descrito que los fagos que utilizan el mecanismo de llenado de cabeza para el empaquetamiento de su DNA promueven con mayor eficiencia transducción generalizada que aquellos que emplean otros sistemas (40). Ello se debe a una menor especificidad de reconocimiento del sitio *pac* por sus terminasas. Por ello, con una determinada frecuencia, dichas terminasas pueden reconocer regiones parecidas al sitio *pac* en el genoma del hospedador, lo cual conduce a su empaquetamiento y da lugar a partículas de transducción generalizada. Por el contrario, los fagos que empaquetan estrictamente unidades genómicas poseen terminasas muy específicas que deben reconocer en el concatémero unas secuencias al inicio y al final del cromosoma del fago para poder completar adecuadamente el empaquetamiento. Por lo tanto, es muy improbable que el genoma de la cepa hospedadora contenga dos puntos de reconocimiento que sean parecidos a los que reconoce la terminasa y que, además, estén adecuadamente espaciados para que el DNA procesado pueda ser introducido en la cápside fágica. En consecuencia, el fago UAB\_Phi20 podría promover intercambios genéticos mediante transducción generalizada a una mayor frecuencia que los fagos UAB\_Phi78 y UAB\_Phi87. En este punto, también debe considerarse que la transducción promovida por fagos virulentos, como los que son objeto de estudio en este trabajo, no es fácil que ocurra, ya que los posibles transductantes serán infectados por fagos y se acabará produciendo su lisis. Por ello, es conveniente estudiar este fenómeno en el laboratorio utilizando una  $MOI_{input}$  baja. A este respecto, en los experimentos de transducción realizados con los bacteriófagos UAB\_Phi20, UAB\_Phi78 y UAB\_Phi87 no se detectó transducción para el marcador cromosómico triptófano a valores de  $MOI_{input}$  de 1 y 0,01. En contraste, se detectó la transducción de dicho marcador con el bacteriófago P22 y también con el mutante de alta frecuencia de transducción P22*int7*. Por ello, puede concluirse que, en las condiciones

experimentales utilizadas, los fagos UAB\_Phi20, UAB\_Phi78 y UAB\_Phi87 no promueven transducción generalizada.

## 5.2. Optimización de la terapia fágica por vía oral

La vía oral es la más adecuada para la aplicación de terapia fágica en el control de patógenos entéricos como *Salmonella* en una explotación animal de grandes dimensiones. Ello se debe a la posibilidad de utilizar el pienso o el agua de bebida como vehículos de su administración, permitiendo al mismo tiempo que los bacteriófagos alcancen rápidamente el intestino que es donde se encuentra el patógeno diana. Sin embargo, esta vía de administración presenta dos inconvenientes. El primero de ellos es la falta de estabilidad de los bacteriófagos en ambientes extremadamente ácidos, como el estómago de los animales (130) y el segundo, es el escaso tiempo que los bacteriófagos permanecen en el tracto gastrointestinal para producir el efecto terapéutico deseado (71, 74). Junto a estos dos claros inconvenientes, es necesario mencionar que la administración por vía oral no garantiza un efecto a nivel sistémico de los bacteriófagos, punto de vital importancia para un tratamiento eficaz contra patógenos entéricos como *Salmonella*, con capacidad para penetrar a través del epitelio intestinal y colonizar órganos internos. Actualmente, la capacidad de translocación de los bacteriófagos a través de la mucosa intestinal es un tema controvertido. Se ha postulado que los bacteriófagos sólo podrían llegar a órganos internos a una baja concentración, gracias a la translocación mediante células bacterianas diana infectadas o a través de su fagocitosis por acción de las células del sistema inmunitario (131), condiciones que difícilmente permitirán una terapia fágica efectiva.

Se hipotetizó que dichos inconvenientes podrían superarse parcial o totalmente si se administraban bacteriófagos encapsulados en materiales biocompatibles. De entre los diversos materiales posibles, se escogieron los lípidos y el alginato-CaCO<sub>3</sub> para la encapsulación de los fagos, ya que, como se ha comentado en la introducción de esta memoria, sus propiedades

fisicoquímicas parecían ser las más adecuadas para alcanzar el objetivo propuesto y, además, ambos materiales han sido ampliamente utilizados en la encapsulación de moléculas biológicas sin provocar pérdidas de su actividad (132, 133).

La encapsulación de fagos en envueltas lipídicas se realizó a través de la técnica de inclusión de los fagos en liposomas, basada en la hidratación de una película lipídica (114). Para la formación de dicha película se probaron distintas mezclas con diferentes proporciones de lípidos con carga final positiva o neutra, las cuales fueron hidratadas con preparaciones de fagos a elevadas concentraciones ( $10^{11}$  pfu/ml). En general, los fagos son partículas que presentan potenciales Z negativos, en consecuencia, se observó que el aumento de la proporción de lípidos catiónicos mejoraba el rendimiento de encapsulación obtenido. Ello se debe al incremento de la afinidad entre las vesículas lipídicas formadas y los bacteriófagos. No obstante, elevadas proporciones de lípidos catiónicos provocaron la agregación y precipitación de las vesículas. Por ello, se modificó la concentración de lípidos catiónicos, con el fin de determinar las condiciones que permitieran un mayor rendimiento de encapsulación, a la vez que se obtenían vesículas que no precipitaran en una suspensión acuosa. Finalmente, se seleccionó la mezcla compuesta por DLPC (+), Chol-PEG6000, colesterol y colesteril (+) a una proporción molar de 1:0.1:0.2:0.7 (121). Sin embargo, en estas condiciones, las vesículas fueron de un tamaño comprendido entre 0,5 y 5  $\mu\text{m}$ . Estas dimensiones reducían la estabilidad de las vesículas lipídicas, provocando una rápida liberación del producto encapsulado. Para solucionar este inconveniente, los liposomas se homogeneizaron mediante un proceso de extrusión con dos tamaños de membrana (400 nm y 100 nm). Se observó que la extrusión con membranas de 100 nm causaba una reducción en la eficiencia de encapsulación, lo cual fue atribuido a la obtención de vesículas de un tamaño demasiado pequeño para la correcta encapsulación de los bacteriófagos. En cambio, la extrusión a través de membranas de 400 nm no modificó la

eficiencia de encapsulación. Por ello, se escogió esta metodología para la encapsulación de fagos en vesículas lipídicas.

Para la encapsulación en alginato-CaCO<sub>3</sub> se empleó una mezcla de alginato al 1,8%, 1% de CaCO<sub>3</sub> y fago a 10<sup>11</sup> pfu/ml, junto con un baño de gelificación con un 1,8% de CaCl<sub>2</sub>. Inicialmente, se utilizó la técnica de la atomización por secado, ya que de esta manera se podrían obtener cápsulas de un tamaño inferior a 100 µm. No obstante, se observó una pérdida casi completa del título de los bacteriófagos encapsulados, lo cual se atribuyó al proceso de desecación de los aerosoles formados tras la atomización. Por ello, se consideró conveniente mantener la hidratación de las cápsulas de alginato-CaCO<sub>3</sub>, por lo que se probó la eficiencia de encapsulación empleando la metodología de goteo. Los resultados obtenidos demostraron que no se perdía título de bacteriófago y que se conseguía una elevada eficiencia de encapsulación. No obstante, con este procedimiento el tamaño de las cápsulas fue de 1 a 2 mm, hecho no deseable ya que dificultaría mucho su uso práctico, dado que precipitarían rápidamente en medio líquido y tampoco serían útiles para su formulación en piensos. Por ello, se diseñó un sistema de extrusión basado en una pulverización a través de una boquilla, con la finalidad de reducir las dimensiones de las cápsulas y mantener la eficiencia de encapsulación obtenida. Tras diferentes pruebas, finalmente, se estableció una presión de 2,7 bares y una velocidad de bombeo de 1,5 ml/min para la pulverización de la mezcla de encapsulación, lo cual permitió obtener cápsulas de unas 100 µm de diámetro con una elevada eficiencia de encapsulación y sin comprometer la estabilidad de los bacteriófagos.

Los dos métodos comentados anteriormente mostraron claras diferencias en la eficiencia de encapsulación, obteniéndose valores cercanos al 50% en el caso de los liposomas y superiores al 90% con alginato-CaCO<sub>3</sub>. Es de resaltar que, si bien la eficiencia de encapsulación obtenida en esta última técnica es muy parecida a la conseguida por otros autores (97), el tamaño



micrométrico de las cápsulas que se ha conseguido en este estudio (123,7 – 149,3  $\mu\text{m}$ ) es casi diez veces inferior al descrito. Así, se ha reportado la encapsulación de bacteriófagos en cápsulas de alginato-pectina de 1 mm diámetro (98), de alginato-quitosano con 780  $\mu\text{m}$  de diámetro (97), de alginato- $\text{CaCO}_3$  de 900  $\mu\text{m}$  de diámetro (99) y de alginato-proteínas del suero con tamaños de 310 a 880  $\mu\text{m}$  de diámetro (134). También es de destacar que la encapsulación basada en lípidos catiónicos permitió obtener cápsulas de dimensión nanométrica (308,6 – 325,8 nm), con un tamaño casi 16 veces inferior al de las vesículas unilamelares gigantes de  $\leq 5$   $\mu\text{m}$  descritas hasta el momento en la encapsulación de los fagos  $\lambda$ eypf de *E. coli* y TM4 de *Mycobacterium* (102).

Ambos métodos de encapsulación mantuvieron la infectividad de los bacteriófagos y demostraron que pueden ser usados con bacteriófagos de distintas morfologías, ya que los fagos UAB\_Phi20 y UAB\_Phi78 son miembros de la familia *Podoviridae* presentando una cápside icosaédrica y una cola corta, mientras que el fago UAB\_Phi87, de la familia *Myoviridae*, tiene una cápside icosaédrica unida a una cola larga contráctil (54, 57). Además, los fagos encapsulados mediante las dos metodologías y mantenidos en suspensión acuosa, fueron estables tras su almacenamiento a 4°C durante al menos 6 meses (Tablas 10 y 14).

Teniendo en cuenta la futura comercialización de productos basados en bacteriófagos, es conveniente una presentación de dichos productos en forma liofilizada. Sin embargo, se ha descrito que el proceso de liofilización afecta de forma muy significativa a la infectividad de los fagos, aunque estén encapsulados (97). Por ello, se exploró si los procesos de encapsulación desarrollados en este trabajo podrían proteger a los fagos del efecto deletéreo de la liofilización en presencia de distintos agentes crioprotectores. Los resultados obtenidos mostraron que los fagos encapsulados en alginato- $\text{CaCO}_3$  sufrían una pérdida de actividad superior a la de los fagos sin encapsular, con independencia del agente crioprotector empleado (Tabla 15). Una

posible explicación a esta situación es que se formen cristales de  $\text{CaCO}_3$  durante la congelación, los cuales podrían desestabilizar las cápsides y colas de los bacteriófagos. En cambio, las cápsulas lipídicas confirieron un efecto protector frente a la liofilización, ya que se observó una menor pérdida de infectividad (Tabla 11), lo cual podría ser debido a un efecto protector de los lípidos utilizados. En este sentido, en un estudio publicado sobre el efecto de la liofilización en una mezcla de los fagos Sh-1, F-2, S-204 y N-1 de *Shigella dysenteriae* y *S. paradysenteriae*, se demostró que la yema de huevo, empleada como fuente de fosfolípidos, incrementaba la supervivencia del fago después de sufrir dicho proceso (111).

Como se ha comentado anteriormente, la administración de bacteriófagos a través del agua de bebida o del pienso es la forma más conveniente en producción animal. Dado el tamaño nanométrico de los fagos, ambas formas de administración son posibles, pero en el caso de los fagos encapsulados debe considerarse si su tamaño final es el adecuado. En este sentido, el diámetro nanométrico de las cápsulas lipídicas permite que las dos formas de aplicación comentadas sean posibles. Además, el hecho de obtener un producto liofilizado estable sin grandes pérdidas de infectividad, también podría ser una ventaja. En cambio, las dimensiones micrométricas de las cápsulas de alginato- $\text{CaCO}_3$  hacen que sólo sean aplicables a través del pienso, ya que precipitarían en el agua de bebida. Además, en este caso, no sería posible una presentación en forma de liofilizado.

Uno de los objetivos de este trabajo ha sido encapsular a los fagos para protegerlos del ambiente ácido presente en el estómago de los animales (pH 1 – 3). Se había hipotetizado que la mezcla lipídica catiónica empleada en la encapsulación debería actuar como una barrera contra los protones (90). En cambio, este fenómeno no tendría lugar en el caso de la encapsulación en alginato- $\text{CaCO}_3$ , ya que los protones son capaces de penetrar a través de la matriz de alginato (135). En estas últimas cápsulas se esperaría que la protección se deba a un

efecto tampón, ya que en un medio ácido la solubilidad del  $\text{CaCO}_3$  aumentará, permitiendo que los iones de  $\text{CO}_3^{-2}$  difundan al medio desde el interior de las cápsulas y se produzca un aumento del pH estomacal debido a su combinación con los protones del medio. Este efecto tampón se vió confirmado experimentalmente, ya que al añadir los fagos encapsulados en alginato- $\text{CaCO}_3$  en una solución de fluido gástrico simulado, el pH del medio aumentó de 2,8 a 3,8. Además, el efecto tampón descrito también podría mejorar la estabilidad de la cápsula, debido a la interacción de los iones  $\text{Ca}^{+2}$  con los grupos carboxilo de las moléculas de alginato (99). Tal y como se había hipotetizado, ambos sistemas de encapsulación ejercieron un papel protector en condiciones gástricas simuladas (Figura 22 y 27). La supervivencia de los tres bacteriófagos encapsulados en alginato- $\text{CaCO}_3$  fue mayor que la de los no encapsulados (Figura 27). Fue especialmente relevante el hecho de que el fago UAB\_Phi20 no sufriera alteración del título tras permanecer 60 min en estas condiciones. Con referencia a los fagos encapsulados UAB\_Phi78 y UAB\_Phi87, la disminución observada ( $2,9 \log_{10}$  y  $3,5 \log_{10}$ , respectivamente) fue significativamente menor que la pérdida de título de los mismos sin encapsular ( $8 \log_{10}$  y  $7,8 \log_{10}$ , respectivamente). Los resultados obtenidos fueron parecidos a las disminuciones de título de distintos fagos, descritos por otros autores en estudios similares a los indicados. Así, se ha reportado un descenso del título de  $0,67 \log_{10}$  al utilizar en la encapsulación alginato con  $\text{CaCO}_3$  a los 120 min incubación (99); de  $2,58 \log_{10}$  a los 60 min usando quitosano (97) y de  $0,5$  a  $2 \log_{10}$  a los 120 min cuando se utilizaron proteínas del suero (134). Si bien en algún caso el efecto protector observado en estos trabajos es superior al obtenido en nuestro estudio, como ya se ha comentado anteriormente, el tamaño de dichas cápsulas fue siempre mayor.

La protección frente al medio ácido conferida por los lípidos catiónicos fue algo inferior a la comentada para el alginato- $\text{CaCO}_3$ ; obteniéndose una reducción de  $4,8 \log_{10}$  para el fago UAB\_Phi20,  $5,4 \log_{10}$  para el fago UAB\_Phi78 y  $3,7 \log_{10}$  para el fago UAB\_Phi87 (Figura 22). No

obstante, estas reducciones fueron menores que las observadas en los fagos sin encapsular, con valores de  $5,7 \log_{10}$  (UAB\_Phi20),  $8,0 \log_{10}$  (UAB\_Phi78) y  $7,8 \log_{10}$  (UAB\_Phi87). Es de resaltar que el incremento de la estabilidad de los fagos en medio ácido debido a la encapsulación con lípidos se consigue con capsulas de tamaño nanométrico y sin necesidad de adicionar antiácidos, lo cual es una práctica habitual en muchos de los trabajos publicados sobre terapia fágica oral en animales (71, 78).

Por otra parte, la administración oral de bacteriófagos encapsulados en terapia fágica contra patógenos intestinales debe garantizar que los fagos se liberen en el intestino, para que puedan ejercer su efecto lítico sobre la bacteria diana. Una característica intrínseca de los lípidos es que son degradados al entrar en contacto con las sales biliares (136), por ello es factible pensar que los fagos encapsulados en liposomas se empiecen a liberar tras su paso por el duodeno, lugar en el cual el saco biliar secreta las sales biliares para completar la digestión. En función de ello, se realizó un estudio *in vitro* incubando los bacteriófagos encapsulados en liposomas en contenido cecal de pollos de engorde y determinando la concentración de fago libre (Figura 24). Los resultados revelaron diferencias en las cinéticas de liberación de los tres fagos. Así, la mayor parte del fago UAB\_Phi78 se liberó a los 30 min de dicha incubación ( $80\% \pm 17,2$ ), mientras que la liberación de los fagos UAB\_Phi20 y UAB\_Phi87 fue más lenta, con porcentajes de liberación del  $74,7\% \pm 5,4$  y  $56,6\% \pm 16,7$ , respectivamente, a los 60 min de incubación. Estos resultados pueden ser debidos a una diferente afinidad entre las proteínas de la cápside y de la cola de los tres fagos y los lípidos catiónicos de las cápsulas. Además, el hecho de que el fago UAB\_Phi87 posea una cola larga hace que presente una mayor superficie de contacto con la envueltas lípidica, lo cual podría aumentar el número de enlaces iónicos entre el fago y la cápsula, provocando que su liberación sea la más lenta. En conjunto, los resultados obtenidos

demuestran que la concentración de sales biliares en el intestino de los pollos de engorde debe ser suficiente como para promover la liberación de los bacteriófagos *in vivo*.

