



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Bacteriófagos en el cuerpo humano

Maryury Andrea Brown Jaque



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

BACTERIÓFAGOS EN EL CUERPO HUMANO

MARYURY ANDREA BROWN JAQUE

Barcelona, julio de 2018



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultat de Farmàcia i Ciències de
l'Alimentació
Universitat de Barcelona

BACTERIÓFAGOS EN EL CUERPO HUMANO

Memoria presentada por **MARYURY ANDREA BROWN JAQUE** para optar por el
grado de Doctora por la Universitat de Barcelona

Programa de doctorado EEES: Biotecnología

Tesis realizada bajo la dirección de la Dra. María Teresa Muniesa Pérez y el Dr. Joan Jofre Torroella y bajo la tutoría del Dr. Francisco Lucena Gutiérrez en el Departamento de Genética, Microbiología y Estadística de la Facultad de Biología de la Universitat de Barcelona

La directora,

El director,

María Teresa Muniesa Pérez

Joan Jofre Torroella

El tutor,

Autor,

Francisco Lucena Gutiérrez

Maryury Andrea Brown Jaque

Barcelona, julio de 2018

Beca doctoral otorgada por el Gobierno de la República de Colombia

COLCIENCIAS Convocatoria No. 617 de 2013 “Doctorados en el exterior”



A Dios, a mi familia y a la memoria de mi papito Eddie y mi abuelita Erisinda, que me dieron su fuerza y su bendición al partir para Barcelona a cumplir este sueño, ahora llevo su amor y sus enseñanzas siempre en mi mente y en mi corazón.

*“Yo creo en muchas cosas que no he visto, y ustedes también, lo sé.
No se puede negar la existencia de algo palpado por más etéreo que sea.
No hace falta exhibir una prueba de decencia de aquello que es tan verdadero.
El único gesto es creer o no. Algunas veces hasta creer llorando...”*

*...Es la naturaleza, será, que será,
que no tiene certeza y nunca te da,
que no tiene concepto, y nunca tendrá,
que no tiene tamaño”.*

Willie Colón – Canción “Oh, ¿Qué Será?”

*““There is a driving force more powerful than steam, electricity and atomic energy:
the will.”*

Albert Einstein

(Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad.)

AGRADECIMIENTOS

Una vez termina el caos y la locura frenética que implican escribir la tesis doctoral y que parece que nunca van a acabar, no me queda sino escribir la parte más difícil pero la que más me hacía ilusión desde que empecé con esta tarea. “Gracias” es una de mis palabras favoritas y quienes me conocen, lo saben. Cuántas veces he dicho “gracias” y luego me pongo a pensar... ¿Por qué lo he dicho? Supongo que no soy la única que se lo pregunta (jejeje)... Pero bueno me gusta pensar que hace parte de mi personalidad y de lo que me han enseñado en casa.

Ahora sí, este es el momento de agradecer a todos aquellos que de alguna manera han contribuido directa o indirectamente en la realización de este trabajo hecho con todo el amor, la pasión, la dedicación y el esfuerzo, y con el que aspiramos no solo a hacer un aporte al conocimiento científico sino también al avance de la sociedad. Este logro no es solo mío, quiero que sientan que es de todos ustedes porque sin su apoyo no habría llegado hasta aquí.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mi Padre Eterno que me ha dado una voluntad de hierro y la fuerza de mil caballos para sacar adelante esta tesis, a pesar de todas las dificultades personales que he tenido que enfrentar en esta última etapa. No solo me das una fuerza a la que no le encuentro explicación, sino que además me has puesto alrededor personas maravillosas que cada día me enseñan lo bonita que es la vida, a pesar de las nubes grises que vienen y van.

He tenido el privilegio de hacer el doctorado al lado un grupo de personas brillantes y con una calidad humana impresionante. Para mí, el grupo MARS es una familia, mi segunda familia, me han hecho sentir como en casa desde el primer día y por eso creo que este es la mejor ocasión para confesar como lo concibo:

Maite has sido como mi “madre” en este proceso, me has abierto una ventana al mundo de los fagos y en cuanto me asomé por ella... ¡Zaz!!! Flechazo directo al corazón ♥. Eres un ejemplo de eficiencia, de superación, de optimismo, de pasión por el trabajo y de liderazgo. Con tu visión de la ciencia, tu organización y la motivación que despiertas en nosotros haces que siempre queramos dar lo mejor de nosotros. Gracias a ti no solo somos un puñado de chicos reunidos en un laboratorio, somos un equipo en todos los sentidos. Muchas gracias por tu paciencia, por todo lo que me has enseñado, por la confianza que has depositado en mí, por tu orientación, por ayudarme a ver las cosas positivas cuando yo no veía nada o solo veía lo negativo, por tu calidez, por creer en mí cuando ni siquiera yo lo hacía, por levantarme una y

otra vez cada vez que caigo, por tu apoyo y consejo no solo en el ámbito profesional, sino también en el personal. Como toda una madre nos enseñas, nos orientas, nos apoyas, velas por nosotros, te preocupas por nuestro futuro y nos motivas a salir adelante. Definitivamente, ha sido un privilegio y un honor tener una directora de tesis como tú.

Joan, ha sido para mí como un “abuelo” en esta hermosa familia. Un maestro, un patriarca, una persona sabia, una fuente de experiencia. Habrá alguno que piense que exagero (incluso Joan 😊), pero para mí es una eminencia en el mundo de los fagos. Muchas gracias por aceptar la dirección de esta tesis, por tus consejos, por ayudarme siempre que lo he necesitado, por las anécdotas y experiencias que nos has contado, por las risas que nos has sacado con ellas, por tu amabilidad, por las charlas cada vez que nos encontrábamos por el pasillo sobre el humor inglés, lo que conoces de Colombia, tus viajes, en fin... Ya he tenido el gusto de decirte que para mí es un honor y un orgullo tener una tesis dirigida por ti. Sin embargo, nunca estará de más repetirlo.

A **Francisco** y **Anicet**, los veo como a unos “tíos” en esta familia MARS. Muchas gracias por su amabilidad, por sus consejos y por las historias y anécdotas que nos cuentan, nos hacen reír o nos dejan reflexionando, o a veces las dos cosas... Muchas gracias **Francisco** por ser mi puerta de entrada al grupo, fuiste tú quien me acogió y me dirigió hacia Maite. Sé que cada año lo olvidas, pero sí, ¡eres mi tutor!!! 😊 Gracias por ello también.

Gente del laboratorio 9, ustedes son mis “prim@s”. **Raquel**, gracias por tu comprensión, tu dulzura, por tu disposición siempre para ayudarme, por ser tan única y especial, por ser tú. Siempre he pensado que si hubiera una Raquel en cada rincón del mundo, el mundo sería un lugar más amable, generoso y divertido. Echaré de menos tus saludos a todo pulmón, tus gritos y tu cantar en balleno. Si pudiera te haría pequeñita, te metería en mi bolsillo y te llevaría allá donde vaya.

Julia, “muchas gracias, muy amable” por todo lo que has hecho por mí, nos parecemos en muchas cosas, me encanta tu sencillez y sobre todo aquel lazo cósmico que tenemos y que descubrimos en Valencia. Que sepas que esos lazos son eternos y no entienden de distancias. Dale también las gracias a Oscar, es muy ameno y divertido charlar con él. Raquel y Julia, muchas gracias por patrocinar mi gusto por las contaminaciones, los hongos y los espectaculares cristales de sales, ustedes ya saben que donde los demás ven cosas dignas de desechar, yo veo asombrosas obras de arte 😊.

Dra. Sala, Laura, la mujer orquesta, la fuente de energía inagotable, la condesa de Cervera, el diablillo y yo creo que mi alma gemela en el lab. Nos entendemos tan bien, me siento tan cómoda contigo, que ahora no me creo que al principio te tuviera un poquito de miedo. Te admiro muchísimo ¡eres lo máximo! Me dejaste un vacío enorme cuando te fuiste del lab, ahora ya me voy acostumbrando, pero aún te echo mucho de menos.

Miriam, contigo demostramos que las pequeñas somos fuertes, admiro mucho tu determinación y la pasión que le pones a todo lo que haces, una persona fiel a sus creencias y convicciones. Gracias por toda tu ayuda, por estar siempre pendiente de mí, sobre todo en esta última etapa, gracias por ese abrazo y esos ánimos que me das cada vez que los necesito.

Al resto de mis “prim@s” que han pasado por el 9 y a los que continúan allí: **Miriam Agulló, Ángela, Carlos, Enric, Lina, Jennifer, Luisa, Roger, Anna**, aunque no te veamos mucho cuando pasas por el lab eres como un ciclón. **Laia**, siempre tan dulce y tan maja. **Judith**, mi aliada indiscutible a la hora del foto estudio de placas, aún flipo con los brazos que te has sacado!! Has demostrado ser una chica de hierro por dentro y por fuera. Incluyo a **Robert** en esta parte de la familia, porque por más lejos que te vayas, ya eres miembro extraoficial de MARS. Seguro me he dejado alguno, la memoria suele ser traicionera y más en momentos como este. Pero a los que están aquí y a los que se me han escapado: ¡gracias por todo y por tanto!!

Hay un par de personitas por allí que también podría considerar como unas primas mayores y a las que quiero también agradecer: **Eli**, eres cálida, divertida y tan bonita cuando me saludas que me alegras el día ☺. Y **Cris**, eres amable, muy trabajadora, siempre dispuesta ayudar cuando te he necesitado, me encanta cuando nos cuentas cosas de Oliver ¡es tan bonito!!

Y ahora le toca el turno a mis “hermanit@s” del 10. Mis hermanit@s mayores: **Anna Allué**, no compartí mucho tiempo contigo, pero sí el suficiente para disfrutar de tu simpatía, **Marta Gómez**, una bomba constante de alegría capaz de contagiar a todos los que te rodean. **Alex**, eres un profesor increíble y eres como Laura, ¿de dónde sacas tanta energía? Reparte un poco ¡no seas egoísta! Gracias por tu paciencia, por tu disposición para echar un cable donde se necesita, por tus historias, por los videos de Youtube, por las bromas, por la hora golfa y por tantas cosas que nos hacían morir de risa. Me heredaste tu poyata y tu material del lab, pero también la necesidad de invadir otras poyatas (pobre Pedro...). Definitivamente, algo tiene esa poyata. Ah! Y no

te preocupes, no me hacen falta más muestras, Alex, que ya no quiero más muestras... Pero si más adelante llego a necesitar, ya sé que puedo contar contigo 😊

Marta Colomer, que orgullosa me siento de haber sido tu padawan, tu pequeño saltamontes. Me acompañaste por aquellos primeros pasos por el lab y me diste las primeras herramientas que necesitaba para llevar a cabo esta tesis. Siempre te recuerdo a ti y a tus enseñanzas con mucho cariño. Creo que te he mencionado en el laboratorio desde el primer día hasta el último. ¡Te admiro muchísimo!! **Aiora**, mil gracias por ser mi salvadora, siempre estás allí para ayudarme, para darme un consejo, para apoyarme, para darme un abrazo cuando más lo he necesitado. Eres sinónimo de eficiencia total, siempre tuve todo el material necesario para llevar a cabo mis experimentos, incluso cuando el tiempo apremiaba y contra todo pronóstico. Eres una mujer impresionante lo único que te falta es clonarte, sé que ya lo estás poniendo a punto, así que por mi ¡adelante!!

Lorena, gracias por tus consejos y por la experiencia que aportas a esta familia. Me enseñas constantemente cosas nuevas, también me has hecho cuestionarme unas cuantas, tú al igual que el resto de esta familia me has dado tu apoyo incondicional, eres fan # 1 de mis libretas, se quedarán en las mejores manos. **Pablo**, no tengo palabras para agradecer todo lo que has hecho por mí. Has sido el mejor de los compañeros que podía tener y un amigo en todo el sentido de la palabra. Gracias por estar siempre allí cuando he necesitado de un amigo dentro y fuera del laboratorio, y para echarle la culpa a los virus “malparíos” cuando alguien se pone malo (jajaja). Tienes un corazón y una nobleza muchísimo más grandes que tú. Eres listo, trabajador y un amor de persona, te esperan grandes cosas. Mientras que van llegando, te espero en Colombia 😊.

Dani, muchas gracias por tu disposición para ayudar siempre y porque me has hecho agudizar el oído. Aún me cuesta pero ya puedo entenderte cuando hablas en frecuencia “daniniana”. ¡Bieeen!! **Pedro**, el último en incorporarse a esta gran familia, gracias por las charlas que ya me vienen bien para hacer una pausa del trabajo y distraerme un poco. Bienvenido a la familia MARS y mucha suerte con la tesis. Al resto de mis “herman@s” que han pasado por el lab: **William, Carmen, Ferrán, Carla, Lirain, Olatz**, gracias a todos por sus aportes, no solo en el ámbito científico sino también en el personal. Han hecho que el equipo de trabajo sea único. **Clara**, te tengo un cariño especial, ya te lo ganaste por ser como eres en todo, sinceramente la única parte del TFM que no me gustó es que te marchas, te echaré de menos 😊. Eres

única, lista, trabajadora, organizada, humilde, sencilla, lo tienes todo para triunfar en la vida. Y estoy segura que así será.

Quiero agradecer a toda la gente de fase I y fase II del departamento, jefes y predocs, por su amabilidad y por la ayuda que me han prestado para sacar adelante este trabajo. Siempre contamos con ustedes para salir de apuros en medio de algún experimento (ya hasta la gente del 7 se sabe mi cara de pedir cosas, ¿verdad **Maite** y **Elena**?), para aprender millones de cosas y hacer una que otra cerveza como con **Elena**, **Ayalke** y todo el que se quisiera unir. A los que se han ido del departamento, especialmente a **Lily**, **Marcelle**, **Tania**, **Eloy** y **Ceci**, he tenido la suerte de compartir muchas cosas bonitas con ustedes, muchas gracias por el ánimo que me han dado para terminar esta tesis, nunca olvidaré aquellas comidas-tertulias en las mesitas del jardín de Farmacia. **Yesi**, mil y mil gracias por tu cariño, por tu comprensión, por escucharme, por tus consejos y por estar tan pendiente de mí en esta última etapa tan difícil para mí. Te mereces todo lo bueno que yo pueda dar, eres como una hermana para mí. Me muero de ganas por ir a verte a Panamá.

Muchas gracias a todos los miembros de la secretaría del departamento: **Macu**, **Mónica**, **Manolo**, **Susana**, **Rosario** y **Bea**. Da gusto entrar a secretaría a “molestarlos” y que siempre nos regalen una sonrisa, además de estar siempre dispuestos a ayudar. Gracias por ser tan ágiles con los trámites y todo aquello que les pedimos, por todas las actividades que organizan y sobre todo por hacer que nos disfracemos cada año por un buñuelo 😊.

Gracias a mis compis de Master por tantos momentos especiales: **Lily Lalaleo**, **Diego**, **Jonás**, **Gladys**, **Silvia**, **Alberto** y **Nancy**. A mis ex compañeros de piso, especialmente a **Jahir**, **José** y **Diego** por su compañía y amistad. A tanta gente linda que he conocido en Barcelona: **Edilma** y **don Mike**, **Laia**, **Teresita**, **doña Blanca** y su familia, que tanto apoyo nos están dando a mi madre, a mi hermano y a mí, **Laura** (que es como mi hermanita pequeña) por su buena vibra, por todo su cariño y por su colaboración en la realización de la portada de esta tesis. **David**, esa mano amiga que me sacó de aquel pozo profundo y oscuro en el que me encontraba hasta hace solo unos meses, sencillamente sin tu ayuda esta tesis no existiría. **Katia**, mi segunda mamá, que suerte tengo de tenerte en mi vida.

Un enorme GRACIAS a mi familia. A mi abuelita **Chela**, por tus cuidados y tus mimos, a mi hermano **Andrés** (Alias “**Chiqui**”), por ser mi compañía y mi apoyo casi desde que nací, habría sido muy aburrido ser hija única. A mis padres, **George** y **Belkis**, por

su maravilloso ejemplo, por su amor, su dedicación y por trabajar incansablemente para que no nos faltara nada y tuviéramos lo mejor. Sé que es difícil explicarle a la gente lo que hago cuando les preguntan, pero también sé que les hace mucha ilusión tener una hija científica. Todos mis logros son para ustedes.

Mami, gracias por patrocinarme siempre en esta locura de la ciencia, por darme todo tu apoyo cuando he querido seguir estudiando, por animarme tanto, por tus cuidados, por levantarme y protegerme cada vez me vengo abajo, por tanto amor que me das, sabes que sin ti no estaría donde estoy ahora. Me has enseñado que con disciplina, dedicación, esfuerzo, sacrificio y amor se puede llegar a conseguir todo lo que uno se proponga. Por ti haría un anexo de los agradecimientos, pero vale no me enrolló para que no me eches la bronca 😊... Eres una guerrera, el mejor ejemplo que podía tener, la mejor mamá del mundo mundial ♥

Finalmente, quiero agradecer a la hermosa ciudad de **Barcelona** por ser el fondo de toda esta historia llamada Master y Doctorado, todo un núcleo de aprendizajes y experiencias. Al **pueblo colombiano** que ha financiado mis estudios doctorales por medio de COLCIENCIAS. A los centros que han colaborado con nosotros en la realización de esta tesis: el **Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau**, el **Departamento de Microbiología Clínica** y la **Unidad de Fibrosis Quística del Hospital Vall d'Hebron**, y el **Departamento de Microbiología del Hospital Clínic de Barcelona**. Al servicio de crio-microscopía electrónica del CCiTUB, en especial a **Gemma** y a **Lidia**, por su amabilidad, por su simpatía, y por estar siempre dispuestas a responder a mis solicitudes con la mayor celeridad; y al **IdRA** por la ayuda concedida para la impresión de esta tesis doctoral.

Como decía un famoso cantautor argentino: ¡GRACIAS TOTALES!!!! ♥♥♥

RESUMEN

Los bacteriófagos son componentes abundantes y omnipresentes en muchos ambientes naturales, y el cuerpo humano no es la excepción. Del mismo modo que pasa en la naturaleza, los fagos en el cuerpo humano pueden desempeñar un papel importante en el control y la evolución de las poblaciones bacterianas, promoviendo la selección de ciertos tipos de bacterias e influyendo notablemente en la evolución de los genomas bacterianos mediante transferencia genética horizontal. Además, teniendo en cuenta su gran abundancia, podría preverse que las partículas fágicas incluso lleguen a afectar a las bacterias presentes en muestras clínicas humanas, interfiriendo de esta manera con el diagnóstico microbiológico de diversas patologías infecciosas.

El objetivo principal de la presente tesis doctoral fue evaluar la presencia de los bacteriófagos en biomas humanos. Específicamente, se evaluó la interferencia que pueden tener en pruebas de diagnóstico clínico, y su papel como reservorios y vehículos en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) en la microbiota del tracto digestivo y respiratorio. Este trabajo se presenta en cuatro capítulos: (1) Los bacteriófagos presentes en muestras clínicas pueden interferir con las herramientas de diagnóstico microbiológico; (2) Genes de resistencia a antibióticos en partículas fágicas aisladas de heces humanas e inducidas de aislamientos bacterianos clínicos; (3) El fagoma fecal de individuos sanos y las variaciones causadas por el tratamiento con ciprofloxacina; (4) Genes de resistencia a antibióticos en partículas fágicas aisladas de esputos de pacientes con fibrosis quística.

Los resultados derivados de esta tesis sugieren que la presencia de fagos en muestras humanas puede influir y sesgar los resultados de pruebas diagnósticas microbiológicas y moleculares. Además, se destaca el papel de las partículas fágicas como vehículos para la movilización y diseminación de resistencias a antibióticos, tanto en el microbioma intestinal de individuos sanos, como en el microbioma respiratorio individuos sanos y de pacientes con fibrosis quística. Las partículas fágicas pueden, por tanto, contribuir a la generación de bacterias multirresistentes, consideradas como un problema de salud mundial de primera magnitud.

ABSTRACT

Bacteriophages are abundant and ubiquitous components in many natural environments and the human body is not an exception. As in natural environments, phages in the human body can play an important role in the potential control and evolution of the bacterial populations, by promoting the selection of certain types of bacteria and by significantly influencing the evolution of bacterial genomes through horizontal gene transfer. Furthermore, considering their great abundance, it could be envisaged that phage particles can even affect the bacteria present in human clinical samples, interfering with the microbiological diagnosis of several infectious diseases.

The main objective of this PhD thesis was to evaluate the presence of bacteriophages in human biomes. Specifically, it was evaluated the interference of phages in clinical diagnostic tests, and their role as reservoirs and vehicles in the dissemination of antibiotic resistance genes (ARGs). This thesis is presented in four chapters: (1) Bacteriophages present in clinical samples can interfere with microbiological diagnostic tools; (2) Antibiotic resistance genes in phage particles isolated from human feces and induced from clinical bacterial isolates; (3) Fecal phageome of healthy individuals and variations caused by ciprofloxacin treatment; (4) Antibiotic resistance genes in phage particles isolated from sputum of cystic fibrosis patients.

The results derived from this research suggest that the presence of phages in human samples can influence and bias the results of microbiological and molecular diagnostic tests. In addition, the role of phage particles as vehicles for the mobilization and dissemination of antibiotic resistance is highlighted, both in the intestinal microbiome of healthy individuals, and in the respiratory microbiome of healthy individuals and of cystic fibrosis patients. Therefore, phage particles can contribute to the generation of multiresistant bacteria, which are considered as a global health problem of the first magnitude.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARGs	Genes de resistencia a antibióticos, del inglés <i>Antibiotic Resistance Genes</i>
ARN	Ácido ribonucleico
CsCl	Cloruro de cesio
C_t	Ciclo umbral, del inglés <i>Threshold cycle</i>
DO	Densidad óptica
<i>E. coli</i> EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ESBLs	β-lactamasas de amplio espectro, del inglés <i>Extended-spectrum β-lactamases</i>
FQ	Fibrosis quística
GC	Copias genómicas, del inglés <i>Gene copies</i>
GIs	Islas genómicas, del inglés <i>Genomic Islands</i>
GTAs	Agentes de transferencia génica, del inglés <i>Gene Transfer Agents</i>
HGT	Transferencia genética horizontal, del inglés <i>Horizontal Gene Transfer</i>
ICE	Elemento de integración conjugativa, del inglés <i>Integrative Conjugative Element</i>
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LOD	Límite de detección, del inglés <i>Limit of detection</i>
LOQ	Límite de cuantificación, del inglés <i>Limit of quantification</i>
Lp	Cebador 3' – 5' (Lower primer)
Mb (o Mpb)	Megabases
MGEs	Elementos genéticos móviles, del inglés <i>Mobile Genetic Elements</i>
mitC	Mitomicina C
MRSA	<i>S. aureus</i> resistente a meticilina, del inglés <i>Methicillin-resistant S. aureus</i>
NGS	Secuenciación de última generación, del inglés <i>Next-Generation Sequencing</i>
O/N	Overnight
°C	Grados Celsius
OMS	Organización Mundial de la Salud
P	Variable de significancia estadística
PBS	Tampón fosfato salino, del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	PCR cuantitativa
rpm	Revoluciones por minuto
SCC<i>mec</i>	Cassette cromosómico estafilocócico <i>mec</i> , del inglés <i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i>
spp	Especie
TEM	Microscopía electrónica de transmisión, del inglés <i>Transmission Electron Microscopy</i>
UFP	Unidades formadoras de calva
Up	Cebador 5' – 3' (Upper primer)
UV	Ultravioleta
VGT	Transferencia genética vertical, del inglés <i>Vertical Gene Transfer</i>
VLPs	Partículas similares a virus, del inglés <i>Virus-like particles</i>

CONTENIDO DE LA TESIS

AGRADECIMIENTOS.....	i
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
ABREVIATURAS.....	ix
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1-42
1.1. Bacteriófagos.....	3
1.1.1. Ciclos replicativos de los bacteriófagos	5
1.1.2. Inductores del ciclo lítico en bacteriófagos atemperados	9
1.1.3. Abundancia y ubiquidad de los bacteriófagos.....	11
1.2. Bacteriófagos en el cuerpo humano	13
1.2.1. Bacteriófagos como parte de la microbiota humana y animal	13
1.2.1.1. Metagenómica aplicada al estudio de viromas	15
1.2.2. Bacteriófagos como reguladores de poblaciones	18
1.3. Transferencia genética horizontal (HGT)	20
1.3.1. Elementos genéticos móviles.....	20
1.3.2. Mecanismos de HGT.....	23
1.3.3. Bacteriófagos como MGEs.....	27
1.4. Antibióticos	30
1.4.1. Definición y clasificación de los antibióticos.....	30
1.4.2. Resistencia a antibióticos.....	33
1.4.2.1. Mecanismos de resistencia a antibióticos.....	34
1.4.2.2. Genes de resistencia a antibióticos β -lactámicos	36
1.4.2.3. Genes de resistencia a quinolonas	40
1.4.2.4. Genes de resistencia a sulfonamidas	41
1.4.2.5. Genes de resistencia a aminoglucósidos.....	41
1.4.3. Fagos, biomas humanos y la transferencia de ARGs.....	42
2. OBJETIVOS.....	43-46
3. PUBLICACIONES.....	47-52
3.1. Listado de publicaciones	49
3.2. Informe de participación de la doctoranda en los artículos presentados.....	50

3.3. Informe sobre el factor de impacto de los artículos publicados	52
4. RESULTADOS.....	53-150
4.1. Capítulo 1: Los bacteriófagos presentes en muestras clínicas pueden interferir con las herramientas de diagnóstico microbiológico	55-70
Resumen del artículo 1	57
Artículo 1: <i>Bacteriophages in clinical samples can interfere with microbiological diagnostic tools</i>	63
4.2. Capítulo 2: Genes de resistencia a antibióticos en partículas fágicas aisladas de heces humanas e inducidas de aislamientos bacterianos clínicos.....	71-88
Resumen del artículo 2	73
Artículo 2: <i>Antibiotic resistance genes in phage particles isolated from human feces and induced from clinical bacterial isolates</i>	79
4.3. Capítulo 3: El fagoma fecal de individuos sanos y las variaciones causadas por el tratamiento con ciprofloxacina.....	89-132
Resumen del artículo 3	91
Artículo 3: <i>Fecal phageome of healthy individuals and variations caused by ciprofloxacin treatment</i>	97
4.4. Capítulo 4: Genes de resistencia a antibióticos en partículas fágicas aisladas de esputos de pacientes con fibrosis quística.....	133-150
Resumen del artículo 4	135
Artículo 4: <i>Detection of bacteriophages particles containing antibiotic resistance genes in the sputum of cystic fibrosis patients</i>	141
5. DISCUSIÓN GENERAL.....	151-172
6. CONCLUSIONES	173-178
7. BIBLIOGRAFÍA	179-206
8. ANEXOS	207-245
8.1. Anexo 1. Otras publicaciones.....	209
8.2. Anexo 2. Medios de cultivo, tampones y soluciones	217
8.3. Anexo 3. Protocolos usados en este estudio	223
8.4. Anexo 4. Reacciones de PCR y qPCR	233
8.5. Anexo 5. Condiciones de PCR y qPCR	241

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Bacteriófagos

Los bacteriófagos, o fagos para abreviar, son virus que infectan exclusivamente bacterias (Adams, 1959). Como parásitos intracelulares obligados, usan la maquinaria celular de la bacteria huésped para replicarse (Adams, 1959; Hyman and Abedon, 2009). Los fagos fueron descubiertos de manera independiente por Frederick W. Twort en 1915 y Félix d'Hérelle en 1917 (D'Hérelle, 1917; Twort, 1915). D'Hérelle acuñó el término "bacteriófago" por primera vez cuando describía los fenómenos que observaba (D'Hérelle, 1917). Dicho término proviene de "bacteria" y "*phagētón*", que en griego significa comer o devorar (Sulakvelidze et al., 2001).

Los bacteriófagos son ubicuos y a su vez, las entidades más abundantes del planeta con una estimación global de 10^{31} fagos (Hyman and Abedon, 2009; Sulakvelidze et al., 2001; Suttle, 2005). Cada partícula fágica (virión) consta esencialmente de un ácido nucleico, ADN o ARN monocatenario o bicatenario, envuelto en una cápside proteica que protege este material genético de las agresiones del medio externo y contribuye a su transferencia entre las células huésped (Gogarten et al., 2009; Prescott et al., 2002).

Sin embargo, los fagos tienen una gran variedad estructural, de modo que se pueden encontrar desde fagos simples hasta fagos de simetría compleja que incluyen estructuras anexas como colas, contráctiles o no contráctiles, fibras o espículas (Kutter and Sulakvelidze, 2005; Prescott et al., 2002). Asimismo, pueden adoptar diversas formas y tamaños que, por lo general, oscilan entre 20 y 200 nm aproximadamente. Además, son extremadamente variados en contenido y composición del ADN, estructura del genoma, proteínas, propiedades biológicas y antigénicas (Ackermann, 2009).

Debido a su gran diversidad, los fagos se han clasificado en función de múltiples propiedades como presencia o ausencia de envoltura, número de capsómeros y rango de huéspedes. Pero sin lugar a dudas, la clasificación más importante se basa en la morfología del fago y las características de su ácido nucleico (Figura 1) (Ackermann, 2009; Prescott et al., 2002). Cerca del 96% de los fagos descritos hasta ahora pertenecen al orden *Caudovirales*, que se caracterizan por poseer cola y ADN bicatenario (dsADN), mientras que los virus "cúbicos" (llamados así por su simetría cúbica y forma icosaédrica), filamentosos o pleomórficos representan menos del 4% (Ackermann, 2009).

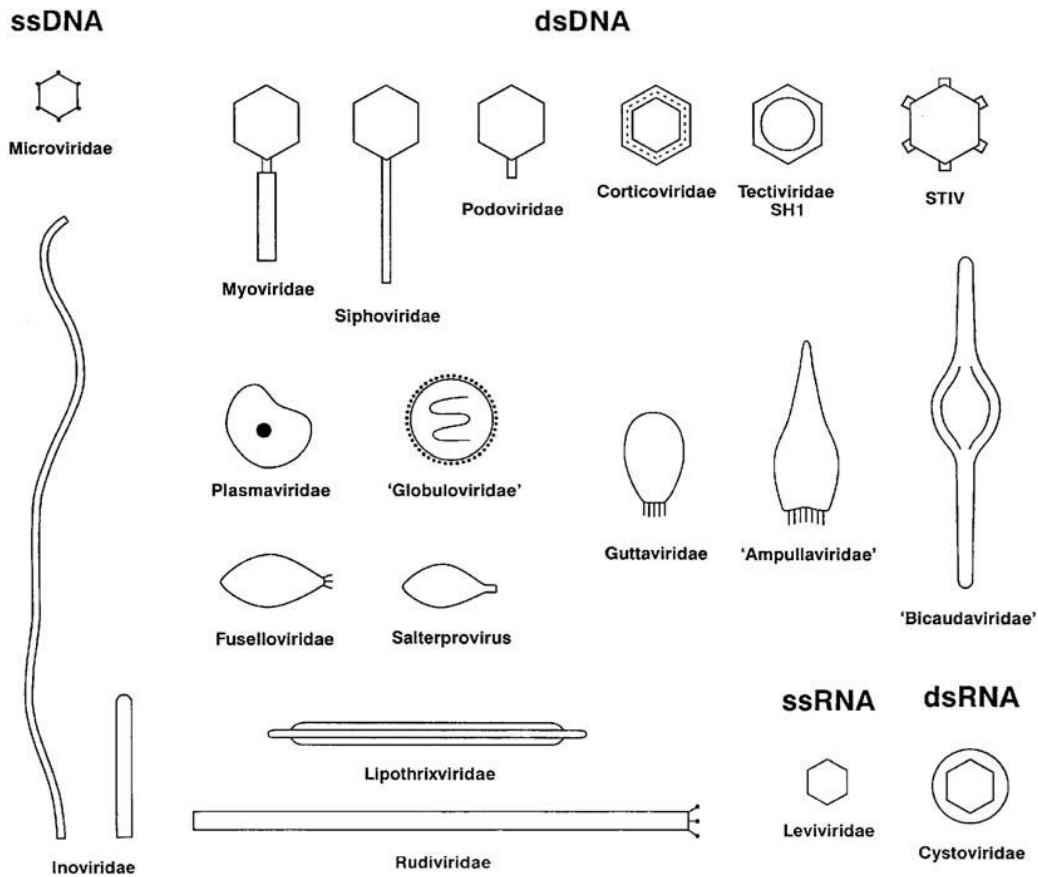


Figura 1. Clasificación de los bacteriófagos según su morfología y las características de su ácido nucleico (Ackermann, 2009).

Un tipo de fago determinado solo puede infectar un espectro limitado de bacterias, el cual se denomina rango de huésped. Esta especificidad está relacionada con la presencia de receptores bacterianos que interactúan con el sistema de reconocimiento de la partícula vírica. Estos receptores pueden ser lipopolisacáridos, proteínas de la pared celular, ácidos teicoicos, flagelos o *pili* (Campbell and Reece, 2011; Prescott et al., 2002). El huésped diana para cada fago es un grupo específico de bacterias, a menudo un subconjunto de una especie. Sin embargo, un fago puede infectar varias especies si éstas están relacionadas (Kutter and Sulakvelidze, 2005).

Teniendo en cuenta lo anterior, las cepas fágicas capaces de atacar una sola especie bacteriana se conocen como "monovalentes", mientras que los fagos capaces de infectar dos o más especies bacterianas son conocidos como "polivalentes". Existen varios estudios que evidencian que los bacteriófagos polivalentes no solo cruzan los límites entre diferentes especies bacterianas de un mismo género, como el caso del género *Enterococcus* (Mazaheri et al., 2011), sino también entre diferentes géneros de una misma familia como, por ejemplo, en la familia *Enterobacteriaceae* (Evans et al.,

2010; Souza et al., 1972), entre géneros de diferentes familias, como los fagos que infectan *Pseudomonas* y a su vez, *Escherichia coli* (Yu et al., 2016), entre diferentes taxones como sucede entre *Gammaproteobacteria* y *Betaproteobacteria* (Jensen et al., 1998) e incluso entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Khan et al., 2002), aunque la validez de estos últimos resultados requieren cierta confirmación.

1.1.1. Ciclos replicativos de los bacteriófagos

Tras la infección, los fagos pueden seguir el ciclo lítico o el ciclo lisogénico que conducen a diferentes resultados del proceso infeccioso (Figura 2). En función de estos ciclos de replicación, los bacteriófagos se clasifican como **virulentos**, cuando solo pueden multiplicarse por medio de la vía lítica, o **atemperados**, los cuales una vez han infectado la célula pueden seguir la vía lítica o lisogénica. El fago virulento más estudiado es el fago T4 de *E. coli* y en cuanto a los fagos atemperados, el más representativo es el fago lambda (λ) (Adams, 1959; Kutter and Sulakvelidze, 2005; Prescott et al., 2002).

El **ciclo lítico** completo, desde el primer contacto del fago con la superficie celular hasta la lisis de la célula, presenta duración variable según la cepa huésped, las condiciones ambientales y el estado metabólico de ésta. En *E. coli* dura entre 20 y 30 minutos a 37°C, produciendo unas 100 nuevas partículas fágicas (Campbell, 2003; Campbell and Reece, 2011). El ciclo lítico se desarrolla en una serie de pasos estrictamente programados. A continuación, se describe el ciclo lítico típico del fago T4:

1. **Adsorción:** el fago usa estructuras de su cápside, como fibras, espículas de la cola o estructuras análogas para unirse a receptores específicos de la superficie de la célula diana, como los que se han descrito anteriormente (Kutter and Sulakvelidze, 2005). Esta unión se debe probablemente a interacciones electrostáticas y está influenciada por el pH, la presencia de iones tales como Mg^{2+} y Ca^{2+} y el estado fisiológico del huésped, que puede cambiar sustancialmente la concentración de moléculas particulares de la superficie celular (Kutter and Sulakvelidze, 2005; Prescott et al., 2002).
2. **Penetración:** una vez el bacteriófago se ha unido irreversiblemente su huésped, pone en marcha un mecanismo enzimático para penetrar la capa de peptidoglicano y posteriormente, la membrana interna para liberar su ADN directamente en el interior de la célula (Kutter and Sulakvelidze, 2005). En el caso de los bacteriófagos T4, de cola contráctil, después de la adsorción, se

producen cambios conformacionales en la placa basal y en la vaina de la cola. La vaina se reorganiza de tal forma que se contrae, se activa el mecanismo enzimático que perfora la pared bacteriana y el tubo central actúa como un canal que facilita el paso del ADN desde la cápside hasta el interior de la célula (Prescott et al., 2002).

Posteriormente en el citoplasma, el ADN de algunos fagos se circulariza rápidamente a través de los extremos cohesivos o redundancia terminales, usando las ligasas del huésped, mientras que otros fagos protegen los extremos lineales de su ADN modificando nucleótidos. Todo esto con el fin de evadir la acción de exonucleasas y enzimas de restricción del huésped que pueden degradar el ADN del fago (Kutter and Sulakvelidze, 2005).

3. Síntesis de los ácidos nucleicos y las proteínas virales: poco después de la inyección del ADN del fago, la ARN polimerasa del huésped reconoce promotores fágicos fuertes dando lugar a la transcripción de *genes tempranos inmediatos*. Los productos de estos genes tienen funciones como la protección del genoma del fago, inactivando las proteasas del huésped y bloqueando las enzimas de restricción, y la reestructuración de la célula huésped de acuerdo con las necesidades del fago, que va desde la inhibición de las biosíntesis macromoleculares del huésped o la destrucción de algunas proteínas hasta la degradación total del ADN de la célula. Posteriormente, se inicia la transcripción de un conjunto de *genes intermedios* que se encargan de la síntesis del nuevo ADN fágico, seguidos de un grupo de *genes tardíos* que codifican los componentes estructurales del fago (Kutter and Sulakvelidze, 2005).

Durante la síntesis, el ADN fágico sufre una serie de modificaciones orientadas a evitar la degradación por parte de endonucleasas bacterianas. Por ejemplo, el fago T4 sintetizan un análogo a la cisteína que adicionalmente se glicosila al final de la síntesis, mientras que el fago lambda añade grupos metilo a los grupos amino de la adenina y la citosina (Prescott et al., 2002).

4. Ensamblaje de los viriones: el ARNm tardío, que se produce tras la replicación del ADN, dirige la síntesis de proteínas estructurales del fago, proteínas que ayudan al ensamblaje de los viriones y proteínas que participan en la lisis celular y la liberación de fagos. Todas las proteínas necesarias para el ensamblaje de fagos se sintetizan de forma simultánea (Prescott et al., 2002). El ADN es empaquetado dentro una envoltura proteica icosaédrica

preensamblada, llamada *procápside*. Esta procápside se ensambla gracias a las denominadas proteínas de andamio, que se degradan una vez ha concluido la construcción. Antes o durante el empaquetamiento, la cabeza se expande y se vuelve más estable, con un mayor volumen interno para el ADN. En uno de los vértices de la procápside, se localiza una proteína portal especial que sirve como punto de partida para el ensamblaje de la cápside, sitio de acoplamiento para las enzimas de empaquetamiento de ADN, conducto para el paso de ADN y, para los fagos con cola como el T4, el sitio de unión para la cola del fago, que se ensambla por separado (Kutter and Sulakvelidze, 2005).

5. **Liberación de los viriones**: muchos fagos lisan sus células huésped al final de la fase intracelular (Prescott et al., 2002). Los fagos con cola, como el T4, emplean una lisina, que es capaz de romper uno de los enlaces clave en la matriz de peptidoglicano, y una holina, que forma poros en la membrana interna en el momento preciso para permitir que la lisina alcance la capa de peptidoglicano y así finalmente, precipitar la lisis. Los fagos que carecen de cola codifican una variedad de proteínas precipitantes de la lisis que alteran las enzimas de procesamiento del peptidoglicano del huésped (Kutter and Sulakvelidze, 2005).

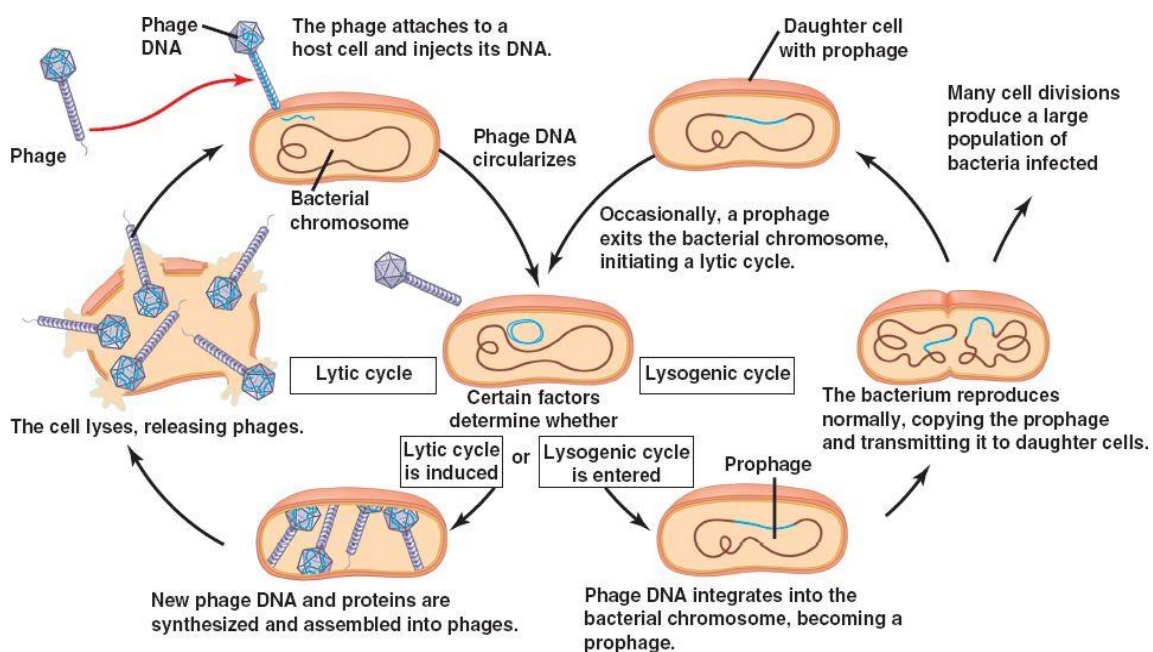


Figura 2. Ciclo lítico y lisogénico del fago λ (Campbell and Reece, 2011).

En contraste con el ciclo lítico, los fagos atemperados como el fago λ pueden seguir el **ciclo lisogénico**. En éste, tras la adsorción y la penetración, el ADN del fago se

circulariza gracias a sus extremos cohesivos y se inicia la transcripción por acción de la ARN polimerasa del huésped. Los primeros genes que se transcriben codifican proteínas reguladoras que controlan el ciclo lítico y posteriormente, se sintetiza una proteína represora (producto del gen *cI*) que inhibe la transcripción de la mayoría de los otros genes del fago (Kutter and Sulakvelidze, 2005; Prescott et al., 2002).

Una vez este represor bloquea la transcripción, el ADN del fago se integra en el genoma de la bacteria de la forma propuesta inicialmente por Allan Campbell (Campbell, 1963). Esta integración o inserción es posible gracias a la acción de una integrasa específica sintetizada por el fago que incorpora el ADN viral por recombinación genética a una región del cromosoma de la célula huésped, denominada sitio *att* ("attachment"). En el fago λ , *att* está localizado entre el operón galactosa, *gal*, y el operón biotina, *bio*, en el cromosoma de *E. coli* (Kutter and Sulakvelidze, 2005; Prescott et al., 2002). Cada tipo de fago localiza distintos lugares de integración específicos en el cromosoma bacteriano (Recktenwald and Schmidt, 2002; Serra-Moreno et al., 2007). Por otro lado, fagos como P1, en lugar de integrarse en el cromosoma de la bacteria, se circularizan y actúan como un replicón independiente que se replica al mismo tiempo que el cromosoma del huésped, esto se conoce como **estado portador de fago** (Weinbauer, 2004).

Al integrarse de este modo en el cromosoma bacteriano, el ADN viral se conoce como **profago**. De esta manera, el genoma del profago permanece en un estado quiescente. Cada vez que la célula se prepara para dividirse, replica el ADN del fago junto con el propio y traslada las copias a las células hijas. Una única célula infectada puede dar origen rápidamente a una gran población de bacterias portadoras del profago (Campbell and Reece, 2011). Sin embargo, cada una de estas células infectadas puede producir fagos y lisarse en ciertas circunstancias. Esta relación entre el fago y su huésped se denomina **lisogenia**. Asimismo, se denominan **lisógenas** o **lisogénicas** a las bacterias que portan profagos (Prescott et al., 2002).

Además de la derivación clásica de un bacteriófago a la propagación lítica o lisogénica, se ha propuesto la pseudolisogenia como una ruta de desarrollo alternativa (Clokic et al., 2011; Los et al., 2003; Łoś and Węgrzyn, 2012; Schuch and Fischetti, 2009). La **pseudolisogenia** es una etapa de desarrollo postergado de un bacteriófago en una célula huésped, en la que el genoma del fago no se multiplica (como en la vía lítica), ni se replica de forma sincronizada y estable durante el ciclo celular (como en la vía lisogénica), pero se mantiene dentro del huésped lo que permite el posterior reinicio del desarrollo del virus. Este fenómeno generalmente es causado por

condiciones de crecimiento desfavorables para la célula huésped (como la privación de nutrientes) y se termina con el inicio de la lisogenización verdadera o la proliferación lítica cuando las condiciones de crecimiento mejoran (Cenens et al., 2013; Łoś and Węgrzyn, 2012).

La **inducción** es el proceso por el que el profago sale de su estado de reposo y entra en el ciclo lítico produciendo nuevos fagos que lisan la bacteria (Campbell and Reece, 2011; Prescott et al., 2002). Este proceso es desencadenado por un descenso en los niveles de la proteína represora y suele producirse en respuesta a factores ambientales tales como la radiación UV o la presencia de mutágenos químicos. Al incorporar su genoma en la bacteria huésped, el fago atemperado puede producir un cambio en el fenotipo de la célula, que puede estar relacionado con cambios fisiológicos o patogénicos de la bacteria (Prescott et al., 2002). Este cambio recibe el nombre de **conversión lisogénica** (Kutter and Sulakvelidze, 2005; Prescott et al., 2002).

1.1.2. Inductores del ciclo lítico en bacteriófagos atemperados

Los profagos pueden activar nuevamente el ciclo lítico de forma espontánea o inducida por factores ambientales que causan estrés en la célula huésped (Adams, 1959; Cenens et al., 2013; Kutter and Sulakvelidze, 2005). Como consecuencia de este estrés, la bacteria activa una respuesta de daño del ADN (SOS) que conduce a la inactivación del represor del profago por escisión, lo que permite que los genes del ciclo lítico se activen nuevamente (Cenens et al., 2013; Hyman and Abedon, 2009; Prescott et al., 2002). Los factores ambientales que promueven la inducción se conocen como **inductores** o **agentes inductores**, y pueden ser naturales o introducidos en el medio ambiente por la actividad humana (Adams, 1959). Algunos ejemplos de inductores son:

- Altas presiones hidrostáticas: agentes físicos como las altas presiones inducen una respuesta SOS en *E. coli*. Aunque *E. coli* no está naturalmente sometida a ambientes de alta presión, estos tratamientos se usan con los alimentos con el fin de generar estrés bacteriano e inactivar posibles patógenos transmitidos por los alimentos como *E. coli* O157:H7, *Salmonella* o *Listeria monocytogenes* (Aertsen and Michiels, 2005; Simmons et al., 2008; Yamamoto et al., 2003).
- Agentes mutagénicos: cualquier agente que cause daños o alteraciones en el ADN, como las radiaciones o los rayos UV, puede inducir el ciclo lítico en diversos lisógenos (Adams, 1959; Yamamoto et al., 2003).

- Antibióticos: algunos antibióticos empleados en terapia humana o en la cría de animales como promotores del crecimiento, tienen la capacidad de inducir profagos. Aquellos antibióticos que causan daños en el ADN o que alteran la integridad de la pared celular, como los β -lactámicos, activan la respuesta SOS de la bacteria (Maiques et al., 2006; Miller et al., 2004). Las quinolonas, como la ciprofloxacina o la norfloxacina, han sido ampliamente usadas para la inducción de fagos (Colomer-Lluch et al., 2014; Goerke et al., 2006; Looft et al., 2012; Meessen-Pinard et al., 2012; Rolain et al., 2009). Se ha demostrado la inducción de profagos portadores de resistencia a quinolonas, a partir de poblaciones intestinales en presencia de quinolonas (Modi et al., 2013). También se ha observado la inducción de fagos de *Pseudomonas aeruginosa* en respuesta al tratamiento con ciprofloxacina y norfloxacina en esputo de pacientes con fibrosis quística (Fothergill et al., 2011).

Existen reportes de que las quinolonas y otros antibióticos como trimetoprim y furazolidona inducen la expresión del gen *stx* en *E. coli* EHEC O157: H7, que codifica para la toxina Shiga y que se encuentra en profagos atemperados (Kimmitt et al., 2000).

- Mitomicina C: este compuesto causa entrecruzamiento de cadenas complementarias de ADN e inhibe la síntesis del mismo. Se empleó tradicionalmente como agente antitumoral. En la práctica de laboratorio, se usa en concentraciones subinhibitorias para la inducción de fagos atemperados (Fuchs et al., 1999; Livny and Friedman, 2004; Muniesa et al., 2004a).
- Agentes quelantes: el EDTA y el citrato de sodio son los más representativos. Se ha reportado que el EDTA aumenta el número de copias del gen de la toxina Shiga (*stx*) en los fagos atemperados Stx cuando se trata un cultivo de una cepa lisogénica para este fago con EDTA 20 mM, incluso en ausencia de RecA (Imamovic and Muniesa, 2012). También se ha descrito como inductor de partículas fágicas portadoras de genes de resistencia a antibióticos (Colomer-Lluch et al., 2014).
- Agentes oxidantes: las especies de oxígeno reactivo (ROS), como el peróxido de hidrógeno, son fuertes agentes oxidantes que pueden descomponerse y generar radicales libres, causando daño al ADN bacteriano (Kutter and Sulakvelidze, 2005) y con ello, la inducción de fagos atemperados (Loés et al., 2009). Un ejemplo claro de esto es la activación del ciclo lítico en bacterias

lisogénicas que se ven sometidas a estrés oxidativo cuando son fagocitadas por neutrófilos (Wagner and Waldor, 2002).

1.1.3. Abundancia y ubiquidad de los bacteriófagos

Tal como se ha mencionado anteriormente, los bacteriófagos son componentes abundantes y omnipresentes en muchos ambientes naturales. Dondequiera que vivan sus huéspedes bacterianos, ellos también están presentes. Se ha descrito la presencia de bacteriófagos en entornos tan variados como aguas residuales (Cantalupo et al., 2011), suelo (Weinbauer, 2004), plantas (Gill and Abedon, 2003), lagos (Sible et al., 2015), ríos (Wolf et al., 2003), sistemas marinos (Flores et al., 2013), entre otros; ambientes extremos como fuentes hidrotermales, desiertos y entornos polares (Le Romancer et al., 2006), hasta microbiomas humanos y animales (Breitbart et al., 2003, 2008; Minot et al., 2011). Aunque los números de fagos detectados en estos ambientes son bastante altos, suelen variar en función de la abundancia y actividad bacteriana (Muniesa et al., 2013b) (Tabla 1).

Origen	Concentración	Referencia
Ambientes de aguas profundas	$10^4 - 10^5$ VLP/ml	(Paul and Kellogg, 2000)
Ambientes costeros	$10^6 - 10^7$ VLP/ml	(Paul and Kellogg, 2000)
Lagos productivos o aguas de estuario	$10^8 - 10^9$ VLP	(Hennes and Suttle, 1995)
Sedimentos marinos y limnéticos	$>10^8 - 10^9$ VLP	(Danovaro et al., 2002)
Rizósfera o suelo	$10^7 - 10^8$ VLP/g	(Ashelford et al., 2003)
Contenido intestinal	$5 \times 10^7 - 10^{10}$ VLP/g	(Letarov and Kulikov, 2009)
Espuito de pacientes con infecciones broncopulmonares	$10^3 - 10^7$ PFU sobre <i>P. aeruginosa</i>	(Tejedor et al., 1982)
Comunidades microbianas de plantas	$>10^6$ PFU/g de tejido foliar de fagos que infectan <i>Erwinia</i>	(Ritchie and Klos, 1977)
Lodos activados	$>10^9$ VLP/ml	(Otawa et al., 2007)
Aguas residuales municipales sin procesar	10^8 VLP/ml	(Rosario et al., 2009)
Agua potable y de pozo	$10^5 - 10^6$ VLP/ml	(Rosario et al., 2009)

VLP: Virus-like particles; PFU: Plaque-forming unit.

Tabla 1. Ubicuidad y abundancia de los bacteriófagos (Muniesa et al., 2013b).

El desarrollo de técnicas moleculares como la secuenciación y el análisis metagenómico han revelado una enorme y creciente diversidad de bacteriófagos en

muchos entornos en los que hasta ahora no había sido posible aislarlos e identificarlos (Breitbart et al., 2004; Srinivasiah et al., 2008; Weinbauer, 2004). Este hecho apunta que los fagos son el reservorio de información de secuencias más grande no explorado en la biósfera, con una enorme variedad de nichos ambientales y estrategias de supervivencia (Weinbauer, 2004).

Otra importante característica de los fagos es su elevada persistencia a una gran variedad de factores de estrés ambiental, que les permite sobrevivir incluso a sus respectivos huéspedes bacterianos (Duran et al., 2002; IAWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology, 1991; Jofre, 2007; Muniesa et al., 1999). Su alto nivel de especificidad, la capacidad de supervivencia a largo plazo y la capacidad de replicarse rápidamente en huéspedes apropiados contribuyen a mantener un equilibrio dinámico entre la gran variedad de especies bacterianas en cualquier ecosistema natural. Cuando no hay huéspedes apropiados, muchos fagos pueden mantener su capacidad de infectar durante décadas, a menos que sean gravemente afectados por agentes externos (Kutter and Sulakvelidze, 2005).

Los bacteriófagos tienen un papel clave en el control potencial y la evolución de las poblaciones bacterianas (Rohwer, 2003). Al lisar las bacterias como consecuencia final del proceso infeccioso, y a su vez, promover la selección de ciertos tipos de bacterias que son resistentes a sus ataques, regulan la densidad y la diversidad de ciertas poblaciones bacterianas en un ambiente determinado (Scanlan and Buckling, 2011; Suttle and Chan, 1994; Winter et al., 2004). Además, influyen notablemente en la evolución de los genomas bacterianos mediante transferencia genética horizontal (HGT, por sus siglas en inglés, *Horizontal Gene Transfer*) por transducción (Fortier and Sekulovic, 2013).

1.2. Bacteriófagos en el cuerpo humano

La presencia de bacteriófagos en el cuerpo humano ha sido reportada desde hace décadas (D'Hérelle, 1917; Mankiewicz and Liivak, 1967). Sin embargo, debido al creciente interés en el rol que cumple la microbiota simbiótica en el bienestar del ser humano, se ha promovido el uso de herramientas metagenómicas que posicionan a los fagos como el grupo más numeroso y diverso del viroma humano (se entiende por viroma, la colección de genomas de todos los virus, eucariotas y procariontes, presentes en un ecosistema particular) (Breitbart et al., 2002; Łusiak-szelachowska et al., 2017; Navarro and Muniesa, 2017; Zárate et al., 2017). Por citar un ejemplo, por medio de un análisis de secuenciación al azar del ADN vírico, Breitbart y sus colaboradores identificaron 1200 genotipos virales en las heces humanas de un único adulto sano, donde se estima que el número de especies bacterianas no supera las 800 (Breitbart et al., 2003; Ley et al., 2006). Los resultados de muchos de estos estudios sugieren que los fagos podrían ser actores contribuyentes que están directamente relacionados con la salud humana (Manrique et al., 2016).

1.2.1. Bacteriófagos como parte de la microbiota humana y animal

La abundancia de los fagos en microbiomas humanos y animales, la cual es generalmente mayor que la de los virus eucariotas, está respaldada por muchos análisis metagenómicos que destacan su presencia. Esta abundancia ha sido demostrada en estudios metagenómicos de la microbiota humana y animal del tracto respiratorio y gastrointestinal, cavidad oral, piel, vagina, orina y suero (Breitbart et al., 2003; Colomer-Lluch et al., 2011a; Minot et al., 2011; Oh et al., 2014; Santiago-Rodriguez et al., 2015b, 2015a; Virgin, 2014).

