



FACULTADE DE CIENCIAS

**MÁSTER en INNOVACIÓN en NUTRICIÓN, SEGURIDADE e
TECNOLOXÍAS ALIMENTARIAS**

Lucía Álvarez López

**ISOLAMENTO E CARACTERIZACIÓN DE BACTERIÓFAGOS DE
BACTERIAS CAUSANTES DA MASTITE BOVINA**

**AI SLAMI ENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIÓFAGOS DE
BACTERIAS CAUSANTES DE LA MAMITIS BOVINA**

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MASTITIS RELATED
BACTERIA BACTERIOPHAGES**

Traballo de Fin de Máster

Curso 2022/2023

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	7
2. OBXECTIVOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1 Mostras para illamento de bacterias causantes de mastite e bacteriófagos	16
3.2 Illamento e identificación de bacterias causantes de mastite	16
3.3 Illamento e purificación de bacteriófagos	17
3.4 Expansión de fagos	18
3.5 Illamento de DNA, secuenciación e anotación do xenoma	19
3.6 Estabilidade térmica e a distintos valores de pH	21
3.7 Comparativa control – leite	22
3.8 Ensaio de infección por fagos	22
3.9 Curva de crecemento de un paso	22
3.10 Análise estatístico	22
4. RESULTADOS E DISCUSIÓN	23
4.1 Identificación bacteriolóxica	23
4.2 Illamento de fagos	28
4.3 Morfoloxía de placas	29
4.4 Análise xenómica do fago	30
4.5 Estabilidade térmica e a distintos valores de pH	40
4.6 Comparativa control – leite	41
4.7 Ensaio de infección por fagos	42
4.8 Curva de crecemento de un paso	44
5. CONCLUSIÓN	46
6. BIBLIOGRAFÍA	47

RESUMO/RESUMEN/ABSTRACT

A resistencia aos antimicrobianos considérase a pandemia silenciosa. Estímase, que no ano 2050 as bacterias multirresistentes provocarán anualmente 10 millóns de mortes. No caso do ganado leiteiro, a mastite é unha das principais patoloxías que require do uso de antibióticos e nos últimos anos estase a complicar o tratamento das mesmas debido ao aumento das resistencias bacterianas. Como consecuencia, estanse a buscar alternativas ao uso de antibióticos, como é o caso dos bacteriófagos, virus que infectan exclusivamente bacterias. Estes virus teñen un rango de lise pequeno e normalmente cada fago so infecta unha especie bacteriana ou as veces a serotipos específicos de unha especie bacteriana. Isto ten como consecuencia que o tratamento con fagos permita eliminar as bacterias patóxenos sen afectar ao resto da microbiota.

O obxectivo de este traballo é illar de mostras de leite e de xurro de granxas de bovino leiteiro e de augas de depuradora, bacteriófagos de bacterias causantes de mastite e realizar unha caracterización dos mesmos para valorar o seu posible uso terapéutico. Illouse o fago de *Klebsiella pneumoniae* a partir de unha mostra de auga residual empregando a cepa *K. pneumoniae* CECT 8453. O xenoma de este fago foi secuenciado e presentou unha lonxitude de 40564 pares de bases e non codifica no seu xenoma nin xenes de virulencia nin de resistencia, factor importante para o seu uso en terapia con fagos.

Ademais, o bacteriófago de *K. pneumoniae* mostrou unha gran estabilidade a distintas temperaturas (-20 a 60°C) e pH, excepto a pH 12. Tamén se puido comprobar que non hai diferenzas ante a estabilidade de este fago entre o control (tampón SM) e o leite. O seguinte paso a seguir será facer estudos *in vitro* e *in vivo* para determinar o potencial terapéutico do fago illado neste estudo.

Palabras chave: Mastite bovina, leite, alternativas aos antibióticos, bacteriófagos, *Klebsiella pneumoniae*, caracterización fenotípica

La resistencia a los antimicrobianos se considera la pandemia silenciosa. Se estima, que en el año 2050 las bacterias multirresistentes provocarán anualmente 10 millones de muertes. En el caso del ganado lechero, la mastitis es una de las principales patologías que requieren del uso de antibióticos y en los últimos años se está a complicar el tratamiento de las mamas debido al aumento de las resistencias bacterianas. Como consecuencia, se están a buscar alternativas al uso de antibióticos, como es el caso de los bacteriófagos, virus que infectan exclusivamente bacterias. Estos virus tienen un rango de lisis pequeño y normalmente cada fago solo infecta una especie bacteriana o a veces a serotipos específicos de una especie bacteriana. Esto tiene como consecuencia que el tratamiento con fagos permita eliminar las bacterias patógenas sin afectar al resto del microbiota.

El objetivo de este trabajo es aislar de muestras de leche y de purín de granjas de bovino lechero y de aguas de depuradora, bacteriófagos de bacterias causantes de mastitis y realizar una caracterización de estos para valorar su posible uso terapéutico. Se aisló el fago de *Klebsiella pneumoniae* a partir de una muestra de agua residual usando la cepa *K. pneumoniae* CECT 8453. El genoma de este fago fue secuenciado y presentó una longitud de 40564 pares de bases y no codifica en su genoma ni genes de virulencia ni de resistencia, factor importante para su uso en terapia de fagos.

Además, el bacteriófago de *K. pneumoniae* mostró una gran estabilidad a distintas temperaturas (-20 a 60°C) y pH, excepto a pH 12. También se pudo comprobar que no hay diferencias ante la estabilidad de este fago entre el control (tampón SM) y la leche. El siguiente paso por seguir será hacer estudios *in vitro* y *in vivo* para determinar el potencial terapéutico del fago aislado en este estudio.

Palabras clave: Mastitis bovina, leche, alternativas a los antibióticos, bacteriófagos, *Klebsiella pneumoniae*, caracterización fenotípica

Antimicrobial resistance is considered the silent pandemic. It is estimated that by 2050 multidrug-resistant bacteria will cause 10 million deaths annually. In the case of dairy cattle, mastitis is one of the main pathologies that require the use of antibiotics and in recent years, the treatment of the same is becoming complicated due to the increase in bacterial resistance. As a result, alternatives to the use of antibiotics are being sought, such as bacteriophages, viruses that exclusively infect bacteria. These viruses have a small lysis range and normally each phage only infects one species of bacteria or sometimes to specific serotypes of a bacterial species. This means that phage treatment eliminates pathogenic bacteria without affecting the rest of the microbiota.

The objective of this work is to isolate milk and slurry samples from dairy cattle farms and sewage treatment plants, bacteriophages of bacteria causing mastitis and perform a characterization of them to assess their possible therapeutic use. The phage of *Klebsiella pneumoniae* was isolated from a wastewater sample using the *K. pneumoniae* CECT 8453 strain. The genome of this phage was sequenced and presented a length of 40564 base pairs and it does not encode virulence or resistance genes in its genome, an important factor for its use in phage therapy.

In addition, the bacteriophage of *K. pneumoniae* showed great stability at different temperatures (-20 to 60°C) and pH, except at pH 12. It was also possible to verify that there are no differences in the stability of this phage between the control (SM buffer) and milk. The next step will be to do *in vitro* and *in vivo* studies to determine the therapeutic potential of the phage isolated in this study.

Keywords: Bovine mastitis, milk, antibiotic alternatives, bacteriophages, *Klebsiella pneumoniae*, phenotypic characterization

1. INTRODUCCIÓN

A mastite bovina é unha inflamación das glándulas mamarias das vacas (Sharun, y otros, 2021). Esta enfermidade está causada principalmente por infeccións bacterianas, pero tamén pode deberse a traumas físicos (Cheng & Han, 2020). Actualmente considérase unha enfermidade de gran impacto a nivel de benestar animal (Sharun, y otros, 2021) e a nivel económico debido ás perdas que provoca nas industrias gandeiras e lácteas (Cheng & Han, 2020).

Segundo o grado de inflamación da ubre pódense diferenciar tres clases de mastite bovina; clínica, subclínica e crónica. A mastite clínica trátase do tipo de mastite máis fácil de detectar debido a que a ubre adquire unha tonalidade vermella e sofre inchazón. A maiores as vacas presentan febre (Cheng & Han, 2020). Un 40% do casos de mastite son causados por *Streptococcus uberis*, e *Streptococcus dysgalactiae*, un 30% por *Staphylococcus aureus* e un 30% por *Escherichia coli* (Abebe, Hatiya, Abera, Megersa, & Asmare, 2016).

A diferenza da mastite clínica, a subclínica representa un 59,2% dos casos (Abebe, Hatiya, Abera, Megersa, & Asmare, 2016) e caracterízase por unha redución na produción do leite acompañada de un aumento no recuento de células somáticas. Sen embargo, neste caso non se aprecian cambios na ubre, o que dificulta o seu diagnóstico.

O terceiro tipo de mastite bovina que se pode distinguir segundo o grado de inflamación da ubre é a mastite crónica. Esta trátase de unha clase de mastite que perdura varios meses (Cheng & Han, 2020).

As células somáticas son células propias do organismo que lle serven á glándula mamaria como mecanismo de defensa contra organismos patóxenos. Están constituídas por leucocitos e células epiteliais. Unha vez que un patóxeno ataca as células do interior da glándula mamaria, o sistema inmunitario do organismo responde enviando glóbulos brancos á ubre para neutralizar as bacterias invasoras. Estes glóbulos brancos son os que constitúen maioritariamente o recuento de células mamarias. Por iso se di que un aumento de estas células garda relación coa presenza de mastite bovina (Hernández Reyes & Bedolla Cedeño, 2008). Un recuento por encima de 200000 células somáticas/mililitro de leite indica inflamación na ubre (Izurieta, 2017).

Existen tres factores principais que están asociados coa incidencia da mastite bovina, o factor patóxeno, hóspede e ambiental (Cheng & Han, 2020). A mastite bovina está causada por diferentes bacterias. En base á infección bacteriana pódense diferenciar mastites contaxiosas e ambientais. A primeira transmítese de vaca a vaca por malas prácticas durante o muxidura; por exemplo polo uso de equipo en mal estado ou por falta de desinfección dos tetos tras o muxido. Polo tanto, a hixiene é un dos factores claves para previr este tipo de mastite (Cheng & Han, 2020). Dentro dos patóxenos máis comúns na mastite contaxiosa podemos diferenciar; *S. aureus*, *S. agalactiae*, *Mycoplasma bovis* ou *Corynebacterium* spp. (García Á. , 2004).

S. aureus é un patóxeno Gram positivo. Trátase do patóxeno máis frecuentemente illado de mastites bovinas. Está asociado fundamentalmente coa mastite subclínica, aínda que tamén pode causar mastite clínica (Cheng & Han, 2020). Xera infeccións que poden perdurar ao longo

da lactación, polo tanto é preciso evitar o contacto entre as vacas sas e as infectadas, reducir o número de animais infectados (San Julián, 2012) e manter a hixiene do ubre das vacas durante o muxido. Este patóxeno pode chegar a reducir a produción de leite (Cheng & Han, 2020). O principal tratamento para paliar a mastite provocada por *S. aureus* basease no uso de antibióticos (San Julián, 2012), sen embargo, este patóxeno está desenvolvendo resistencia a antibióticos, como os β – lactámicos, debido á formación de biopelículas (Cheng & Han, 2020).

S. agalactiae é un patóxeno Gram positivo. Encóntrase tanto no tracto gastrointestinal dos animais, como no medio ambiente. Isto xera que se transmita a través do equipo de muxido e a través da vía oro – fecal polo consumo de auga contaminada (Cheng & Han, 2020). O gando infectado por este tipo de patóxeno presenta un alto recuento de células somáticas asociado a unha diminución na produción de leite (San Julián, 2012). Ao igual que no caso anterior o tratamento basease no uso de antibióticos, como os β – lactámicos (San Julián, 2012). Sen embargo, este patóxeno pode sobrevivir durante moito tempo na ubre das vacas grazas á formación de biopelículas, polo que o tratamento con antibióticos non é o máis axeitado (Cheng & Han, 2020).

M. bovis trátase de un patóxeno que causa menos mastites que *S. aureus* e *S. agalactiae*. Trátase de unha bacteria que é moi común no tracto respiratorio do gando bovino, pero que pode chegar a transferirse á glándula mamaria. A pesar de ser menos común xera graves enfermidades que producen unha diminución na produción de leite e incluso pode chegar a cesar a produción de este (San Julián, 2012). Ao igual que nos casos anteriores esta bacteria tamén posúe a capacidade de formar biopelículas, o que fai que sexa resistente aos antibióticos. Polo que o único medio de control é o seguimento do gando, separación e sacrificio das vacas infectadas (Cheng & Han, 2020).

A mastite ambiental, a diferenza da contaxiosa, está causada por bacterias que proveñen do entorno da vaca, é dicir, do chan, das camas ou do esterco. De forma que as bacterias poden acceder ao teto durante o muxido (Cheng & Han, 2020). De entre as bacterias que causan este tipo de mastite destacan; *S. uberis*, *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp. ou *Enterococcus* spp. (García Á. , 2004).

S. uberis é un patóxeno ambiental asociado tanto a mastites clínicas como subclínicas. Trátase de un patóxeno que habita tanto na pel da vaca como no seu entorno, é dicir, na cama, no chan ou no esterco. Xeralmente, este tipo de patóxeno causa infeccións cando as condicións ambientais son malas ou cando o gando ten feridas nos tetos (San Julián, 2012). Como nos casos anteriores este patóxeno é capaz de formar biopelículas que lle confiren resistencia tanto baixo estrés ambiental como ante o tratamento con antibióticos (Cheng & Han, 2020).

E. coli é unha bacteria Gram negativa. Trátase de un dos patóxenos causantes da mastite ambiental, polo que pode encontrarse no entorno onde reside o gando e causa mastite clínica. Os síntomas que provoca este patóxeno na vaca poden ser moi variados, pode causar signos locais que inclúen ubre de cor vermello e inchado ou febre. Nos casos mais graves a produción de leite pode verse diminuída e incluso pode cesar (Cheng & Han, 2020).

Klebsiella pneumoniae é unha bacteria Gram negativa. Encontrase na materia fecal bovina, no ambiente ou nas camas de serrín. De entre os casos clínicos de mastite este patóxeno representa entre o 2 ao 9% (Massé, Dufour, & Archambault, 2020). Xera unha diminución na produción de leite, febre e incluso abortos. Xeralmente os brotes de mastite por este patóxeno prodúcense en verán. Presenta baixas taxas de curación bacteriolóxica despois da administración de antimicrobianos (Martín Richard, 2007).

Pseudomonas aeruginosa causa mastites crónicas, aínda que tamén pode dar lugar a cadros agudos ou subagudos. Trátase de un patóxeno oportunista, que vive no chan e na auga. A principal causa de infección débese á limpeza dos tetos con auga contaminada. Ademais, trátase dun patóxeno moi resistente ao tratamento con antibióticos debido á capacidade de formación de biopelículas (Cheng & Han, 2020).

Enterococcus spp. son patóxenos Gram negativos que causan infeccións ambientais porque residen no entorno do gando. Ao igual que nos casos anteriores trátase de patóxenos que resisten moi ben ao tratamento con antibióticos debido á formación de biopelículas (Cheng & Han, 2020).

Entre os anos 2005 – 2011 o Laboratorio Interprofesional Galego de Análise do Leite (LIGAL) e un equipo de investigación da Universidade de Santiago de Compostela (USC) realizaron un estudo acerca dos principais patóxenos causantes de mastite bovina en Galicia (Galego, 2017).

Neste estudo demostrouse que hai unha tendencia á baixa de algúns patóxenos como *Corynebacterium* spp., *S. agalactiae* ou *Staphylococcus epidermidis*. Sen embargo, outros patóxenos como *S. uberis* ou estafilococos coagulasa negativa seguen incrementando a súa presenza (**Figura 1**) (Galego, 2017).

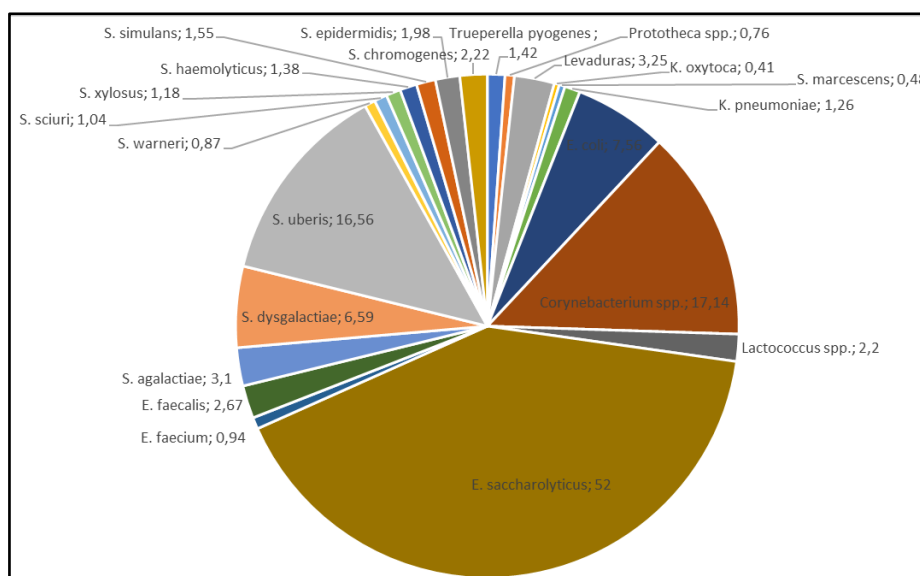


Figura 1. Frecuencia de patóxenos en mostras de leite (Galicia 2005 – 2011) (Galego, 2017)

Outro estudo publicado en 2020 mostra unha comparativa da frecuencia dos principais patóxenos causantes de mastite entre dous traballos realizados en Galicia, un en 1998 e outro

en 2017 (**Figura 2**). Patóxenos contaxiosos como *S. aureus* e *S. agalactiae* reduciron a súa presenza, mentres que *S. uberis*, *E. coli* e estafilococos coagulasa negativa aumentárona (Mato Iglesias, 2020). Tanto o estudo realizado polo LIGAL como este último coinciden nun incremento de mastite bovina causa por *S. uberis* e estafilococos coagulasa negativa.