Respecto a la matriz de alginato debe considerarse que tiene la propiedad de contraerse a pH ácido y de disolverse a pH alcalino (137). La primera de estas características sirve para proteger a los fagos durante su paso por el estómago y la segunda debería permitir la liberación del fago el intestino delgado y grueso. Por ello, se caracterizó la cinética de liberación de los tres bacteriófagos estudiados en un medio de fluido intestinal simulado a pH 8. Al igual que lo comentado para las cápsulas lipídicas se obtuvieron cinéticas de liberación diferentes. En este caso, el fago UAB\_Phi87 se había liberado casi completamente a los 30 min de incubación, mientras que la liberación de los otros dos fagos fue más lenta (Figura 28). Estas diferencias pueden atribuirse a cambios en la densidad de la matriz de las cápsulas de alginato-CaCO<sub>3</sub>. En este sentido, el fago UAB\_Phi87 ocupa un mayor volumen en el interior de las cápsulas dado su mayor tamaño, con lo cual la matriz de alginato debe presentar una menor densidad y, por tanto, puede disolverse con mayor facilidad en contacto con el medio intestinal a pH 8. En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que las cápsulas de alginato-CaCO<sub>3</sub> pueden degradarse al entrar en contacto con el ambiente intestinal.

Los estudios que se han comentado indican que los fagos se liberan de ambos tipos de cápsulas, a través de procesos distintos, en medios que simulan las condiciones intestinales. No obstante, debe tenerse en cuenta que la situación *in vivo* será mucho más compleja. Factores como la adherencia de las cápsulas a la mucosa intestinal, el abundante moco producido por el epitelio subyacente y la concomitante digestión de los alimentos podrían provocar una demora o bien acelerar la liberación de los fagos encapsulados.

Otro de los objetivos de este trabajo ha sido conseguir, mediante la encapsulación, que los bacteriófagos permanezcan el mayor tiempo posible en el intestino de los animales para mejorar así la efectividad de la terapia fágica oral. Actualmente, hay controversia respecto a la permanencia de los fagos en el intestino, ya que un estudio *in vitro* demostró que ciertos fagos pueden adherirse a la superficie de cultivos celulares si se añaden secreciones mucosas (138). Sin embargo, otros estudios *in vivo* sugieren que la concentración de fagos en el intestino se reduce drásticamente en ausencia de la bacteria hospedadora (71, 74), lo cual indica que *in vivo* los fagos son retenidos por poco tiempo en el intestino. Una forma de mejorar la retención de los fagos es su encapsulación en materiales con propiedades mucoadhesivas. Además del tamaño nanométrico de las cápsulas lipídicas obtenidas en este trabajo, los lípidos catiónicos exhiben capacidad mucoadhesiva debido a su potencial positivo, opuesto al de la mucosa intestinal. En conjunto, ambas características contribuyen a una mayor permeabilidad y retención en la mucosa intestinal (91, 139). De forma parecida, el alginato posee una elevada viscosidad, lo cual le confiere capacidad mucoadhesiva (95) y, por tanto, puede contribuir a aumentar el tiempo de residencia de los fagos en el intestino. Según lo comentado, sería de esperar que el tiempo de permanencia de los fagos en el intestino aumente si estos están encapsulados en ambos materiales. Los resultados obtenidos en el estudio de retención de los fagos en el intestino de pollos de engorde confirmaron, por una parte, su escaso tiempo de permanencia en el intestino de los animales en el modelo de experimentación que mimetiza las condiciones ambientales de producción intensiva de pollos de engorde. Además, estos datos concuerdan con los obtenidos por nuestro grupo en animales SPF (74). Por otra parte, también demostraron que su encapsulación contribuye significativamente a prolongar su permanencia en el intestino (Figuras 23 y 29). Cabe destacar que se observaron diferencias significativas en los niveles de retención de bacteriófagos entre los dos tipos de cápsulas. Así, la encapsulación

en alginato-CaCO<sub>3</sub> confiere una mayor retención que la encapsulación en liposomas, ya que a las 72 h de tratamiento, el porcentaje de animales con bacteriófagos en el ciego fue más elevado en los tratados con fagos encapsulados en alginato-CaCO<sub>3</sub> (71,4%) que en los tratados con fagos encapsulados en liposomas (38,1%) ( $P < 0,001$ ). Esta situación puede ser debida en parte a las distintas eficiencias de encapsulación comentadas. Así, al administrar fagos encapsulados en alginato-CaCO<sub>3</sub>, más del 90% de ellos están encapsulados. En cambio, al tratar los animales con fagos encapsulados en liposomas, aproximadamente el 50% de ellos se hallan en forma libre.

Las características comentadas anteriormente para ambos tipos de cápsulas sugieren que la encapsulación de los fagos con los materiales y las metodologías desarrollados en este trabajo debería mejorar la eficacia de la terapia fágica oral. Ello se probó en un modelo basado en pollos de engorde y en condiciones de estabulación que simularon las de las granjas de producción de estos animales. Los resultados obtenidos mostraron que durante el tiempo en que se administraron diariamente los fagos (un día previo y 7 días posinfección con *Salmonella*), los cócteles compuestos por los tres fagos encapsulados, tanto en liposomas como en alginato-CaCO<sub>3</sub>, mostraron la misma eficacia por lo que se refiere a la disminución de la concentración de *Salmonella* en el ciego. Además, ambos cócteles de fagos encapsulados fueron tan efectivos como el cóctel de fagos no encapsulados, alcanzándose la máxima disminución de la concentración de *Salmonella* (3,5-3,9 log<sub>10</sub>) a los 8 días posinfección. Únicamente se observaron diferencias significativas en el primer día de tratamiento entre el efecto del cóctel encapsulado en alginato-CaCO<sub>3</sub> y el de los fagos sin encapsular, siendo más efectivo el segundo ( $P < 0,05$ ). Ello posiblemente se deba a que el 90% de los fagos están encapsulados en alginato-CaCO<sub>3</sub> y debe requerirse un cierto tiempo hasta que los fagos sean liberados y alcancen una concentración terapéutica eficaz. Es de resaltar que el efecto del

tratamiento de fagos sin encapsular se abolió a las 72 h de haber interrumpido la terapia fágica. En cambio, la disminución de la concentración de *Salmonella* respecto al control se mantuvo hasta el final del experimento en los grupos de animales tratados con fagos encapsulados, sin diferencias significativas entre ambos grupos. Es importante resaltar que, según nuestro conocimiento, no se ha reportado un efecto de terapia fágica oral tan prolongado en el tiempo como el conseguido en este trabajo. Por otra parte, cabe mencionar que ninguno de los tratamientos de terapia fágica aplicados en este estudio fue capaz de lograr la completa erradicación de *Salmonella* presente en el tracto gastrointestinal de los animales. En ese sentido, cabe considerar que la infección experimental de los pollos de engorde con *Salmonella* dió lugar a una concentración muy elevada del patógeno (aproximadamente  $6 \log_{10}$  cfu/g de ciego), valor que en condiciones reales puede ser complicado de alcanzar y, además, la infección no afectaría a toda la manada a la vez. Por tanto, es posible, que en una situación de infección real, el tratamiento con bacteriófagos encapsulados consiga eliminar la carga de *Salmonella* en los animales. Es necesario señalar que el estudio de eficacia de la terapia fágica se realizó en pollos infectados con *Salmonella*, mientras que la determinación del tiempo de retención de fagos a nivel intestinal se experimentó con animales no infectados. Esta diferencia es crucial para la correcta interpretación y comparación de los resultados, ya que durante el tratamiento de los animales infectados con *Salmonella*, es esperable que los bacteriófagos generen una nueva progenie tras multiplicarse en dicha bacteria (140).

Además de lo mencionado anteriormente, los resultados de los experimentos de terapia fágica nos han permitido analizar la relación en el ciego entre la concentración de fago libres y de bacterias (F/B) *in vivo* a lo largo del tiempo y su posible correlación con la eficacia de la terapia fágica oral. En los experimentos de terapia fágica realizados pueden distinguirse dos fases en función de la pauta de administración de los bacteriófagos. En la primera de ellas, se trató a los



animales con una dosis oral diaria del cóctel fágico desde el día previo hasta 7 días después de la infección con *Salmonella*, mientras que en la segunda fase que comenzó el día 8 y finalizó el 15, no se administró ninguno de los cócteles fágicos. En la Figura 30 puede observarse que a lo largo del tiempo la relación F/B sigue cinéticas distintas para los grupos tratados con bacteriófagos encapsulados y no encapsulados. En este último grupo, el valor F/B descendió progresivamente desde el día 3 hasta el día 8, obteniéndose en este día un valor F/B de 0,8 que se mantuvo constante hasta el final del experimento (Figura 30). En la primera fase, la concentración de bacteriófagos en el ciego se mantuvo prácticamente constante, a pesar de que se administraron fagos durante 7 días posinfección (Tabla 13 y 17), lo cual indica claramente que la concentración bacteriana tiende a aumentar a partir del día 3 y que la excreción de fagos debe ser elevada. En la segunda fase, la concentración bacteriana aumentó progresivamente (de 5,2 a 6,3  $\log_{10}$ ) desde el día 8 hasta el final del experimento, a la vez que el valor F/B se mantuvo constante. Esto es indicativo de un incremento de la población de bacteriófagos en el intestino y de un equilibrio entre ambas poblaciones, pero sin un efecto terapéutico del tratamiento.

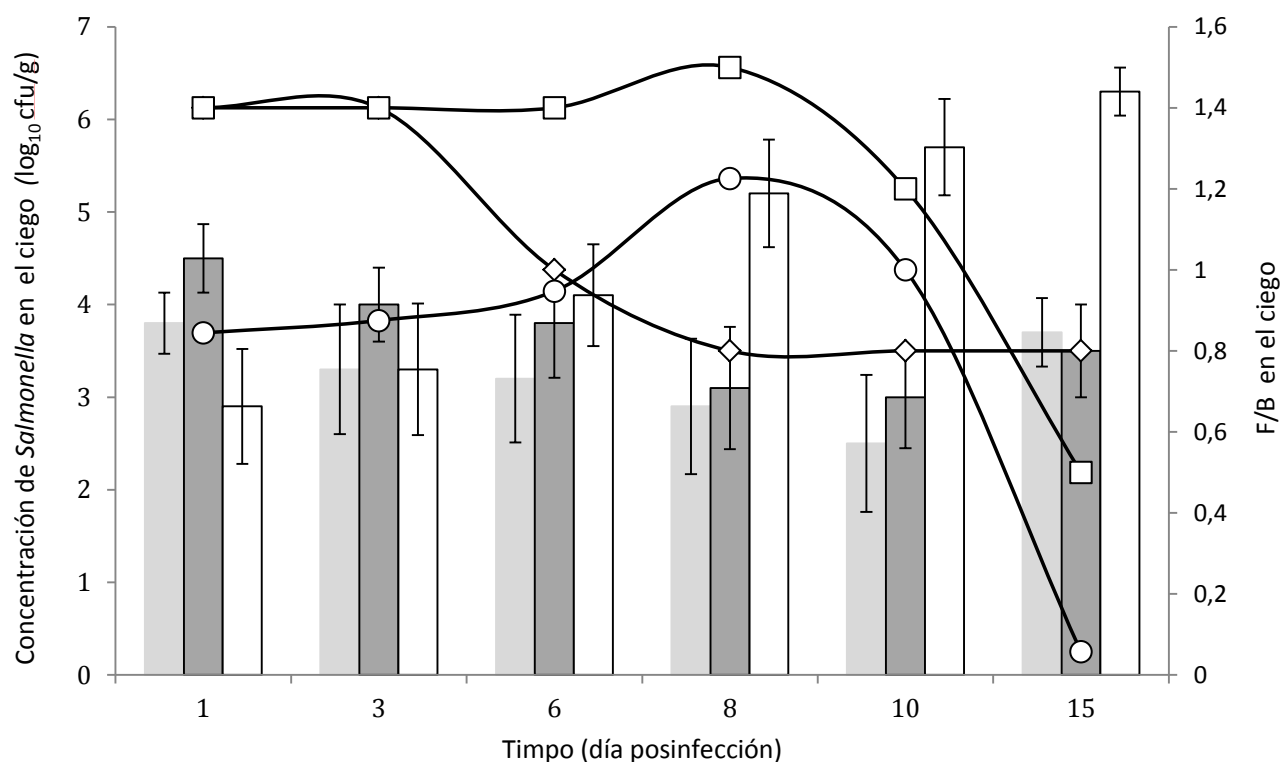
A diferencia de lo comentado anteriormente, el valor F/B se mantuvo constante durante los primeros seis días en los grupos tratados con bacteriófagos encapsulados (Figura 30), alcanzándose un valor máximo de F/B al inicio de la segunda fase (día 8). Estos valores fueron de 1,4 para el grupo tratado con fagos encapsulados en liposomas y de 1,2 para el tratado con fagos encapsulados en alginato- $\text{CaCO}_3$ . Dado que durante estos 8 días, la concentración de fagos libres en el ciego se mantuvo prácticamente constante (Tablas 13 y 17), el aumento del parámetro F/B se debe a una progresiva disminución de la concentración bacteriana, como consecuencia del efecto terapéutico del tratamiento fágico. El hecho de que los valores F/B del grupo tratado con fagos encapsulados en alginato- $\text{CaCO}_3$  durante los 6 primeros días sea muy

inferior a los del grupo al que se administraron fagos encapsulados en liposomas puede atribuirse a que en el primero el 90% de los fagos están encapsulados, mientras que en el segundo aproximadamente el 50% se halla en forma libre.

Es de destacar que durante toda la segunda fase, el grupo tratado con fagos no encapsulados presentó un valor F/B de 0,8, mientras que, desde el día 8 hasta el 10, este valor fue superior o igual a 1 en los dos grupos tratados con fagos encapsulados, lo cual parece indicar que sólo se consigue un efecto terapéutico si la relación F/B es superior a 1 cuando no hay aporte externo de fagos. No obstante, esta hipótesis no se cumple a los 15 días en los tratamientos con fagos encapsulados, ya que los valores F/B son muy inferiores a 1. Este resultado podría explicarse en atención a la edad de los animales ya que es posible que, a los 17 días de edad, los animales dispongan de una microbiota completamente establecida en su tracto gastrointestinal y tenga lugar una exclusión competitiva, siempre y cuando la concentración de *Salmonella* sea baja. Si bien no se disponen de datos sobre la respuesta inmune de los pollos de engorde provocada por el tratamiento fágico, también podría pensarse que, a los 17 días de edad de los animales, dicho sistema hubiera madurado lo suficiente como para mantener unos bajos niveles de *Salmonella* en su tracto digestivo. También es posible pensar que la concentración de *Salmonella* pueda aumentar a partir de los 15 días. En cualquier caso, todas estas hipótesis deberán ser probadas en posteriores experimentos.

En un estudio *in vitro* se demostró que cuando la concentración de la bacteria hospedadora es baja ( $10^4$  cfu/ml), se requiere una cantidad mínima de bacteriófago para asegurar que el contacto entre ambos sea posible y se inicie el ciclo de multiplicación del fago (110). En este sentido, los resultados obtenidos indican que, en el modelo animal utilizado en este trabajo, la concentración crítica bacteriana para que se produzca el encuentro bacteria-fago es aproximadamente de  $3,5 \log_{10}$ , cuando no hay aporte externo de fagos. Ello puede deducirse de

los datos obtenidos en la segunda fase del experimento, ya que a partir del día 8, en el cual la concentración de *Salmonella* de los grupos tratados con fagos encapsulados alcanza valores cercanos a 3,5 log<sub>10</sub> (Tablas 12 y 16), la concentración de bacteriófagos disminuye (Tablas 13 y 17).



**Figura 30.** Relación entre la concentración fágica (F) y bacteriana (B) en el ciego de pollos de engorde durante los experimentos de terapia fágica utilizando los cócteles encapsulados en liposomas (□), alginato-CaCO<sub>3</sub> (○) y sin encapsular (◇). Las barras representan la concentración media de *Salmonella* en el ciego de los pollos, durante el tratamiento con los cócteles de fagos encapsulados en liposomas (gris claro), alginato-CaCO<sub>3</sub> (gris oscuro) y sin encapsular (blanco). Los valores indicados corresponden a la media de los datos obtenidos con 14 animales. Se indica el error estándar.