Tanto el organismo humano, como animal, están expuestos de forma frecuente y continua a un gran número de fagos. Como consecuencia de esto, se estima que la concentración de VLPs (del inglés *virus-like particles*) en heces humanas es de 10^8 - 10^9 VLPs por gramo (Kim et al., 2011). Aunque los fagos no pueden infectar células eucariotas, existen estudios que señalan que pueden interactuar físicamente con las superficies de las mucosas, atravesar las capas de células epiteliales, diseminarse por todo el organismo e influir en su sistema inmune (Abeles and Pride, 2014; Barr, 2017; Górski et al., 2006; Nguyen et al., 2017).

Por ejemplo, se han detectado partículas fágicas en la sangre y el suero de humanos sintomáticos y asintomáticos (Breitbart and Rohwer, 2005; Fancello et al., 2014; Gaidelyte et al., 2007; Moustafa et al., 2017; Parent and Wilson, 1971; Thannesberger

et al., 2017; Weber-Dabrowska et al., 1987). Por otro lado, se ha observado una migración irregular pero rápida y repetida de fagos al torrente sanguíneo como resultado de la dosificación de fagos a ratones a través de la alimentación por vía oral y el lavado gástrico (Keller and Engley, 1958; Międzybrodzki et al., 2017b).

Una vez los fagos llegan a sangre periférica, penetran en todos los órganos principales del cuerpo, incluyendo pulmón, hígado, riñón, bazo, tracto urinario e incluso el cerebro, lo que indica la posible capacidad de estos virus para cruzar la barrera hematoencefálica (Barrow et al., 1998; Dubos et al., 1943; Frenkel and Solomon, 2002; Geier et al., 1973; Keller and Engley, 1958; Międzybrodzki et al., 2017a). De esta manera, se hace viable detectar la presencia de fagos en zonas del cuerpo donde hasta ahora se creía que representaban ambientes estériles como el tracto urinario y específicamente, la vejiga (Malki et al., 2016; Miller-Ensminger et al., 2018; Santiago-Rodríguez et al., 2015a).

Adicionalmente en animales, se han aislado fagos con capacidad infectiva sobre *Bacteroides* a partir de suero, hecho que confirma su presencia en el torrente sanguíneo (Keller and Traub, 1974). Otro estudio hecho en ratonas preñadas ha demostrado la translocación de fagos desde la sangre hasta los tejidos fetales de ratón (Srivastava et al., 2004a).

La abundancia, la diversidad y la morfología de los bacteriófagos se han investigado gracias a su observación directa, mediante el microscopio electrónico (Muniesa and Jofre, 2014), pero en los últimos años, los investigadores se han centrado en la caracterización de la diversidad de estos virus utilizando herramientas metagenómicas (Abeles and Pride, 2014; Muniesa and Jofre, 2014; Reyes et al., 2012).

Con el fin de aislar únicamente la fracción del viroma de los microbiomas, se han diseñado métodos que permiten la discriminación de la fracción viral de las muestras, mientras descartan el ADN libre y bacteriano. De estos estudios se han derivado resultados sorprendentes como el hecho de que muchas partículas virales llevan en su interior secuencias identificadas como ADN bacteriano (Navarro and Muniesa, 2017). Se ha confirmado el contenido genético compartido cuando se han analizado las fracciones fágicas y bacterianas de la misma muestra (Breitbart et al., 2003; Colombo et al., 2016; Howe et al., 2016; Minot et al., 2011), incluyendo secuencias pertenecientes a los sistemas CRISPR-Cas (Dutilh et al., 2014).

1.2.1.1. Metagenómica aplicada al estudio de viromas

La metagenómica se define como el análisis genético directo de todos los genomas contenidos en una muestra, a menudo de tipo ambiental (Thomas et al., 2012). El término "metagenómica" se acuñó inicialmente en 1998 por Handelsman y colaboradores, en un estudio orientado a la caracterización de la composición microbiana del suelo (Handelsman et al., 1998). En la última década, el interés en la caracterización de la diversidad viral ha tenido un aumento vertiginoso catalizado por los avances en la secuenciación de última generación (NGS, del inglés *Next-Generation Sequencing*) (Reyes et al., 2012).

Nuestro grupo de investigación ha querido participar en esta carrera metagenómica y por eso, sentimos la necesidad de hacer un aporte al estudio de la fracción fágica del viroma intestinal, que se ha materializado en la presente tesis. Por esta razón, a pesar de que existe actualmente un amplio abanico de técnicas de secuenciación masiva y herramientas de procesamiento y análisis informático de los datos, en el presente apartado solo se mencionaran aquellas técnicas y aplicaciones bioinformáticas empleadas en el desarrollo de este estudio.

Los pasos básicos de un estudio de metagenómica comprenden el procesamiento de la muestra, la secuenciación masiva y el análisis bioinformático de los datos obtenidos, que incluyen el control de calidad, el ensamblaje y la anotación de las secuencias generadas (Thomas et al., 2012).

La secuenciación "Sanger" fue una de las primeras tecnologías de secuenciación que se desarrolló (Sanger et al., 1977). Debido a la facilidad de uso y fiabilidad, la secuenciación Sanger pronto se convirtió rápidamente en el *gold standard* de las tecnologías de secuenciación. Sin embargo, la NGS ha superado varias de las desventajas que presentaba el método de Sanger con el abaratamiento de los costes por secuenciación base, un incremento sustancial del rendimiento, una preparación más sencilla de las librerías y la eliminación del paso de clonación (Bragg and Tyson, 2014).

La plataforma Illumina es una de las tecnologías de NGS más aplicadas en estudios metagenómicos, al lado de la plataforma 454 de Roche (Bragg and Tyson, 2014; Thomas et al., 2012). Los protocolos de secuenciación Illumina inician con la preparación de las librerías de secuenciación, que incluyen la fragmentación aleatoria del ADN y la posterior adición de adaptadores (secuencias conocidas), que se unen a los extremos de los fragmentos generados (Lu et al., 2016). El sistema Nextera XT,

empleado en esta tesis, se basa en el uso de transposomas que fragmentan el ADN (1 ng) y añaden adaptadores en un único paso conocido como **tagmentación** (Illumina, 2018a).

Por medio de los adaptadores, los fragmentos de ADN se inmovilizan sobre una celda de flujo de cristal y son amplificados por PCR *bridge* para generar agrupaciones de fragmentos de ADN idénticos o *clusters*. Finalmente, estos *clusters* son secuenciados con nucleótidos terminadores reversibles marcados fluorescentemente en un proceso de secuenciación por síntesis (Bentley et al., 2008; Bragg and Tyson, 2014) (Figura 3). Con la tecnología illumina MiSeq se pueden generar alrededor de 8 Gbp (Gigabases) de secuencia filtrada a partir de 25 millones de *reads* con una longitud de 2 x 150 pb (pares de bases) (Illumina, 2018b).

Las secuencias generadas a partir del proceso de secuenciación (**reads**) son sometidas a un proceso de control de calidad, con el fin de eliminar las secuencias remanentes de los adaptadores, cribar secuencias de ADN contaminantes del huésped (humano o animal), filtrar los *reads* de baja cobertura (*coverage*), que pudieran ser errores de secuencia, y los *reads* de alta cobertura, que pueden ser secuencias repetitivas de una misma región (Bragg and Tyson, 2014; Reyes et al., 2012).

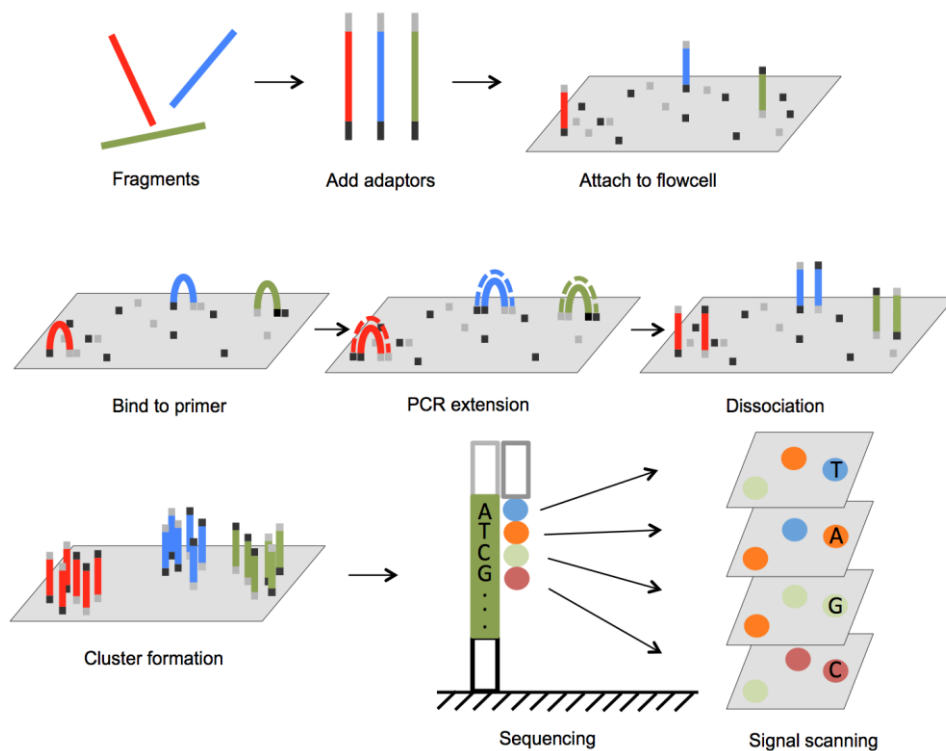


Figura 3. Esquema del proceso de secuenciación de la plataforma Illumina (Lu et al., 2016).

Este control de calidad reduce notablemente las posibles fuentes de error que pueden afectar los siguientes análisis bioinformáticos y en la plataforma Illumina se hace con la herramienta FastQC (Babraham Bioinformatics FastQC, 2018).

En el proceso básico de ensamblaje se identifican solapamientos entre los *reads*, que luego son fusionados para formar secuencias de mayor tamaño denominadas **contigs** (secuencia "contigua") utilizando diferentes tipos de algoritmos (Bragg and Tyson, 2014). Los ensamblajes guiados o basados en referencia son útiles cuando la cobertura de la secuencia es baja (debido a la baja abundancia celular o a la alta variabilidad intraespecífica) y especialmente cuando se dispone de un genoma de referencia de una especie estrechamente relacionada (por ejemplo, el mismo género) (Bragg and Tyson, 2014).

Caso contrario, el ensamblaje *de novo* permite ensamblar genomas a partir *reads* muy cortos, como aquellos generados por Illumina, sin necesidad de usar un genoma de referencia, lo que se traduce en un incremento de la capacidad para generar de secuencias más precisas, identificar de variantes estructurales y reordenamientos complejos y proporcionar información útil para el mapeo de genomas de nuevos organismos o el refinamiento de genomas de organismos conocidos (Bragg and Tyson, 2014; Illumina, 2018a). SPAdes es un ensamblador que se basa en gráficos de Bruijn de varios tamaños para guiar el ensamblaje de genomas pequeños, como genomas bacterianos y virales (Bankevich et al., 2012; Wan et al., 2015). Después del ensamblaje, los *contigs* generados pueden ser ordenados y agrupados para dar lugar a secuencias de mayor longitud conocidas como **scaffolds** (Bragg and Tyson, 2014).

La anotación de los datos de secuencia metagenómica tiene en general dos pasos. En primer lugar, se identifican las características de interés genotípico (predicción de características) y, en segundo lugar, se asignan análogos taxonómicos y funciones genéticas putativas (anotación funcional). En la predicción de características, se etiquetan secuencias como genes o elementos genómicos, de esta manera se clasifican regiones de los metagenomas como codificantes (**CDS**, del inglés *coding sequences*) o no codificantes (Thomas et al., 2012). En nuestro estudio, esta predicción se llevó a cabo con el software Prokka (Seemann, 2014).

Por último, la anotación funcional de los datos metagenómicos que se presentan en esta tesis incluyó una clasificación taxonómica de los *contigs* generados usando diversas herramientas que permitían comparar resultados. Éstas fueron Kraken (Wood and Salzberg, 2014), que se aplica a todo tipo de secuencias, PHASTER, diseñada para la identificación y anotación de secuencias de profagos dentro de genomas

bacterianos y plásmidos (Arndt et al., 2016), y VirSorter, que detecta señales virales en las secuencias y además, gracias a modelos probabilísticos y la gran cantidad de datos del viroma que posee, puede maximizar la detección de nuevos virus (Roux et al., 2015). La asignación de funciones genéticas putativas estuvo orientada a la identificación de genes de resistencia a antibióticos (ARGs, del inglés *Antibiotic Resistance Genes*) con el servidor web ResFinder (Zankari et al., 2012).

1.2.2. Bacteriófagos como reguladores de poblaciones

Existe un acuerdo general de que a través la transferencia horizontal de genes y la depredación, los bacteriófagos juegan un papel clave en la configuración del tamaño, la estructura y la función de las poblaciones bacterianas en los microbiomas (Muniesa and Jofre, 2014).

La evidencia experimental obtenida de los quimiostatos y las observaciones de fagos/hospedadores en sistemas abiertos ha demostrado que, para algunas especies bacterianas, las poblaciones de fagos y hospedadores oscilan con el tiempo, siguiendo una dinámica de "Reina Roja / matar al ganador (*kill the winner*)", que describe las variaciones presa-depredador (Jover et al., 2013; Lim et al., 2015; Rodríguez-Brito et al., 2010). Sin embargo, la dinámica de la relación fago-huésped puede cambiar de acuerdo con la homogeneidad y estructura del ambiente; así como en función de las condiciones que facilitan los encuentros entre fagos y células (De Paepe et al., 2014).

Los cambios o un reemplazo total del microbioma por un trasplante fecal en enfermedades sin un agente etiológico bien definido, como las enfermedades inflamatorias del intestino (enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa), pueden dar lugar a cierta mejora de la enfermedad (Loh and Blaut, 2012; Moayyedi et al., 2015). Al parecer el éxito de los trasplantes de microbiota fecal depende de variables como la estabilidad del microbioma del donante y el tiempo de evolución de la patología (Moayyedi et al., 2015; Norman et al., 2015). La comparación de los viromas intestinales de individuos que padecen la enfermedad de Crohn y familiares sanos reveló diferencias en la composición y la variabilidad (Pérez-Brocal et al., 2013; Wagner et al., 2013), sugiriendo que los fagos podrían participar en la disbiosis de la flora intestinal (Norman et al., 2015).

El aumento de la abundancia de fagos que se adhieren al moco intestinal puede reducir la colonización bacteriana de la mucosa, en mayor medida que los fagos no adherentes (Barr et al., 2015). Además, se ha observado que los fagos atemperados presentes en la mucosa pueden proteger al huésped bacteriano contra el mismo tipo

de fago o fagos relacionados, pero también este tipo de fagos pueden participar en la selección de la microbiota comensal (Barr et al., 2013). Por otro lado, existen evidencias que apoyan que la virobiota de los pacientes puede contribuir a la inflamación intestinal inducida por la liberación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, producto de las lisis bacterianas (Norman et al., 2015).

Aún no se ha establecido si los cambios en el fagoma (colección de fagos) de los biomas humanos son una causa o una consecuencia de la disbiosis en tales enfermedades (Navarro and Muniesa, 2017). Teniendo en cuenta que el fagoma podría influir en las poblaciones bacterianas, hay dos opciones plausibles: los cambios en las bacterias podrían causar variaciones en la distribución de los grupos de fagos; o los cambios en el fagoma podrían ser responsables de la disbacteriosis (Norman et al., 2015; Pérez-Brocal et al., 2015).

Los fagos pueden ocasionar variaciones en las bacterias que pueden ir en detrimento de los pacientes (Navarro and Muniesa, 2017). Por ejemplo, la presencia de fagos contribuye a la selección de características fenotípicas asociadas a virulencia, como la sobreproducción mucoide por parte de ciertos aislamientos de *Pseudomonas fluorescens*, que confiere protección contra la infección por fagos e incrementa su virulencia. Esto último contribuye a infecciones más persistentes, por ejemplo, en pacientes con fibrosis quística (Scanlan and Buckling, 2011).

Otros ejemplos de la regulación de poblaciones bacterianas en los microbiomas humanos mediada por fagos son aquellos en los que se convierte en herramientas claves en la competencia entre bacterias por la colonización de nichos. Tal es el caso de la competencia entre *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* (Selva et al., 2009), o entre cepas de *Enterococcus faecalis* (Duerkop et al., 2012).

1.3. Transferencia genética horizontal (HGT)

1.3.1. Elementos genéticos móviles

Los elementos genéticos móviles (MGEs, del inglés *Mobile Genetic Elements*) son segmentos de ADN que codifican enzimas y otras proteínas que intervienen en el movimiento del ADN dentro de los genomas (movilidad intracelular) o entre células bacterianas (movilidad intercelular) (Frost et al., 2005). Estos elementos actúan como vectores en la HGT, que constituye el principal mecanismo evolutivo de los procariontes (Darmon and Leach, 2014; Gogarten et al., 2009; Vos et al., 2015). El conjunto de MGEs dentro de una célula se denomina **mobiloma** (Siefert, 2009). Entre ellos se destacan los plásmidos, los transposones, los integrones, las islas genómicas, los elementos de integración conjugativa, los agentes de transferencia génica y los bacteriófagos, que se describieron anteriormente en detalle (Figura 4).

- **Plásmidos:** son moléculas de ADN extracromosómicas que cuentan con sus propios orígenes de replicación, son auto-replicativos, estables entre generaciones y por lo general, no contienen genes esenciales para las funciones celulares esenciales (Frost et al., 2005). Contribuyen de forma importante a la movilización de ARGs (Bennett, 2008).
- **Transposones:** son fragmentos de ADN que pueden moverse o integrarse en diferentes regiones del cromosoma o “saltar” entre replicones. Como los transposones pueden “saltar” a fagos o plásmidos, también pueden transferirse por medio de ellos a otras células. Los elementos transponibles pueden provocar mutaciones al incorporar genes o reorganizar el ADN provocando deleciones del material genético (Frost et al., 2005). Los transposones pueden ser simples o compuestos y a menudo transportan ARGs (Chancey et al., 2012; Quintiliani and Courvalin, 1996).
- **Integrones:** similares a los transposones, pueden albergar ARGs y la principal diferencia es que la enzima que permite su integración es una integrasa, en lugar de una transposasa. Pueden integrar o escindir sus casetes genéticos gracias a la acción de esta integrasa. Al igual que los transposones, no son MGE en sí mismos, pero cuando se encuentran dentro de un plásmido o un elemento de integración conjugativa (ICE, del inglés *Integrative Conjugative Element*), pueden dispersarse mediante conjugación (Cambray et al., 2010).

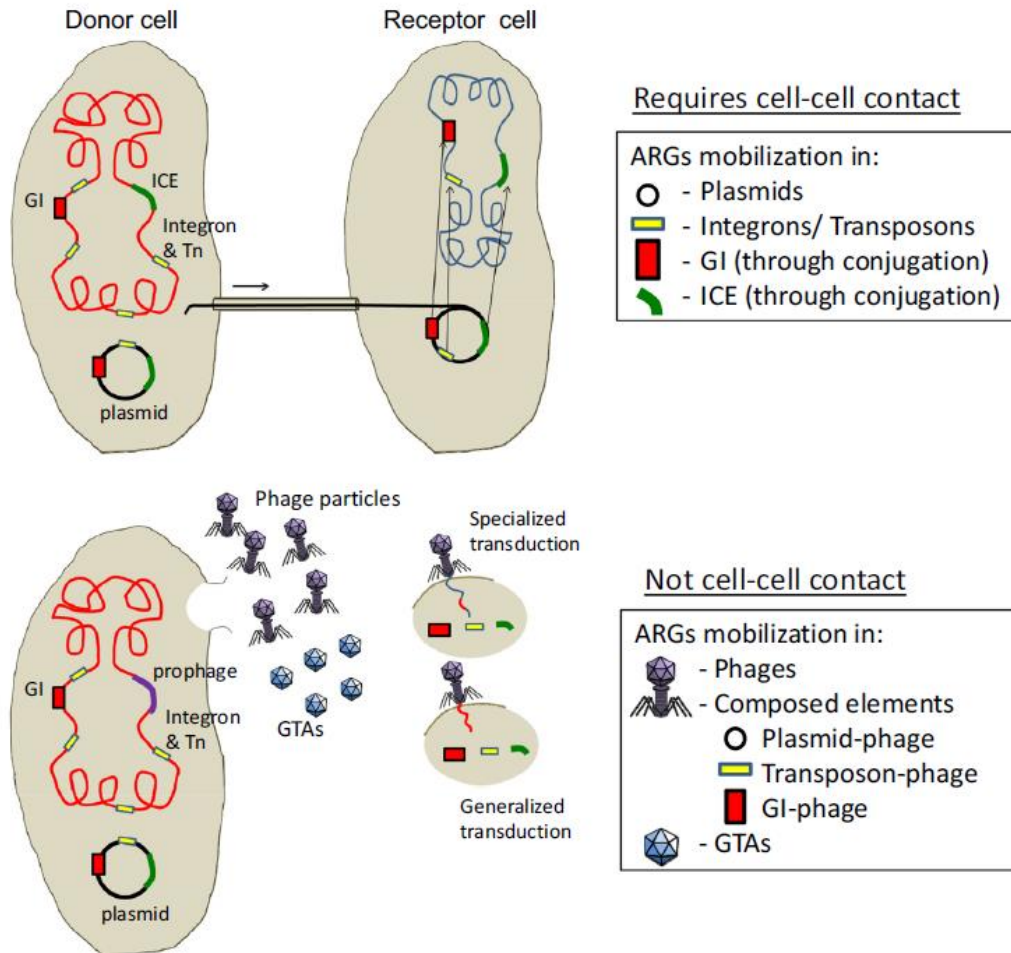


Figura 4. MGEs responsables de la movilización de ARGs clasificados según el requerimiento de contacto célula-célula. ARG: antibiotic resistance gene; GI: genomic island; ICE: integrative conjugative elements, GTA: gene transfer agent; Tn: transposon (Brown-Jaque et al., 2015).

- **Islas genómicas:** las islas genómicas (GIs, del inglés *Genomic Islands*) son segmentos discretos de ADN que pueden ser móviles o no, y difieren entre cepas bacterianas estrechamente relacionadas. Algunas GIs tienen la capacidad de integrar, escindir y transferirse a un nuevo huésped por medio de transformación, conjugación o transducción fágica (Boyd et al., 2009). Las GIs están involucradas en la diseminación de genes asociados a virulencia, resistencia a antibióticos y formación de vías catabólicas (Juhás et al., 2009).
- **ICEs:** son elementos genéticos móviles con capacidad de transferencia autónoma mediante conjugación (Zakharova and Viktorov, 2015). Generalmente se localizan en el cromosoma del huésped, y contienen los genes necesarios para su conjugación (Burrus and Waldor, 2004). Muchos ICEs portan genes adicionales, como ARGs (Johnson and Grossman, 2015).

- Agentes de transferencia génica: los agentes de transferencia génica (GTAs, del inglés *Gene Transfer Agents*) son partículas similares a cápsides de fagos (a veces con cola) que tienen la capacidad de empaquetar y transferir fragmentos aleatorios del genoma del huésped (Figura 5) (Guy et al., 2013; Lang et al., 2012; Quirós et al., 2016). Los genes GTA están constitutivamente presentes en el cromosoma de algunos géneros bacterianos y no se transfieren a las células receptoras (Hynes et al., 2012; Lang and Beatty, 2007; Quirós et al., 2016). A diferencia de los bacteriófagos, no es necesaria una infección previa de la célula huésped para la generación de GTAs, como en el caso de la transducción generalizada (la cual se describirá en la siguiente sección) (Lang et al., 2012).

Se inducen de forma similar a los fagos atemperados y una vez generados, los GTAs son liberados por las células a través de la lisis celular y movilizan su contenido de ADN a otras bacterias receptoras actuando como la cápside de un fago (Lang et al., 2012). Estas partículas han sido descritas en especies bacterianas propias de ambientes marinos, en general, dentro de las alfa-proteobacterias (Lang and Beatty, 2007; McDaniel et al., 2010, 2012) y alguna Betaproteobacteria. No existen reportes en otros grupos bacterianos y ciertos mecanismos relacionados con la producción, liberación y transducción de estas partículas aún se desconocen (Brown-Jaque et al., 2015; García-Aljaro et al., 2017). Sin embargo, cabe destacar que presentan una frecuencia de transferencia de ARGs tres órdenes de magnitud más alta que cualquier otro mecanismo de transferencia genética conocido (Solioz et al., 1975).

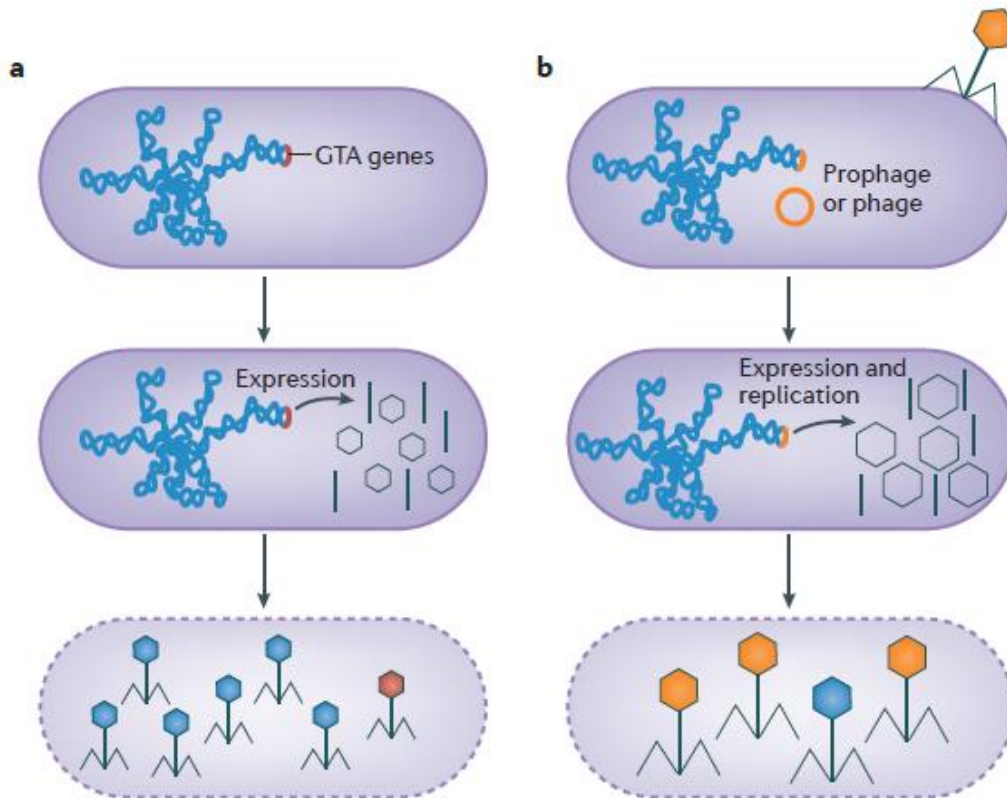


Figura 5. Comparación entre la producción de un GTA y un fago transductante. (a) Los genes que codifican las partículas de GTA están ubicados en el cromosoma del huésped, y su expresión conduce a la producción de GTAs (negro). Segmentos aleatorios de ADN del huésped son empaquetados en las partículas (partículas azules), y ocasionalmente alguna partícula contiene genes de GTA (partícula roja). (b) En la producción de fagos transductantes, se expresan los genes del fago o profago dentro del genoma del huésped, dando a lugar a la producción de partículas fágicas (negro) y la replicación del genoma del fago. Posteriormente, el genoma fágico es empaquetado (partículas naranjas) con empaquetamiento ocasional de ADN no fágico (partícula azul) (Lang et al., 2012).

1.3.2. Mecanismos de HGT

Los mecanismos involucrados en la HGT entre bacterias son la conjugación, la transformación y la transducción, y son los responsables de la variabilidad fenotípica en el metabolismo, la virulencia y la resistencia a antibióticos (Brown-Jaque et al., 2015; Gogarten et al., 2009) (Figura 6).

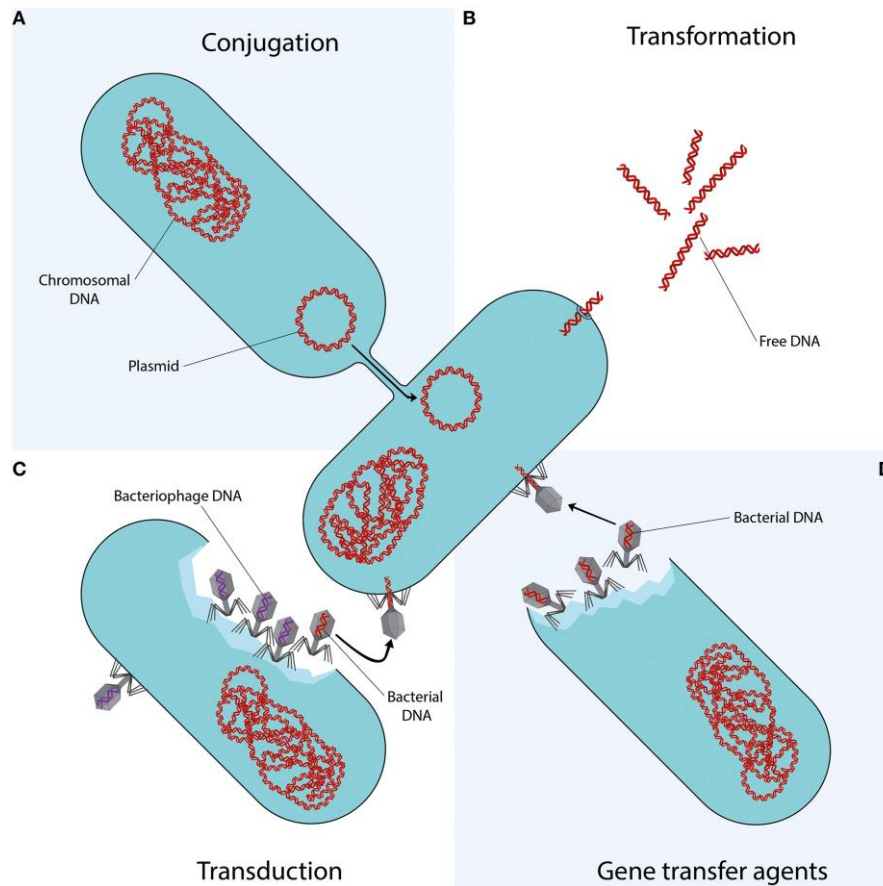


Figura 6. Mecanismos de transferencia genética horizontal (von Wintersdorff et al., 2016).

- **Transformación:** es el proceso por el cual el ADN extracelular liberado por un organismo donador es adquirido por bacterias competentes (receptoras). La transformación puede ser natural, que ocurre con fragmentos de ADN cromosómico libre en el medio extracelular (Nielsen et al., 2009), o artificial, producida en el laboratorio como herramienta de manipulación genética.
- **Conjugación:** se define como la transferencia de ADN por medio contacto directo entre dos células. Este contacto se establece mediante un pili (Siefert, 2009) codificado por un plásmido F. Este proceso se lleva a cabo no sólo entre especies bacterianas relacionadas, sino entre diferentes géneros (Dreiseikermann, 1994). El mecanismo de conjugación es el más habitual y es uno de los que contribuye en mayor medida a la HGT en procariontas (de la Cruz and Davies, 2000). Los MGEs transportados por este mecanismo son plásmidos conjugativos o ICEs insertados en el cromosoma (Smillie et al., 2010; Wozniak and Waldor, 2010).
- **Transducción:** La transducción se refiere al proceso por el cual un fragmento de ADN se transfiere de una célula bacteriana a otra usando una partícula de

bacteriófago como vector (Brown-Jaque et al., 2015; Zinder and Lederberg, 1952). El tamaño de los fragmentos de ADN que pueden empaquetarse en una partícula de fago está limitado por el tamaño de la cápside de su cápside, pero puede superar las 100 kilobases (kb) (Muniesa et al., 2013a). La transducción por bacteriófagos incluye cualquier tipo de ADN bacteriano, desde fragmentos de cromosoma lineal hasta todo tipo de MGEs tales como plásmidos, islas genómicas, transposones y elementos de inserción (Mann and Slauch, 1997). A diferencia de otros mecanismos de HGT, la transducción no requiere contacto entre la célula donadora y la célula receptora (Figura 7).

Existen dos tipos de transducción:

Transducción generalizada: en este proceso cualquier fragmento de ADN del huésped puede ser empaquetado dentro de la cápside de un fago, en lugar del ADN del propio fago. Posteriormente, la partícula transductante originada puede transferir este ADN a otra bacteria. Las partículas transductantes generalizadas pueden producirse durante el ciclo lítico de los fagos tanto virulentos como atemperados (Thierauf et al., 2009). Este proceso ocurre como consecuencia del reconocimiento “erróneo” del sitio *pac*, que indica el lugar de corte del ADN fágico que ha de ser empaquetado. En su lugar, la maquinaria del fago corta en sitios homólogos de *pac* que se encuentran en el cromosoma bacteriano, por lo que es un fragmento de ADN bacteriano el que es escindido y finalmente, empaquetado dentro de una cápside fágica (Bushman, 2002).

Las partículas derivadas de transducción generalizada no pueden propagarse debido a que no transportan ADN fágico y, por tanto, carecen de genes fágicos necesarios para su replicación. Pero a pesar de eso, su capacidad de infección no disminuye ya que ésta depende de la cápside (Muniesa et al., 2013b). Tras la infección de una nueva célula huésped, el ADN movilizado en la partícula fágica puede incorporarse al genoma del nuevo huésped por mecanismos de recombinación (Moat et al., 2003). Algunos fagos con la capacidad de transducción generalizada son el fago T4, P22 y P1, del cual se ha reportado que aproximadamente el 30% de las partículas presentes en un lisado de este fago se derivan de transducción generalizada (Sternberg and Coulby, 1990; Thierauf et al., 2009). La transducción generalizada contribuye sustancialmente al intercambio genético bacteriano en la naturaleza (Kutter and Sulakvelidze, 2005).

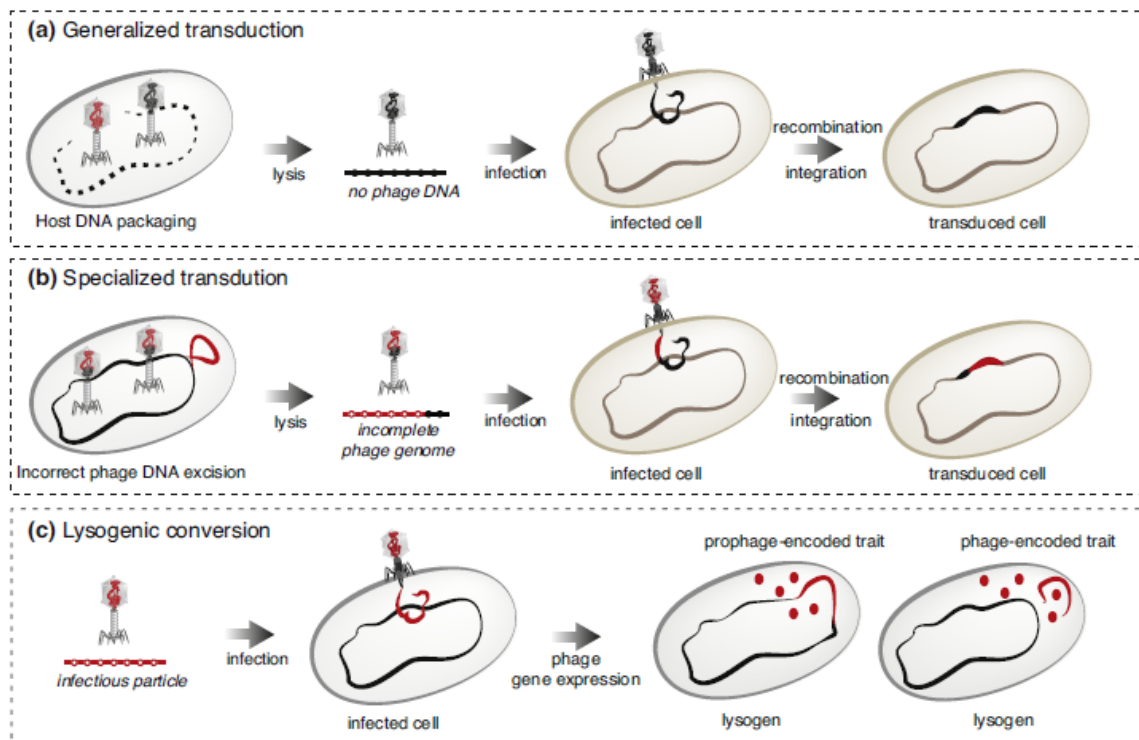


Figura 7. Principales mecanismos de HGT mediados por fagos. La transducción ocurre cuando los fagos recién formados adquieren genes del huésped y los transfieren a otras células bacterianas. (a) La transducción generalizada puede transferir fragmentos aleatorios de ADN cromosómico o plasmídico del hospedador a otras células sensibles a estos fagos. Puede darse tanto en fagos atemperados como virulentos. (b) La transducción especializada se debe a la escisión defectuosa del profago del cromosoma del huésped que conduce a un genoma de fago con genes del fago (rojo) y del hospedador (negro). Este tipo de transducción está restringido a fagos atemperados. (d) La conversión lisogénica ocurre cuando un profago (integrado o episomal) induce un cambio en el fenotipo de la célula infectada (que no es parte del ciclo de vida del fago). Por ejemplo, los profagos pueden codificar proteínas tales como toxinas (círculos rojos), que se secretan o liberan en la lisis bacteriana y contribuyen a la patogenicidad bacteriana (Touchon et al., 2017).

Transducción especializada: a diferencia de la transducción generalizada, este proceso consiste en la escisión errónea de un profago de un sitio de integración específico en el cromosoma bacteriano, empaquetando tanto ADN fágico como un fragmento de ADN adyacente del genoma bacteriano en una sola partícula de fago (Miller et al., 2004; Thierauf et al., 2009). En un mecanismo similar, hay fagos que portan un gen específico fágico, aunque no necesariamente adyacente al sitio de integración. Una vez el fago infecta un nuevo huésped, estos genes podrán ser incorporados en la bacteria huésped en el lugar donde se inserte el profago. Cuando se active el ciclo lítico, el

profago podrá volver a inducirse y dar lugar a nuevos viriones, ya que posee todos los genes necesarios para su replicación y propagación. El ejemplo más conocido de este tipo de fagos es el fago λ (Miller et al., 2004).

La transducción especializada es probablemente un contribuyente minoritario para la transferencia genética en el medio ambiente en comparación con la transducción generalizada. Sin embargo, la frecuencia de transducción del fragmento de ADN bacteriano específico es alta ya que todas las partículas de fago producidas después de la inducción del profago portan este fragmento particular.

1.3.3. Bacteriófagos como MGEs

La transducción juega un papel importante en la genética bacteriana. Briani y sus colaboradores han enfatizado la importancia de los fagos atemperados como "replicones dotados de capacidades de transferencia horizontal", y probablemente hayan sido factores importantes en la evolución bacteriana al mover segmentos de genomas a nuevos organismos (Briani et al., 2001).

La transducción se consideraba tradicionalmente como un evento raro que ocurría alrededor de una vez cada $10^7 - 10^9$ infecciones por fagos. Sin embargo, estudios recientes muestran que la transducción puede ocurrir a frecuencias de varios órdenes de magnitud mayores de lo que se pensaba (Evans et al., 2010; Kenzaka et al., 2010). Con estas frecuencias y las concentraciones de fagos y huéspedes encontradas en muchos entornos, la transferencia de genes por transducción tendría lugar una cantidad excepcional de veces por segundo en cualquier lugar (Muniesa et al., 2013a).

El hecho de que parte del genoma bacteriano pueda ser movilizado por cápsides fágicas, tiene múltiples consecuencias, tales como la movilización y la transducción de genes de virulencia (Allué-Guardia et al., 2011; Griffiths et al., 2000; O'Brien et al., 1984; Penadés and Christie, 2015), genes de resistencia a antibióticos (Colomer-Lluch et al., 2011b; Haaber et al., 2016; Muniesa et al., 2004b; Ross and Topp, 2015) o genes relacionados con el metabolismo (Lindell et al., 2004; Müller et al., 2013) a nuevos huéspedes bacterianos. Sin lugar a duda, este intercambio genético horizontal contribuye a la evolución de las poblaciones bacterianas.

La ubiquidad, la abundancia, la persistencia y la polivalencia, de algunos fagos, hace de los bacteriófagos los vehículos genéticos ideales para la transferencia de genes entre bacterias, incluso de diferentes taxones o biomas.

Entre los genes movilizados son de especial interés aquellos relacionados con la patogenicidad bacteriana, tales como factores de virulencia (toxinas), o con la resistencia a antibióticos. En el caso específico de los ARGs, los fagos pueden desempeñar un papel crucial en las primeras etapas de transferencia de los resistomas de bacterias ambientales, localizados cromosómicamente, a bacterias comensales de las microbiomas humanos y animales, y en última instancia, a patógenos (Muniesa et al., 2013b).

La presión ejercida por las altas concentraciones de antibióticos, que encontramos en la mayoría de los ambientes, favorece el proceso de movilización, así como su permanencia en los microbiomas asociados al cuerpo (Muniesa et al., 2013a) (Figura 8).

Actualmente, la resistencia a antibióticos es uno de los problemas más graves de salud pública a nivel mundial, que dificulta enormemente el tratamiento de infecciones bacterianas (Hawkey and Jones, 2009). Esta problemática se agrava aún más en enfermedades en las que los pacientes dependen casi exclusivamente de tratamientos con antimicrobianos para mejorar su calidad de vida y su supervivencia, como en el caso de la fibrosis quística (Castellani and Assael, 2017). Sumando las condiciones propias de esta enfermedad con la necesidad de un uso continuado de antibióticos durante la vida de estos pacientes, los bacteriófagos podrían contribuir a la colonización de cepas multirresistentes.

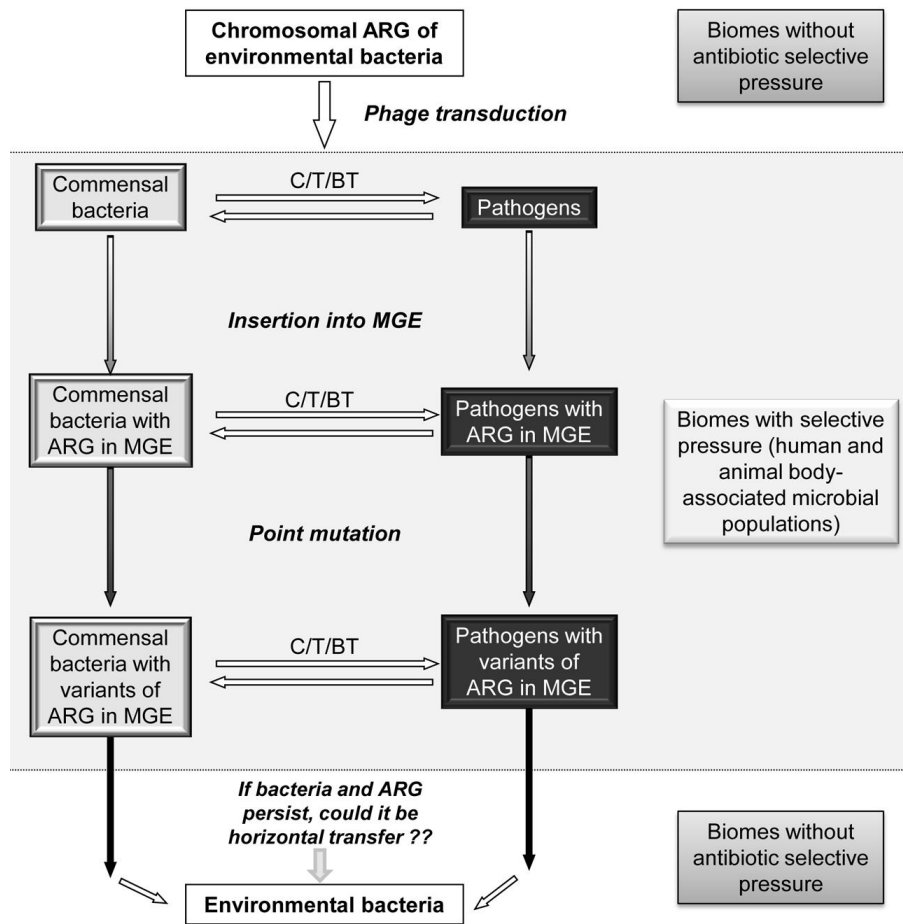


Figura 8. Modelo de movilización de ARG de biomas ambientales, donde no existe una presión selectiva por parte de los antibióticos, a los biomas relacionados con la microbiota humana y animal. ARG: antibiotic resistance genes; MGE: mobile genetic element; C: conjugation; T: transformation; BT: bacteriophage transduction (Muniesa et al., 2013a).

1.4. Antibióticos

1.4.1. Definición y clasificación de los antibióticos

El término antibiótico (del griego, *anti*, "contra", *bios*, "vida") se refería originalmente a un compuesto natural producido principalmente por bacterias o mohos, que tiene la capacidad de matar otros microorganismos que causan enfermedades en humanos o animales. Hoy en día, nos referimos a un antibiótico como una sustancia química producida por un microorganismo o un derivado sintético que inhibe el crecimiento de (bacteriostático) o mata (bactericida) otros microorganismos sensibles (Colomer-Lluch, 2014; Davies and Davies, 2010; Waksman and Flynn, 1973).

Actualmente, se conocen diferentes clases de antibióticos y se clasifican comúnmente en función de sus mecanismos de acción, estructura química o espectro de actividad (Neu, 1992). Los antibióticos pueden inhibir la síntesis de proteínas, como los aminoglucósidos, el cloranfenicol, los macrólidos y las tetraciclinas, o interactuar con la síntesis de ADN y ARN, como las quinolonas y las rifamicinas. Algunos grupos inhiben la síntesis o dañan la pared celular bacteriana como los β -lactámicos y los glicopéptidos. Otros actúan a nivel de metabolismo energético de las células bacterianas como las sulfonamidas y el trimetoprim. En la Tabla 2 se describen las principales clases de antibióticos y su mecanismo de acción.

Clase de antibiótico	Antibiótico	Espectro antimicrobiano	Diana primaria	Vías afectadas
Fluoroquinolones				
Inhibidor de la síntesis de ADN	Ácido nalidíxico, ciprofloxacina, norfloxacina, levofloxacina y gemifloxacina	Especies aerobias Gram-positivas y Gram-negativas, algunas especies anaerobias Gram-negativas (<i>C. perfringes</i>) y <i>M. tuberculosis</i>	Topoisomerasa II (ADN girasa), topoisomerasa IV	Replicación de ADN, respuesta SOS, división celular, generación de ATP, ciclo TCA, síntesis de clúster de Fe-S, formación de ROS y sistemas de dos componentes de envoltura y respuesta redox
Trimetoprim-sulfametoxazol				
Inhibidor de la síntesis de ADN	Co-trimoxazol (una combinación de trimetoprim y sulfametoxazol en una proporción de 1: 5)	Especies aerobias Gram-positivas y Gram-negativas	Inhibidores de la síntesis de ácido tetrahidrofólico	Biosíntesis de nucleótidos y replicación de ADN
Rifamicinas				
Inhibidor de la síntesis de ARN	Rifamicinas, rifampina y rifapentina	Especies Gram-positivas y Gram-negativas, y <i>M. tuberculosis</i>	ARN polimerasa dependiente de ADN	Transcripción de ARN, replicación de ADN y respuesta SOS
β-lactámicos				
Inhibidores de la síntesis de la pared celular	Penicilinas (penicilina, ampicilina, oxacilina), cefalosporinas (cefazolina, cefoxitina, ceftriaxona, cefepima) y carbapenémicos (imipenem)	Especies Gram-positivas y Gram-negativas aerobias y anaerobias	Proteínas de unión a penicilina	Síntesis de la pared celular, división celular, actividad autolisina (regulada por el sistema de dos componentes LytSR-VncRS), respuesta SOS, ciclo TCA, síntesis de clúster Fe-S, formación de ROS y sistemas de dos componentes de envoltura y respuesta redox
Glicopéptidos y glicolipopéptidos				
Inhibidor de la síntesis de la pared celular	Vancomicina; teicoplanina	Especies Gram-positivas	Unidades de peptidoglicano (dipéptido d-Ala-d-Ala terminal)	Síntesis de la pared celular, transglicosilación, transpeptidación y activación de autolisina (sistema de dos componentes VncRS)
Lipopéptidos				
Inhibidor de la síntesis de la pared celular	Daptomicina y polimixina B	Especies Gram-positivas (daptomicina), especies Gram-negativas (polimixinas)	Membrana celular	Síntesis de pared celular y sistemas de dos componentes de envoltura

Clase de antibiótico	Antibiótico	Espectro antimicrobiano	Diana primaria	Vías afectadas
Aminoglucósidos				
Inhibidores de la síntesis de proteínas	Gentamicina, tobramicina, estreptomicina y kanamicina	Especies aerobias Gram-positivas y Gram-negativas, y <i>M. tuberculosis</i>	Ribosoma 30S	Traducción de proteínas (errores de traducción por ARNt discordantes), ETC, respuesta SOS, ciclo TCA, síntesis de clúster Fe-S, formación de ROS y sistemas de dos componentes de envoltura y respuesta redox
Tetraciclinas				
Inhibidores de la síntesis de proteínas	Tetraciclina y doxiciclina	Especies aerobias Gram-positivas y Gram-negativas	Ribosoma 30S	Traducción de proteínas (a través de la inhibición de la unión de aminoacil ARNt al ribosoma)
Macrólidos				
Inhibidores de la síntesis de proteínas	Eritromicina y azitromicina	Especies Gram-positivas y Gram-negativas aerobias y anaerobias	Ribosoma 50S	Traducción de proteínas (a través de la inhibición de los pasos de elongación y translocación) y la reducción de ARNt libre
Streptograminas				
Inhibidores de la síntesis de proteínas	Pristinamicina, dalfopristina y quinupristina	Especies Gram-positivas y Gram-negativas aerobias y anaerobias	Ribosoma 50S	Traducción de proteínas (a través de la inhibición de los pasos de iniciación, elongación y translocación) y la reducción de ARNt libre
Fenicoles				
Inhibidores de la síntesis de proteínas	Cloranfenicol	Algunas especies Gram-positivas y Gram-negativas, incluidas <i>B. fragilis</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>H. influenzae</i> y <i>S. pneumoniae</i>	Ribosoma 50S	Traducción de proteínas (a través de la inhibición de la etapa de elongación)

Tabla 2. Clasificación de los antibióticos. Clases, ejemplos, espectro antimicrobiano, diana principal y vías afectadas de los antibióticos más usados (modificado de Kohanski et al., 2010).

1.4.2. Resistencia a antibióticos

La resistencia a los antibióticos se puede definir como la capacidad de algunas poblaciones de microorganismos para sobrevivir y multiplicarse en presencia de un antibiótico al que originalmente eran sensibles (Colomer-Lluch, 2014) (Figura 9).

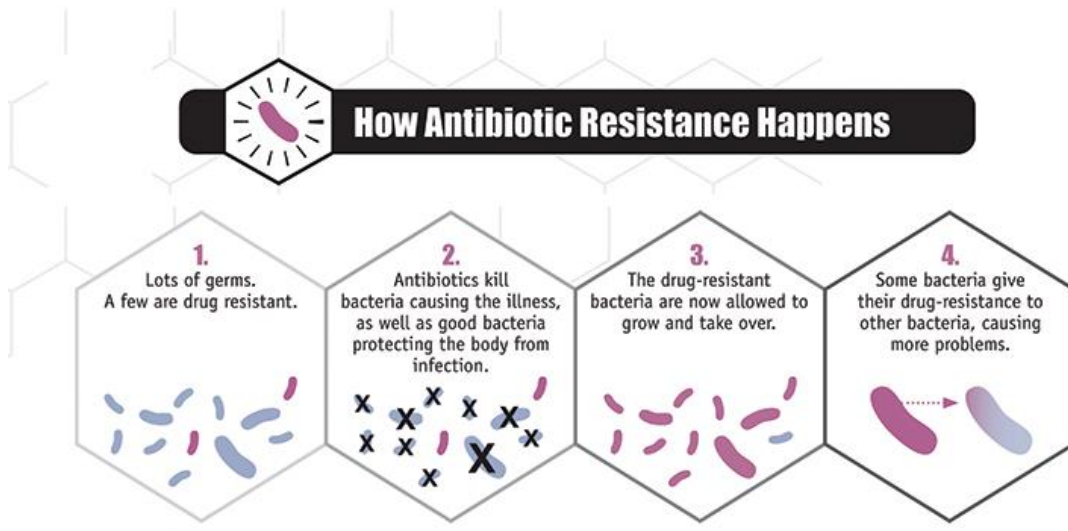


Figura 9. Cómo se origina la resistencia a antibióticos (CDC, 2018).

Contrario a los que se creía inicialmente, los genes que confieren resistencia a los antibióticos están ampliamente extendidos en la naturaleza y estos genes se intercambian con frecuencia entre patógenos (Abraham and Chain, 1988; Van Hoek et al., 2011). El amplio uso de antibióticos ejerce una potente presión selectiva que hace que la fracción de bacterias que contienen genes de resistencia aumente a través del tiempo. Como consecuencia de esto, la resistencia a un nuevo antibiótico surge de 2 a 5 años después de su introducción (Bushman, 2002), o incluso más rápido.

De esta manera, la resistencia a antibióticos se ha convertido en un fenómeno grave y en constante aumento en la medicina contemporánea y a su vez, ha surgido como una de las principales preocupaciones de salud pública del siglo XXI (WHO, 2014).

En Europa, se estima que unas 25.000 personas mueren cada año a causa de infecciones con bacterias resistentes a antibióticos. De estas, por lo menos 23,000 mueren como resultado directo de infecciones resistentes a los antibióticos y muchas otras mueren por complicaciones derivadas de este tipo de infecciones. En lo que respecta a España, cerca de 2,000 personas mueren cada año como consecuencia directa de una respuesta antibiótica ineficiente debido a la resistencia y a la

multirresistencia de los patógenos a los tratamientos antibióticos (ECDC/EMA, 2009; ECDC, 2016).

Las principales causas del incesante aumento de la resistencia a antibióticos se atribuyen con frecuencia al uso desmedido y la aplicación incoherente de antibióticos en humanos, y al uso de antibióticos en la cría de animales, no solo con fines terapéuticos y/o profilácticos sino con propósitos de mejora en la producción (Davies and Davies, 2010; Levy and Marshall, 2004).

1.4.2.1. Mecanismos de resistencia a antibióticos

El **resistoma** consiste en la totalidad de genes de resistencia a antibióticos presentes en bacterias patógenas, productoras de antibióticos, ambientales benignas o comensales de otros organismos. También incluye genes de resistencia críptica (localizados en el cromosoma bacteriano pero que generalmente no se expresan) y genes precursores que, bajo una presión selectiva apropiada, pueden evolucionar a un gen de resistencia completo y funcional (Wright, 2007, 2010b).

Las bacterias emplean ciertos mecanismos para resistir a los antimicrobianos tales como cambios de permeabilidad en la pared celular que restringe el acceso de los antimicrobianos a los sitios de acción, expulsión activa del antibiótico desde el citoplasma, modificación enzimática del antibiótico, degradación del agente antimicrobiano, adquisición de rutas metabólicas alternativas a aquellas inhibidas por el fármaco, modificación de dianas de los antibióticos y sobreproducción de enzimas diana (Finley et al., 2013) (Figura 10).