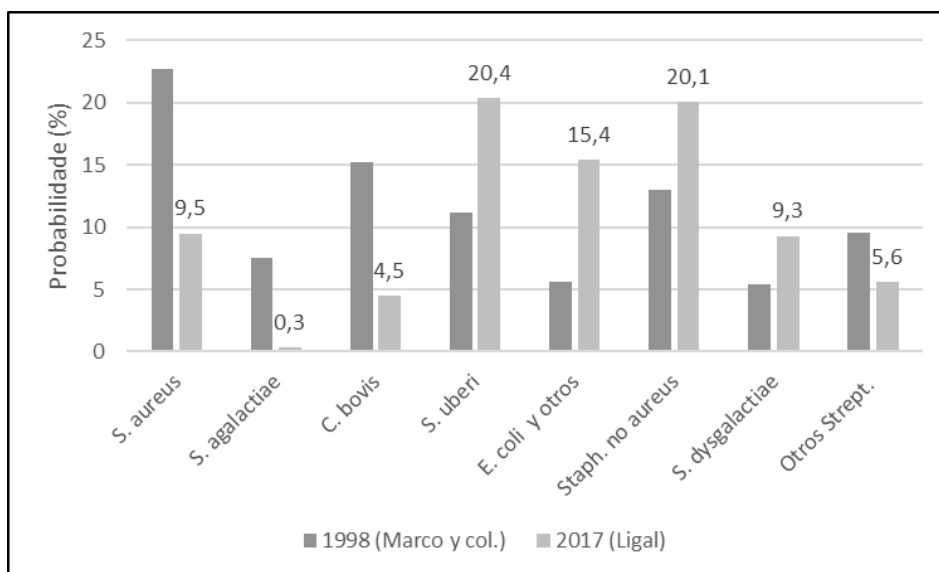


Figura 2. Evolución do orixe dos patóxenos en Galicia (1998 - 2017) (Mato Iglesias, 2020).

Outro dos factores a ter en conta na incidencia da mastite bovina é o factor hóspede. Este está influenciado por distintos aspectos como o factor xenético. As razas de gando de alto rendemento son máis susceptibles a enfermidades, coma a mastite, que as razas de rendemento medio. Por exemplo; a raza Holstein – Friesian é máis propensa a padecer este tipo de enfermidades que o gando Jersey. Ademais de isto, as vacas múltiparas son máis vulnerables que as primíparas (shaheen & Showkat , 2016).

A estrutura do ubre inflúe na incidencia da mastite. Aquelas vacas que presentan tetos grandes e ubres colgantes son mais susceptibles a padecer esta enfermidade. Isto débese a que a distancia entre a ubre e o chan é menor, o que implica que si o chan está contaminado haxa un maior risco de infección (Persson Waller, Personson, Nyman, & Stengärde, 2014). Ademais, a medida que as vacas van adquirindo máis idade tenden a ter o canal do teto máis aberto, o que fai que sexan animais máis susceptibles a unha infección bacteriana intramamaria (Cheng & Han, 2020).

Tras o parto as vacas entran nun período de lactación, no cal a demanda de enerxía e de nutrientes é maior. Isto implica que o consumo de alimento por parte do gando vacún debe satisfacer as demandas que esixe a lactación. Sen embargo, un balance enerxético negativo debido a deficiencia en oligoelementos, aminoácidos e vitaminas na dieta provoca que o gando vaia ser máis susceptible a padecer infeccións (Cheng & Han, 2020).

En canto ao factor ambiental a limpeza é un punto clave xa que o chan contaminado ou a cama dos animais mollada pode provocar un aumento na incidencia da mastite bovina. Ademais, un gran número de animais nun recinto pequeno, unha mala ventilación ou un clima

cálido e húmido tamén poden incidir na presenza da mastite bovina (Zeinhom, Abdel Aziz, Mohamed, & Bernabucci, 2016).

Como xa se citou anteriormente a mastite trátase de unha enfermidade que ten unha gran importancia económica, non so no ámbito gandeiro, se non tamén no ámbito da industria láctea. É un dos motivos de baixa animal nas explotacións gandeiras. O Control Leiteiro Galego no ano 2021 rexistrou 30096 baixas bovinas en Lugo, concretamente 3194 (10%) debéronse á mastite.

A morte por mastite aumenta a medida que aumenta o número de partos, en vacas primeirizas o porcentaxe é de un 7.2%, sen embargo, en vacas con cinco partos o porcentaxe é de un 14.2%.

O momento da lactación tamén é un punto importante na baixa animal. As baixas ao inicio da lactación débense a mortes na explotación, sacrificio, accidente ou enfermidade. Ao final da lactación débense á improdutividade ou esterilidade. Sen embargo, no período medio de lactación as mortes prodúcense fundamentalmente por mastite bovina (**Figura 3**) (Africor Lugo, 2021).

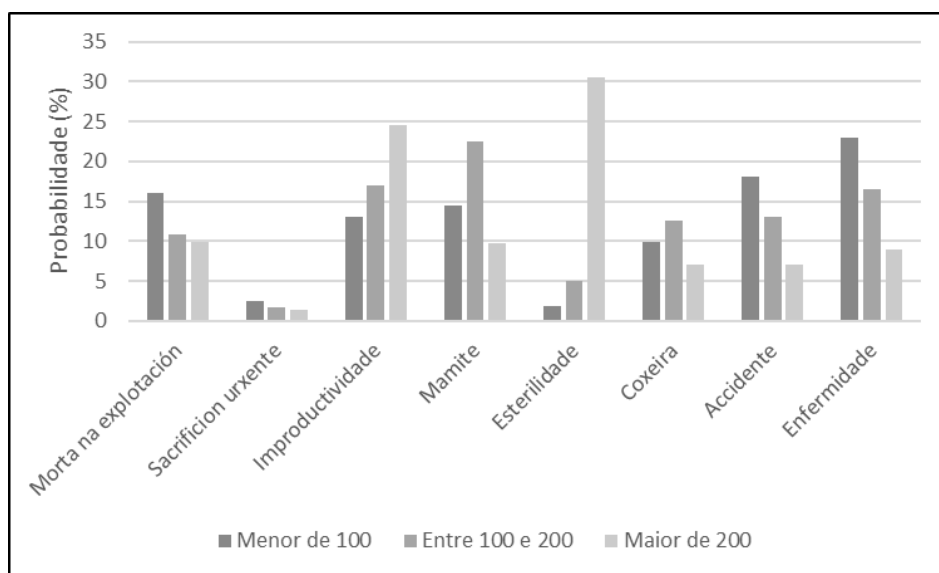


Figura 3. Motivo de baixa durante o período de lactación (Africor Lugo, 2021).

Ademais, a mastite implica outros gastos económicos. O gando que padece esta enfermidade debe ser tratado e isto implica gastos veterinarios e costes en medicamentos. Pero ademais, este leite non pode comercializarse polo que hai unha perda no valor de este alimento (Sharun, y otros, 2021).

Isto implica que sexa necesario un control da mastite eficiente e efectivo, de forma que os posibles casos deben ser detectados de maneira temperá. Requírese de novas técnicas de detección máis sensibles, prevención do gando non infectado e sobre todo, boas prácticas de manipulación durante o momento de muxir. Esta última é unha etapa crucial, xa que supón a gran maioría das infeccións porque as máquinas de muxir úsanse en distintas vacas, polo que é necesario desinfectar antes e despois deste proceso (Sharun, y otros, 2021).

Os costes en medicamentos débense ao uso de antibióticos. Xa que a maneira principal para paliar a mastite consiste no uso de estes medicamentos, como ampicilina, tetraciclina ou penicilina. Estes antibióticos poden ser administrados vía intramamaria, unha vez se acabou de muxir a vaca e se eliminaron todos os posibles restos, e por vía intramuscular ou intravenosa (M, S, M, M, & M, 2017). Unha vez finalizado o tratamento, o leite non pode comercializarse xa que debe de cumprirse un período de espera para así evitar a presenza de restos de antibióticos neste alimento e evitar así as posibles resistencias a antibióticos, o que supón unha perda económica.

Pese a todo isto hoxe en día están aparecendo unha serie de problemas derivados do uso de antibióticos. Ao longo do tempo estes medicamentos usáronse de forma excesiva e incontrolada, o que fixo que foran xurdindo unha serie de resistencias. Por iso o Grupo de Expertos Ad Hoc en Asesoramento Antimicrobiano (*Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert Group*, AMEG) estableceu unha clasificación dos antibióticos segundo as posibles consecuencias que poidan ter na saúde humana debido ás resistencias. Isto axuda á correcta elección dos antibióticos por parte dos veterinarios á hora de tratar un animal con algunha infección. Esta clasificación divídese en catro categorías. A categoría A inclúe os antibióticos que se deben evitar porque non están autorizados pola UE e non deben usarse en animais produtores de alimentos, como é o gando vacún debido á produción de leite. A categoría B inclúe aos antibióticos que se deben de limitar porque teñen importancia transcendental nos seres humanos. So se poden usar cando os antibióticos das categorías C ou D non sexan eficaces. En caso de ser posible, o seu uso debe ser determinado por probas de susceptibilidade antimicrobiana. A categoría C inclúe a aqueles antibióticos cos que se debe de ter precaución, sen embargo, en casos veterinarios si se poden usar cando non hai alternativas na categoría D. Ademais, fronte a estes antibióticos existen alternativas na medicina humana. A categoría D inclúe aos antibióticos cos que se debe de ter prudencia, xa que so se usarán ante indicacións médicas (EMA).

A Organización das Nacións Unidas para a Agricultura e a Alimentación (FAO) establece que os agricultores teñen un papel clave en canto á resistencia a antimicrobianos. Deben adoptar boas prácticas de hixiene nas actividades levadas a cabo nas explotacións para así evitar infeccións coma a mastite. En caso de unha enfermidade que requira do uso de antimicrobianos contribuírase ao aumento da resistencia antimicrobiana, de forma que os patóxenos resistentes poden chegar ao medio ambiente por medio dos restos animais ou da esorrentía das explotacións (Elcacho, 2019).

Estes restos procedentes das explotacións gandeiras poden contaminar alimentos propios da alimentación humana, de tal maneira que, de forma indirecta estaríase aumentando a resistencia a antibióticos nos seres humanos. En 2014 estímase que as bacterias multirresistentes causaron a morte de aproximadamente 50000 persoas en Europa e Estados Unidos. Prevese que no ano 2050 as mortes por esta causa poidan chegar a aumentar a 10 millóns (IACG, 2019).

Por estes motivos é necesario cumprir co uso de antibióticos segundo as distintas categorías citadas anteriormente. A maiores, tamén se debe de evitar un uso innecesario de estes medicamentos, evitar tratamentos durante períodos moi longos e usar a dose suficiente.

O incumprimento de estes tres aspectos fai que cada vez haxa máis bacterias resistentes a antibióticos, o que fai que sexa necesario buscar un novo método para poder tratar a mastite.

Este novo método xurde do estudo dos bacteriófagos (fagos). Son virus que infectan bacterias de maneira específica e teñen a capacidade de replicarse exponencialmente (Sharun, y otros, 2021). Son inofensivos tanto para humanos como para animais (García Suárez, Martínez Fernández, & Rodríguez González, 2008). Polo tanto, hoxe en día están a considerarse como unha alternativa antimicrobiana para reducir o uso de antibióticos nas industrias gandeiras (Cheng & Han, 2020). Son os organismos máis abundantes na natureza, aproximadamente hai 10 veces máis bacteriófagos que procariontes (Zhao, y otros, 2021).

Os fagos poden clasificarse como virulentos ou temperados. A principal diferenza é o método de replicación. Os fagos virulentos replícanse seguindo o ciclo lítico, mentres que os fagos temperados poden replicarse seguindo o ciclo lítico ou lisoxénico (**Figura 4**). Aqueles fagos que seguen o ciclo lítico caracterízanse porque unha vez que entran en contacto coa célula comeza a transcripción do seu material xenético, polo que a infección é rápida. Sen embargo, os bacteriófagos con ciclo lisoxénico, son capaces de insertarse no DNA da célula hóspede (Pelzek, Fischetti, Schuch, & Schmitz, 2008).

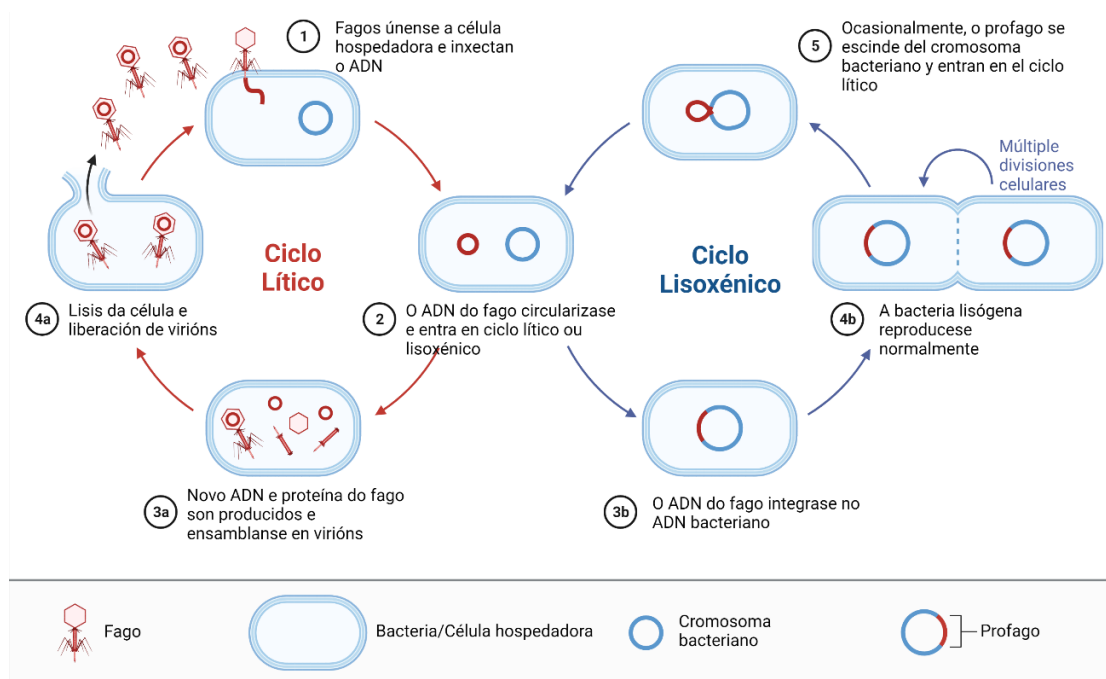


Figura 4. Representación ilustrativa dos ciclos líticos e lisoxénicos que poden seguir os fagos. Figura creada a partir dos modelos de Biorender.com.

O mecanismo de acción consiste na infección de unha bacteria hóspede, sucesiva replicación e finalmente liberación ao exterior por lise bacteriana. Isto implica a morte da bacteria e o comezo dun novo ciclo para infectar novas bacterias (García Suárez, Martínez Fernández, & Rodríguez González, 2008).

En 1917 o microbiólogo canadense Félix d’Herelle descubriu “un invisible antagonista microbiano do bacilo da disentería” que posteriormente confirmou que se trataba de un virus e

denominou bacteriófago. Este descubrimento recoñécese que foi compartido con outro investigador, Frederick Twort, porque identificou bacteriófagos de forma independente en 1915.

Posteriormente a investigación proseguiu, de forma que os bacteriófagos empezaron a usarse con fins terapéuticos para tratar enfermidades como a disentería, infeccións cutáneas por *S. aureus*, peste bubónica ou cólera. Estes descubrimentos sentaron as bases para a investigación recente. Hoxe en día, o interese polos bacteriófagos volveu a resurxir debido ao incremento de bacterias resistentes a antibióticos (Pelzek, Fischetti, Schuch, & Schmitz, 2008).