En resumen, en esta parte del trabajo se ha demostrado que fagos con diferentes morfologías pueden ser encapsulados tanto en liposomas catiónicos como en alginato-CaCO<sub>3</sub>. Ambos tipos de cápsulas confieren a los fagos mayor estabilidad en ambientes ácidos y permiten su liberación en condiciones intestinales. Además, aumentan el tiempo de permanencia de los

fagos en el intestino de los animales y se han conseguido efectos positivos de la terapia fágica oral, como mínimo durante 15 días, sobre el patógeno intestinal *S. Typhimurium* en un modelo de pollos de engorde en condiciones que simulan las de las granjas de producción animal. Finalmente, es de destacar que el tamaño de las cápsulas es adecuado para su aplicación en producción animal, pudiéndose administrar a través del agua de bebida (cápsulas lipídicas) o de pienso granulado y compactado (cápsulas lipídicas y de alginato- $\text{CaCO}_3$ ), sin comprometer la calidad del alimento. Además, ambos tipos de encapsulación pueden ser también útiles en terapia fágica oral aplicada en humanos.

# CONCLUSIONES



## 6. Conclusions

The main conclusions of this work have been:

1. During their infection to *Salmonella* cells, the virulent phages UAB\_Phi20 and UAB\_Phi78 showed temporal differences in initiating DNA replication. This difference can be explained by the fact that the latter phage encodes a RNA polymerase that may control the expression of its own DNA polymerase. The delay in initiating DNA replication can explain that lysis of the bacterial cultures occurred more slowly in those infected by UAB\_Phi20 than by UAB\_Phi78.
2. The unexpectedly longer duration of DNA replication of bacteriophage UAB\_Phi87 could be attributed to the inhibition of cell lysis by superinfection and it agrees with the very long lysis time of the bacterial cultures infected by this phage.
3. Bacteriophage UAB\_Phi20 uses a headful packaging system, like the phages belonging to the genus *P22likevirus*, and its genome contains a *pac* sequence that differs by only two bases compared to that of P22 phage.
4. The bacteriophage UAB\_Phi78 genome contains short direct terminal repeats of 179 bp, and the packaging strategy of the phage is the same as that of phages belonging to the genus *SP6likevirus*.
5. The bacteriophage UAB\_Phi87 genome contains short direct terminal repeats of 608 bp and the packaging system of the phage is the same as that of phages belonging to the genus *Felixounalikevirus*.
6. Under the laboratory conditions tested, none of the three bacteriophages was able to promote transduction of the genetic marker tryptophan at  $MOI_{input}$  values of 1 and 0.01.

7. Cationic lipid mixtures allowed the encapsulation of bacteriophages differing in their morphologies. The encapsulation efficiency was 40–50% and the resulting capsules were 308.6–325.8 nm in diameter with a positive Z potential between +31.6 and +35.1 mV (pH 6.1). This is the first description of bacteriophage capsules of nanometric size.
8. Bacteriophages of different morphologies were also encapsulated in alginate-CaCO<sub>3</sub>. The efficiency was >90% and the capsules ranged in size from 123.7 to 149.3 μm, which was smaller than described for other, similarly encapsulated bacteriophages.
9. The use of lipids but not alginate-CaCO<sub>3</sub> for bacteriophage encapsulation significantly reduced the deleterious effect on the phages of lyophilisation.
10. The encapsulation of the bacteriophages using either method (lipids or alginate-CaCO<sub>3</sub>) significantly increased their stability when incubated in simulated gastric fluid.
11. Bile salts in the chicken intestinal tract promoted liposomal release of the bacteriophages. The release kinetics probably depended on the morphology and size of the phage.
12. The alkaline pH of the intestinal tract promoted release of the bacteriophages from alginate-CaCO<sub>3</sub> capsules. Larger phages probably reduced the density of the alginate matrix, which facilitated the degradation of the capsules and accelerated their release.
13. Encapsulation of the phages in either lipids or alginate-CaCO<sub>3</sub> lengthened their retention time in the chicken caecum, resulting in long-lasting therapeutic effects against intestinal pathogens. In a model of commercial broiler chickens infected with *Salmonella*, the encapsulated phages offered protection for a minimum of 15 days.
14. Under the tested conditions, a phage/bacteria ratio in the caecum >1 was necessary for successful oral phage therapy.
15. In the animal model used in this work, a *Salmonella* concentration higher than ~3.5 log<sub>10</sub> was needed for phage multiplication.



# BIBLIOGRAPHY



## 7. Bibliography

1. **Wilcock BP, Schwartz KJ.** 1993. Salmonellosis, p. 570-583. In: Diseases of swine. Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW (Eds.). 7th ed. Wiley-Blackwell, London, UK.
2. **Ellermeyer CD, Strauch, JM.** 2006. The genus *Salmonella*, p. 123-158. In: Prokaryotes. Dworkin, M. y Falkow, S, Rosenberg E, Schleifer KH (Eds.). 3th ed. Springer, New York, USA.
3. **Winfield MD, Groisman EA.** 2003. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **7**:3687–3694.
4. **Grimont P, Weill FX.** 2008. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collab Cent Ref Res *Salmonella* **2**:1–167.
5. **Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B.** 2000. *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol* **38**:2465–2467.
6. **Libby SJ, Halsey TA, Altier C, Potter J, Gyles CL.** 2008. *Salmonella*, pp. 143-168. In: Pathogenesis of bacterial infections in animals. Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO (Eds.). 3rd ed. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA.
7. **Fierer J, Guiney DG.** 2001. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. *J Clin Invest* **107**:775–780.
8. **Neidhardt FC, Curtiss R, Ingraham JL, Lin EC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE.** 1996. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. Neidhardt FC (Ed.). vol. 2. 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C. USA .
9. **Gray LD.** 1995. *Escherichia, Salmonella, Shigella* and *Yersinia*, p. 450-456. In: Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Pfaller MA, Tenover FC (Eds.). 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, USA.
10. **Miller SI, Hohmann EL, Pegues DA.** 1995. *Salmonella* (including *Salmonella Typhi*), pp. 2013-2033. In: Principles and practice of infectious diseases. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds.). 4th ed. Churchill Livingstone, New York, USA.
11. **Rivera-Chávez F, Bäumlér AJ.** 2014. The pyromaniac inside you: *Salmonella* metabolism in the host gut. *Annu Rev Microbiol* **69**:31-48.
12. **LaRock DL, Chaudhary A, Miller SI.** 2015. *Salmonellae* interactions with host processes. *Nat Rev Microbiol* **4**:191-205.
13. **Haraga A, Ohlson MB, Miller SI.** 2008. *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* **6**:53–66.
14. **Mastroeni P, Grant A, Restif O, Maskell D.** 2009. A dynamic view of the spread and

intracellular distribution of *Salmonella enterica*. Nat Rev Microbiol **7**:73–80.

15. **Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe R V, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM.** 2011. Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. Emerg Infect Dis **17**:7–15.
16. **Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM.** 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. Clin Infect Dis **50**:882–889.
17. **Batz MB, Hoffmann S MJ.** 2011. Ranking the risks: The 10 pathogen-food combinations with the greatest burden on public health. Public Health 1-68.
18. **Centers for Disease Control and Prevention.** 2012. Foodborne diseases active surveillance network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2011 (Final Report) 1–52.
19. **European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control.** 2014. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. EFSA J **12**:3547.
20. Reglamento (CE) N° 2160/2003. 2003. Control de *Salmonella* y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos.  
[http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/legislacion/reglamento\\_2160\\_2003\\_tcm7-6038.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/legislacion/reglamento_2160_2003_tcm7-6038.pdf)
21. Reglamento (EC) N° 584/2008. 2008. Objetivo de la Unión Europea de reducción de la prevalencia de las serovariedades Enteritidis y Typhimurium de *Salmonella enterica* en las manadas de pavos.  
[http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/legislacion/R\(UE\)\\_10862011\\_CRITERIOS\\_MICROBIOLOGICOS\\_tcm7-180664.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/legislacion/R(UE)_10862011_CRITERIOS_MICROBIOLOGICOS_tcm7-180664.pdf)
22. **European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control.** 2004. Opinion of the scientific panel on biological hazards on the request from the Commission related to the use of antimicrobials for the control of *Salmonella* in poultry. EFSA J **115**:1–76.
23. Reglamento (UE) No 200/2010. 2010. Objetivo de la Unión Europea de reducción de la prevalencia de determinadas serovariedades de *Salmonella enterica* en las manadas de reproductoras adultas de *Gallus gallus*.  
<http://www.caib.es/sacmicrofront/archivopub.do?ctrl=MCRST6185ZI191894&id=191894>
24. Reglamento (UE) N° 517/2011. 2011. Objetivo de la Unión Europea de reducción de la prevalencia de determinadas serovariedades de *Salmonella enterica* en gallinas ponedoras de la especie *Gallus gallus*. <https://www.boe.es/doue/2011/138/L00045-00051.pdf>

25. Reglamento (UE) N° 200/2012. 2012. Objetivo de la Unión Europea de reducción de las serovariedades Enteritidis y Typhimurium de *Salmonella enterica* en las manadas de pollos de engorde. [http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-e-higiene-ganadera/Reg\\_200-2012\\_SE\\_\\_ST\\_pollos\\_de\\_engorde\\_tcm7-215788.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-e-higiene-ganadera/Reg_200-2012_SE__ST_pollos_de_engorde_tcm7-215788.pdf)
26. **Twort FW**. 1915. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet* **186**:1241-1243.
27. **D'Herelle F**. 1917. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* **165**:373-375.
28. **Brüssow H**. 2005. Phage therapy: the *Escherichia coli* experience. *Microbiology* **151**:2133-40.
29. **Joerger RD**. 2003. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poult Sci* **82**:640-647.
30. **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR**. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**:5463-5467.
31. **Hendrix RW**. 2002. Bacteriophages: Evolution of the majority. *Theor Popul Biol* **61**:471-480.
32. **Nelson D**. 2004. Phage Taxonomy : We Agree To Disagree. *J Bacteriol* **186**:7029-7031.
33. **Ackerman HW**. 2005. Bacteriophage classification p. 67-90. In: *Bacteriophages Biology and Applications*. Kutter E, Sulakvelidze A (Eds.). CRC press, Washington D.C., USA.
34. **Ackermann H-W**. 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch Virol* **152**:227-43.
35. **Campbell A**. 1988. General aspects of Lysogeny, p. 66-73. In: *The Bacteriophages*. Calendar, R. (Eds.). 1st ed. Springer, New York, USA
36. **Campbell A**. 2003. The future of bacteriophage biology. *Nat Rev Genet* **4**:471-7.
37. **Rakhuba D V, Kolomiets EI, Szwajcer Dey E, Novik GI**. 2010. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish J Microbiol* **59**:145-155.
38. **Hersey AD, Chase M**. 1952. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J Gen Physiol* **36**:39-56.
39. **Grayson P, Molineux IJ**. 2007. Is phage DNA "injected" into cells—biologists and physicists can agree. *Curr Opin Microbiol* **10**:401-409.
40. **Casjens S**. 2009. Determining DNA packaging strategy by analysis of the termini of the chromosomes in tailed-bacteriophage virions. *Methods Mol Biol* **502**:365-370.

41. **Gilbert W, Dressler D.** 1968. DNA replication: the rolling circle model. *Symp Quant Biol* 33:473-484.
42. **Bukhari AI, Taylor AL.** 1975. Influence of insertions on packaging of host sequences covalently linked to bacteriophage Mu DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**:4399–4403.
43. **Meijer WJ, Horcajadas JA, Salas M.** 2001. Phi29 family of phages. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 87-261.
44. **Jardine PJ, Anderson DL.** 1988. DNA packaging in double-stranded DNA phages p. 49-65. In: *The Bacteriophages*. Calendar, R. (Ed.). 1st ed. Springer, New York, USA.
45. **Fleming A, Allison VD.** 1922. Further observations on a bacteriolytic substance (“lysozyme”) found in secretions and tissues. *Brit. J. Exp. Pathol.* **3**:252-260.
46. **Young R.** 2014. Phage lysis: Three steps, three choices, one outcome. *J Microbiol* **52**:243–258.
47. **Bernhardt TG, Wang I-NN, Struck DK, Young R.** 2002. Breaking free: “Protein antibiotics” and phage lysis. *Res Microbiol* **153**:493–501.
48. **White R, Chiba S, Pang T, Dewey JS, Savva CG, Holzenburg A, Pogliano K, Young R.** 2011. Holin triggering in real time. *Proc Natl Acad Sci* **108**:798–803.
49. **Pang T, Savva CG, Fleming KG, Struck DK, Young R.** 2009. Structure of the lethal phage pinhole. *Proc Natl Acad Sci* **106**:18966–71.
50. **ICTV official Taxonomy.** Updates since the 8th Report. 2014. [http://talk.ictvonline.org/files/ictv\\_official\\_taxonomy\\_updates\\_since\\_the\\_8th\\_report/default.aspx](http://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/default.aspx)
51. **Casjens S.** 2012. Information about bacteriophage P22. *Am Soc Microbiol.* <https://www.asm.org/division/m/fax/P22Fax.html>
52. **Kropinski AM, Sulakvelidze A, Konczy P, Poppe C.** 2007. *Salmonella* Phages and Prophages—Genomics and Practical Aspects. p. 133-175. In: *Salmonella* methods and protocols. Schatten, H. and Eisenstrak (Eds.), 2nd ed. Humana Press, New Jersey, USA.
53. **Lavigne R, Seto D, Mahadevan P, Ackermann HW, Kropinski AM.** 2008. Unifying classical and molecular taxonomic classification: analysis of the Podoviridae using BLASTP-based tools. *Res Microbiol* **159**:406–14.
54. **Bardina C.** 2011. Estudios sobre terapia fágica contra *S. enterica* en *Gallus gallus*. Universitat Autònoma de Barcelona. PhD.
55. **Dobbins AT, George MJ, Basham D, Ford ME, Houtz JM, Pedulla ML, Lawrence JG, Hatfull GF, Hendrix RW.** 2004. Complete genomic sequence of the virulent *Salmonella* bacteriophage SP6. *J Bacteriol* **186**:1933–1944.

56. **Chen Z, Schneider TD.** 2005. Information theory based T7-like promoter models: Classification of bacteriophages and differential evolution of promoters and their polymerases. *Nucleic Acids Res* **33**:6172–6187.
57. **Spricigo DA.** 2011. La desinfección basada en bacteriófagos como herramienta de biocontrol de *Salmonella* en alimentos. Universitat Autònoma de Barcelona. PhD.
58. **Scholl D, Kieleczawa J, Kemp P, Rush J, Richardson CC, Merril C, Adhya S, Molineux IJJ.** 2004. Genomic analysis of bacteriophages SP6 and K1-5, an estranged subgroup of the T7 supergroup. *J Mol Biol* **335**:1151–1171.
59. **Felix A, Callow BR.** 1943. Typing of paratyphoid B bacilli by means of Vi bacteriophage. *Br Med J* **2**:4308–4310.
60. **Whichard JM, Weigt LA, Borris DJ, Li LL, Zhang Q, Kapur V, William Pierson F, Lingohr EJ, She YM, Kropinski AM, Sriranganathan N.** 2010. Complete genomic sequence of Bacteriophage Felix O1. *Viruses* **2**:710–730.
61. **Goodrich-Blair H, Shub DA.** 1996. Beyond homing: competition between intron endonucleases confers a selective advantage on flanking genetic markers. *Cell* **84**:211–21.
62. **D’Herelle F.** 1931. Bacteriophage as a treatment in acute medical and surgical infections. *Bull N Y Acad Med* **7**:329-48.
63. **Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM.** 2011. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* **1**:66–85.
64. **Chanishvili N.** 2012. Phage therapy history from Twort and d’Herelle through Soviet experience to current approaches. *Adv Virus Res* **83**:3–40.
65. **Wittebole X, De Roock S, Opal SM.** 2014. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence* **5**:226–235.
66. **Sarker SA, McCallin S, Barretto C, Berger B, Pittet AC, Sultana S, Krause L, Huq S, Bibiloni R, Bruttin A, Reuteler G, Brüssow H.** 2012. Oral T4-like phage cocktail application to healthy adult volunteers from Bangladesh. *Virology* **434**:222–232.
67. **Bruttin A, Brüssow H.** 2005. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:2874–2873.
68. **Azeredo J, Sutherland IW.** 2008. The use of phages for the removal of infectious biofilms. *Curr Pharm Biotechnol* **4**:216-6.
69. **Miedzybrodzki R, Fortuna W, Weber-Dabrowska B, Górski A.** 2007. Phage therapy of staphylococcal infections (including MRSA) may be less expensive than antibiotic treatment. *Postepy Hig Med Dosw* **61**:461–465.