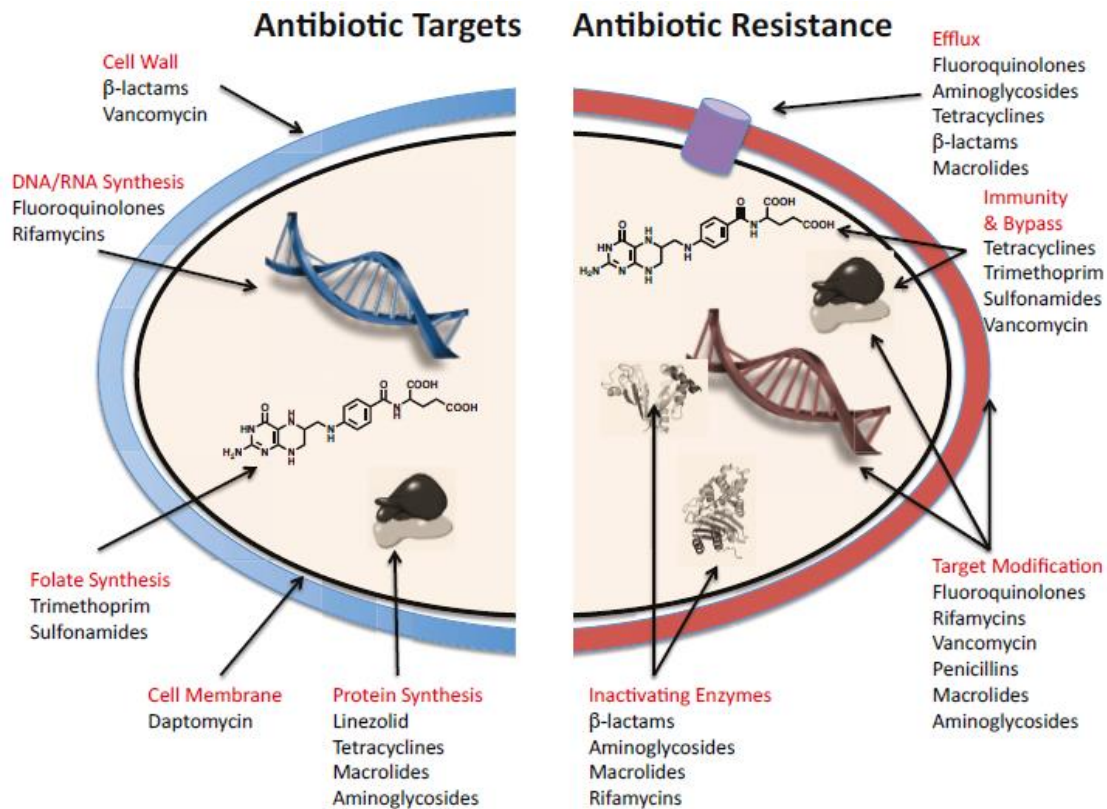


Figura 10. Dianas de antibióticos y mecanismos de resistencia (Wright, 2010a).

Estos mecanismos de resistencia pueden ser intrínsecos o adquiridos, mediante mutaciones o la adquisición de material genético a través de HGT:

- **Resistencia intrínseca:** es la capacidad innata de todas o la mayoría de especies bacterianas (patógenas y no patógenas) para resistir a un determinado agente antimicrobiano a través de sus características estructurales o funcionales. La resistencia intrínseca se codifica cromosómicamente y es independiente de la presión selectiva ejercida por los antibióticos (Cox and Wright, 2013; D'Costa et al., 2006; Dantas et al., 2008; Sommer et al., 2009). Las propiedades de difusión molecular de la membrana citoplasmática y las bombas de eflujo, las cuales bombean los antibióticos presentes en el citoplasma hacia fuera de la célula, son ejemplos de mecanismos intrínsecos de resistencia (Borges-Walmsley et al., 2003; Madigan et al., 2006; Scherrer and Gerhardt, 1971; Vaara et al., 1990; Van Bambeke et al., 2000).
- **Resistencia adquirida:** es producto de un cambio en el ADN bacteriano que trae como consecuencia la expresión de un nuevo rasgo fenotípico orientado a la resistencia a antimicrobianos (McManus, 1997). El origen de este cambio en

el genoma puede ser debido a mutaciones del ADN existente o por adquisición de ADN foráneo a través de HGT.

Mutaciones: son procesos espontáneos que pueden ocurrir independientemente de la presencia de antibióticos (Hawkey, 1998). Estas mutaciones se producen a nivel cromosómico en genes que codifican para la diana del antimicrobiano, o en genes que regulan diferentes funciones celulares que podrían conducir a la activación o inhibición de genes implicados en el mecanismo de resistencia (p. Ej. Hiperexpresión de enzimas inactivadoras, hiperexpresión de bombas de eflujo o inhibición de porinas). La resistencia desarrollada por medio de mutación cromosómica y selección se transfiere de una célula a su descendencia y conduciría a una transmisión vertical del gen de resistencia (VGT, del inglés *Vertical Gene Transfer*) (Tenover, 2006).

HGT: La presión selectiva del entorno impulsa la transferencia y la incorporación de genes específicos que promueven la aptitud y la supervivencia en un entorno determinado. Los agentes responsables de la movilización de los ARGs se han descrito en detalle en el apartado 1.3.

Las β -lactámicos, las fluoroquinolonas, los aminoglucósidos, las sulfonamidas y las tetraciclinas constituyen las principales opciones terapéuticas para tratar las infecciones causadas por microorganismos patógenos (Wax et al., 2007). A continuación, se detallarán las características de la resistencia adquirida contra varias clases de antibióticos centrándonos en aquellas que serán objeto de evaluación en la presente tesis.

1.4.2.2. Genes de resistencia a antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos son agentes bactericidas que tienen un anillo β -lactámico en su estructura molecular, lo que les confiere sus principales características: su mecanismo de acción y su baja toxicidad. En la actualidad son los antibióticos comerciales más usados; debido a su eficiencia, bajo coste y efectos secundarios mínimos (Wilke et al., 2005). El mecanismo de acción de esta clase de antibióticos se centra en la inhibición de la síntesis de la pared celular uniéndose a las proteínas de unión a la penicilina (PBP) en las bacterias e interfiriendo con la reticulación estructural de los peptidoglicanos. Como consecuencia, se debilita la pared celular de la bacteria y finalmente se produce la citólisis o muerte debido a la presión osmótica (Andes and Craig, 2005).

Se han descrito cuatro mecanismos de resistencia a los compuestos β -lactámicos: Bombas de eflujo, modificación de PBPs, disminución de la expresión de las proteínas de membrana exteriores y producción de β -lactamasas (Drawz and Bonomo, 2010). Sin embargo, la producción de β -lactamasas es el mecanismo más habitual de resistencia, en especial en bacilos Gram negativos (Dallenne et al., 2010).

β -lactamasas

Las β -lactamasas son enzimas que hidrolizan el anillo de β -lactámico de la molécula de antibiótico y, por lo tanto, lo inactivan (Kong et al., 2010). Hasta el año 2018, han sido identificadas alrededor de 1.800 β -lactamasas. Entre ellas, las β -lactamasas de amplio espectro (ESBLs) son las más perjudiciales. Las ESBL son enzimas bacterianas mediadas por plásmidos que hidrolizan la mayoría de penicilinas, monobactámicos (aztreonam), cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación (cefotaxima y ceftazidima) (Bush, 2013).

- *bla*_{TEM}

La familia TEM representa el mecanismo de resistencia a β -lactámicos más significativo a nivel clínico, ampliamente distribuido y con una gran diversidad y prevalencia en enterobacterias (Robin et al., 2012). La primera en ser descubierta, TEM-1, fue descrita a principios de la década de 1960 en una cepa de *E. coli* aislada en Grecia de un paciente llamado Temoneira (TEM como acrónimo de Temoneira) y se considera de amplio espectro, puesto que hidrolizaba las primeras cefalosporinas y muchas penicilinas (Datta and Kontomichalou, 1965). TEM-1 se ha convertido en una de las β -lactamasas más frecuentes y es omnipresente entre las *Enterobacteriaceae*.

La mayoría de las ESBLs han evolucionado por sustituciones de aminoácidos (mutaciones puntuales) de las β -lactamasas nativas TEM-1, TEM-2 y SHV-1 encontradas en *Enterobacteriaceae* (Bradford, 2001). TEM-3 tiene un espectro de sustrato incrementado, incluyendo cefalosporinas de tercera generación, pero es susceptible a inhibidores de β -lactamasa como el ácido clavulánico (Sirost et al., 1987). La mayoría de los tipos de TEM descubiertos posteriormente son ESBLs, lo que da como resultado más de 223 variantes descritas hasta la fecha (Lahey Clinic, 2017).

- *bla*_{CTX-M}

Las enzimas de la familia CTX-M son las ESBLs más prevalentes en *Enterobacteriaceae* en Europa y otras áreas del mundo (Coque et al., 2008a). CTX-M-1 se describió por primera vez en 1989 cuando se recuperó un aislamiento de *E. coli*

susceptible a cefotaxima, pero resistente a ceftazidima, del oído de un niño de 4 meses que padecía otitis media en Munich (CTX como acrónimo de cefotaxima y -M de Munich) (Bauernfeind et al., 1990, 1992).

Las diferentes variantes de ESBLs CTX-M se agrupan en 5 *clusters* o grupos (CTX-M-1, 2, 8, 9 y 25). Todos presentan una potente actividad hidrolítica contra cefotaxima, aunque las nuevas variantes también pueden hidrolizar eficazmente ceftazidima, con una distribución que varía enormemente según el área geográfica. La familia CTX-M, con más de 172 variantes identificadas hasta ahora (Lahey Clinic, 2017), es reconocida como el mecanismo de resistencia a antibióticos más extendido y amenazante, tanto en clínica como en entornos comunitarios (Cantón and Coque, 2006; Pitout and Laupland, 2008; Valverde et al., 2004).

El clúster CTX-M grupo 1 incluye 31 variantes y el CTX-M grupo 9, 22 variantes, por lo que representan los grupos más diversos (El Salabi et al., 2013). En España, se ha informado una alta prevalencia local de enzimas CTX-M-9, CTX-M-10, CTX-M-14 y CTX-M-15 entre pacientes hospitalizados, ambulatorios e individuos sanos (Díaz et al., 2010). Los análisis filogenéticos sugieren que los genes CTX-M no se originaron por mutaciones de enzimas mediadas por plásmidos previos, sino a través de la movilización de genes *bla* cromosómicos de diferentes especies de *Kluyvera*, que posteriormente se han propagado entre bacterias relevantes patógenas y no patógenas, por medio de MGEs (Cantón et al., 2012; Coque et al., 2008b; Nicolas-Chanoine et al., 2008).

- *bla*_{OXA-48}

Las β -lactamasas de tipo OXA se denominan así debido a sus capacidades hidrolizantes sobre la oxacilina (Bush et al., 1995). Se descubrieron originalmente en varios aislamientos de *P. aeruginosa* de un solo hospital en Ankara, Turquía en 1991 (Hall et al., 1993). Estas β -lactamasas predominan en *P. aeruginosa* (Weldhagen et al., 2003) pero se han detectado en muchas otras bacterias Gram negativas (Livermore, 1995). Hasta el momento, se ha reportado 498 variantes (Lahey Clinic, 2017).

La enzima OXA-48 tiene la capacidad de hidrolizar el carbapenem, antibiótico betalactámico de amplio espectro y de una elevada resistencia a las betalactamasas. Esta β -lactamasa está ampliamente extendida en *K. pneumoniae* y otras *Enterobacteriaceae*, y ahora también se han descrito en *Acinetobacter baumannii*

(Gonçalves et al., 2013). Representa una de las evoluciones más preocupantes en la resistencia a los carbapenems en la última década (Evans and Amyes, 2014).

- *bla_{VIM}*

La familia VIM de las metalo-β-lactamasas (MBL) es el segundo grupo dominante, detrás de la familia IMP (Sacha et al., 2008). Actualmente se conocen 46 variantes (Lahey Clinic, 2017). Las enzimas de tipo VIM demuestran poca similitud de aminoácidos con IMP (<32%). La VIM-1 (Verona IMipenemasa) se caracterizó por primera vez a partir de una cepa de *P. aeruginosa* aislada en 1997 en Italia (Lauretti et al., 1999). La principal característica de las MBL es el requerimiento de dos iones de zinc como cofactor enzimático para catalizar la hidrólisis del anillo β-lactámico (Walsh et al., 2005).

Las MBL son las carbapenemasas más significativas a nivel clínico y se han descrito principalmente en *P. aeruginosa*. Las MBL, pertenecientes a la familia de clase molecular B, son las más preocupantes de todas las β-lactamasas porque confieren resistencia a carbapenémicos, a todos los β-lactámicos (a excepción de aztreonam) y generalmente, a aminoglucósidos y quinolonas (Sacha et al., 2008).

mecA

Otros genes confieren resistencia a los antibióticos betalactámicos en grupos diferentes a las Enterobacterias. Por ejemplo, *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) posee un mecanismo de resistencia basado en la expresión del gen *mecA*, que codifica una proteína de unión a la penicilina modificada (PBP2a o PBP2'), la cual presenta una baja afinidad por los antibióticos β-lactámicos y, en consecuencia, confiere resistencia clínicamente significativa a la meticilina (Enright, 2003).

El complejo del gen *mecA* está localizado en un elemento genético móvil, el **cassette cromosómico estafilocócico** (SCC*mec*) (Hanssen and Ericson Sollid, 2006; Katayama et al., 2000). Hasta la fecha, se han clasificado once tipos principales de SCC*mec* en función del tamaño y la composición (I a XI) (IWG-SCC, 2018; Ma et al., 2002; Zhang et al., 2009).

S. aureus MRSA es considerado un patógeno multirresistente porque es resistente a prácticamente todos los antibióticos β-lactámicos que se han desarrollado hasta la fecha y a la mayoría de los macrólidos, aminoglucósidos, cloranfenicol, fluoroquinolonas y tetraciclinas (Lee, 2006). Además, recientemente se ha reportado la aparición de *S. aureus* resistente a la vancomicina (VRSA) (Chang et al., 2003; Weigel

et al., 2003; Zhu et al., 2008). MRSA se ha convertido en una de las causas más importantes de infecciones bacterianas nosocomiales y adquiridas en la comunidad en todo el mundo (Chambers and DeLeo, 2009; Motoshima et al., 2010).

1.4.2.3. Genes de resistencia a quinolonas

Las quinolonas son agentes bactericidas totalmente sintéticos, ampliamente utilizados en medicina humana y veterinaria. El primer miembro de la familia de las quinolonas, el ácido nalidíxico, fue descubierto en 1962 como subproducto de la síntesis de la cloroquina (un conocido fármaco anti-malaria), el cual mostró actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-negativas (Bisacchi, 2015; Leshner et al., 1962). La continua manipulación de la molécula por medio de síntesis química permitió obtener compuestos con una potencia significativamente mayor (Aldred et al., 2014; Dougherty and Pucci, 2012).

Los objetivos de las moléculas de quinolona son las topoisomerasas ADN girasa tipo II (topoisomerasa II) y ADN topoisomerasa IV (Drlica and Zhao, 1997), que son esenciales para facilitar la replicación, transcripción, recombinación y reparación del ADN. Las quinolonas actúan inhibiendo la acción de la ADN girasa y la topoisomerasa IV y, como resultado, la síntesis de ADN se bloquea y conduce a la muerte de la bacteria (Hawkey, 2003; Laponogov et al., 2009; Maruri et al., 2012).

Durante décadas se creyó que los mecanismos de resistencia a las quinolonas solo eran codificados cromosómicamente. Estos mecanismos comprendían modificaciones moleculares de las dianas del antibiótico (ADN girasa y topoisomerasa IV), disminución de la permeabilidad de la membrana externa (relacionada con la pérdida de porinas) y sobreexpresión de las bombas de eflujo naturales (Hooper, 2001; Jacoby, 2005; Ruiz et al., 2012). Sin embargo, en 1998 se informó la aparición de la resistencia a las quinolonas mediada por plásmidos (PMQR) (Courvalin, 2008; Jacoby et al., 2009; Martínez-Martínez et al., 2008; Robicsek et al., 2006).

El primer determinante de PMQR que correspondía a la proteína Qnr (QnrA1), fue descubierto dentro de un plásmido de 56 kb llamado pMG252, el cual porta genes de resistencia a quinolonas, β -lactámicos, aminoglicósidos, sulfonamidas, trimetoprim y cloranfenicol (Martínez-Martínez et al., 1998; Strahilevitz et al., 2009). Los genes *Qnr* son muy diversos, se han identificado 8 *qnrA*, 94 *qnrB*, 1 *qnrC*, 3 *qnrD*, 1 *qnrE*, 9 *qnrS* y 6 genes *qnrVC* (Jacoby et al., 2008; Lahey Clinic, 2018). Su mecanismo de acción consiste en la interferencia con la acción de las quinolonas en la ADN girasa y la topoisomerasa IV, confiriendo una resistencia parcial que permite a la cepa bacteriana

propagar y adquirir la mutación que le conferirá la resistencia total al antibiótico. (Aldred et al., 2014; Cambau et al., 2006).

1.4.2.4. Genes de resistencia a sulfonamidas

Las sulfonamidas son agentes antimicrobianos sintéticos derivados de la sulfanilamida. Se consideran de amplio espectro, ya que se emplean en el tratamiento de infecciones bacterianas y parasitarias en medicina humana y veterinaria (Pérez-Trallero and Iglesias, 2003).

Su mecanismo de acción se basa en la competición, con el ácido p-aminobenzoico, por el centro activo de la enzima dihidropteroato sintasa (DHPS), interrumpiendo la utilización bacteriana de este compuesto en la síntesis de ácido fólico y, en última instancia, de purina y ADN (Pérez-Trallero and Iglesias, 2003; Sköld, 2001). Por lo tanto, las sulfonamidas son bacteriostáticas e inhiben el crecimiento y la multiplicación de bacterias, pero no las matan (Sköld, 2001).

Se han descrito dos mecanismos de resistencia bacteriana a sulfonamida. El primero consiste en la mutación del gen de la enzima DHPS (*folP*) que ocasiona una reducción de la afinidad de las sulfonamidas por la enzima DHPS (Sköld, 2000); y el segundo, en la adquisición de un gen alternativo de la enzima DHPS (*suI*). Hasta el momento, han sido caracterizadas tres enzimas localizadas en plásmidos, las cuales codifican variantes de la enzima DHPS: *suI1*, *suI2* y *suI3* (Lin et al., 2016).

Los genes *suI* representan el mecanismo de resistencia a sulfonamidas más frecuente en aislamientos clínicos humanos y animales. Los genes *suI1* y *suI2* suelen ser más prevalentes que *suI3* (Infante et al., 2005; Lanz et al., 2003; Lin et al., 2016).

1.4.2.5. Genes de resistencia a aminoglucósidos

Los aminoglucósidos inicialmente conocidos como aminociclitoles aminoglucosídicos tienen más de 60 años (Begg and Barclay, 1995; Siegenthaler et al., 1986). El primer aminoglucósido descubierto fue la estreptomina, aislado de *Streptomyces griseus* a principios de la década de 1940 (Schatz et al., 1944). Posteriormente, se caracterizaron otros aminoglucósidos tales como neomicina, kanamicina, gentamicina y amikacina (Begg and Barclay, 1995; Davies and Wright, 1997). Los aminoglucósidos actúan mediante su fijación a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano inhibiendo la síntesis proteica, lo que conduce finalmente a la muerte del microorganismo (Shakil et al., 2008).

Se han identificado varios mecanismos de resistencia a aminoglucósidos. Entre las enterobacterias, *armA* y *rmtB* son los más prevalentes (Doi et al., 2016; Granier et al., 2011), y en estos estudios hemos incluido *armA*, que actúa por metilación del sitio de unión del antibiótico en el ribosoma (sitio A del ARNr 16S) (Durante-Mangoni et al., 2009; Shakil et al., 2008).

1.4.3. Fagos, biomas humanos y la transferencia de ARGs

Teniendo en cuenta la gran abundancia de fagos infectando todo tipo de géneros bacterianos en una gran diversidad de ambientes, incluyendo el cuerpo humano, puede preverse que las partículas fágicas desempeñen un papel claro en la regulación de las poblaciones bacterianas, que podría tener un impacto en la salud humana (Manrique et al., 2016); provean un mecanismo de intercambio genético que contribuya a la evolución de las células bacterianas en el cuerpo humano (Dalmasso et al., 2014); o que incluso puedan afectar a las bacterias presentes en muestras clínicas humanas, interfiriendo de esta manera con el diagnóstico microbiológico de diversas patologías infecciosas (Navarro and Muniesa, 2017).

Además, hay que considerar que los fagos pueden contribuir a la movilización y dispersión de genes altamente relacionados con virulencia y, entre ellos, genes de resistencia a antibióticos, que son el principal problema de salud del siglo XXI, contribuyendo así a la emergencia de nuevas cepas virulentas.

Por todo ello, esta tesis doctoral se centra en el estudio de bacteriófagos en diversos biomas humanos, la interferencia que pueden tener en pruebas diagnósticas clínicas y su papel como vehículos de movilización de ARGs en dos biomas humanos, el tracto digestivo y el tracto respiratorio, este último focalizándonos en pacientes con fibrosis quística.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis fue evaluar la presencia de los bacteriófagos en biomas humanos. Específicamente, se evaluó en primer lugar la interferencia que pueden tener en pruebas de diagnóstico clínico y, en segundo lugar, su papel como reservorios y vehículos en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos (ARGs). A continuación, se detallan los objetivos específicos:

2.1. Capítulo 1: Los bacteriófagos presentes en muestras clínicas pueden interferir con las herramientas de diagnóstico microbiológico.

- Determinar la presencia e infectividad de bacteriófagos en diversas muestras clínicas.
- Confirmar e identificar morfológicamente los fagos presentes en las muestras.
- Describir la interferencia de los bacteriófagos con el aislamiento bacteriano a partir de muestras clínicas.

2.2. Capítulo 2: Genes de resistencia a antibióticos en partículas fágicas aisladas de heces humanas e inducidas de aislamientos bacterianos clínicos.

- Detectar y cuantificar ARGs en la fracción de ADN fágico de muestras fecales humanas.
- Aislar cepas bacterianas portadoras de ARG a partir de muestras fecales humanas y evaluar su capacidad para producir partículas fágicas portadoras de ARGs.
- Confirmar y cuantificar las partículas fágicas portadoras de ARG inducidas de cultivos bacterianos mediante microscopía y qPCR.

2.3. Capítulo 3: El fagoma fecal de individuos sanos y las variaciones causadas por el tratamiento con ciprofloxacina.

- Secuenciar el viroma de las muestras fecales mediante la tecnología Illumina MiSeq.
- Detectar y cuantificar ARGs en la fracción de ADN fágico de las muestras fecales y comparar con los resultados de metagenómica.
- Evaluar cambios producidos en el viroma de las heces de un individuo sano antes y después de un tratamiento con ciprofloxacina.

2.4. Capítulo 4: Genes de resistencia a antibióticos en partículas fágicas aisladas de esputos de pacientes con fibrosis quística.

- Diseñar un protocolo para la extracción y purificación de ADN fágico a partir de muestras de esputo de pacientes con fibrosis quística.
- Detectar y cuantificar ARGs en la fracción de ADN fágico de muestras de esputo.
- Confirmar la presencia de fagos infecciosos portadores de ARG en las muestras de esputo mediante pruebas de infectividad, microscopía y qPCR (microscopía).

3. PUBLICACIONES

3.1. Listado de publicaciones

La presente tesis doctoral está basada en los siguientes artículos:

- 1) **Brown-Jaque M, Muniesa M & Navarro F**. 2016. Bacteriophages in clinical samples can interfere with microbiological diagnostic tools. *Sci Rep*. 6:33000.
- 2) **Brown-Jaque M, Calero-Cáceres W, Espinal P, Rodríguez-Navarro J, Miró E, González JJ, Cornejo T, Hurtado JC, Navarro F, Muniesa M**. 2018. Antibiotic resistance genes in phage particles isolated from human feces and induced from clinical bacterial isolates. *Int J Antimicrob Agents*. 51(3): 434-442.
- 3) **Fernández-Orth D, Miró E, Brown-Jaque M, Espinal P, Rodríguez-Navarro J, Gonzalez-Lopez JJ, Muniesa M, Navarro F**. 2018. Fecal phageome of healthy individuals and variations caused by ciprofloxacin treatment. *J Antimicrob Chemother*. Sometido por segunda vez en octubre de 2018 y actualmente en segunda revisión.
- 4) **Brown-Jaque M, Rodríguez Oyarzun L, Cornejo-Sánchez T, Martín-Gómez MT, Gartner S, de Gracia J, Rovira S, Alvarez A, Jofre J, González-López JJ, Muniesa M**. 2018. Detection of bacteriophages particles containing antibiotic resistance genes in the sputum of cystic fibrosis patients. *Front Microbiol*. 9:856.

3.2. Informe de participación de la doctoranda en los artículos presentados

Brown-Jaque M, Muniesa M & Navarro F. 2016. Bacteriophages in clinical samples can interfere with microbiological diagnostic tools. *Sci Rep.* 6:33000.

La doctoranda realizó parte del trabajo experimental que incluyó la purificación de bacteriófagos a partir de las muestras, los ensayos de infectividad y enumeración de bacteriófagos y los estudios de microscopía electrónica. También participó en el análisis y procesamiento de los datos obtenidos, así como en la redacción del artículo y la elaboración de la tabla y las figuras. Finalmente, ha colaborado en la difusión de estos resultados en un congreso internacional.

Brown-Jaque M, Calero-Cáceres W, Espinal P, Rodríguez-Navarro J, Miró E, González JJ, Cornejo T, Hurtado JC, Navarro F, Muniesa M. 2018. Antibiotic resistance genes in phage particles isolated from human feces and induced from clinical bacterial isolates. *Int J Antimicrob Agents.* 51(3): 434-442.

La doctoranda participó en la recogida y transporte de las muestras, y en el diseño de los cebadores y la sonda para la qPCR del gen *bla_{OXA-48}*. Además, llevó a cabo gran parte del trabajo experimental (ensayos de inducción, extracciones de ADN fágico y su cuantificación por qPCR, purificación de bacteriófagos por gradientes de CsCl y su posterior observación por microscopía electrónica). Ha contribuido en el análisis de resultados y procesamiento de los datos obtenidos, en la redacción del artículo y en la elaboración de tablas y figuras.

Fernández-Orth D, Miró E, Brown-Jaque M, Espinal P, Rodríguez-Navarro J, Gonzalez-Lopez JJ, Muniesa M, Navarro F. 2018. Fecal phageome of healthy individuals and variations caused by ciprofloxacin treatment. *J Antimicrob Chemother.* Sometido por segunda vez en octubre de 2018 y actualmente en segunda revisión.

La doctoranda participó en la recogida y transporte de las muestras, llevó a cabo las extracciones de ADN fágico y los ensayos de qPCR, y colaboró activamente tanto en la optimización del protocolo de purificación del ADN fágico como en la evaluación de la concentración y la pureza del ADN fágico que se requería para los estudios de metagenómica. Finalmente, ha contribuido en el análisis y procesamiento de los datos obtenidos, en la elaboración de tablas y en la redacción del artículo.

Brown-Jaque M, Rodriguez Oyarzun L, Cornejo-Sánchez T, Martín-Gómez MT, Gartner S, de Gracia J, Rovira S, Alvarez A, Jofre J, González-López JJ, Muniesa M. 2018. Detection of bacteriophages particles containing antibiotic resistance genes in the sputum of cystic fibrosis patients. *Front Microbiol.* 9:856.

La doctoranda colaboró en la recogida y transporte de las muestras. También fue la responsable de la purificación de bacteriófagos a partir de las muestras de esputo, que incluía la evaluación previa del protocolo que se usó para este fin, las extracciones de ADN fágico, las cuantificaciones de los genes del estudio por qPCR, los ensayos de infectividad, la purificación de bacteriófagos por gradientes de CsCl y los estudios de microscopía electrónica. Además, se encargó del diseño de los cebadores y la sonda para la qPCR de *bla_{VIM}*. Ha participado en el análisis y procesamiento de los datos obtenidos, el diseño de tablas y figuras, la redacción del artículo y en la difusión de estos resultados en varias ocasiones.

Ninguno de los coautores de los artículos ha utilizado los datos descritos en estas publicaciones para la elaboración de su tesis doctoral.

Dra. M. Muniesa

Dr. J. Jofre

Barcelona, julio de 2018

3.3. Informe sobre el factor de impacto de los artículos publicados

El artículo ***Bacteriophages in clinical samples can interfere with microbiological diagnostic tools*** fue publicado online el 9 de septiembre de 2016 en la revista *Scientific Reports*. Desde el año 2016, esta revista está incluida en el primer cuartil (Q1) del área temática *Multidisciplinary Sciences* (10/64) con un factor de impacto de 4.259. Hasta el momento de la presentación de este informe, este artículo ha sido citado 5 veces según Web of Science y 8 veces según Google Academics.

El artículo ***Antibiotic resistance genes in phage particles isolated from human feces and induced from clinical bacterial isolates*** fue publicado online el 24 de noviembre de 2017 en la revista *International Journal of Antimicrobial Agents*, que está incluida en el primer cuartil (Q1) de las áreas temáticas *Infectious Disease* (14/84), *Microbiology* (23/125) y *Pharmacology and Pharmacy* (35/257), con un factor de impacto de 4.307 para el año 2016. Hasta el momento de la presentación de este informe, este artículo ha sido citado 1 vez según Web of Science y 2 veces según Google Academics.

El artículo ***Fecal phageome of healthy individuals and variations caused by ciprofloxacin treatment*** fue sometido por segunda vez el 12 de octubre de 2018 en la revista *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* y actualmente se encuentra en segunda revisión. Esta revista está incluida en el primer cuartil (Q1) de las áreas temáticas *Infectious Diseases* (9/84), *Microbiology* (20/125) y *Pharmacology and Pharmacy* (23/257), con un factor de impacto de 5.071 en el año 2016.

Por ultimo, el artículo ***Detection of bacteriophages particles containing antibiotic resistance genes in the sputum of cystic fibrosis patients*** fue publicado online el 1 de mayo de 2018 en la revista *Frontiers in Microbiology*. Desde el año 2016, esta revista está incluida en el primer cuartil (Q1) del área temática *Microbiology* (26/125) con un factor de impacto de 4.076.

Dra. M. Muniesa

Dr. J. Jofre

Barcelona, julio de 2018

4. RESULTADOS

4.1. CAPÍTULO 1:

Los bacteriófagos presentes en muestras clínicas pueden interferir con las herramientas de diagnóstico microbiológico

Los bacteriófagos presentes en muestras clínicas pueden interferir con las herramientas de diagnóstico microbiológico

Bacteriophages in clinical samples can interfere with microbiological diagnostic tools.

Autores: **Maryury Brown-Jaque**, Maite Muniesa y Ferran Navarro

Revista: Scientific Reports, 2016 Sep 9; 6:33000

Introducción

Los bacteriófagos son virus bacterianos que usan la maquinaria de la célula huésped para replicarse (Adams, 1959). Una vez han infectado la célula, los fagos virulentos siguen exclusivamente un ciclo lítico mientras que los fagos atemperados pueden seguir un ciclo lítico o lisogénico (Campbell, 2003).

Es innegable que los bacteriófagos son las entidades más abundantes del planeta y así mismo, están presentes en prácticamente todos los ecosistemas naturales incluyendo el cuerpo humano (Abeles and Pride, 2014; Eckburg et al., 2005). Este hecho ha despertado gran interés en el papel que pueden desempeñar en los sistemas microbianos, tanto en la regulación de la densidad y diversidad de las poblaciones bacterianas (Winter et al., 2004) como en la transferencia genética horizontal por medio de la transducción (Fortier and Sekulovic, 2013). Adicionalmente, el uso de ciertos antibióticos puede favorecer e incluso aumentar la transducción, dado que algunos antibióticos pueden producir la inducción del ciclo lítico de los profagos (Colomer-Lluch et al., 2014).

En consonancia con la demostrada abundancia y ubicuidad de los fagos, los cultivos de laboratorio de muestras clínicas no están exentos de contaminación con fagos. Según se ha reportado anteriormente, la presencia de fagos puede sesgar los resultados de los cultivos de enriquecimiento gracias a que pueden propagar en las bacterias que se pretende enriquecer, lisándolas en el proceso, lo que posteriormente puede interferir con el aislamiento y la caracterización de las mismas bacterias que se quiere aislar (Abedon, 2012; Dunbar et al., 1997; Muniesa et al., 2005; Quirós et al., 2015).

En la actualidad, algunos métodos de diagnóstico microbiológico emplean pasos previos de enriquecimiento en medios de cultivo líquidos con el fin de mejorar la sensibilidad analítica y a su vez, favorecer el crecimiento del patógeno diana por medio del uso de medios de cultivos selectivos. También se han desarrollado herramientas moleculares basadas en la detección directa del ácido nucleico del

patógeno en muestras clínicas y aunque estos métodos facilitan y aceleran el diagnóstico, algunos requieren pasos preliminares de enriquecimiento del microorganismo diana (Carrara et al., 2013).

Aunque ya es evidente que los cultivos de enriquecimiento líquido tienden al sesgo debido al crecimiento bacteriano diferencial (Dunbar et al., 1997; Muniesa et al., 2005), la interferencia de fagos presentes en la muestra podría ser un factor clave a considerar como sesgo adicional de los resultados de cultivo. Nuestros resultados confirmaron la presencia de fagos en muestras de orina y líquido ascítico constituyendo evidencia directa que respalda la interferencia de bacteriófagos con herramientas de diagnóstico microbiológico.

Objetivos

Los objetivos que se plantearon en este estudio fueron los siguientes:

- Determinar la presencia de bacteriófagos en placas de antibiograma y varios tipos de muestras clínicas.
- Evaluar la infectividad de los fagos que pudieran estar presentes en las placas de antibiogramas y las muestras clínicas incluidas en el estudio.
- Confirmar e identificar morfológicamente los fagos presentes en las muestras analizadas.
- Analizar la interferencia de los bacteriófagos con el aislamiento bacteriano a partir de muestras clínicas.

Resultados y discusión

Para evaluar la presencia de fagos en muestras clínicas, se analizaron muestras de sangre, orina, líquido ascítico, líquido cefalorraquídeo (LCR) y suero recolectadas de 65 pacientes con infecciones bacterianas potenciales que acudían al Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, España). Además, se seleccionaron 5 placas de antibiograma que presentaban áreas de crecimiento bacteriano confluyente con pequeñas zonas sin crecimiento compatibles con calvas de lisis, para la búsqueda de indicios de la presencia de fagos (Figura 1).

Se obtuvieron suspensiones a partir de las placas de antibiograma con zonas de lisis, que después de ser filtradas y tratadas con cloroformo, se usaron para hacer test de la gota, enumeración de fagos y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Los test

de la gota confirmaron la presencia de fagos infecciosos en las cinco suspensiones (Figura 2.1), y después de diluciones decimales seriadas de cada suspensión, se observaron calvas de lisis por el método de doble capa de agar alcanzando títulos de hasta 10^8 UFP/ml (Figura 2.2). Por microscopía electrónica, se visualizaron fagos de morfología *Siphoviridae* (Figura 2.3).

En las muestras clínicas no se detectaron fagos en LCR, sangre y suero. Sin embargo, se confirmaron fagos en el 46% de las muestras directas de orina y líquido ascítico (Tabla 1, muestras directas). Además, se recuperaron fagos de la superficie de placas de agar ChromID® CPS® inoculadas con orina y de cultivos líquidos inoculados con líquido ascítico (Tabla 1). Estas muestras contenían partículas fágicas que fueron visualizadas por microscopía electrónica con capacidad de infectar *Escherichia coli* WG5 y *Shigella sonnei* 866, cepas huésped seleccionadas en este estudio por su susceptibilidad a un amplio rango de bacteriófagos (Muniesa et al., 2004a).

En algunos casos, no se detectó la presencia de fagos infecciosos sobre las dos cepas huésped mencionadas anteriormente por lo que no se descarta que el uso de otro género bacteriano, o incluso otras cepas de *E. coli*, podría haber proporcionado resultados adicionales, como es el caso de los fagos de *Bacteroides* en muestras de suero animal (Keller and Traub, 1974).

El tipo morfológico más comúnmente observado fue *Siphoviridae* en un total de 21 muestras de 25 que presentaron fagos (Figura 3). También se observaron fagos de morfología *Podoviridae* (2 muestras directas y una proveniente de propagación sobre *E. coli* WG5) y *Myoviridae* (2 muestras). Una de las muestras analizada directamente contenía fagos *Siphoviridae*, y luego de ser propagada en *E. coli* WG5, reveló una segunda morfología fágica del tipo *Myoviridae* (Figura 3B, C).

Se estudiaron tres casos claros de interferencia de fagos con el aislamiento bacteriano dirigido al diagnóstico clínico. En el primer caso, los fagos presentes en una muestra de orina no permitían un crecimiento bacteriano confluyente requerido para las placas de antibiograma (Figura 4B). Esto sucedía cuando el inóculo era tomado a partir de una placa de agar que contenía potenciales calvas de lisis y, por tanto, fagos (Figura 4A, flecha 1). Sin embargo, cuando se partía de una única colonia proveniente de un área libre de fagos (Figura 4A, flecha 2), se obtenía una placa con crecimiento confluyente sin problemas.

En el segundo caso, se aisló *E. coli* directamente de dos muestras de líquido ascítico provenientes del mismo paciente. Sin embargo, tras hacer un enriquecimiento líquido

de las mismas muestras, fue imposible aislar el microorganismo, lo que se atribuyó a que la propagación de los fagos presentes en las muestras pudo haber ocasionado la lisis del patógeno. Se confirmó la presencia de fagos en ambas muestras de líquido ascítico capaces de infectar los aislamientos de *E. coli* y, además, se visualizaron partículas fágicas por microscopía electrónica en ambas muestras y en los cultivos de enriquecimiento.

En el tercer y último caso, se observaron bacilos Gram-negativos mediante microscopio óptico en un sedimento de una muestra de orina (Figura 5A). Sin embargo, se obtuvo un escaso crecimiento bacteriano en placas de agar (Figura 5B) de este sedimento, que no se correspondía con la observación previa. Esta discrepancia se atribuyó a la presencia de fagos infecciosos en la muestra, que lisaban las células impidiendo su crecimiento en placa. La alta densidad de fagos en la muestra de orina fue confirmada también por TEM, así como la susceptibilidad de la bacteria aislada de las escasas colonias que se obtuvieron de la placa.

Basándose en el creciente aumento de estudios sobre la abundancia de los bacteriófagos en el cuerpo humano (Abeles and Pride, 2014; Breitbart et al., 2003; Calci et al., 1998; D'Hérelle, 1917; Dinakaran et al., 2014; Letarov and Kulikov, 2009; Mankiewicz and Liivak, 1967; Martínez-Castillo et al., 2013; Oh et al., 2014; Quirós et al., 2014; Reyes et al., 2010; Santiago-Rodríguez et al., 2015b; Willner et al., 2009), es razonable asumir que así como las bacterias pueden translocarse en diferentes partes del cuerpo humano por ciertas vías, los bacteriófagos también podrían hacerlo, tal como se sugirió hace ya algunos años (Górski et al., 2006). Esta translocación fágica es una posible explicación a las observaciones reveladas en este estudio, que introducen la presencia de los fagos como un nuevo factor adicional a considerar en el panorama de las inconsistencias en el diagnóstico clínico microbiológico.

Podría pensarse que una buena alternativa al uso de métodos de diagnóstico microbiológico que requieren enriquecimiento líquido son las metodologías moleculares basadas en la detección de un gen específico o incluso ADNr 16S, ya que no necesitan más que el ADN bacteriano que pueda quedar en la muestra aún después de la lisis de las bacterias ocasionada por fagos.

Sin embargo, es sumamente importante tener en cuenta que tanto los fagos como los elementos relacionados con fagos pueden empaquetar ADN bacteriano y movilizarlo (Colomer-Lluch et al., 2011b; Fineran et al., 2009; Fortier and Sekulovic, 2013; Marti et al., 2014; Martínez-Castillo and Muniesa, 2014). La movilización de un gen bacteriano interferiría así con la detección molecular de ese gen propio del patógeno, ya que se

obtendrían resultados positivos del gen detectado sin que el microorganismo estuviera realmente presente (Martinez-Castillo et al., 2013). Los métodos de extracción de ADN más comunes no pueden distinguir entre fagos y bacterias sin la aplicación de un pretratamiento adecuado que permita eliminar dichos fagos (Quirós et al., 2015).

Conclusiones

- Los datos presentados en este estudio indican que algunas muestras clínicas portan fagos que pueden sesgar el resultado del análisis clínico.
- Se sugiere explorar métodos de eliminación de virus para reducir significativamente o eliminar fagos en muestras donde se sospecha su presencia, y así contribuir a la recuperación eficiente de aislamientos bacterianos que encamine hacia un diagnóstico microbiológico correcto.

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Bacteriophages in clinical samples can interfere with microbiological diagnostic tools

Maryury Brown-Jaque¹, Maite Muniesa¹ & Ferran Navarro²

Received: 09 May 2016

Accepted: 18 August 2016

Published: 09 September 2016

Bacteriophages are viruses that infect bacteria, and they are found everywhere their bacterial hosts are present, including the human body. To explore the presence of phages in clinical samples, we assessed 65 clinical samples (blood, ascitic fluid, urine, cerebrospinal fluid, and serum). Infectious tailed phages were detected in >45% of ascitic fluid and urine samples. Three examples of phage interference with bacterial isolation were observed. Phages prevented the confluent bacterial growth required for an antibiogram assay when the inoculum was taken from an agar plate containing lysis plaques, but not when taken from a single colony in a phage-free area. In addition, bacteria were isolated directly from ascitic fluid, but not after liquid enrichment culture of the same samples, since phage propagation lysed the bacteria. Lastly, Gram-negative bacilli observed in a urine sample did not grow on agar plates due to the high densities of infectious phages in the sample.

Bacteriophages, also known as phages, are bacterial viruses that infect and multiply using the machinery of the host bacteria¹. Phages can follow lytic or lysogenic pathways, resulting in different infection outcomes. Virulent phages only follow a lytic cycle, which begins with phage attachment to the host cell receptor, followed by injection of its nucleic acid, replication of the nucleic acid, and synthesis of capsid proteins. Capsid proteins assemble with one copy of the nucleic acid to form new viral particles, which are released by causing lysis of the host cell. In contrast, following attachment and injection of the nucleic acid into the cell, temperate phages can follow either a lytic or lysogenic cycle². In the lysogenic cycle, the phage inserts its DNA into the chromosome of the bacterium and remains in a latent state (prophage) until various external conditions induce the prophage to revert to the lytic cycle.

The recognition that phages are abundant and pervasive components of many natural environments, including the human body^{3,4}, has stimulated considerable interest in their role in microbial systems, both in regulating bacterial population density and diversity⁵ and in horizontal gene transfer⁶. In addition, there are diverse opinions on the role of phages in the homeostasis of intestinal bacterial flora and other microbiota of the human body^{3,7}. Since many of the viruses detected in humans are phages³, their interactions with their cellular hosts are undeniable. Moreover, phages can mobilize genetic material by transduction, defined as phage-mediated transfer of bacterial DNA between two bacterial cells, and the use of certain antibiotics, such as beta-lactamases or quinolones, can favor and even increase genetic transduction by activating the induction of prophages⁸.

Given their abundance and ubiquity, there is a risk of phages contaminating laboratory cultures of clinical samples. Previous studies performed with enteric bacteria^{9–11}, including studies in the area of phage therapy¹², have indicated that the presence of phages may bias the results of enrichment cultures, where they can propagate and subsequently interfere with bacterial isolation and identification.

Some microbiological diagnosis methods applied in clinical samples are based on enriched liquid culture media (using standardized culture broths for blood, ascitic fluid, etc.), some of which (e.g. Selenite-F broth, Alkaline Peptone Water) also contain selective substances. Liquid enrichment cultures are used to increase sample volume in order to enhance analytical sensitivity, and the use of selective substances in these liquid enrichment cultures can favor the growth of the target pathogen in samples containing many other microorganisms.

Several molecular approaches based on direct detection of pathogen nucleic acid in the clinical sample have also been developed. Although these methods facilitate and accelerate diagnosis of infectious processes, some of

¹Department of Microbiology, University of Barcelona, Diagonal 645, Annex, Floor 0, 08028 Barcelona, Spain.

²Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Sant Quintí 89, 08041 Barcelona, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.M. (email: mmuniesa@ub.edu) or F.N. (email: fnavarror@santpau.cat)

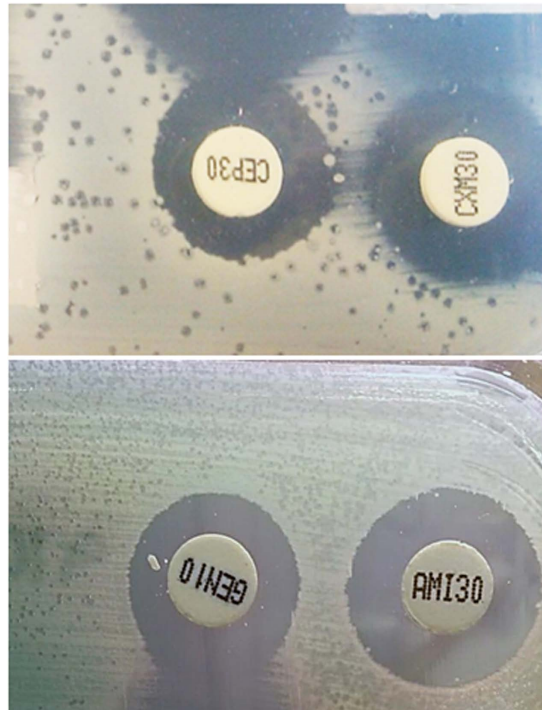


Figure 1. Phages on antibiogram plates. Two examples of antibiogram agar plates showing areas of confluent bacterial growth, with spots consistent with phage lysis plaques.

them require preliminary steps to enrich the target microorganisms¹³. Even in molecular approaches to antibiotic susceptibility testing or epidemiological studies, it remains essential to culture pathological specimens in order to isolate and identify the causative pathogen.

It is clear that liquid enrichment cultures are prone to bias due to differential bacterial growth^{9,11}, and we hypothesized that the interference of phages present in samples might potentially be a key factor in skewing culture results.

In clinical microbiology practice, it is not unusual to observe lysis spots consistent with phage plaques in the confluent bacterial growth on agar plates used for antibiogram assays, or even in the culture plates (Fig. 1). This observation formed the rationale for this study and prompted our hypothesis. We asked two research questions: *i*) are phages normally present in sterile human clinical samples? and *ii*) to what extent may cultured bacteria be affected by the presence of phages in the sample? Our results confirmed the presence of phages in urine and ascitic samples first analyzed directly and then following enrichment culture. Phage interference with microbiological diagnostic tools was supported by direct evidence.

Results

Occurrence of phages in antibiogram agar plates. To confirm that the lysis spots observed in the antibiogram agar plates from urine samples (Fig. 1) were produced by phages, five plates (A to E) were selected and a 2 cm² area of the plate area containing the spots was recovered and resuspended in PBS buffer. Suspensions were filtered and chloroform-treated, and then used for spot tests, phage enumeration, and electron microscopy. Four plates contained *E. coli* growth (A-D), while one corresponded to *P. aeruginosa* (E). *E. coli* WG5 was used as the host for phages in plates A-D and *P. aeruginosa*, isolated from the same plate and pure-cultured after three passages, was used as the host for phages in plate E. The spot test confirmed the presence of infectious phages in all five suspensions (Fig. 2.1), and after decimal dilution, lysis plaques were observed in the double agar layer (Fig. 2.2). All plates contained phages with *Siphoviridae* morphology (Fig. 2.3).

Occurrence of phages in clinical samples. To further evaluate the presence of phages in normally sterile clinical samples, blood, urine, ascitic fluid, CSF and serum were analyzed. No phages were detected in blood, CSF or serum samples either by infectivity assays or electron microscopy. In contrast, 46.1% of urine samples 45.8% of ascitic fluid samples carried phages (Table 1, direct samples). In addition to these, phages were recovered from the surface of CPS agar plates inoculated with urine samples and from liquid cultures inoculated with ascitic liquids (Table 1).

The samples contained phages that infected *E. coli* WG5 and *S. sonnei* 866, as revealed using the spot test, or phage particles as observed by electron microscopy. Given that a positive spot test could be caused by factors other than phages, and that some spot tests showed weak lysis, phages were isolated from the lysis zone, diluted and enumerated by the double agar layer method, and those showing lysis plaques were confirmed.

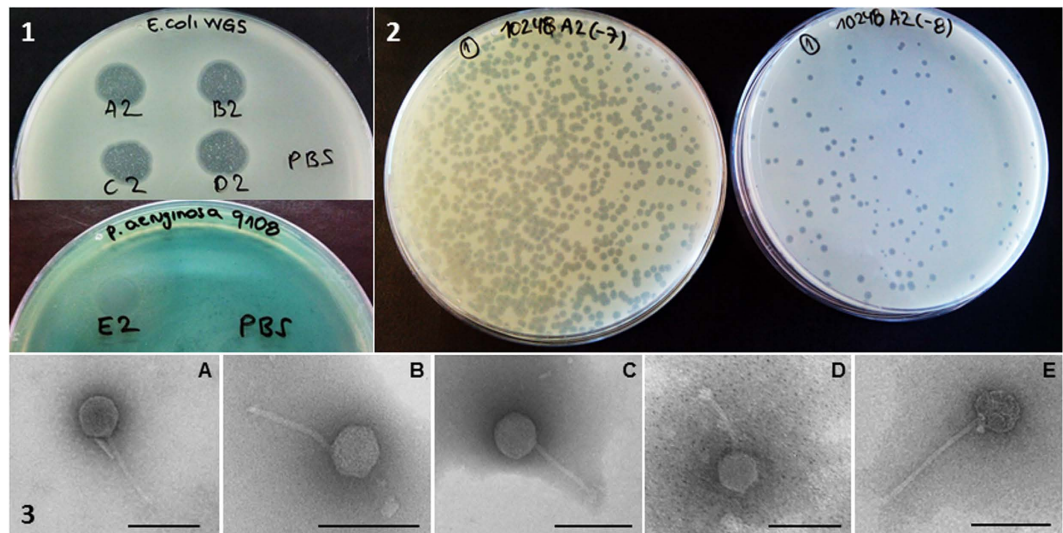


Figure 2. Occurrence of phages in clinical samples. Lysis plaques obtained from the suspension of antibiogram plates of urine cultures. 2.1: Spot tests of suspensions of samples A–D in *E. coli* WG5 and E in *P. aeruginosa*. PBS control. **2.2:** Lysis plaques observed by the double agar layer method in *E. coli* WG5 in 10⁻⁷ and 10⁻⁸ dilutions of the suspension of plate A. **2.3:** Electron micrographs of phages from plates (A–E). Bar 100 nm.

Type of sample	Blood (6 samples)	Urine (16 samples)		Ascitic (26 samples)		CSF (7 samples)	Serum (10 samples)
	Liquid culture	Direct	Agar plate	Direct	Liquid culture	Direct	Direct
n	6	13	5	24	5	7	10
Presence of infectious phages ^a	0	10	5	16	3	0	0
Presence of phage particles ^b	0	6	5	11	3	0	0
Positive for both techniques	—	6	5	11	3	—	—
% confirmed positive	0	46.1	100	45.8	60.0	0	0

Table 1. Summary of types of samples analyzed and those testing positive for the presence of phages directly from the samples or from the agar plates or the liquid cultures where the samples were inoculated. ^aAnalyzed by spot test and confirmed by the double agar layer method using host strains *E. coli* WG5. ^bAnalyzed by TEM directly from the samples or recovered from the spot test lysis area.

Not all samples revealed infectious phages on *E. coli* WG5 and *S. sonnei* 866, the host strains selected for their susceptibility to a wide range of phages¹⁴. The *E. coli* WG5 strain was more sensitive to the phages tested and results in Table 1 were obtained with this strain. It cannot be ruled out that the use of other bacterial genera would have provided additional results, as shown for phages of *Bacteroides* in animal sera samples¹⁵.

Some samples analyzed directly gave a positive spot test, but phages were not subsequently observed under the electron microscope. In these cases, phages were taken from the spot test area where propagation had occurred, instead of directly from the sample, and in many instances the number of particles increased to reach the required levels (minimum of 10⁷ particles/ml) for microscopic visualization, allowing a positive confirmation. However, a few samples with a positive spot test still did not show any viral particles by microscopy of phages recovered from the lysis area (Table 1).

Morphological types of phages in the samples. Twenty-five samples showed phages, the most common morphological type being *Siphoviridae* (21). Two (one urine and one ascitic fluid sample) showed *Podoviridae* morphology. A *Podoviridae* phage from one of the ascitic fluid samples was recovered after propagation in *E. coli* WG5 (Fig. 3A). Two urine samples showed phages with *Myoviridae* morphology. One of these urine samples showed *Siphoviridae* phages when analyzed directly, but after propagation on *E. coli* WG5 revealed a second *Myoviridae* phage, which was propagated in WG5 to reach the necessary concentration (Fig. 3B,C).

Interference of phages in bacterial strain recovery. Bacteria were isolated in some of the samples. Three blood cultures showed *E. coli*, *Enterobacter cloacae* or *Staphylococcus epidermidis*, respectively. Phages were not detected in any blood samples. *E. coli* was detected in 11 urine samples and *Citrobacter koseri* and *P.*

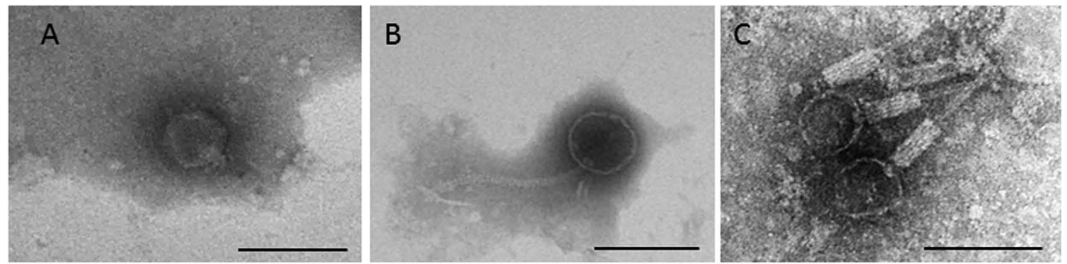


Figure 3. Morphological types of phages observed in samples. (A) *Podoviridae* from an ascitic fluid sample after propagation in WG5. (B) *Siphoviridae* and C: *Myoviridae* from a urine sample. (B,C) correspond to the same urine sample, which when processed directly showed only B and when enriched showed both. Bar 100 nm.

aeruginosa in another urine sample. Seven of these samples carried phages, but since no liquid culture was performed, no interference was expected.

However, we did find three examples of phage interference.

The first example corresponds to two ascitic fluid samples, both from the same patient which were processed in parallel by inoculation on agar plates and by liquid culture under aerobic and anaerobic conditions. *E. coli* was isolated from agar plates of both samples, but surprisingly, it was not detected after propagation in liquid cultures. Suspecting that phages had caused bacterial lysis during propagation in the liquid culture, but not in the agar plate, we attempted to detect phages in the samples, on the surface of the agar plate and in the supernatant of the aerobic and anaerobic liquid cultures. Phages corresponding to the *Podoviridae* and *Siphoviridae* morphological types were detected in the direct samples and in the corresponding supernatants of the aerobic liquid culture. No phages were isolated from the surface of the agar plates, probably because of the low densities of phages transferred from the samples. No phages were detected in the supernatant of anaerobic cultures either, probably because of the slow growth of the strain or the anaerobic conditions, which did not support good phage replication.

The second example of interference was in a urine sample inoculated on chromID™ CPS® Elite plates (CPS plates). The confluent area showed lysis plaques consistent with the presence of phages (Fig. 4A). From this, an inoculum was taken from a colony close to the inoculation zone (Fig. 4A, arrow 1) to perform an antibiogram test. This culture was only 14 hours old and the colonies were small. The resulting antibiogram plate (Fig. 4B) showed a very poor growth of colonies, with an apparent confluent lysis. In a second test conducted 18 hours later, a single colony far from the inoculation zone (Fig. 4A, arrow 2) was taken from the CPS plate and used to inoculate a new plate, which this time yielded growth suitable for the antibiogram test (Fig. 4C). *Podoviridae*-type phages (Fig. 4D) were detected in the original urine sample and were also recovered from the surface of the first antibiogram plate (Fig. 4B), but not from the second (Fig. 4C).