Un dos estudos realizado coa finalidade de tratar a mastite bovina con bacteriófagos foi o realizado en 2020 no cal se determinaron os efectos beneficiosos do bacteriófago CM8-1 en mastites causadas por *K. pneumoniae*. De tal forma que se determinou unha redución do dano estrutural e da resposta inflamatoria do tecido da glándula mamaria despois da indución da mastite con *K. pneumoniae*. Sen embargo, neste estudo tamén se concluíu que son necesarios mais estudos *in vivo* (Zhao, y otros, 2021).

O uso de bacteriófagos para o tratamento de enfermidades e en concreto para o caso da mastite bovina ten varias vantaxes. Por unha parte son moi específicos, é dicir, só son activos fronte aos patóxenos dos que foron illados, de forma que o resto da microbiota quedará intacta (Rodríguez, Martínez, & García, 2010). So se replican cando o patóxeno está presente, polo que un mínimo aumento de este implica a replicación inmediata do bacteriófago (García Suárez, Martínez Fernández, & Rodríguez González, 2008). Poden ser resistentes a factores físicos e químicos desfavorables, como por exemplo, altas ou baixas temperaturas, distintos pH, salinidade... Ademais, o desenvolvemento de fagos que poidan ser usados terapéuticamente é mais sinxelo que o desenvolvemento de antibióticos. Finalmente, os bacteriófagos tamén poden codificar despolimerasas que permiten a degradación das matrices extracelulares, o que permite degradar biopelículas (Pelzek, Fischetti, Schuch, & Schmitz, 2008).

Sen embargo, o uso de bacteriófagos tamén ten unha serie de desvantaxes, como por exemplo, a xeración rápida de cepas resistentes ao hóspede, a eliminación dos bacteriófagos por parte do sistema reticuloendotelial ou a xeración de xenes de virulencia que poden transmitirse aos hóspedes (Pelzek, Fischetti, Schuch, & Schmitz, 2008).

2. OBXECTIVOS

Os obxectivos de este traballo foron:

- Illamento de bacterias causantes de mastite a partir de mostras de leite de vacas con mastite.
- Illamento de bacteriófagos de bacterias causantes da mastite a partir de mostras de leite de vacas con mastite, de mostras de xurro de granxas de bovino leiteiro e de augas de depuradora.
- Caracterización dos bacteriófagos illados previamente para o seu uso terapéutico.
- Caracterización xenotípica do fago de *K. pneumoniae* mediante técnicas de secuenciación masiva e ferramentas bioinformáticas.
- Caracterización fenotípica do fago de *K. pneumoniae* illado en este estudo incluíndo estabilidade a diferentes temperaturas e pH, multiplicidade de infección (MOI) e estabilidade en leite.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Mostras para illamento de bacterias causantes de mastite e bacteriófagos

Os bacteriófagos son virus que infectan exclusivamente bacterias e por tanto precisan delas para producir novas partículas víricas. Por iso para poder illar os bacteriófagos, en primeiro lugar é preciso contar con bacterias hóspedes. Poden ser empregadas dous tipos de bacterias. Por un lado as cepas de coleccións de cultivo tipo a Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) da Universidade de Valencia ou tamén se poden empregar cepas salvaxes illadas de diversas matrices. É importante resaltar que nas mostras onde atopamos as bacterias de interese tamén se atopan os bacteriófagos que as depredan, xa que coexisten. Estas bacterias salvaxes son de gran interese para illar bacteriófagos xa que os fagos que atopamos nas mostras soen ter una alta capacidade de infección sobre esas bacterias.

Por tanto, no presente estudo o primeiro que se realizou foi o illamento de bacterias causantes de mastite de mostras de leite de vacas con mastite. Para este propósito recolléronse un total de 42 mostras recollidas na provincia de Lugo.

As mesmas mostras de leite empregadas para o illamento de bacterias causantes de mastites así coma as 10 mostras de xurro de granxas leiteiras foron empregadas para o illamento de fagos. Como medida de continxencia no caso de non illar fagos das mostras de leite e xurro das explotacións gandeiras decidiuse tamén recoller unha mostra de auga no punta de entrada de unha estación de depuración de augas residuais de Lugo. Estas mostras soen ter unha ampla concentración e diversidade de fagos dado o seu orixe e son as mostras de elección en moitos estudos para o illamento dos mesmos.

3.2 Illamento e identificación de bacterias causantes de mastite

Para o illamento e a identificación do patóxeno causante da mastite usáronse distintos medios de cultivo selectivos e diferenciais. As mostras de leite e xurro foron sembradas empregando a técnica de sembra por esgotamento en estría.

En primeiro lugar empregouse un medio selectivo especificamente deseñado para o illamento de bacterias Gram positivas causantes de mastite. Este método permite illar os patóxenos *S. agalactiae*, *S. uberis* e *S. aureus* e denominase CHROMagar™ GP Mastitis (15.0 g/L agar, 20.0 g/L peptona e extracto de levadura, 5.0 g sales, 2.4 g mestura cromoxénica e selectiva, 8.0 mL/L factores de crecemento) (CHROMagar, Paris, Francia). Este medio foi incubado a 37°C durante 24h en condicións aerobias.

Tamén se empregou un medio clásico para o illamento de *Streptococcus* spp. como é o *Edwards Medium Base* (10.0 g/L péptido dixestivo de tecido animal, 10.0 g/L extracto de carne, 1.0 g/L esculina, 5.0 g/L cloruro sódico, 0.0013 g/L cristal violeta, 0.33 g/L sulfato de talio de

tenreira, 15.0 g/L agar) (Oxoid, Basingstoke Hampshire, Reino Unido) suplementado con un 7% de sangue de ovella defibrinada (Thermo Scientific Oxoid, Reino Unido). Este medio foi incubado a 37°C durante 24h.

Para o illamento de *S. aureus* empregouse o medio de cultivo *Baird Parker agar base* (10.0 g/L triptona, 5.0 g/L extracto de carne, 1.0 g/L extracto de levadura, 5.0 g/L cloruro de litio, 12.0 g/L glicina, 10.0 g/L piruvato sódico, 20.0 g/L agar) (VWR, Barcelona, España) suplementado con 0.1 g/L de telurio potásico (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unido), e 50.0 mL de emulsión de xema de ovo. Estas placas foron incubadas a 37°C durante 48h.

Para a identificación e recuento de coliformes en mostras de leite usouse o medio *Violet Red Bile Lactose Agar* (VRBL) (3.0 g/L extracto levadura, 7.0 g/L peptona, 1.5 g/L sales biliares, 10.0 g/L lactosa, 5.0 g/L cloruro sódico, 0.03 g/L vermello neutro, 0.0002 g/L cristal violeta, 13.0 g/L agar). Este medio foi incubado a 37°C durante 24h.

Dos diferentes medios e mostras empregadas nesta parte do traballo seleccionáronse colonias que tiñan unha morfoloxía típica dos patóxenos de interese para este estudo nos diferentes medios de cultivo empregados, que foron purificadas empregando caldo de BHI (27.5 g/L dixestión enzimática de tecido animal, extracto de cerebro e corazón, 2.0 g/L D(+)-Glucose, 5.0 g/L NaCl, 2.5 g/L Na_2HPO_4) (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) suplementado con 15.0 g/L de agar (Liofilchem, Teramo, Italia). Una vez purificados os illados, con unha asa bacteriolóxica seleccionouse una colonia illada e foi transferida a un tubo de caldo BHI con 20% de gliceral e conservadas a -20°C ata ser usadas.

Para confirmar a identidade dos illados, estes foron sembrados no medio *Columbia agar base* (10.0 g/L peptona de caseína, 5.0 g/L peptona de carne, 3.0 g/L extracto de corazón, 5.0 g/L extracto de levadura, 1.0 g/L almidón, 5.0 g/L cloruro sódico, 13.0 g/L agar) suplementado con 5% de sangue de ovella defibrinada e foron enviados ao LIGAL. A identificación foi realizada empregando un sistema automatizado para a identificación microbiana por espectrometría de masas utilizando tecnoloxía de desorción/ionización láser asistida por matriz - Tempo de voo (MALDI-TOF). Concretamente empregouse o equipo Vitek™ (Biomerieux, Marcy-l'Étoile, Francia) e a súa base de datos integrada.

3.3 Illamento e purificación de bacteriófagos

Para o illamento de bacteriófagos empregáronse tres tipos de mostras. Por un lado empregáronse as mostras de leite das vacas con mastite e por outro lado empregáronse as mostras de xurro e tamén a mostra de auga residual recollida na depuradora de Lugo. O método empregado foi o descrito por (Van & Kropinski, 2009) con lixeiras modificacións.

No caso do leite e xurro fíxose una mestura con volume equivalente de todas as mostras e esa foi empregada para illar os fagos. No caso do leite empregouse un volume de 40 mL e no caso do xurro un peso de 35 gramos. No caso da mostra de auga residual, esta foi centrifugada a 6000 x g durante 10 minutos a 4°C para precipitar as partículas grosas e as células bacterianas. O sobrenadante foi recollido e filtrado por un filtro de xiringa de 0.22µm. Este filtrado foi o

empregado para o illado dos bacteriófagos. Neste punto, as mostras foron mesturadas co mesmo volume de caldo Luria Bertani (LB) (10.0 g/L Triptona, 5.0 g/L Extracto de Levadura, 10.0 g/L NaCl) (Nzytech, Lisboa, Portugal) a concentración 2X suplementado con 10mM de MgSO₄ e un cultivo de 12 horas de bacteria hóspede para unha concentración final 1/10. As cepas empregadas para o illamento dos fagos foron as cepas de *S. uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *C. bovis* illadas das mostras de leite, así como as cepas de referencia *K. pneumoniae* CECT 8453, *S. uberis* CECT 994 e *S. agalactiae* CECT 183. As mostras foron incubadas durante 24h a 37°C e 130 rpm.

Despois da incubación, as mostras foron centrifugadas a 6000 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recollido en un novo tubo e mesturado con cloroformo a unha concentración final 1/10 (v/v). Os tubos foron centrifugados novamente a 6000 x g durante 5 minutos a 4°C. A fase acuosa foi recollida con unha xiringa e filtrada con un filtro de 0.22µm. Para determinar a presenza de fagos utilizouse unha capa de dobre agar. Para isto, empregáronse placas petri con LB agar que foron cubertas con una sobrecapa de 3 mL de LB semisólido (0.7% agar) con 100 µL de un cultivo bacteriano en fase exponencial de crecemento. Una vez solidificada a sobrecapa, puxéronse sobre a súa superficie 5 µL da mostra purificada no paso anterior. Una vez seca a gota as placas foron incubadas a 37°C durante 24h. Despois de este tempo, determinouse a ausencia de crecemento bacteriano no lugar onde foi depositada a gota. No caso das mostras onde se detectou zona de inhibición, estas foron sometidas a dilucións decimais empregando tampón SM (0.05 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.008 MgSO₄, pH 7.5). De novo, 5 µL de cada dilución foi sementada en dobre agar ata observar a presenza de placas fáxicas illadas. As placas fáxicas illadas foron repicadas ata ter placas fáxicas con unha morfoloxía única.

3.4 Expansión de fagos

Para producir fagos empregouse o método do dobre agar descrito previamente por (Melo, y otros, 2014) con modificacións. Resumidamente, unha placa illada de fago foi pinchada empregando unha parte punzante de unha asa de sembra de un solo uso. Esta empregouse para pinchar un agar de dobre capa preparado como se describiu na sección anterior realizando dúas liñas de punto paralelas (**Figura 5**). Despois pasouse un papel previamente esterilizado por toda a superficie da placa para expandir as partículas fáxicas.

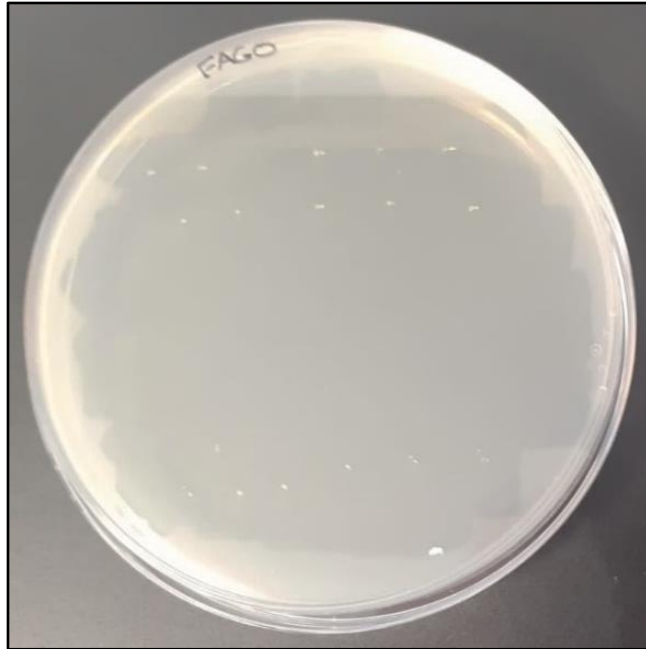


Figura 5. Expansión do fago de *K. pneumoniae*.

As placas foron incubadas durante a 37°C durante 6h. A continuación, a sobrecapa semisólida foi recolectada con un asa Digralsky e introducida en un tubo falcón de 15 mL. Despois foron engadidos 3 mL de tampón SM e os tubos foron axitados a 4°C durante 3h. Pasado este tempo, os tubos foron centrifugados a 6000 x g a 4°C durante dez minutos. O sobrenadante foi traspasado a un novo tubo e mesturado con cloroformo para unha concentración final 1/10 (v/v). O tubo foi centrifugado de novo a 6000 x g a 4°C durante cinco minutos e a fase acuosa foi filtrada empregado un filtro de xeringa de 0.22 µM. Este stock de fagos foi conservado a 4°C e a súa concentración foi determinada empregando o método de dobre capa e dilucións decimais descrito anteriormente.

3.5 Illamento de DNA, secuenciación e anotación do xenoma

Un volume de 200µL do stock do fago usouse para a extracción do DNA empregando o kit comercial PureLink Genomic DNA mini kit (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) seguindo o protocolo descrito polo fabricante para mostras de sangue. Para a cuantificación do DNA unha vez extraído empregouse o fluorímetro comercial Qubit™ (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) e o kit de ensaios de DNAs Qubit™ BR (Invitrogen, ThermoFisher Scientific).

Para a secuenciación do xenoma completo do bacteriófago empregouse a plataforma de secuenciación de cuarta xeración de Oxford Nanopore MinION (Oxford Nanopore Technologies (ONT), Oxford, Reino Unido). O proceso foi o seguinte; 400 ng de DNA do bacteriófago foi preparado para a secuenciación empregado o kit comercial Rapid Sequencing kit (ONT) seguindo as instrucións do fabricante. Este kit produce unha fragmentación aleatoria do DNA e engade unha serie de adaptadores que permiten que o DNA poida ser secuenciado. Una vez prepara a mostra, esta foi cargada na célula de secuenciación Flongle (ONT), previamente posta no equipo de secuenciación MinION (ONT). Este equipo ten un tamaño

menor a un móbil intelixente actual e pode ser usando simplemente conectándoo a un ordenador portátil de gama media/alta. A célula de secuenciación está composta de una serie de proteínas por as que pasan as cadeas de DNA ao ser secuenciada (**Figura 6**). O paso dos nucleótidos polo canal da proteína causa un cambio no fluxo de corrente. Este cambio de corrente é característico para cada nucleótido, e é o que se usa para secuenciar o DNA. O software de secuenciación foi o MinKNOW version 22.05.5. Ao final da secuenciación obtéñense os arquivos Fast5, onde se atopan os datos crús de secuenciación.

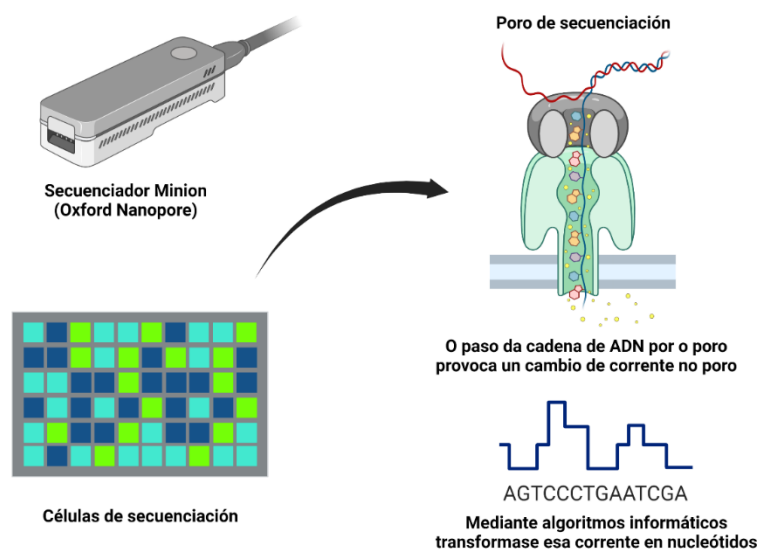


Figura 6. Esquema de secuenciación da tecnoloxía Oxford Nanopore Technologies. Figura creada con Biorender.com

O software Guppy versión 6.0.1 (ONT) en modo fast-basecalling foi empregado para realizar o basecalling (transformación da sinais crús do aparato de secuenciación en nucleótidos) dos datos de secuenciación. En este paso obtéñense os arquivos FASTQ que serán empregados para os seguintes pasos.