70. **Dabrowska K, Switała-Jelen K, Opolski A, Weber-Dabrowska B, Gorski A.** 2005. A review: Bacteriophage penetration in vertebrates. *J Appl Microbiol* **98**:7–13.
71. **Atterbury RJ, Van Bergen MP, Ortiz F, Lovell MA, Harris JA, De Boer A, Wagenaar JA, Allen VM, Barrow PA.** 2007. Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* **73**:4543–9.
72. **Loc Carrillo C, Atterbury RJ, El-Shibiny A, Connerton PL, Dillon E, Scott A, Connerton IF.** 2005. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* **71**: 6554-6563
73. **Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B, Delattre AS, Lavigne R.** 2012. Learning from bacteriophages - advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Curr Protein Pept Sci* **13**:699–722.
74. **Bardina C, Spricigo DA, Cortés P, Llagostera M.** 2012. Significance of the bacteriophage treatment schedule in reducing *Salmonella* colonization of poultry. *Appl Environ Microbiol* **78**:6600–6607.
75. **Spricigo DA, Bardina C, Cortés P, Llagostera M.** 2013. Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry. *Int J Food Microbiol* **165**:169–174.
76. **Barrow P, Lovell M, Berchieri AJ.** 1998. Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. *Clin Diagn Lab Immunol* **5**:294–298.
77. **Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM, Donoghue AM.** 2002. Prevention of *Escherichia coli* infection in broiler chickens with a bacteriophage aerosol spray. *Poult Sci* **81**:1486–1491.
78. **Hammerl JA, Jäckel C, Alter T, Janczyk P, Stingl K, Knüver MT, Hertwig S.** 2014. Reduction of *Campylobacter jejuni* in Broiler Chicken by Successive Application of Group II and Group III Phages. *PLoS One* **12**:e114785.
79. **Carvalho CM, Gannon BW, Halfhide DE, Santos SB, Hayes CM, Roe JM, Azeredo J.** 2010. The *in vivo* efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens. *BMC Microbiol* **10**:232-243.
80. **Miller RW, Skinner J, Sulakvelidze A, Mathis GF, Hofacre CL.** 2010. Bacteriophage therapy for control of necrotic enteritis of broiler chickens experimentally infected with *Clostridium perfringens*. *Avian Dis* **54**:33–40.
81. **Andreatti Filho RL, Higgins JP, Higgins SE, Gaona G, Wolfenden AD, Tellez G, Hargis BM.** 2007. Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce *Salmonella enterica* serovar enteritidis *in vitro* and *in vivo*. *Poult Sci* **86**:1904–1909.



82. **Toro H, Price SB, McKee S, Hoerr FJ, Krehling J, Perdue M, Bauermeister L.** 2009. Use of bacteriophages in combination with competitive exclusion to reduce *Salmonella* from infected chickens. *Avian diseases* **49**:118-124.
83. **Borie C, Albala I, Sánchez P, Sánchez ML, Ramírez S, Navarro C, Morales MA, Retamales AJ, Robeson J.** 2008. Bacteriophage treatment reduces *Salmonella* colonization of infected chickens. *Avian Dis* **52**:64–67.
84. **Cortés P, Spricigo DA, Bardina C, Llagostera M.** 2015. Remarkable diversity of *Salmonella* bacteriophages in swine and poultry. *FEMS Microbiol Lett* **362**:1–7.
85. **Endersen L, O'Mahony J, Hill C, Ross RP, McAuliffe O, Coffey A.** 2014. Phage Therapy in the Food Industry. *Annu Rev Food Sci Technol* **5**:327–349.
86. **Frampton RA, Pitman AR, Fineran PC.** 2012. Advances in Bacteriophage-Mediated Control of Plant Pathogens. *Int J Microbiol* **2012**:1–11.
87. **Sanguansri P, Augustin MA.** 2006. Nanoscale materials development a food industry perspective. *Trends Food Sci Technol* **17**:547–556.
88. **Ezhilarasi PN, Karthik P, Chhanwal N, Anandharamakrishnan C.** 2013. Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. *food bioprocess technol* **6**:628–647.
89. **Martín VM, Morales HM, Gallardo LV, Ruiz MM.** 2009. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular. *ARS Pharm* **50**:43–50.
90. **Paula S, Volkov AG, Van Hoek AN, Haines TH, Deamer DW.** 1996. Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness. *Biophys J* **70**:339–348.
91. **Thirawong N, Thongborisute J, Takeuchi H, Sriamornsak P.** 2008. Improved intestinal absorption of calcitonin by mucoadhesive delivery of novel pectin-liposome nanocomplexes. *J Control Release* **125**:236–245.
92. **Oliveira CS, Saramento B, Pinto CR.** 2012. Oral delivery of biopharmaceuticals, p. 125-149. In: *Mucosal delivery of biopharmaceuticals*. Neves J, Saramento B (Eds). The Royal Society of Chemistry. 1st ed. Springer, New York, USA.
93. **Angelova MI, Dimitrov DS.** 1986. Liposome electroformation. *Faraday Discuss Chem Soc* **81**:303-311.
94. **Weinberger A, Tsai FC, Koenderink GH, Schmidt TF, Itri R, Meier W, Schmatko T, Schröder A, Marques C.** 2013. Gel-assisted formation of giant unilamellar vesicles. *Biophys J* **105**:154–164.
95. **Kesavan K.** 2010. Sodium alginate based mucoadhesive system for gatifloxacin and its *in vitro* antibacterial activity. *Sci Pharm* **78**:941–957.

96. **Nigam SC, Tsao I-F, Sakoda A, Wang HY.** 1988. Techniques for preparing hydrogel membrane capsules. *Biotechnol Tech* **2**:271–276.
97. **Ma Y, Pacan JC, Wang Q, Xu Y, Huang X, Korenevsky A, Sabour PM.** 2008. Microencapsulation of bacteriophage Felix O1 into chitosan-alginate microspheres for oral delivery. *Appl Environ Microbiol* **74**:4799–4805.
98. **Dini C, Islan GA, de Urraza PJ, Castro GR.** 2012. Novel biopolymer matrices for microencapsulation of phages: enhanced protection against acidity and protease activity. *Macromol Biosci* **12**:1200–1208.
99. **Ma Y, Pacan JC, Wang Q, Sabour PM, Huang X, Xu Y.** 2012. Enhanced alginate microspheres as means of oral delivery of bacteriophage for reducing *Staphylococcus aureus* intestinal carriage. *Food Hydrocoll* **26**:434–440.
100. **Stanford K, McAllister TA, Niu YD, Stephens TP, Mazzocco A, Waddell TE, Johnson RP.** 2010. Oral delivery systems for encapsulated bacteriophages targeted at *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle. *J Food Prot* **73**:1304–1312.
101. **Puapermpoonsiri U, Spencer J, van der Walle CF.** 2009. A freeze-dried formulation of bacteriophage encapsulated in biodegradable microspheres. *Eur J Pharm Biopharm* **72**:26–33.
102. **Nieth A, Verseux C, Barnert S, Süß R, Römer W.** 2015. A first step toward liposome-mediated intracellular bacteriophage therapy. *Expert Opin Drug Deliv* **9**:1411–1424.
103. **Saez AC, Zhang J, Rostagno MH, Ebner PD.** 2011. Direct feeding of microencapsulated bacteriophages to reduce *Salmonella* colonization in pigs. *Foodborne Pathog Dis* **8**:1269–1274.
104. **Barrow PA.** 2000. The paratyphoid *Salmonellae* Description of the disease in poultry. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* **19**:351–375.
105. **White DG, Zhao S, Sudler R, Ayers S, Friedman S, Chen S, McDermott PF, McDermott S, Wagner DD, Meng J.** 2001. The isolation of antibiotic-resistant *Salmonella* from retail ground meats. *N Engl J Med* **345**:1147–1154.
106. **Castanon JIR.** 2007. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poult Sci* **86**:2466–2471.
107. **Van Immerseel F, Cauwerts K, Devriese LA, Haesebrouck F, Ducatelle R.** 2002. Feed additives to control *Salmonella* in poultry. *Worlds Poult Sci J* **58**:501–513.
108. **Desin TS, Köster W, Potter AA.** 2013. *Salmonella* vaccines in poultry: past, present and future. *Expert Rev Vaccines* **12**:87–96.
109. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.

110. **Kasman LM, Kasman A, Westwater C, Dolan J, Schmidt MG, Norris JS.** 2002. Overcoming the phage replication threshold: a mathematical model with implications for phage therapy. *J Virol* **76**:5557–5564.
111. **Schade AL, Caroline L.** 1944. The preparation of a polyvalent dysentery bacteriophage in a dry and stable form: ii. factors affecting the stabilization of dysentery bacteriophage during lyophilization. *J Bacteriol* **48**:179–190.
112. **Schmieger H.** 1972. Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities. *Mol Gen Genet* **119**:75–88.
113. **Klumpp J, Dorscht J, Lurz R, Biemann R, Wieland M, Zimmer M, Calendar R, Loessner MJ.** 2008. The terminally redundant, nonpermuted genome of *Listeria* bacteriophage A511: a model for the SPO1-like myoviruses of gram-positive bacteria. *J Bacteriol* **190**:5753–65.
114. **Bennett-Guerrero E, McIntosh TJ, Barclay GR, Snyder DS, Gibbs RJ, Mythen MG, Poxton IR.** 2000. Preparation and preclinical evaluation of a novel liposomal complete-core lipopolysaccharide vaccine. *Infect Immun* **68**:6202–6208.
115. **Musikasang H, Tani A, Hkittikun A, Maneerat S.** 2009. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. *World J Microbiol Biotechnol* **25**:1337–1345.
116. **Mosier-Boss PA, Lieberman SH, Andrews JM, Rohwer FL, Wegley LE, Breitbart M.** 2003. Use of fluorescently labeled phage in the detection and identification of bacterial species. *Appl Spectrosc* **57**:1138–1144.
117. **Hadjalirezaei S.** 2013. Coating of alginate capsules. Norwegian University of Science and Technology. PhD.
118. **Jordan F, Mullin PF.** 2008. Some useful data, p. 571–587. In: *Poultry diseases*. Pattison M, Mullin PF, Bradbury JM, Alexander DJ (Eds.). 6th ed. Elsevier Health Sciences, Philadelphia, USA.
119. **Fiorentin L, Vieira ND, Barioni W.** 2005. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella* Enteritidis PT4 in caecal contents of broilers. *Avian Pathol* **34**:258–263.
120. **Born Y, Fieseler L, Marazzi J, Lurz R, Duffy B, Loessner MJ.** 2011. Novel virulent and broad-host-range *Erwinia amylovora* bacteriophages reveal a high degree of mosaicism and a relationship to *Enterobacteriaceae* phages. *Appl Environ Microbiol* **77**:5945–5954.
121. **Colom J, Cano-Sarabia M, Otero J, Cortés P, Maspoch D, Llagostera M.** 2015. Liposome-encapsulated bacteriophages for enhanced oral phage therapy against *Salmonella spp.* *Appl Environ Microbiol* **81**:4841–4849.

122. **Hershey AD.** 1946. Mutation of bacteriophage with respect to type of plaque. *Genetics* **31**:620–640.
123. **Bode W.** 1967. Lysis inhibition in *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J Virol* **1**:948–955.
124. **Moussa SH, Kuznetsov V, Tran TAT, Sacchettini JC, Young R.** 2012. Protein determinants of phage T4 lysis inhibition. *Protein Sci* **21**:571–582.
125. **Tran TAT, Struck DK, Young R.** 2005. Periplasmic domains define holin-antiholin interactions in T4 lysis inhibition. *J Bacteriol* **187**:6631–6640.
126. **Wu H, Sampson L, Parr R, Casjens S.** 2002. The DNA site utilized by bacteriophage P22 for initiation of DNA packaging. *Mol Microbiol* **45**:1631–1646.
127. **Casjens S, Winn-Stapley D a., Gilcrease EB, Morona R, Kühlewein C, Chua JEH, Manning PA, Inwood W, Clark AJ.** 2004. The chromosome of *Shigella flexneri* bacteriophage Sf6: Complete nucleotide sequence, genetic mosaicism, and DNA packaging. *J Mol Biol* **339**:379–394.
128. **Casjens SR, Gilcrease EB, Danella A, Schicklmaier P, Schmieger H, Pedulla L, Ford ME, Houtz JM, Graham F, Hendrix RW, Winn-stapley DA, Pedulla ML, Hatfull GF.** 2005. The generalized transducing *Salmonella* bacteriophage ES18 : complete genome sequence and DNA packaging strategy. *J Bacteriol* **187**:1091–1104.
129. **Marti R.** 2013. Assembly of a *Salmonella* cocktail with broad, strictly virulent activity and detailed characterization of the phage used. ETH Zürich. PhD.
130. **Jonczyk E, Kłak M, Międzybrodzki R, Górski A.** 2011. The influence of external factors on bacteriophages review. *Folia Microbiol Praha* **56**:191–200.
131. **Nieth A, Verseux C, Römer W.** 2014. A question of attire: dressing up bacteriophage therapy for the battle against antibiotic-resistant intracellular bacteria. *Springer Sci Rev* **3**:1–11.
132. **Pawar SN, Edgar KJ.** 2012. Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials* **33**:3279–3305.
133. **Immordino ML, Dosio F, Cattel L.** 2006. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomedicine* **1**:297–315.
134. **Tang Z, Huang X, Baxi S, Chambers JR, Sabour PM, Wang Q.** 2013. Whey protein improves survival and release characteristics of bacteriophage Felix O1 encapsulated in alginate microspheres. *Food Res Int* **52**:460–466.
135. **Tang M, Dettmar P, Batchelor H.** 2005. Bioadhesive oesophageal bandages: protection against acid and pepsin injury. *Int J Pharm* **292**:169–177.
136. **Rowland RN, Woodley JF.** 1980. The stability of liposomes in vitro to pH, bile salts and

- pancreatic lipase. *Biochim Biophys Acta* **620**:400–409.
137. **George M, Abraham TE.** 2006. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan--a review. *J Control Release* **114**:1–14.
138. **Barr JJ, Auro R, Furlan M, Whiteson KL, Erb ML, Pogliano J, Stotland A, Wolkowicz R, Cutting AS, Doran KS, Salamon P, Youle M, Rohwer F.** 2013. Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**:10771–1776.
139. **Takeuchi H, Matsui Y, Sugihara H, Yamamoto H, Kawashima Y.** 2005. Effectiveness of submicron-sized, chitosan-coated liposomes in oral administration of peptide drugs. *Int J Pharm* **303**:160–170.
140. **Connerton PL, Connerton IF.** 2005. Microbial treatments to reduce pathogens in poultry meat, p. 414–427. In: *Food safety control in the poultry industry*. Mead G (Ed.), Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, UK.



**ANEXO**





# Liposome-Encapsulated Bacteriophages for Enhanced Oral Phage Therapy against *Salmonella* spp.

Joan Colom,<sup>a</sup> Mary Cano-Sarabia,<sup>b</sup> Jennifer Otero,<sup>a</sup> Pilar Cortés,<sup>a</sup> Daniel Maspoch,<sup>b,c</sup> Montserrat Llagostera<sup>a</sup>

Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Spain<sup>a</sup>; Institut Català de Nanociència i Nanotecnologia, Bellaterra, Spain<sup>b</sup>; Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats, Barcelona, Spain<sup>c</sup>

**Bacteriophages UAB\_Phi20, UAB\_Phi78, and UAB\_Phi87 were encapsulated in liposomes, and their efficacy in reducing *Salmonella* in poultry was then studied. The encapsulated phages had a mean diameter of 309 to 326 nm and a positive charge between +31.6 and +35.1 mV (pH 6.1). In simulated gastric fluid (pH 2.8), the titer of nonencapsulated phages decreased by 5.7 to 7.8 log units, whereas encapsulated phages were significantly more stable, with losses of 3.7 to 5.4 log units. The liposome coating also improved the retention of bacteriophages in the chicken intestinal tract. When cocktails of the encapsulated and nonencapsulated phages were administered to broilers, after 72 h the encapsulated phages were detected in 38.1% of the animals, whereas the nonencapsulated phages were present in only 9.5%. The difference was significant. In addition, in an *in vitro* experiment, the cecal contents of broilers promoted the release of the phages from the liposomes. In broilers experimentally infected with *Salmonella*, the daily administration of the two cocktails for 6 days postinfection conferred similar levels of protection against *Salmonella* colonization. However, once treatment was stopped, protection by the nonencapsulated phages disappeared, whereas that provided by the encapsulated phages persisted for at least 1 week, showing the enhanced efficacy of the encapsulated phages in protecting poultry against *Salmonella* over time. The methodology described here allows the liposome encapsulation of phages of different morphologies. The preparations can be stored for at least 3 months at 4°C and could be added to the drinking water and feed of animals.**

Foodborne diseases are a global health problem and include infections with nontyphoidal *Salmonella*, which is among the most common zoonotic pathogens that affect humans. In fact, this bacterium was responsible for more than 1 million annual cases of food-related illnesses in the United States from 2000 to 2008 (1) and for more than 90,000 cases of salmonellosis (mainly from *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium) diagnosed in the European Union in 2012 (2). The major source of *Salmonella* infections in humans is poultry products (2), and poultry is the major reservoir of this bacterium. The health risk is exacerbated in the case of broilers, which are asymptomatic carriers that house *Salmonella* in their gut. In fact, several *Salmonella* strains persistently colonize chickens but without causing any signs of illness (3). This lack of clinical symptoms facilitates the dissemination of *Salmonella* within flocks (4), thereby increasing the probability of cross-contamination during the transport, slaughter, and processing of broilers.