A third example of interference was in a urine sample obtained from a patient who had received ciprofloxacin and levofloxacin three weeks prior to the infection process, but no subsequent antimicrobial treatment before sample collection. The sediment of this urine showed 10–25 white blood cells per high-power field and abundant Gram-negative bacilli were observed by Gram staining (Fig. 5A), suggesting the presence of more than 10^5 colony-forming units per milliliter of urine (cfu/mL). Nevertheless, only 14 *E. coli* colonies grew on the CPS plate ($1.4 \cdot 10^3$ cfu/mL), which clearly did not correspond to the Gram stain observation. Based on the low cfu counts on the CPS plates, this sample would have been considered negative for *E. coli* were it not for the sediment analysis results. One of these colonies was used for the antibiogram agar plate, which revealed lysis plaques consistent with phages (Fig. 5B), leading us to suspect that phages in the urine sample had induced lysis of the bacteria when inoculated on the CPS plate. To confirm this, the surface of the CPS plate was washed in 3 ml PBS buffer, and the suspension was chloroform-treated and observed under the electron microscope. Observations revealed phages of *Siphoviridae* morphology (Fig. 5C) at densities higher than 10^7 particles/ml of sample (the level required for electron microscopy observations), which were probably responsible for lysis of the bacteria growing on the CPS plate. Moreover, phages isolated from the CPS agar plate were confirmed as infectious by the spot test on the *E. coli* strain isolated from the CPS plate and pure-cultured after three passages. The phages, isolated further from the spot test area, were of the same *Siphoviridae* morphology.

Discussion

An increasing amount of data on the diversity and abundance of phages in human bodies is becoming available. Most work in this field has focused on the digestive tract^{3,16,17} and on feces, where the first phages were isolated in the 20th century^{18,19}, and many studies have recently been reported^{20–23}. Nevertheless, it is also well accepted that phages are found in other biomes of the human body; for example, phages, phage DNA, or virus-like particles have been described in the skin²⁴ and mouth²⁵. In patients with cystic fibrosis, phages have been reported in the respiratory tract²⁶, and higher concentrations of phage DNA are found in blood of cardiovascular disease patients than in healthy individuals²⁷.

Phages are known to act as regulators of bacterial populations in the intestinal tract^{3,28}, a role they might also play in other biomes within the human or animal body, although knowledge of the true extent of phages could be hampered by the inter- and intra-individual heterogeneity of the samples analyzed. It is nevertheless reasonable to assume that in the same way than bacteria can translocate from gateways in different parts of the human body,

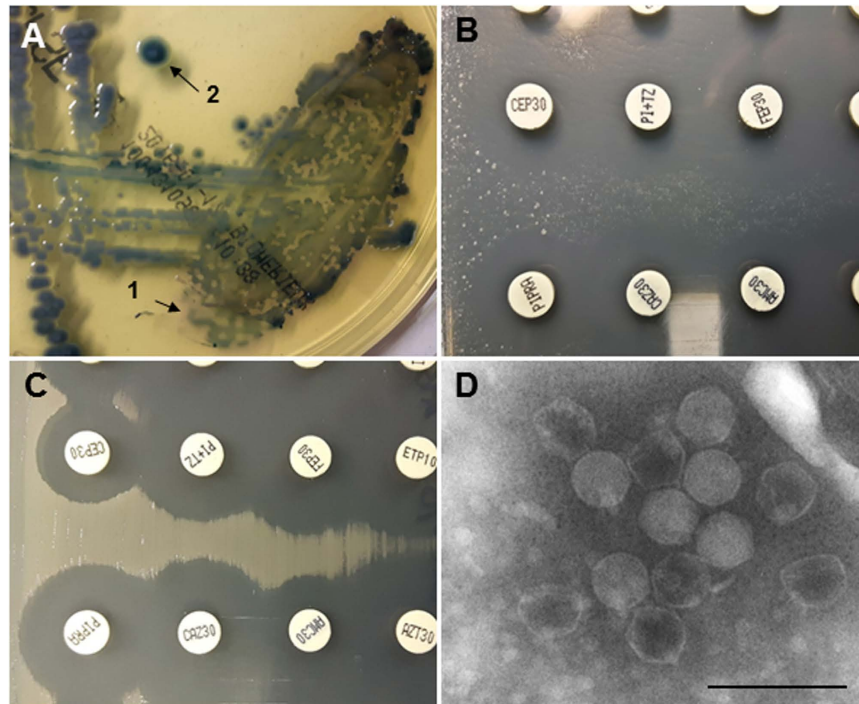


Figure 4. Interference of phages in antibiogram plates. (A) ChromID™ CPS® Elite plate of a urine sample; (B) antibiogram agar plate inoculated directly from a colony close to the inoculation zone of this urine sample (arrow 1 in Fig. 4A); (C) antibiogram from an isolated colony far from the inoculation zone of this urine sample (arrow 2 in Fig. 4A). (A,B) show areas of confluent bacterial growth with spots consistent with phage lysis plaques but no spots were observed in (C). Bacteriophage of *Podoviridae* morphology isolated from (A,B). Bar 100 nm.

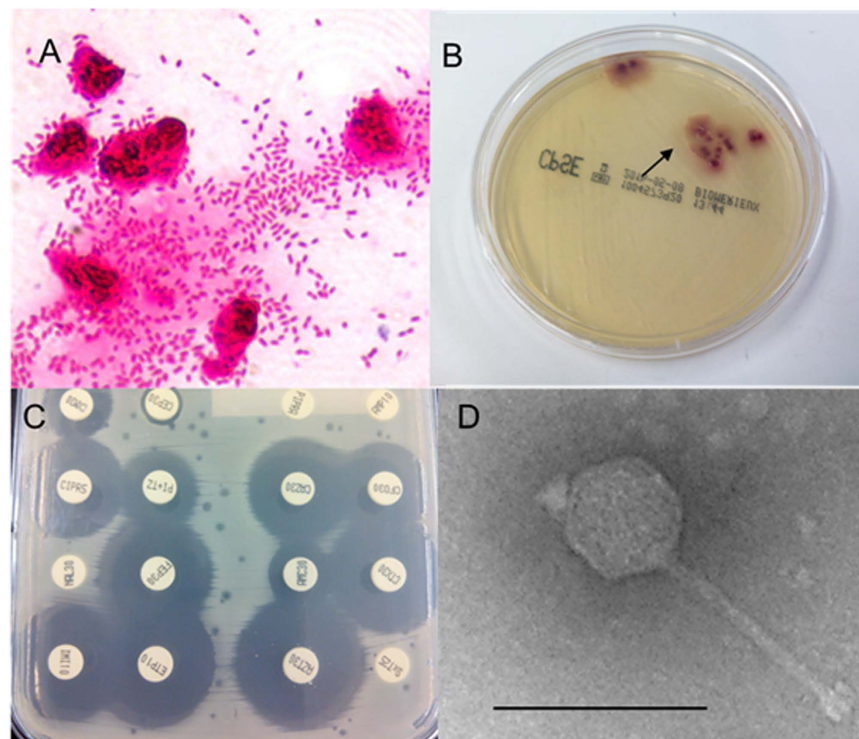


Figure 5. Interference of phages in bacterial isolation. (A) ChromID™ CPS® Elite plate of a urine sample; (B) Gram staining of the urine sediment; (C) antibiogram agar plate inoculated directly from a colony (arrow in B); (D) bacteriophage of *Siphoviridae* morphology isolated from A. Bar 100 nm.

translocation might occur also with bacteriophages, as suggested a few years ago²⁹. We propose phage translocation as a possible explanation for our observations in the present study. It is also possible that phages translocate alone, without accompanying bacteria, since many samples were found to carry phages without detectable bacteria. Phages can also be introduced when a sample is subjected to culture, interfering with microbiological diagnosis. This was confirmed to be the case for urine and ascitic fluid samples. CSF samples were expected to be negative because translocation should only occur there very rarely. There may be several explanations for the negative results obtained for blood and serum samples: *i*) the high protein content matrix may have disturbed microscopy observations and interfered with phage infectivity, even if using the right host strain; *ii*) phages are never present in blood or serum or only rarely; and *iii*) phage densities may have been too low to be detected by the methods used here. Nevertheless, the presence of phages in animal serum samples has been previously reported, although rarely¹⁵.

The bacteria and phage densities required for phage replication and subsequent destruction of the host cell^{30,31} can occur in some clinical samples. In our study, phages were directly observed by electron microscopy in many samples, indicating a minimum phage density of 10⁷ particles/ml of sample. Moreover, the physiological state of bacteria actively growing in a culture is optimal for phage replication³¹. Therefore, if the sample contains bacteria susceptible to infection by co-present phages, the bacterial densities achieved during enrichment could favor phage infection and replication, even when initial numbers are low. During replication, the increasing number of phages released by cell lysis can devastate a cultured bacterial population within a few hours, hence preventing isolation of the pathogen. This could account for the situation we observed in two ascitic fluid samples: *E. coli* was isolated from agar plates of both samples, but the liquid cultures tested negative for the bacteria, presumably due to lysis caused by propagation of the phages observed in the sample by electron microscopy.

Bias in the quantification of bacteria in enrichment cultures is frequently mentioned in the literature. This is typically manifested in discrepancies between the bacterial numbers detected by plating on solid medium, where phages cannot propagate so efficiently, and the counts obtained by the most probable number (MPN) method in liquid medium cultures, with surprisingly higher results obtained in agar plates than for MPN³². This bias cannot always be attributed to phages, which are not found in all samples, as shown in our study, and may not necessarily be able to propagate. Susceptible host bacteria might not be present, or might not be sufficiently metabolically active to allow phage replication. However, the contribution of phages is certainly a factor for consideration.

Phage interference when performing antibiograms has long been observed and documented¹⁵, but we noted that in some cases, the presence of phages (confirmed by electron microscopy) could even invalidate susceptibility studies. Also common in the literature are inconsistent results in microbiological diagnoses of various clinical samples (blood cultures, ascitic fluids, CSF, etc.) when a pathogen is detected and / or quantified by molecular methods (mostly PCR and qPCR) as opposed to isolation^{33,34}. Possible explanations include prior antibiotic therapy, competition with commensal bacteria in the sample, the pathogen being in a viable but not cultivable state, or simply that the target bacteria are present in very low amounts. Based on the present study, a new additional factor for consideration is the presence of phages.

One possible scenario is that phages can lyse bacteria, preventing their isolation, although bacterial DNA may still be present in the sample. Further implications can occur when using only molecular methods based on the detection of a specific gene, or even bacterial 16S rDNA. Phages, and phage-related elements, can cause packaging of bacterial DNA and mobilize it^{6,35–38}. The occurrence of free phage particles bearing this gene in a given clinical sample could consequently interfere with the molecular detection of the pathogen, because they could yield positive results of the gene detected by PCR without the bacterial pathogen actually being present. An example is Shiga toxin phages in enterohemorrhagic *E. coli*, found in abundance in human fecal samples as free viral particles in the absence of bacteria²¹. The DNA extraction methods cannot distinguish between phages and bacteria without a proper pretreatment to remove the phages¹⁰.

The data presented here indicate that at least some clinical samples carry phages and that these latter can bias the outcome of the clinical analysis. We suggest exploring methods for virus removal, such as filtration or the application of virucides, to reduce the presence of phages, where suspected, and contribute to more efficient recovery of bacterial isolates during microbiological diagnosis.

Methods

Samples. 6 blood, 16 urine, 26 ascitic fluid, 7 cerebrospinal fluid (CSF), and 10 serum samples were collected from 65 patients with a potential microbial infectious disease attending the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain). All samples were used after performing a conventional microbiological diagnosis and were completely anonymized. No data on patients were collected and samples were destroyed immediately after the study.

The presence of phages was evaluated, as described below, in liquid cultures of blood; directly or from agar plates for urine samples; directly or after liquid culture for ascitic samples; directly for CSF samples; directly for serums; and also from antibiogram agar plates (Table 1).

Liquid cultures. Samples were processed according to conventional protocols for isolating pathogenic bacteria³⁹. Using the BacT/ALERT blood culture system (BioMérieux, Marcy l’Etoile, France), an aerobic and an anaerobic BacT/ALERT blood culture bottle were each inoculated with 5–10 ml of ascitic fluid or blood at the bedside. The bottles were placed in the BacT/ALERT instrument, incubated for five days, and processed according to the manufacturer’s instructions. Each bottle was treated independently. Cultures were not performed with serum samples, which only underwent serological testing before being evaluated for the presence of phages.

Bacterial isolation. 25 µl of ascitic fluid and CSF was inoculated in Columbia agar containing 5% sheep blood (BioMérieux), chocolate agar PolyViteX (BioMérieux) and Schaedler agar containing 5% sheep blood

(BioMérieux). Cultures were incubated in 5% CO₂ (PolyViteX and Columbia agar plates) or in an anaerobic atmosphere (Schaedler agar plate) at 35 °C for 2–4 days and examined daily for visible growth. Direct ascitic fluid and CSF were also subjected to Gram staining.

ChromID™ CPS® Elite plates (BioMérieux) (CPS) were inoculated with 10 µl of urine samples, and plates were incubated aerobically at 35 °C for 24 hours. All samples previously underwent microscopic urine sediment analysis and Gram staining.

Bacteria were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Susceptibility studies of microorganisms were performed by disc diffusion antibiotic susceptibility testing⁴⁰.

Phage purification. 15 ml of blood liquid cultures, 10 ml of direct urine samples, 0.3–0.5 ml of CSF samples, 5 ml of either direct ascitic samples or liquid cultures of ascitic samples, and 5 ml of serum samples were used for phage purification. The volumes described above were filtered through low protein-binding 0.22-µm-pore-size membrane filters (Millex-GP, Millipore, Bedford, MA). When necessary, several filter units were used to filter the whole volume. If the volume was insufficient for filtration (e.g. CSF), it was raised to 2 ml with PBS and filtered. Filtered samples were treated with chloroform (1:10), vortexed for 2 min, and centrifuged at 16,000×g for 5 min. Initially, the supernatant of five ascitic liquid cultures was processed directly and after 100-fold concentration by means of protein concentrators (100 kDa Amicon Ultra centrifugal filter units, Millipore). However, we observed that the concentration step broke the phage tails and concentrated any element of a proteic nature in the sample, which disturbed electron microscopy observations. Therefore, the remaining samples were analyzed without concentration.

Infectivity of phages present in the samples. Laboratory strains of *E. coli* WG5 (ATCC 700078) and a clinical isolate *Shigella sonnei* 866¹⁴ were used as hosts for bacteriophage propagation. One isolate of *Pseudomonas aeruginosa* from one antibiogram plate and one *E. coli* isolate from a CPS agar plate were also used in this study as host strains for bacteriophage propagation.

Phage propagation was performed in solid culture (by a spot test or enumeration by the double agar layer technique) or liquid culture. For the spot test, 1 ml of target bacteria at OD₆₀₀ of 0.3 was mixed with Luria Bertrani (LB) semi-solid agar (0.7% agar), poured onto LB agar plates, and solidified at room temperature. 20 µl of phage suspension was spotted onto each of the plate surfaces, which were inspected for lysis zones after overnight incubation at 37 °C. Phage enumeration was performed by the double agar layer method as previously described¹. Liquid cultures were performed using 1 ml of host strain and 1 ml of phage suspension in 8 ml of LB broth and incubated overnight at 37 °C while gently shaking.

Phages were recovered from the lysis zones with a loop, suspended in 0.5 ml of PBS buffer, chloroform-treated, and used for electron microscopy studies. For phage suspensions obtained from liquid cultures, 2 ml of culture was filtered and chloroform-treated as described above.

Electron microscopy studies. 10 µl of phage suspensions were dropped onto copper grids with carbon-coated Formvar films and negatively stained with 2% ammonium molybdate (pH 6.8) for 1.5 min. The samples were examined in a Jeol 1010 transmission electron microscope (JEOL Inc. Peabody, MA USA) operating at 80 kV.

Ethics. The Ethics Committee of Hospital de la Santa Creu i Sant Pau approved the research (approval number: 12/065/1350) and waived the need for consent. The samples were anonymized.

References

- Adams, M. H. In *Bacteriophages* 592 (1959).
- Campbell, A. The future of bacteriophage biology. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 471–7 (2003).
- Abeles, S. R. & Pride, D. T. Molecular bases and role of viruses in the human microbiome. *J. Mol. Biol.* **426**, 3892–906 (2014).
- Eckburg, P. B. *et al.* Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**, 1635–8 (2005).
- Winter, C., Smit, A., Herndl, G. J. & Weinbauer, M. G. Impact of viroplankton on archaeal and bacterial community richness as assessed in seawater batch cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 804–13 (2004).
- Fortier, L.-C. & Sekulovic, O. Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence* **4**, 354–65 (2013).
- Górski, A. & Weber-Dabrowska, B. The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 511–9 (2005).
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J. & Muniesa, M. Quinolone resistance genes (*qnrA* and *qnrS*) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**, 1265–74 (2014).
- Muniesa, M., Blanch, A. R., Lucena, F. & Jofre, J. Bacteriophages may bias outcome of bacterial enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 4269–75 (2005).
- Quirós, P., Martínez-Castillo, A. & Muniesa, M. Improving detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by molecular methods by reducing the interference of free Shiga toxin-encoding bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 415–421 (2015).
- Dunbar, J., White, S. & Forney, L. Genetic Diversity through the Looking Glass: Effect of Enrichment Bias. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1326–31 (1997).
- Abedon, S. T. In *Bacteriophages Heal. Dis.* (Hyman, P., Abedon, S. T.) 256–272 (CABI Press, 2012).
- Carrara, L. *et al.* Molecular diagnosis of bloodstream infections with a new dual-priming oligonucleotide-based multiplex PCR assay. *J. Med. Microbiol.* **62**, 1673–9 (2013).
- Muniesa, M. *et al.* Diversity of stx2 converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Microbiology* **150**, 2959–71 (2004).
- Keller, R. & Traub, N. The characterization of *Bacteroides fragilis* bacteriophage recovered from animal sera: observations on the nature of bacteroides phage carrier cultures. *J. Gen. Virol.* **24**, 179–89 (1974).
- Reyes, A. *et al.* Viruses in the fecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* **466**, 334–338 (2010).
- Letarov, A. & Kulikov, E. The bacteriophages in human- and animal body-associated microbial communities. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 1–13 (2009).

18. D'Herelle, F. sur un microbe invisible antagonist des bacilles disenterique. *comptes rendus l'Academie Sci. Paris* **165**, 373–375 (1917).
19. Mankievicz, E. & Liivak, M. Mycobacteriophages isolated from Human Sources. *Nature* **216**, 485–486 (1967).
20. Quirós, P. *et al.* Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 606–9 (2014).
21. Martínez-Castillo, A., Quirós, P., Navarro, F., Miró, E. & Muniesa, M. Shiga toxin 2-encoding bacteriophages in human fecal samples from healthy individuals. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 4862–8 (2013).
22. Calci, K. R., Burkhardt, W., Watkins, W. D. & Rippey, S. R. Occurrence of male-specific bacteriophage in feral and domestic animal wastes, human feces, and human-associated wastewaters. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 5027–9 (1998).
23. Breitbart, M. *et al.* Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *J. Bacteriol.* **185**, 6220–3 (2003).
24. Oh, J. *et al.* Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. *Nature* **514**, 59–64 (2014).
25. Santiago-Rodríguez, T. M. *et al.* Transcriptome analysis of bacteriophage communities in periodontal health and disease. *BMC Genomics* **16**, 549 (2015).
26. Willner, D. *et al.* Metagenomic analysis of respiratory tract DNA viral communities in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis individuals. *PLoS One* **4**, e7370 (2009).
27. Dinakaran, V. *et al.* Elevated levels of circulating DNA in cardiovascular disease patients: metagenomic profiling of microbiome in the circulation. *PLoS One* **9**, e105221 (2014).
28. Ventura, M., Sozzi, T., Turrone, F., Matteuzzi, D. & van Sinderen, D. The impact of bacteriophages on probiotic bacteria and gut microbiota diversity. *Genes Nutr.* **6**, 205–7 (2011).
29. Górski, A. *et al.* Bacteriophage translocation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **46**, 313–9 (2006).
30. Wiggins, B. A. & Alexander, M. Minimum bacterial density for bacteriophage replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 19–23 (1985).
31. Muniesa, M. & Jofre, J. Factors influencing the replication of somatic coliphages in the water environment. *Antonie Van Leeuwenhoek* **86**, 65–76 (2004).
32. Kuai, L., Nair, A. A. & Polz, M. F. Rapid and simple method for the most-probable-number estimation of arsenic-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3168–73 (2001).
33. Esparcia, O. *et al.* Diagnostic accuracy of a 16S ribosomal DNA gene-based molecular technique (RT-PCR, microarray, and sequencing) for bacterial meningitis, early-onset neonatal sepsis, and spontaneous bacterial peritonitis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **69**, 153–60 (2011).
34. Soriano, G. *et al.* Bacterial DNA in the diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **33**, 275–84 (2011).
35. Colomer-Lluch, M., Jofre, J. & Muniesa, M. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS One* **6**, (2011).
36. Fineran, P. C & Petty, N. K. S. G. In *desk Encycl. Microbiol.* 666–679 (Elsevier Academic Press, 2009).
37. Martí, E., Variatza, E. & Balcázar, J. L. Bacteriophages as a reservoir of extended-spectrum β -lactamase and fluoroquinolone resistance genes in the environment. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, O456–9 (2014).
38. Martínez-Castillo, A. & Muniesa, M. Implications of free Shiga toxin-converting bacteriophages occurring outside bacteria for the evolution and the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**, 46 (2014).
39. Baron, E. & Thomson, R. In *Man. Clin. Microbiol.* (Versalovic, J. *et al.*) (ASM Press, 2011).
40. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement. *Clin. Lab. Stand. Inst.* M100–S24 (2009).

Acknowledgements

This study was supported by the Generalitat de Catalunya (2009SGR1043); the Centre de Referència en Biotecnologia (XeRba); Plan Nacional de I+D+i and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015/0017); and the Fondo de Investigación Sanitaria (grant PI13/00329) - co-financed by European Development Regional Fund “A way to achieve Europe” ERDF. MABJ has a grant from COLCIENCIAS (Republic of Colombia). Authors thank Prof. P. Coll and Prof. J. Jofre for useful comments on the manuscript.

Author Contributions

Conception and design: F.N. and M.M. Acquisition of data: M.B.-J. Laboratory analysis: M.B.-J. Analysis and interpretation of data: F.N. and M.M. Drafting Manuscript: M.M. Review of manuscript: F.N., M.M. and M.B.-J.

Additional Information

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Brown-Jaque, M. *et al.* Bacteriophages in clinical samples can interfere with microbiological diagnostic tools. *Sci. Rep.* **6**, 33000; doi: 10.1038/srep33000 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

4.2. CAPÍTULO 2:

**Genes de resistencia a antibióticos en partículas
fágicas aisladas de heces humanas e inducidas
de aislamientos bacterianos clínicos**

Genes de resistencia a antibióticos en partículas fágicas aisladas de heces humanas e inducidas de aislamientos bacterianos clínicos

Antibiotic resistance genes in phage particles isolated from human feces and induced from clinical bacterial isolates

Autores: **Maryury Brown-Jaque**, William Calero-Cáceres, Paula Espinal, Judith Rodríguez-Navarro, Elisenda Miró, Juan José González-López, Thais Cornejo, Juan Carlos Hurtado, Ferran Navarro, Maite Muniesa

Revista: International Journal of Antimicrobial Agents. 2018 Mar; 51(3):434-442.

Introducción

Los bacteriófagos son las entidades biológicas más abundantes del planeta y a su vez, representan un factor clave en la evolución y el control de las poblaciones bacterianas (Rohwer, 2003). En las últimas décadas, los fagos han cobrado cada vez más relevancia en biología molecular por su papel esencial en el estudio y la comprensión de diferentes procesos biológicos relacionados con la genética microbiana (Canchaya et al., 2003; Mojica and Rodriguez-Valera, 2016; Reyes et al., 2010; Rohwer, 2003).

Por otro lado, la resistencia bacteriana a los antibióticos, que sigue en aumento, ha sido identificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como uno de los problemas más relevantes de salud pública a nivel mundial. La comunidad científica y las autoridades gubernamentales han hecho un llamamiento a un mejor control del uso de los antibióticos tanto en humanos como en animales. Por su parte, los investigadores están tratando de hallar nuevas generaciones de antibióticos para tratar infecciones por cepas resistentes, pero también sería aconsejable realizar más investigaciones sobre los mecanismos de resistencia.

La resistencia a antibióticos puede ser intrínseca o adquirida, ya sea por mutaciones o por la adquisición de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) a través de elementos genéticos móviles (MGEs) (Davies and Davies, 2010). Según los estudios clínicos, la conjugación y la transformación son los mecanismos más probables de transferencia genética horizontal (Alekhshun and Levy, 2007). Sin embargo, existen mecanismos como la transducción, mediada por fagos o partículas derivadas de fagos, a los que se les ha prestado poca atención (Balcazar, 2014; Colomer-Lluch et al., 2011b; Fancello et al., 2011). Los bacteriófagos pueden ser potencialmente relevantes en este sentido puesto que la cápside confiere protección y, por lo tanto, persistencia extracelular al

ácido nucleico que contienen. Esta protección de la cápside podría ser importante en casos donde no hay contacto directo de célula a célula (Quirós et al., 2016).

En estudios preliminares, se determinó la presencia de ARGs en ADN fágico y total de heces de individuos sin ninguna enfermedad entérica (Quirós et al., 2014). Ese trabajo se amplía aquí con el análisis de ARGs adicionales en la fracción fágica de una nueva colección de 150 muestras fecales provenientes de individuos sanos, sin contacto con entornos clínicos y que no habían recibido tratamiento con antibióticos en los tres meses previos a la recolección de las muestras. Por último, para dilucidar si las partículas fágicas detectadas en heces derivan de la flora intestinal, 82 cepas bacterianas (de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*) aisladas de heces que poseían un determinado ARG fueron tratadas para inducir partículas fágicas portadoras de dicho gen.

Objetivos

Los objetivos de este estudio fueron los siguientes:

- Diseñar la sonda y los cebadores para la qPCR del gen *bla*_{OXA-48}.
- Detectar y cuantificar por qPCR 9 genes de resistencia (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{OXA-48}, *qnrA*, *qnrS*, *mecA*, *sul1* y *armA*) en la fracción de ADN fágico de muestras fecales humanas.
- Aislar cepas bacterianas que lleven al menos un ARG a partir de muestras fecales humanas.
- Evaluar la capacidad para producir partículas fágicas portadoras de ARGs de las cepas bacterianas aisladas después de un tratamiento de inducción con mitomicina C (mitC).
- Evidenciar la presencia de partículas fágicas en muestras fecales y sobrenadantes de cultivos bacterianos tratados con mitC por microscopía electrónica de transmisión (TEM).
- Detectar y cuantificar los correspondientes ARGs por qPCR de dichas partículas fágicas purificadas por CsCl y visualizadas por TEM.

Resultados y discusión

En este estudio se analizaron 9 genes de resistencia a antibióticos, entre ellos, cuatro genes codificadores de β -lactamasas (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9} y *bla*_{OXA-48}) (Lahey

Clinic, 2017), dos genes de resistencia a quinolonas (*qnrA* y *qnrS*) (Colomer-Lluch et al., 2014), el gen *mecA* que confiere resistencia a meticilina en *S. aureus* (Hiramatsu et al., 2013), el gen emergente *armA* que confiere resistencia a aminoglucósidos (Granier et al., 2011) y por último *sul1*, el gen más extendido que confiere resistencia a las sulfonamidas (Pallecchi et al., 2007).

El estudio se llevó a cabo con 150 muestras fecales de individuos sanos del área de Barcelona. Ninguno tenía relación con ambientes clínicos, no habían recibido tratamiento con antibióticos y no habían viajado a países extranjeros en los tres meses previos al muestreo. La edad de los individuos estuvo comprendida entre 1,3 y 85 años.

El 72% de las muestras fueron positivas para al menos un ARG, con *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M-9} como los más prevalentes y abundantes (Figura 1). El análisis de la distribución de ARGs entre sujetos en diferentes segmentos de edad (<20, 20-40, 40-60 o >60) reveló una mayor prevalencia de *sul1* y *bla*_{CTX-M-1} en muestras provenientes de sujetos mayores, así como una prevalencia más baja de *bla*_{CTX-M-9}. Los individuos de entre 20 y 60 años dieron un alto porcentaje de muestras sin ningún ARG, aunque cabe destacar que este grupo proporcionó la mayoría de las muestras. La línea de tendencia no mostró ninguna correlación con los diferentes grupos de edad (Figura S1).

La prevalencia de ARGs en la fracción fágica concuerda con los datos obtenidos previamente a partir de otro conjunto de muestras fecales. En el estudio anterior, tampoco se observaron correlaciones entre la edad y el número de ARGs en ADN fágico (Quirós et al., 2014).

Se aislaron 70 cepas de *E. coli* y 12 cepas de *K. pneumoniae* a partir de las muestras de heces (82 individuos), que fueron seleccionadas con base en la presencia de al menos uno de los ARGs detectados en este estudio. La finalidad era evaluar la capacidad de producir partículas fágicas portadoras de ARGs tras un tratamiento con mitC a concentración subinhibitoria (Colomer-Lluch et al., 2014).

Se determinó el efecto de la mitC sobre los aislamientos supervisando la reducción de DO₆₀₀ de la alícuota tratada de cada cultivo en comparación con la alícuota no tratada después de 6 horas de incubación a 37°C. Como resultado, 54 aislamientos (65,8%) tuvieron una disminución de DO₆₀₀ > 0,5 puntos (Figura 2). La reducción de DO se interpretó como la activación del ciclo lítico del fago o un mecanismo similar que pudiera causar la lisis celular. De esta manera, se podría sospechar que estos

aislamientos albergaban profagos o partículas derivadas de fagos que causaron la lisis de la cepa huésped después de la inducción.

Al cuantificar los ARGs en el ADN fágico de los sobrenadantes de cultivo de los 82 aislamientos tratados y no tratados con mitC, se observó un incremento en el número de copias del respectivo ARG en el 62% de los aislamientos después del tratamiento de inducción (Figura 3). Los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9} y *sul1* fueron los más abundantes con concentraciones de hasta 10⁹ copias genómicas (GC)/ml después de la inducción (Figura 4).

Los valores de ARGs fueron usualmente más altos en los cultivos tratados con mitC, hecho atribuido a la generación de partículas fágicas como consecuencia de la inducción causada por el tratamiento. En algunos casos (*qnrA* y *qnrS*) (Figura 3), solo se observaron partículas fágicas portadoras de algún ARG después de la inducción, probablemente gracias a que el número de partículas portadoras de ARG en los cultivos sin tratamiento era demasiado bajo y estaba por debajo del límite de cuantificación de nuestros ensayos de qPCR. Por otra parte, la presencia de partículas portadoras de ARGs en los cultivos no inducidos se podría atribuir a la generación basal espontánea de partículas fágicas, ampliamente reportada en fagos y partículas relacionadas con éstos, tales como los agentes de transferencia genética (GTAs) (Livny and Friedman, 2004; McDaniel et al., 2012).

Adicionalmente, algunos aislamientos tuvieron unas densidades de copias genómicas mayores en el control con respecto al cultivo inducido pero estas diferencias no fueron significativas ($p > 0.05$). Estos resultados podrían deberse a una reducción en el número de células causada por la activación del ciclo lítico de otros profagos presentes en el cromosoma bacteriano, lo cual es comúnmente encontrado en *E. coli* o *Klebsiella spp.* (Bossi et al., 2003). Otra posible causa es que el tratamiento con mitC haya reducido la tasa de crecimiento del cultivo bacteriano, disminuyendo así el número de partículas producidas por célula.

Por último, la observación de las muestras fecales y el sobrenadante de algunos de los cultivos bacterianos tratados con mitC por TEM reveló partículas fágicas correspondientes a los tipos morfológicos *Myoviridae* y *Siphoviridae* (Figura 5). No se visualizaron partículas fágicas en todas las muestras, ya sea porque no había cápsides integrales presentes en las mismas, o muy probablemente porque estaban presentes en concentraciones inferiores a las requeridas para su visualización en el microscopio electrónico (ca. 10⁸ partículas/ml) (Brown-Jaque et al., 2016).

Las partículas fágicas visualizadas por TEM se purificaron previamente por gradientes de CsCl, dando como resultado bandas grises correspondientes a una densidad de 1,5 g/ml, la cual es compatible con aquella esperada para las partículas fágicas (King et al., 2011) (Figura 5A). Estas bandas fueron recuperadas y tal como se indicó anteriormente, se usaron para confirmar la presencia de partículas fágicas. Después de un tratamiento con cloroformo y ADNasa, se extrajo el ADN fágico de estas cápsides y se cuantificaron densidades de ARG de alrededor de 10^7 GC/ml (Figura 5C). Si tenemos en cuenta que se requiere una cantidad mínima de 10^7 partículas/ml de muestra para la observación por TEM, podría asumirse que al menos una fracción de las partículas fágicas visualizadas podría portar uno de los ARGs en densidades similares a las de las partículas observadas y en el mismo orden de magnitud que se muestra en la Figura 3.

Los resultados sugieren que las partículas producidas por los aislamientos bacterianos incluidos en este estudio se han generado a partir de las cepas en las que residían como profagos y fueron inducidas como consecuencia del tratamiento con mitC. La presencia de ARGs en estas partículas abre dos posibilidades. La primera es que estos profagos podrían tener el ARG insertado en su genoma, y la segunda es que, después de la inducción, los genes de profago presentes en los aislamientos bacterianos hayan empaquetado ADN bacteriano (incluyendo el ARG) a modo de transducción generalizada o mecanismos similares.

En el primer caso, estas partículas tendrían que ser capaces de transducir el gen en frecuencias relativamente altas pero nuestros intentos de transducción no fueron exitosos. En el segundo caso, dichas partículas serían detectables por los métodos empleados en este estudio y mostrarían un incremento después de la inducción, pero no tendrían alrededor genes de origen fágico, lo cual concuerda con nuestras observaciones (datos presentados en el siguiente capítulo). Considerando su genoma, estas partículas no podrían ser consideradas fagos dado de que contienen únicamente ADN bacteriano y no fágico, de acuerdo a resultados presentados en recientes estudios (Enault et al., 2017).

Dada la metodología empleada, se descarta una contaminación importante con ADN bacteriano. La explicación más plausible a la presencia de ARGs en las partículas fágicas estudiadas es que el ADN bacteriano es movilizado por estas partículas a través de transducción generalizada o mecanismos relacionados.

Conclusiones

- Este estudio destaca la abundancia de partículas fágicas portadoras de ARGs. El 72% de las muestras fecales de individuos sanos contenían al menos 1 ARG en la fracción de ADN fágico.
- Se detectaron todos los ARGs seleccionados para el estudio. *bla*_{TEM} fue el ARG más prevalente y abundante en la fracción de ADN fágico de las muestras de heces.
- Probablemente, muchas partículas fágicas portadoras de ARGs en heces se derivan de bacterias. De acuerdo con lo anterior, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1} y *sul1* fueron los ARGs más prevalentes en partículas fágicas inducidas a partir de los aislamientos fecales.
- Se observaron fagos inducidos de los aislamientos por TEM. Estos mismos fagos purificados contenían altas densidades de ARG, apoyando la hipótesis de que estas partículas portan ARGs.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijantimicag

Antibiotic resistance genes in phage particles isolated from human faeces and induced from clinical bacterial isolates

Maryury Brown-Jaque ^a, William Calero-Cáceres ^a, Paula Espinal ^b, Judith Rodríguez-Navarro ^{b,c}, Elisenda Miró ^b, Juan José González-López ^d, Thais Cornejo ^d, Juan Carlos Hurtado ^e, Ferran Navarro ^{b,c,*}, Maite Muniesa ^{a,**}^a Department of Genetics, Microbiology and Statistics, University of Barcelona, Diagonal 643, Annex, Floor 0, E-08028 Barcelona, Spain^b Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Sant Quintí 89, 08041 Barcelona, Spain^c Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain^d Department of Clinical Microbiology, Hospital Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Institut de Recerca, Barcelona, Spain^e ISGlobal, Barcelona Centre for International Health Research, Department of Microbiology, Hospital Clínic de Barcelona, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 July 2017

Accepted 18 November 2017

Editor: P. Colson

Keywords:

Antibiotic resistance

Bacteriophage

Faeces

Horizontal gene transfer

Transduction

ABSTRACT

Phage particles have emerged as elements with the potential to mobilise antibiotic resistance genes (ARGs) in different environments, including the intestinal habitat. This study aimed to determine the occurrence of ARGs in phage particles present in faecal matter and induced from strains isolated from faeces. Nine ARGs (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1 group}, *bla*_{CTX-M-9 group}, *bla*_{OXA-48}, *qnrA*, *qnrS*, *mecA*, *sul1* and *armA*) were quantified by qPCR in the phage DNA fractions of 150 faecal samples obtained from healthy individuals who had not received antibiotic treatment or travelled abroad in the 3 months prior to sample collection. On the suspicion that the detected particles originated from bacterial flora, 82 *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing at least one identified ARG (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1 group}, *bla*_{CTX-M-9 group}, *armA*, *qnrA*, *qnrS* and *sul1*) were isolated and their capacity to produce phage particles carrying these ARGs following induction was evaluated. Of 150 samples, 72.7% were positive for at least one ARG, with *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M-9 group} being the most prevalent and abundant. Of the 82 isolates, 51 (62%) showed an increase in the number of copies of the respective ARG in the phage fraction following induction, with *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1 group}, *bla*_{CTX-M-9 group} and *sul1* being the most abundant. Phages induced from the isolates were further purified and visualised using microscopy and their DNA showed ARG levels of up to 10¹⁰ gene copies/mL. This study highlights the abundance of phage particles harbouring ARGs and indicates that bacterial strains in the intestinal habitat could be source of these particles.

© 2017 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Bacteriophages, or bacterial viruses, are the most abundant biological entities on Earth and one of the keys to the evolution and potential control of bacterial populations [1]. Knowledge of phages has been essential for the progress of molecular biology and they have been used as models for studying different biological processes. In recent decades, phages have acquired increasing relevance in molecular biology owing to new insights into their presence in many bacterial genomes [1,2], their role in horizontal gene trans-

fer [3], the phage–bacterium relationship, and bacterial defence mechanisms against phage infection [4].

Meanwhile, bacterial resistance to antibiotics continues to increase and is severely undermining our ability to control infectious diseases. The World Health Organization (WHO) has identified antibiotic resistance as one of the most challenging problems in public health care on a global scale (http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA68-REC1/A68_R1_REC1-en.pdf). The causes of this increase in resistance are believed to include overuse and inconsistent application of antibiotics in humans, together with the use of antibiotics in animal husbandry [5,6]. The scientific community and governments have reacted by calling for better control of antibiotic usage both in humans and livestock. Researchers are trying to find new generations of antibiotics to treat infections by resistant strains, but more research into the mechanisms of resistance would also be advisable. This is the purpose of the multidisciplinary ‘One Health’ approach, which aims to encourage the collaborative efforts of multiple disciplines working locally, nationally and globally.

* Corresponding author. Department of Genetics, Microbiology and Statistics, University of Barcelona, Diagonal 643, Annex, Floor 0, E-08028, Barcelona, Spain.

E-mail address: Fnavarrr@santpau.cat (F. Navarro).

** Corresponding author. Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Sant Quintí 89, 08041, Barcelona, Spain.

E-mail address: mmuniesa@ub.edu (M. Muniesa).

Antibiotic resistance may be intrinsic or conferred either by mutation or by acquiring antibiotic resistance genes (ARGs) through mobile genetic elements [5]. Clinical studies point to conjugation and transformation as the most likely mechanisms of transfer [7]. However, little attention has been paid to other mechanisms, such as transduction mediated by phages or phage-derived particles, which have only recently emerged as potentially relevant [8–10]. Bacteriophages basically consist of one nucleic acid molecule (the phage genome) surrounded by a protein coating, the capsid. This packaging of the nucleic acid confers protection and hence an extracellular persistence that cannot be found for naked DNA or RNA. Therefore, capsid protection could be important in cases where there is no close cell-to-cell contact [11].

In preliminary studies, the presence of ARGs was determined in total and phage DNA in faeces of individuals without any enteric disease [12]. That work is extended here by analysis of more ARGs in the phage fraction of a new collection of faecal samples from 150 healthy individuals free of contact with clinical settings and who had not received antibiotic therapy in the previous 3 months before sample collection. The ARGs studied consisted of four β -lactamases (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1 group}, *bla*_{CTX-M-9 group} and *bla*_{OXA-48}) [13], two quinolone resistance genes (*qnrA* and *qnrS*) [14], the *mecA* gene that confers resistance to methicillin in *Staphylococcus aureus* [15], the emerging *armA* gene that confers resistance to aminoglycosides [16], and *sul1*, the most widespread gene conferring resistance to sulfonamides [17]. Another aim of this study was to gain an insight into the origin of the phage particles, suspected to be derived from bacterial flora. Accordingly, bacterial strains (*Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*) isolated from faeces that possessed a given ARG were treated to induce phage particles carrying this ARG.

2. Materials and methods

2.1. Faecal samples

This study was performed with 150 human faecal samples from individuals living in the city of Barcelona (Catalonia, North East Spain) collected over a period of 6 months (February–August 2016). All individuals were healthy, not related to clinical environments or involved in a foodborne outbreak, and not showing any gastrointestinal pathology or known infection. None of the subjects had consumed antibiotics or travelled to foreign countries in the 3 months before sampling. All samples were completely anonymised. Besides ensuring the above criteria were fulfilled, no individual data were collected except for age. The samples were destroyed immediately after the study, which was approved by the Clinical Ethics Committee of Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain). Informed consent was obtained for all individuals.

2.2. Bacterial strains

The *E. coli* strains used as controls for the different ARGs are listed in Table 1. Faecal samples were cultured on chromogenic agar (chromID® CPS® Elite; bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). Following 24 h of incubation at 37 °C, all isolates growing on the plates compatible with *E. coli* or *Klebsiella* were identified by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) (MALDI Autoflex II™/TOF/TOF; Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). Antimicrobial susceptibility testing was performed according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [20].

A total of 70 *E. coli* and 12 *K. pneumoniae* isolates were selected on the basis of the presence of one of the target ARGs (one isolate per individual) to determine the presence of phage particles containing the ARGs.

Table 1

Strains used in this study as controls for antibiotic resistance genes (ARGs).

Strain	ARG	Reference
<i>Escherichia coli</i> C600	<i>bla</i> _{TEM} in pGEM vector	Promega
<i>E. coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-1 group}	[9]
<i>E. coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-9 group}	[18]
MRSA	<i>mecA</i>	[9]
<i>E. coli</i> strain 226	<i>qnrA</i>	[14]
<i>Enterobacter cloacae</i> strain 565	<i>qnrS</i>	[14]
<i>E. coli</i>	<i>armA</i> in plasmid pMUR050	[12]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{OXA-48}	This study
<i>E. coli</i> J53 R388	<i>sul1</i>	[19]

MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

2.3. Partial purification of phage DNA

Faecal samples were homogenised 1:5 (w:v) in phosphate-buffered saline by shaking for 15 min. Then, 50 mL of the homogenate was centrifuged at 3000 × g and the supernatant was filtered through a low-protein-binding 0.22- μ m pore size membrane filter (Millex-GP; Millipore, Bedford, MA). The suspensions were treated with chloroform, were centrifuged at 16 000 × g for 10 min and the supernatant was treated with DNase (100 U/mL; Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) for 1 h at 37 °C. DNase was heat-inactivated at 75 °C for 5 min. To rule out the presence of non-packaged DNA, an aliquot of the sample was taken after DNase treatment and before its desencapsulation. Using this control sample, the absence of free 16S rDNA was established as well as the absence of the ARGs studied by quantitative PCR (qPCR), confirming total removal of non-encapsidated DNA [12,21]. Different controls were performed to verify the stability and appropriate inactivation of the DNase [9]. Packaged DNA was extracted by proteinase K digestion and was purified and quantified [9,12].

2.4. Purification of bacteriophages from clinical isolates

Cultures (20 mL) of each clinical isolate in Luria–Bertani broth were grown to mid-exponential phase [optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.3]. Each culture was aliquoted in two 10 mL tubes and one aliquot was treated with mitomycin C (mitC) (final concentration 0.5 μ g/mL) to induce phage particles. Both tubes were incubated for 6 h at 37 °C by shaking in the dark and the absorbance of the culture following induction was monitored by comparing the OD₆₀₀ values of the mitC-treated and non-treated cultures. Phages in the supernatant lysate from both aliquot cultures were partially purified as described above.

2.5. Standard PCR and qPCR procedures

PCR was performed with a GeneAmp® PCR 2700 system (Applied Biosystems, Barcelona, Spain). ARGs from the control strains were amplified by conventional PCR, were cloned in a pGEM®-T Easy Vector (Promega, Barcelona, Spain) to generate the constructs and were verified by sequencing (Table 2). The constructs were used to generate the standard curves.

Real-time qPCR assays for *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1 group}, *bla*_{CTX-M-9 group}, *mecA*, *armA*, *qnrA*, *qnrS* and *sul1* were performed as described previously [9,12,14,18,19,22,23]. The *bla*_{OXA-48} gene qPCR assay (Table 2) was designed using Primer Express® Software v.3.0 (Applied Biosystems). The gene was amplified using specific primers (Table 2) from the sequence of *bla*_{OXA-48} harboured in *K. pneumoniae* clinical isolate HSP172. The amplified *bla*_{OXA-48} was sequenced and cloned in a pGEM®-T Easy Vector. The construct was confirmed by sequencing and was used to generate the standard curves [9]. The qPCR assay for *bla*_{OXA-48} showed 99.8% efficiency and a limit of quantification

Table 2
Oligonucleotides used in this study.

Target gene	Reaction	Oligonucleotide	Sequence	Amplimer (bp)	LOQ of qPCR (GC)	Reference
<i>bla_{TEM}</i>	PCR	UP	CTCACCCAGAAACGCTGGTG	569		[22]
		LP	ATCCGCCTCCATCCAGTCTA			
	qPCR	UP	CACATTTCTCAGAATGACTTGGT	85	7.6	[22]
		LP	TGCATAATTCTTACTGTATG			
<i>bla_{CTX-M-1}group</i>	PCR	TaqMan TEM	FAM-CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGG-MGBNFQ	356		[9]
		UP	ACGTTAAACACCGCCATTCC			
		LP	TCGGTGACGATTTTAGCCGC			
	qPCR	UP	ACCAACGATATCGCGGTGAT	101	8.4	[9]
		LP	ACATCGCGACGGCTTCT			
		TaqMan CTX-M-1	FAM-TCGTGCGCCGCTG-MGBNFQ			
<i>bla_{CTX-M-9}group</i>	PCR	UP	ACGCTGAATACCGCCATT	352		[18]
		LP	CGATGATTCTCGCCGCTG			
	qPCR	UP	ACCAATGATATTGCGGTGAT	85	13	[18]
		LP	CTGCGTTCTGTGCGGCT			
<i>bla_{OXA-48}</i>	PCR	TaqMan CTX-M-9	FAM-TCGTGCGCCGCTG-MGBNFQ	790		This study
		UP	CGTTATGCGTGTATTAGCCTTAT			
		LP	TTTTTCCTGTTGAGCACTTCTTT			
	qPCR	UP	CGGTAGCAAAGGAATGGCAA	133	18.2	This study
		LP	TGGTTCCGCCGTTAAGATT			
		TaqMan OXA-48	FAM-CGTAGTTGTGCTCTGGA-MGBNFQ			
<i>sul1</i>	PCR	UP	TTCATGGGCAAAAGCTTGATG	965		[19]
		LP	GGCCGGAAGGTGAATGCTA			
	qPCR	UP	CCGTTGGCCTTCCTGTAAG	67	5.9	[19]
		LP	TTGCCGATCGCGTGAAGT			
<i>mecA</i>	PCR	TaqMan <i>sul1</i>	FAM-CGAGCCTTGCGGCGG-MGBNFQ	434		[9]
		UP	GATAGCAGTTATATTCTA			
		LP	ATACTTAGTTCCTTAGCGAT			
	qPCR	UP	CGCAACGTTCAATTTAATTTGTTAA	92	10.4	[23]
		LP	TGGTCTTTCTGCATTCCTGGA			
		TaqMan <i>mecA</i>	FAM-AATGACGCTATGATCCCAATCTAACTCCACA-MGBNFQ			
<i>qnrA</i>	PCR	UP	ACGCCAGGATTTGAGTGAC	565		[14]
		LP	CCAGGCACAGATCTTGAC			
	qPCR	UP	AGGATTGCAGTTTCATTGAAAGC	138	8.6	[14]
		LP	TGAACTCTATGCCAAAGCAGTTG			
<i>qnrS</i>	PCR	TaqMan <i>qnrA</i>	FAM-TATGCCGATCTGCGCGA-MGBNFQ	425		[14]
		UP	AAGTGATCTCACCTTCACCGCTG			
		LP	TTAAGTCTGACTCTTTCAGTGATG			
	qPCR	UP	CGACGTGCTAACTTGCCTGA	118	8.3	[14]
		LP	GGCATTGTTGGAAACTTGCA			
		TaqMan <i>qnrS</i>	FAM-AGTTCATTGAACAGGGTGA-MGBNFQ			
<i>armA</i>	qPCR	UP	GAAAGAGTCGCAACATTAATGACTT	93	8.4	[12]
		LP	GATTGAAGCCACAACAAAATCT			
		TaqMan <i>armA</i>	FAM-TCAAACATGTCTCATCTATT-MGBNFQ			
pGEM	PCR	pGEM7up	TGTAATACGACTCACTAT			Promega

LOQ, limit of quantification (determined with the standard curve used in this study for each qPCR assay); qPCR, quantitative PCR; UP, upper primer; LP, lower primer; FAM, 6-carboxyfluorescein reporter; MGBNFQ, minor groove-binding non-fluorescent quencher.

of 18.2 gene copies/ μ L (threshold cycle of 32.4), similar to the other genes.

Primers and TaqManTM hydrolysis probes (Table 2) were used under standard conditions in a StepOneTM Real-Time PCR system (Applied Biosystems) [9]. To further screen for PCR inhibition, dilutions of known gene copy concentrations of the *mecA* standard were spiked with DNA isolated from the samples and the results were compared with the expected concentration. No inhibition of the PCR by the samples was detected. All of the samples were run in duplicate.

2.6. Phage purification by caesium chloride (CsCl) density gradients

Eight isolates showing good induction and a high level of ARGs in phage DNA were selected for purification by CsCl density gradients [24] and electron microscopy observations. The easily visible grey bands corresponding to bacteriophages [24,25] were collected and dialysed. Phage DNA was extracted from the particles in the band and was used to quantify the ARGs. Phage particles forming a band were visualised by electron microscopy in a JEOL 1010 transmission electron microscope (JEOL Inc., Peabody, MA) operating at 80 kV [26].

2.7. Statistical analysis

Computation of data and statistical tests was performed using SPSS Statistics v.17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). A tolerance interval with 90% confidence in 90% of the population (considering collected isolates as the population) was used to determine which isolates were considered positive for induction following mitC treatment (using OD₆₀₀ and ARGs gene copy data).

3. Results and discussion

3.1. Antibiotic resistance genes in phage particles isolated from faeces

Stool samples from healthy individuals in the Barcelona area were selected as described in Section 2.1. It was verified that the subjects had no contact with a clinical environment and had not received any antibiotic treatment or travelled abroad in the 3 months before sampling. The age of the individuals ranged from 1.3–85 years.

From the 150 samples, 109 (72.7%) of the phage suspensions obtained from the stools were positive for at least one ARG: 29 samples (19.3%) were positive for one ARG, 40 samples (26.7%) for two ARGs,

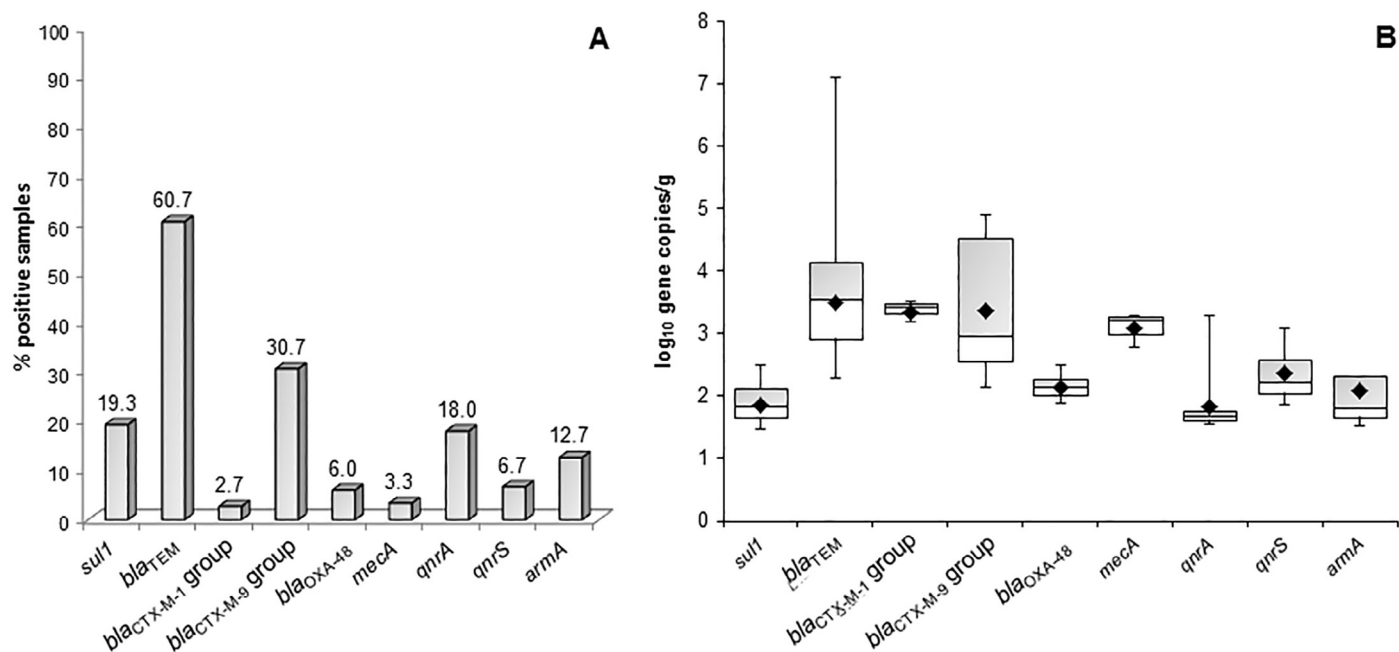


Fig. 1. Antibiotic resistance genes (ARGs) in the phage fraction of human faecal samples. (A) Percentage of positive samples for each ARG. (B) Abundance of each ARG. Box plot of the average values (\log_{10} gene copies/g faeces) of all ARGs in the positive samples. In the box plot, the cross-pieces of each box represent (from top to bottom) the maximum, upper quartile, median (black bar), lower quartile and minimum values. The black diamond shows the mean value. The upper grey boxes in the box plot include samples showing values within the 75th percentile and the lower white boxes represent samples showing values within the 25th percentile.

24 samples (16.0%) for three ARGs, 14 samples (9.3%) for four ARGs and 2 samples (1.3%) for five ARGs. Among the detected ARGs, *bla*_{TEM} was the most prevalent, followed by *bla*_{CTX-M-9 group}, *sul1* and *qnrA* (Fig. 1A). *bla*_{TEM} was also the most abundant (Fig. 1B), reaching maximum densities of 10^6 gene copies/g, although the samples showed great heterogeneity in the number of particles carrying *bla*_{TEM} gene copies. Next in abundance were both *bla*_{CTX-M groups 1 and 9}. Although not among the most prevalent ARGs, *mecA* and *qnrS* showed an average abundance of 3.1 and 2.4 \log_{10} gene copies/g, respectively. The average number of particles bearing *bla*_{OXA-48}, *qnrA* and *armA* was close to 2 \log_{10} gene copies/g (although some samples showed higher densities of *qnrA*), whilst *sul1*, despite its high prevalence, was one of the least abundant genes (Fig. 1B).

Analysing the distribution of ARGs among subjects in different age divisions (<20, 20–39, 40–60 or >60 years) revealed a higher prevalence of *sul1* and *bla*_{CTX-M-1 group} in samples from older subjects, which also showed a lower level of *bla*_{CTX-M-9 group}, as the most remarkable observations (Supplementary Fig. S1A). Individuals aged 20–60 years gave a higher percentage of samples without any ARGs, although this group also provided the most samples. The trend line (Supplementary Fig. S1B) did not show any correlation with different age groups.

The ARG prevalence in the phage fraction is in agreement with previous data obtained with a different set of faecal samples [12]. In the former study, correlations between age and the number of ARGs in phage DNA were also not observed [12]. In that study, 22.5% of samples were negative compared with ca. 28% here, and the proportions of each ARG were slightly higher in abundance. The most notable difference between the studies is that whereas both cohorts of individuals were not affected by gastrointestinal disease, in the previous study prior administration of antibiotics or travel abroad was not monitored.