As seguintes análises bioinformáticas foron realizadas a través do servizo Galaxy (Galaxy Community, 2022). Este é un proxecto colaborativo e de acceso libre realizado por diversas institucións educativas e de investigación ao redor do mundo. Permite realizar con calquera ordenador, a través de un navegador web, análises bioinformáticas que requiren de altos recursos informáticos. Isto é posible xa que este servizo usa diferentes servidores de alta potencia localizados en diferentes rexións. Ademais, hai que ter en conta que a maioría de softwares para este tipo de análises traballan en base Linux e requiren certos coñecementos informáticos. Como esta plataforma traballa a través de una interface gráfica en calquera navegador web, calquera persoa con poucos coñecementos informáticos pode realizar análises bioinformáticas que de outro xeito non estarían ao seu alcance.

O fluxo bioinformático empregado neste estudo foi o seguinte. Os arquivos FASTQ foron subidos ao servidor europeo de Galaxy (<https://usegalaxy.eu/>). En primeiro lugar os arquivos FASTQ foron convertidos a formato FASTA empregando a ferramenta FASTQ to FASTA converter (Galaxy Version 1.1.5). Despois os arquivos FASTA foron unidos en un so mediante a ferramenta Merge.files Merge data (Galaxy Version 1.39.5.0).

As lecturas obtidas na secuenciación teñen que ser pulidas para eliminar os adaptadores introducidos por o kit durante a preparación das mostras para a secuenciación. Para iso empregase a ferramenta Porechop adapter trimmer for Oxford Nanopore reads (Galaxy Version 0.2.4+galaxy0) (Rrwick, 2017) coa configuración por defecto. O arquivo FASTA obtido neste paso será o empregado para os seguintes procesos. Para coñecer as estatísticas de secuenciación (número de bases secuenciadas, tamaño de lecturas) empregouse a ferramenta NanoPlot Plotting suite for Oxford Nanopore sequencing data and alignments (Galaxy Version 1.36.2+galaxy1) (De Coster, 2018).

O seguinte paso foi o de reconstruír o xenoma do fago a partir das lecturas obtidas na secuenciación. Iso denomínase De Novo Assembly e realízase mediante o emprego de ensambladores. Esas ferramentas fan un aliñamento das lecturas e conseguen reconstruír o xenoma sen usar ningún outro xenoma como referencia. Das diferentes ferramentas dispoñibles para ensamblar lecturas obtidas ca tecnoloxía ONT empregouse Create assemblies with Unicycler pipeline for bacterial genomes (Galaxy Version 0.5.0+galaxy1) (Wick, Judd, Gorrie, & Holt, 2017) empregando as condicións por defecto.

Para visualizar o ensamblaxe obtido empregouse a ferramenta Bandage Image visualize de novo assembly graphs (Galaxy Version 2022.09+galaxy4) (Wick, Schultz, Zobel, & Holt, 2015). O ensamblaxe foi pulido empregando a ferramenta Medaka consensus pipeline Assembly polishing via neural networks (Galaxy Version 1.7.2+galaxy0). Este paso permite corrixir erros de nucleótidos. A ferramenta tRNA prediction (tRNAscan) (Galaxy Version 0.4) foi empregada para determinar a presenza de RNA de transferencia na secuencia do fago (Lowe & Eddy, 1997).

Finalmente o xenoma obtido tras o paso de pulido foi anotado (adxudicación de información xenética ao xenoma) nunha plataforma que traballa dunha forma similar a Galaxy denominada Kbase (<https://www.kbase.us/>) (Arkin, y outros, 2018). Isto foi debido a que ferramenta empregada para a anotación non estaba dispoñible en Galaxy. Esta foi feita co programa RASTtk - v1.073 (Overbeek, y outros, 2014). Finalmente a ferramenta BLAST do NCBI foi empregada para realizar una comparativa do xenoma do fago illado de *K. pneumoniae*.

3.6 Estabilidade térmica e a distintos valores de pH

Para caracterizar o fago e a súa capacidade para poder ser usado en futuras terapias fáticas estudouse a súa estabilidade ante diferentes condicións. Para avaliar a estabilidade térmica, incubáronse 10^8 PFU/mL do fago de *K. pneumoniae* en tampón SM ás temperaturas -20°C, 4°C (control), 28°C, 42°C e 60°C durante 24h. Unha vez finalizado o período de incubación, a concentración dos fagos determinouse empregando o método de dobre capa e de dilucións decimais descrito anteriormente.

Para avaliar o efecto do pH na estabilidade do fago usouse un tampón de pH universal (150 mM KCl, 10 mM KH_2PO_4 , 10 mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ e 10mM H_3BO_3) como describen (Ferreira, y outros, 2021). O rango de pH avaliado foi de pH 2 a pH 12 e este foi axustando empregando HCL 2N e NaOH 2N. As mostras foron incubadas á temperatura ambiente durante 24h. Despois dese

tempo a concentración de fagos determinouse da mesma forma que no caso da temperatura. En ambos casos realizáronse seis ensaios independentes.

3.7 Comparativa control – leite

O principal obxectivo do traballo é illar fagos que poidan ser empregados no tratamento da mastite en vacas leiteiras. Para iso é fundamental caracterizar a estabilidade do fago illado en leite. Isto é fundamental para valorar o seu potencial uso clínico. Para isto comparouse a estabilidade do fago de *K. pneumoniae* entre a condición control (tampón SM) e o leite enteiro. As mostras foron incubadas a 33°C durante 24h (Rodríguez, Sánchez Matamoros, Carvajal Valilla, Blanco Murcia, & Sánchez Vizcaíno, 2008) para simular a temperatura da ubre da vaca. Realizáronse seis ensaios independentes.

3.8 Ensaio de infección por fagos

A bacteria *K. pneumoniae* incubouse a 37°C, 130 rpm ata que se obtivo un valor de densidade óptica medida a 630 nm (DO_{630}) de aproximadamente 0.200. Unha vez acadada esta DO_{630} , preparouse una mestura da bacteria co fago para ter multiplicidade de infección (MOI) de 0.1, 1 e 10. Para o control positivo preparouse unha mostra na que había unicamente bacteria. A DO tanto das mostras a diferentes MOI como a do control positivo (so bacteria) determinouse durante unha semana cada 24h empregando un lector de microplacas (Das, Roma, Italia). Para isto, transferíronse 200 μ L das mostras a placas de poliestireno de 96 pocillos. Realizáronse dous ensaios independentes.

3.9 Curva de crecemento de un paso

A curva de crecemento de un paso obtívose agregando o fago a MOI máis efectiva (MOI 0.1) a unha suspensión bacteriana exponencial de *K. Pneumoniae*, DO_{630} de aproximadamente 0.200, incubada a 37°C, 130 rpm. Tomáronse mostras periodicamente ata 150 minutos para a titulación de fagos. Realizáronse tres experimentos independentes.

3.10 Análise estatístico

As análises estatísticas leváronse a cabo usando o programa estatístico RStudio. En primeiro lugar os números de fagos (PFU) obtidos nos diferentes resultados transformáronse a \log_{10} para obter homoxeneidade de varianza nos datos. Posteriormente, naqueles casos onde a variable cualitativa ou factor estaba determinada por máis de dous compoñentes, a análise estatística realizada foi unha análise de varianza (ANOVA). Sen embargo, cando a variable cualitativa estaba determinada por dous compoñentes, a análise estatística realizada foi un Test-t para mostras independentes. En ambos os casos as mostras consideráronse estatisticamente diferentes para valores de p – valor inferior a 0.05.

4. RESULTADOS E DISCUSIÓN

4.1 Identificación bacteriolóxica

O primeiro paso do traballo consistiu en intentar illar patóxenos de mostras de leite de vacas diagnosticadas de mastite. A selección dos medios de cultivos empregados no traballo fíxose tendo en conta cales son as principais bacterias implicadas nesta enfermidade. Por sembra das mostras nos distintos medios de cultivo (CHROMagar™ GP Mastitis, *Edwards Medium Base*, BD Baird – Parker Agar, VRBL) identificáronse os posibles patóxenos causantes da mastite bovina.

CHROMagar™ GP Mastitis é un medio cromoxénico e diferencial empregado para a identificación rápida das principais bacterias Gram positivas implicadas na mastite. Neste medio as colonias de *S. agalactiae* (**Figura 7A**) aparecen dunha cor azul turquesa, mais con esta cor poden aparecer tamén as colonias de *S. dysgalactiae*, outra bacteria implica na mastite.

As colonias de *S. uberis* (**Figura 7B**) aparecen dunha cor azul escura ou metálica. Pero desta cor tamén poden aparecer as cepas de *Enterococcus* spp., unha bacteria comunmente presente no ambiente e que tamén pode causar mastite. Por tanto, é importante destacar que as colonias típicas poden corresponderse con diferentes especies e necesitan de confirmación posterior. Finalmente, as cepas de cor rosa poden ser presuntivos *S. aureus*. Este medio foi amplamente avaliado por (Garcia, y otros, 2021) e (Granja, Fidelis, Garcia, & Veiga dos Santos, 2021) en mostras de vacas con mastite clínica e subclínica (**Figura 7C**).

Ambos estudos mostraron unha sensibilidade e especificidade maior do 90% para identificar *S. agalactiae*/*S. dysgalactiae* e *S. uberis*/*Enterococcus* spp. Sen embargo, no caso de *S. aureus* a sensibilidade do medio CHROMagar™ GP Mastitis foi menor do 50% (Garcia, y otros, 2021) Por ese motivo, neste estudo tamén se empregou o medio *Baird Parker Agar* para identificar *S. aureus* (**Figura 7D**), onde ca frecha se marca unha colonia típica de *S. aureus* illada dunha mostra de leite co seu halo característico nese medio.

Tamén se empregou o medio *Edwards Medium Base* suplementado con 7% de sangue de ovella defibrinada para illar *S. agalactiae*. Neste medio as colonias de *S. agalactiae* van dende unha cor azulada ata ausencia de cor e o halo de inhibición ao seu redor indica presenza de hemólise (**Figura 7F**).

En canto ao medio VRBL empregouse para a detección de bacterias Gram negativas implicadas na mastite bovina como pode ser *E. coli* ou *K. pneumoniae*. As colonias típicas illadas poden apreciarse na **Figura 7E**.

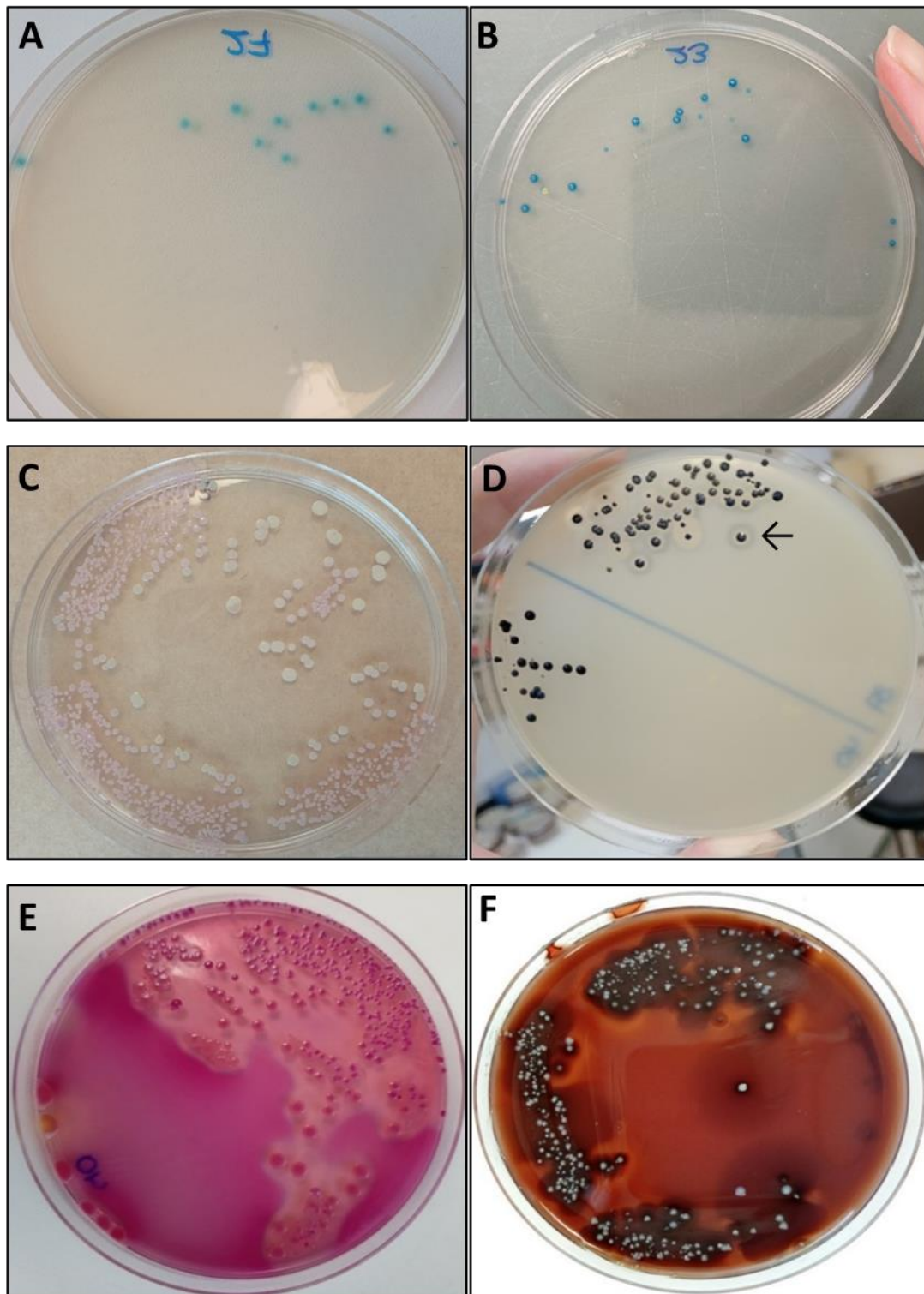


Figura 7. Medios de cultivo empregados no traballo. Colonias presuntivas de A) *S. agalactiae*/ *S. dysgalactiae* en medio CHROMagar™ GP Mastitis, B) *S. uberis*/ *Enterococcus* spp. en medio CHROMagar™ GP Mastitis, C) *S. aureus* en medio CHROMagar™ GP Mastitis, D) *S. aureus* en medio BD Baird Parker Agar, E) Coliformes en medio VRBL, F) Colonias azuis en *S. agalactiae* en Edwards Medium Base.

Na **Táboa 1** móstrase un resumo das colonias presuntivas encontradas nas diferentes mostras analizadas. É moi importante destacar que se trata de colonias presuntivas e que estas necesitan ser confirmadas posteriormente para saber realmente que tipo de patóxeno en

concreto son. En todas as mostras analizadas houbo crecemento de cepas que tiñan una morfoloxía típica de patóxenos causantes de mastite. Varias de esas colonias foron purificadas en BHI e confirmadas polo sistema automatizado Vitek™.

Táboa 1. Presenza presuntiva de colonias típicas en cada un dos medios empregados en este estudo.

Referencia da mostra	Colonias presuntivas			
	CHROMagar™ GP Mastitis	VRBL	BD Baird-Parker Agar	Edwards Medium Base
2	<i>S. uberis</i> / <i>Enterococcus</i> spp. <i>S. agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i>	Coliformes	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>S. agalactiae</i>
2b	<i>S. uberis</i> / <i>Enterococcus</i> spp <i>S. agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i>	Coliformes	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>S. agalactiae</i>
3	<i>S. aureus</i>	Coliformes	<i>S. aureus</i>	<i>S. agalactiae</i>
3b	<i>S. aureus</i>	Coliformes	<i>S. aureus</i>	<i>S. agalactiae</i>
Tanque	<i>S. uberis</i> / <i>Enterococcus</i> spp <i>S. agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i> <i>S. aureus</i>	Coliformes	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>S. agalactiae</i>
9	<i>S. uberis</i> / <i>Enterococcus</i> spp <i>S. agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i> <i>S. aureus</i>	Coliformes	<i>S. aureus</i>	<i>Streptococcus</i> spp.
10	<i>S. uberis</i> / <i>Enterococcus</i> spp <i>S. agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i>		<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
11	<i>S. uberis</i> / <i>Enterococcus</i> spp <i>S. agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i> <i>S. aureus</i>	Coliformes	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
12	<i>S. agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i>			<i>Streptococcus</i> spp.
13	<i>S. uberis</i> / <i>Enterococcus</i> spp <i>S. agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i>	Coliformes	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
14			<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>S. agalactiae</i>
15	<i>S. uberis</i> / <i>Enterococcus</i> spp <i>S. agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i> <i>S. aureus</i>		<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
16	<i>S. uberis</i> / <i>Enterococcus</i> spp <i>S. agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i>	Coliformes		<i>Streptococcus</i> spp.
17	<i>S. agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i>	Coliformes	<i>S. aureus</i>	<i>Streptococcus</i> spp.
18	<i>S. agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i>	Coliformes	<i>S. aureus</i>	<i>Streptococcus</i> spp.
19	<i>S. uberis</i> / <i>Enterococcus</i> spp	Coliformes	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
20	<i>S. uberis</i> / <i>Enterococcus</i> spp <i>S. agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i>	Coliformes	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.