*Salmonella* infection in broilers has been controlled mainly through the use of vaccines (5, 6), probiotics, prebiotics, and synbiotics (7), and antibiotics (8), although the effectiveness of these treatments is limited. Importantly, antibiotics can ultimately increase the severity and frequency of colonization by certain resistant strains of *Salmonella* (9).

Phages are viruses that infect bacteria, subsequently replicating and then rapidly killing their bacterial host (10). Thus, phage therapy has been proposed as a means to control *Salmonella* infection in chickens. Indeed, several studies have shown that phages effectively reduce *Salmonella enterica* colonization in poultry (11–15). The utility of phages in food preservation and safety has also been demonstrated (16–21). In a previous study based on an experimental model of *Gallus gallus* free of specific pathogens, we showed that a phage cocktail containing the phages UAB\_Phi20, UAB\_Phi78, and UAB\_Phi87 is highly effective in reducing *Sal-*

*monella* colonization; the same results were obtained when diverse foodstuffs were similarly treated (20, 21).

Despite these advances, inherent challenges remain in the practical use of oral phage therapy. For example, phages typically lack stability in the extremely acidic environment of the chicken stomach (22), and their residence time in the intestinal tract is very short (20). These problems translate into a low efficiency of phage infection that can only be compensated for by very frequent treatment, which is costly and time-consuming (20). Thus, the practical use of phages for controlling *Salmonella* infections in broilers will require phages (or formulations thereof) that are more acid stable and have longer residence times. Two strategies have recently been developed for stabilizing phages in acidic media: (i) the addition of antacids (e.g., CaCO<sub>3</sub>) to phage suspensions (15) and (ii) the encapsulation of phages into polymeric microcapsules, including those comprising alginate-pectin (23) (size, 1 mm), alginate-chitosan (size, 780 μm) (24), methacrylate (25), and alginate-CaCO<sub>3</sub> (size, 900 μm) (26). However, to date, there

Received 11 March 2015 Accepted 5 May 2015

Accepted manuscript posted online 8 May 2015

Citation Colom J, Cano-Sarabia M, Otero J, Cortés P, Maspoch D, Llagostera M. 2015. Liposome-encapsulated bacteriophages for enhanced oral phage therapy against *Salmonella* spp. *Appl Environ Microbiol* 81:4841–4849. doi:10.1128/AEM.00812-15.

Editor: M. J. Pettinari

Address correspondence to Daniel Maspoch, daniel.maspoch@icn.cat, or Montserrat Llagostera, montserrat.llagostera@uab.es.

J.C. and M.C.-S. contributed equally to this article.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.00812-15

have been no reports of a method that simultaneously resolved both the acid sensitivity and the limited intestinal residence time of phages to achieve a significant reduction of *Salmonella* infections in broilers. In considering liposomes, we hypothesized that they would serve two primary functions: (i) as a barrier to protons (27), thus protecting phages against gastric acids, and (ii) as a promoter of mucoadhesiveness, owing to their positively charged surfaces (28, 29), which would prolong the intestinal residence time. We chose cationic liposomes as the encapsulation matrix because they readily allow the encapsulation of negatively charged, nanoscale biological entities (30, 31) such as phages. Furthermore, cationic liposomes favor the dispersion of their biomolecules in aqueous media over prolonged periods of time, facilitate the oral administration of these biomolecules to animals, and are degraded upon contact with intestinal bile salts (32).

In the work reported here, we separately encapsulated the three phages (UAB\_Phi20, UAB\_Phi78, and UAB\_Phi87) in cationic lipid envelopes (liposomes) and then compared the performances of the resulting liposome-encapsulated and nonencapsulated phages as orally administered phage therapy in broilers.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and growth conditions.** *Salmonella* Typhimurium LB5000 (SGSC181; University of Calgary) was used for the propagation of phages UAB\_Phi20, UAB\_Phi78, and UAB\_Phi87, and *S. Typhimurium* ATCC 14028 Rif<sup>r</sup> for the colonization of the animals. All bacterial strains were grown in Luria-Bertani (LB) broth or on LB agar plates for 18 h at 37°C. Viable counts of *S. Typhimurium* ATCC 14028 Rif<sup>r</sup> were determined by plating on xylose-lysine-deoxycholate (XLD) plates (Laboratorios Conda, Spain) supplemented with rifampin (75 µg/ml), followed by incubation at 37°C for 18 h.

**In vitro multiplication of bacteriophages.** UAB\_Phi20, UAB\_Phi78, and UAB\_Phi87 phage lysates were obtained by infecting exponential-phase cultures of *S. Typhimurium* strain LB5000 grown in LB broth at an input multiplicity of infection (MOI) (ratio of added phages to added bacteria) of 0.01 (33). After a 5-h incubation at 37°C, the cultures were centrifuged at  $10,414 \times g$  for 10 min. The supernatants were collected and then filtered first through 0.45-µm and then through 0.22-µm syringe polyestersulfone (PES) filters (Millipore, Carrigtwohill, Ireland). The phage titer was determined by plating serial dilutions (1:10) onto LB plates using the double agar layer method (34).

When high titers of phage lysates were required, 50-ml portions of *Salmonella* cultures in LB broth at an initial optical density at 550 nm ( $OD_{550}$ ) of 0.2 were prepared and incubated at 37°C with agitation until an  $OD_{550}$  of 1 was obtained. The cultures were infected with the appropriate phage at an input MOI of 0.01, and the suspensions were then incubated at 37°C for 12 to 14 h (34). Finally, the lysates were recovered by centrifugation as described above. The phage lysates were concentrated by ultracentrifugation (Optima L-80; Beckman, CA, USA) in an 80Ti rotor (Beckman, CA, USA) at 4°C ( $68,584 \times g$ ) for 2 h (35). The pellets were resuspended in aqueous  $MgSO_4$  (10 mM, pH 6.1) with overnight shaking. The resulting phage suspensions were filtered through 0.45-µm PES filters and then stored at 4°C. The phage titer was determined as described above.

**Encapsulation method.** The phages were encapsulated in lipids using the thin-film hydration method (36). A lipid mixture of 1,2-dilauroyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine (DLPC), cholesteryl polyethylene glycol 600 sebacate (Chol-PEG600), cholesterol (Chol), and cholesteryl 3β-*N*-(dimethylaminoethyl)carbamate hydrochloride (cholesteryl) was used (1:0.1:0.2:0.7 molar ratio). Briefly, after each lipid was dissolved in chloroform (100 mg/ml), a solution containing 106 µl of DLPC, 17 µl of cholesterol-PEG600, 13 µl of Chol, and 64 µl of cholesteryl was prepared under sterile conditions. The total lipid concentration was 17 mM. The organic solvent was removed under vacuum and nitrogen to afford a dry lipid film, which

was then hydrated with 2 ml of the appropriate aqueous suspension of the phage (either UAB\_Phi20, UAB\_Phi78, or UAB\_Phi87) at a concentration of  $10^{11}$  PFU/ml under stirring for 1 h. Under these conditions, the stacks of liquid crystalline lipid bilayers become fluid and swell, resulting in their detachment during agitation and their self-closure to form large multilamellar vesicles (LMVs). Unilamellar vesicles were obtained by homogenizing the LMV suspension using an extruder (Lipex Biomembranes, Vancouver, Canada) and a polycarbonate membrane (pore size, 400 nm). Particle size distributions of the vesicles were determined using a dynamic light scattering (DLS) analyzer combined with noninvasive backscatter technology (Malvern Zetasizer; Malvern Instruments, United Kingdom). The samples (1 ml) were measured without dilution directly thereafter. The mean of three different measurements was taken as the mean diameter. The stability of the liposome-encapsulated phages was examined by measuring their zeta potential with an electrophoretic mobility and light scattering analyzer (Malvern Zetasizer). The samples were placed into the cuvettes and measured without dilution immediately thereafter. The mean from three different experiments was taken as the mean zeta potential of the dispersed system.

**Encapsulation efficiency.** The encapsulation efficiency of the phages was calculated according to the equation  $EE (\%) = 100 - (C_{free}/C_{total}) \times 100$ , where EE is encapsulation efficiency,  $C_{total}$  is the total phage concentration, and  $C_{free}$  is the concentration of free phages. To quantify  $C_{total}$ , 0.5 ml of liposome-encapsulated phages was treated with 0.5 ml of bile salts (50 mM) (Sigma-Aldrich, MO, USA) to disrupt the liposomes. A preliminary experiment confirmed that this concentration had no significant effect on the infectivity of the phages. The double agar layer method was used to plate appropriate dilutions of the samples onto LB plates with *S. Typhimurium* strain LB5000, and the  $C_{total}$  was then determined. To quantify  $C_{free}$ , the titers of liposome-encapsulated phages were directly determined by plating serial dilutions (1:10) with strain LB5000. The same method was used to determine the stability of liposome-encapsulated phages that had been stored at 4°C for 3 months.

**Microscopy.** Liposome integrity (morphology and lamellarity) was examined by cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) using a JEOL-JEM 1400 microscope (JEOL, Japan). The samples were prepared in a controlled environment vitrification system. A 5-µl aliquot of each one was deposited onto carbon-coated film meshes supported by standard copper TEM grids. After 30 s, the grids were gently blotted with a double layer of filter paper to obtain a thin film (thickness, 20 to 400 nm), plunged into liquid ethane at its freezing point ( $-180^\circ\text{C}$ ), and then transferred into liquid nitrogen ( $-196^\circ\text{C}$ ), where they were stored until use. At that time, the vitrified specimens were transferred to the microscope using a cryotransfer and its workstation (626 DH; Gatan).

To confirm that the phages had indeed been encapsulated within liposomes, fluorescently labeled samples were observed by laser confocal microscopy using a Leica TCS SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Germany). Phages were stained with 100× SYBR gold (Molecular Probes, OR, USA) by adding 0.02 ml of SYBR gold to 10 ml of phages suspended in 10 mM  $MgSO_4$  to obtain a concentration of  $10^{11}$  PFU/ml. After an overnight incubation in the dark (37), the samples were ultrafiltered and washed three times at  $5,000 \times g$  using Amicon Ultra 50K tubes (Millipore). The fluorescent SYBR gold-labeled phages were encapsulated using the thin-film hydration method described above and using the DLPC-Chol-PEG-Chol-cholesteryl lipid mixture incorporating the Vybrant DiI phospholipid-labeling solution (10 µl of Vybrant DiI per 20 mg lipid). In this case, the liposomes were not extruded through a membrane, as the resulting particles would have been below the resolution limit of the optical microscope. A 30-µl sample was placed on a coated glass slide and observed in resonance scanning mode.

**Lyophilization.** For the long-term storage of the liposome-encapsulated phages, the cryoprotectant trehalose was added during liposome synthesis, and the encapsulated phages were subjected to lyophilization as follows. The dried lipid film was hydrated with a suspension containing the phages and trehalose at a lipid/carbohydrate ratio of 1:5 (3.2%, wt/

vol). The resulting cryoprotected liposome-encapsulated phages were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 2 h and then lyophilized at  $-40^{\circ}\text{C}$  for 48 h. For comparison, nonencapsulated phages were also lyophilized with the cryoprotectant trehalose. When needed, the lyophilized samples were resuspended in aqueous  $\text{MgSO}_4$  (10 mM) and plated as indicated above to determine the pre- and postlyophilization phage titers for use in calculating phage infectivity.

**Bacteriophage stability in SGF.** The liposome-encapsulated phages were tested for their stability in simulated gastric fluid (SGF) solution (pH 2.8) comprising pepsin (3 mg/ml) (Sigma-Aldrich, MO, USA) in 0.85% NaCl (38). In all cases, 0.1 ml of encapsulated phages was added to 10 ml of the simulated gastric fluid solution. No change in pH occurred. The samples were then incubated in a water bath at  $42^{\circ}\text{C}$  with agitation to mimic the conditions of the avian stomach. To determine the total phage concentration, aliquots taken at 0, 30, and 60 min were treated with bile salts (50 mM) and plated as described previously. The same methodology, but without the bile salts treatment, was used to test nonencapsulated phages.

**In vivo assays in broilers.** Both the intestinal residence time and the effectiveness of a cocktail of either liposome-encapsulated or nonencapsulated phages against *Salmonella* were evaluated *in vivo* in commercial broilers (*Gallus gallus*, Ross strain 308; Terra-Avant S.A., Girona, Spain). The animals were treated in agreement with the guidelines of the ethics commission (Comissió d'Ètica en l'Experimentació Animal i Humana [CEEAH]) of the Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). The study was approved and assigned the authorization number 1953.

Newly hatched chickens were purchased and subsequently transported to a biosafety level 2 animal-testing facility at the UAB's Servei de Granges i Camps Experimentals (Cerdanyola del Vallès, Spain). The broilers were housed in pens with food and water supplied *ad libitum*. In an attempt to simulate farm conditions and increase the feeding impulse of the animals, they were kept under 23-h/1-h light/dark cycles using green and blue light (39). Prior to each of the experiments, tissue samples were obtained from two euthanized chickens and tested using enrichment protocols to confirm that they were free of *Salmonella* and phages. For the detection of *Salmonella*, homogenized tissues were incubated in buffered peptone water (BPW) (Merck) at  $37^{\circ}\text{C}$  for 18 h, after which 0.2 ml of tissue suspension was inoculated in 2 ml of Müller-Kauffman selective broth (Merck, Darmstadt, Germany). Following a 24-h incubation at  $37^{\circ}\text{C}$ , 0.1 ml of this culture was plated onto XLD plates. Phages were detected as previously reported (10). Briefly, 0.2 ml of each homogenate was added to a 2-ml culture of *Salmonella* Typhimurium in LB at an  $\text{OD}_{550}$  of 0.2. After 24 h of incubation at  $37^{\circ}\text{C}$ , the presence of phages was determined by spotting 10  $\mu\text{l}$  of the above-described suspensions onto lawns of *S. Typhimurium* ATCC 14028 Rif<sup>r</sup>. The plates were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 h, and bacterial lysis was then evaluated. By this method, fewer than 200 phages per gram of cecum were detected.

*In vivo* assays were based on the oral administration to the broilers of 100  $\mu\text{l}$  of a cocktail containing either the liposome-encapsulated phages or the nonencapsulated phages. The cocktail comprised a 1:1:1 mixture of the three phages (UAB\_Phi20, UAB\_Phi78, and UAB\_Phi87) at a concentration of  $10^{11}$  PFU/ml in  $\text{MgSO}_4$  buffer without any antacid. All oral inoculations were performed using a curved oral-dosing needle (75 mm, 16 gauge; Veterinary Instrumentation, Sheffield, United Kingdom).

**In vivo retention in the intestinal tract.** The intestinal residence time of a cocktail of either liposome-encapsulated or nonencapsulated phages was determined over 72 h as follows. Two groups of 63 1-day-old chickens were housed in two poultry pens. At time zero, one group was treated with 100  $\mu\text{l}$  of the liposome-encapsulated phage cocktail and the other with 100  $\mu\text{l}$  of the nonencapsulated phage cocktail. In both cases, the dose was  $10^{10}$  PFU/animal. After 2, 48, and 72 h, 21 animals from each group were euthanized and cecum samples were collected. For phage quantification, serial dilutions of homogenized cecum samples were plated onto a lawn of *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 Rif<sup>r</sup> using the double agar layer method and then incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 h. When direct detection of

phages was not possible, the enrichment procedure was carried out as detailed above.

**Assay of the efficacy of bacteriophage therapy.** The efficacy of phage therapy against *Salmonella* was assessed over 17 days and assayed in chickens orally administered 100  $\mu\text{l}$  of a cocktail containing liposome-encapsulated or nonencapsulated phages. The animals were orally infected on day 0 with 100  $\mu\text{l}$  of a suspension of *S. Typhimurium* ATCC 14028 Rif<sup>r</sup> in LB medium at a dose of  $10^7$  CFU/animal. Three groups of 84 recently hatched commercial broilers (*Gallus gallus*, Ross strain 308) were separated in pens. Group 1, which controlled for *Salmonella* colonization, was untreated. Groups 2 and 3 received the nonencapsulated and encapsulated phages, respectively. In both cases, phages in an oral dose of  $10^{10}$  PFU/animal were administered once daily for 8 days, from day  $-1$  to day 7 postinfection with *Salmonella*. The control group was orally inoculated over the same 8 days with an aqueous suspension of  $\text{MgSO}_4$  (10 mM). In each group, 14 chickens were euthanized on days 1, 3, 6, 8, 10, and 15 postinfection, and cecum samples were obtained for *Salmonella* quantification. To count the salmonellae, the tissues were weighed, resuspended in 4 ml of BPW, and then mechanically homogenized for 15 min. Serial dilutions of the homogenates were plated on XLD agar plates (Laboratorios Conda) supplemented with rifampin (75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). After incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 h, the number of colonies of *Salmonella* was recorded. For each treatment, the reduction in bacteria was calculated by subtracting their mean cecal concentration (expressed in log units) in groups 2 and 3 from the mean value of the group 1 control.