3.2. Phage particles induced from clinical bacterial isolates

The nature of phage particles carrying ARGs detected in faeces is unknown. They could be free particles in the gut incorporated

by ingestion of food or water, or particles produced by bacterial strains present in the microbiota. To evaluate this second possibility, 70 *E. coli* and 12 *K. pneumoniae* isolates from faecal samples of different individuals in this study (82 individuals) were selected on the basis of the presence of one or more targeted ARGs (Table 3). The isolates allowed us to analyse phage particles carrying *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1 group}, *bla*_{CTX-M-9 group}, *armA*, *qnrA*, *qnrS* and *sul1*. Phage particles were induced from the isolates using mitC at a subinhibitory concentration, a commonly used method [14]. The Enterobacteriaceae group does not harbour *mecA*, therefore this gene was not included in this part of the study. The absence of isolates with *bla*_{OXA-48} could be expected considering that the isolation performed was not specific for its detection, and in addition this gene should not be prevalent in healthy carriers [27].

The effect of mitC on the isolates was determined by monitoring the reduction in OD₆₀₀ of the treated aliquot of each culture in comparison with the untreated aliquot following 6 h of incubation at 37 °C. The reduction in OD₆₀₀ is interpreted as activation of the phage lytic cycle or a similar mechanism causing cell lysis. Each isolate was treated with mitC at least in duplicate, and although the OD₆₀₀ differed slightly between replicates, the differences between the control and the treated aliquot of the culture were consistent between replicates. To statistically support which samples showed induction, we considered a tolerance interval of 90% confidence in 90% of the population. Therefore, isolates falling outside the tolerance range, i.e. those showing an OD₆₀₀ reduction of <0.2 points, which indicates a lack of cell lysis, were excluded. Only 7 of the 82 isolates were considered non-inducible (isolates marked with an asterisk in Fig. 2). In contrast, 54 isolates showed an OD₆₀₀ decrease of >0.5 points (Fig. 2) and these were suspected of harbouring prophages or phage-derived particles causing lysis of the host strain after induction.

3.3. Antibiotic resistance genes in phage particles induced from clinical isolates

The genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1 group}, *bla*_{CTX-M-9 group}, *armA*, *qnrA*, *qnrS* and *sul1* were quantified in phage DNA in the culture supernatant of 82

Table 3
List of isolates from faeces and determination of the presence of various antibiotic resistance genes (ARGs).

No. of isolates	Species	Strain	ARGs present
9	<i>Escherichia coli</i>	Ec1–3, Ec6–7, Ec11, Ec13–15	<i>bla</i> _{TEM} , <i>sul1</i>
3	<i>E. coli</i>	Ec5, Ec16–17	<i>bla</i> _{TEM}
1	<i>E. coli</i>	Ec4	<i>bla</i> _{TEM} , <i>qnrA</i> , <i>qnrS</i> , <i>sul1</i>
5	<i>E. coli</i>	Ec18, Ec20 Ec26–28	<i>bla</i> _{CTX-M-1} group
2	<i>E. coli</i>	Ec19, Ec21	<i>bla</i> _{CTX-M-1} group, <i>sul1</i>
1	<i>E. coli</i>	Ec25	<i>bla</i> _{CTX-M-1} group, <i>bla</i> _{CTX-M-9} group
1	<i>E. coli</i>	Ec23	<i>bla</i> _{CTX-M-1} group, <i>qnrA</i> , <i>qnrS</i>
1	<i>E. coli</i>	Ec24	<i>bla</i> _{CTX-M-1} group, <i>armA</i>
1	<i>E. coli</i>	Ec22	<i>bla</i> _{CTX-M-1} group, <i>qnrA</i> , <i>qnrS</i> , <i>sul1</i>
4	<i>E. coli</i>	Ec29–32	<i>bla</i> _{CTX-M-9} group
3	<i>E. coli</i>	Ec34, Ec36–37	<i>qnrA</i> , <i>qnrS</i>
5	<i>E. coli</i>	Ec33, Ec61–64	<i>qnrA</i> , <i>qnrS</i> , <i>sul1</i>
34	<i>E. coli</i>	Ec38–60, Ec65–75	<i>sul1</i>
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kp1–3, Kp5–7	<i>bla</i> _{TEM}
1	<i>K. pneumoniae</i>	Kp4	<i>bla</i> _{TEM} , <i>sul1</i>
3	<i>K. pneumoniae</i>	Kp8–9, Kp11	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M-1} group, <i>sul1</i>
1	<i>K. pneumoniae</i>	Kp10	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M-1} group
1	<i>K. pneumoniae</i>	Kp12	<i>bla</i> _{CTX-M-1} group
Total = 82			24 <i>bla</i> _{TEM} , 16 <i>bla</i> _{CTX-M-1} group, 5 <i>bla</i> _{CTX-M-9} group, 1 <i>armA</i> , 11 <i>qnrA</i> , 11 <i>qnrS</i> , 56 <i>sul1</i>

isolates treated or not with mitC. ARG values were usually higher in the mitC-treated culture, attributed to the generation of phage particles by the treatment. Isolates Ec7, Ec22, Ec37, Ec60 Ec70, Kp2 and Kp3, which did not show a reduction in the OD₆₀₀ measurements after mitC treatment (Fig. 2), accordingly did not show an increase in gene copies/mL of the corresponding ARGs in phage DNA

after induction (Fig. 3). *armA* is not included because no differences between the induced culture and the control were detected.

After two independent induction experiments, 51 isolates (62%) showed an increase in the ARG copy number in the phage fraction. Those isolates with an increase of >0.2 log₁₀ gene copies, on the basis of a tolerance interval of 90% confidence in 90% of the

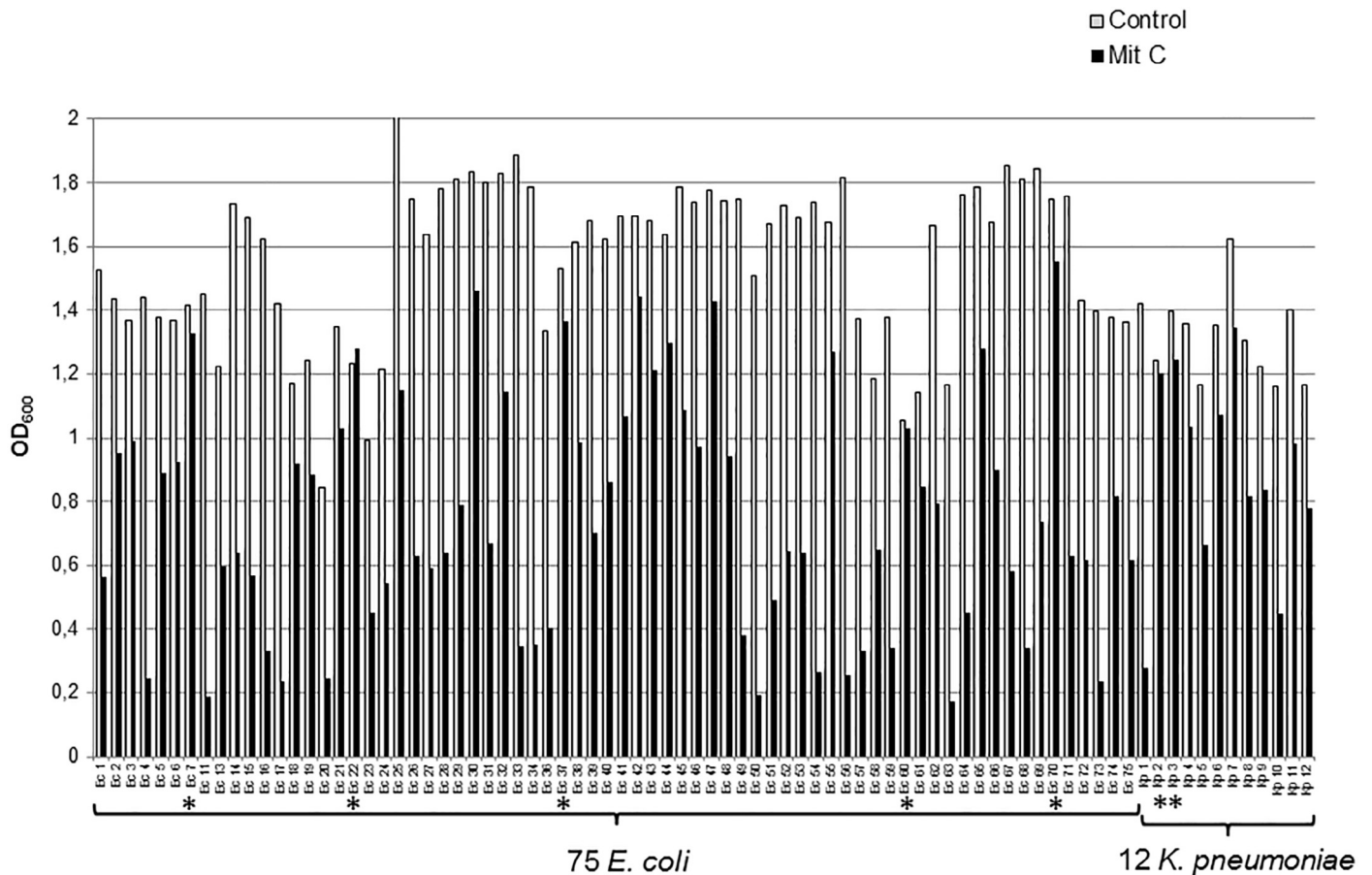


Fig. 2. Induction of phage particles from bacterial isolates by mitomycin C treatment. OD₆₀₀ measurements for cultures of *Escherichia coli* (Ec) and *Klebsiella pneumoniae* (Kp) isolates with (mitC) or without (control) mitomycin C (0.5 µg/mL) treatment. * Asterisks indicate non-inducible strains. OD₆₀₀, optical density at 600 nm.

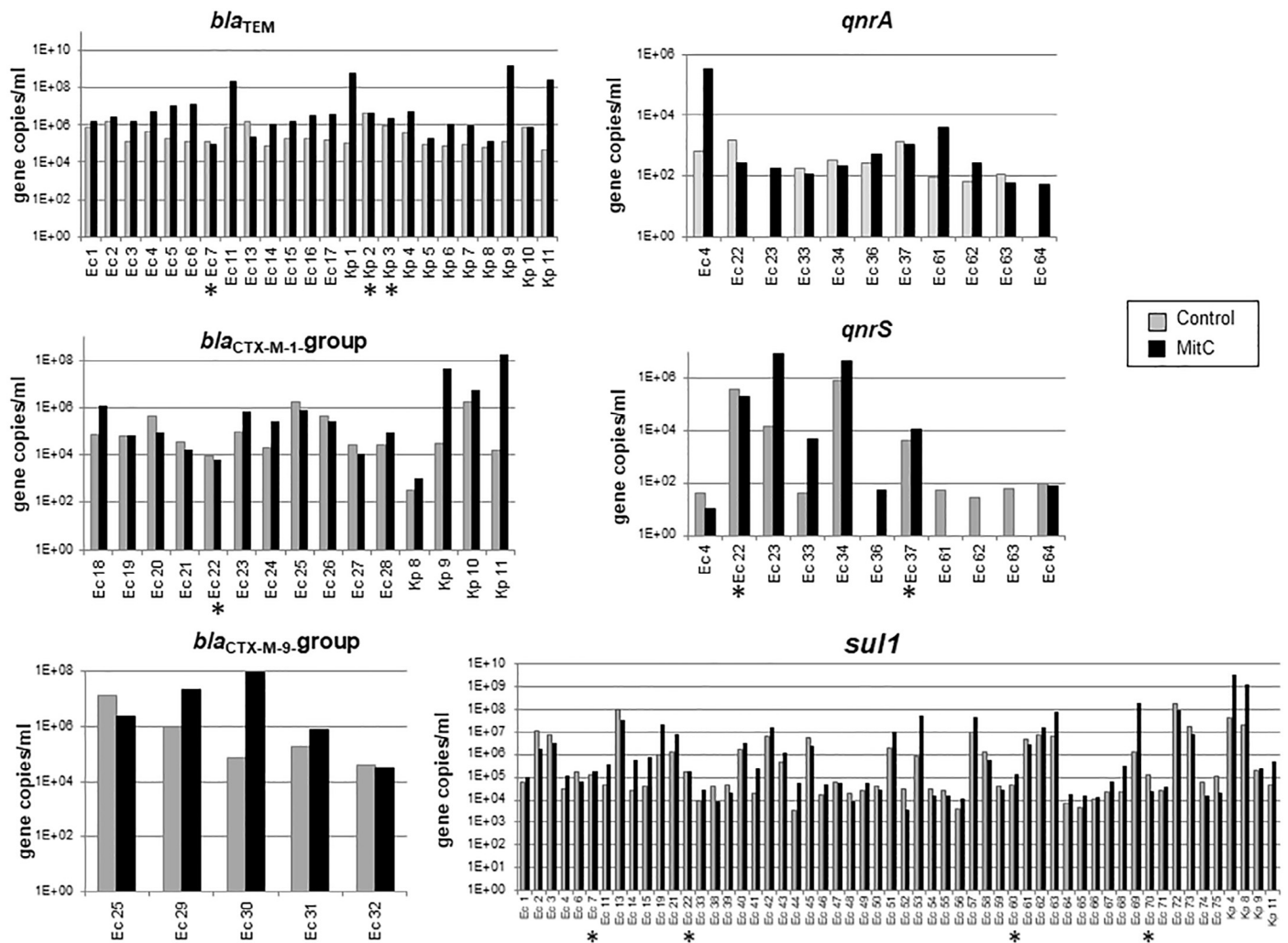


Fig. 3. Antibiotic resistance genes (ARGs) in the phage fraction of each bacterial isolate from human faecal samples. ARG densities (gene copies/mL) in phage DNA extracted from the cultures of *Escherichia coli* (Ec) and *Klebsiella pneumoniae* (Kp) isolates with (mitC) or without (control) mitomycin C (0.5 μ g/mL) treatment. Results correspond to one independent induction experiment. * Asterisks indicate the non-inducible strains in Fig. 2.

population, were selected as inducible. In fact, for all 51 isolates that showed an increase in the ARG copy number, the difference was ≥ 0.5 \log_{10} . Of the 82 strains, 31 (38%) did not show an increase in the gene copy values (≤ 0.2 \log_{10} units). In some cases (*qnrA* and *qnrS*) (Fig. 3), particles containing an ARG were only observed after induction, probably because the number of ARG particles in the untreated culture was too low and below the limit of quantification of the qPCR assays. In contrast, the occurrence of ARG particles in the uninduced culture is attributed to basal, spontaneous generation of phage particles, widely reported in phages [28] and phage-related particles, such as gene transfer agents (GTAs) [29]. Moreover, some isolates showed higher gene copy densities in the control than in the induced culture, although the differences were not significant ($P > 0.05$) (Fig. 3). These results could be attributed to a reduction in cell number caused by activation of the lytic cycle of other prophages in the isolate chromosome, which are very commonly found in *E. coli* and *Klebsiella* spp. [30]. Another possibility is that the treatment with mitC reduced the growth rate of the isolate, thereby diminishing the number of particles produced per cell.

Average gene copy/mL values of those samples with an increase in the number of particles following mitC induction were box-plotted (Fig. 4) and the differences between control and mitC-treated samples were significant ($P < 0.05$) for all ARGs except *sul1*.

Similar averaged densities were observed for all ARGs except *qnrA* and *qnrS*, which showed lower values. Some ARGs (*sul1*, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M-1 group}) showed up to 10^9 gene copies/mL after induction (Fig. 4).

3.4. Observation of phage particles carrying antibiotic resistance genes

Observation of faecal samples and the supernatant of some of the mitC-treated bacterial cultures revealed tailed phage particles, corresponding to the Myoviridae and Siphoviridae morphological types (like those shown in Fig. 5). Not all samples allowed visualisation of phage particles, either because they corresponded to samples where no integral capsids were present, or very probably because they were present at concentrations below those required for visualisation in the electron microscope (ca. 10^8 particles/mL) [26].

Phage particles were obtained from induced cultures of four *E. coli* (Ec4, Ec11, Ec30 and Ec69) and four *K. pneumoniae* (Kp4, Kp8, Kp9 and Kp11) isolates selected on the basis of high induction rates and an increase in the gene copies of one or more ARGs following mitC treatment (Fig. 3). Particles were further purified by CsCl gradients and the resulting grey band corresponded to a density of

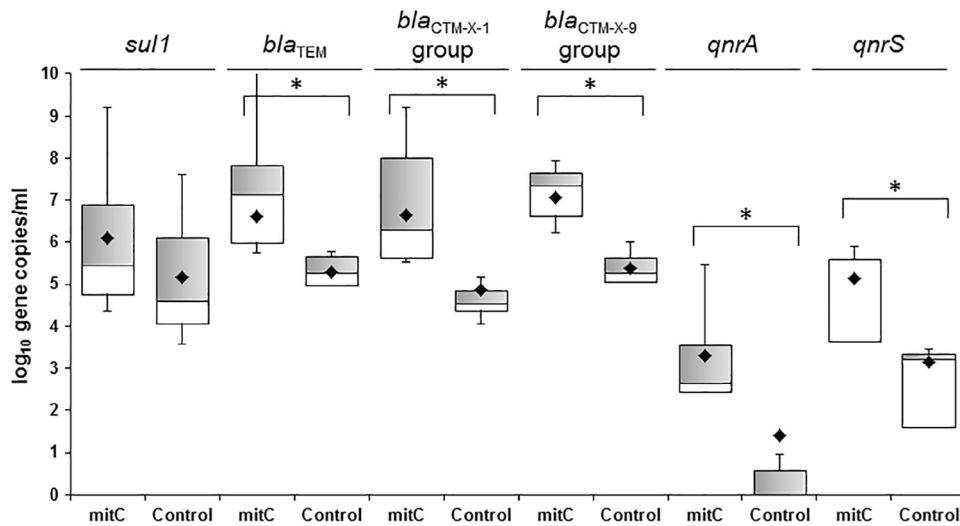


Fig. 4. Average antibiotic resistance gene (ARG) densities in the phage fraction of bacterial isolates. Average number of ARG copies (\log_{10} gene copies/mL) in phage DNA from isolates showed a significant ($* P < 0.05$) increase in the number of ARG copies after mitomycin C (mitC) treatment versus uninduced controls in all ARGs except *sul1*. In the box plot, the cross-pieces of each box represent (from top to bottom) the maximum, upper quartile, median (black bar), lower quartile and minimum values. The black diamond shows the mean value. The upper grey boxes in the box plot represent samples showing values within the 75th percentile and the lower white boxes represent samples showing values within the 25th percentile.

1.5 g/mL, which is in accordance with what is expected for phage particles [25] (Fig. 5A). The band was recovered and used to confirm the presence of phage particles. Following chloroform and DNase treatment, the DNA from the phage capsids was extracted and the ARGs were quantified.

The eight strains showed the presence of phage particles of the Myoviridae and Siphoviridae morphological types (Fig. 5B). Both groups have been reported as the most abundant infecting *E. coli* and *Bacteroides fragilis* in faecally polluted water samples [31,32] and stool samples [33]. Analysis of faecal viromes also indicates that

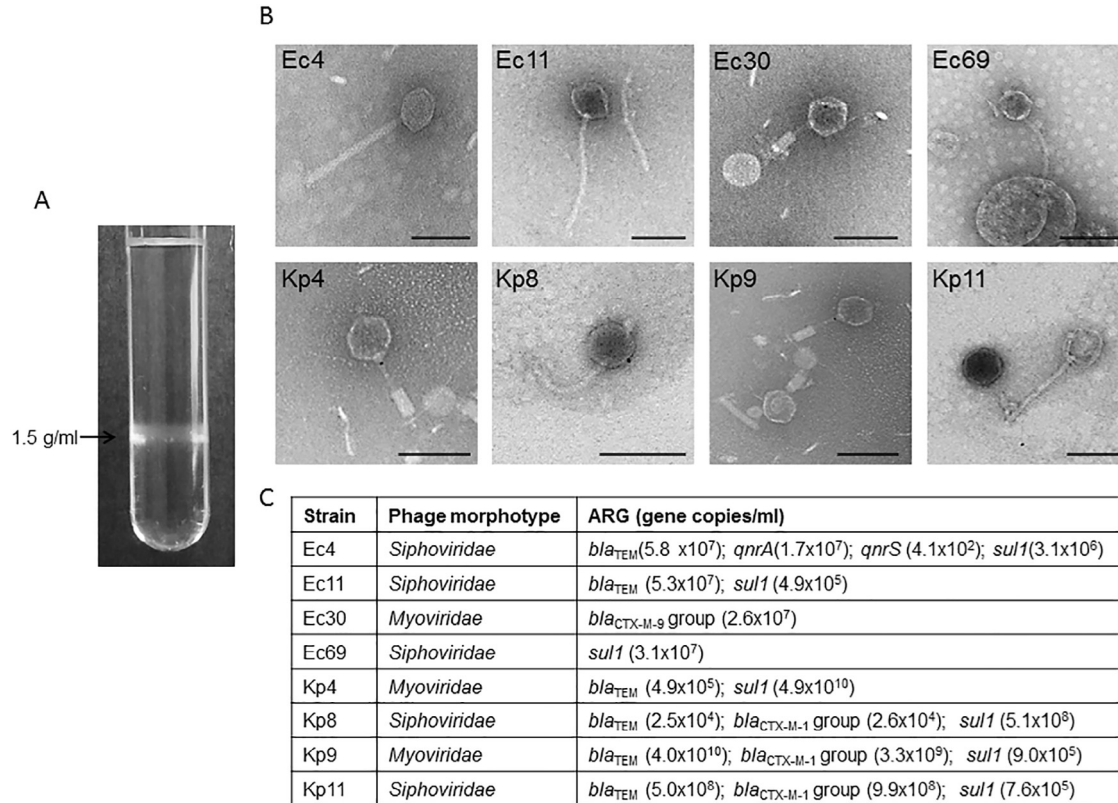


Fig. 5. Visualisation of phage particles from the induced cultures carrying antibiotic resistance genes (ARGs). (A) Example of the grey band corresponding to a density of 1.5 g/mL in a tube of caesium chloride (CsCl) density gradients prepared with the induced fraction of isolate Ec4. (B). Electron micrographs of phage particles purified from the eight *Escherichia coli* (Ec) and *Klebsiella pneumoniae* (Kp) induced isolates. Bar = 100 nm. (C) Quantitative PCR (qPCR) results of the ARGs present in the phage particles purified from the CsCl density bands and visualised by electron microscopy in (B).

tailed, doubled-stranded DNA viruses of the order Caudovirales, which include Siphoviridae, Myoviridae and Podoviridae, are the most abundant types in faeces [34].

A minimal amount of 10^7 particles/mL of sample is required for electron microscopy observation, therefore the phages observed are assumed to be the most abundant in these samples. Accordingly, the packaged DNA extracted from the CsCl density gradient bands containing the phages showed densities of gene copies/mL of $>10^7$ for at least one of the ARGs (Fig. 5C) and some ARGs showed densities of up to 10^{10} gene copies/mL. It can be assumed that at least a fraction of the phage particles visualised by microscopy would carry one of the ARGs in densities in accordance with the particles observed by microscopy and at the same order of magnitude as shown in Fig. 3.

The mobilome [35] includes all the mobile genetic elements (MGEs) in a genome, whilst the resistome [36] refers to all ARGs and their precursors in a bacterial genome. The two concepts are closely linked because, in general, ARGs found intrinsically in certain bacteria are mobilised to recipient cells by a range of MGEs and their spread is the main cause of the alarming emergence of antibiotic-resistant bacteria worldwide [6]. However, the scope of the elements that comprise the mobilome has not yet been definitively defined. The role of plasmids in ARG transfer in clinical settings has been widely reported [7,37], but it is now suspected that other elements, such as phages [9,10,21] or phage-derived particles [11], could also be involved.

The intestinal habitat is a densely populated environment where phages play a determinant role, either in regulation of intestinal populations thereby influencing human welfare, or as MGEs of genes related to pathogenicity [2,12,38]. It has been suggested [11] that phages are efficient genetic vehicles owing to the protection conferred by the protein capsid in extracellular environments.

Some phage genomes are spontaneously induced from resistant strains by environmental conditions [14,28], resulting in transcription and production of new phage particles that then infect and lysogenise other uninfected host cells. Other elements that can be considered as phage-related, because of their evident similarities with phages, are induced in a similar way: this is the case for GTAs [39].

The particles produced by the bacterial isolates in this study appeared to be resident in the isolates as prophages and were induced by mitC treatment. The presence of ARGs in these particles opens up two possibilities. The first is that these are prophages with the ARG inserted in their genome. We would then expect to be able to isolate these ARG-harboring phages and plausibly to transduce the gene in relatively high frequencies. This was not the case here: the transduction attempts were not successful, in line with previous attempts using phage particles isolated from faecally polluted samples [9]. Moreover, some sequencing studies [9,12], as in the present work (data not presented), have shown a lack of phage genes flanking the targeted ARGs.

The second possibility is that following induction, prophage genes in the bacterial isolates have packaged bacterial DNA (including the ARG) in a sort of generalised transduction or GTA-like particle. These would then be detectable by the methods used and show an increase after induction, but with an absence of phage DNA genes, which is more in accord with our observations. These ARG-containing phage particles would theoretically be capable of attaching to new host cells and injecting their DNA [40]. In fact, quite a number of phages reportedly involved in ARG transfer appear to be derived from generalised transduction [41–43]. In terms of their genome, these cannot be considered phages because they contain only bacterial and not phage DNA. In line with these assumptions, an interesting recent study revealed that bacterial DNA, including ARGs, found in viromes was rarely encoded in phage genomes [44]. Once the possibility of bacterial DNA contamination is discarded (although not

completely ruled out), and considering ARGs as those genes that confer real resistance, the most plausible explanation for the presence of ARGs in the studied phage particles is that bacterial DNA is mobilised through generalised transduction or related mechanisms [44].

Acknowledgment

The authors thank Dr Javier Méndez for his valuable contribution to the statistical analysis.

Funding: This study was supported by Plan Nacional de I+D+i and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015) – co-financed by the European Development Regional Fund 'A way to achieve Europe' ERDF; the Fondo de Investigación Sanitaria [grant PI13/00329]; and the Generalitat de Catalunya [2014SGR0073]. MB-J has received a grant from COLCIENCIAS (Republic of Colombia). PE is funded by the Instituto de Salud Carlos III ['Sara Borrell' contract no. CD15/00017].

Competing interests: None declared.

Ethical approval: The Clinical Ethics Committee of Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain) approved this study [12/065/1350].

Appendix. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.11.014](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.11.014).

References

- [1] Rohwer F. Global phage diversity. *Cell* 2003;113:141.
- [2] Reyes A, Haynes M, Hanson N, Angly FE, Andrew C, Rohwer F, et al. Viruses in the fecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* 2010;466:334–8.
- [3] Canchaya C, Fournous G, Chibani-Chennouf S, Dillmann ML, Brüßow H. Phage as agents of lateral gene transfer. *Curr Opin Microbiol* 2003;6:417–24.
- [4] Mojica FJM, Rodríguez-Valera F. The discovery of CRISPR in archaea and bacteria. *FEBS J* 2016;283:3162–9.
- [5] Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010;74:417–33.
- [6] Hawkey PM. The growing burden of antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2008;62(Suppl. 1):i1–9.
- [7] Alekshun MN, Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* 2007;128:1037–50.
- [8] Balcazar JL. Bacteriophages as vehicles for antibiotic resistance genes in the environment. *PLoS Pathog* 2014;10:e1004219.
- [9] Colomer-Lluch M, Jofre J, Muniesa M. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS ONE* 2011;6:e17549.
- [10] Fancello L, Desnues C, Raoult D, Rolain JM. Bacteriophages and diffusion of genes encoding antimicrobial resistance in cystic fibrosis sputum microbiota. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:2448–54.
- [11] Quirós P, Brown-Jaque M, Muniesa M. Spread of bacterial genomes in packaged particles. *Future Microbiol* 2016;11:171–3.
- [12] Quirós P, Colomer-Lluch M, Martínez-Castillo A, Miró E, Argente M, Jofre J, et al. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:606–9.
- [13] Lahey Clinic. β -Lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes. Burlington, MA: Lahey Clinic; 2015. <https://www.lahey.org/Studies/>. [Accessed 26 January 2018].
- [14] Colomer-Lluch M, Jofre J, Muniesa M. Quinolone resistance genes (*qnrA* and *qnrS*) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:1265–74.
- [15] Hiramatsu K, Ito T, Tsubakishita S, Sasaki T, Takeuchi F, Morimoto Y, et al. Genomic basis for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infect Chemother* 2013;45:117–36.
- [16] Granier SA, Hidalgo L, San Millan A, Escudero JA, Gutierrez B, Brisabois A, et al. ArmA methyltransferase in a monophasic *Salmonella enterica* isolate from food. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:5262–6.
- [17] Pallecchi L, Lucchetti C, Bartoloni A, Bartalesi F, Mantella A, Gamboa H, et al. Population structure and resistance genes in antibiotic-resistant bacteria from a remote community with minimal antibiotic exposure. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1179–84.

- [18] Colomer-Lluch M, Imamovic L, Jofre J, Muniesa M. Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4908–11.
- [19] Calero-Cáceres W, Melgarejo A, Colomer-Lluch M, Stoll C, Lucena F, Jofre J, et al. Sludge as a potential important source of antibiotic resistance genes in both the bacterial and bacteriophage fractions. *Environ Sci Technol* 2014;48:7602–11.
- [20] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement. Document M100-S22. Wayne, PA: CLSI; 2012.
- [21] Muniesa M, García A, Miró E, Mirelis B, Prats G, Jofre J, et al. Bacteriophages and diffusion of β -lactamase genes. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1134–7.
- [22] Lachmayr KL, Kerkhof LJ, Dirienzo AG, Cavanaugh CM, Ford TE. Quantifying nonspecific TEM β -lactamase (*bla*_{TEM}) genes in a wastewater stream. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:203–11.
- [23] Volkmann H, Schwartz T, Bischoff P, Kirchen S, Obst U. Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (*TaqMan*). *J Microbiol Methods* 2004;56:277–86.
- [24] Sambrook J, Russell D. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. p. 999.
- [25] King AMQ, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB, editors. *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Inc.; 2011.
- [26] Brown-Jaque M, Muniesa M, Navarro F. Bacteriophages in clinical samples can interfere with microbiological diagnostic tools. *Sci Rep* 2016;6:33000.
- [27] Nüesch-Inderbinen M, Zurfluh K, Hächler H, Stephan R. No evidence so far for the dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the community in Switzerland. *Antimicrob Resist Infect Control* 2013;2:23.
- [28] Livny J, Friedman DI. Characterizing spontaneous induction of Stx encoding phages using a selectable reporter system. *Mol Microbiol* 2004;51:1691–704.
- [29] McDaniel LD, Young EC, Ritchie KB, Paul JH. Environmental factors influencing gene transfer agent (GTA) mediated transduction in the subtropical ocean. *PLoS ONE* 2012;7:e43506.
- [30] Bossi L, Fuentes JA, Mora G, Figueroa-Bossi N. Prophage contribution to bacterial population dynamics. *J Bacteriol* 2003;185:6467–71.
- [31] Muniesa M, Lucena F, Jofre J. Study of the potential relationship between the morphology of infectious somatic coliphages and their persistence in the environment. *J Appl Microbiol* 1999;87:402–9.
- [32] Queralto N, Jofre J, Araujo R, Muniesa M. Homogeneity of the morphological groups of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* strain HSP40 and strain RYC2056. *Curr Microbiol* 2003;46:163–8.
- [33] Chibani-Chennoufi S, Sidoti J, Bruttin A, Dillmann M-L, Kutter E, Qadri F, et al. Isolation of *Escherichia coli* bacteriophages from the stool of pediatric diarrhea patients in Bangladesh. *J Bacteriol* 2004;186:8287–94.
- [34] Chehoud C, Dryga A, Hwang Y, Nagy-Szakal D, Hollister EB, Luna RA, et al. Transfer of viral communities between human individuals during fecal microbiota transplantation. *MBio* 2016;7:e00322.
- [35] Siefert JL. Defining the mobilome. *Methods Mol Biol* 2009;532:13–27.
- [36] Wright GD. The antibiotic resistome. *Expert Opin Drug Discov* 2010;5:779–88.
- [37] Cantón R. Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clin Microbiol Infect* 2009;15(Suppl. 1):20–5.
- [38] Wagner J, Maksimovic J, Farries G, Sim WH, Bishop RF, Cameron DJ, et al. Bacteriophages in gut samples from pediatric Crohn's disease patients: metagenomic analysis using 454 pyrosequencing. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19:1598–608.
- [39] Zhaxybayeva O, Doolittle WF. Lateral gene transfer. *Curr Biol* 2011;21:R242–6.
- [40] Fineran PC, Petty NKSG. Transduction: host DNA transfer by bacteriophages. In: *Encyclopedia of microbiology*. San Diego, CA: Elsevier Academic Press; 2009. p. 666–79.
- [41] Willi K, Sandmeier H, Kulik EM, Meyer J. Transduction of antibiotic resistance markers among *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains by temperate bacteriophages Aa phi 23. *Cell Mol Life Sci* 1997;53:904–10.
- [42] Bearson BL, Brunelle BW. Fluoroquinolone induction of phage-mediated gene transfer in multidrug-resistant *Salmonella*. *Int J Antimicrob Agents* 2015;46:201–4.
- [43] Beumer A, Robinson JB. A broad-host-range, generalized transducing phage (SN-T) acquires 16S rRNA genes from different genera of bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:8301–4.
- [44] Enault F, Briet A, Bouteille L, Roux S, Sullivan MB, Petit M-A. Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses. *ISME J* 2017;11:237–47.

4.3. CAPÍTULO 3:

El fagoma fecal de individuos sanos y las variaciones causadas por el tratamiento con ciprofloxacina

El fagoma fecal de individuos sanos y las variaciones causadas por el tratamiento con ciprofloxacina

Fecal phageome of healthy individuals and variations caused by ciprofloxacin treatment

Autores: Dietmar Fernández-Orth, Elisenda Miró, **Maryury Brown-Jaque**, Paula Espinal, Judith Rodríguez-Navarro, Juan José González-López, Maite Muniesa, Ferrán Navarro

Revista: Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Sometido por segunda vez en octubre de 2018 y actualmente en segunda revisión.

Introducción

Comúnmente, los estudios sobre el microbioma intestinal se han enfocado principalmente en el componente bacteriano. Sin embargo, recientes estudios sugieren que la fracción viral también contribuye a la configuración de la estructura del microbioma.

La fracción fágica es la más abundante del viroma y según se ha descrito, muchos de estas partículas fágicas contienen ADN bacteriano (Dutilh et al., 2014; Navarro and Muniesa, 2017; Norman et al., 2015). Lo anterior sumado a la gran abundancia de fagos con capacidad de infectar todo tipo de géneros bacterianos, sugiere que las partículas fágicas son un mecanismo de intercambio genético que tiene un papel relevante en la salud y la enfermedad (Dalmasso et al., 2014).

Los tratamientos con antibióticos están correlacionados con el incremento de bacterias resistentes a los antimicrobianos (Ventola, 2015) y a su vez, tienen serias implicaciones en la diversidad y la abundancia de especies del microbioma. En el caso de los bacteriófagos, la perturbación ocasionada por los antibióticos puede afectar las poblaciones de fagos e incrementar sus tasas de propagación (Goerke et al., 2006), promoviendo de este modo la transferencia genética mediada por fagos.

En el presente estudio, se exploró el rol de los fagos en la difusión de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) en comunidades bacterianas humanas con ayuda de herramientas metagenómicas. También se evaluó la relación de los bacteriófagos con la alteración de los patrones de ARGs en un individuo que recibía tratamiento con antibióticos.

Objetivos

Para llevar a cabo este estudio, se plantearon los siguientes objetivos:

- Purificar la fracción fágica de las muestras fecales humanas incluidas en el estudio.
- Secuenciar el ADN fágico obtenido de las muestras fecales usando la tecnología Illumina MiSeq.
- Procesar y analizar los datos obtenidos de la secuenciación masiva del ADN fágico de muestras fecales mediante el uso de diversas herramientas bioinformáticas.
- Detectar y cuantificar por qPCR 8 genes de resistencia (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{OXA-48}, *mecA*, *qnrA*, *qnrS* y *sul1*) en la fracción de ADN fágico de muestras fecales humanas.
- Evaluar cambios producidos en el fagoma de las heces de un individuo sano causados por un tratamiento con ciprofloxacina.

Resultados y discusión

Los resultados de este trabajo fueron obtenidos a partir de 5 muestras fecales (UB25, UB6, HC10, HC9, HC6) de individuos sanos, cuyas edades estuvieron comprendidas entre los 26 y los 53 años. Ninguno de los sujetos había recibido antibióticos en los tres meses anteriores a la recolección de la muestra. Además, se analizaron 2 muestras fecales provenientes de un individuo de 66 años, una de las cuales fue recolectada antes de recibir antibióticos (PRECIP) y la otra, cuatro días después de haber iniciado un tratamiento profiláctico previo a una cirugía con 500 mg de ciprofloxacina cada 12 horas durante de 5 días (POSTCIP).

Todos los individuos pertenecían al área de Barcelona (Cataluña) y es importante resaltar que ninguno estuvo involucrado en brotes de origen alimentario, ni mostró alguna patología gastrointestinal o infección conocida. Los individuos no viajaron al extranjero en los tres meses previos al muestreo excepto aquellos correspondientes a las muestras HC9 y HC10, quienes viajaron a la República de Ecuador y Perú, respectivamente.

El estudio del fagoma de estas muestras arrojó un total de 11,754.439 *reads* (Tabla 1). Estos *reads* fueron ensamblados con Spades y luego fueron clasificados

taxonómicamente con la base de datos estándar de Kraken (Tabla 1). Adicionalmente, se realizó una búsqueda de secuencias fágicas en los *contigs* ensamblados usando Phaster (Arndt et al., 2016) (Tabla 1 y Archivo Suplementario 2). Los viomas mostraron un moderado número de *contigs* relacionados con fagos (Tabla 1).

Se identificaron genes de origen fágico como resultado de la anotación de los *contigs* generados efectuada con Prokka. Los datos revelaron genes estructurales fágicos, terminasas e hidrolasas (Tabla 1 y Archivo Suplementario 3). Además, Prokka detectó secuencias que codifican ciertos mecanismos de resistencia, tales como bombas de eflujo, en las muestras UB25, HC9, UB6, PRECIP y POSTCIP (Archivo Suplementario 3, azul).

Además de los genes de fagos, el análisis de Kraken reveló un alto porcentaje de secuencias correspondientes a ADN bacteriano o de arqueas en los viomas (Tabla 1 y Archivo Suplementario 4). Algunos de estos genes son claramente de origen bacteriano, mientras que otros pueden estar presentes ya sea en partículas de origen fágico o bacterias (Lundin et al., 2010). Esta gran proporción de secuencias bacterianas podrían ser originadas a partir de partículas fágicas derivadas de transducción generalizada o mecanismos similares (García-Aljaro et al., 2017) que pueden generar cápsides con contenido de ADN bacteriano en lugar de fágico (Enault et al., 2017).

Según Kraken, la fracción viral de las muestras correspondía en su mayoría al orden *Caudovirales* incluyendo fagos de las familias *Siphoviridae*, *Myoviridae* y *Podoviridae*. Adicionalmente, los viomas obtenidos fueron analizados usando la aplicación VirSorter. Los resultados derivados de este análisis evidenciaron numerosos genes de fagos en algunos de los *contigs* de cada muestra (Tabla 1), respaldando aquellos identificados por Kraken y aportando información adicional.

Cuando se cotejaron los viomas con ResFinder 2.1 y Prokka 1.11, se detectaron diversos genes de resistencia y genes correspondientes a mecanismos relacionados con resistencia, como bombas de eflujo. Por otro lado, se cuantificaron por qPCR 8 ARGs específicos que habían sido previamente detectados en viomas de heces humanas (Brown-Jaque et al., 2018; Quirós et al., 2014). Se detectó al menos uno de dichos ARGs en todas las muestras excepto en PRECIP, pero no se detectó ninguno de estos ni por qPCR ni en el análisis metagenómico (Tabla 3). Sin embargo, la falta de correspondencia entre los ensayos de qPCR y los *reads* de metagenómica ha sido reportada anteriormente (Hjelmsø et al., 2017).

Posteriormente, las regiones flanqueantes de los ARGs detectados por ResFinder fueron analizadas con BLAST con el fin de indagar sobre su origen. Estas regiones pertenecían al genoma de diversas especies bacterianas y se correspondían con elementos genéticos móviles, mayoritariamente transposones y secuencias de inserción (Tabla 3). Este hecho apoyaría nuestra suposición sobre los mecanismos de transducción generalizada como origen de las partículas fágicas aquí obtenidas. Por otra parte, cabe resaltar que dichos elementos genéticos móviles flanqueando a los ARGs podrían servir de plataformas para la movilización de estos genes.

Por último, la comparación de las muestras provenientes del mismo individuo antes y después de recibir tratamiento con ciprofloxacina arrojó diferencias en el porcentaje de *contigs* virales detectados y una mayor prevalencia de ARGs en la muestra POSTCIP (Tablas 1 y 3). Todas las secuencias fágicas presentes en ambas muestras correspondían al orden *Caudovirales*, con una mayor prevalencia de secuencias de *Myoviridae* en la muestra PRECIP, mientras que en POSTCIP casi todas pertenecían a *Siphoviridae* (Tabla 2; Figura 1).

En la muestra PRECIP no se detectó ningún ARG y solo se identificaron dos genes de bomba de eflujo por Prokka. En cambio, en POSTCIP se detectaron ARGs tanto por el análisis metagenómico como por qPCR (Tabla 3). En particular, después de que el individuo recibiera tratamiento con ciprofloxacina, se detectaron genes transmisibles de resistencia a quinolonas en la muestra POSTCIP.

Con el fin de confirmar si las variaciones en la prevalencia de ARG eran un efecto del tratamiento con ciprofloxacina y obtener información adicional sobre los niveles de referencia de ARGs en este individuo, se tomaron dos muestras independientes al cabo de un año y un año y una semana después del tratamiento. Durante este tiempo el individuo no recibió ningún tratamiento antibiótico adicional. No se detectaron ARGs en el ADN fágico de estas dos muestras.

Aunque se conoce que el fagoma alberga ARGs que pueden transferirse a otras bacterias (Muniesa et al., 2004b; Quirós et al., 2014), hay pocos estudios de metagenómica sobre fagomas humanos que muestran que los fagos contribuyen a la propagación de ARGs en las comunidades bacterianas (Dutilh et al., 2014; Enault et al., 2017; Subirats et al., 2016).

Conclusiones

- El enfoque metagenómico confirmó la presencia de fagos o cápsides de fagos que contenían ADN bacteriano, incluidos los ARG.

- Los mecanismos de empaquetamiento son desconocidos, pero los resultados señalan a los fagos como vehículos para la diseminación de resistencias entre la comunidad bacteriana.
- Futuros estudios podrían dilucidar el impacto de los fagos en la regulación de la microbiota y la propagación de bacterias multirresistentes como un problema de salud mundial.

1 **Fecal phageome of healthy individuals and variations caused by ciprofloxacin**
2 **treatment**

3 Dietmar Fernández-Orth^{1*}, Elisenda Miró^{2*}, Maryury Brown-Jaque³, Lorena Rodríguez-
4 Rubio³, Paula Espinal², Judith Rodríguez-Navarro^{2,4}, Juan José González-López^{4,5},
5 Maite Muniesa^{3§}, Ferran Navarro^{2, 4§}

6 *These first authors contributed equally to this article.

7 §made an equal contribution as last authors.

8 ¹ISGlobal, Barcelona Centre for International Health Research; Department of
9 Microbiology, Hospital Clínic de Barcelona, Universitat de Barcelona, Spain.

10 ² Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació
11 Biomèdica Sant Pau, Sant Quintí 89, E-08041 Barcelona, Spain.

12 ³Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Universitat de Barcelona,
13 Diagonal 643, Annex, Floor 0, E-08028 Barcelona, Spain.

14 ⁴Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona,
15 Barcelona, Spain.

16 ⁵Department of Clinical Microbiology, Hospital Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Institut
17 de Recerca (VHIR), Pg Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain.

18 **Corresponding authors:** Drs. Maite Muniesa and Ferran Navarro

19 M. Muniesa. Phone: +34 93 4039386. Fax: 934039047 e-mail: mmuniesa@ub.edu

20 F. Navarro. Phone: +34 93 5537297. Fax: 935537287. e-mail: Fnavarror@santpau.cat

21 **Running title-** Phageome and antibiotics

22 **Keywords.-** Phageome, metagenomics, bacteriophages, antibiotic resistance,
23 transduction, horizontal gene transfer, human feces.

24 **Synopsis**

25 ***Objectives***

26 Antimicrobial resistance genes (ARGs) can be transferred by means of mobile
27 genetic elements (MGEs), which play a critical role in the dissemination of resistances
28 in the bacterial community. ARG transmission within MGEs has been reported in
29 plasmids and transposons but less frequently in bacteriophages. Here, the bacteriophage
30 fraction of seven human fecal samples was purified and deep-sequenced to detect the
31 presence of ARGs in the phage particles.

32 ***Methods***

33 Seven fecal samples (five from healthy individuals, and two from a patient
34 before and after receiving ciprofloxacin treatment) were used to extract phage DNA,
35 which was purified and then sequenced in a MiSeq (Illumina). Generated reads were
36 checked for quality and assembled, and the generated contigs analyzed with Kraken,
37 PHASTER, VirSorter and Prokka. Some genes were also validated by qPCR.

38 ***Results***

39 Analysis of the purified phage DNA by Kraken identified from 4 to 266 viral
40 particles in the samples. The viral fraction corresponded mainly to the order
41 *Caudovirales*, including phages from the *Siphoviridae* and *Myoviridae* families.
42 Bacterial genes associated with antimicrobial resistance were detected in the viral DNA,
43 as confirmed by qPCR. Higher densities of ARG-carrying phage particles were
44 observed in the post- versus pre-ciprofloxacin treatment sample.

45 ***Conclusions***

46 The finding of ARGs in phage particles supports the description of phages as
47 mobile elements contributing to the dissemination of bacterial antibiotic resistance and

48 suggests ciprofloxacin treatment may play a role in the release of ARG-carrying
49 particles, thereby increasing resistance.

50

51 **Introduction**

52 Descriptions of the lower gastrointestinal tract microbiome have focused chiefly
53 on bacterial components^{1,2}. However, recent research has suggested that the viral
54 fraction also contributes to shaping the microbiome structure³⁻⁶.

55 Within the virome, the phage fraction is the most abundant, with an active
56 phageome reported to comprise 35-2800 viruses,^{1,4,5} and many viral particles carry
57 bacterial DNA.⁷⁻⁹ The great abundance of phages infecting all sorts of bacterial genera
58 suggests that phages and phage-derived particles are a mechanism of genetic exchange
59 that may play an important role in human health and disease.^{6,10}

60 Antibiotic treatment is associated with the rise of antimicrobial resistant bacteria
61 ¹¹ and affects microbiome composition and species abundance.¹ As phages constitute
62 an important part of the microbiome, antibiotic perturbation might also affect phage
63 populations and promote their propagation rates,^{12,13} thereby increasing phage-mediated
64 gene transfer.

65 Using a metagenomic approach, this study explored how phage particles may
66 actively contribute to antimicrobial resistance through the mobilization of antibiotic
67 resistant genes (ARGs) in human bacterial communities. When studying viromes,
68 contamination with bacterial DNA poses a serious drawback,¹⁴ therefore an optimized
69 protocol was used to ensure that DNA outside the phage capsids was completely
70 removed and that only packaged DNA was sequenced.¹⁴ The role of phages in altering
71 ARG patterns in an individual receiving antibiotic treatment was also assessed.

72

73 **Materials and methods**

74 **Fecal samples.** Samples HC6, HC9, HC10, UB6 and UB25 were obtained from
75 five healthy individuals (aged 53, 39, 37, 27 and 26 years, respectively). The subjects
76 did not consume antibiotics in the three months prior to sample collection. Samples
77 PRECIP and POSTCIP were obtained from the same individual (aged 66 years):
78 PRECIP before taking antibiotics and POSTCIP four days after starting a 5-day
79 ciprofloxacin treatment (500 mg/12 hours) prescribed as prophylaxis before dental
80 surgery. The same individual supplied two independent fecal samples one year and one
81 year plus one week after the study, when no longer receiving any antibiotics. All
82 individuals live in Barcelona (Catalonia), none were involved in a food-borne outbreak
83 or showed any gastro-intestinal pathology or known infection, and none travelled
84 abroad in the three months before sampling except those providing samples HC9 and
85 HC10, who travelled to the Republic of Ecuador and Peru, respectively.

86 All samples were completely anonymized. The study was approved by the
87 Clinical Ethics Committee of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (12/065/1350).
88 Informed consent was obtained for all individuals.

89 **Purification of DNA from phage particles.** Ten g of fecal samples were
90 homogenized 1:5 (w:v) in phosphate buffered saline (PBS) by shaking for 30 minutes.
91 50 mL of the homogenate was centrifuged at 3,000 *xg* and the supernatant was filtered
92 through low protein-binding, 0.22 µm pore-size membrane filters (Millex-GP,
93 Millipore, Bedford, MA) to remove cellular debris and bigger particles while allowing
94 viral protein capsids, small particles (including small vesicles) and free DNA to pass.
95 The viral capsids in the filtrates were 20-fold concentrated using protein concentrators
96 (100 kDa Amicon Ultra centrifugal filter units, Millipore, MA, US), at 3,000*xg*
97 following the manufacturer's instructions. Two ml concentrated suspensions were

98 treated twice with chloroform 1:10, mixed by vigorous vortexing for 5 minutes and
99 centrifuged at 16,000 *xg* for 10 minutes to disrupt bacterial membranes with the aim of
100 breaking DNA-containing small vesicles that might have passed through the 0.22 μm
101 pore-size membrane filters. The supernatant was treated with DNase (100 units/mL;
102 Sigma-Aldrich, Spain) using the reaction buffer provided by the manufacturer for 1
103 hour at 37°C to eliminate non-packaged DNA that might have passed the filters
104 (bacterial DNA or DNA released from vesicles after the chloroform treatment). The
105 DNase was inactivated using the Stop Solution provided by the manufacturer.

106 In this step, viral capsids remain intact and no vesicles were observed (as
107 confirmed by electron microscopy in previous studies),²¹ whereas free DNA outside
108 viral capsids should have been removed by the DNase treatment. To confirm the
109 absence of non-packaged bacterial DNA, an aliquot of the phage suspension was taken
110 at this stage and used as a template to amplify each ARG and eubacterial 16S rDNA by
111 qPCR (Table 1). If the protocol had successfully eliminated most of the vesicles as well
112 as DNA outside the viral capsids, both amplifications would be negative.

113 The protocols applied here for DNase treatment and DNase inactivation were
114 verified in previous studies of the group.¹⁵ Briefly, the DNase performance was verified
115 by adding known concentrations of an ARG that would not be detected by qPCR if
116 adequately eliminated by the DNase. DNase inactivation was previously confirmed by
117 adding known concentrations of an ARG immediately after the DNase inactivation step
118 and by amplifying this ARG by qPCR. An incomplete DNase inactivation would have
119 resulted in a reduced amplification of the ARG caused by DNase cleavage of the
120 primers in the qPCR assay, which was not observed.¹⁵

121

122 Packaged DNA was extracted using a double extraction to achieve the required
123 purity. Firstly, the PowerSoil® DNA isolation kit (MO Bio) was used, which broke
124 down the capsids and allowed the viral DNA to be recovered. Since the purity of the
125 extracted DNA was not yet optimal, according to the Bioanalyzer system (Agilent
126 Technologies, CA, US), further purification was carried out using the EZ1 Virus Mini
127 Kit v2.0 (Qiagen, CA, US) following the manufacturer's instructions to a final volume
128 of 60µl.

129 **Sequencing.** After purification, the DNA concentration was evaluated using a
130 Qubit® Fluorometer (Life Technologies. CA, US) and the DNA quality was further
131 confirmed using the 2100 Bioanalyzer system (Agilent Technologies, CA, US). 0.2
132 ng/µl of DNA was used to prepare the libraries.

133 Illumina libraries were generated following the Nextera XT (Illumina, Inc., San
134 Diego, CA, US) manufacturer's protocol for paired-end libraries (2x150 bp). For
135 extension, 14 PCR cycles of 2.5 min were performed to increase the tagmentation
136 process. Libraries were purified and checked in a 2100 Bioanalyzer electrophoresis
137 instrument (Agilent Technologies, CA, US) and quantified in a Quantus™ Fluorometer
138 (Promega, WI, US). An equimolar pool of the seven samples was sequenced in an
139 Illumina MiSeq system with the Miseq Reagent Kit v2 (Illumina).

140 **Bioinformatic analysis.** Sequence reads were quality checked with FASTQC
141 v0.11.2 to detect any anomalies in the sequencing process. Reads were then *de novo*
142 assembled with default parameters using SPAdes v3.6.2.¹⁶ Contigs were classified
143 taxonomically with Kraken v0.10.5¹⁷ using the standard Kraken database that
144 comprises NCBI taxonomic information, as well as the complete genomes in RefSeq for
145 the bacterial, archaeal, viral as well as phage domains. In parallel, contigs were
146 identified by comparison against the phage sequence database using PHASTER.¹⁸

147 PHASTER classifies prophage sequences according to the percentage of the total
148 number of coding sequences (CDS) and the presence of specific phage-related words.
149 VirSorter was used to identify viral signals in the assembled contigs.¹⁹

150 Gene annotation was performed with Prokka 1.11,²⁰ which establishes an e-
151 value of 10^{-6} within the different included databases. ARGs were searched with
152 ResFinder 2.1,²¹ which establishes a percentage of identity between CDS and the ARGs.
153 The minimum percentage of identical nucleotides shared between the best matching
154 ARG in the database and the corresponding sequence in a contig was established as 90
155 %. The minimum percentage of overlapping nucleotides between a sequence and an
156 ARG to count as a hit for that gene was established as 60 %.

157 Sequences flanking the ARG genes detected by Resfinder were examined with
158 BLAST²² to ascertain whether the sequences were phage or bacterial.

159 The search for 16S rDNA sequences in the contigs was performed with Metaxa2
160 software,²³ which allows detection of the 16S DNA in metagenomic samples taking
161 into account the contigs generated in the novo assembling (done by Spades).

162

163 **Standard PCR and qPCR procedures.** PCRs were performed with an Applied
164 Biosystems 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Barcelona, Spain). ARGs from
165 the control strains were amplified by conventional PCR (Table 1).

166 Real-time qPCR assays using TaqMan hydrolysis probes for the different ARGs
167 (Table 1) were used under standard conditions as previously described²⁴⁻²⁷. Those
168 ARGs analyzed by SYBR Green (Table 1) were quantified using PowerUp SYBR
169 Green Master Mix (ThermoFisher Scientifics, Waltham Massachusetts) following the
170 manufacturer's instructions.

171

172

173 **Results**

174 **Identification of DNA from phage particles**

175 Study of DNA from phage particles gave a total of 11,754.439 reads (Table 2),
176 with an average depth of 1.68 ± 0.18 Mb per sample and a sufficiently high quality for
177 our purposes. Trimming was not carried out, as the QC performed by FastQC showed
178 high quality reads, even in the last read positions. Sequence adaptors were also not
179 detected. The results obtained when trimming was performed were almost the same
180 (analysis not shown). As the results can vary depending on the bioinformatic tool used,
181 reads were first assembled with SPAdes and then taxonomically classified with the
182 Kraken Standard Database (Table 2). In addition, the assembled contigs were used to
183 perform a search for phage sequences with PHASTER¹⁸ (Table 2 and Supplementary
184 File 1), which discriminates between sequences with a high certainty of belonging to
185 phages and those that are questionable or incomplete. PHASTER identified a different
186 number of phage-related contigs in the DNA from phage particles compared to Kraken
187 (Table 2).

188

189 The generated contigs were annotated using Prokka v1.11,²⁰ which allowed
190 several phage genes to be identified (Table 2 and raw data in Supplementary File 2).
191 However, since genes in phage genomes can be shared among several phage taxa,
192 Prokka cannot determine if a given gene belongs to a specific phage. Data analysis
193 revealed phage structural genes (encoding capsid and tail), terminase and hydrolases
194 (Supplementary File 2). Also, Prokka detected ARG sequences in UB25, HC9, UB6,
195 PRECIP and POSTCIP (Supplementary File 2, blue).