21	<i>S. uberis</i> / <i>Enterococcus</i> spp <i>S. agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i>	Coliformes	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
22	<i>S. agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i>			<i>Streptococcus</i> spp.
23	<i>S. uberis</i> / <i>Enterococcus</i> spp		<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>S. agalactiae</i>
24	<i>S. agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i>	Coliformes	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
25	<i>S. uberis</i> / <i>Enterococcus</i> spp <i>S. agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i>		<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
26	<i>S. uberis</i> / <i>Enterococcus</i> spp		<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
27	<i>S. agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i>			<i>Streptococcus</i> spp.
28	<i>S. uberis</i> / <i>Enterococcus</i> spp		<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
29	<i>S. uberis</i> / <i>Enterococcus</i> spp <i>S. agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i>		<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
30	<i>S. agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i>			
31	<i>S. uberis</i> / <i>Enterococcus</i> spp		<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
32	<i>S. agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i>			<i>Streptococcus</i> spp.
33	<i>S. uberis</i> / <i>Enterococcus</i> spp		<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
34	<i>S. uberis</i> / <i>Enterococcus</i> spp			
35	<i>S. uberis</i> / <i>Enterococcus</i> spp	Coliformes	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
36		Coliformes		
37	<i>S. uberis</i> / <i>Enterococcus</i> spp		<i>Staphylococcus</i> spp.	
38	<i>S. uberis</i> / <i>Enterococcus</i> spp		<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
39	<i>S. agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i>		<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
40	<i>S. agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i>	Coliformes	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
41	<i>S. uberis</i> / <i>Enterococcus</i> spp <i>S. agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i>	Coliformes	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
42	<i>S. agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i>	Coliformes	<i>S. aureus</i>	<i>Streptococcus</i> spp.
Lugo a	<i>S. uberis</i> / <i>Enterococcus</i> spp			<i>Streptococcus</i> spp.
Lugo b	<i>S. agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i>			<i>Streptococcus</i> spp.

Ademais, estas mostras tamén foron analizadas polo LIGAL mediante espectrometría de masas, obténdose os resultados que aparecen recollidos na **Táboa 2**. Como se pode apreciar, na Táboa 2 non aparecen recollidas todas as mostras da Táboa 1 debido a que a bacteria non puido ser correctamente identificada empregando a base de datos incluída no equipo de MALDI-TOF Vitek™.

Táboa 2. Identificación de patóxenos causantes de mastite por espectrometría de masas

Referencia da mostra	Identificación
Tanque	<i>Paenibacillus azotofixans</i>
2	<i>Enterococcus faecalis</i>
3	<i>S. aureus</i>
9.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
9.2	<i>Aerococcus viridans</i>
10	<i>A. viridans</i>
11	<i>Lactococcus lactis</i>
15	<i>S. uberis</i>
18	<i>E. faecalis</i>
19	<i>E. faecalis</i>
20	<i>S. uberis</i>
21	<i>S. uberis</i>
22	<i>S. dysgalactiae</i>
23	<i>S. dysgalactiae</i>
25	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
26	<i>A. viridans</i>
27	<i>S. dysgalactiae</i>
28	<i>A. viridans</i>
29	<i>S. dysgalactiae</i>
30	<i>Corynebacterium bovis</i>
31	<i>S. epidermidis</i>
32	<i>S. dysgalactiae</i>
33	<i>S. uberis</i>
34	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>
35	<i>S. uberis</i>
38	<i>A. viridans</i>
39	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
40	<i>L. lactis</i>
42	<i>S. dysgalactiae</i>
Lugo a	<i>S. uberis</i>
Lugo b	<i>S. dysgalactiae</i>

En canto a identificación dos patóxenos, no caso das mostras; tanque, 2, 9, 10, 11, 18, 19, 25, 26, 28, 30, 34, 38 e 40, non existe coincidencia entre o patóxeno identificado nos distintos medios de cultivo e o identificado por o sistema Vitek™. Nos medios cromoxénicos resulta a veces complicado facer una identificación correcta das cepas, sobre todo se non se está

altamente especializado no uso do medio de cultivo, de aí a importancia de realizar una confirmación das cepas por outros métodos, como foi feito neste caso.

Finalmente, cando as mostras se sembraron en medio de cultivo *Edwards Medium Base* en moitas delas non se puido identificar o *Streptococcus* concreto. Sen embargo, coa axuda da análise por espectrometría de masas si se puido identificar. Isto foi o caso de mostras como; 22, 23, 27, 31, 32, 39 ou 42.

4.2 Illamento de fagos

As cepas de *S. uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *C. bovis* illadas nestas mostras xunto coas cepas de referencia da CECT *K. pneumoniae* CECT 8453, *S. uberis* CECT 994 e *S. agalactiae* CECT 183 foron empregadas para illar bacteriófagos. Para isto, como está descrito en materiais e métodos empregáronse tanto mostras de leite como de xurro e unha mostra de auga de depuradora. Neste proceso foi posible illar un fago de *K. pneumoniae* (**Figura 8**) a partir da mostra de auga residual. É interesante destacar que a cepa de *K. pneumoniae* empregada para illar este fago foi orixinalmente illada de leite de vaca.

Unha das principais limitacións deste estudo é que solo se testou a actividade deste fago contra unha única cepa de referencia (*K. pneumoniae* CECT 8453). Por tanto non está caracterizado o rango de actividade do fago. É necesario determinar isto para coñecer o espectro lítico. Unha das características de *K. pneumoniae* é que ata o día de hoxe foron identificados ata 70 serotipos capsulares diferentes (Pan, y otros, 2008).

Os fagos de *Klebsiella* soen ter un espectro lítico moi reducido, principalmente debido aos diferentes tipos capsulares, xa que en moitas ocasión solo presentan actividade lítica contra un tipo específico de cápsula. Por exemplo, (Bai, y otros, 2022) illaron o fago *Klebsiella pneumoniae* phage vB_kpnM_17-11 e este solo tiña actividade lítica en 4 das 92 cepas testadas, sendo as catro do mesmo tipo capsular, K19. Por tanto é de gran importancia coñecer o espectro lítico do fago illado neste estudo.

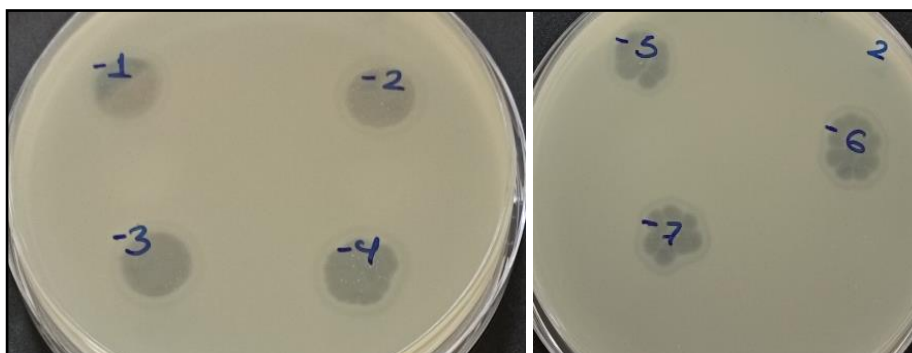


Figura 8. Titulación e enumeración do fago de *K. pneumoniae*.

4.3 Morfoloxía de placas

Na **Figura 9** obsérvanse placas con morfoloxía única do fago de *K. pneumoniae*. Nestas placas obsérvase un dobre halo. O do centro é totalmente transparente mentres que o halo externo é translucido. Este halo externo podería indicar a produción de depolimerasas por parte do fago. As depolimerasas son enzimas producidas polos fagos que se unen e degradan os compoñentes polisacáridos da parede celular da célula hospede. As depolimerasas poden degradar de forma específica polisacáridos capsulares da superficie da bacteria. Esta degradación provoca que o fago poida acceder máis facilmente á superficie celular nas bacterias que están protexidas por una cápsula externa e eventualmente tamén se poden unir a receptores de membrana externos (Michaud, Da Costa, Courtois, & Courtois, 2023).

Moitas veces, os fagos que atacan bacterias Gram negativas usan espigas da cola do fago que se unen especificamente a un sitio da cápsula e liberan a enzima despolimerasa que inicia a escisión secuencial dos enlaces poliméricos (Yan, Mao, & Xie, 2014). Estas proteínas teñen un modo de acción moi diverso debido á co-evolución dos fagos cos seus hospedes, as bacterias.

As depolimerasas pódense atopar en forma soluble de rápida difusión libre ou unidas á partícula do fago. A forma soluble que se libera durante a lise da bacteria hóspede vese como un halo, como un ollo de touro circular (Latka, Maciejewska, Majkowska-Skrobek, Briers, & Drulis-Kawa, 2017) (Singh, Padmesh, Dwivedi, & Kostova, 2022), como se pode ver na Figura 9.

Estudos recentes demostraron que as depolimerasas poden recoñecer de forma específica os diferentes tipos capsulares, eliminar *biofilms* bacterianos así como reducir a virulencia bacteriana (Bai, y otros, 2022). Isto é de gran importancia. Hai que ter en conta que a cápsula é un dos principais factores de virulencia de *K. pneumoniae*, por tanto ter enzimas que a degraden teñen un grande interese clínico.

No caso da terapia fájica hai diversas estratexias, dende o uso dos fagos propiamente ditos ata explotar as proteínas producidas polos fagos para desenrolar novas terapias antimicrobianas. Por exemplo, demostrouse que o un pre-tratamento con depolimerasa aumentaba a infectividade do fago de *Klebsiella* KP1079 (Lukianova, y otros, 2022). Sen embargo tamén é importante resaltar que a especificidade das depolimerasas tamén pode ser un dos seus talóns de Aquiles xa que limita o seu espectro de acción e é posible que a maioría das depolimerasas solo sexan activas contra un tipo específico de cápsula.

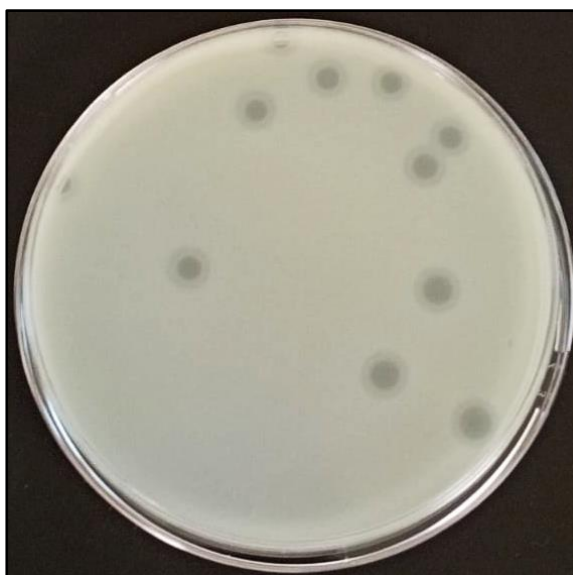


Figura 9. Placas formadas polo bacteriófago de *K. pneumoniae* nun céspede da cepa hóspede (*K. pneumoniae* CECT 8453).

4.4 Análise xenómica do fago

O xenoma do fago de *K. pneumoniae* foi caracterizado a nivel xenómico empregando a tecnoloxía de ONT flongle. Na **Táboa 3** amósanse as estatísticas de secuenciación. Debido ao tamaño de lecturas que se obteñen ca tecnoloxía Minion, o número de lecturas necesarias para ter un bo coveraxe do xenoma é moito menor que cas tecnoloxías de lectura curta como Illumina ou Ion Torrent. Así, nesta secuenciación obtivéronse un total de 9010 lecturas. É importante destacar que a lectura máis longa obtida unha vez realizada purificadas as lecturas foi de 40344 bases e as seguintes foron de 39382, 38819, 36784, 36127 bases.

Táboa 3. Estatísticas de secuenciación

Métrica	Numero de nucleótidos
Número de lecturas	9010
Bases secuenciadas	18652319
Mediana de lonxitude de lectura	694
Media de lonxitude de lectura	2070.2
Desviación estándar de lecturas	3754.9
n50	6555
Lectura máis longa	40344

Como se comentará posteriormente a lectura máis longa é do mesmo tamaño que o xenoma obtido despois de ensamblaxe. Por tanto unha das vantaxes desta tecnoloxía de secuenciación é que no caso de xenomas pequenos como é o caso dos virus, pódense obter

lecturas do xenoma completo. Isto ten interese dende dous puntos de vista, por un lado ter lecturas longas facilita o proceso de De Novo Assembly e ademais pode axudar, sobre todo en bacteriófagos lineais, as rexións que compoñen o inicio de replicación. Estas soen ser zonas repetitivas que cando se empregan lecturas curtas como as de Illumina para facer o ensamblaxe soe dar problemas. Esas rexións son difíciles de interpretar para os programas de ensamblaxe e moitas veces quedan eliminadas do ensamblaxe final que se obtén.

O ensamblaxe realizado con Unicycler e pulido coa ferramenta Medaka deu un tamaño para o xenoma do fago *K. pneumoniae* de 40564pb con un contido total de GC do 53.2%. Tendo en conta que o número de bases secuenciadas foi de 18652319, a cobertura do xenoma neste ensamblaxe foi de 460x. Neste estudo non foi secuenciado o xenoma da cepa *K. pneumoniae* CECT 8453 empregada para o illamento do fago, mais as estatísticas do xenoma están dispoñibles na páxina web da ATCC (CITA). O xenoma da cepa de *K. pneumoniae* CECT 8453 ten un tamaño de 5,2 millón pares de bases e un porcentaxe de 57.53%. Por tanto o porcentaxe de GC do fago illado é algo menor que o da cepa hospedadora. Identificáronse un total de 47 marcos de lectura abertos (ORF), todos eles transcribíense na mesma dirección (**Figura 10**). O fago non presenta no seu xenoma ningún RNA de transferencia. A presenza destes no xenoma dos fagos correspóndense normalmente con codóns que están moi presentes nos xenes dos fagos, mentres que a súa presenza nos xenes das bacterias soe ser menor.

En canto ao tamaño das proteínas predecidas, o 38% das proteínas predecidas teñen un tamaño menor de 100 pares de bases. Hai tamén una proteína que presenta un tamaño moito maior que as demais con 1322 aminoácidos, a proteína predecida como Phage DNA ejection component Gp16, peptidoglycan lytic exotransglycosylase. Esta é unha enzima con actividade lítica que actúa sobre o peptidoglicano das paredes celulares bacterianas (Fokine, Miroshnikov, Shneider, Mesyanzhinov, & Rossmann, 2008).

A análise do xenoma completa do fago illado neste estudo na ferramenta BLAST indica que hai case unha centena de fagos con un porcentaxe de identidade superior ao 90% e con unha cobertura maior do 80%. Por tanto, o fago illado non presenta gran novidade respecto a outros fagos xa previamente illados. Existe un porcentaxe de identidade do 96.24% e una cobertura do 97% co xenoma do fago *Klebsiella* phage vB_KpnP_KpV763 (Secuencia ID: NC_047771.1). Así mesmo, tamén presenta un porcentaxe de identidade do 95.49% e una cobertura do 97 co fago *Klebsiella* phage cp7 (Secuencia ID: OX335390.1). A clasificación taxonómica de eses fagos é Viruses; Duplodnaviria; Heunggongvirae; Uroviricot; Caudoviricetes; Autographiviridae; Studiervirinae; Przondovirus.

En canto a organización xenómica do fago, ten una estrutura moi similar a outros fagos no que o xenoma está organizado en grupos funcionais. En primeiro lugar una serie de xenes relacionados coa replicación e transcrición do DNA vírico, seguido por unha serie de xenes relacionados coa morfoxénese do fago e finalmente estarían os xenes relacionados co empacotado do DNA e coa lise da célula hóspede.