**In vitro studies of bacteriophage release.** Phage release from liposomes in the cecum was studied in 12 1-day-old chickens maintained in pens as described above. After 15 days, the animals were euthanized and the contents of their ceca were harvested. For each phage, 990  $\mu\text{l}$  of cecal content was mixed with 10  $\mu\text{l}$  of liposome-encapsulated phages and incubated at  $42^{\circ}\text{C}$ , the body temperature of the chickens. Phage concentration over time was determined by plating the appropriate dilutions using the double agar layer method.

**Statistical analysis.** All results were analyzed using IBM SPSS software. For normally distributed samples, analysis of variance (ANOVA) and Student's *t* test were applied; in cases of nonnormal distribution, the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used. The polydispersity index (PdI), defined as the square of the ratio of the standard deviation to the mean diameter, was determined as a measure of the width of the particle size distribution.

## RESULTS

### Characterization of the liposome-encapsulated bacteriophages.

Each lytic phage (UAB\_Phi20, UAB\_Phi78, or UAB\_Phi87) (20, 21) was separately encapsulated into liposomes and characterized. DLS indicated that the mean size of the liposome-encapsulated phages was  $308.6 \pm 20.9$  nm for UAB\_Phi20 (PdI = 0.14),  $320.6 \pm 15.2$  nm for UAB\_Phi78 (PdI = 0.21), and  $325.8 \pm 23.1$  nm for UAB\_Phi87 (PdI = 0.18) (Fig. 1). The surface charges of the liposome-encapsulated phages, determined by measuring their zeta potential at pH 6.1, were  $+35.1 \pm 1.0$  mV,  $+33.0 \pm 2.1$  mV, and  $+31.6 \pm 1.3$  mV, respectively (Table 1).

The morphology and structure of the resulting liposome-encapsulated phages were imaged by cryo-TEM. As shown in Fig. 2A to C, the phages were encapsulated in unilamellar liposomes. The number of encapsulated phages in a single liposome varied; empty liposomes and nonencapsulated phages were also observed. In the latter, most were attached to the external surface of the liposome. The sizes of the liposomes as determined by cryo-TEM were consistent with those estimated by DLS. The encapsulation efficiency of each phage was determined by preparing six independent encapsulation batches. The encapsulation yields (expressed as a percentage) were  $49\% \pm 2.4\%$  for UAB\_Phi20,  $48\% \pm 6.4\%$  for

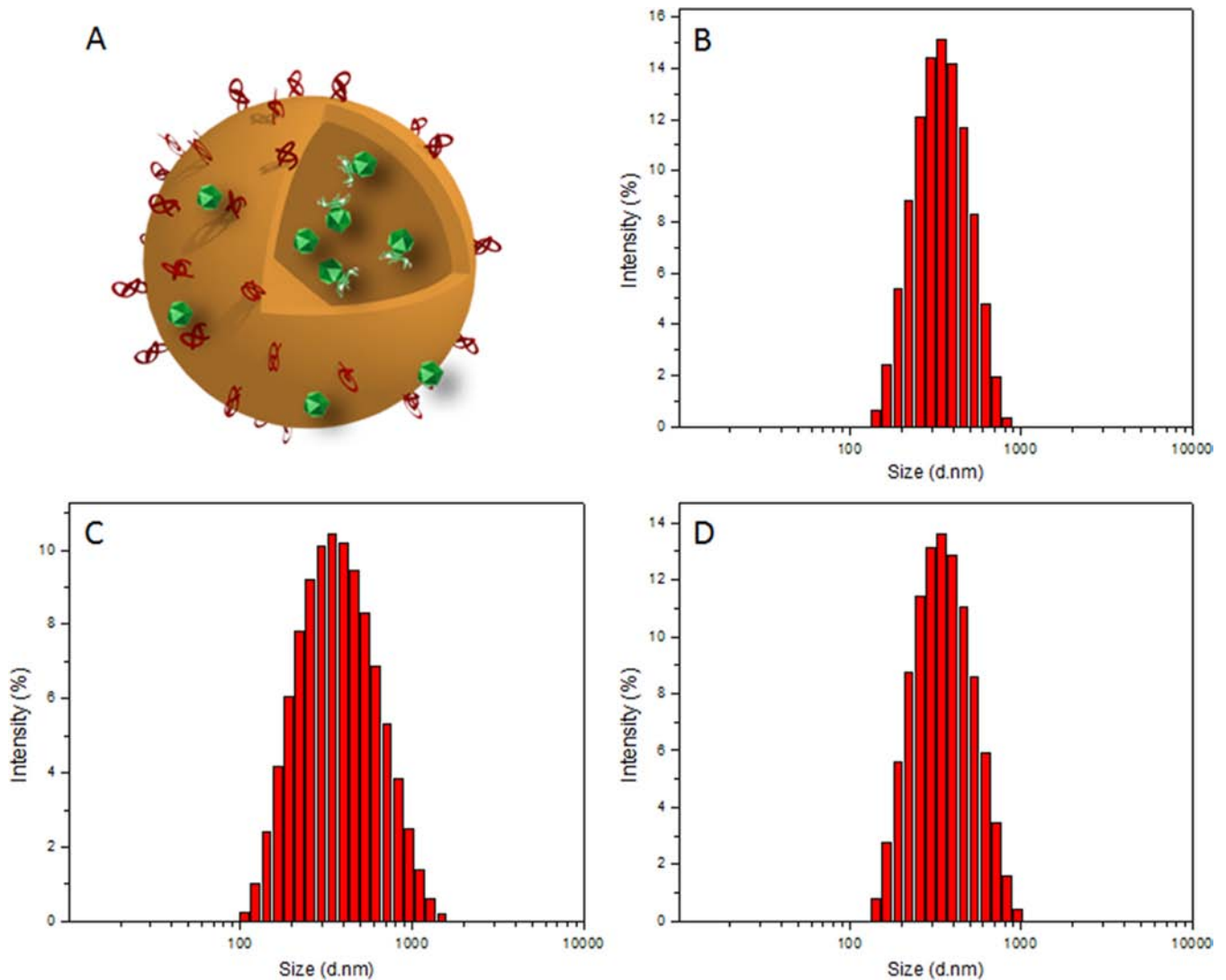


FIG 1 (A) Schematic representation of the liposome-encapsulated bacteriophage system, showing the presence of phages (green) encapsulated inside liposomes or attached to their external surfaces. (B to D) Particle size distribution plots for the liposome-encapsulated phages UAB\_Phi20 (B), UAB\_Phi78 (C), and UAB\_Phi87 (D), as measured by dynamic light scattering.

UAB\_Phi78, and  $47\% \pm 5.1\%$  for UAB\_Phi87 (Table 1). To further characterize the physicochemical structure of the liposome-encapsulated phages, they were labeled with SYBR gold and encapsulated into DiI-labeled liposomes. Figure 2D to F shows the three-dimensional (3D) spatial superimposition of the fluorescence intensities of SYBR-gold-labeled UAB\_Phi20, UAB\_Phi78,

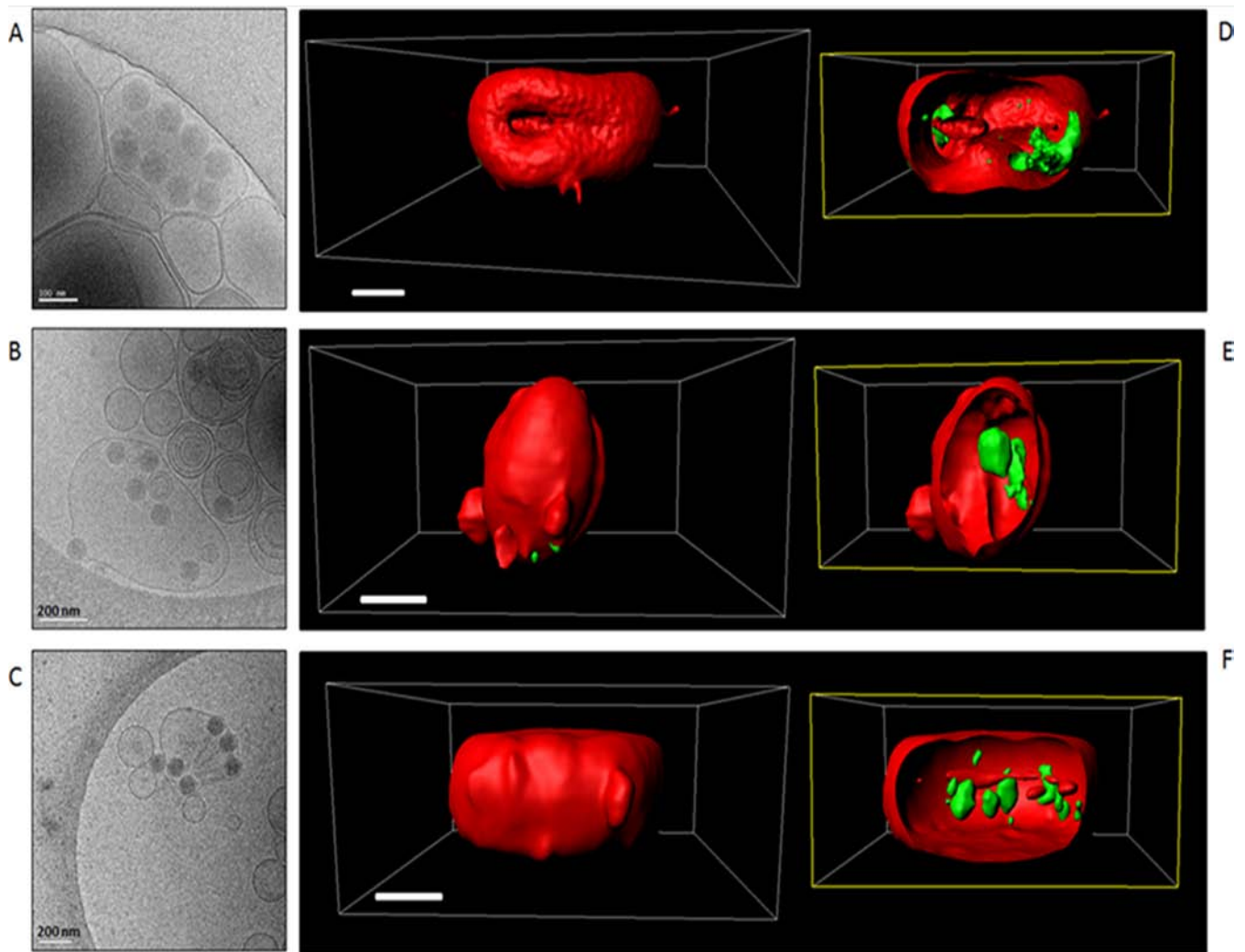
and UAB\_Phi87 phages (in green) and those of the DiI-labeled liposomes (in red). The images confirmed that each type of phage had indeed been encapsulated inside the liposomes.

We then tested the stability of the encapsulated phages, that is, the extent to which the phages remained inside the liposomes. To this end, both the DLS characteristics and the zeta potentials of the

TABLE 1 Size and zeta potential of the liposomes and encapsulation yield for the three phages freshly prepared and after their storage at  $4^{\circ}\text{C}$  for 3 months<sup>a</sup>

Phage	Fresh			Stored at $4^{\circ}\text{C}$ for 3 months		
	Encapsulation yield (%)	Size (nm)	$\zeta$ potential (mV)	Encapsulation yield (%)	Size (nm)	$\zeta$ potential (mV)
UAB_Phi20	$49 \pm 2.4$	$308.6 \pm 20.9$	$+35.1 \pm 1.0$	$59 \pm 9.2$	$292.7 \pm 15.9$	$+34.2 \pm 1.3$
UAB_Phi78	$48 \pm 6.4$	$320.6 \pm 15.2$	$+33.0 \pm 2.1$	$55 \pm 3.8$	$338.5 \pm 12.1$	$+35.2 \pm 1.1$
UAB_Phi87	$47 \pm 5.1$	$325.8 \pm 23.1$	$+31.6 \pm 1.3$	$43 \pm 2.7$	$302.6 \pm 23.5$	$+32.5 \pm 1.6$

<sup>a</sup> Each value represents the average from three independent experiments  $\pm$  the standard deviation.



**FIG 2** (A to C) Cryo-TEM images of liposome-encapsulated phages UAB\_Phi20 (A), UAB\_Phi78 (B), and UAB\_Phi87 (C). (D to F) 3D confocal microscopy images of SYBR gold-labeled phages UAB\_Phi20 (D), UAB\_Phi78 (E), and UAB\_Phi87 (F) (green) encapsulated into fluorescent DiI-labeled liposomes (red) 3D images of the liposome surface are shown on the left, and the corresponding cross-sectional images on the right. Scale bars, 5  $\mu\text{m}$ .

freshly encapsulated phages were determined, together with their concentrations. In addition, samples of each freshly encapsulated phage were stored at 4°C for 3 months and subsequently characterized as described above. No significant differences were found in the values of any of the parameters between the fresh and stored

encapsulated phages (Table 1), thereby confirming the stability of the liposome-encapsulated phages under the test conditions (4°C and 3 months).

**Lyophilization of the liposome-encapsulated bacteriophages.** With the goal of obtaining a stable product suitable for long-term storage and easily administered in animal water or feed, we evaluated the effect of the lyophilization procedure on liposome-encapsulated phages. Prior to lyophilization, the cryoprotectant trehalose (24) was added to the phage-containing suspension during the synthetic hydration step. Nonencapsulated phages were also lyophilized, for the purpose of comparison. After lyophilization, each resulting powder was reconstituted by resuspension in aqueous 10 mM  $\text{MgSO}_4$ , and the phage titer was determined. Table 2 shows the titers, expressed as a percentage, of both the nonencapsulated and encapsulated phages after lyophilization with respect to the titers before lyophilization. The values of the encapsulated phages were consistently much higher than those of the corresponding nonencapsulated phages ( $P < 0.05$ ): roughly 82% and 84% versus 22% and 47% for encapsulated and nonencapsu-

**TABLE 2** Effect of lyophilization on the titers of phages

Phage	Encapsulation	Titer (%) <sup>a</sup>
UAB_Phi20	No	22.0 $\pm$ 13.4
	Yes	82.3 $\pm$ 15.4*
UAB_Phi78	No	2.0 $\pm$ 1.5
	Yes	15.1 $\pm$ 9.6*
UAB_Phi87	No	47.5 $\pm$ 12.1
	Yes	84.4 $\pm$ 16.9*

<sup>a</sup> The value is the percentage of the titer after lyophilization with respect to the titer before lyophilization. Each value is the average from six independent experiments  $\pm$  standard deviation. \*,  $P < 0.05$ .

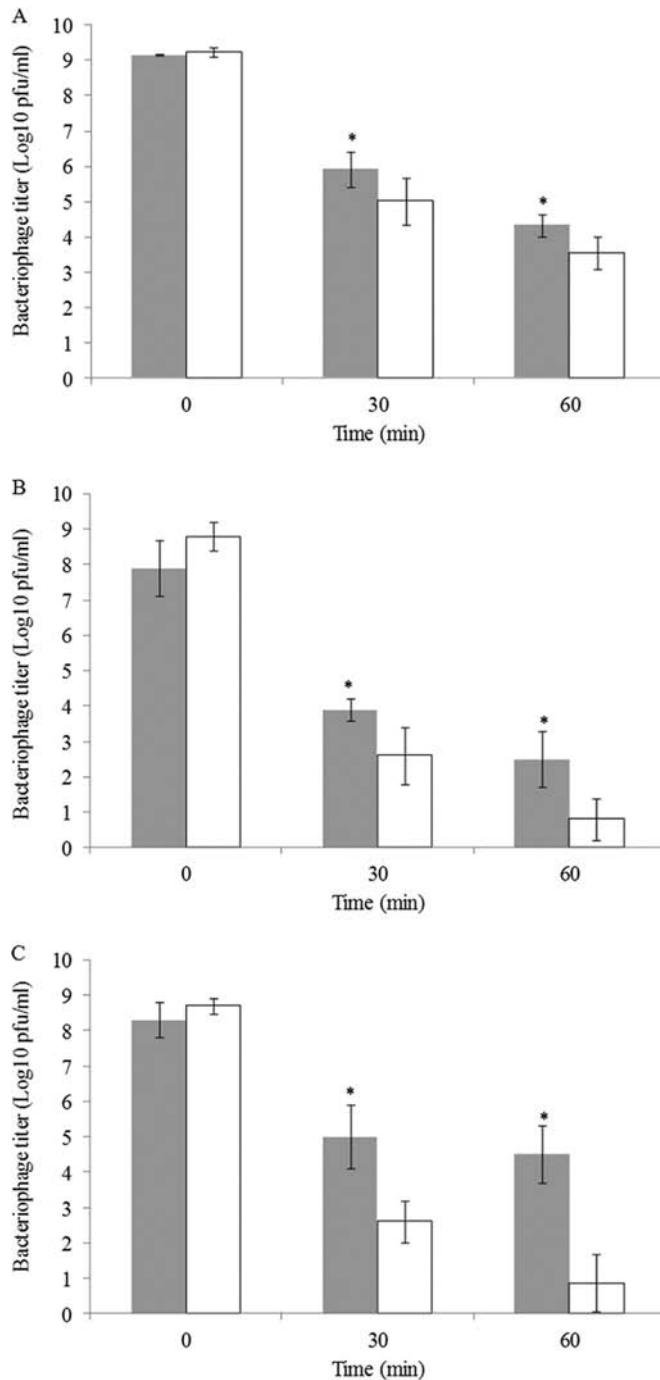


FIG 3 Stability of the nonencapsulated (white bars) and liposome-encapsulated (gray bars) phages in simulated gastric fluid (pH 2.8). (A) UAB\_Phi20; (B) UAB\_Phi78; (C) UAB\_Phi87. Each value is the average from six independent experiments  $\pm$  standard deviation. \*,  $P < 0.05$ .

lated UAB-Phi20 and UAB-Phi87, respectively. In the third phage, UAB\_Phi78, which was extremely sensitive to lyophilization, the variation between the values obtained for encapsulated and nonencapsulated forms pre- and postlyophilization was much greater, 15% versus 2%, respectively.