196 Besides phage genes, Kraken analysis revealed numerous genes from different
197 bacterial species in the phage DNA fraction of the samples (Supplementary File 3).
198 Some genes were clearly of bacterial origin, while others, such as integrases or
199 ribonucleotide reductases, can be present in either phages or bacteria.^{27,28}

200 Contamination with non-packaged DNA was excluded by the controls, which
201 showed an absence of 16S rDNA and ARGs in the phage suspensions before
202 desencapsidation. Efficient DNA removal by DNase activity was confirmed and DNase
203 was completely inactivated by thermal treatment.

204 Additional information was obtained with VirSorter, which classified matches in
205 three categories. (i) Category 1 (“*most confident*” predictions) regions have significant
206 enrichment in viral-like genes and at least one hallmark viral gene detected. A hallmark
207 viral gene is typically of viral origin annotated as such (capsid gene, portal, terminase,
208 etc.). (ii) Category 2 regions correspond to “likely” predictions and are either enriched
209 in viral-like or non-*Caudovirales* genes, or have a viral hallmark gene detected.
210 Category 3 (“*possible*” prediction) was not considered.

211

212 **Viral identification**

213 According to the Kraken output, a high percentage of sequences in the viromes
214 (hereby understood as DNA extracted from the viral fraction, mostly phage particles)
215 belonged to bacterial or archaeal DNA (4.8%-29%), while the percentage of viral
216 sequences among the samples varied from 0.5% to 23.9% (Table 2 and Supplementary
217 File 3). The remaining sequences were not identified, or classed as uncharacterized
218 viruses (viral dark matter).²⁹

219

220 The distribution of the Kraken-identified viral sequences in the DNA from phage
221 particles revealed that the order *Caudovirales*, which includes most bacteriophages, was
222 the most abundant (Fig. 1, Table 3). Within this group, *Siphoviridae* was the most
223 prominent family, within which phages of lactic acid bacteria, including Skunalikevirus,
224 ³⁰ were the most abundantly identified by comparison against the databases. All the
225 sequences found in samples UB6 and UB25 belonged to the *Siphoviridae*. Sequences of
226 phages belonging to the *Myoviridae* family were only found in the PRECIP sample,
227 particularly those infecting *Clostridium* and *Bacillus*. The POSTCIP sample contained a
228 small percentage of *Escherichia coli* phages of the *Podoviridae* family. Based on
229 database sequences, HC6 showed a contig with 100 % homology with the phage ØX174
230 from the family *Microviridae*, which infects *E. coli*, and HC9 contained *Rhodococcus*
231 phages. In addition, 50% of the viral sequences in HC9 belonged to the family
232 *Mimiviridae*, giant viruses that use *Amoebae* as hosts. ³¹

233 VirSorter also identified numerous phage genes belonging to *Caudovirales* in
234 several contigs of each sample (Table 2), particularly when categories 1 and 2 were
235 considered together. However, this is not indicative of the number of phages because it
236 is possible that several contigs belonged to the same phage. Data are available upon
237 request.

238

239 **Detection of ARGs in the phage particles**

240 The DNA from phage particles was searched for ARGs using ResFinder 2.1 and
241 Prokka 1.11 (Table 4). ResFinder identifies only a limited number of acquired ARGs,
242 while Prokka identifies any gene possibly involved in antibiotic or heavy metal
243 resistance, including those not exclusively involved in antibiotic resistance. The DNA
244 from phage particles was also searched for bacterial 16S rDNA using Metaxa2, and it

245 was detected in several contigs from all samples (Table 4). In contrast, 16S rDNA was
246 not detected in the samples before the capsids were broken down, as shown above.

247

248 Phage DNA in the samples was also analyzed by real-time qPCR targeting
249 specific ARGs (β -lactamases *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1} group and *bla*_{CTX-M-9} group, *bla*_{OXA-48},
250 methicillin resistance *mecA*, sulfonamide resistance *sulI* and quinolone resistance *qnrA*
251 and *qnrS*),^{24,25}. These were selected for their clinical significance and because they have
252 previously been detected in human fecal viromes.^{24,25} We also included most of the
253 ARGs identified in the metagenomic analysis (tetracycline resistance *tetW*, β -lactamase
254 *bla*_{CFXA6}, and macrolide resistance *ermF* and *mefA*). qPCR amplified at least one ARG
255 in all the samples except PRECIP (Table 4). The results obtained by metagenomic
256 analysis and qPCR did not always coincide. In general, metagenomics only detected the
257 most abundant ARGs (those showing a lower threshold cycle (Ct) by qPCR) (Table 4).
258 To shed light on the origin of the ARGs detected by ResFinder, the flanking regions
259 were analyzed by BLAST. The length of the flanking regions of each ARG varied
260 depending on the contig length, ranging from 127 to 5,050 bp. Sequences showing more
261 than 95% identity with the fragment analyzed corresponded mostly to *Bacteroides*
262 *fragilis* or in a few cases other *Bacteroides* and bacterial species (Table 4). All
263 sequences corresponded with mobile genetic elements such as transposons or insertion
264 sequence elements, and specific phage sequences were not identified.

265

266 **Comparison of samples from the same individual before (PRECIP) and** 267 **after (POSTCIP) ciprofloxacin treatment**

268 PRECIP and POSTCIP samples showed differences in the metagenome structure
269 and viral content (Table 2). With a similar number of reads, the bacterial sequences

270 detected in POSTCIP did not change remarkably in terms of species. However, a greater
271 prevalence of genes from the Bacteroidetes group, lower prevalence of Actinobacteria
272 and higher viral prevalence and diversity was observed in the POSTCIP sample (Fig. 2).
273 All identified sequences in both samples corresponded to *Caudovirales*; PRECIP
274 presented a higher prevalence of *Myoviridae*, whereas in POSTCIP almost all were
275 *Siphoviridae* (Table 2; Fig. 2).

276 The PRECIP sample did not show any ARGs, and only Prokka identified two
277 efflux pump genes (involved in antimicrobial resistance) (Table 4). In contrast, ARGs
278 were detected in the POSTCIP sample by both metagenomic analysis and qPCR (Table
279 4). Notably, after the treatment with ciprofloxacin, POSTCIP showed low but detectable
280 levels of quinolone resistance genes (*qnrA* and *qnrS*).

281 To confirm that the higher ARG prevalence was caused by ciprofloxacin and to
282 gain insight into the background ARG levels in this individual, two additional samples
283 were taken one year and one year plus one week after the treatment. No ARGs were
284 detected by qPCR in phage DNA from these two samples.

285

286 **Discussion**

287 Studies of the phage community in human biomes have identified at least 1,000
288 phage and prophage sequences, the majority belonging to double-stranded DNA viruses
289 of the *Caudovirales* order (*Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae*) and others to single-
290 stranded DNA viruses such as the *Microviridae* family.^{32,33} An accurate analysis of the
291 DNA from phage particles greatly depends on the methods used, including the
292 extraction technique. In our study, we avoided concentration steps that could bias
293 species detection in the samples,³⁴ and phenol was not used, as it negatively affects the
294 purity of the extracted DNA.²⁵

295 Results also depend on the depth of sequencing. Illumina recommends starting
296 with a minimum of 100k reads, but here, as in similar studies, the number was increased
297 from 1 to 3 Mb ³⁵ to minimize the loss of sequences belonging to rare species. ³⁴
298 Additionally, precise separation of the phage fraction is critical for avoiding chimeras,
299 which can be generated when analyzing total DNA in a metagenomic study. Shotgun
300 metagenomics thus provides a functional and detailed taxonomical classification of the
301 species composing the virome. ³⁶

302

303 As no perfect tool exists for the detection of phage sequences or ARGs, it is
304 advisable to use a combination of different software, allowing contigs to be grouped
305 from different standpoints. We used SPAdes for the metagenomic assembly since it has
306 been favorably described compared with other options like Soap, Metavelvet, Omega or
307 MetaHit.³⁷ Different software tools will yield different results. For example, Kraken
308 includes any virus (not only phages, although these are the most abundant) and phage
309 sequence annotated as such in the databases. In contrast, VirSorter is more restrictive,
310 particularly for category 1 regions, and will only identify genes with a clear phage
311 origin. However, VirSorter allows the prediction of viral sequences outside the host
312 genome, even from short fragments. ¹⁹

313

314 One of the problems encountered when analyzing viromes is the possibility of
315 bacterial DNA contamination. The methods used were designed to prevent
316 contamination of the viral DNA, which could have three sources: bacterial or eukaryotic
317 cells, free-cell DNA ³⁸ or DNA inside outer membrane vesicles (OMV). ³⁸ Filtration
318 eliminated bacterial or eukaryotic cells and vesicles. The chloroform treatment, not
319 always included in other virome studies, was used to minimize the impact of DNA-

320 containing OMV.³⁸ The residual presence of vesicles containing DNA that passed
321 through the filter and were not eliminated by the chloroform treatment cannot be
322 completely ruled out. However, their contribution to the viral DNA pool should not be
323 significant, based on previous studies using electron microscopy²⁴ in which the amount
324 of phage particles visualized coincided with the number of ARGs in the phage DNA
325 fraction. Finally, free DNA was removed using a strong DNase treatment, demonstrated
326 to efficiently eliminate non-packaged DNA.^{15,39,40} Absence of bacterial DNA
327 contamination was confirmed by the controls, which showed that free, non-packaged
328 DNA had been removed to the extent that 16S rDNA and ARGs were undetectable by
329 qPCR or metagenomics before the viral capsids were broken, whereas these genes were
330 later detected in the viral DNA fraction.

331 After rigorous efforts to eliminate all DNA outside the viral capsids, our results
332 still showed a wide fraction of bacterial DNA in phage particles, as previously observed
333 in viromes.³⁴ Up to 70-80% of reads of viral metagenomes yield no significant matches,
334^{3,41} possibly because few studies have focused specifically on phage sequencing,
335 resulting in a lack of specific phage databases and a low availability of phage sequences
336 in public databases in comparison with bacterial entries.^{42,43} In addition, there is a bias
337 toward the more studied human viruses, and a large fraction of virus sequences in the
338 databases correspond to uncharacterized viruses (viral dark matter)²⁹. Moreover, when
339 analyzing our sequences, we found that a number of prophage sequences within
340 bacterial genomes are erroneously annotated as bacterial, do not appear as phages when
341 searched in general databases, and cannot be identified in comparisons against the viral
342 database subsets.

343

344 Thus, assuming the absence of a significant proportion of bacterial DNA
345 contamination (but not completely ruled out), our hypothesis is that a high proportion of
346 bacterial DNA found within viral particles in this and other studies is the consequence
347 of generalized transduction or similar mechanisms able to package and spread
348 fragments of the bacterial genome in phage capsids.⁴⁴⁻⁴⁷ We recently showed that
349 phage particles harboring ARGs likely originate from bacterial strains in the
350 microbiome, and proposed that bacteria use this mechanism to spread their
351 genome.²⁴This idea is supported by a recent study demonstrating that phage packaging
352 in *Staphylococcus aureus* frequently contributes to the mobilization of enormous
353 fragments of the genome of a single bacterial cell with great frequency. This new
354 mechanism, named “co-lateral transduction”, shows not only that phages can package
355 and mobilize bacterial genes, but that it is not a random process and that certain regions
356 of the *S. aureus* chromosome are preferentially hypermobile platforms of gene transfer.
357 ⁴⁷

358 If this mechanism also explains our observations, then using 16S rDNA as a
359 measure of contamination has its limitations, because like other bacterial genes, 16S
360 rDNA could also be packaged in the phage capsids and detected within the viral DNA.
361 Supporting our hypothesis, 16S rDNA was detected in the DNA from the phage
362 particles, and in more contigs than those showing ARGs. This was to be expected
363 considering that 16S rDNA should be more abundant in the bacterial population than
364 ARGs, perhaps with the exception of cells carrying ARGs located in multicopy
365 plasmids. Thus, monitoring 16S rDNA before breaking the capsids provides an accurate
366 way of verifying the absence of bacterial DNA contamination.

367

368 Special care should be taken when annotating ARGs. It has been repeatedly
369 demonstrated that a sequence showing homology with an ARG does not necessarily
370 indicate a true gene conferring antibiotic resistance.^{14,48} Therefore, the real extent of
371 ARGs in microbiomes and the associated risk of resistance transfer can be
372 overestimated. Nevertheless, the phageome is known to harbor ARGs,^{13,25,49} as shown
373 by the few studies on human phageomes^{40,50} and environmental samples.⁵¹

374 The metagenomic data from the viral particles confirmed the presence of ARGs
375 in most samples. Parallel qPCR assays of the same DNA detected most of the ARGs
376 identified by metagenomic analysis, but the latter did not find all the ARGs detected by
377 qPCR. Although the Ct value of the qPCR is only indicative and varies among qPCR
378 assays, the output of the two methods largely coincided in the most abundant ARGs
379 (lower Ct), which suggests that high ARG densities are required for coverage by our
380 libraries. An exception was *bla*_{TEM}, which was not detected by metagenomics despite a
381 Ct indicating higher abundance than other ARGs, perhaps because it was still close to
382 the coverage limit.

383 In one of the few studies measuring the efficiency of viral metagenomics in
384 comparison with PCR, the two approaches produced divergent results in different
385 matrices spiked with murine norovirus.³⁴ When sequencing the virome, it is quite
386 difficult to estimate the level of coverage needed to detect less abundant genes.⁵²
387 Again, different software such as Prokka and ResFinder gave non-matching results.
388 Prokka combines the output of different tools that predict coding sequences, ribosomal
389 RNA, transfer RNA, signal leader peptides and non-coding RNA, whereas ResFinder
390 uses BLAST to identify ARGs. As each approach analyzes sequences from a different
391 standpoint, their results are not comparable, but both can provide valuable insights.

392 No specific phage sequences were found in the ARG flanking regions but
393 notably ARGs were located next to MGEs such as transposons or insertion sequences
394 (IS). This prevents the identification of the origin of the DNA (whether bacterial or
395 phage). As these elements are also present in the bacterial genomes, they could provide
396 platforms for ARG mobilization. The flanking regions were mostly identified as
397 belonging to *Bacteroides fragilis*. Since Bacteroidetes is the phylum most extensively
398 represented in our samples, this could explain why metagenomics detected more ARGs
399 related to these bacterial groups (Table 4). In contrast, β -lactamase genes (excluding
400 those from Bacteroidetes such as *bla*_{CFXA6}) are mostly associated with
401 *Enterobacteriaceae*⁵³, present in the gut microbiome to a lesser extent than
402 Bacteroidetes.⁵⁴ Thus, β -lactamase genes or *qnr* genes belonging mostly to the less
403 abundant *Enterobacteriaceae* were only detected by the more sensitive qPCR assays
404 and not by metagenomics.

405

406 The samples analyzed before and after the ciprofloxacin treatment gave different
407 results. The PRECIP sample belongs to the 20% of fecal samples negative for ARGs in
408 phage DNA by qPCR described in previous work,^{25,55} whereas the POSTCIP sample
409 showed different mechanisms of resistance to various drugs. Although the absence of
410 ARGs in the normal state has not been explained, the presence of bacterial genes other
411 than ARGs (including 16S rDNA) in the viral DNA of the PRECIP sample indicates
412 that genomic DNA packaging occurred, although to a lesser extent than in POSTCIP. It
413 can be speculated that in this case some individual conditions repress the induction of
414 phage particles in general, or specifically those particles containing ARGs from the
415 microbiota, considering the microbiota as the main source of ARG-carrying phage
416 particles.⁵⁶ Thus, ciprofloxacin might have reverted this repression or most probably

417 caused an increase in the induction of phage particles, which were detectable for a
418 period after the treatment. Absence of ARGs in phage DNA in samples taken one year
419 later suggests the microbiota of the individual had returned to the PRECIP values.

420 This observation supports the hypothesis that the presence of ARGs in the DNA
421 from phage capsids of POSTCIP was due to the antibiotic treatment. Stable
422 maintenance of ARGs and their elements in the absence of antibiotic selection has been
423 reported,⁵⁷ but this is attributed to other genes in the same element conferring a
424 different kind of selective advantage. In contrast, some antibiotics are known to
425 exacerbate the transfer of their own resistance by the mobilization of genetic elements.
426⁵⁷ Higher rates of phage induction and recombination⁵⁸ and greater abundance and
427 diversity have been reported in the presence of antibiotics in the swine gut microbiome.
428⁵⁹ Ciprofloxacin, one of these antibiotics, is reported to be an activator of the SOS
429 response and one of the most effective inducers of MGEs, including phages and derived
430 particles.^{12,60,61}

431 In metagenomic studies, accurate methods and the use of a combination of
432 different software are strongly recommended to increase data output. Despite its
433 limitations, the metagenomic approach confirmed the presence of phage particles
434 containing several sequences of bacterial origin, including ARGs. The packaging
435 mechanisms are unknown but could involve transduction or other strategies by which
436 bacterial DNA is packaged, protected and spread. However, the association of ARGs
437 with phage particles points to the latter as a likely system of resistance dissemination
438 among the bacterial community. Future studies could elucidate the impact of phages on
439 the regulation of microbiota and the spread of multi-resistant bacteria as a problem of
440 global health.

441

442 **Acknowledgements**

443 ISGlobal, a member of the CERCA Programme, Generalitat de Catalunya.

444 Authors thank Prof. J. Jofre for his contribution to the study.

445

446 **Funding**

447 This study was supported by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), co-financed

448 by the European Regional Development Fund (ERDF) “A Way to Achieve Europe,” the

449 Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015/0017) and the

450 Spanish Ministry of Health (grant number FIS PI13/00329). P. Espinal has been funded

451 by ISCIII (SB:CD15/00017) and M. Brown-Jaque with a grant from COLCIENCIAS

452 (Republic of Colombia).

453

454 **Transparency of declaration**

455 All authors have none to declare

456

457 **References**

458 1. Dethlefsen L, Huse SM, Sogin ML, Relman DA. The pervasive effects of an

459 antibiotic on the human gut microbiota, as as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing.

460 *PLoS Biol* 2008; **6**: e280.

461 2. Gill SR, Pop M, Deboy RT, *et al.* Metagenomic analysis of the human distal

462 gut microbiome. *Science* 2006; **312**: 1355–9.

463 3. Džunková M, D’Auria G, Moya A. Direct sequencing of human gut virome

464 fractions obtained by flow cytometry. *Front Microbiol* 2015; **6**: 955.

465 4. Pérez-Brocal V, García-López R, Nos P, Beltrán B, Moret I, Moya A.

466 Metagenomic analysis of Crohn’s disease, patients identifies changes in the virome and

467 microbiome related to disease status and therapy, and detects potential interactions and
468 biomarkers. *Inflamm Bowel Dis* 2015.

469 5. Norman JM, Handley S a, Parkes M, *et al.* Disease-specific alterations in the
470 enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell* 2015; **160**: 447–60.

471 6. Abeles SR, Pride DT. Molecular bases and role of viruses in the human
472 microbiome. *J Mol Biol* 2014; **426**: 3892–906.

473 7. Navarro F, Muniesa M. Phages in the human body. *Front Microbiol* 2017; **8**.

474 8. Dutilh BE, Cassman N, McNair K, *et al.* A highly abundant bacteriophage
475 discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nat Commun*
476 2014; **5**: 37–43.

477 9. Minot S, Sinha R, Chen J, *et al.* The human gut virome: inter-individual
478 variation and dynamic response to diet. *Genome Res* 2011; **21**: 1616–25.

479 10. Dalmaso M, Hill C, Ross RP. Exploiting gut bacteriophages for human
480 health. *Trends Microbiol* 2014; **22**: 399–405.

481 11. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T a*
482 *peer-reviewed J Formul Manag* 2015; **40**: 277–83.

483 12. Goerke C, Köller J, Wolz C. Ciprofloxacin and trimethoprim cause phage
484 induction and virulence modulation in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents*
485 *Chemother* 2006; **50**: 171–7.

486 13. Colomer-Lluch M, Jofre J, Muniesa M. Quinolone resistance genes (qnrA
487 and qnrS) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing
488 agents on packaged antibiotic resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**:
489 1265–74.

490 14. Enault F, Briet A, Bouteille L, Roux S, Sullivan MB, Petit M-A. Phages
491 rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses. *ISME J*

492 2017; **11**: 237–47.

493 15. Colomer-Lluch M, Calero-Cáceres W, Jebri S, Hmaied F, Muniesa M, Jofre
494 J. Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and
495 Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each
496 population. *Environ Int* 2014; **73**: 167–75.

497 16. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, *et al.* SPAdes: a new genome assembly
498 algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 2012; **19**: 455–
499 77.

500 17. Wood DE, Salzberg SL. Kraken: ultrafast metagenomic sequence
501 classification using exact alignments. *Genome Biol* 2014; **15**: R46.

502 18. Arndt D, Grant JR, Marcu A, *et al.* PHASTER: a better, faster version of the
503 PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res* 2016; **44**: W16–21.

504 19. Roux S, Enault F, Hurwitz BL, Sullivan MB. VirSorter: mining viral signal
505 from microbial genomic data. *PeerJ* 2015; **3**: e985.

506 20. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*
507 2014; **30**: 2068–9.

508 21. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, *et al.* Identification of acquired
509 antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 2640–4.

510 22. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local
511 alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; **215**: 403–10.

512 23. Bengtsson-Palme J, Hartmann M, Eriksson KM, *et al.* METAXA2:
513 improved identification and taxonomic classification of small and large subunit rRNA
514 in metagenomic data. *Mol Ecol Resour* 2015; **15**: 1403–14.

515 24. Brown-Jaque M, Calero-Cáceres W, Espinal P, *et al.* Antibiotic resistance
516 genes in phage particles isolated from human feces and induced from clinical bacterial

517 isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2018; **51**: 434–42.

518 25. Quirós P, Colomer-Lluch M, Martínez-Castillo A, *et al.* Antibiotic resistance
519 genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples. *Antimicrob Agents*
520 *Chemother* 2014; **58**: 606–9.

521 26. Colomer-Lluch M, Imamovic L, Jofre J, Muniesa M. Bacteriophages
522 carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry.
523 *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 4908–11.

524 27. Lundin D, Gribaldo S, Torrents E, Sjöberg B-M, Poole AM. Ribonucleotide
525 reduction - horizontal transfer of a required function spans all three domains. *BMC Evol*
526 *Biol* 2010; **10**: 383.

527 28. Groth AC, Calos MP. Phage integrases: biology and applications. *J Mol Biol*
528 2004; **335**: 667–78.

529 29. Thannesberger J, Hellinger H-J, Klymiuk I, *et al.* Viruses comprise an
530 extensive pool of mobile genetic elements in eukaryote cell cultures and human clinical
531 samples. *FASEB J* 2017; **31**: 1987–2000.

532 30. Rousseau GM, Moineau S. Evolution of *Lactococcus lactis* phages within a
533 cheese factory. *Appl Environ Microbiol* 2009; **75**: 5336–44.

534 31. Aherfi S, Colson P, La Scola B, Raoult D. Giant viruses of amoebas: an
535 update. *Front Microbiol* 2016; **7**: 349.

536 32. Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B, Delattre A,
537 Lavigne R. Learning from bacteriophages - advantages and limitations of phage and
538 phage-encoded protein applications. *Curr Protein Pept Sci* 2012; **13**: 699–722.

539 33. Łusiak-Szelachowska M, Weber-Dąbrowska B, Jończyk-Matysiak E,
540 Wojciechowska R, Górski A. Bacteriophages in the gastrointestinal tract and their
541 implications. *Gut Pathog* 2017; **9**: 44.

- 542 34. Hjelmsø MH, Hellmér M, Fernandez-Cassi X, *et al.* Evaluation of methods
543 for the concentration and extraction of viruses from sewage in the context of
544 metagenomic sequencing. *PLoS One* 2017; **12**: e0170199.
- 545 35. Cotten M, Oude Munnink B, Canuti M, *et al.* Full genome virus detection in
546 fecal samples using sensitive nucleic acid preparation, deep sequencing, and a novel
547 iterative sequence classification algorithm. *PLoS One* 2014; **9**.
- 548 36. Jovel J, Patterson J, Wang W, *et al.* Characterization of the gut microbiome
549 using 16S or shotgun metagenomics. *Front Microbiol* 2016; **7**: 459.
- 550 37. Vollmers J, Wiegand S, Kaster A-K. Comparing and evaluating metagenome
551 assembly tools from a microbiologist's perspective - not only size matters! Rodriguez-
552 Valera F, ed. *PLoS One* 2017; **12**: e0169662.
- 553 38. Biller SJ, Schubotz F, Roggensack SE, Thompson AW, Summons RE,
554 Chisholm SW. Bacterial vesicles in marine ecosystems. *Science (80-)* 2014; **343**: 183–
555 6.
- 556 39. Ross J, Topp E. Abundance of antibiotic resistance genes in bacteriophage
557 following soil fertilization with dairy manure or municipal biosolids, and evidence for
558 potential transduction. *Appl Environ Microbiol* 2015; **81**: 7905–13.
- 559 40. Subirats J, Sánchez-Melsió A, Borrego CM, Balcázar JL, Simonet P.
560 Metagenomic analysis reveals that bacteriophages are reservoirs of antibiotic resistance
561 genes. *Int J Antimicrob Agents* 2016; **48**: 163–7.
- 562 41. Ng TFF, Marine R, Wang C, *et al.* High variety of known and new RNA and
563 DNA viruses of diverse origins in untreated sewage. *J Virol* 2012; **86**: 12161–75.
- 564 42. Wagner J, Maksimovic J, Farries G, *et al.* Bacteriophages in gut samples
565 from pediatric Crohn's disease patients: metagenomic analysis using 454
566 pyrosequencing. *Inflamm Bowel Dis* 2013; **19**: 1598–608.

- 567 43. Reyes A, Haynes M, Hanson N, *et al.* Viruses in the faecal microbiota of
568 monozygotic twins and their mothers. *Nature* 2010; **466**: 334–8.
- 569 44. Quirós P, Brown-Jaque M, Muniesa M. Spread of bacterial genomes in
570 packaged particles. *Future Microbiol* 2016; **11**: 171–3.
- 571 45. Garcia-Aljaro C, Balleste E, Muniesa M. Beyond the canonical strategies of
572 horizontal gene transfer in prokaryotes. *Curr Opin Microbiol* 2017; **38**: 95–105.
- 573 46. Enault F, Briet A, Bouteille L, Roux S, Sullivan MB, Petit M-A. Phages
574 rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses. *ISME J*
575 2016: 53025.
- 576 47. Chen J, Quiles-Puchalt N, Chiang YN, *et al.* Genome hypermobility by co-
577 lateral transduction. *Science (80-)* 2018; **In press**.
- 578 48. Martínez JL, Coque TM, Baquero F. What is a resistance gene? Ranking risk
579 in resistomes. *Nat Rev Microbiol* 2014; **13**: 116–23.
- 580 49. Muniesa M, García A, Miró E, *et al.* Bacteriophages and diffusion of beta-
581 lactamase genes. *Emerg Infect Dis* 2004; **10**: 1134–7.
- 582 50. Modi SR, Lee HH, Spina CS, Collins JJ. Antibiotic treatment expands the
583 resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature* 2013;
584 **499**: 219–22.
- 585 51. Balcazar JL. Bacteriophages as vehicles for antibiotic resistance genes in the
586 environment. *PLoS Pathog* 2014; **10**: e1004219.
- 587 52. Sims D, Sudbery I, Ilott NE, Heger A, Ponting CP. Sequencing depth and
588 coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat Rev Genet* 2014; **15**: 121–32.
- 589 53. Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing
590 Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill* 2008; **13**.
- 591 54. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, *et al.* Diversity of the human intestinal

592 microbial flora. *Science* 2005; **308**: 1635–8.

593 55. Larrañaga O, Brown-Jaque M, Quirós P, *et al.* Phage particles harboring
594 antibiotic resistance genes in fresh-cut vegetables and agricultural soil. *Environ Int*
595 2018; **115**.

596 56. Brown-Jaque M, Calero-Cáceres W, Espinal P, *et al.* Antibiotic resistance
597 genes in phage particles isolated from human faeces and induced from clinical bacterial
598 isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2018; **51**.

599 57. Salyers AA, Amábile-Cuevas CF. Why are antibiotic resistance genes so
600 resistant to elimination? *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**: 2321–5.

601 58. Johnson TA, Looft T, Severin AJ, *et al.* The in-feed antibiotic carbadox
602 induces phage gene transcription in the swine gut microbiome. *MBio* 2017; **8**.

603 59. Looft T, Johnson TA, Allen HK, *et al.* In-feed antibiotic effects on the swine
604 intestinal microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; **109**: 1691–6.

605 60. Zhang X, McDaniel AD, Wolf LE, Keusch GT, Waldor MK, Acheson DW.
606 Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production,
607 and death in mice. *J Infect Dis* 2000; **181**: 664–70.

608 61. Ubeda C, Maiques E, Knecht E, Lasa I, Novick RP, Penadés JR. Antibiotic-
609 induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-
610 encoded virulence factors in staphylococci. *Mol Microbiol* 2005; **56**: 836–44.

611 62. Lachmayr KL, Kerkhof LJ, Dirienzo AG, Cavanaugh CM, Ford TE.
612 Quantifying nonspecific TEM beta-lactamase (*bla*TEM) genes in a wastewater stream.
613 *Appl Environ Microbiol* 2009; **75**: 203–11.

614 63. Colomer-Lluch M, Jofre J, Muniesa M. Antibiotic resistance genes in the
615 bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS One* 2011; **6**.

616 64. Iwahara K, Kuriyama T, Shimura S, *et al.* Detection of *cfxA* and *cfxA2*, the

617 beta-lactamase genes of *Prevotella* spp., in clinical samples from dentoalveolar
618 infection by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 172–6.

619 65. Chen J, Yu Z, Michel FC, Wittum T, Morrison M. Development and
620 application of real-time PCR assays for quantification of erm genes conferring
621 resistance to macrolides-lincosamides-streptogramin B in livestock manure and manure
622 management systems. *Appl Environ Microbiol* 2007; **73**: 4407–16.

623 66. Volkmann H, Schwartz T, Bischoff P, Kirchen S, Obst U. Detection of
624 clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time
625 PCR (TaqMan). *J Microbiol Methods* 2004; **56**: 277–86.

626 67. Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L. Detection of
627 erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; **40**:
628 2562–6.

629 68. Calero-Cáceres W, Melgarejo A, Colomer-Lluch M, *et al.* Sludge as a
630 potential important source of antibiotic resistance genes in both the bacterial and
631 bacteriophage fractions. *Environ Sci Technol* 2014; **48**: 7602–11.

632 69. Hunter N, Nadkarni MA, Jacques NA, Martin FE. Determination of bacterial
633 load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set.
634 *Microbiology* 2002; **148**: 257–66.

635

Table 1. Oligonucleotides used in this study

ARG	Assay	Oligonucleotide	Sequence	Amplimer (bp)	LOQ qPCR (Ct)	of Reference
<i>bla</i> _{TEM}	qPCR-T	UP	CACTATTCTCAGAATGACTTGGT	85	30.5	62
		LP	TGCATAATTCTCTTACTGTCATG			
		probe TEM	FAM-CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGG-MGBNFQ			
<i>bla</i> _{CTX-M-1} -group	qPCR-T	UP	ACCAACGATATCGCGGTGAT	101	31.3	63
		LP	ACATCGCGACGGCTTTCT			
		probe CTX-M-1	FAM-TCGTGCGCCGCTG- MGBNFQ			
<i>bla</i> _{CTX-M-9} -group	qPCR-T	UP	ACCAATGATATTGCGGTGAT	85	30.5	26
		LP	CTGCGTTCTGTTGCGGCT			
		probe CTX-M-9	FAM – TCGTGCGCCGCTG- MGBNFQ			
<i>bla</i> _{OXA-48}	qPCR-T	UP	CGGTAGCAAAGGAATGGCAA	133	32.4	24
		LP	TGGTTCGCCCCGTTTAAGATT			
		probe OXA-48	FAM – CGTAGTTGTGCTCTGGA- MGBNFQ			
<i>bla</i> _{CfxA6}	qPCR-S	UP	GCGCAAATCCTCCTTTAACAA	802	31.5	64
		LP	ACCGCCACACCAATTTTCG			
<i>ermF</i>	PCR-S	UP	CGACACAGCTTTGGTTGAAC	309	34.0	65
		LP	GGACCTACCTCATAGACAAG			
<i>mecA</i>	qPCR-T	UP	CGCAACGTTCAATTTAATTTTGTTAA	92	33.8	66
		LP	TGGTCTTTCTGCATTCTGGA			
		probe <i>mecA</i>	FAM-AATGACGCTATGATCCCAATCTAACTTCCACA-MGBNFQ			
<i>mefA</i>	qPCR-S	UP	AGTATCATTAATCACTAGTGC	348	33.7	67
		LP	TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG			
<i>qnrA</i>	qPCR-T	UP	AGGATTGCAGTTTCATTGAAAGC	138	34.0	13
		LP	TGAACTCTATGCCAAAGCAGTTG			

<i>qnrS</i>	qPCR-T	probe qnrA	FAM-TATGCCGATCTGCGCGA-MGBNFQ	118	34.6	13
		UP	CGACGTGCTAACTTGCGTGA			
		LP	GGCATTGTTGGAAACTTGCA			
<i>sulI</i>	qPCR-T	probe qnrS	FAM-AGTTCATTGAACAGGGTGA-MGBNFQ	67	34.5	68
		UP	CCGTTGGCCTTCCTGTAAAG			
		LP	TTGCCGATCGCGTGAAGT			
<i>tetW</i>	qPCR-T	probe sulI	FAM-CGAGCCTTGCGGCGG-MGBNFQ	62	33.7	This study
		UP	GACGGACACCATGTTTTTGGGA			
		LP	AGGAAGTGACTGCCGCTTGA			
16S rDNA	qPCR-T	probe tetW	AGCGTGGGATTACCA	467	32.2	69
		UP	TCCTACGGGAGGCAGCAGT			
		LP	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT			
		probe 16S	FAM-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-MGBNFQ			

637
638
639
640
641

qPCR-T: quantitative real time PCR using TaqMan hydrolysis probes.

qPCR-S: quantitative real time PCR using a SybrGreen assay.

UP: upper primer, LP: lower primer, FAM: 6-carboxyfluorescein reporter, MGBNFQ: Minor groove binding non-fluorescent quencher.

LOQ. Limit of quantification determined with the standard curve used in this study for each qPCR assay.

Table 2. Bioinformatic analysis of DNA from phage particles.

Sample	# Reads	#Contigs	Kraken		PHASTER	Prokka		VirSorter			
			N° taxons ^a (%)	N° viruses ^b (%)	N° of phages	N° of phage genes	CDS	Category 1 ^c		Category 2 ^d	
								N° phage contigs ^e	N° phage genes ^f	N° phage contigs ^e	N° phage genes ^f
PRECIP	1,653,277	11,100	532 (4.8)	11 (2.0)	17	40	7,162	7	159	51	1,379
POSTCIP	1,612,020	18,469	1,689 (9.1)	182 (10.8)	12	41	10,769	4	28	61	1,014
HC6	1,758,529	6,015	842 (14.0)	4 (0.5)	12	25	2,297	2	7	13	391
HC9	1,799,296	4,604	440 (9.6)	4 (0.9)	10	39	4,050	1	21	31	968
HC10	1,372,547	3,838	1,113 (29.0)	266 (23.9)	7	31	2,415	0	0	34	739
UB6	1,954,802	17,814	3,035 (17.0)	56 (1.8)	12	35	10,419	6	79	48	1,298
UB25	1,603,968	4,949	781 (15.8)	24 (3.0)	8	21	6,457	4	69	28	1,022

643 ^a All microorganisms: archaea, bacteria and viruses.

644 ^b viruses including phages.

645 ^c “most confident prediction”: high probability of phage identification.

646 ^d “likely”: good probability of phage identification.

647 ^e N° of contigs where genes of phages have been identified.

648 ^f N° of genes of phages identified in all contigs.

649 CDS: Coding regions.

650
651

Table 3. DNA from phage particles of the samples. Percentages of sequences identified by Kraken as different phages.

Phages	Hosts	PRECIP	POSTCIP	HC6	HC9 ^a	HC10 ^a	UB6	UB25
<i>Caudovirales</i>		91	100	75	50	99.2	100	100
<i>Siphoviridae</i>		63.7	99.5	75	25	99.2	100	100
<i>Skunalikevirus</i>	<i>Lactococcus</i>	27	31	50		31	21	29
<i>C2likevirus</i>	<i>Lactococcus</i>					9		
<i>Unclassified</i>	<i>Lactococcus</i>	27	57	25		55.4	41	66
	<i>Lactobacillus</i>	9						5
	<i>Leuconostoc</i>		2				33	
	<i>Enterococcus</i>						2	
	<i>Propionibacterium</i>						2	
	<i>Rhodococcus</i>				25			
	Others	0.7	10		25	3.8	1	
<i>Myoviridae</i>		27.3						
	<i>Clostridium</i>	9						
	<i>Bacillus</i>	9						
	Others	9.3						
<i>Podoviridae</i>			0.5					
<i>Microviridae</i>	<i>Enterobacteria</i>			25				
<i>Mimiviridae</i>	<i>Unclassified</i>				50			
Unassigned		9				0.8		

652

^a subject HC9 travelled to the Republic of Ecuador; subject HC10 travelled to Peru

		ARG		ARG Flanking regions	16S rDNA
	qPCR(Ct)	Prokka ^b	Resfinder	(length of the flanking region fragment) (GenBank Accession n°)	# contigs
PRECIP	---	MdtH, MdtK	---	---	7
POSTCIP	<i>mecA</i> (32.76) <i>qnrA</i> (32.09) <i>qnrS</i> (32.94) <i>tet(W)</i> (25.35)	Aluminium ^c , Bicyclomycin, CzcA ^c , DrrA, Glyoxalase/Bleomycin, operon repressor, MdtA, MdtB, MdtC, MdtE, MdtK, MexA, MexB, NorM, MarA, YheH, EmrK, SugE, TerB, TetO, TelA, Trypsin-resistant surface T6 protein, VanW	<i>bla</i> _{CfxA5} <i>tet(W)</i>	<i>Bacteroides fragilis</i> insertion sequence IS614B (93 bp) (AY769934) <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> plasmid mobilization relaxosome protein MobC (5,050 bp) (CP026548.1)	16
HC6	<i>bla</i> _{TEM} (28.45) <i>bla</i> _{CTX-M-1} group (32.09) ^a <i>bla</i> _{CfxA6} (26.74) <i>erm(F)</i> (30.17) <i>qnrA</i> (34.29) ^a <i>qnrS</i> (34.59) ^a <i>tet(W)</i> (29.99)	---	<i>erm(F)</i>	No flanking regions, contig aligns totally	3
HC9	<i>bla</i> _{TEM} (28.26) <i>bla</i> _{CTX-M-1} group (32.97) ^a <i>bla</i> _{CTX-M-9} group (32.74) ^a <i>bla</i> _{CfxA6} (28.88)	CzcA ^c , TerB	---	---	6
HC10	<i>bla</i> _{CTX-M-1} group (32.86) ^a <i>qnrS</i> (30.12) <i>tet(W)</i> (31.94)	---	---	---	4

UB6	<i>bla</i> _{TEM} (28.43) <i>bla</i> _{CTX-M-9} group (33.41) ^a <i>bla</i>_{CfxA6} (22.43) <i>mef(A)</i> (30.15) <i>sulI</i> (32.79) <i>tet(W)</i> (27.09)	BmrA, CnrB ^c , CzcA ^c , Fosmidomycin, Lincosamide, MecR1, MdtE, MdtK, TetM	DrrA, <i>aadE</i> MarA, <i>bla</i> _{CfxA} <i>bla</i> _{CfxA6} <i>mef(A)</i> <i>tet(Q)</i> <i>tet(X)</i>	No flanking region, contig aligns totally <i>B. fragilis</i> transposon Tn4555 TnpA, integrase, TnpC, excisionase, mobilization protein and unknown genes (1,118 bp) (U75371.3) No flanking regions, contig aligns totally <i>B. fragilis</i> strain HMW 615 transposon CTnHyb (304 bp) (KJ816753.1) HMW615 transposon CTnHyb (1,836 bp) (KJ816753.1) <i>B. fragilis</i> transposon Tn4351 (1,836 bp) (M37699.1)	13
UB25	<i>bla</i> _{TEM} (28.21) <i>bla</i> _{OXA-48} (34.10) ^a <i>bla</i> _{CTX-M-9} group (29.81) <i>bla</i>_{CfxA6} (27.73) <i>mef(A)</i> (26.21) <i>qnrS</i> (30.85) <i>qnrA</i> (34.25) ^a <i>sulI</i> (32.58) <i>tet(W)</i> (24.37)	Fosmidomycin, CnrB ^c CzcA ^c , Lincosamide, MdtE, MdtK, TetM	<i>bla</i> _{CfxA} <i>mef(A)</i> <i>tet(Q)</i> <i>tet(X)</i>	<i>Bacteroides ovatus</i> insertion sequence IS4-like (127 bp) (HE999703.1) <i>B. fragilis</i> transposon CTnHyb, (277 bp) (KJ816753.1) <i>B. fragilis</i> transposon Tn4351 (390 bp) (M37699.1) <i>B. fragilis</i> transposon Tn4351 (390 bp) (M37699.1)	16

654 ^aBeyond the limit of quantification of the standard curve of each qPCR assay but still detectable.

655 ^bThe annotation of specific proteins responsible for antibiotic resistance or the elements to which resistance is conferred are indicated.

656 ^c Proteins conferring resistances to metals.

657 Ct: Threshold cycle.

658 ARGs in bold indicate coincidence between qPCR and Resfinder results.

659 **Figure legends**

660

661 **Figure 1.** Pie Graphs of Kraken data for samples HC6, HC9, PRE-CIP and
662 POSTCIP from healthy individuals. Distribution and relative abundance of different
663 bacteriophages identified in the viromes with regard to the total viral sequences
664 identified. Interactive pie graphs available upon request.

665

666 **Figure 2.** Pie Graphs of Kraken data showing metagenomic comparison of the
667 virome of the two samples from the same individual taken before (PRECIP) and after
668 (POSTCIP) ciprofloxacin treatment.



Figure 1

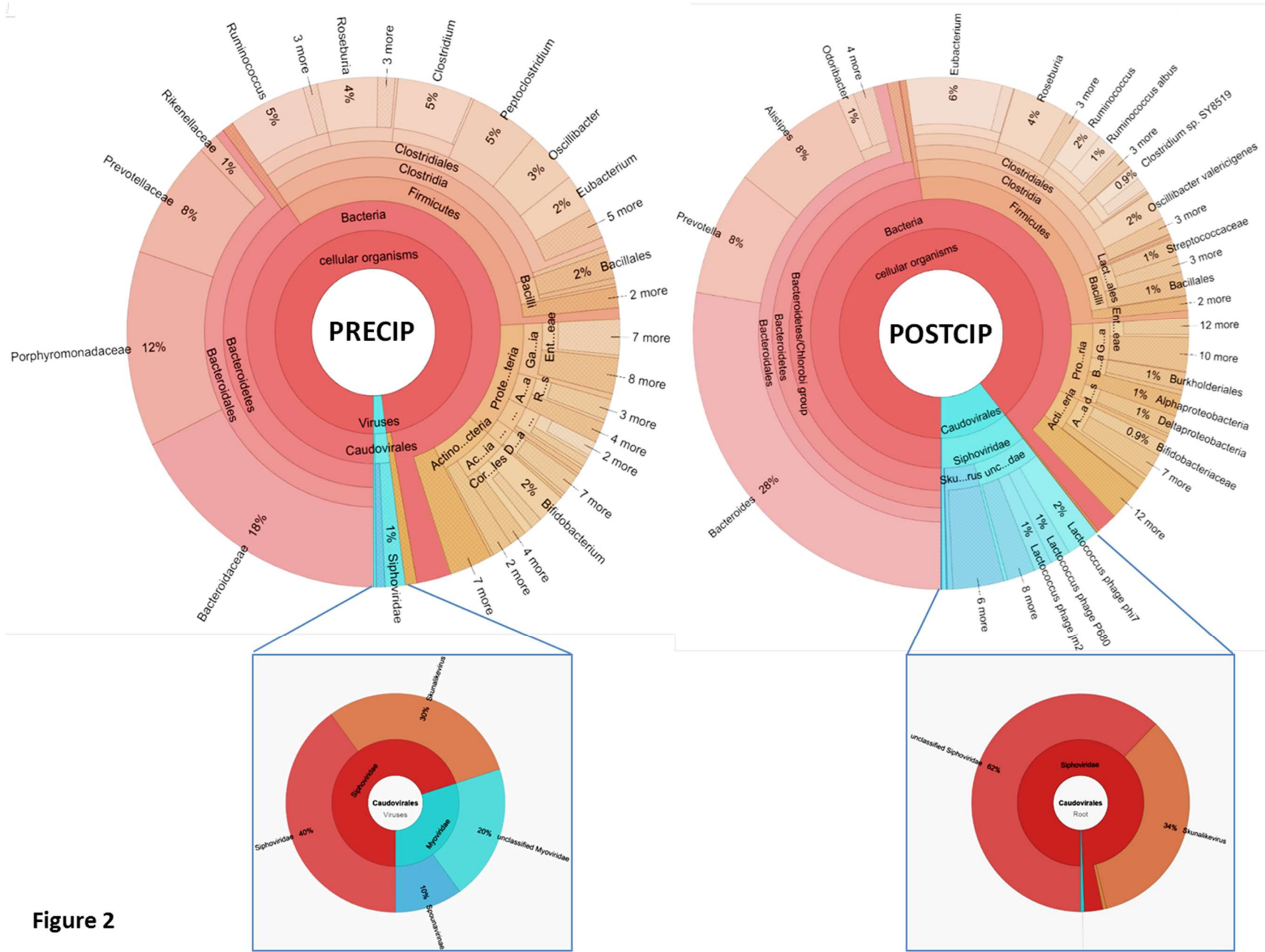


Figure 2

4.4. CAPÍTULO 4:

**Genes de resistencia a antibióticos en partículas
fágicas aisladas de esputos de pacientes con
fibrosis quística**

Genes de resistencia a antibióticos en partículas fágicas aisladas de esputos de pacientes con fibrosis quística

Detection of bacteriophages particles containing antibiotic resistance genes in the sputum of cystic fibrosis patients

Autores: **Maryury Brown-Jaque**, Lirain Rodríguez Oyarzun, Thais Cornejo-Sánchez, María Teresa Martín-Gómez, Silvia Gartner, Javier de Gracia, Sandra Rovira, Antonio Álvarez, Joan Jofre, Juan José González-López, Maite Muniesa.

Revista: *Frontiers in Microbiology*. 2018 May 1; 9:856.

Introducción

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva más común en la población caucásica (Allen et al., 2010). La importante morbilidad y mortalidad de esta enfermedad se relacionan con la afectación pulmonar y sus complicaciones, que son responsables de hasta el 85% de las muertes de pacientes con FQ, incluidos niños y adultos (Allen et al., 2010; Elborn, 2016).

La microbiología de la FQ es compleja. *Staphylococcus aureus* coloniza los pulmones del 30% de los pacientes durante su infancia. En la adolescencia, los pulmones desarrollan una infección crónica con *Pseudomonas aeruginosa* que permanece en alrededor del 80% de los pacientes adultos con FQ. Se han aislado otros patógenos oportunistas de pacientes con FQ como *Burkholderia cepacia*, *Haemophilus influenzae* y micobacterias atípicas (Bittar et al., 2008). En este desorden crónico, la colonización bacteriana del pulmón está vinculada a una respuesta inflamatoria excesiva que conduce a insuficiencia respiratoria. Un diagnóstico y tratamiento precoz sumado una supervisión frecuente y rigurosa son pilares fundamentales para el bienestar del paciente.

La grave problemática a nivel mundial de la resistencia a antibióticos dificulta enormemente el tratamiento de infecciones bacterianas (Hawkey and Jones, 2009). Dentro de las pautas terapéuticas de la FQ, el uso de antimicrobianos se hace absolutamente necesario durante toda la vida del paciente para mejorar su calidad de vida y garantizar su supervivencia (Castellani and Assael, 2017). Esta situación somete a los microorganismos a una continua presión selectiva que termina generando bacterias resistentes o multirresistentes. Algunos estudios sugieren que hasta un 45% de los pacientes están colonizados por un microorganismo

multirresistente, lo que hace que el tratamiento antimicrobiano sea aún más difícil (McCaughey et al., 2013).

La transferencia de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) mediada por elementos genéticos móviles (MGEs) es el mecanismo de dispersión más importante y rápido. Los MGEs más comúnmente estudiados son plásmidos, transposones y tal como se ha publicado recientemente, bacteriófagos (o fagos) (Colombo et al., 2016; Colomer-Lluch et al., 2011b; Lekunberri et al., 2017; Srivastava et al., 2004b). Sin embargo, estos últimos son los menos explorados en entornos clínicos.

Objetivos

En este estudio se plantearon los objetivos detallados a continuación:

- Aislar y caracterizar los microorganismos presentes en las muestras de esputo de pacientes con FQ y pacientes control.
- Diseñar y evaluar un protocolo para la extracción y purificación de ADN fágico a partir de muestras de esputo.
- Diseñar la sonda y los cebadores para la qPCR del gen *bla*_{VIM}.
- Detectar y cuantificar por qPCR 8 genes de resistencia (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, *mecA*, *qnrA* y *qnrS*) en la fracción de ADN fágico de muestras de esputo.
- Establecer comparaciones entre las muestras de esputo de pacientes con FQ y las muestras provenientes del grupo control.
- Evaluar la presencia de fagos infecciosos presentes en las muestras por medio de test de la gota y microscopía electrónica de transmisión (TEM).
- Detectar y cuantificar por qPCR los ARGs mencionados anteriormente en las partículas fágicas purificadas por CsCl y visualizadas por TEM.

Resultados y discusión

Se analizaron 71 muestras de esputo de pacientes con FQ de edades comprendidas entre 4 y 79 años, que acudieron a una visita de seguimiento a la unidad de FQ del Hospital Vall d'Hebron en Barcelona, entre agosto de 2015 y octubre de 2016. Se recolectaron además 21 muestras de esputo de un grupo de personas que no

padecían FQ, ni habían recibido antibióticos en los últimos tres meses. Este último fue definido como grupo control.

Uno de los primeros pasos de este estudio contempló la evaluación y la estandarización de un protocolo que permitiera una recuperación eficiente de ADN fágico a partir de las muestras de esputo. Con este fin, se compararon varias homogenizaciones con PBS de 5 muestras de esputo de paciente con FQ, negativas para el gen *bla*_{TEM} y *stx*₂. En cada dilución, se inoculó un volumen determinado de un estándar de qPCR del gen *bla*_{TEM} con un número de copias genómicas (GC, del inglés *Gene copies*) conocidas y con una suspensión de título conocido de un fago Stx (fago 933W) que contiene el gen de la toxina Shiga, *stx* (Imamovic et al., 2010).

La homogenización de las muestras de esputo en PBS (1:3) (v/v) mostró la misma eficiencia que la homogenización en PBS (1:5) (v/v). En los ensayos preliminares con *bla*_{TEM}, se obtuvo una recuperación de >99% de GC con respecto a la concentración inoculada inicialmente. Teniendo en cuenta estos resultados y para minimizar la dilución de la muestra, se seleccionó la homogenización en PBS (1:3) para llevar a cabo el estudio. La recuperación del fago Stx 933W añadido a las muestras varió entre 96 y 99,8%, sugiriendo que el protocolo de purificación recuperó las partículas virales inoculadas en las muestras de manera eficiente.

Por otra parte, se evaluaron 8 ARGs clínicamente relevantes que difieren en sus mecanismos de resistencia e importancia clínica. Cinco genes que confieren resistencia a antibióticos β-lactámicos (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{OXA-48} y *bla*_{VIM}), dos genes de resistencia a quinolonas (*qnrA* y *qnrS*) y un gen que confiere resistencia a meticilina (*mecA*), comúnmente encontrado en *Staphylococcus* (Colomer-Lluch et al., 2011b).

Los resultados para los diferentes ARGs en la fracción fágica de las muestras de esputo variaron dependiendo si se tuvo en cuenta el límite de detección (LOD) o el límite de cuantificación (LOQ) de los ensayos de qPCR (Figura 1). Debido a la dificultad para calcular correctamente las densidades de GC cuando se considera el LOD, los resultados de este estudio sólo están basados en las muestras positivas dentro del LOQ. Sin embargo, consideramos que vale la pena resaltar que se produjo amplificación de ciertos ARGs y que algunos genes, como *mecA* y *qnrA*, incluso aparecieron cuando se consideró el LOD. Estimando el LOD, algunas muestras presentaban hasta 7 ARGs mientras que, si se estimaba el LOQ, no se hallaban más de 4 ARGs en una misma muestra.

Se dividieron las muestras en dos grupos de edades: pacientes menores o igual a 18 años ($n = 28$) y mayores de 18 ($n = 43$) (Figura 2). No se observaron diferencias notables con sólo un porcentaje significativamente mayor ($p < 0,05$) de muestras positivas para *bla*_{TEM} y menor para el grupo *bla*_{CTX-M-9} en el grupo más joven (Figura 2).

El gen *mecA* no se detectó en ninguna de las muestras de pacientes con FQ, ni tampoco en las muestras del grupo control. En este último, una muestra fue positiva para *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{OXA-48} y *qnrS*. Los genes *qnrA* y *bla*_{CTX-M-9} se detectaron en 3 y 4 muestras control respectivamente. *bla*_{TEM} y *bla*_{VIM} fueron los más prevalentes con 7 y 8 muestras positivas respectivamente.

Los genes de betalactamasas fueron los ARGs más abundantes en pacientes con FQ, con valores de alrededor de 10^3 GC/ml (Figura 3). En contraste con lo anterior, no se detectó ni *qnrA* ni *mecA*, y *qnrS* estuvo presente a muy bajas densidades.

En cuanto al aislamiento y la caracterización bacteriana de las muestras de esputo de pacientes con FQ, *P. aeruginosa* y *S. aureus* fueron los microorganismos más prevalentes (presentes en alrededor del 45% de las muestras), seguidos de *Achromobacter sp.* y *Stenotrophomonas maltophilia*, entre otros. Los resultados de los antibiogramas revelaron que el 42% de los aislamientos de *P. aeruginosa* eran multirresistentes y que el 34% de los aislamientos de *S. aureus* eran resistentes a metilicina. En el caso de las muestras de esputo del grupo control, se detectó *S. aureus* en 5 muestras y *P. aeruginosa* en una muestra. Los ARGs detectados en el ADN fágico obtenido de cada muestra no se corresponden con las especies bacterianas aisladas de las mismas y los ARGs que se reportan en estas especies.

Se detectaron partículas fágicas con características morfológicas de *Siphoviridae*, capaces de infectar a *P. aeruginosa* (Pa) y *Klebsiella pneumoniae* (Kp) en las muestras de esputo de pacientes con FQ (Figura 4). En el ADN extraído de estas suspensiones fágicas purificadas por CsCl, se detectó *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{OXA-48} y *bla*_{VIM} en densidades cercanas a 10^5 GC/ml (Figura 4C). Hasta donde tenemos conocimiento, es la primera vez que se visualizan partículas fágicas en muestras de esputo. Los altos niveles de ARGs en estas partículas fágicas purificadas confirman que al menos una fracción de ellas alberga ARGs. Estos resultados sugieren que los bacteriófagos y partículas fágicas derivadas podrían desempeñar un papel clave en la movilización y diseminación de ARGs en biomas como los pulmones, que contienen múltiples microorganismos.

Conclusiones

- Las partículas fágicas portadoras de ARGs fueron abundantes en los pulmones, tanto de los pacientes con FQ como de las personas que no padecían la enfermedad. Estas partículas podrían contribuir a la colonización de cepas multirresistentes.
- Entre los ARGs analizados, las β -lactamasas fueron las más abundantes, particularmente el gen *bla*_{VIM}.
- Los ARGs detectados en el ADN fágico obtenido de cada muestra no se corresponden con las especies bacterianas aisladas de las mismas y las resistencias que se reportan en estas especies.
- A pesar de que el protocolo empleado en este estudio pareció ser bastante eficiente, la matriz densa y altamente viscosa de los esputos de los pacientes con FQ podría dificultar la extracción del ADN fágico y, por consiguiente, causaría una subestimación de los resultados.
- De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, las partículas fágicas debería ser consideradas como vehículos que movilizan resistencias en FQ.