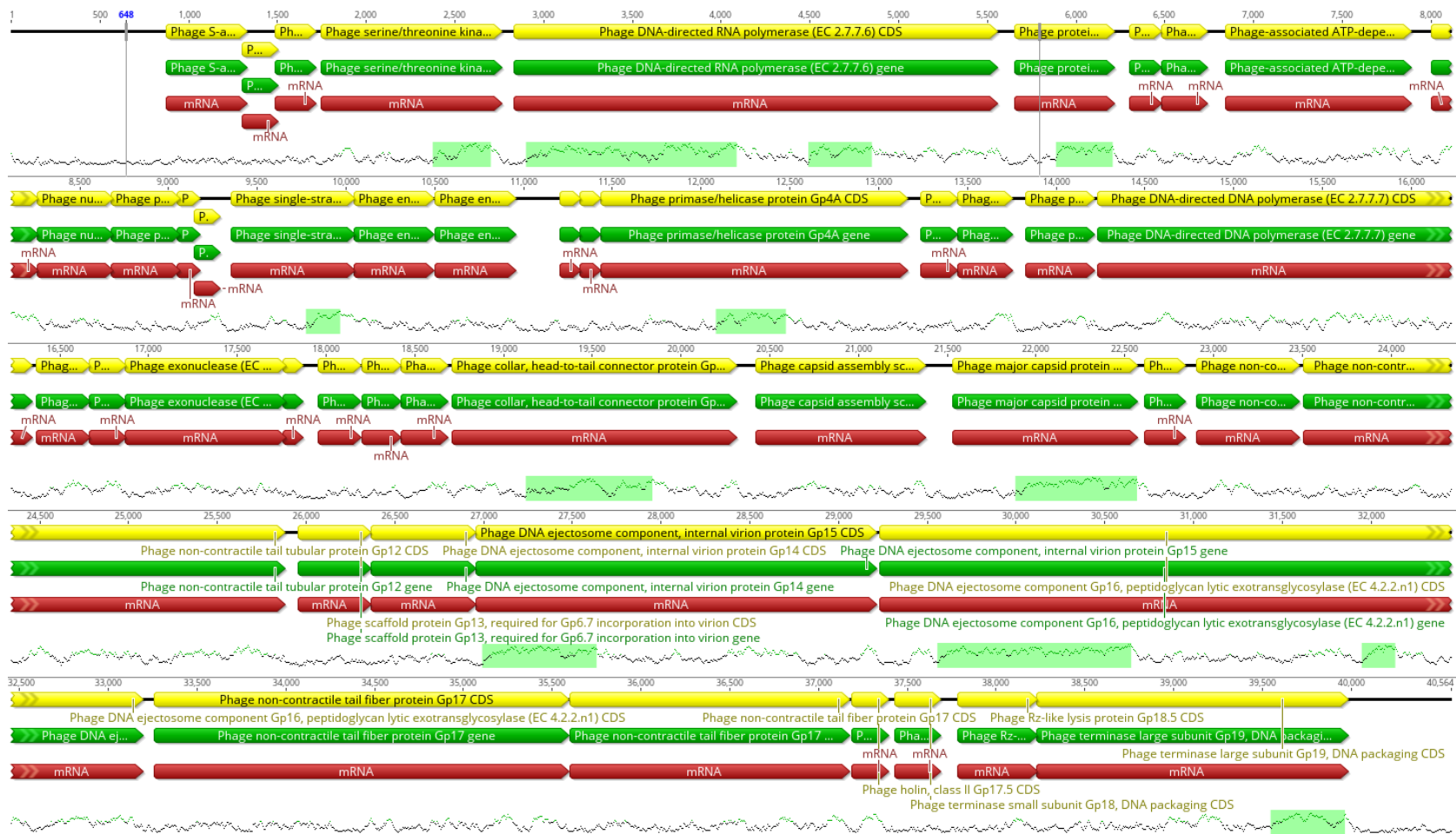


Figura 10. Descripción xeral do xenoma do fago *K. pneumoniae*.

Na **Táboa 4** aparecen identificados os xenes do xenoma do fago *K. pneumoniae*. Cabe destacar a importancia de algúns dos xenes. As endolisinas, holinas e lisinas son enzimas claves durante o ciclo lítico dos fagos. As endolisinas son enzimas que hidrolizan a parede celular da bacteria hóspede, permitindo así a liberación da proxenie. As holinas son pequenas proteínas que serven para desencadear e controlar a degradación da parede celular da bacteria hóspede ao final do ciclo lítico de infección viral (Abdelrahman, y otros, 2021). E as lisinas son enzimas que degradan o peptidoglicano bacteriano, polo que son unha fonte prometedora para o uso de antimicrobianos, fronte á resistencia a antibióticos (García, y otros, 2022).

Para que o ciclo lítico poida ser levado a cabo son necesarias determinadas enzimas. A proteína de unión a DNA moconatenario é unha destas enzimas, xa que é a encargada de desestabilizar o DNA bicatenario, uníndose de forma non específica á secuencia, pero de forma selectiva e cooperativa ao DNA monocatenario. De esta forma orixínase unha estrutura que é recoñecida polas enzimas implicadas na replicación, reparación e recombinación do DNA (InterPro).

Tamén son importantes enzimas como; a DNA ligasa dependentes de ATP, xa que son as encargadas de unir as roturas no esqueleto fosfodiéster do DNA durante a replicación e a reparación (Pan, Lian, Sarre, & Kirsti, 2021). As endonucleasas desempeñan unha función clave no ciclo de vida dos fagos porque son as encargadas do empacamento do DNA do bacteriófago (Zhang, y otros, 2017). A exonucleasa é unha enzima encargada da eliminación de secuencias redundantes (Cassuto, Lash, Sriprakash, & Radding, 1971). Finalmente, destaca a primasa que é unha polimerasa de RNA que sintetiza cebadores de RNA durante a replicación do DNA (Griep, 1995).

Ademais, para a estruturación dos fagos son importantes enzimas como; as proteínas de andamiage de bacteriófagos que son as proteínas encargadas do ensamblaxe dos bacteriófagos. Ou as proteínas da cápside que son as encargadas da formación da cápsula dos bacteriófagos (White, y otros, 2012).

Táboa 4. Identificación dos xenes do xenoma do fago *K. pneumoniae* anotados co programa bioinformático RASTtk - v1.073 (Overbeek, y otros, 2014). Na segunda columna o termino AA refírese a aminoácidos, e dicir o número de residuos de aminoácidos da proteína. Os marcos de lectura abertos obtidos identificados co programa RASTtk foron tamén analizados na páxina web InterPro para obter a afiliación familiar da proteína así como os procesos biolóxicos nos que está implicada, a súa función molecular e o compoñente molecular implicado. No caso da afiliación familiar á proteína, os textos teñen un hipervínculo para que se poda acceder a explicación de cada familia proteica.

InterPro GO terms						
Anotación RASTtk - v1.073	AA	Afiliación familiar á proteína	Proceso biolóxico	Función molecular	Compoñente celular	
Phage S-adenosyl-L-methionine hydrolase (EC 3.3.1.2)	152					
Phage protein	66					
Phage protein	78					
Phage serine/threonine kinase involved in host transcription shutoff Gp0.7	339					
Phage DNA-directed RNA polymerase (EC 2.7.7.6)	907	DNA-directed RNA polymerase, phage-type (IPR002092)	Transcrición por DNA	Actividade polimerasa dirixida por ADN	RNA 5'-3'	
				Unión DNA		
Phage protein	187					
Phage protein	59					
Phage protein	86					
Phage-associated ATP-dependent DNA ligase (EC 6.5.1.1) CDS	349		Recombinación DNA	Actividade ligasa	DNA	
			Reparación DNA	Unión ATP		
				Actividade ligasa (ATP)	DNA	

						Unión á dobre cadea de DNA
Phage protein Gp1.6	88					
Phage nucleotide kinase Gp1.7, phosphorylates dGMP to dGDP and dTMP to dTDP	144	SaV-like (IPR021739)				
Phage protein Gp2.8/Gp7.7 contains HNH endonuclease motif	130					Actividade endonuclease Unión DNA
Phage protein Gp1.8	43					
Phage protein Gp2, bacterial RNA polymerase inhibitor	50	RNA polymerase inhibitor (IPR016412)				
Phage single-stranded DNA-binding protein Gp2.5	232	Single-stranded protein, bacteriophage T7 (IPR016411)	DNA-binding bacteriophage			Unión DNA
Phage endonuclease I (EC 3.1.21.2), four-way DNA junctions resolving	150	Bacteriophage T7, Gp3, endodeoxynuclease I (IPR008029)		Integración DNA Proceso viral		Actividade desoxirribonucleasa IV
Phage endolysin	152	Peptidoglycan recognition protein (IPR015510) Endolysin T7 type (IPR034689)		Proceso catabólico do peptidoglicano Liberación viral da célula hospede por citólises Regulación negativa da transcripción viral		Actividade N-acetilmuramoil-L-alanina-amidasa Unión ións de zinc

Phage protein	39				
Phage protein	40				
Phage primase/helicase protein Gp4A	577	Twinkle-like protein (IPR027032) Bacteriophage T7 DNA helicase/primase (IPR046394)	Replicación DNA	Unión ATP Actividade helicasa Actividad primasa Actividade helicasa Unión ións de zinc Unión de DNA monocatenario Actividade 5'-3' DNA helicasa	DNA DNA
Phage protein Gp4.3	70	Protein of unknown function DUF5471 (IPR035156)			
Phage protein Gp4.5, inhibitor of host toxin/antitoxin system	104	Inhibitor of toxin/antitoxin system			
Phage protein Gp4.7	129				
Phage DNA-directed DNA polymerase (EC 2.7.7.7)	704	DNA polymerase A (IPR002298)	Replicación do DNA Replicación do DNA provocada por o DNA	Actividade DNA polimerasa dirixida ao ADN Unión de ácidos nucleicos Unión do DNA	DNA

Phage protein Gp5.5 suppressor of silencing	101	Protein suppressor of silencing, bacteriophage T7 (IPR022611)		
Phage protein Gp5.7	70			
Phage exonuclease (EC 3.1.11.3)	302			
Phage protein Gp6.3	37			
Phage protein Gp6.5	82	Bacteriophage T7-like gene 6.5 (IPR020121)		
Phage virion protein Gp6.7 ejected into infected cell	74	Bacteriophage T7-like, protein 6.7 (IPR020134)		
Phage virion assembly protein Gp7.3 ejected into infected cell	87	Bacteriophage T7-like virion assembly protein (IPR024281)		
Phage collar, head-to-tail connector protein Gp8	536	Head-to-tail connector protein, podovirus-type (IPR020991) Portal protein, Caudovirales (IPR038995)	Expulsión do xenoma viral a través da envoltura da célula hospede, mecanismo de cola corta	Complexo portal vírico
Phage capsid assembly scaffolding protein Gp9	320	Capsid assembly scaffolding protein-like (IPR008768)	Ensamblaxe da cápsula vírica	
Phage major capsid protein Gp10A	346			Cápsula viral
Phage protein	77			
Phage non-contractile tail tubular protein Gp11	193	Tail tubular protein Gp11 (IPR033767)		

Phage non-contractile tail tubular protein Gp12	792					
Phage scaffold protein Gp13, required for Gp6.7 incorporation into virion	137	Probable scaffold protein Gp13, bacteriophage T7 (IPR020335)				
Phage DNA ejectosome component, internal virion protein Gp14	197	Internal virion Gp14 (IPR038996)	protein	Expulsión do xenoma viral a través da envoltura da célula hospede		
Phage DNA ejectosome component, internal virion protein Gp15	752	Internal virion Gp15 (IPR038993)	protein	Expulsión do xenoma viral a través da envoltura da célula hospede		
-Phage DNA ejectosome component, peptidoglycan exotransglycosylase (EC 4.2.2.n1)	1322	Internal virion Gp16 (IPR038994)	protein	Proceso metabólico do peptidoglicano	Actividade lítica da Membrana transglicosilasa	
				Expulsión do xenoma viral a través da envoltura da célula hospede		
Phage non-contractile tail fiber protein Gp17	778	Bacteriophage T7 tail fiber protein (IPR005604)	tail fibre			
Phage non-contractile tail fiber protein Gp17	525					

Phage holin, class II Gp17.5	70	Bacteriophage T7, Gp17.5, holin (IPR019682)	Liberación viral da célula hóspede por citólises
Phage terminase small subunit Gp18, DNA packaging	86	DNA maturase, bacteriophage T7-like (IPR024345)	
Phage Rz-like lysis protein Gp18.5	149	Spanin, inner membrane subunit	Liberación viral da célula hóspede por citólises
Phage terminase large subunit Gp19, DNA packaging	586	Terminase, large subunit gp19 (IPR044271)	Unión ATP Actividade endonuclease Actividade hidrólisis de ATP

4.5 Estabilidade térmica e a distintos valores de pH

A temperatura e o pH son factores físicos externos que inflúen na supervivencia dos bacteriófagos xa que desempeñan un papel fundamental na fixación, penetración, multiplicación e viabilidade dos bacteriófagos (Jończyk, Kłak, Międzybrodzki, & Górski1, 2011). A **Figura 11** mostra unha representación das PFU/mL (Log_{10}) do fago de *K. pneumoniae* a distintas temperaturas ($^{\circ}\text{C}$); -20°C , 4°C (control), 28°C , 42°C e 60°C . Como pode apreciarse este fago é estable a todas as temperaturas. Si comparamos estes resultados co estudo que se realizou en 2020 sobre os efectos benéficos do bacteriófago CM8-1 nun modelo de mastite bovina xerada por *K. pneumoniae* pode determinarse que en ambos os casos o fago é estable a temperaturas comprendidas entre 30°C e 60°C (Zhao, y otros, 2021). Sen embargo, no estudo realizado en 2020 non se determinou a estabilidade a temperaturas inferiores a 30°C , pero si se determinou a estabilidade temperaturas superiores a 60°C e determinouse que o fago non era estable. No presente estudo sería necesario determinar a estabilidade do fago illado a temperaturas superiores a 60°C para así realizar unha comparativa.

Realizando unha análise estatística por ANOVA pode determinarse que con un p – valor de 0.274 acéptase a hipótese nula (p – valor > 0.05), polo que non hai diferenzas estatisticamente significativas da estabilidade de este fago entre as distintas temperaturas.

Que non haxa diferenzas ante a estabilidade de este fago a distintas temperaturas é unha vantaxe xa que á hora de realizar unha terapia con fagos no caso da mastite bovina, o fago non se degradaría nun amplo rango de temperaturas.

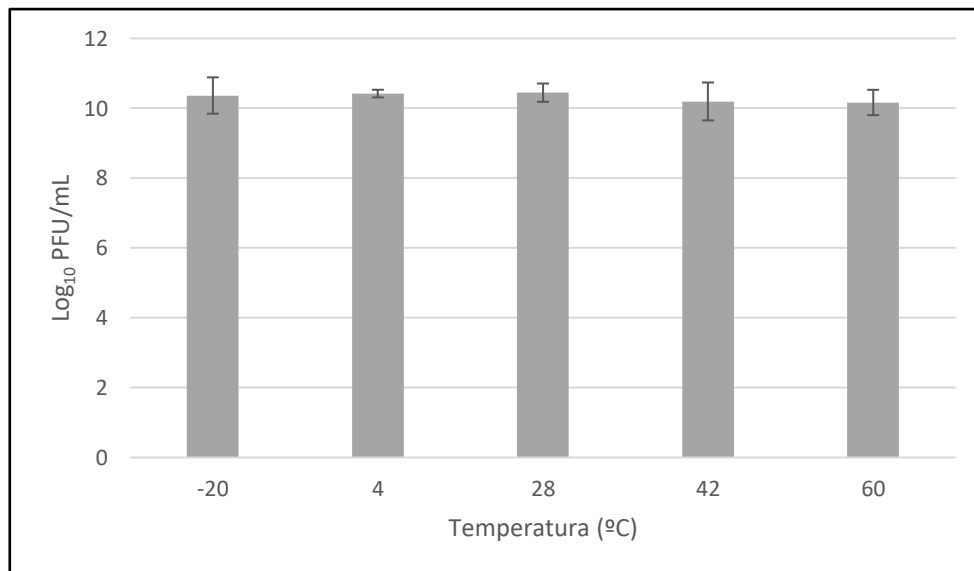


Figura 11. Estabilidade térmica do fago de *K. pneumoniae*. Ensaio realizado a diferentes temperaturas (-20°C , 4°C (control), 28°C , 42°C e 60°C) durante 24h. As barras de error representan a desviación estándar de seis ensaios independentes.

A **Figura 12** mostra unha representación das PFU/mL (Log_{10}) do fago de *K. pneumoniae* a distintos pH; 2, 3, 4, 5, 6, 7 (control), 8, 9, 10, 11 e 12. Como pode apreciarse este fago é estable a todos os pH, menos a pH 12. Si comparamos estes resultados co estudo que se realizou en 2020 sobre os efectos benéficos do bacteriófago CM8-1 nun modelo de mastite bovina

xerada por *K. pneumoniae* (Zhao, y otros, 2021) pode determinarse que en ambos os casos o fago é estable a pH comprendidas entre 6 e 10. Sen embargo neste estudo determinouse que o fago non era estable a pH comprendidos entre 2 e 4, pero os meus resultados mostraron estabilidade a pH 3 e 4, ao igual que tamén mostraron estabilidade a pH 11.

Realizando unha análise estatística por ANOVA, sen ter en conta o pH 12, pode determinarse que con un p – valor de 0.0288 non se acepta a hipótese nula (p – valor < 0.05), polo que hai diferenzas estatisticamente significativas da estabilidade de este fago entre os distintos pH. Concretamente existen diferenzas significativas entre os pH 4 e 11.

Que haxa estas diferenzas estatisticamente significativas entre os pH 4 e 11 non inflúe en canto á estabilidade do fago a estes pH, xa que como podemos ver na Figura 12 é estable. Isto supón unha vantaxe xa que á hora de realizar terapia con fagos, no caso da mastite bovina, o fago non se degradaría a un gran rango de pH. Sen embargo, non podería usarse a un pH 12 porque non é estable.