**Bacteriophage resistance to SGF.** The acid stabilities of liposome-encapsulated and nonencapsulated phages were tested in

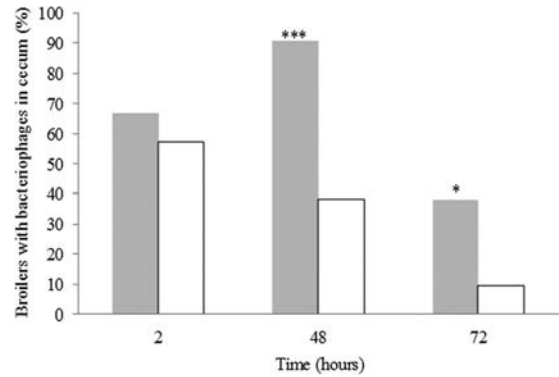


FIG 4 Persistence of nonencapsulated (white bars) and liposome-encapsulated (gray bars) phages in the ceca of broilers. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

simulated gastric fluid (SGF) at pH 2.8 for 60 min. For the nonencapsulated phages (Fig. 3), after 30 min of incubation, titer losses of 4.2 log units (UAB\_Phi20), 6.2 log units (UAB\_Phi78), and 6.1 log units (UAB\_Phi87) were recorded. Further decreases occurred after 60 min: 5.7 log units (UAB\_Phi20), 8.0 log units (UAB\_Phi78), and 7.8 log units (UAB\_Phi87). In contrast, all three encapsulated phages were less prone to acidic degradation at both time points (Fig. 3) ( $P < 0.05$ ). Thus, the titer losses after 30 min of incubation were 3.2 log units (UAB\_Phi20), 4.0 log units (UAB\_Phi78), and 3.3 log units (UAB\_Phi87). After 60 min of incubation, losses of 4.8 log units (UAB\_Phi20), 5.4 log units (UAB\_Phi78), and 3.7 log units (UAB\_Phi87) were recorded.

**In vivo retention in the intestinal tract.** We studied whether the retinal residence time of phages UAB\_Phi20, UAB\_Phi78, and UAB\_Phi87 *in vivo* in broilers was prolonged by their encapsulation in cationic liposomes. Two phage cocktails were prepared: one comprising a 1:1:1 mixture of the three liposome-encapsulated phages and the other a 1:1:1 mixture of the three nonencapsulated phages. In both cases, the final concentration was  $10^{11}$  PFU/ml. Two groups of 63 broilers each were treated with the first (encapsulated) and second (nonencapsulated) cocktails. For each group, 21 chickens were euthanized 2, 48, and 72 h later, at which time the presence of phages in the cecum of each animal was determined. Figure 4 shows the percentage of chickens from each treatment group that contained phages in the cecum at each of the three time points tested. After 2 h, there was no significant difference between the two groups: 66.7% of the chickens administered the encapsulated phages versus 57.1% of those receiving the nonencapsulated phages. However, after 48 and 72 h the differences were significant: 90.5% versus 38.1% ( $P < 0.001$ ) and 38.1% versus 9.5% ( $P < 0.05$ ), respectively.

**Bacteriophage therapy against *Salmonella*.** The therapeutic efficacies of cocktails of the encapsulated and nonencapsulated forms of the three phages against *Salmonella* colonization in commercial broilers were tested. As shown in Table 3, cecal *Salmonella* concentrations were lower in the two treated groups than in the untreated control group, but the two types of cocktails differed in their long-term efficacies. Thus, within the first 6 days postinfection (during which the broilers received their respective cocktails), the decreases in the *Salmonella* concentration in both treated groups were similar and significant compared to the control. The difference in the decrease in the *Salmonella* concentration between the nonencapsulated and control groups was significant

TABLE 3 *Salmonella* concentrations in the ceca of broilers treated with encapsulated and nonencapsulated phages

Day postinfection	<i>Salmonella</i> concn in cecum ( $\log_{10}$ CFU/g) <sup>a</sup>		
	Control group	Encapsulated group	Nonencapsulated group
1	5.8 ± 0.7	3.8 ± 1.2 <sup>b</sup>	2.9 ± 2.3 <sup>b</sup>
3	6.6 ± 0.5	3.3 ± 2.6 <sup>b</sup>	3.3 ± 2.7 <sup>b</sup>
6	6.9 ± 0.8	3.2 ± 2.6 <sup>b</sup>	4.1 ± 2.1 <sup>b</sup>
8	6.7 ± 0.5	2.9 ± 2.8 <sup>b,c</sup>	5.2 ± 2.2 <sup>b</sup>
10	6.4 ± 1.0	2.5 ± 2.8 <sup>b,c</sup>	5.7 ± 1.9
15	5.2 ± 1.3	3.7 ± 1.4 <sup>b,c</sup>	6.3 ± 1.0

<sup>a</sup> Each value is the average from 14 cecum samples ± standard deviation.

<sup>b</sup> Statistical significance between the control and each treated group ( $P < 0.001$  at days 1 to 6,  $P < 0.001$  at day 8 for encapsulated group, and  $P < 0.05$  at day 8 for nonencapsulated group).

<sup>c</sup> Statistical significance between the two treated groups ( $P < 0.05$  at days 8 and 10 and  $P < 0.001$  at day 15).

only on day 8, the first day in which treatment was no longer administered (reduction of 1.5  $\log_{10}$ ;  $P < 0.05$ ). In contrast, the differences between the encapsulated and control groups were significant until the end of the experiment (day 15;  $P < 0.001$ ). In this case, the reductions on days 8, 10, and 15 were 3.8, 3.9, and 1.5 log units, respectively. Moreover, when the efficacies of the two treatments were compared statistically, the reduction in *Salmonella* achieved using the encapsulated phages was significantly greater from day 8 ( $P < 0.05$ ) until the end of the experiment (day 15;  $P < 0.001$ ).

**In vitro bacteriophage release by cecum content.** The kinetics of the release of liposome-encapsulated phages incubated for up to 60 min with the cecal contents of the chickens were determined. After 30 min, the percentages of released phages were 19.4 ± 2.6, 80 ± 17.2, and 42.7 ± 14.1 for UAB\_Phi20, UAB\_Phi78, and UAB\_Phi87, respectively (Fig. 5). After 60 min, the corresponding percentages were 74.7 ± 5.4, 92.6 ± 12.4, and 56.6 ± 16.7 (Fig. 5).

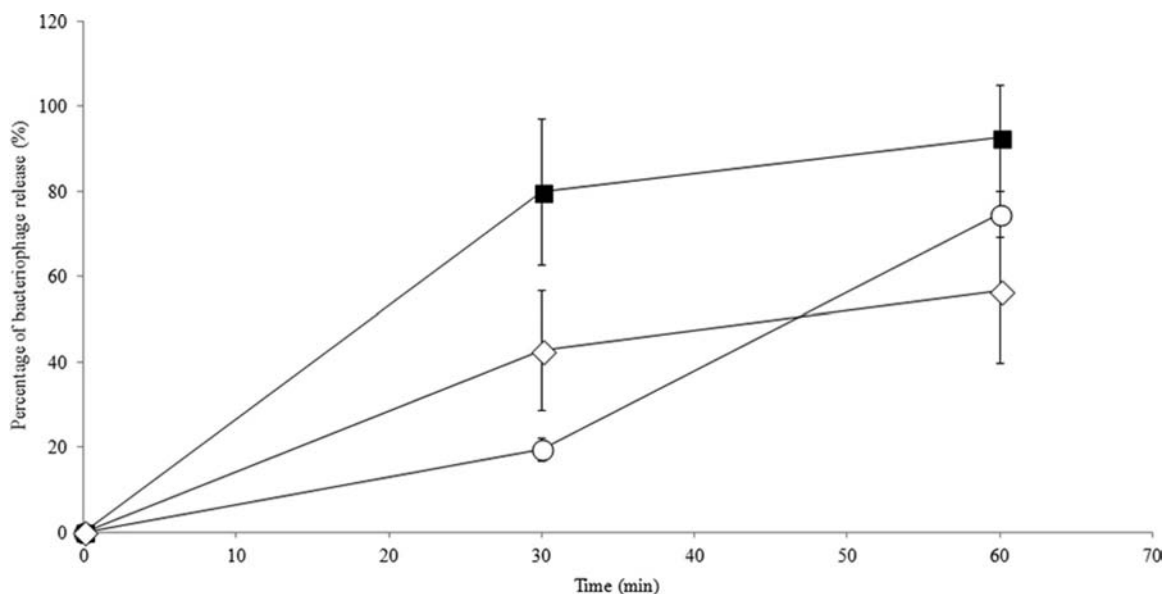


FIG 5 *In vitro* release of liposome-encapsulated phages UAB\_Phi20 (○), UAB\_Phi78 (■), and UAB\_Phi87 (◇) by the cecal contents of the chickens. Each value is the average from six independent experiments ± standard deviation.

## DISCUSSION

*Salmonella* in poultry production remains a serious problem. The use of phages to fight against these bacteria and its efficient development in the veterinary sector may therefore have a significant economic impact. However, the effectiveness of oral phage applications is compromised by several factors, such as their lack of stability in the acidic environment and their short residence time in the intestinal tracts of animals. With the aim of overcoming the problems inherent in the oral administration of phages to control bacterial pathogens, we tested the efficacy of phages encapsulated in liposomes in broiler chickens. We reasoned that cationic liposomal complexes would promote the release of the encapsulated phages in the target area and therefore their activity against *Salmonella*.

The three targeted phages (UAB\_Phi20, UAB\_Phi78, and UAB\_Phi87) were encapsulated in cationic lipid envelopes comprising a mixture of lipids with efficiencies of nearly 50%. Our encapsulation procedure does not inactivate the phages. Moreover, it can be used for phages with different morphologies, as phages UAB\_Phi20 and UAB\_Phi78 have icosahedral heads (60 ± 1.5 nm and 66 ± 1.7 nm, respectively) and noncontractile short tails (13 ± 0.7 nm and 14 ± 0.7 nm, respectively), whereas UAB\_Phi87 has an icosahedral head (68 ± 2.7 nm) but a long, contractile tail (114 ± 4.3 nm) (20, 21).

A first obvious advantage of our method is that the liposome-encapsulated phages are stable in aqueous suspensions at 4°C for at least 3 months. In addition, they can be prepared as a dry, stable powder suitable for long-term storage. In previous studies, the lytic activity of lyophilized phages, even those that had been encapsulated, was compromised. This was the case in both alginate-chitosan-encapsulated and poly(lactic-co-glycolic acid)-encapsulated phages (24, 40). However, in a study on the effect of lyophilization of nonencapsulated dysentery phage, in which raw egg yolk was employed as a source of phospholipids, the phage survived lyophilization (35). In our study, the significantly lower

susceptibility to the lyophilization process of the encapsulated than the nonencapsulated phages can be attributed to our use of a protective lipid mixture and to the addition of trehalose as a cryoprotectant.

The cationic lipids used in the lipid mixture probably protected the orally administered phages from the acidic environment of the stomach (pH ~1 to 3) by forming a barrier against protons. In fact, under simulated gastric conditions, the survival of the liposome-encapsulated phages was higher than that of their nonencapsulated counterparts (Fig. 3). In addition, after 48 and 72 h, the intestinal residence time in broilers of an orally administered cocktail of phages was significantly longer for the encapsulated than for the nonencapsulated form (Fig. 4). Consistent with the resistance of the encapsulated phages to gastric pH, at 2 h after their administration, their cecal concentration was significantly higher than that of nonencapsulated phages (data not shown). In addition, in an *in vitro* experiment (Fig. 5) in which the three phages were tested individually; we were able to show that the cecal contents provoked different release kinetics. Thus, the major part of phage UAB\_Phi78 is released during the first 30 min; meanwhile, the release of the other two phages is slower, in particular for phage UAB\_Phi87, which has a long and contractile tail. Moreover, different affinities of the viral capsid and tail proteins for the lipids used in the encapsulation can explain these results. Nonetheless, in all three cases the *in vivo* release of the phages from their lipid capsules was likely due to the activity of bile salts, because their concentrations in the intestinal tracts of broilers are high enough to cause the rupture of the liposomes (38). However, the release kinetics *in vivo* undoubtedly differ and are more complex than those determined *in vitro*. Thus, adherence of the liposomes to the intestinal mucosa, the potentially abundant mucus produced by the underlying epithelium, and the concomitant digestion of food could delay the release of phages. All these facts are crucial for the success of the phage therapy because once phages pass through the stomach, they remain retained in the intestinal tract. In this sense, an *in vitro* study showed that phage can interact with tissue culture cells in the presence of mucus (41). However, it was also described that the concentration of phages in the gut decreased dramatically when the concentration of the bacterial host was reduced (20), such that the phages were retained only briefly by the mucous membrane. We were able to show that one way to address the inherently low retention of phages is to encapsulate them in matrices such as liposomes. Cationic liposomes are positively charged and exhibit mucoadhesive properties, which together result in a much better permeability in the intestinal mucosa and a much longer intestinal retention time than for nonencapsulated formulations (28, 29).

These advantages conferred by the lipid mixture used in this study should translate into an enhanced therapeutic effect of the liposome-encapsulated phages; in fact, their long-term efficacy against *Salmonella* infection was much higher than that of the nonencapsulated phages (Fig. 4). Specifically, when administered daily for 6 days postinfection, both cocktails similarly protected the chickens against *Salmonella* colonization. However, once treatment had been stopped, the protective effects of the nonencapsulated phages disappeared after 72 h, whereas those of the encapsulated phages persisted for 1 week, consistent with their higher intestinal residence time and their presumed gradual release from liposomes. However, it must be noted that a total reduction of *Salmonella* was not reached by this treatment. In this

respect, it must be considered that the experimental infection of chickens with *Salmonella* gives rise to a high initial concentration of bacteria (approximately 6 log<sub>10</sub> CFU/g of cecum), and even under these conditions, a total *Salmonella* reduction was found in the 21% of animals treated with encapsulated phages (data not shown). Therefore, better results would be expected if the initial concentration of *Salmonella* was lower than that used here, which probably occurs under natural conditions.

It is important to note that our study of the efficacy of phage therapy was done in chickens infected with *Salmonella* (i.e., the host of the three phages), whereas determination of the *in vivo* intestinal retention of the phages was performed in noninfected chickens. This difference is crucial in the correct interpretation and comparison of our results, because during the treatment of infected animals with phage, once the phages are released they begin to multiply, thereby generating new progeny (42). This would explain the superior therapeutic effects of the liposome-encapsulated phages.

In summary, we showed that phages with different morphologies can be encapsulated into cationic liposomes and are markedly more stable to acid and to lyophilization *in vitro* than the corresponding nonencapsulated phages. It is noteworthy that the nanometric size of the liposome-encapsulated phages confers excellent characteristics for their real applications. These include an avoidance of their sedimentation in drinking water and their ready mixture with both the ground feed usually given to younger broilers and the pellets used to feed older chickens, without compromising feed quality. The prolonged intestinal residence time of the encapsulated phages and their efficient release from liposomes in the intestinal tract together resulted in potent and long-lasting therapeutic effects. We are confident that our findings will help researchers to overcome some of the disadvantages of oral phage therapy against other bacterial pathogens.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from La Caixa and the Associació Catalana d'Universitats Públiques (2010ACUP00300), AGAUR-ACCIÓ-Generalitat de Catalunya (2010VALOR00114), and AGAUR-Generalitat de Catalunya (2014SGR572). We are grateful to the Servei de Granges i Camps Experimentals and the Servei de Microscòpia of the Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) for their support. J.C. and J.O. received predoctoral fellowships from the UAB.

We thank S. Campoy, J. Aranda, and A. Mayola for their help with the animal experiments and S. Escribano for her excellent technical assistance.