Detection of Bacteriophage Particles Containing Antibiotic Resistance Genes in the Sputum of Cystic Fibrosis Patients

Maryury Brown-Jaque¹, Lirain Rodriguez Oyarzun¹, Thais Cornejo-Sánchez², Maria T. Martín-Gómez², Silvia Gartner³, Javier de Gracia³, Sandra Rovira³, Antonio Alvarez³, Joan Jofre¹, Juan J. González-López^{2*} and Maite Muniesa^{1*}

¹ Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain,

² Department of Clinical Microbiology, Hospital Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ³ Cystic Fibrosis Unit, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, CIBER of Respiratory Diseases (Ciberes CB06/06/0030), Carlos III Health Institute, Barcelona, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Patrick Rik Butaye,
Ross University School of Veterinary
Medicine, Saint Kitts and Nevis

Reviewed by:

Friederike Hilbert,
Veterinärmedizinische Universität
Wien, Austria
Grzegorz Węgrzyn,
University of Gdańsk, Poland

*Correspondence:

Juan J. González-López
jgonzal@vhebron.net
Maite Muniesa
mmuniesa@ub.edu

Specialty section:

This article was submitted to
Antimicrobials, Resistance
and Chemotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 19 January 2018

Accepted: 13 April 2018

Published: 01 May 2018

Citation:

Brown-Jaque M, Rodriguez Oyarzun L, Cornejo-Sánchez T, Martín-Gómez MT, Gartner S, de Gracia J, Rovira S, Alvarez A, Jofre J, González-López JJ and Muniesa M (2018) Detection of Bacteriophage Particles Containing Antibiotic Resistance Genes in the Sputum of Cystic Fibrosis Patients. *Front. Microbiol.* 9:856. doi: 10.3389/fmicb.2018.00856

Cystic fibrosis (CF) is a chronic disease in which the bacterial colonization of the lung is linked to an excessive inflammatory response that leads to respiratory failure. The microbiology of CF is complex. *Staphylococcus aureus* is the first bacterium to colonize the lungs in 30% of pediatric CF patients, and 80% of adult patients develop a chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection, but other microorganisms can also be found. The use of antibiotics is essential to treat the disease, but antibiotic performance is compromised by resistance mechanisms. Among various mechanisms of transfer of antibiotic resistance genes (ARGs), the recently been reported bacteriophages are the least explored in clinical settings. To determine the role of phages in CF as mobile genetic elements (MGEs) carrying ARGs, we evaluated their presence in 71 CF patients. 71 sputum samples taken from these patients were screened for eight ARGs (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}-group, *bla*_{CTX-M-9}-group, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, *mecA*, *qnrA*, and *qnrS*) in the bacteriophage DNA fraction. The phages found were also purified and observed by electron microscopy. 32.4% of CF patients harbored ARGs in phage DNA. β -lactamase genes, particularly *bla*_{VIM} and *bla*_{TEM}, were the most prevalent and abundant, whereas *mecA*, *qnrA*, and *qnrS* were very rare. *Siphoviridae* phage particles capable of infecting *P. aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* were detected in CF sputum. Phage particles harboring ARGs were found to be abundant in the lungs of both CF patients and healthy individuals and could contribute to the colonization of multiresistant strains.

Keywords: cystic fibrosis, bacteriophages, antibiotic resistance genes, horizontal gene transfer, sputum

INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive disease in the Caucasian population (Panitch and Rubenstein, 2010). The important morbidity and mortality of this disease are related to pulmonary affectation and its complications, which are responsible for up to 85% of the deaths of patients suffering from CF, including children and adults (Panitch and Rubenstein, 2010; Elborn, 2016).

The microbiology of CF is complex. *Staphylococcus aureus* colonizes the lungs of more than 30% of child or youth patients. In adolescence, chronic pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa* is developed, which remains in up to 80% of adult CF patients and is capable of growing in biofilms in the lungs, thereby greatly complicating antibiotic treatment of the disease. Other opportunistic pathogens have also been isolated from CF patients, including *Burkholderia cepacia* and *Haemophilus influenzae*. Additional opportunistic pathogens such as *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, and nontuberculous *Mycobacterium* are being recovered from adult patients with increasing frequency (Bittar et al., 2008; Lipuma, 2010).

After the observation that the mucous obstructing CF airways is hypoxic, analysis under strict anaerobic conditions has revealed that anaerobic bacterial species are also present within CF airways in high numbers. The spectrum of facultative and obligate anaerobic species recovered from CF samples frequently includes members of the genera *Prevotella*, *Streptococcus*, *Rothia*, and *Veillonella* (Fodor et al., 2012). High throughput sequencing efforts indicate that the CF microbiome consists of more than 60 different bacterial genera, while interrogation of bacterial 16S ribosomal RNA (rRNA) gene-based phylogenetic microarrays has placed the estimate at as many as 43 different bacterial phyla and over 2,000 different taxa (Guss et al., 2011; Fodor et al., 2012). In contrast, the role of fungi, viruses and mycobacteria (which are not identified by standard bacterial 16S rRNA sequencing) is still unclear (Kim et al., 2015). Pulmonary exacerbations are related to a complex relationship between host defense and airway microbiota and can lead to pulmonary decline. Early recognition and treatment of exacerbations is fundamental for patient wellbeing, and so frequent monitoring of patients is necessary.

Antibiotic resistance is a serious global health problem (Hawkey and Jones, 2009), as infections caused by resistant pathogens may be difficult to treat. The dispersion of clones exhibiting resistance to various antibiotics has become common (Cantón et al., 2005; Czekalski et al., 2012) and represents a greater threat than ever before (Hawkey, 2008; Hawkey and Jones, 2009). In the case of CF, the use of antimicrobials is necessary throughout the life of the patient. Aggressive antibiotic therapies are already used during primocolonization with the aim of eradicating the microorganisms in the airway of the CF patient. The ultimate objective is to delay the deterioration of lung function that occurs during chronic colonization, which reduces the quality of life and survival of the patient (Castellani and Assael, 2017). During chronic colonization, nebulized, oral, and intravenous chronic suppressive treatments are used (Cantón et al., 2005; Castellani and Assael, 2017). All this facilitates resistant or multiresistant antimicrobial bacteria being selected over time. Some studies suggest that up to 45% of CF patients are colonized by a multiresistant microorganism, which makes antimicrobial treatment even more difficult (McCaughey et al., 2013). Among new proposals for treating CF infections, phage therapy and co-treatment with antibiotics is a promising approach that may overcome antibiotic resistant pathogens and natural resistance in biofilm

(Alemayehu et al., 2012; Saussereau et al., 2014; Fong et al., 2017).

Transfer of antibiotic resistance genes (ARGs) mediated by mobile genetic elements (MGEs) provides the most important and rapid mechanism of dispersion. The most commonly studied MGEs are plasmids, transposons and, more recently, bacteriophages (or phages) (Srivastava et al., 2004; Colomer-Lluch et al., 2011b; Colombo et al., 2016; Lekunberri et al., 2017), which are bacterial viruses that infect and multiply using the machinery of the host bacterium.

In the case of CF, phages have been detected in the metagenome of respiratory tracts of patients (Willner et al., 2009) and ARGs have been found in the sputum virome of five patients (Fancello et al., 2011). Phages can be important contributors to the mobilization of ARGs, leading to the emergence of new resistant clones, which is a major problem in the treatment of CF patients. Our objective was to detect and quantify phage particles carrying ARGs in sputum samples of CF patients.

MATERIALS AND METHODS

Samples

The study was conducted with 71 sputum samples of 71 CF patients taken during regular follow up visit to the CF unit of Vall d'Hebron Hospital in Barcelona, from August 2015 to October 2016. The age of CF patients under study ranged from four to 79 years. All the samples were used only after performing a conventional microbiological diagnosis and they were completely anonymized. No data other than the age of the patients were collected and the samples were destroyed immediately after the study. The study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Hospital (reference number PR(AG)187/2014). Additionally, 21 sputum samples were taken from a group of people not suffering from CF who had not received antibiotics in the previous 3 months.

Bacterial Isolation and Antimicrobial Susceptibility Characterization

Sputum samples were processed within 2 h of reception. They were homogenized with 2% cysteine solution (1:1) (v:v) and vigorously vortexed before being plated in chocolate agar, mannitol salt agar, MacConkey agar, and modified Thayer-Martin agar.

Isolates identification was performed using the VITEK MS matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) and antimicrobial susceptibility to β -lactams, quinolones and aminoglycosides of bacterial isolates was studied by the disk diffusion method following EUCAST (EUCAST, 2016). Specifically, the antimicrobials evaluated for non-fermenting gram-negative bacteria were ampicillin-sulbactam, piperacillin-tazobactam, ceftazidime, cefepime, aztreonam, imipenem, meropenem, ciprofloxacin, amikacin, and tobramycin; and for *Staphylococcus aureus*, penicillin, ampicillin, cefoxitin and gentamicin.

Bacteriophage Purification From Sputum Samples

One ml of each sample was diluted 1:3 in phosphate-buffered saline (PBS). The suspension was filtered through 0.22 μm low protein-binding membrane filters (Millex-GP, Millipore, Bedford, MA, United States). The suspension was then treated with chloroform (1:10) (v:v) to minimize the presence of membrane vesicles containing DNA and treated with DNase (100 units/ml of the phage lysate at 37°C for 1 h), to remove non-packaged DNA. The DNase was heat inactivated at 75°C for 5 min.

Evaluation of the Protocol for Phage DNA Recovery From Sputum Samples

Assays were performed to verify the efficiency of the protocol for phage DNA recovery from sputum. Firstly, various degrees of homogenization of five CF sputum samples negative for the presence of the *bla*_{TEM} gene were performed in PBS (direct analysis, 1:3 dilution and 1:5). In each dilution, 10 μl of the qPCR standard containing 10³ gene copies (GC) of the *bla*_{TEM} gene were inoculated. The conditions showing

the best recovery of the GC number were used in the experiments.

In addition, five CF sputum samples were inoculated to a final concentration of 10⁶ phage particles/ml with a suspension of phage 933W (Imamovic et al., 2010). This phage contains one copy of the Shiga toxin 2 (*stx*₂) gene in its genome and was not expected to be naturally present in these samples. The *stx*₂ qPCR assay (Imamovic et al., 2010; **Table 1**) was used to detect the *stx* and each copy corresponded to one phage 933W. Comparison of the number of phage particles inoculated and the number of phages 933W recovered from the sputum after phage purification and DNA extraction allowed the protocol effectiveness to be calculated.

Phage DNA Extraction

The phage suspensions purified from the samples or from the enrichment cultures were then digested using proteinase K (0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), and the DNA extracted with phenol/chloroform (1:1 v/v) (Sambrook and Russell, 2001). The remaining phenol/chloroform was removed by adding the mixture to Phase Lock Gel Tubes (5-Prime, Huco Erlöss, Madrid, Spain) and centrifuging following the manufacturer's instructions.

TABLE 1 | Quantitative real time PCR primers and probes for qPCR assays used in this study.

Target gene	PCR	Sequence	Amplimer (bp)	Reference
<i>bla</i> _{TEM} qPCR	UP	CACTATTCTCAGAATGACTTGGT	85	Lachmayr et al., 2009
	LP	TGCATAATTCTCTACTGTCATG		
	Probe	6FAM-CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGG-MGBNFQ		
<i>bla</i> _{CTX-M-1} qPCR	UP	ACCAACGATATCGCGGTGAT	101	Colomer-Lluch et al., 2011b
	LP	ACATCGCGACGGCTTTCT		
	Probe	6FAM – TCGTGCGCCGCTG-MGBNFQ		
<i>bla</i> _{CTX-M-9} qPCR	UP	ACCAATGATATTGCGGTGAT	85	Colomer-Lluch et al., 2011a
	LP	CTGCGTTCTGTTGCGGCT		
	Probe	6FAM – TCGTGCGCCGCTG-MGBNFQ		
<i>bla</i> _{OXA-48} qPCR	UP	CGGTAGCAAAGGAATGGCAA	133	Brown-Jaque et al., 2018
	LP	TGGTTCGCCCGTTTAAGATT		
	Probe	6FAM – CGTAGTTGTGCTCTGGA-MGBNFQ		
<i>bla</i> _{VIM} qPCR	UP	AATGGTCTCATTGTCCGTGATG	61	This study
	LP	TACAGCGTGGGGTGCGA		
	Probe	6FAM –TGATGAGTTGCTTTTGATTG-MGBNFQ		
<i>mecA</i> qPCR	UP	CGCAACGTTCAATTTAATTTGTTAA	92	Volkman et al., 2004
	LP	TGGTCTTTCTGCATTCTGGA		
	Probe	6FAM-AATGACGCTATGATCCCAATCTAACTCCACA-MGBNFQ		
<i>qnrA</i> qPCR	UP	AGGATTGCAGTTTCATTGAAAGC	138	Colomer-Lluch et al., 2014b
	LP	TGAACTCTATGCCAAAGCAGTTG		
	Probe	6FAM-TATGCCGATCTGCGCGA-MGBNFQ		
<i>qnrS</i> qPCR	UP	CGACGTGCTAACTTGCGTGA	118	Colomer-Lluch et al., 2014b
	LP	GGCATTGTTGAAACTTGCA		
	Probe	6FAM –AGTTCATTGAACAGGGTGA-MGBNFQ		
<i>stx</i> ₂	UP	ACGGACAGCAGTTATACCACTCT	65	Imamovic et al., 2010
	LP	CTGATTTCATTCCGGAACGT		
	Probe	FAM-CCAGCGCTGCGACACG-NFQ		
16S rDNA	UP 28f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGA	1503	Weisburg et al., 1991
Eubacteria	LP 1492r	TACGGCTACCTTGTTACGACTT		

qPCR, quantitative real time PCR; UP, upper primer; LP, lower primer; MGBNFQ, Minor groove binding non-fluorescent quencher; FAM: 6-carboxyfluorescein reporter.

DNA was precipitated using 100% ethanol and 3M sodium acetate, and resuspended in 50 μ l of ultrapure water. DNA was quantified using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, United States). To verify the absence of non-packaged DNA, the protocol for DNA extraction from the phage fraction of the samples was always accompanied by several controls, as described previously (Colomer-Lluch et al., 2014a). To rule out the possibility of contamination with free DNA outside the phage particles, an aliquot of the sample taken after DNase treatment and before desencapsidation was evaluated. At this stage, the samples were also used as a template for conventional PCR of eubacterial 16S rDNA (Table 1) and as a template for the qPCR assay of each ARG. Both amplifications should be negative, confirming that DNase has removed all non-encapsidated DNA from the samples.

qPCR Procedures

Eight clinically relevant ARGs that differ in their resistance mechanisms and clinical significance were evaluated: five genes that confer resistance to β -lactam antibiotics (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1} group, *bla*_{CTX-M-9} group *bla*_{OXA-48}, and *bla*_{VIM}), two quinolone resistance genes (*qnrA* and *qnrS*) and a gene conferring resistance to methicillin (*mecA*), commonly found in *Staphylococcus* (Colomer-Lluch et al., 2011b). A fragment of each target ARG was amplified by conventional PCR using an Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Barcelona, Spain) with the primers described previously (Brown-Jaque et al., 2018), purified and cloned into a pGEM-T Easy vector for insertion of PCR products (Promega, Barcelona, Spain), and used to generate the standard curves as previously described (Colomer-Lluch et al., 2011b). The standard curves were constructed with the averaged values obtained by three replicates in at least five independent serial dilutions of the standard.

TaqMan qPCR assays (Table 1) were performed under conditions described previously (Colomer-Lluch et al., 2011b) in a Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Spain). Genes were amplified in a 20 μ l reaction mixture with the TaqMan[®] Environmental Master Mix 2.0 (Applied Biosystems). The reaction contained 2 or 9 μ l of the sample DNA or quantified plasmid DNA.

All the samples, standards used for quantification of each ARG, positive controls of DNA containing each ARG and negative controls added to rule out the presence of non-encapsidated DNA (Colomer-Lluch et al., 2014a) and contamination of the qPCR reaction, were assayed in duplicate. The gene copy (GC) was defined as the average of the duplicate data obtained. The efficiency (*E*) of all qPCR reactions ranged from 95 to 100%. To quantify the ARGs we considered the GC results obtained within the threshold cycle (Ct) within the limit of quantification (LOQ). This was determined by the last valid Ct for each ARG assay in the standard curve that is consistent in the diverse replicates. However, sometimes amplification was observed beyond the LOQ, but the lack of consistency in the replicates did not allowed the GC to be correctly quantified. The values beyond the LOQ but

not undetermined were those within the limit of detection (LOD).

We designed a new *bla*_{VIM} qPCR assay for this study. A 748 bp fragment of the sequence of *bla*_{VIM} was amplified from a clinical isolate of *P. aeruginosa* by conventional PCR with primers UP-TCTACATGACCGCGTCTGTC/LP-TGTGCTTTGACAACGTTTCGC. The fragment generated was cloned in a pGEM vector and used to prepare the standard curve. A *bla*_{VIM} qPCR assay (Table 1) was designed with the software tool Primer Express 3.0 and commercially synthesized (Applied Biosystems). Specificity was determined via sequence alignments using *bla*_{VIM} sequences available in the NCBI nucleotide database. A FAM-labeled fluorogenic probe was commercially synthesized by Applied Biosystems. The *bla*_{VIM} probe was minor-groove binding (MGB) with an FAM reporter (FAM: 6-carboxyfluorescein) and an NFQ quencher (non-fluorescent quencher). The *bla*_{VIM} gene showed an efficiency of 91.9% and a detection limit of 22.5 GC/ μ l (Ct of 33.9).

Evaluation of Infectious Phages in the Samples

Laboratory strain *Escherichia coli* WG5 (Anonymous, 2000), *S. aureus* RN450 (Novick, 1967), an environmental isolate of *P. aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* reference strain of capsular serotype K2 (Orskov and Orskov, 1984), were used as hosts for bacteriophage propagation. These were selected for their ability to detect lytic phages and were negative for the ARGs in this study. Phage propagation was performed in solid culture by double agar layer (Anonymous, 2000) with some modifications. Briefly, 1 ml of target bacteria grown in LB at an OD₆₀₀ of 0.3 was mixed with Luria Bertrani (LB) semi-solid agar (0.7% agar) supplemented with 6 mM CaCl₂. The mixture was poured into LB agar plates and left to solidify at room temperature. Ten microliters of each phage suspension was dropped onto the agar layer and plates were examined for the presence of lysis after incubation at 37°C overnight.

Phage Purification by CsCl Density Gradients

Sputum samples showing a high level of ARGs in phage DNA were pooled and used for purification of phages using caesium chloride (CsCl) density gradients (Sambrook and Russell, 2001). The easily visible gray bands corresponding to bacteriophages were collected and dialysed. Phages in the bands were used in electron microscopy studies and to quantify the presence of ARGs by qPCR.

Electron Microscopy Studies

Fifteen microliters of phage suspensions purified from CsCl gradient sputum was deposited on copper grids with carbon-coated Formvar films and negatively stained with 2% ammonium molybdate (pH 6.8) for 1.5 min. The samples were examined in a Jeol 1010 transmission electron microscope (JEOL USA Inc., Peabody, MA, United States) operating at 80 kV.

Statistical Analysis

Analysis was carried out using the R software packages (R Core Team, 2014). An ANOVA test was used and a 5% significance level was adopted to identify differences in ARG content in phage DNA between groups of individuals under or over 18 years of age.

RESULTS

Evaluation of the Protocol for Phage DNA Recovery From Sputum Samples

Homogenization of the sputum sample in PBS (1:3) (v:v) proved to be equally as efficient as homogenization in PBS (1:5) (v:v). The preliminary assays performed to evaluate the recovery of spiked *bla*_{TEM} GC showed a recovery of >99% with respect to the stock. In order to minimize the dilution of the sample, 1:3 was selected for the study.

Recovery of Stx phage 933W spiked in the samples ranged from 96.0 to 99.8% in five CF sputum samples, suggesting that the purification protocol efficiently recovered viral particles inoculated in the samples.

Occurrence of ARGs in Phage DNA of CF Sputum Samples: Limit of Detection Versus Limit of Quantification for Positive Samples

The LOD is the absolute highest threshold cycle (Ct) generated that still proves to be amplification of the specific target sequence. The LOQ is defined as the last valid Ct in the standard curve that is consistent in the diverse replicates and is used to calculate the efficiency of each qPCR assay. In our case, Ct-values above 34–35 were close to the borderline of true detection and produced inconsistent and non-reproducible results among the replicates due to the low GC numbers.

The results for the different ARGs in the phage fraction of the sputum samples varied according to whether the LOD or LOQ was considered (Figure 1). Positive samples within the LOD showed regular curves but the Ct-values were too close to the limit and beyond the LOQ defined for our qPCR assays. As it was impossible to properly calculate the densities of GC in these cases, only positive samples within the LOQ are included in the results. However, we consider it worth noting that some amplification of certain ARGs took place, which emerge when considering the LOD, and that these samples were not really negative. This is the case of *mecA* and *qnrA* genes. When considering the LOD, some samples carried up to seven ARGs, whereas when considering the LOQ, no more than four ARGs were encountered in the same sample.

Occurrence of ARG by Age

Sputum samples were taken from 71 CF patients aged 4 to 79 years. Two subgroups were devised: patients under or 18 years old ($n = 28$) and above ($n = 43$) (Figure 2). No remarkable differences were observed; the only significant ($p < 0.05$)

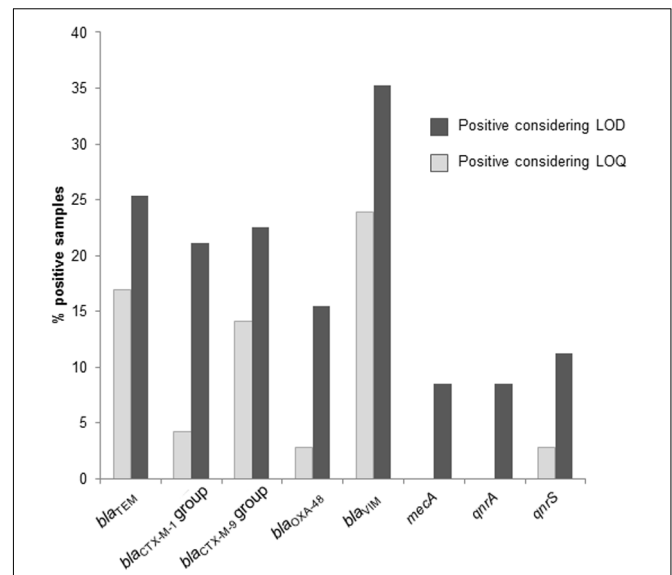


FIGURE 1 | Percentage of positive samples for each antibiotic resistance gene (ARG) in phage DNA of the sputum samples considering the limit of detection (LOD) or the limit of quantification (LOQ) of the qPCR assays.

differences were a higher percentage of *bla*_{TEM} and lower percentage of *bla*_{CTX-M-9} group positive samples in the younger subgroup (Figure 2).

In addition to the 71 sputum samples from CF patients, sputum samples from 21 healthy individuals not affected by the disease were analyzed. ARGs in the phage fraction were also detected in this group. As for CF samples, *mecA* was not detected in non-CF individuals. One sample was positive for *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{OXA-48} and *qnrS*. *qnrA* and *bla*_{CTX-M-9} were detected in three and four control samples, respectively, and *bla*_{TEM} and *bla*_{VIM} were the most prevalent with seven and eight positive samples, respectively.

Abundance of ARGs in Phage DNA of Sputum of CF Patients

The quantification of ARGs in phage DNA showed that β -lactamase genes were the most abundant in CF patients, with values of up to 10^3 GC/ml (Figure 3). In contrast, there was an absence of *qnrA* and *mecA*, and very low numbers of *qnrS*. The highest copy number was obtained for the *bla*_{VIM} gene with a mean of $3.1 \log_{10}$ GC/ml (Figure 3) and a maximum value of $4.6 \log_{10}$ GC/ml (Figure 3).

Characterization of Bacterial Isolates and Antibiotic Resistances

The results of the bacterial cultures of the sputum samples of the CF patients showed that 46.5% were positive for *P. aeruginosa*, 39.4% for *S. aureus*, 7.0% for *Achromobacter* sp., 5.6% for *Stenotrophomonas maltophilia*, 2.9% for *H. influenzae*, 1.4% for *H. parainfluezae* and 1.4% for *Burkholderia* sp. None of the samples were positive for any species of the *Enterobacteriaceae* family. Antimicrobial susceptibility testing

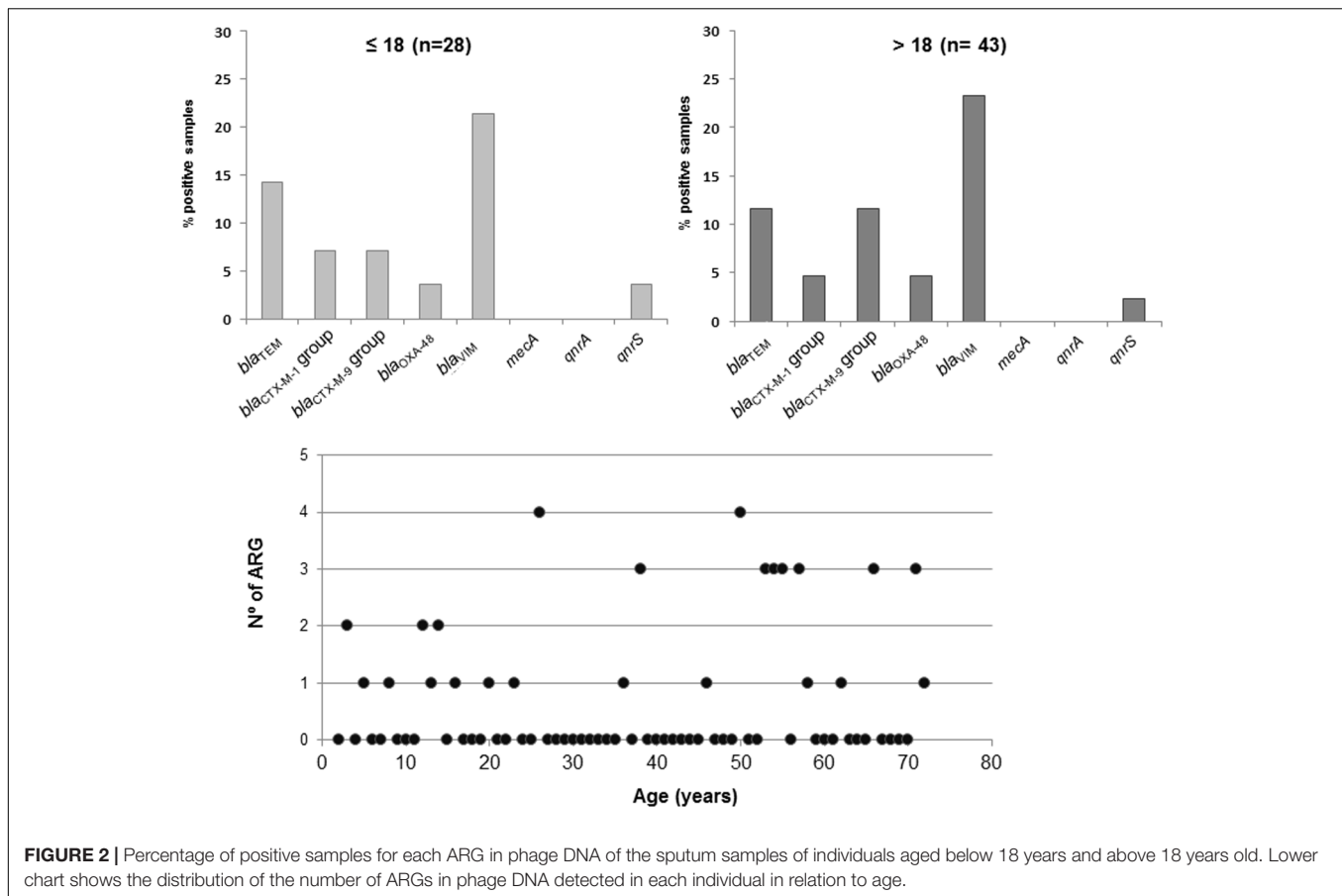


FIGURE 2 | Percentage of positive samples for each ARG in phage DNA of the sputum samples of individuals aged below 18 years and above 18 years old. Lower chart shows the distribution of the number of ARGs in phage DNA detected in each individual in relation to age.

showed that 42.4% of the *P. aeruginosa* isolates obtained were multidrug-resistant (i.e., non-susceptible to at least one agent in three or more antimicrobial categories) and of those, 71.4% were extensively drug-resistant (i.e., susceptible to only one or two antimicrobial categories). Regarding the *S. aureus* isolates obtained, 34.6% of them were methicillin resistant.

In the non-CF group, 14 of the 21 sputum samples were analyzed for the presence of bacteria. In five samples *S. aureus* was detected (one of them was methicillin resistant) and in one sample *P. aeruginosa* was detected. No bacteria were isolated from the rest of the samples.

When comparing the results of isolates for each sample and the ARG results in phage DNA, no co-occurrence was found between ARG in phage DNA and the bacterial species isolated or their antibiotic susceptibility profiles.

Presence of Infectious Bacteriophages in the CsCl Purified Samples

The qPCR detection of ARGs in the phage DNA fraction of sputum samples provided evidence of the presence of ARGs-mobilizing phage particles. To gain more information, we further purified the phage particles in the samples to (i) evaluate their infectivity, (ii) directly visualize them by electron microscopy, and (iii) confirm that these purified particles

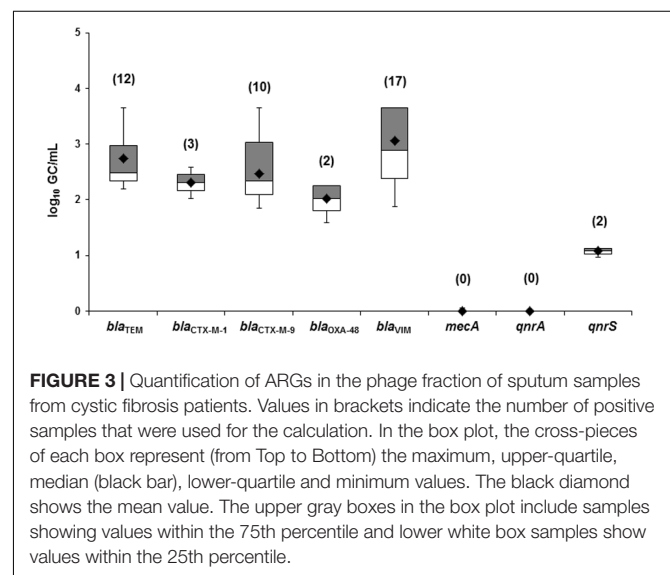
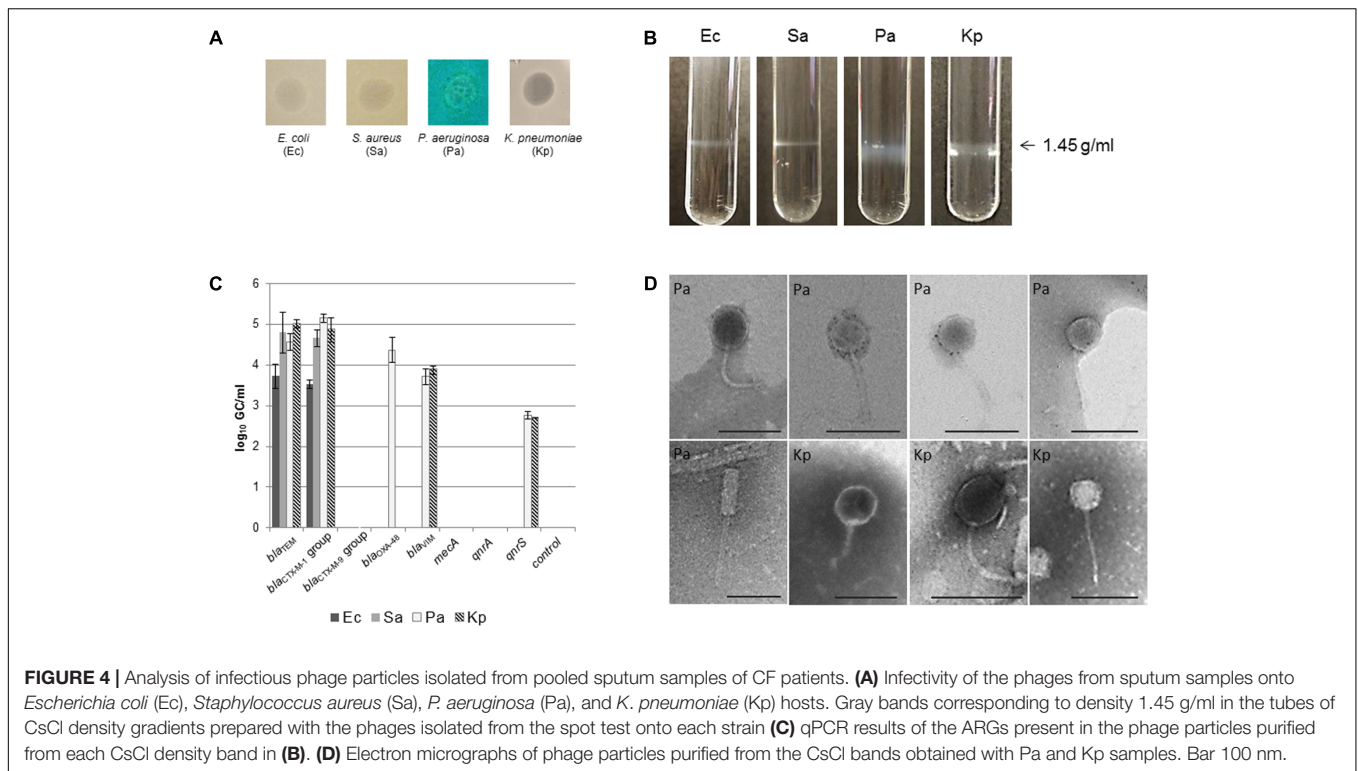


FIGURE 3 | Quantification of ARGs in the phage fraction of sputum samples from cystic fibrosis patients. Values in brackets indicate the number of positive samples that were used for the calculation. In the box plot, the cross-pieces of each box represent (from Top to Bottom) the maximum, upper-quartile, median (black bar), lower-quartile and minimum values. The black diamond shows the mean value. The upper gray boxes in the box plot include samples showing values within the 75th percentile and lower white box samples show values within the 25th percentile.

propagated in a host strain and observed by electron microscope carried ARGs.

A pool of phages purified from 10 sputum samples was used to determine the presence of infectious phages carrying ARGs by a spot test, as described in section “Materials



and Methods.” The occurrence of lysis was attributed to the presence of phages capable of infecting a given strain. Opaque lysis in the area of the spot test was observed on the *E. coli* WG5 host strain (Ec) (Brown-Jaque et al., 2016) and *S. aureus* RN450 (Sa) (Novick, 1967), whereas clear lysis occurred on *P. aeruginosa* (Pa) and *K. pneumoniae* (Kp) hosts (Figure 4A).

To increase the volume of phage suspension, 20 spots of each strain were pooled together. As a negative control, layers of each host strain without phages were used. Suspensions were treated by chloroform, DNase and further purified by CsCl gradients.

Thick gray bands at the densities expected for phages (1.45 g/ml) were obtained for phage suspensions recovered from Kp and Pa lysis areas. Thin bands at the same density were obtained from Ec and Sa samples (Figure 4B). No bands were obtained from the control without phages. DNAs extracted from phages in each of the bands in Figure 4B were used as a template for the qPCR quantification of ARGs (Figure 4C). *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1} group, *bla*_{OXA-48}, and *bla*_{VIM} were detected in densities of up to 10⁵ GC/ml depending on the gene and the host strain (Figure 4C).

Particles compatible with phage capsid heads were visualized by electron microscopy in the CsCl bands of Ec and Sa samples, but the presence of phages could not be confirmed due to the absence of tails (images not shown). In contrast, capsids of phages of the *Siphoviridae* morphological types with isometric heads and various tail lengths (120–150 nm) were observed in Pa and Kp samples (Figure 4D). We also observed one apparently detached *Myoviridae* tail (210 nm) (Figure 4D, Pa, second row).

DISCUSSION

Phages are among the most recently studied MGEs that play a role in the spread of ARGs (Colomer-Lluch et al., 2011b; Fancello et al., 2011; Subirats et al., 2016). In our study, ARGs were detected in phage particles, as previously observed in other biomes (Muniesa et al., 2004; Colomer-Lluch et al., 2011b; Lekunberri et al., 2017; Lood et al., 2017; Brown-Jaque et al., 2018) and in accordance with metagenomics analyses of CF patients (Bittar et al., 2008; Fancello et al., 2011). The protocol used appeared to be sufficiently efficient for our purposes. However, it should be noted, that CF sputum samples are very dense matrices and the protocol of inoculation and mixture of phage 933W may not have achieved a level of phage particle internalization comparable with that of phage particles already present in the sample. As a consequence, recovery of naturally occurring phages, or phage types other than 933W, could be less efficient than in the spiked samples. In this case, the phage densities in the real samples would be even higher than our results indicate. Furthermore, the limits imposed by our qPCR quantification curve may underestimate the presence of ARGs in some samples, as revealed when comparing the LOD and LOQ.

Compared to healthy individuals, the far greater viscosity of the sputum of CF patients could also hinder the extraction of the packaged DNA, causing an underestimation of the results. It is also possible that the microorganisms remain more firmly attached to the lung in CF patients because of the difficulties in expectoration.

Among all ARGs amplified in this study, the most prevalent and abundant group are the β -lactamase genes. This is in

agreement with the widespread expansion of *bla* genes in the environment, either in bacterial (Mesa et al., 2006) or phage fractions (Colomer-Lluch et al., 2011a,b; Marti et al., 2014), in human (Fancello et al., 2011) and animal biomes (Mesa et al., 2006; Economou and Gousia, 2015). Notably, a high percentage of *P. aeruginosa* isolates from CF patients in our study displayed resistance to β -lactam antibiotics, in agreement with previous reports (López-Causapé et al., 2017). A high β -lactamase activity has also been reported in CF-patients (Giwerzman et al., 1992). In contrast, the *mecA* gene was almost absent in the phage DNA fraction of our study, while 35% of the isolates were MRSA, in agreement with other studies (Muhlebach, 2017).

Analysis of a smaller group of samples from non-CF-patients also revealed the presence of ARGs, confirming an individual variability of the microbiome (Hauser et al., 2014). Moreover, the healthy population has for decades been subjected to antibiotic pressure and has incorporated ARGs into their microbiomes, even in the absence of a recent antibiotic treatment (Sommer et al., 2010; Penders et al., 2013; Quirós et al., 2014; Brown-Jaque et al., 2018).

An ARG encoded in a bacterial cell can be mobilized by a phage particle through transduction, or a related mechanism not yet defined (Quirós et al., 2016). The particle may remain in a biome where bacteria are no longer present or be mobilized to a different area. This might explain the apparent lack of coherence of our results concerning ARGs in packaged DNA and the bacterial species isolated. We recently demonstrated that phages present in many human biomes can interfere in the isolation of bacteria from samples (Brown-Jaque et al., 2016). This interference could be due to phage infection, propagation and subsequent lysis of the bacteria targeted for isolation during the enrichment process. In addition, only a fragment of the ARG may be detected by qPCR amplification, or the phage particle might not be carrying the complete gene (Martínez et al., 2014) and hence be unable to confer resistance. Nevertheless, in previous studies at least a fraction of ARGs in phage DNA were complete and able to confer resistance (Colomer-Lluch et al., 2011b).

Previous evidence from phage fecal environments or studies of clinical strains suggests that the mobilization of phage-based ARGs may be mostly by generalized transduction (Monson et al., 2011). It has been proposed that the frequency of transduction events could be greater than previously thought (McDaniel et al., 2010). To the best of our knowledge, the phage particles observed after propagation on *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* allowed us to visualize phages in sputum samples for the first time.

The high levels of ARGs in the purified infectious phage particles confirmed that at least some of them harbored ARGs. The number of phage particles present in Ec and Sa samples was apparently insufficient to allow their visualization by electron microscope. Considering that the concentration required for phage detection by electron microscopy is a minimum of 10^8 particles/ml (Brown-Jaque et al., 2016), it can be estimated that a fraction of $1/10^3$ – $1/10^5$ of the particles observed in Pa and Kp contained one ARG, a frequency in agreement with previous studies (McDaniel et al., 2010). The ability of some bacteriophages to infect different bacteria, strains or even

bacterial genera would facilitate the ARG mobilization in biomes that contain multiple microorganisms such as the lungs.

One of the most important pathogen is *Pseudomonas* spp. (Elborn, 2016). A notably high prevalence of *bla*_{VIM} has been found in packaged DNA, an ARG linked to *Pseudomonas* infection (Tato et al., 2010). *Pseudomonas* cells carry a high number of prophages and generalized transduction has been extensively reported in this genus (Fothergill et al., 2011; Monson et al., 2011). Phages of *Pseudomonas* appear to be polyvalent and can even infect other bacterial genera (for instance *E. coli*) (Yu et al., 2016). In the early stages of the disease, the lungs are colonized by *S. aureus* (Bittar et al., 2008; Elborn, 2016), which displays mobilization of pathogenicity islands (encoding virulence factors) through helper phages (Novick et al., 2010) and in *S. aureus* phages capable of mobilizing ARGs have also been reported (Novick et al., 2010). Moreover, *Burkholderia*, another common lung colonizer in CF patients, is the first non- α proteobacteria reported to contain gene transfer agents (GTAs), phage-derived elements encoded in the bacterial chromosome capable of packaging any sort of bacterial DNA in their phage capsids (Ronning et al., 2010). GTAs involve a mechanism similar to generalized transduction (Ronning et al., 2010; Quirós et al., 2016), in which the DNA of the bacteria carrying the GTA genes is packaged and spread within the capsids they encode. Phages and phage-like elements are also common in pathogens associated with CF, such as *Haemophilus* (Zehr et al., 2012) or *Mycobacterium* (Dedrick et al., 2017).

Most bacteria involved in CF (e.g., *Pseudomonas*), are organized, spread and coexist within the biofilm generated in the lungs of sufferers, which greatly hampers antibiotic treatments. This is about a cause of concern, considering that bacteriophages might transfer genes within biofilms (Solheim et al., 2013).

Transduction rates are highly dependent on the density of bacterial cells and phage particles, and could be increased by various factors: the immobilization of the donor and receptor bacteria in the biofilm matrix, the high concentration of microorganisms in this habitat, and phage induction by antibiotics, which increases the number of phage particles (Fothergill et al., 2011). This could represent another difficulty for the treatment of CF patients, in addition to the antibiotic diffusion barrier of biofilm.

ETHICS STATEMENT

Clinical Ethics Committee approved this study [reference number PR(AG)187/2014]. The laboratories involved in this study are allowed to work with microorganisms classified within biosafety levels 2 and 3.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MM, SG, JG, and JG-L designed the study, analyzed and interpreted the results. MM, JJ, and JG-L wrote the draft manuscript. MB-J, LRO, TC-S, and MM-G performed the experiments. JG-L, SG, JG, SR, and AA collected the samples

and provided the isolates for this study. MM and JG-L coordinated the study. All authors revised and approved the final version of the manuscript.

FUNDING

This work was supported by Sira Carrasco Foundation Project Grant 2015, the Generalitat de Catalunya (2009SGR1043),

REFERENCES

- Alemayehu, D., Casey, P. G., McAuliffe, O., Guinane, C. M., Martin, J. G., Shanahan, F., et al. (2012). Bacteriophages ϕ MR299-2 and ϕ NH-4 can eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the murine lung and on cystic fibrosis lung airway cells. *MBio* 3, e29–e12. doi: 10.1128/mBio.00029-12
- Anonymous (2000). *ISO 10705-2: Water quality. Detection and enumeration of Bacteriophages – part 2: e. Enumeration of Somatic Coliphages*. Geneva: Organization for Standardization.
- Bittar, F., Richet, H., Dubus, J.-C., Reynaud-Gaubert, M., Stremmer, N., Sarles, J., et al. (2008). Molecular detection of multiple emerging pathogens in sputa from cystic fibrosis patients. *PLoS One* 3:e2908. doi: 10.1371/journal.pone.0002908
- Brown-Jaque, M., Calero-Cáceres, W., Espinal, P., Rodríguez-Navarro, J., Miró, E., González-López, J. J., et al. (2018). Antibiotic resistance genes in phage particles isolated from human feces and induced from clinical bacterial isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents* 51, 434–442. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.11.014
- Brown-Jaque, M., Muniesa, M., and Navarro, F. (2016). Bacteriophages in clinical samples can interfere with microbiological diagnostic tools. *Sci. Rep.* 6:33000. doi: 10.1038/srep33000
- Cantón, R., Cobos, N., de Gracia, J., Baquero, F., Honorato, J., Gartner, S., et al. (2005). Antimicrobial therapy for pulmonary pathogenic colonisation and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 690–703. doi: 10.1111/j.1469-0691.2005.01217.x
- Castellani, C., and Assael, B. M. (2017). Cystic fibrosis: a clinical view. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 129–140. doi: 10.1007/s00018-016-2393-9
- Colombo, S., Arioli, S., Guglielmetti, S., Lunelli, F., and Mora, D. (2016). Virome-associated antibiotic-resistance genes in an experimental aquaculture facility. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92:fiw003. doi: 10.1093/femsec/fiw003
- Colomer-Lluch, M., Calero-Cáceres, W., Jebri, S., Hmaied, F., Muniesa, M., and Jofre, J. (2014a). Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population. *Environ. Int.* 73, 167–175. doi: 10.1016/j.envint.2014.07.003
- Colomer-Lluch, M., Imamovic, L., Jofre, J., and Muniesa, M. (2011a). Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4908–4911. doi: 10.1128/AAC.00535-11
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., and Muniesa, M. (2011b). Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS One* 6:e17549. doi: 10.1371/journal.pone.0017549
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., and Muniesa, M. (2014b). Quinolone resistance genes (*qnrA* and *qnrS*) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 1265–1274. doi: 10.1093/jac/dkt528
- Czekalski, N., Berthold, T., Caucci, S., Egli, A., and Bürgmann, H. (2012). Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into lake Geneva, Switzerland. *Front. Microbiol.* 3:106. doi: 10.3389/fmicb.2012.00106
- Dedrick, R. M., Jacobs-Sera, D., Bustamante, C. A., Garlena, R. A., Mavrich, T. N., Pope, V. H., et al. (2017). Prophage-mediated defence against viral attack and viral counter-defence. *Nat. Microbiol.* 2:16251. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.251
- Economou, V., and Gousia, P. (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infect. Drug Resist.* 8, 49–61. doi: 10.2147/IDR.S55778

and the Centre de Referència en Biotecnologia (XeRba). MB-J has a grant from COLCIENCIAS (Colombia).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. S. Merino for providing the *K. pneumoniae* K2 reference strain and Dr. J. R. Penadés for providing the *S. aureus* RN450 strain.

- Elborn, J. S. (2016). Cystic fibrosis. *Lancet* 388, 2519–2531. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00576-6
- EUCAST (2016). *Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Version 6.0*. Basel: EUCAST.
- Fancello, L., Desnues, C., Raoult, D., and Rolain, J. M. (2011). Bacteriophages and diffusion of genes encoding antimicrobial resistance in cystic fibrosis sputum microbiota. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 2448–2454. doi: 10.1093/jac/dkr315
- Fodor, A. A., Klem, E. R., Gilpin, D. F., Elborn, J. S., Boucher, R. C., Tunney, M. M., et al. (2012). The adult cystic fibrosis airway microbiota is stable over time and infection type, and highly resilient to antibiotic treatment of exacerbations. *PLoS One* 7:e45001. doi: 10.1371/journal.pone.0045001
- Fong, S. A., Drilling, A., Morales, S., Cornet, M. E., Woodworth, B. A., Fokkens, W. J., et al. (2017). Activity of bacteriophages in removing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronic rhinosinusitis patients. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7:418. doi: 10.3389/fcimb.2017.00418
- Fothergill, J. L., Mowat, E., Walshaw, M. J., Ledson, M. J., James, C. E., and Winstanley, C. (2011). Effect of antibiotic treatment on bacteriophage production by a cystic fibrosis epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 426–428. doi: 10.1128/AAC.01257-10
- Giwerzman, B., Meyer, C., Lambert, P. A., Reinert, C., and Høiby, N. (1992). High-level beta-lactamase activity in sputum samples from cystic fibrosis patients during antipseudomonal treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 71–76. doi: 10.1128/AAC.36.1.71
- Guss, A. M., Roeselers, G., Newton, I. L., Young, C. R., Klepac-Ceraj, V., Lory, S., et al. (2011). Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria associated with cystic fibrosis. *ISME J.* 5, 20–29. doi: 10.1038/ismej.2010.88
- Hauser, P. M., Bernard, T., Greub, G., Jatou, K., Pagni, M., and Hafen, G. M. (2014). Microbiota present in cystic fibrosis lungs as revealed by whole genome sequencing. *PLoS One* 9:e90934. doi: 10.1371/journal.pone.0090934
- Hawkey, P. M. (2008). The growing burden of antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 62(Suppl. 1), i1–i9. doi: 10.1093/jac/dkn241
- Hawkey, P. M., and Jones, A. M. (2009). The changing epidemiology of resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 64(Suppl. 1), i3–i10. doi: 10.1093/jac/dkp256
- Imamovic, L., Serra-Moreno, R., Jofre, J., and Muniesa, M. (2010). Quantification of Shiga toxin 2-encoding bacteriophages, by real-time PCR and correlation with phage infectivity. *J. Appl. Microbiol.* 108, 1105–1114. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04664.x
- Kim, S. H., Clark, S. T., Surendra, A., Copeland, J. K., Wang, P. W., Ammar, R., et al. (2015). Global Analysis of the fungal microbiome in cystic fibrosis patients reveals loss of function of the transcriptional repressor Nrg1 as a mechanism of pathogen adaptation. *PLoS Pathog.* 11:e1005308. doi: 10.1371/journal.ppat.1005308
- Lachmayr, K. L., Kerkhof, L. J., Dirienzo, A. G., Cavanaugh, C. M., and Ford, T. E. (2009). Quantifying nonspecific TEM beta-lactamase (*bla*TEM) genes in a wastewater stream. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 203–211. doi: 10.1128/AEM.01254-08
- Lekunberri, I., Subirats, J., Borrego, C. M., and Balcázar, J. L. (2017). Exploring the contribution of bacteriophages to antibiotic resistance. *Environ. Pollut.* 220, 981–984. doi: 10.1016/j.envpol.2016.11.059
- Lipuma, J. J. (2010). The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 299–323. doi: 10.1128/CMR.00068-09
- Lood, R., Ertürk, G., and Mattiasson, B. (2017). Revisiting antibiotic resistance spreading in wastewater treatment plants - bacteriophages as a much neglected potential transmission vehicle. *Front. Microbiol.* 8:2298. doi: 10.3389/fmicb.2017.02298

- López-Causapé, C., de Dios-Caballero, J., Cobo, M., Escribano, A., Asensio, Ó, Oliver, A., et al. (2017). Antibiotic resistance and population structure of cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a Spanish multi-centre study. *Int. J. Antimicrob. Agents* 50, 334–341. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.03.034
- Marti, E., Variatza, E., and Balcázar, J. L. (2014). Bacteriophages as a reservoir of extended-spectrum β -lactamase and fluoroquinolone resistance genes in the environment. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, O456–O459. doi: 10.1111/1469-0691.12446
- Martínez, J. L., Coque, T. M., and Baquero, F. (2014). What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 116–123. doi: 10.1038/nrmicro3399
- McCaughey, G., Gilpin, D., Elborn, J., and Tunney, M. M. (2013). The future of antimicrobial therapy in the era of antibiotic resistance in cystic fibrosis pulmonary infection. *Expert Rev. Respir. Med.* 7, 385–396. doi: 10.1586/17476348.2013.814411
- McDaniel, L. D., Young, E., Delaney, J., Ruhnu, F., Ritchie, K. B., and Paul, J. H. (2010). High frequency of horizontal gene transfer in the oceans. *Science* 330:50. doi: 10.1126/science.1192243
- Mesa, R. J., Blanc, V., Blanch, A. R., Cortés, P., González, J. J., Lavilla, S., et al. (2006). Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 211–215. doi: 10.1093/jac/dkl211
- Monson, R., Foulds, I., Foweraker, J., Welch, M., and Salmond, G. P. (2011). The *Pseudomonas aeruginosa* generalized transducing phage ϕ PA3 is a new member of the ϕ KZ-like group of “jumbo” phages, and infects model laboratory strains and clinical isolates from cystic fibrosis patients. *Microbiology* 157, 859–867. doi: 10.1099/mic.0.044701-0
- Muhlebach, M. S. (2017). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 23, 544–550. doi: 10.1097/MCP.0000000000000422
- Muniesa, M., García, A., Miró, E., Mirelis, B., Prats, G., Jofre, J., et al. (2004). Bacteriophages and diffusion of beta-lactamase genes. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1134–1137. doi: 10.3201/eid1006.030472
- Novick, R. (1967). Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*. *Virology* 33, 155–166. doi: 10.1016/0042-6822(67)90105-5
- Novick, R. P., Christie, G. E., and Penadés, J. R. (2010). The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 541–551. doi: 10.1038/nrmicro2393
- Orskov, I., and Orskov, F. (1984). 4 Serotyping of Klebsiella. *Methods Microbiol.* 14, 143–164. doi: 10.1016/S0580-9517(08)70449-5
- Panitch, A. J., and Rubenstein, R. (2010). “Cystic fibrosis. Lung biology,” in *Health and Disease*, eds R. Allen, J. Panitch, and H. Rubenstein (New York, NY: Informa Healthcare).
- Penders, J., Stobberingh, E. E., Savelkoul, P. H., and Wolfs, P. F. (2013). The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance. *Front. Microbiol.* 4:87. doi: 10.3389/fmicb.2013.00087
- Quirós, P., Brown-Jaque, M., and Muniesa, M. (2016). Spread of bacterial genomes in packaged particles. *Fut. Microbiol.* 11:2. doi: 10.2217/fmb.15.145
- Quirós, P., Colomer-Lluch, M., Martínez-Castillo, A., Miró, E., Argente, M., Jofre, J., et al. (2014). Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 606–609. doi: 10.1128/AAC.01684-13
- R Core Team (2014). *R A Language Environment Statistical Computing R Foundation Statistical Computing*. Vienna: R Core Team.
- Ronning, C. M., Losada, L., Brinkac, L., Inman, J., Ulrich, R. L., Schell, M., et al. (2010). Genetic and phenotypic diversity in Burkholderia: contributions by prophage and phage-like elements. *BMC Microbiol.* 10:202. doi: 10.1186/1471-2180-10-202
- Sambrook, J., and Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, NY: Cold Spring Harb. Lab. Press.
- Saussereau, E., Vachier, I., Chiron, R., Godbert, B., Sermet, I., Dufour, N., et al. (2014). Effectiveness of bacteriophages in the sputum of cystic fibrosis patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, O983–O990. doi: 10.1111/1469-0691.12712
- Solheim, H. T., Sekse, C., Urdahl, A. M., Wasteson, Y., and Nesse, L. L. (2013). Biofilm as an environment for dissemination of stx genes by transduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 896–900. doi: 10.1128/AEM.03512-12
- Sommer, M. O., Church, G. M., and Dantas, G. (2010). The human microbiome harbors a diverse reservoir of antibiotic resistance genes. *Virulence* 1, 299–303. doi: 10.4161/viru.1.4.12010
- Srivastava, A. S., Kaido, T., and Carrier, E. (2004). Immunological factors that affect the in vivo fate of T7 phage in the mouse. *J. Virol. Methods* 115, 99–104. doi: 10.1016/j.jviromet.2003.09.009
- Subirats, J., Sánchez-Melsió, A., Borrego, C. M., Balcázar, J. L., and Simonet, P. (2016). Metagenomic analysis reveals that bacteriophages are reservoirs of antibiotic resistance genes. *Int. J. Antimicrob. Agents* 48, 163–167. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.04.028
- Tato, M., Coque, T. M., Baquero, F., and Cantón, R. (2010). Dispersal of carbapenemase *bla*VIM-1 gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons, and conjugative plasmids in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 320–327. doi: 10.1128/AAC.00783-09
- Volkman, H., Schwartz, T., Bischoff, P., Kirchen, S., and Obst, U. (2004). Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *J. Microbiol. Methods* 56, 277–286. doi: 10.1016/j.mimet.2003.10.014
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697–703. doi: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991
- Willner, D., Furlan, M., Haynes, M., Schmieder, R., Angly, F. E., Silva, J., et al. (2009). Metagenomic analysis of respiratory tract DNA viral communities in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis individuals. *PLoS One* 4:e7370. doi: 10.1371/journal.pone.0007370
- Yu, P., Mathieu, J., Li, M., Dai, Z., and Alvarez, P. J. J. (2016). Isolation of polyvalent bacteriophages by sequential multiple-host approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 808–815. doi: 10.1128/AEM.02382-15
- Zehr, E. S., Tabatabai, L. B., and Bayles, D. O. (2012). Genomic and proteomic characterization of SuMu, a Mu-like bacteriophage infecting *Haemophilus parasuis*. *BMC Genomics* 13:331. doi: 10.1186/1471-2164-13-331

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Brown-Jaque, Rodríguez Oyarzun, Cornejo-Sánchez, Martín-Gómez, Gartner, de Gracia, Rovira, Alvarez, Jofre, González-López and Muniesa. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

5. DISCUSIÓN GENERAL

Durante décadas, los fagos han representado un recurso esencial para el progreso de la biología molecular. Los estudios sobre ciertos fagos usados como modelos han dilucidado procesos biológicos como, por ejemplo, la identificación de la naturaleza del material genético (Hershey and Chase, 1952), el código de tripletes de nucleótidos de aminoácidos individuales (Crick et al., 1961) y los enzimas de restricción (Dussoix and Arber, 1962). Además, el primer genoma secuenciado fue el del fago ϕ X174 de *Escherichia coli* (Sanger et al., 1977). Durante algunos años, el interés por los fagos se limitó a estudios de fagotipado, sobre todo en el campo de las industrias lácteas, estudios ecológicos y propuestas para su uso como indicadores de contaminación fecal (IAWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology, 1991; Jacquet et al., 1993; Jofre et al., 2016; Zadoks et al., 2002). En general, el interés en los bacteriófagos ha sido menor en comparación con sus huéspedes bacterianos o virus animales.