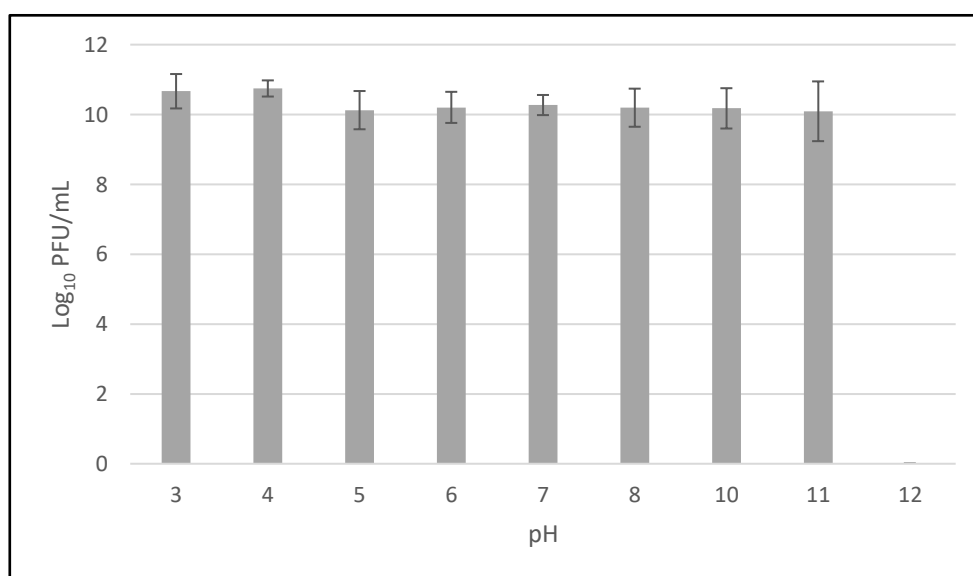


Figura 12. Estabilidade do fago de *K. pneumoniae* a distintos pH. Ensaio realizado a diferentes pH (2, 3, 4, 5, 6, 7 (control), 8, 9, 10, 11, 12) durante 24h. As barras de error representan a desviación estándar de seis ensaios independentes.

Polo tanto, este fago presenta unha excelente tolerancia a medios ácidos e alcalinos, ademais, é termoestable, polo que pode considerarse un bacteriófago con un gran potencial para tratar enfermidades causadas por *K. pneumoniae in vivo*.

4.6 Comparativa control – leite

Determinar a estabilidade do fago unha vez exposto ao leite cru é un factor clave para un posible tratamento da mastite bovina con bacteriófagos. Diversos estudos mostran unha redución do título de fagos despois de unha exposición ao leite cru. No caso de un fago listerial (A511) observouse unha redución do 43% do total de fagos despois de entrar en contacto co

leite cru, sen embargo, no caso de dous fagos estafilocócicos (ϕ H5 y ϕ A72) a redución foi de un 90% (García-Anaya, y otros, 2020).

No caso do fago de *K. pneumoniae*, unha vez incubado o control (tampón SM) e o leite, a 33°C durante 24h, determinouse que presentaba un comportamento semellante ante o control (tampón SM) e o leite a 33°C (**Figura 13**). Mediante unha análise estatística por test – T para mostras independentes puido determinarse que con un p – valor de 0.93 acéptase a hipótese nula. Polo que se conclúe que non hai diferenzas estatisticamente significativas (p – valor > 0.05) na estabilidade de este fago entre o control (tampón SM) e o leite a 33°C.

Que non haxa diferenzas ante a estabilidade de este fago entre o control (tampón SM) e o leite é unha vantaxe xa que á hora de realizar unha terapia con fagos no caso da mastite bovina, o fago non se degradaría ao entrar en contacto co leite, polo que sería un tratamento efectivo.

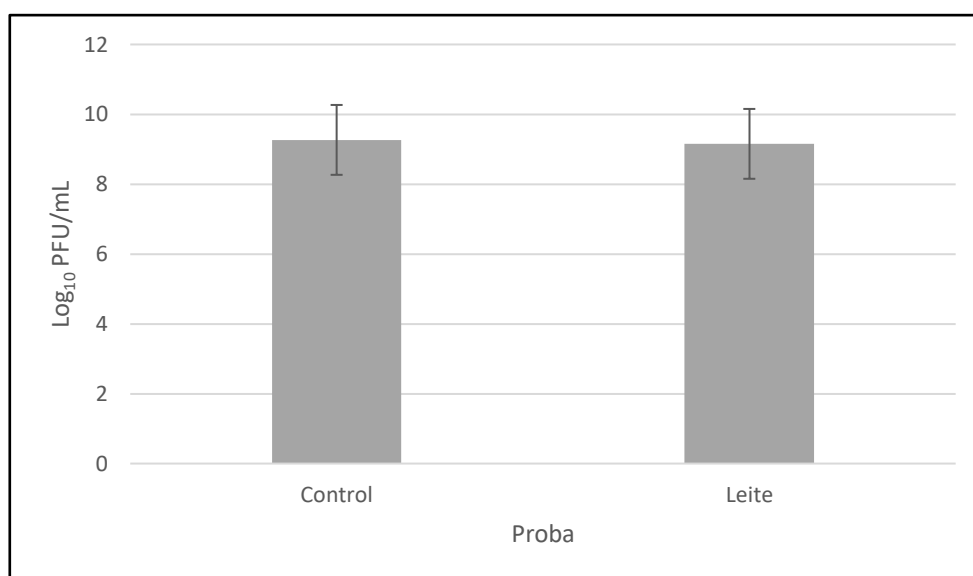


Figura 13. Comparativa da estabilidade do fago de *K. pneumoniae* entre o control (tampón SM) e o leite a 33°C durante 24h. As barras de error representan a desviación estándar de seis ensaios independentes.

Os mecanismos polo cal en algúns caos se reduce o título de fagos ante a exposición a leite cru e noutros casos non, non está claro. Pénsase que as proteínas do leite poden ter influencia ou ben pode ser debido ás fraccións que constitúen o leite.

4.7 Ensaio de infección por fagos

A capacidade lítica do fago de *K. pneumoniae* avalíouse infectando a propia bacteria co seu correspondente fago a diferentes MOIs (1, 0.1 e 10) durante 168 horas. A **Figura 14** representa a MOI 1. Por medio de unha análise estatística de test – T para mostras independentes determinouse a presenza ou ausencia de diferenzas estatisticamente significativas. Ás 24, 48 e 96 horas observouse unha redución significativa (p < 0.05) de *K. pneumoniae* ante a incubación co fago. Sen embargo, a partir das 96 horas de incubación non se observou redución significativa (p – valor > 0.05).

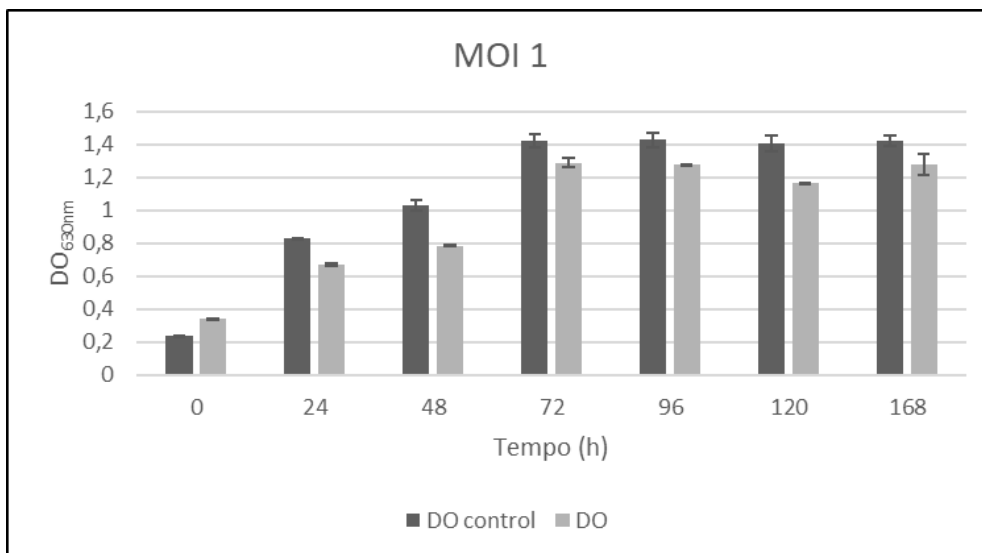


Figura 14. *K. pneumoniae* infectado co seu correspondente fago a MOI 1. Ensaio de infección realizado durante 168 h a 37°C, 130 rpm na MOI indicada. As barras de error representan a desviación estándar de dous ensaios independentes.

A **Figura 15** representa a MOI 0.1. Por medio de unha análise estatística de test – T para mostras independentes determinouse a presenza ou ausencia de diferenzas estatisticamente significativas. A partir das 24 horas observouse unha redución significativa ($p < 0.05$) de *K. pneumoniae* ante a incubación co fago.

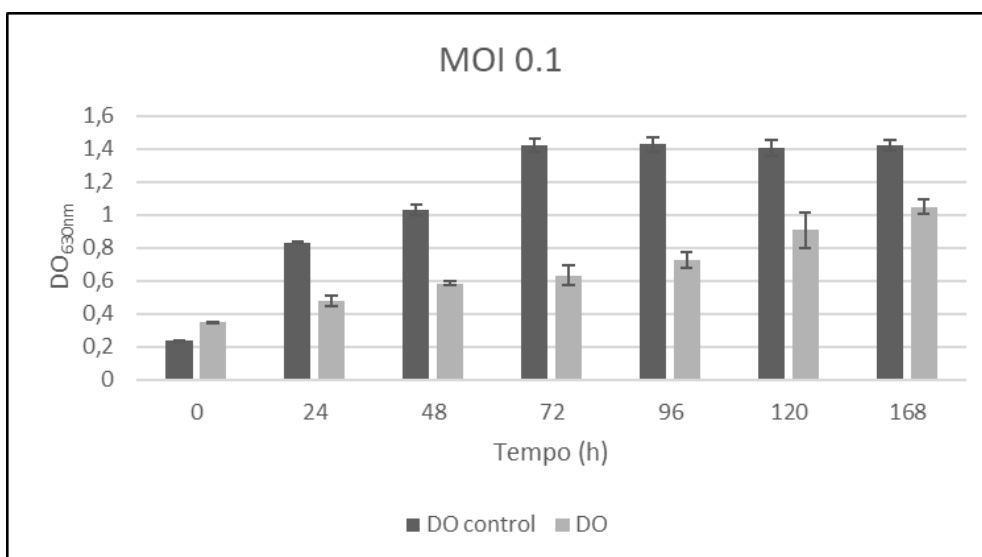


Figura 15. *K. pneumoniae* infectado co seu correspondente fago a MOI 0.1. Ensaio de infección realizado durante 168 h a 37°C, 130 rpm na MOI indicada. As barras de error representan a desviación estándar de dous ensaios independentes.

A **Figura 16** representa a MOI 10. Por medio de unha análise estatística de test – T para mostras independentes determinouse a presenza ou ausencia de diferenzas estatisticamente significativas. Entre as 24 e 72 horas observouse unha redución significativa ($p < 0.05$) de *K. pneumoniae* ante a incubación co fago. Sen embargo, a partir das 72 horas non houbo redución significativa entre a bacteria e o seu correspondente fago.

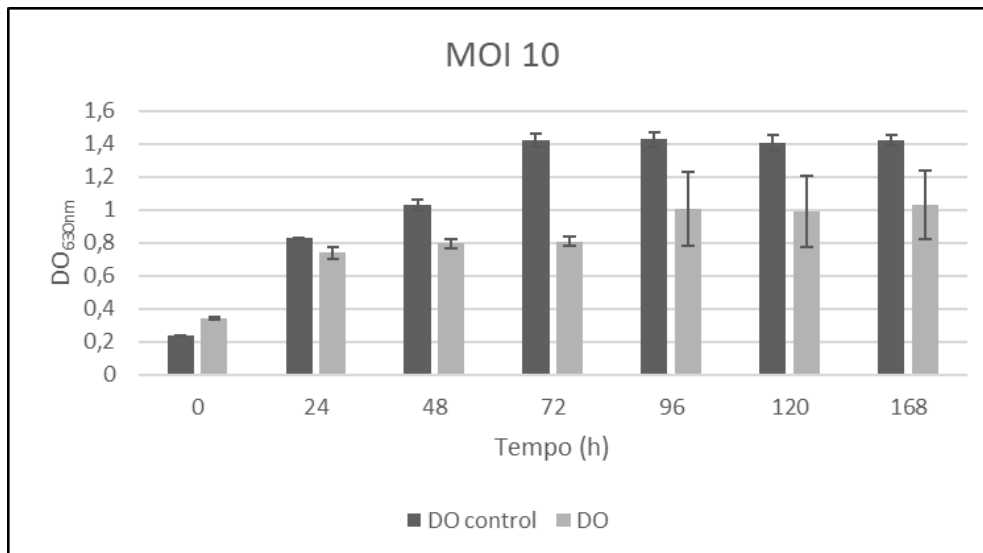


Figura 16. *K. pneumoniae* infectado co seu correspondente fago a MOI 10. Ensaio de infección realizado durante 168 h a 37°C, 130 rpm na MOI indicada. As barras de error representan a desviación estándar de dous ensaios independentes.

Estes resultados mostraron a influencia do fago no crecemento de *K. pneumoniae* en función da súa proporción e respaldan a posibilidade de usar este fago para controlar unha infección producida pola bacteria *K. pneumoniae* si se usa unha MOI 0.1. En todas as MOIs produciuse unha redución significativa de *K. pneumoniae* en algún tempo, sen embargo, a redución foi máis significativa e duradeira a MOI 0.1. Isto a súa vez coincide cos resultados obtidos no estudo realizado en 2020 sobre os efectos beneficiosos do bacteriófago CM8-1 nun modelo de mastite bovina xerada por *K. pneumoniae* (Zhao, y otros, 2021). En futuros estudos sería necesario avaliar valores de MOI inferior para determinar o seu efecto. Por exemplo, no estudo realizado por (Bai y otros, 2022) co fago de *K. pneumoniae* vB_kpnM_17-11 o MOI óptimo foi de 0.001.

4.8 Curva de crecemento de un paso

O ciclo de infección do fago de *K. pneumoniae* avaliouuse a través da curva de crecemento de un paso (**Figura 17**). Considérase unha característica que reflexa a forte capacidade de replicación e proliferación de un bacteriófago.

Para realizala empregouse unha MOI de 0.1. Como se pode apreciar no gráfico o bacteriófago tivo un crecemento exponencial de 60 minutos. Alcanzou o momento de explosión aos 100 minutos aproximadamente.

Mediante unha análise estatística ANOVA puido determinarse que existen diferencias estatisticamente significativas ($p < 0.05$) entre o tempo inicial da incubación e aos 30 minutos de incubación e entre estes e os resto de tempos. Sen embargo, comparando os tempos 60, 90, 120 e 150 non existen diferencias estatisticamente significativas ($p > 0.05$).

Isto implica, que a tempo 0 e a tempo 30 existe un crecemento exponencial, pero a 60, 90, 120 e 150 o tamaño da explosión, expresado en PFU por célula infectada, mantense semellante, en torno a 10.48 PFU por célula infectada. A diferenza de este resultado, no estudo

realizado en 2020 sobre os efectos beneficiosos do bacteriófago CM8-1 nun modelo de mastite bovina xerada por *K. pneumoniae*, o tamaño da explosión foi de aproximadamente 9.54 PFU por célula infectada (Zhao, y otros, 2021).

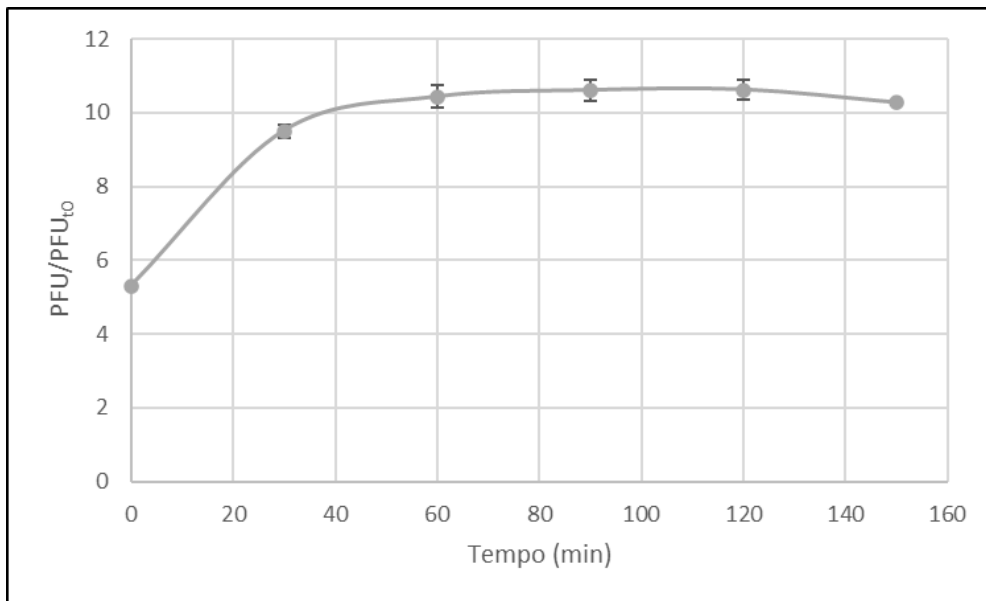


Figura 17. Curva de crecemento de un paso para o fago de *K. pneumoniae*. Engadiuse o fago correspondente a *K. pneumoniae* a unha MOI de 0.1. Os valores medios están representados por puntos e a desviación estándar por barras de erro, correspondentes a tres ensaios independentes. A liña descontinua representa o axuste dos datos experimentais a unha liña de tendencia polinómica de grado 2.