## REFERENCES

1. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. 2011. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg Infect Dis* 17:7–15. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1701.P111101>.
2. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2014. The European Union Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *Efsa J* 12:3547. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3547>.
3. Leveque G, Forgetta V, Morroll S, Smith AL, Bumsetad N, Barrow P, Loredó-Osti JC, Morgan K, Malo D. 2003. Allelic variation in TLR4 is linked to susceptibility to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infections in chickens. *Infect Immun* 71:1116–1124. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.71.3.1116-1124.2003>.
4. Barrow PA. 2000. The paratyphoid salmonellae: description of the disease in poultry. *Rev Sci Tech Off Int Epizoot* 19:351–375.
5. Zhang-Barber Z, Turner AK, Barrow PA. 1999. Vaccination for control



- of *Salmonella* in poultry. *Vaccine* 17:2538–2545. [http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00060-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00060-2).
6. Desin TS, Köster W, Potter AA. 2013. *Salmonella* vaccines in poultry: past, present and future. *Expert Rev Vaccines* 12:87–96. <http://dx.doi.org/10.1586/erv.12.138>.
  7. Van Immerseel F, Cauwerts K, Devriese LA, Haesebrouck F, Ducatelle R. 2002. Feed additives to control *Salmonella* in poultry. *Worlds Poult Sci J* 58:501–513. <http://dx.doi.org/10.1079/WPS20020036>.
  8. Davies RH. 2005. Pathogen populations on poultry farms, p 101–135. In Mead G (ed), *Food safety control in the poultry industry*. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, United Kingdom.
  9. Manning JG, Hargis BM, Hinton A, Corrier DE, DeLoach JR, Creger CR. 1994. Effect of selected antibiotics and anticoccidials on *Salmonella enteritidis* cecal colonization and organ invasion in Leghorn chicks. *Avian Dis* 38:256–261. <http://dx.doi.org/10.2307/1591946>.
  10. Guttman B, Raya P, Kutter E. 2005. Basic phage biology, p 28–67. In Kutter E, Sulakvelidze A (ed), *Bacteriophages: biology and applications*. CRC Press, Boca Raton, FL.
  11. Fiorentin L, Vieira ND, Barioni W. 2005. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella enteritidis* PT4 in caecal contents of broiler chickens. *Avian Pathol* 34:258–263. <http://dx.doi.org/10.1080/01445340500112157>.
  12. Andreatti Filho RL, Higgins JP, Higgins SE, Gaona G, Wolfenden AD, Tellez G, Hargis BM. 2007. Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce *Salmonella enterica* serovar Enteritidis *in vitro* and *in vivo*. *Poult Sci* 86:1904–1909. <http://dx.doi.org/10.1093/ps/86.9.1904>.
  13. Berchieri A, Lovell MA, Barrow PA. 1991. The activity in the chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for *Salmonella* Typhimurium. *Res Microbiol* 142:541–549. [http://dx.doi.org/10.1016/0923-2508\(91\)90187-F](http://dx.doi.org/10.1016/0923-2508(91)90187-F).
  14. Borie C, Albala I, Sánchez P, Sánchez ML, Ramírez S, Navarro C, Morales MA, Retamales AJ, Robeson J. 2008. Bacteriophage treatment reduces *Salmonella* colonization of infected chickens. *Avian Dis* 52:64–67. <http://dx.doi.org/10.1637/8091-082007-Reg>.
  15. Atterbury RJ, Van Bergen MAP, Ortiz F, Lovell MA, Harris JA, De Boer A, Wagenaar JA, Allen VM, Barrow PA. 2007. Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 73:4543–4549. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00049-07>.
  16. Fiorentin L, Vieira N, Barioni W, Jr. 2005. Use of lytic bacteriophages to reduce *Salmonella* Enteritidis in experimentally contaminated chicken cuts. *Braz J Poult Sci* 7:255–260. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2005000400010>.
  17. Higgins JP, Higgins SE, Gunther KL, Huff W, Donoghue AM, Donoghue DJ, Hargis BM. 2005. Use of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products. *Poult Sci* 84:1141–1145. <http://dx.doi.org/10.1093/ps/84.7.1141>.
  18. Goode D, Allen VM, Barrow PA. 2003. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Appl Environ Microbiol* 69:5032. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.8.5032-5036.2003>.
  19. Sharma M, Patel JR, Conway WS, Ferguson S, Sulakvelidze A. 2009. Effectiveness of bacteriophages in reducing *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut cantaloupes and lettuce. *J Food Prot* 72:1481–1485.
  20. Bardina C, Spricigo DA, Cortés P, Llagostera M. 2012. Significance of the bacteriophage treatment schedule in reducing *Salmonella* colonization of poultry. *Appl Environ Microbiol* 78:6600–6607. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01257-12>.
  21. Spricigo DA, Bardina C, Cortés P, Llagostera M. 2013. Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry. *Int J Food Microbiol* 165:169–174. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.009>.
  22. Jończyk E, Klak M, Międzybrodzki R, Górski A. 2011. The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia Microbiol (Praha)* 56:191–200. <http://dx.doi.org/10.1007/s12223-011-0039-8>.
  23. Dini C, Islan GA, de Urraza PJ, Castro GR. 2012. Novel biopolymer matrices for microencapsulation of phages: enhanced protection against acidity and protease activity. *Macromol Biosci* 12:1200–1208. <http://dx.doi.org/10.1002/mabi.201200109>.
  24. Ma Y, Pacan JC, Wang Q, Xu Y, Huang X, Korenevsky A, Sabour PM. 2008. Microencapsulation of bacteriophage Felix O1 into chitosan-alginate microspheres for oral delivery. *Appl Environ Microbiol* 74:4799–4805. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00246-08>.
  25. Stanford K, McAllister TA, Niu YD, Stephens TP, Mazzocco A, Waddell TE, Johnson RP. 2010. Oral delivery systems for encapsulated bacteriophages targeted at *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle. *J Food Prot* 73:1304–1312.
  26. Ma Y, Pacan JC, Wang Q, Sabour PM, Huang X, Xu Y. 2012. Enhanced alginate microspheres as means of oral delivery of bacteriophage for reducing *Staphylococcus aureus* intestinal carriage. *Food Hydrocoll* 26:434–440. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.11.017>.
  27. Paula S, Volkov AG, Van Hoek AN, Haines TH, Deamer DW. 1996. Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness. *Biophys J* 70:339–348. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79575-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79575-9).
  28. Thirawong N, Thongborisute J, Takeuchi H, Sriamornsak P. 2008. Improved intestinal absorption of calcitonin by mucoadhesive delivery of novel pectin-liposome nanocomplexes. *J Control Release* 125:236–245. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.10.023>.
  29. Takeuchi H, Matsui Y, Sugihara H, Yamamoto H, Kawashima Y. 2005. Effectiveness of submicron-sized, chitosan-coated liposomes in oral administration of peptide drugs. *Int J Pharm* 303:160–170. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.06.028>.
  30. Singh R, Al-Jamal KT, Lacerda L, Kostarelos K. 2008. Nanoengineering artificial lipid envelopes around adenovirus by self-assembly. *ACS Nano* 2:1040–1050. <http://dx.doi.org/10.1021/nn8000565>.
  31. Van den Bossche J, Al-Jamal WT, Yilmazer A, Bizzarri E, Tian B, Kostarelos K. 2011. Intracellular trafficking and gene expression of pH-sensitive, artificially enveloped adenoviruses *in vitro* and *in vivo*. *Biomaterials* 32:3085–3093. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.12.043>.
  32. Rowland RN, Woodley JF. 1980. The stability of liposomes *in vitro* to pH, bile salts and pancreatic lipase. *Biochim Biophys Acta* 620:400–409. [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2760\(80\)90131-9](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2760(80)90131-9).
  33. Kasman LM, Kasman A, Westwater C, Dolan J, Schmidt MG, Norris JS. 2002. Overcoming the phage replication threshold: a mathematical model with implications for phage therapy. *J Virol* 76:5557–5564. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.76.11.5557-5564.2002>.
  34. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
  35. Schade AL, Caroline L. 1944. The preparation of a polyvalent dysentery bacteriophage in a dry and stable form. II. Factors affecting the stabilization of dysentery bacteriophage during lyophilization. *J Bacteriol* 48:179–190.
  36. Bennett-Guerrero E, McIntosh TJ, Barclay GR, Snyder DS, Gibbs RJ, Mythen MG, Poxton IR. 2000. Preparation and preclinical evaluation of a novel liposomal complete-core lipopolysaccharide vaccine. *Infect Immun* 68:6202–6208. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.68.11.6202-6208.2000>.
  37. Egley LEW, Breitbart M. 2003. Use of fluorescently labeled phage in the detection and identification of bacterial species. *Appl Spectrosc* 57:1138–1144. <http://dx.doi.org/10.1366/00037020360696008>.
  38. Musikasang H, Tani A, Kittikun H-A, Maneerat S. 2009. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. *World J Microbiol Biotechnol* 25:1337–1345. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-009-0020-8>.
  39. Jordan F, Mullin PF. 2008. Some useful data, p 571–587. In Pattison M, Mullin PF, Bradbury JM, Alexander DJ (ed), *Poultry diseases*, 6th ed. Elsevier Health Sciences, Philadelphia, PA.
  40. Puapermpoonsiri U, Spencer J, Van der Walle CF. 2009. A freeze-dried formulation of bacteriophage encapsulated in biodegradable microspheres. *Eur J Pharm Biopharm* 72:26–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.12.001>.
  41. Barr JJ, Auro R, Furlan M, Whiteson KL, Erb ML, Pogliano J, Stotland A, Wolkowicz R, Cutting AS, Doran KS, Salamon P, Youle M, Rohwer F. 2013. Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:10771–10776. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1305923110>.
  42. Connerton PL, Connerton IF. 2005. Microbial treatments to reduce pathogens in poultry meat, p 414–427. In Mead G (ed), *Food safety control in the poultry industry*. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, United Kingdom.



# AGRAÏMENTS

## 8. Agraïments

En primer lloc voldria donar les gràcies a les meves directores, Dra. Montserrat Llagostera i Dra. María Pilar Cortés, de tesis pel seu recolzament durant aquests quatre anys de Doctorat que ara ja arriben a la seva fi, per la paciència en aquests últimes setmanes d'escriptura i, sobretot, per confiar en mi des del principi permetent-me formar part del grup de Microbiologia Molecular.

També voldria fer extensiu el meu agraïment al Dr. Jordi Barbé cap del grup de Microbiologia Molecular, sempre amb un humor intel·ligent, al final, entre moltes altres coses, fins i tot, he après el nom d'algunes claus de judo, a respondre *do itashimaste* quan toca y el significat de *hora zulú*. Jordi, moltes gràcies per haver-me acceptat en el grup.

En especial també voldria donar les gràcies al Dr. Daniel Maspoch i a la Dra. Mary Cano del Institut Català de Nanociències. Aquest treball no hagués estat possible sense la vostra inestimable contribució, les idees innovadores i la paciència de tots els experiments de prova i error.

Montserrat, crec que amb tu he tingut un exemple de dedicació a seguir, es gairebé increïble que amb tota la burocràcia universitària i les responsabilitats com a directora del Departament de Genètica i Microbiologia sempre hagi trobat temps per poder escoltar-me. Gràcies pel teu lideratge, per compartir la teva experiència i consell al llarg d'aquests anys. Sempre has estat capaç de treure el màxim profit en totes les situacions, fins i tot en aquelles en les que tot es veu negre. Ensenyant-me com comprendre els resultats en profunditat i donant-hi un punt de vista únic i estimulant.

Pilar amb tu he pogut aprendre el que realment significa treballar en un laboratori, ja se que a vegades no acabava de fer cas del tot, però recordo perfectament tot el que m'has anat

ensenyant, fins i tot els primers mutants que vam estar construint durant la beca de col·laboració. Crec que amb tu he tingut un model a seguir per la teva capacitat de treballar amb gran minuciositat, el teu punt de vista constructiu i detallista i, sobretot, per estar sempre disposada a ajudar.

No em puc oblidar de la Dra. Susana Campoy, gràcies per tota la teva ajuda en la planificació i el treball de camp en l'experimentació animal. Encara recordo aquella setmana a l'estabulari amb els ratolins, vaig agrair molt comptar amb la teva experiència per poder tirar endavant tota la feina feta. També m'agradaria agrair-te que, temps enllà, quan encara era un estudiant de carrera, confiessis en mi i em donessis la oportunitat de demanar la beca de col·laboració.

Sou molts els que formeu part d'aquesta família del grup de Microbiologia Molecular i que us mereixeu unes paraules per haver compartit amb mi aquest llarg camí que al final s'ha acabat fent curt.

Jennifer, em sembla que hi ha poques coses que et pugui dir i que no sàpigues, crec que tampoc hi ha una paraula exacte per agrair-te tot l'esforç i ajuda en aquests últims anys. Gràcies per ser-hi sempre i estar disposada a treballar encara que fos cap de setmana o un dia festiu. Quantes vegades hem anat amunt i avall amb pollastres? ja n'he perdut el compte. Jo només sé que tot això no ha estat fàcil i que sense el teu suport, en moltes ocasions, no hauria estat possible. Espero de debò que el teu camí, sent més curt o més llarg, sigui tan o més profitós que el meu.

Miquel es increïble la teva paciència i capacitat de treball, des del primer moment vas ser capaç de mostrar una gran eficiència al laboratori, de veritat que em feia creus dels teus progressos. Gràcies a tu també per tota la teva ajuda en aquests últims temps, sobretot per totes les PCR de

replicació, gels d'electroforesi i restriccions enzimàtiques. Em sembla que si no m'haguessis donat un cop de mà encara hi seria.

Susana Escribano crec que amb tu es amb qui més temps he passat al laboratori i fins i tot m'he arribat a torbar alguns dels teus "porquets" indicadors de mala endreça!! sàpigues que ho tindrè en compte (és broma). Susana, gràcies pel teu impressionant servei al laboratori, sincerament ets una peça clau per aquest grup, tan a nivell professional com personal. En els moments més crítics sempre he pogut comptar amb tu i crec que en molts casos no ho hauríem aconseguit sense la teva ajuda. Ah! I si algun dia em decideixo a adoptar un gos, no dubtis que et vindré a demanar que m'acompanyis.

Joan Ruiz, això dels Joans del laboratori sembla que ja es va acabant, quina llàstima eh? Gràcies per entendre perfectament les necessitats del moment i tenir sempre la solució a tot. Per intentar entendre les coses d'una altre manera i la comprensió en els moments complicats.

Jesús crec que amb tu, el que més clar m'ha quedat és que a vegades més val ser breu. El laboratori ha canviat molt des de que vas arribar, suposo que tots d'una manera o altre hi aportem la nostre part i això al final es nota. Gràcies pel teu recolzament en els moments més difícils i, per suposat, també en els bons.

Oihane amb tu també hi he pogut comptar sempre. Crec que al llarg d'aquests anys hem coincidint molts caps de setmana al laboratori, jo amb els pollets i tu amb les teves proteïnes, m'equivoco? Gràcies per escoltar-me quan ha fet falta i per compartir moments divertits com el *de de dónde vienen las manzanas???*

A les noves incorporacions de l'equip, María i Jordi, és una llàstima que hagi pogut compartit poc temps amb vosaltres. També a tota la gent que ha passat pel laboratori i ha contribuït en el meu aprenentatge, Dr. Albert Mayola, Dra. Laura Medina, Andrea, Dra. Carlota Bardina, Eva,

Carla, Dra. Estela Noguera i molts d'altres que podria afegir, a tots us desitjo que tot us vagi molt bé. En especial voldria incloure el Dr. Denis Spricigo per transmetre'm els seus coneixements de bacteriòfags i també iniciar-me en totes les metodologies necessàries per poder-hi treballar. Per això, t'estic molt agraït, ja que amb aquesta base he pogut construir el treball d'aquests últims anys.

Agrair al Servei de Granges i Camps Experimentals de la Universitat Autònoma de Barcelona, en particular en Jose Luís i en Ramón, pels seus esfoços per quadrar tots els horaris quan semblava impossible i trobar solucions imaginatives als obstacles que hem anat trobant al llarg de tot aquest temps. Vull fer extensius també aquests agraïments al Servei de Microscòpia de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), per les excel·lents imatges obtingudes al llarg d'aquest treball.

I'm also very grateful with Paul Barrow and Robert Atterbury for letting me work during three months at the University of Nottingham. Thank you for teaching me new methodologies, ways of thinking, and the most important, some English. I wish you all the best.

Tamara ara si que això ja s'acaba, gràcies per aguantar durant aquests anys els canvis de plans a última hora i els caps de setmana que no ho acabaven de ser. Gràcies per fer-me costat en els moments bons i els més complicats. També pels consells de disseny, sobretot aquells relacionats amb els colors, ja saps que aquesta part no és el meu fort. Ara comença una nova etapa que per ara sembla confosa, però si continuem junts com fins ara, seguirem endavant i aconseguirem el que ens proposem.

Per últim voldria agrair tot el recolzament que la meva família m'ha ofert no només aquests últims anys, sinó des de bon principi. Especialment, als meus pares i germà, sense vosaltres no seria qui sóc i tampoc hauria pogut arribat tan lluny. Moltes gràcies.

Aquest treball ha estat finançat pels projectes de La Caixa i l'Associació Catalana d'Universitats Públiques (2010ACUP00300), AGAUR – ACCIÓ-Generalitat de Catalunya (2010VALOR00114), i l'AGAUR-Generalitat de Catalunya (2014SGR572) y ha set possible gracies a la beca de Formació de Personal Investigador de la Universitat Autònoma de Barcelona.