Polo tanto, o fago co que se está a traballar no presente estudo presenta intervalos cortos de incubación e brote, o que implica que ten unha forte capacidade bactericida e un gran potencial de proliferación. Isto mellora a capacidade do fago para destruír bacterias.

5. CONCLUSIÓN

- Neste estudo illáronse das mostras de leite de vacas con mastite bacterias intimamente relacionadas con esta enfermidade como *S. uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *C. bovis* ou *S. aureus* que puideron ser empregadas no illamento de fagos.
- Non foi posible illar ningún fago de *S. uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *C. bovis* ou *S. aureus* nas mostras de leite de vacas con mastite ou xurro. O leite e o xurro son matrices complexas, o que podería influír no illamento dos fagos e habería que intentar optimizar o método de illamento empregado.
- Si foi posible illar un fago de *K. pneumoniae* a partir de unha mostra de augas residuais empregando a cepa *K. pneumoniae* CECT 8453. As placas do fago presentaban uns halos que indicaban a produción de depolimerasas. Isto é de moito interese xa que estas enzimas teñen un potencial interesante nos tratamentos das infeccións e *biofilms* bacterianos.
- O xenoma do fago illado presentou unha alta similitude co xenoma de fagos xa previamente illados e cuxo xenoma estaba presente na base datos.
- O bacteriófago de *K. pneumoniae* mostrou unha gran estabilidade a distintas temperaturas e pH, excepto a pH 12. Ademais, como se puido comprobar non hai diferenzas ante a estabilidade de este fago entre o control (tampón SM) e o leite. Todo isto supón a vantaxe de que en caso de realizar unha terapia con fagos no caso da mastite bovina, este non se degradaría ante distintas temperaturas, pH (2 - 11) e ao entrar en contacto co leite.
- Sería necesario levar a cabo tratamentos *in vitro* en leite e *in vivo* para así poder avaliar a eficacia do tratamento de unha mastite causa por *K. pneumoniae* co seu correspondente fago. Así mesmo é necesario determinar o espectro lítico do fago incluíndo cepas de *K. pneumoniae* de diferentes serotipos capsulares.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelrahman, F., Easwaran, M., Daramola, O., Ragab, S., Lynch, S., Oduselu, T., . . . El Shibiny, A. (28 de Enero de 2021). Phage-Encoded Endolysins. *10(2)*, 124. doi:10.3390/antibiotics10020124
- Abebe, R., Hatiya, H., Abera, M., Megersa, B., & Asmare, K. (3 de Diciembre de 2016). Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. *BMC Veterinary Research*, *12*, 217. doi:10.1186/s12917-016-0905-3
- Africor Lugo. (2021). Memoria de actividades da Asociación Provincial de Criadores de Frisón de Lugo para o Control de Rendementos, AFRICOR LUGO, correspondente ao ano 2021. *Vaca Pinta*, 1-142. Obtenido de https://vacapinta.com/media/files/fichero/memoriaafricorlugo2021_web.pdf
- Arkin, A., Cottingham, R., Henry, C., Harris, N., Stevens, R., Maslov, S., . . . Yu, D. (6 de Julio de 2018). KBase: The United States Department of Energy Systems Biology Knowledgebase. *Nat Biotechnol*, *36(7)*, 566-569. doi:10.1038/nbt.4163
- Bai, J., Zhang, F., Liang, S., Chen, Q., Wang, W., Wang, Y., . . . Zhou, Y. (5 de Julio de 2022). Isolation and Characterization of vB_kpnM_17-11, a Novel Phage Efficient Against Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *12*. doi:https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.897531
- Cassuto, E., Lash, T., Sriprakash, K., & Radding, C. (1971). Role of Exonuclease and β Protein of Phage λ in Genetic Recombination, V. Recombination of λ DNA in Vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *68(7)*, 1639–1643. doi:10.1073/pnas.68.7.1639
- Cheng, W. N., & Han, S. G. (Noviembre de 2020). Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments - A review. *Asian - Australasian Journal of Animal Sciences*, *33(11)*, 1699-1713. doi:10.5713/ajas.20.0156
- De Coster, W. (2018). *GitHub*. Obtenido de NanoPlot: Plotting scripts for long read sequencing data: <https://github.com/wdecoster/NanoPlot>
- Elcacho, J. (19 de Marzo de 2019). Resistencia a los antibióticos provocada por la ganadería. *Bio Eco Actual*. Obtenido de <https://www.bioecoactual.com/2019/03/19/resistencia-a-los-antibioticos-ganaderia/>
- EMA. (s.f.). Clasificación de los antibióticos para uso en animales para un uso prudente y responsable. *European Medicines Agency*. Obtenido de https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/infographic-categorisation-antibiotics-use-animals-prudent-responsible-use_es.pdf
- Ferreira, R., Amado, R., Padrão, J., Ferreira, V., Dias, N., Melo, L., . . . Nicolau, A. (31 de Marzo de 2021). The first sequenced *Sphaerotilus natans* bacteriophage- characterization and potential to control its filamentous bacterium host. *FEMS Microbiol Ecol*, *97(4)*. doi:10.1093/femsec/fiab029
- Fokine, A., Miroshnikov, K., Sheneider, M., Mesyanzhinov, V., & Rossmann, M. (14 de Marzo de 2008). Structure of the Bacteriophage ϕ KZ Lytic Transglycosylase gp144. *Journal of*

- Galaxy Community. (21 de Abril de 2022). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkac247
- Galego, C. (17 de Marzo de 2017). Principales patógenos causantes de mastitis en vacuno de leche en Galicia. *Campo Galego*. Obtenido de <https://www.campogalego.es/principales-patogenos-causantes-de-mastitis-en-vacuno-de-leche-en-galicia/>
- García Suárez, P., Martínez Fernández, B., & Rodríguez González, A. (2008). Nuevas alternativas en el tratamiento de la mastitis en el ganado vacuno. *Tecnología Agroalimentaria*(5), 55-58. Obtenido de <http://hdl.handle.net/10261/7668>
- García, Á. (1 de Enero de 2004). Contagious vs. environmental mastitis. Obtenido de https://openprairie.sdstate.edu/extension_extra/126/
- García, N., Fidelis, C. E., Freu, G., Granja, B., Vegia dos Santos, M., & Breno, L. (31 de Abril de 2021). Evaluation of Chromogenic Culture Media for Rapid Identification of Gram-Positive Bacteria Causing Mastitis. *104*(8). Obtenido de <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2021.662201/full>
- García, P., Vázquez, R., Van Raaij, M., Seoane, M., Rivero, V., & Ruiz, S. (22 de Marzo de 2022). *Centro de Investigación Biomédica En Red*. Obtenido de Enfermedades Respiratorias: <https://www.ciberes.org/noticias/estudios-funcionales-y-estructurales-de-una-enzima-antibacteriana-desvelan-subdominios-de-union-y-actividad#:~:text=Las%20lisinas%20de%20los%20bacteri%C3%B3fagos,a%20bacterias%20resistentes%20a%20antibi%C3%B3ticos>
- García-Anaya, M., Sepúlveda, D., Rios-Velasco, C., Zamudio-Flores, P., Romo-Chacón, A., & Acosta-Muñiz, C. (Abril de 2020). Stability of listerial bacteriophage A511 in bovine milk fat globules. *International Dairy Journal*, *103*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.104627>
- Granja, B., Fidelis, C. E., Garcia, B., & Veiga dos Santos, M. (2021). Evaluation of chromogenic culture media for rapid identification of microorganisms isolated from cows with clinical and subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, *104*(8), 9115-9129. doi:10.3168/jds.2020-19513
- Griep, M. (Agosto de 1995). Primase structure and function. *34*(4), 171-178. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8655184/>
- Hernández Reyes, J., & Bedolla Cedeño, J. (1 de Septiembre de 2008). Importancia del conteo de células somáticas en la calidad. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 1-34.
- IACG. (2019). *NO PODEMOS ESPERAR: ASEGURAR EL FUTURO CONTRA LAS INFECCIONES FARMACORRESISTENTES*. Obtenido de <https://www.woah.org/app/uploads/2021/03/iacg-final-summary-es.pdf>
- InterPro. (s.f.). *Classification of protein families*.

- Izurieta, G. (20 de Octubre de 2017). Perdidas económicas por altos conteos de células somáticas en leche cruda. *Engormix*. Obtenido de <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/perdidas-economicas-altos-conteos-t41133.htm>
- Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (31 de Mayo de 2011). The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia Microbiologica*, *56*(3), 191–200. doi:10.1007/s12223-011-0039-8
- Latka, A., Maciejewska, B., Majkowska-Skrobek, G., Briers, Y., & Drulis-Kawa, Z. (Abril de 2017). Bacteriophage-encoded virion-associated enzymes to overcome the carbohydrate barriers during the infection process. *Appl Microbiol Biotechnol*, *101*(8), 3103–3119. doi:10.1007/s00253-017-8224-6
- Lowe, T., & Eddy, S. (1 de Marzo de 1997). tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res*, *25*(5), 955–964. doi:10.1093/nar/25.5.955
- Lukianova, A., Evseev, P., Shneider, M., Gornostal, E., Mikhaylova, Y., Shelenkov, A., & Miroshnikov, K. (Julio de 2022). Pre-Treatment With Polysaccharide Depolymerase Enhances the Infective Performance of Klebsiella Phage KP1079. *Ural-Siberian Conference on Computational Technologies in Cognitive Science, Genomics and Biomedicine (CSGB)*, 260–263. doi:10.1109/CSGB56354.2022.9865515
- M, H., S, P., M, H., M, I., & M, A. (10 de Marzo de 2017). Bovine mastitis and its therapeutic strategy doing antibiotic sensitivity test. *Austin Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry*, *4*(1).
- Martín Richard, M. (9 de Julio de 2007). Mamitis por Klebsiella. *Frisona*(158), 110–111.
- Massé, J., Dufour, S., & Archambault, M. (20 de Febrero de 2020). Characterization of Klebsiella isolates obtained from clinical mastitis cases in dairy cattle. *American Dairy Science Association*, *103*(4), 3392–3400. doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2019-17324>
- Mato Iglesias, I. (Mayo de 2020). La mamitis evoluciona, las estrategias para combatirla. *Vaca Pinta*(17). Obtenido de https://vacapinta.com/media/files/fichero/vp017_especialmamitis_estrategiasparacombatirmamitis_castelan.pdf
- Melo, L., Sillankorva, S., Ackermann, H., Kropinski, A., Azeredo, J., & Cerca, N. (Octubre de 2014). Caracterización del fago vB_SepS_SEP9 de Staphylococcus epidermidis, un miembro único de la familia Siphoviridae. *Res Microbiol*, *165*(8), 679–685. doi:10.1016/j.resmic.2014.09.012
- Michaud, P., Da Costa, A., Courtois, B., & Courtois, J. (2023). Polysaccharide lyases: recent developments as biotechnological tools. *Crit Rev Biotechnol*, *23*(4), 233–266. doi:10.1080/07388550390447043
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G., Olsen, G., Davis, J., Disz, T., . . . Stevens, R. (Enero de 2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res*, *42*(D1), D206–D214. doi:10.1093/nar/gkt1226
- Pan, J., Lian, K., Sarre, A., & Kirsti, H. (21 de Septiembre de 2021). Bacteriophage origin of some minimal ATP-dependent DNA ligases: a new structure from Burkholderia pseudomallei

- with striking similarity to Chlorella virus ligase. *Scientific reports*. doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-021-98155-w>
- Pan, Y., Fang, H., Yang, H., Lin, T., Hsieh, P., Tsai, F., . . . Wang, J. (Julio de 2008). Capsular polysaccharide synthesis regions in *Klebsiella pneumoniae* serotype K57 and a new capsular serotype. *J Clin Microbiol*, *46*(7), 2231-2240. doi:10.1128/JCM.01716-07
- Pelzek, A., Fischetti, V., Schuch, R., & Schmitz, J. (15 de Octubre de 2008). Isolation of Bacteriophages from Environmental Sources, and Creation and Functional Screening of Phage DNA Libraries. doi: <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et1303s07>
- Persson Waller, K., Personson, Y., Nyman, A.-K., & Stengärde, L. (30 de Enero de 2014). Udder health in beef cows and its association with calf growth. *56*(1). doi:10.1186/1751-0147-56-9
- Rodríguez, A., Martínez, B., & García, P. (2010). Presente y futuro en el control de la mamitis del ganado vacuno. *Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC)*.
- Rodríguez, P., Sánchez Matamoros, A., Carvajal Valilla, J., Blanco Murcia, J., & Sánchez Vizcaíno, J. (2008). APLICACIÓN DE LA TERMOGRAFÍA EN EL ESTUDIO DE LA UBRE DE LOS GRANDES RUMIANTES Y EN SUS POSIBLES COMPLICACIONES PATOLÓGICAS. *RCCV*, *2*(2), 66-72.
- Rrwick. (2017). *GitHub*. Obtenido de Porechop: adapter trimmer for Oxford Nanopore reads: <https://github.com/rrwick/Porechop>
- San Julián, D. (2012). Mamitis bovina. Evolución en Navarra de los microorganismos patógenos que la causan (1990 - 2010). *Navarra Agraria*(192), 41 - 48.
- shaheen, m., & Showkat , N. (2016). A treatise on bovine mastitis: disease and disease economics, etiological basis, risk factors, impact on human health, therapeutic management, prevention and control strategy. *Advances in Dairy Research*, *4*(1). doi:10.4172/2329-888X.1000150
- Sharun, K., Dhama, K., Tiwari, R., Gugjoo, M. B., Yattoo, M., Patel, S. K., . . . Chaicumpa, W. (17 de Febrero de 2021). Advances in therapeutic and management approaches of bovine. *Veterinary Quarterly*, *41*(1), 107–136. doi: 10.1080/01652176.2021.1882713
- Singh, A., Padmesh, S., Dwivedi, M., & Kostova, I. (17 de Febrero de 2022). How Good are Bacteriophages as an Alternative Therapy to Mitigate Biofilms of Nosocomial Infections. *Infect Drug Resist*, *15*, 503-532. doi:10.2147/IDR.S348700
- Van , R. T., & Kropinski, A. M. (2009). Bacteriophage enrichment from water and soil. *Methods Mol Biol*, 15-21. doi:10.1007/978-1-60327-164-6_2
- White, H., Sherman, M., Brasilès, S., Jacquet, E., Seavers, P., Tavares, P., & Orlova, E. (Junio de 2012). Capsid Structure and Its Stability at the Late Stages of Bacteriophage SPP1 Assembly. *Journal of Virology*, *86*(12), 6768–6777. doi:10.1128/JVI.00412-12
- Wick, R., Judd, L., Gorrie, C., & Holt, K. (8 de Junio de 2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol*, *13*(6). doi:10.1371/journal.pcbi.1005595

- Wick, R., Schultz, M., Zobel, J., & Holt, K. (15 de Octubre de 2015). Bandage: interactive visualization of de novo genome assemblies. *Bioinformatics*, *31*(20), 3350-3352. doi:10.1093/bioinformatics/btv383
- Yan, J., Mao, J., & Xie, J. (Junio de 2014). Bacteriophage polysaccharide depolymerases and biomedical applications. *BioDrugs*, *28*(3), 265-274. doi:10.1007/s40259-013-0081-y
- Zeinhom, M., Abdel Aziz, R., Mohamed, A., & Bernabucci, U. (29 de Agosto de 2016). Impact of seasonal conditions on quality and pathogens content of milk in Friesian cows. *29*(8). doi:10.5713/ajas.16.0143
- Zhang, L., Xu, D., Huang, Y., Zhu, X., Rui, M., Wan, T., . . . Gong, Y. (13 de Fevereiro de 2017). Structural and functional characterization of deep-sea thermophilic bacteriophage GVE2 HNH endonuclease. *Scientific reports*. doi:10.1038/srep42542
- Zhao, W., Shi, Y., Liu, G., Yang, J., Yi, B., Liu, Y., . . . Gao, J. (1 de Marzo de 2021). Bacteriophage has beneficial effects in a murine model of *Klebsiella pneumoniae* mastitis. *Journal of Dairy Science*, *104*(3), 3474-3484. doi:https://doi.org/10.3168/jds.2020-19094
- Zhao, W., Shi, Y., Liu, G., Yang, J., Yi, B., Liu, Y., . . . Gao, J. (Marzo de 2021). Bacteriophage has beneficial effects in a murine model of *Klebsiella pneumoniae* mastitis. *Journal of Dairy Science*, *104*(3), 3474-3484. doi:https://doi.org/10.3168/jds.2020-19094