Sin embargo, el notable número estimado de 10^{31} fagos en la Tierra (Hyman and Abedon, 2009; Suttle, 2005) es comúnmente utilizado por los investigadores para resaltar la importancia de los fagos, que se cree superan a cualquier otra clase de entidad biológica en el planeta y que codifican la mayoría de la diversidad genética mundial y la “materia oscura” biológica (Dutilh, 2014; Youle et al., 2012).

El reconocimiento de que los fagos son componentes abundantes y ubicuos de muchos entornos naturales (Lara et al., 2017; Roux et al., 2016), incluido el cuerpo humano (Abeles and Pride, 2014; Eckburg et al., 2005), ha despertado en las últimas décadas un considerable interés en su papel en los sistemas microbianos, tanto en la regulación de la densidad y la diversidad de las poblaciones bacterianas como en la transferencia genética horizontal (HGT) (Fortier and Sekulovic, 2013; Winter et al., 2004).

Los estudios sobre el tema no solo han proporcionado evidencias de que los bacteriófagos son componentes intrínsecos de microbiomas humanos tales como el intestino, la piel, la cavidad oral, los pulmones y el tracto urinario (Costello et al., 2009; Haynes and Rohwer, 2011; Miller-Ensminger et al., 2018; Willner et al., 2009). Además, han aportado nuevas perspectivas sobre su presencia en muchos genomas bacterianos (Fortier and Sekulovic, 2013; Reyes et al., 2010; Rohwer, 2003), la relación fago-bacteria y los mecanismos de defensa bacteriana contra la infección por fagos (Mojica et al., 1993, 2005), su papel en la HGT (Canchaya et al., 2003; Colomer-Lluch et al., 2014) y su influencia en la estructura y composición de los microbiomas humanos (Łusiak-szelachowska et al., 2017; Manrique et al., 2016; Zárata et al., 2017).

Sin embargo, a pesar de toda la información existente hasta el momento, el viroma del cuerpo humano contiene una cantidad asombrosa de diversidad genética sin caracterizar (Dutilh, 2014; Youle et al., 2012) y el alcance de las interacciones de los fagos, tanto con sus huéspedes bacterianos como con el ser humano, aún se desconocen en gran medida, debido quizás a la variabilidad intra e inter-individual que reportan los estudios dedicados a los microbiomas (Barr, 2017; Zárate et al., 2017). Por esta razón, la principal motivación de la presente tesis fue la necesidad de contribuir al estudio de la fracción fágica del viroma humano, específicamente las interacciones de los fagos con las bacterias causantes de patologías infecciosas presentes en muestras clínicas, que puedan interferir con el diagnóstico microbiológico, y la evaluación de su papel como reservorios y vehículos para la diseminación de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) clínicamente importantes, centrándonos en el bioma intestinal de individuos sanos y en el bioma respiratorio de pacientes con fibrosis quística (FQ).

Debido a su abundancia y ubicuidad, existe un riesgo latente de contaminación de cultivos de laboratorio de muestras clínicas con fagos, donde además pueden propagar y en consecuencia, interferir con el aislamiento y la identificación bacteriana (Abedon, 2012; Dunbar et al., 1997; Muniesa et al., 2005; Quirós et al., 2015). Algunos métodos de diagnóstico microbiológico se basan en la implementación de cultivos líquidos de enriquecimiento, que además incluyen sustancias selectivas con el fin de incrementar la sensibilidad analítica de las pruebas y favorecer el crecimiento del patógeno diana sobre muchos otros microorganismos que pueden estar presentes en las muestras.

Teniendo cuenta que los cultivos líquidos de enriquecimiento implican intrínsecamente un sesgo propiciado por el crecimiento bacteriano diferencial, tal como se reporta en las publicaciones citadas en el párrafo anterior, nos hemos planteado la hipótesis de que los fagos pueden ser un factor clave adicional en el sesgo de los resultados de los cultivos, interfiriendo con las pruebas de diagnóstico microbiológico. Con el fin de verificar esta hipótesis, evaluamos la presencia y la infectividad de fagos, y su interferencia en la recuperación de cepas bacterianas a partir muestras clínicas clásicamente estériles: sangre, orina, líquido ascítico, líquido cefalorraquídeo (LCR) y suero.

Hace algunos años, Górski *et al.* sugirieron que, de la misma manera que las bacterias pueden translocarse desde varias puertas de entrada en diferentes partes del cuerpo humano, un fenómeno similar de translocación puede ocurrir con los bacteriófagos

(Górski et al., 2006). El intestino es un enorme reservorio de fagos en humanos (Minot et al., 2013; Reyes et al., 2010), y existe evidencia de que los fagos utilizan varios mecanismos para acceder a otras partes del cuerpo desde allí (Barr, 2017). Sin embargo, el mecanismo primario que utilizan los virus bacterianos para eludir las capas de células epiteliales y acceder al cuerpo sigue siendo objeto de estudio.

Recientemente, Nguyen y sus colaboradores demostraron que la transcitosis rápida y direccional de los bacteriófagos a través de las capas celulares confluentes provee una explicación a la presencia de fagos en el cuerpo humano en ausencia de enfermedad y, además contribuye el establecimiento del fagoma dentro del organismo. A partir de los resultados obtenidos de dicho estudio, se estima que dentro del cuerpo humano adulto promedio, los fagos puede cruzar la barrera del epitelio intestinal a razón de 3.1×10^{10} partículas fágica por día (Nguyen et al., 2017). La translocación de fagos puede ser incluso mayor en los pacientes que padecen patologías gastrointestinales ya que, en muchas de estas enfermedades, la barrera intestinal es más permeable a los microorganismos (Górski et al., 2006).

De este modo, la translocación de bacteriófagos ofrecería una posible explicación de la detección de fagos en muestras de orina y líquido ascítico analizadas en este estudio. También es posible que los fagos transloquen solos, sin bacterias acompañantes, ya que se encontró que muchas de las muestras portaban fagos sin bacterias detectables.

Los fagos también pueden contaminar una muestra cuando esta se somete a cultivo, causando interferencia con el diagnóstico microbiológico. En nuestro estudio, se observaron fagos directamente mediante microscopía electrónica en muchas muestras, lo que indica una densidad de fago mínima de 10^8 partículas/ml de muestra. Estas densidades de fagos sumadas a la presencia de bacterias metabólicamente activas y a la vez, susceptibles a la infección por fagos en una muestra, podrían provocar la devastación de una población bacteriana durante el enriquecimiento en unas pocas horas (Muniesa and Jofre, 2004; Wiggins and Alexander, 1985), evitando así el aislamiento del patógeno que se pretende detectar. Este hecho podría explicar la situación observada en dos muestras de líquido ascítico en la que se observaron fagos por microscopía electrónica, se aisló *E. coli* a partir de placas de agar, pero se obtuvieron resultados negativos para bacterias de los cultivos líquidos.

Existen pocos estudios sobre la presencia de bacteriófagos en el sistema nervioso central, en comparación con los adelantados en otros biomas del cuerpo humano. La mayoría de estos estudios se enfocan en la utilización de fagos con fines terapéuticos

(Barrow et al., 1998; Frenkel and Solomon, 2002; Ksendzovsky et al., 2012; Messing, 2016; Solomon, 2008). Aunque los resultados reportados apuntan a la capacidad de los fagos de atravesar la barrera hematoencefálica y acumularse dentro del cerebro (Barrow et al., 1998; Dubos et al., 1943; Frenkel and Solomon, 2002; Keller and Engley, 1958), las densidades de fagos en el sistema nervioso central están muy por debajo de aquellas observadas en otras partes del cuerpo humano probablemente debido a la estructura de la barrera hematoencefálica, que impide el transporte paracelular y regula de forma selectiva la transcitosis pasiva y activa (Hersh et al., 2016; Pardridge, 2005).

Otro factor que puede influir en la difusión de bacteriófagos en el sistema nervioso central es la estructura propia de la partícula viral, ya que se ha observado que la estructura lineal de los fagos filamentosos facilita la penetración en el sistema nervioso, en comparación con su estructura esférica, conseguida después de un tratamiento de 2 minutos con cloroformo, que no exhibe la misma capacidad de penetración (Frenkel and Solomon, 2002). De hecho, los fagos filamentosos, como el fago M13, f1 y fd, acaparan la atención de estudios orientados al uso de este tipo de fagos como vectores en terapia contra enfermedades neurológicas, principalmente por las ventajas que ofrecen a nivel estructural (Frenkel and Solomon, 2002; Greenwood et al., 1991). Tanto la alta selectividad de la barrera hematoencefálica como la estructura compleja (cápside y cola) de la mayor parte de los bacteriófagos podrían explicar que no se detectaran fagos en las muestras de LCR incluidas en el presente estudio, que además se analizaron en menor número.

En cuanto a los resultados negativos para la presencia de fagos en muestras de sangre y suero, la matriz de elevado contenido proteico propia de estas muestras podría dificultar la purificación y visualización de los fagos a través de microscopía electrónica y, además, interferir con la infectividad de los fagos. Otra posible causa de estos resultados negativos podría radicar en densidades de fagos demasiado bajas como para ser detectadas por los métodos utilizados en este estudio. Cabe mencionar, no obstante que se ha reportado previamente la presencia de fagos en muestras de suero animal, aunque en raras ocasiones (Keller and Traub, 1974), por lo que no se descarta que en futuros estudios con mayor número de muestras y adaptando la metodología, se puedan llegar a detectar.

Los ensayos de infectividad de los fagos presentes en las muestras clínicas se llevaron a cabo sobre cepas de *E. coli* WG5 y *Shigella sonnei* 866, seleccionadas por su susceptibilidad a la infección por una amplia variedad de fagos (Muniesa et al.,

2004a). Sin embargo, de estas dos cepas huésped, *E. coli* WG5 fue más sensible a los fagos testados y por esa razón, los resultados de infectividad que proporcionamos en este estudio se obtuvieron con esta cepa. Somos conscientes de que otra de las posibles causas de los resultados negativos en LCR y, sobre todo en sangre y suero puede ser las características de las cepas huésped seleccionadas, que pueden restringir notablemente la cobertura de la detección de todos los fagos que pudieran estar presentes en las muestras. No se descarta que el uso de otros géneros bacterianos, e incluso otras cepas, pueda proporcionar resultados adicionales, como es el caso de los fagos de *Bacteroides*, detectados en muestras de suero animal (Keller and Traub, 1974).

La presencia de fagos en las muestras analizadas (confirmada por microscopía electrónica) no solo puede interferir, sino que podría incluso invalidar pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos. Es común la observación de calvas de lisis, compatibles con aquellas producidas por fagos, sobre el crecimiento bacteriano confluyente en placas de agar usado para la realización de los antibiogramas en laboratorio clínico. El número de calvas varía en número desde unas pocas calvas sobre la placa hasta la lisis casi total del cultivo (Keller and Traub, 1974). Este hecho, que coincide con nuestras observaciones, dificultaría enormemente la lectura e interpretación de los resultados de antibiogramas por difusión en agar, de mucha utilidad en clínica porque permiten testar múltiples antibióticos a la vez de manera sencilla, lo que conduciría a la invalidación de la prueba y, por consiguiente, el respectivo retraso en la administración de un tratamiento antibiótico adecuado para el paciente.

Existen varios ejemplos de resultados inconsistentes entre pruebas microbiológicas aplicadas con un mismo fin. Las discrepancias entre los números bacterianos detectados por siembra en medio sólido y los recuentos obtenidos por el método de número más probable (NMP) en cultivos de medio líquido, con resultados sorprendentemente más altos en placas de agar que los obtenidos por NMP (Kuai et al., 2001); y la detección y/o cuantificación de patógenos por PCR y qPCR que no se consiguen aislar por métodos de cultivo (Esparcia et al., 2011; Jordan and Durso, 2000; Martinez-Castillo et al., 2013; Soriano et al., 2011), son algunos de ellos.

Posibles explicaciones a estas discrepancias incluyen la terapia previa con antibióticos, la competencia con bacterias comensales en la muestra, la presencia del patógeno en un estado viable pero no cultivable, o simplemente que las bacterias diana están presentes en cantidades muy bajas. Por ese motivo, estos datos

incongruentes no siempre pueden atribuirse a los fagos, que no siempre están presentes en las muestras, tal como se hizo evidente en nuestro estudio o a pesar de estar presentes, pueden no ser capaces de propagar. Sin embargo, basándonos en los datos presentados en este estudio, la presencia de fagos es un nuevo factor que considerar en las interferencias con las herramientas de diagnóstico clínico.

Con el fin de reducir la presencia de fagos, donde se sospeche, y contribuir a una recuperación más eficiente de aislamientos bacterianos durante el diagnóstico microbiológico, sugerimos la implementación de métodos que contribuyan a la eliminación de partículas virales, tales como la filtración con filtros de alta adsorción proteica, que no implican un incremento excesivo del coste, ni de la complejidad del procesamiento de la muestra, pero que se traducirían en un aumento significativo de la eficiencia de las pruebas de diagnóstico microbiológico (Muniesa et al., 2005; Quirós et al., 2015).

Las evidencias de la presencia de fagos en el cuerpo humano también despiertan el interés en la influencia de estas partículas en la evolución de las poblaciones bacterianas de diferentes microbiomas, que puede ser determinante tanto para la enfermedad como para la salud humana. En el caso del microbioma intestinal, los fagos son un repositorio conocido de material genético, que alberga genes asociados con el metabolismo de carbohidratos y aminoácidos, genes de virulencia o genes asociados con la virulencia como ARGs, entre otros (Minot et al., 2011; Modi et al., 2013; Reyes et al., 2010).

Hasta ahora, ha sido poca la atención que ha recibido la transducción mediada por fagos o partículas derivadas de fagos, como mecanismo de difusión de ARGs, en comparación con la conjugación o la transformación (Alekhshun and Levy, 2007). Sin embargo, poco a poco los bacteriófagos emergen como elementos genéticos móviles (MGEs) potencialmente relevantes (Balcazar, 2014; Colomer-Lluch et al., 2011b; Fancello et al., 2011).

En nuestro grupo, se han llevado a cabo estudios basados en la detección de ARGs clínicamente relevantes en la fracción fágica de matrices ambientales y de origen humano. En una primera aproximación, se detectaron genes *bla*(OXA-2), *bla*(PSE-1) o *bla*(PSE-4) y *bla*(PSE)-tipo en el ADN de fagos, indicando la presencia de estas partículas portadoras de ARG en el medio ambiente (Muniesa et al., 2004b). Posteriormente y por técnicas de PCR cuantitativa, se pudo cuantificar 3 ARGs, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} grupo 1 y *mecA*, en la fracción de ADN fágico de muestras de agua residual y agua de río, en densidades lo suficientemente altas como para sugerir que los fagos

podrían constituir un reservorio de genes de resistencia en el ambiente. Además, teniendo en cuenta el origen y las características de las muestras, los resultados obtenidos podrían considerarse como un espejo de lo que podría estar sucediendo en biomas intestinales humanos y animales (Colomer-Lluch, 2014; Colomer-Lluch et al., 2011b).

Con el fin de ir un poco más allá en esta hipótesis, un estudio posterior incluyó la detección de 6 ARGs (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} grupo 1, *mecA*, *armA*, *qnrA* y *qnrS*) en la fracción de ADN fágico de muestras de heces de individuos sin ninguna enfermedad entérica. En este caso, se concluyó que los bacteriófagos libres que portan ARGs podrían contribuir a su movilización en entornos intra y extraintestinales (Quirós et al., 2014). Ese trabajo previo es extendido en la presente tesis con el análisis de un conjunto de ARGs que incluye los mencionados anteriormente, más 3 genes adicionales (*bla*_{CTX-M} grupo 9, *bla*_{OXA-48} y *sul1*) en la fracción fágica de una mayor colección de muestras fecales de 150 individuos sanos del área de Barcelona, sin contacto alguno con ambientes clínicos y que no habían recibido tratamiento antibiótico, ni habían viajado fuera del país en los tres meses previos al muestreo. Estos dos últimos criterios no habían sido controlados en el anterior estudio.

La detección de los ARGs en la fracción viral de las muestras se realizó mediante ensayos de PCR en tiempo real (qPCR) diseñados específicamente para cada uno de los genes. La qPCR es una técnica altamente sensible y específica que cuantifica de forma rápida el gen diana presente en el ADN extraído y purificado a partir de las partículas fágicas. La comparación de la señal obtenida en el ensayo con la curva estándar elaborada para cada gen permite da como resultado la cuantificación absoluta del número de copias (GC) del ARG diana. Considerando que cada partícula fágica lleva una sola copia del ARG correspondiente, cada copia de ARG corresponde a una partícula fágica portadora de ARG.

Teniendo en cuenta que unos de los pasos críticos en el estudio de la fracción viral es la correcta discriminación de los genomas virales de otros presentes en las muestras y la eliminación de ADN libre antes de la lisis de las cápsides para evitar contaminaciones (Thurber et al., 2009), el protocolo de extracción y purificación de ADN fágico empleado en estos estudios, y sobre todo los numerosos controles, estuvo orientado de la manera más precisa posible para garantizar únicamente se analizaban genes en ADN empaquetado dentro de las partículas fágicas y que ni ADN libre ni ADN bacteriano, interfiriera en los ensayos de qPCR y los análisis de metagenómica.

Por lo tanto, es importante enfatizar que nuestro protocolo incluyó un tratamiento con cloroformo para eliminar posibles vesículas que pudieran contener ADN (Ciofu et al., 2000; Kulp and Kuehn, 2010; Yaron et al., 2000) y un paso de tratamiento con ADNasa en altas concentraciones, tal como se realizó en otros estudios metagenómicos virales (Willner et al., 2009), para eliminar cualquier ADN fuera de las partículas fágicas.

Además, se realizaron controles para confirmar la actividad de la ADNasa y para verificar su completa inactivación, de modo que no pudiera influir en las amplificaciones posteriores. En todas las reacciones de qPCR, se incluyeron controles para confirmar la eliminación total de ADN no encapsidado (ver el anexo 4 para información más detallada sobre los controles de qPCR). Nuestros controles confirmaron la ausencia de ADN no empaquetado en la fracción de ADN fágico de las muestras analizadas.

Los resultados obtenidos de los ensayos de detección y cuantificación por qPCR revelaron que alrededor del 72% de las muestras de heces fueron positivas para al menos uno de los ARGs. Aunque en diferentes prevalencias y densidades, todos los ARGs incluidos en este estudio fueron detectados. El gen *bla*_{TEM} fue el más prevalente y abundante en la fracción de ADN fágico de las heces, en concordancia con los reportes existentes sobre la amplia distribución de este gen a nivel mundial (Robin et al., 2012). Por otro lado, *sul1*, a pesar de su alta prevalencia, fue uno de los genes menos abundantes.

Con el fin de verificar si existía alguna correlación entre la prevalencia de los ARGs y la edad de los sujetos que hicieron parte del estudio, que variaba entre 1,3 y 85 años, se analizó la distribución de los ARGs en diferentes grupos de edad. A pesar de que se observó una mayor prevalencia de genes como *sul1* y *bla*_{CTX-M-1} en el grupo de sujetos de más edad, la línea de tendencia no mostró ninguna correlación con los diferentes grupos de edad.

La prevalencia de ARGs en la fracción fágica concuerda con los datos obtenidos en el estudio que se había desarrollado previamente en el grupo (Quirós et al., 2014). En dicho estudio, tampoco se observaron correlaciones entre la edad y la prevalencia de ARGs en el ADN fágico (Quirós et al., 2014), y las densidades de GC de ARG fueron sólo un poco más elevadas en comparación con el presente estudio.

Otro objetivo de este estudio fue indagar acerca del origen de las partículas fágicas presentes en las muestras de heces, que podrían ser partículas libres en el intestino incorporadas por la ingestión de alimentos o agua, o partículas producidas por cepas

bacterianas presentes en la microbiota. Para evaluar la segunda posibilidad, se seleccionaron cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, aisladas de las mismas muestras fecales, sobre la base de que poseyeran algunos de los ARG en estudio. Estas cepas fueron tratadas con mitomicina C (mitC) para inducir partículas fágicas que pudieran portar esos ARGs.

Gracias al tratamiento con mitC, se obtuvieron partículas fágicas que portaban los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9}, *armA*, *qnrA*, *qnrS* y *sul1*, confirmando que las propias cepas bacterianas son productoras de fagos con ARG. El análisis de *mecA* no se incluyó en esta parte del estudio dado que su presencia no es característica de la familia *Enterobacteriaceae*. La ausencia de *bla*_{OXA-48} podría deberse al hecho de que este gen no debería ser prevalente en individuos sanos (Nüesch-Inderbinen et al., 2013). Al cuantificaron los ARGs detectados en el sobrenadante de los cultivos tratados y sin tratar con mitC, se encontró que los valores de ARGs fueron generalmente más altos en cultivos tratados con mitC, lo que podría atribuirse a la generación de partículas fágicas como consecuencia del tratamiento usado para inducir fagos. Hecho contrario ocurrió con *armA*, puesto que no se detectaron diferencias entre los cultivos inducidos y su correspondiente control.

En algunos casos, se detectaron partículas portadoras de ARGs en cultivos no inducidos quizás debido a la generación basal espontánea de partículas fágicas (Livny and Friedman, 2004), o partículas relacionadas con fagos, como los agentes de transferencia génica (GTA) (McDaniel et al., 2012). Algunos aislamientos mostraron mayores densidades de GC en el control en comparación con el cultivo inducido, aunque las diferencias no fueron significativas ($p > 0.05$). Estos resultados podrían ser ocasionados por una reducción en el número de células causada por la activación del ciclo lítico de otros profagos presentes en el cromosoma de la cepa, algo que ha sido reportado en *E. coli* y *Klebsiella spp.* (Bossi et al., 2003). Otra posibilidad es que el tratamiento con mitC reduzca la tasa de crecimiento del aislamiento en cuestión, disminuyendo de ese modo el número de partículas producidas por célula.

La observación de muestras fecales y el sobrenadante de algunos de los cultivos bacterianos tratados con mitC, por microscopía electrónica, reveló partículas fágicas con cola correspondientes a los tipos morfológicos *Myoviridae* y *Siphoviridae*. Estos dos grupos han sido reportados como los abundantes con capacidad de infectar *E. coli* y *B. fragilis*, en muestras de agua con contaminación fecal (Muniesa et al., 1999; Queralt et al., 2003) y muestras de heces (Chibani-Chennoufi et al., 2004). El análisis de viomas fecales también indica que los virus de ADN de doble cadena con cola del

orden *Caudovirales*, que incluyen *Siphoviridae*, *Myoviridae* y *Podoviridae*, son los tipos de fagos más abundantes en heces (Chehoud et al., 2016). Sin embargo, no todas las muestras permitieron la visualización de partículas fágicas, bien porque no presentaban cápsides integrales, o muy probablemente porque estaban presentes a concentraciones inferiores a las requeridas para la visualización en el microscopio electrónico (aproximadamente 10^8 partículas/ml).

El ADN extraído de las cápsides de los fagos visualizados por microscopía electrónica mostró densidades $> 10^7$ GC/ml para al menos uno de los ARGs. Incluso de algunos de los ARGs, se cuantificaron densidades de hasta 10^{10} GC/ml. Estos datos, sumados al hecho de que para la observación con microscopio electrónico se requiere una cantidad mínima de 10^7 partículas/ml, permite suponer que los fagos observados son los más abundantes en estas muestras y que al menos una fracción de estas partículas portaría uno de los ARGs en densidades de acuerdo con las de las partículas observadas por microscopía y en el mismo orden de magnitud de los ARGs cuantificados originalmente en los cultivos correspondientes.

Al parecer, las partículas obtenidas en esta parte del estudio residían como profagos en los aislamientos y como consecuencia del tratamiento con mitC, fueron inducidas. La presencia de ARGs en estas partículas abre dos posibilidades. La primera es que sean profagos con el ARG insertado en su genoma y que, a su vez, tendrían la capacidad de transducir el gen en frecuencias relativamente altas. Este no fue nuestro caso, dado que los intentos de transducción llevados a cabo no tuvieron éxito, al igual que intentos previos con partículas fágicas aisladas de muestras con contaminación fecal (Colomer-Lluch et al., 2011b). Adicionalmente, los posteriores estudios de secuenciación evidencian una falta de genes fágicos flanqueando los ARGs diana. Esta falta de genes fágicos flanqueando los ARG ya se observó en estudios previos (Colomer-Lluch et al., 2011b; Quirós et al., 2014).

La segunda posibilidad es que después de la inducción, los genes de profago presentes en los aislamientos bacterianos hayan promovido el empaquetamiento de ADN bacteriano (incluido el ARG) en una especie de transducción generalizada o partículas similares a GTAs. Estas partículas serían detectables por los métodos utilizados y mostrarían un aumento después de la inducción. Estas partículas no generarían calvas de lisis y no poseerían ADN fágico, lo que estaría más de acuerdo con nuestras observaciones. Estas partículas de fagos que contienen ARGs serían teóricamente capaces de unirse a nuevas células huésped e inyectar su ADN (Fineran et al., 2009). De hecho, un buen número de fagos supuestamente implicados en la

transferencia de ARGs parecen derivarse de transducción generalizada o mecanismos similares (Bearson and Brunelle, 2015; Beumer and Robinson, 2005; Willi et al., 1997).

En función de su genoma, estas partículas no pueden ser consideradas como fagos porque contienen solo ADN bacteriano y no fágico (Enault et al., 2017). Sin embargo, una vez se descarta la posibilidad de contaminación con ADN bacteriano (aunque no por completo) y se consideran los ARGs como aquellos genes que confieren resistencia real, la explicación más plausible para la presencia de ARGs en las partículas fágicas estudiadas es que el ADN bacteriano se moviliza a través de transducción generalizada o mecanismos relacionados (Enault et al., 2017).

De la mano de todas estas evidencias que sugieren que los bacteriófagos pueden desempeñar un rol crítico en la diseminación de resistencias en las poblaciones bacterianas dentro del microbioma intestinal, el siguiente paso de nuestro estudio consistía en la secuenciación del ADN fágico extraído de algunas de las muestras fecales empleando herramientas metagenómicas, con el fin de explorar en qué medida los fagos pueden contribuir a la resistencia a antibióticos por medio de la difusión de ARGs en las comunidades microbianas humanas.

El interés en los metagenomas incluye el estudio de microbiomas humanos, donde los fagos aparecen nuevamente como elementos extremadamente abundantes y diversos. Desde hace poco tiempo, la comunidad científica comienza a sospechar que los fagos contribuyen activamente a la homeostasis de la flora bacteriana (De Paepe et al., 2014). Teniendo en cuenta que los bacteriófagos constituyen una parte importante del microbioma intestinal (Dutilh et al., 2014; Navarro and Muniesa, 2017; Norman et al., 2015) y que contribuyen de forma activa a su estructura (Manrique et al., 2016), la perturbación ocasionada por los tratamientos con antibióticos también puede afectar a las poblaciones de fagos y promover sus tasas de propagación, dando lugar a un incremento en la transferencia génica mediada por fagos (Colomer-Lluch et al., 2014; Goerke et al., 2006). Por lo tanto, también quisimos evaluar el papel de los fagos en la alteración de los patrones de ARGs en un individuo que recibió tratamiento con antibióticos.

El análisis metagenómico de los fagomas fecales se llevó a cabo en 5 muestras seleccionadas de las 150 muestras fecales recolectadas inicialmente para la fase anterior del estudio. Aunque se procuró que estas muestras provinieran de individuos que no hubieran viajado al exterior en los tres meses previos al muestreo, resultó que los individuos correspondientes a dos de las muestras habían viajado dentro de ese tiempo a la República de Ecuador y Perú, respectivamente. Las muestras PRECIP y

POSTCIP fueron obtenidas a partir de un hombre de 66 años de edad antes de recibir tratamiento con antibióticos (PRECIP) y cuatro días después de haber iniciado un tratamiento con ciprofloxacina de una duración total de cinco días (POSTCIP) con fines profilácticos como preparación para un procedimiento quirúrgico.

Teniendo en cuenta que un análisis preciso del fagoma mediante herramientas de metagenómica depende en gran medida de los métodos empleados, se evitó la inclusión de pasos de concentración que podrían sesgar la detección de especies en las muestras (Hjelmsø et al., 2017), se realizó una doble extracción de ADN para obtener ADN con la pureza requerida y se incrementó la profundidad de la secuenciación con la plataforma Illumina de 1 a 3 Mb (Cotten et al., 2014) con el objetivo de minimizar la pérdida de secuencias pertenecientes a especies raras (Hjelmsø et al., 2017).

Además, tal como se ha mencionado anteriormente, los métodos de extracción de ADN viral fueron diseñados para eliminar ADN libre y bacteriano contaminante tanto como fuera posible, incluyendo un tratamiento con cloroformo para minimizar el impacto de vesículas de membrana externa y un fuerte tratamiento con ADNasa, que según se ha reportado, elimina eficazmente el ADN no encapsidado (Thurber et al., 2009; Willner et al., 2009).

Otro desafío importante que se debe asumir a la hora de analizar fagomas es el bajo número de secuencias disponibles en las bases de datos públicas en comparación con las entradas de secuencias bacterianas (Wagner et al., 2013), sin olvidar que una gran parte de estas secuencias virales corresponden a virus no caracterizados (materia viral oscura) (Thannesberger et al., 2017). Otros inconvenientes asociados a este tipo de análisis, es el sesgo existente hacia los virus humanos más comúnmente estudiados y el hecho de que cierta cantidad de profagos presentes en los genomas bacterianos se anotan erróneamente como bacterias y, en consecuencia, no se evidencian cuando se comparan con los subconjuntos de la base de datos viral. Como resultado de esta serie de dificultades, alrededor de un 80% de los *reads* de metagenomas virales no producen coincidencias significativas con las bases de datos de secuencias (Ng et al., 2012), o se identifican erróneamente como bacterias.

Todo lo anterior sumado a la conclusión de que no existe un software perfecto para la detección de secuencias de origen fágico y ARGs, constituyeron los puntos de partida para incluir en este estudio un análisis bioinformático basado en un grupo de diferentes softwares y bases de datos que permitiera identificar, clasificar y anotar el mayor número de secuencias de una manera confiable. Por esta razón, se utilizó

SPAdes, reportado como uno de los mejores ensambladores de genomas por encima de otras opciones (Vollmers et al., 2017); Prokka y ResFinder, el primero de los cuales predice secuencias codificantes, ARNs ribosómicos, ARNs de transferencia, péptidos señal y ARN no codificante, mientras que el segundo usa BLAST para identificar ARGs en los datos de genoma completo; y la combinación de herramientas como Kraken, PHASTER y VirSorter, que permitió la clasificación taxonómica de los contigs por medio de bases de datos estándar y de secuencias fágicas, y la predicción de secuencias virales que contribuye a la caracterización de nuevos virus.

El uso combinado de diferentes herramientas bioinformáticas proporciona un análisis de secuencias desde diferentes puntos de vista que al final rinde resultados que no siempre coinciden y tampoco son comparables, pero que en conjunto proporcionan información valiosa. Tal fue el caso del uso de VirSorter y Kraken con una finalidad similar. Los resultados obtenidos por VirSorter mostraron numerosos genes fágicos en algunos de los contigs de cada muestra respaldando aquellos obtenidos por Kraken y aportando nueva información.

Los resultados obtenidos mostraron una gran cantidad de secuencias bacterianas contenidas dentro de las cápsides fágicas, tal como se ha reportado en estudios previos de viomas (Hjelmsø et al., 2017). Como se ha mencionado anteriormente, el origen de estas partículas virales podría deberse a transducción generalizada o mecanismos similares (Enault et al., 2017; García-Aljaro et al., 2017). Para confirmar esta suposición, se analizaron por BLAST las secuencias flanqueantes de los ARGs detectados por ResFinder y ciertamente no se encontraron secuencias específicas de fagos. Por el contrario, dichas secuencias flanqueantes, identificadas como pertenecientes principalmente a *Bacteroides fragilis*, una de las especies más abundantes del intestino, correspondían a MGEs, tales como transposones o a secuencia de inserción, que podrían proporcionar plataformas para la movilización de los genes.

La composición de los fagomas detectados en las muestras fecales está en concordancia con otras descripciones en biomas humanos (Łusiak-szelachowska et al., 2017), que contienen al menos 1000 secuencias de fagos y profagos, la mayoría pertenecientes a los virus de ADN de doble cadena del orden *Caudovirales*. La presencia de otros virus fue mucho menor. No se encontraron diferencias relevantes entre los fagomas de las muestras, la mayoría de ellas obtenidas de hombres de mediana edad en la misma área geográfica, aunque el número de muestras analizado

fue bajo. La única muestra significativamente diferente correspondió a una mujer en edad fértil que había viajado a Ecuador.

El análisis bioinformático del viroma evidenció la presencia de ARGs en la mayoría de las muestras. Aunque la abundancia de ARGs estuvo alrededor de 10^3 GC/g de muestra, los resultados de qPCR no coincidieron con los del análisis metagenómico. Esta falta de correspondencia entre los ensayos de qPCR y los *reads* obtenidos de secuenciación ha sido reportada anteriormente (Hjelmsø et al., 2017). Otro factor determinante en la secuenciación del fagoma es la estimación del nivel de cobertura necesario para detectar genes específicos, que a su vez, depende de la concentración del gen dentro la fracción fágica (Sims et al., 2014).

Aunque se sabe que el fagoma alberga ARGs que pueden transferirse a otras bacterias (Muniesa et al., 2004b; Quirós et al., 2014), hay pocos estudios de metagenómica en fagomas humanos que muestren que los fagos contribuyen a la propagación de ARG en la comunidad bacteriana (Dutilh et al., 2014; Subirats et al., 2016).

Remarcablemente, las muestras PRECIP y POSTCIP mostraron diferencias significativas. La muestra PRECIP pertenece al 20% de muestras fecales negativas para ARGs en ADN fágico, mientras que la muestra POSTCIP mostró diferentes mecanismos de resistencia a diversos fármacos. Se puede especular que fue el tratamiento de fluoroquinolona recibido el que exacerbó la generación de partículas fágicas portadoras de ARG. Para obtener más información, nuevas muestras fecales del mismo individuo, tomadas y analizadas un año después, mostraron de nuevo ausencia de ARGs en el ADN fágico, lo que sugiere que la microbiota del individuo había sido restaurada y estabilizada a los valores PRECIP. Esta observación respalda la hipótesis de que los ARG en el fagoma POSTCIP fueron la consecuencia del tratamiento con antibióticos. En realidad existen descripciones de que algunos antibióticos pueden activar respuesta SOS, lo que exacerbaría la transferencia de su propia resistencia y de otras mediante la movilización de elementos genéticos, causando tasas crecientes de inducción y recombinación de fagos (Johnson et al., 2017).

Podríamos decir que, en individuos sanos e inmunocompetentes, este tipo de fenómenos no tendría mayor relevancia clínica. Sin embargo, cobra especial interés y enciende todas las alarmas cuando se traslada a individuos que padecen patologías crónicas como la fibrosis quística (FQ). Esta enfermedad, por su cuadro sintomático y esquemas terapéuticos basados en el uso continuado de antibióticos a lo largo de la

vida del paciente, crea un ambiente idóneo para la transferencia de ARGs mediada por MGEs y la consecuente selección de cepas multirresistentes.

La optimización de un protocolo que permitiera recuperar de una manera eficiente ADN fágico a partir de las muestras de esputo indicaron que éste parecía ser lo suficientemente eficiente para nuestros propósitos. Sin embargo, es importante resaltar que las muestras de esputo de pacientes con FQ son matrices muy densas que limitarían la internalización de los fagos usados como control en dichas matrices, en comparación con las partículas fágicas que ya están presentes en la muestra. Como consecuencia, la recuperación de los fagos existentes en las muestras podría ser menos eficiente que en las muestras enriquecidas con el fago 933W usado como control. En comparación con individuos sanos, la mayor densidad y viscosidad del esputo de los pacientes con FQ también podría haber dificultado la extracción del ADN encapsidado, provocando una subestimación de los resultados. También es posible que los microorganismos permanezcan más firmemente unidos al pulmón en pacientes con FQ debido a las dificultades en la expectoración.

Si tenemos en cuenta lo anterior al hablar de la cuantificación de ARGs, las densidades de los fagos en las muestras reales serían incluso más altas de lo que indican nuestros resultados. Además, los límites impuestos por nuestra curva de cuantificación de qPCR pueden subestimar la presencia de ARGs en algunas muestras, como revela la comparación entre los resultados obtenidos dentro del límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ).

A pesar de las limitaciones mencionadas anteriormente, se detectaron ARGs en partículas fágicas provenientes de estas muestras, como se observó previamente en otros biomas (Brown-Jaque et al., 2018; Colomer-Lluch et al., 2011b; Lekunberri et al., 2017; Lood et al., 2017; Muniesa et al., 2004b) y en análisis metagenómicos de pacientes con FQ (Bittar et al., 2008; Fancello et al., 2011).

El grupo más prevalente y abundante fue el correspondiente a los genes que confieren resistencia a β -lactámicos. Este resultado está de acuerdo con la diseminación generalizada de los genes *bla* en el medio ambiente, en bacterias (Mesa et al., 2006), fracciones fágicas (Colomer-Lluch et al., 2011a; Marti et al., 2014), biomas humanos (Fancello et al., 2011) y animales (Economou and Gousia, 2015; Mesa et al., 2006). En particular, un alto porcentaje de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de las muestras de pacientes con FQ mostró resistencia a los antibióticos β -lactámicos, de acuerdo con informes anteriores (Giwercman et al., 1992; López-Causapé et al., 2017). Por el contrario, el gen *mecA* estuvo casi ausente en la fracción

de ADN fágico de las muestras incluidas en este estudio, a pesar de que el 35% de los aislamientos fueron MRSA, de acuerdo con otros estudios (Muhlebach, 2017).

La aparente falta de coherencia entre la detección de ARGs en el ADN fágico y las especies bacterianas aisladas podría ser causada por la permanencia de partículas fágicas portadoras de ARGs, codificados originalmente en una célula bacteriana, en un bioma donde las bacterias ya no están presentes o se movilizan a un área diferente. Otra posible explicación podría ser la interferencia de fagos presentes en el bioma con el aislamiento de bacterias a partir de las muestras. Esta interferencia podría deberse a la infección del fago, la propagación y la posterior lisis de las bacterias seleccionadas para el aislamiento durante el proceso de enriquecimiento, como se ha comentado en el primer estudio de esta tesis. Por otro lado, solo se puede detectar un fragmento de ARG mediante amplificación por qPCR, por lo que la partícula fágica puede no transportar el gen completo (Martínez et al., 2015) o funcional y, por lo tanto, no conferir resistencia. Sin embargo, en estudios previos, al menos una fracción de los ARGs detectados en el ADN fágico estaban completos y eran capaces de conferir resistencia (Colomer-Lluch et al., 2011b).

El análisis de las muestras provenientes del grupo de individuos que no estaban afectados por FQ también reveló la presencia de ARGs, lo que confirma una variabilidad individual del microbioma (Hauser et al., 2014). En un estudio previo, se detectaron fagos en los metagenomas de esputo de pacientes que padecen fibrosis quística y se observó que tanto la diversidad de los fagos presentes como las abundancias relativas eran diferentes de las de los pacientes que no padecían esta enfermedad (Willner et al., 2009). Sin embargo, al igual que en el caso de las diferencias entre los viomas de pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales e individuos sanos, es difícil concluir cuál es la causa de estas diferencias.

Por otro lado, la población sana ha estado sometida durante décadas a la presión de los antibióticos y ha incorporado ARGs en sus microbiomas, incluso en ausencia de un tratamiento antibiótico reciente (Penders et al., 2013; Quirós et al., 2014; Sommer et al., 2010), como se ha hecho evidente en el segundo y tercer estudio de la presente tesis.

Hasta donde tenemos conocimiento, las partículas fágicas observadas después de la propagación en *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* son las primeras visualizadas en muestras de esputo. Los altos niveles de ARGs en las partículas fágicas infecciosas purificadas confirmaron que al menos algunas de ellas albergaban ARGs. Del mismo modo que explicamos en el bioma intestinal, teniendo en cuenta que la concentración

requerida para la detección de fagos mediante microscopía electrónica es de un mínimo de 10^8 partículas/ml, se puede estimar que una fracción de $1/10^3$ - $1/10^5$ de las partículas observadas en Pa y Kp contenían un ARG, frecuencia que coincide con estimaciones realizadas en estudio previos (McDaniel et al., 2010). La capacidad de algunos bacteriófagos para infectar diferentes bacterias, cepas o incluso géneros bacterianos facilitaría aún más la movilización de ARGs en biomas que contienen múltiples microorganismos, como los pulmones.

Uno de los patógenos que cobra mayor importancia en FQ es *Pseudomonas spp.* (Elborn, 2016). En este estudio, se ha encontrado una prevalencia notablemente alta de *bla_{VIM}* en ADN encapsidado, un ARG relacionado con la infección por este patógeno (Tato et al., 2010). Las células de *Pseudomonas* portan un alto número de profagos y la transducción generalizada ha sido ampliamente reportada en este género (Fothergill et al., 2011; Monson et al., 2011). Además, los fagos de *Pseudomonas* parecen ser polivalentes e incluso pueden infectar otros géneros bacterianos (por ejemplo, *E. coli*) (Yu et al., 2016).

En general, diversos mecanismos de HGT están estrechamente relacionados con otros patógenos comúnmente aislados de pacientes con FQ, como es el caso de la movilización de islas de patogenicidad (que codifican factores de virulencia) a través de fagos auxiliares en *Staphylococcus aureus* (Novick et al., 2010), la transferencia mediada por GTAs reportada en el género *Burkholderia* (Ronning et al., 2010) y la transferencia mediada por fagos o partículas similares en *Haemophilus spp.* (Zehr et al., 2012) o *Mycobacterium spp.* (Dedrick et al., 2017).

La mayoría de las bacterias involucradas en la FQ (por ejemplo, *Pseudomonas*) coexisten dentro de un biofilm que generan en los pulmones de quienes la padecen, característica que dificulta en gran medida los tratamientos con antibióticos. Además, un biofilm podría ser un ambiente propicio para promover la transferencia de genes mediada por fagos (Solheim et al., 2013). Las tasas de transducción dependen en gran medida de la densidad de las células bacterianas y las partículas fágicas, y pueden aumentar por factores como la inmovilización de las bacterias donantes y las receptoras en la matriz del biofilm, la alta concentración de microorganismos en este hábitat y la inducción de fagos por antibióticos, que aumenta el número de partículas fágicas (Fothergill et al., 2011). Esto podría representar otra dificultad para el tratamiento de pacientes con FQ, adicional a la barrera de difusión de antibióticos que ya de por sí plantea el biofilm.

Dada su abundancia, ubicuidad y persistencia sería cuestionable que los bacteriófagos no tuvieran influencia alguna sobre el ser humano. Los resultados derivados de esta tesis sugieren que los fagos pueden interferir con herramientas de diagnóstico microbiológico hasta el punto de dificultar el aislamiento de patógenos, su identificación y sus perfiles de susceptibilidad a antibióticos. Esto tendría un gran significado para el paciente sobre todo en casos en los que un diagnóstico y un tratamiento oportuno puede ser la diferencia entre la vida y la muerte.

Analizando la influencia de los fagos en biomas humanos desde otra perspectiva, los resultados presentados ponen en evidencia que los bacteriófagos podrían ser vehículos adecuados para la movilización y diseminación de ARGs. Los ARGs incluidos en estos estudios fueron detectados en altas densidades en individuos sanos, en los que en condiciones fisiológicas no podría ocasionar un problema aparente. Sin embargo, estos genes de resistencia pueden transmitirse a bacterias ambientales, que a su vez, pueden volver a transmitirlos a patógenos y bacterias comensales propias de biomas humanos y animales, ampliando el repertorio de resistencias de estos microorganismos (Muniesa et al., 2013a). Cuando sumamos la presencia de un antibiótico a esta ecuación, estos ARGs, que pueden estar localizados en el cromosoma bacteriano o en plataformas genéticas móviles, son seleccionados y movilizados por diversos mecanismos (Colomer-Lluch, 2014).

La otra cara de la problemática está cuando consideramos el papel de los fagos como vehículos de diseminación de ARGs en enfermedades como la FQ. Los resultados aquí presentados sugieren que los bacteriófagos son actores importantes que contribuyen en buena parte a la aparición y la diseminación de resistencias a antibióticos que representa un peor pronóstico para el paciente y una importante reducción en su supervivencia y su calidad de vida.

Nuestra intención con esta tesis es que la presencia y la influencia de los bacteriófagos vaya más allá de ser conocida y reconocida, y pase a ser considerada como relevante en biomas humanos. La extensión de la influencia de la numerosa población fágica en los biomas humanos no puede estimarse aún, pero su presencia y permanencia sugiere que juegan un papel en las microbiotas humanas y que siguen presentes porque se han seleccionado favorablemente por beneficio de las bacterias, del huésped humano o de ambos.

Por último, con los resultados aquí presentados pretendemos hacer una contribución al estudio de la fracción fágica del viroma humano y proporcionar un punto de partida

que despierte la curiosidad de la comunidad científica en el todavía vasto e inexorable mundo de los fagos y sus interacciones con los seres vivos.

6. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones derivadas de los resultados obtenidos en esta tesis son las siguientes:

- Se detectaron fagos infecciosos con cola en muestras de líquido ascítico y orina. Se ha demostrado que la presencia de fagos dificulta el aislamiento bacteriano en algunas de estas muestras, ya sea impidiendo el crecimiento bacteriano confluyente requerido para un ensayo de antibiograma, reduciendo el crecimiento bacteriano en el enriquecimiento líquido o eliminando las bacterias presentes en una muestra, interfiriendo con el diagnóstico. La presencia de fagos en muestras humanas, la mayoría de las veces no considerada, puede influir y sesgar los resultados microbiológicos y moleculares, sugiriendo que se debe prestar más atención a su interferencia.
- Se sugiere explorar métodos de eliminación de virus para reducir significativamente o eliminar fagos en muestras donde se sospecha su presencia, y así contribuir a la recuperación eficiente de aislamientos bacterianos que encamine hacia un diagnóstico microbiológico correcto.
- El 72% de las muestras fecales de individuos sanos contenían al menos 1 ARG en la fracción de ADN fágico. Este resultado revela la abundancia de partículas fágicas portadoras de ARGs en el bioma intestinal.
- *bla*_{TEM} fue el ARG más prevalente y abundante en la fracción de ADN fágico de las muestras de heces, seguido por *qnrA*, *sul1*, *bla*_{CTX-M-9} y *armA*. Se detectó *qnrS*, *mecA*, *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{OXA-48} en menos del 10% de las muestras.
- Muchas de las partículas fágicas portadoras de ARGs en heces parecen derivar de bacterias presentes en el microbioma. *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1} y *sul1* fueron los ARGs más prevalentes en partículas fágicas inducidas a partir de los aislamientos fecales.
- Mediante microscopía electrónica de transmisión se observaron fagos inducidos de los aislamientos bacterianos. Estas partículas fágicas purificadas contenían altas densidades de ARGs, hecho que apoya la hipótesis de que una fracción importante de estas partículas son portadoras de ARGs.
- Los resultados de un análisis metagenómico están fuertemente influenciados por los estudios bioinformáticos posteriores, que arrojan resultados diferentes y esto debe tenerse en cuenta al elaborar conclusiones.

- La técnica de qPCR es más sensible que el análisis metagenómico para detectar secuencias que se encuentran en menor proporción. Se ha de considerar la profundidad del análisis metagenómico.
- El análisis metagenómico del viroma de las heces confirmó que los fagos, y en concreto fagos del orden *Caudovirales*, son los virus más abundantes del viroma.
- El viroma mostró la presencia de fagos o partículas derivadas de fagos que contenían ADN bacteriano, incluyendo ARGs.
- Aunque los mecanismos de empaquetamiento de ADN bacteriano por parte de estas partículas fágicas son desconocidos, los resultados derivados de este estudio consolidan la descripción hecha en estudios previos, indicando que los fagos son elementos genéticos móviles que contribuyen a la diseminación de resistencias en la microbiota intestinal.
- Los tratamientos con ciertos antibióticos pueden promover la selección de ARGs, su movilización mediante elementos genéticos móviles e incrementar su abundancia y diversidad en el microbioma intestinal de individuos sanos.
- Las partículas fágicas portadoras de ARGs fueron abundantes en los pulmones, tanto de los pacientes con fibrosis quística como de los individuos que no padecían la enfermedad. Entre los ARGs analizados en las muestras de esputo, las β -lactamasas fueron las más abundantes, particularmente el gen *bla_{VIM}*. No hubo correspondencia entre la detección de los ARGs en el ADN fágico y las resistencias detectadas en los microorganismos aislados de cada muestra, sugiriendo que ambas poblaciones pueden encontrarse independientemente. Además, se ha de considerar que ambas poblaciones presentan diferente persistencia y han sido detectadas usando diferentes métodos.
- A pesar de que el protocolo empleado en este estudio se mostró eficiente, la matriz densa y altamente viscosa de los esputos de los pacientes con fibrosis quística podría dificultar la extracción del ADN fágico y, por consiguiente, podría causar una subestimación de los resultados.
- De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, las partículas fágicas deberían ser consideradas como vehículos para la movilización y diseminación de resistencias a antibióticos en fibrosis quística. Estas partículas podrían

contribuir a la generación de cepas multirresistentes que colonizarían los pulmones de los pacientes con dicha patología, dificultando seriamente su tratamiento.

- Futuros estudios podrían dilucidar el impacto de los fagos en la regulación de la microbiota humana y en la generación de bacterias multirresistentes en diversas enfermedades infecciosas, considerada como un problema de salud mundial de primera magnitud.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abedon, S. T. (2012). *Bacteriophages in health and disease*, eds. P. Hyman and S. T. Abedon Wallingford: CABI doi:10.1079/9781845939847.0000.
- Abeles, S. R., and Pride, D. T. (2014). Molecular Bases and Role of Viruses in the Human Microbiome. *J. Mol. Biol.* 426, 3892–3906. doi:10.1016/j.jmb.2014.07.002.
- Abraham, E. P., and Chain, E. (1988). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev. Infect. Dis.* 10, 677–678. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3055168> [Accessed April 30, 2018].
- Ackermann, H.-W. (2009). 'Phage Classification and Characterization', in *Bacteriophages Methods and Protocols*, eds. M. R. J. Clokie and A. M. Kropinski (New York, USA: Humana Press), 127–140. doi:10.1007/978-1-60327-164-6.
- Adams, M. H. (1959). *Bacteriophages*. New York: New York, Interscience Publishers Available at: <https://archive.org/details/bacteriophages00adam> [Accessed January 7, 2018].
- Aertsen, A., and Michiels, C. W. (2005). Mrr instigates the SOS response after high pressure stress in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 58, 1381–1391. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04903.x.
- Aldred, K. J., Kerns, R. J., and Osheroff, N. (2014). Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry* 53, 1565–1574. doi:10.1021/bi5000564.
- Alekshun, M. N., and Levy, S. B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* 128, 1037–1050. doi:10.1016/j.cell.2007.03.004.
- Allen, J. L., Panitch, H. B., and Rubenstein, R. C. (2010). *Cystic fibrosis. Lung Biology in Health and Disease*. Volume 242. United Kingdom: Informa Healthcare.
- Allué-Guardia, A., García-Aljaro, C., and Muniesa, M. (2011). Bacteriophage-Encoding Cytolethal Distending Toxin Type V Gene Induced from Nonclinical *Escherichia coli* Isolates. *Infect. Immun.* 79, 3262–3272. doi:10.1128/IAI.05071-11.
- Andes, D., and Craig, W. A. (2005). Treatment of infections with ESBL-producing organisms: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 10–17. doi:10.1111/j.1469-0691.2005.01265.x.
- Arndt, D., Grant, J. R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., et al. (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 44, W16–W21. doi:10.1093/nar/gkw387.
- Ashelford, K. E., Day, M. J., and Fry, J. C. (2003). Elevated Abundance of Bacteriophage Infecting Bacteria in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 285–289. doi:10.1128/AEM.69.1.285–289.2003.
- Babraham Bioinformatics FastQC (2018). FastQC. Available at: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> [Accessed May 6, 2018].
- Balcazar, J. L. (2014). Bacteriophages as Vehicles for Antibiotic Resistance Genes in the Environment. *PLoS Pathog.* 10, e1004219. doi:10.1371/journal.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., et al. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455–477. doi:10.1089/cmb.2012.0021.
- Barr, J. J. (2017). A bacteriophages journey through the human body. *Immunol. Rev.* 279, 106–122. doi:10.1111/imr.12565.
- Barr, J. J., Auro, R., Sam-Soon, N., Kassegne, S., Peters, G., Bonilla, N., et al. (2015). Subdiffusive motion of bacteriophage in mucosal surfaces increases the frequency of bacterial encounters. *PNAS* 112, 13675–13680. doi:10.1073/pnas.1508355112.
- Barr, J. J., Youle, M., and Rohwer, F. (2013). Innate and acquired bacteriophage-mediated immunity. *Bacteriophage* 3, e25857. doi:10.4161/bact.25857.

- Barrow, P., Lovell, M., and Berchieri, A. (1998). Use of Lytic Bacteriophage for Control of Experimental *Escherichia coli* Septicemia and Meningitis in Chickens and Calves. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 294–298. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC104512/pdf/cd000294.pdf> [Accessed April 29, 2018].
- Bauernfeind, A., Casellas, J. M., Goldberg, M., Holley, M., Jungwirth, R., Mangold, P., et al. (1992). A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection* 20, 158–163. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1644493> [Accessed April 30, 2018].
- Bauernfeind, A., Grimm, H., and Schweighart, S. (1990). A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* 18, 294–298. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2276823> [Accessed April 30, 2018].
- Bearson, B. L., and Brunelle, B. W. (2015). Fluoroquinolone induction of phage-mediated gene transfer in multidrug-resistant *Salmonella*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 46, 201–204. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.04.008.
- Begg, E. J., and Barclay, M. L. (1995). Aminoglycosides-50 years on. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 39, 597–603. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1365070/pdf/brjclinpharm00008-0014.pdf> [Accessed May 1, 2018].
- Bennett, P. M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br. J. Pharmacol.* 153, S347–S357. doi:10.1038/sj.bjp.0707607.
- Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., et al. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456, 53–59. doi:10.1038/nature07517.
- Beumer, A., and Robinson, J. B. (2005). A Broad-Host-Range, Generalized Transducing Phage (SN-T) Acquires 16S rRNA Genes from Different Genera of Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8301–8304. doi:10.1128/AEM.71.12.8301–8304.2005.
- Bisacchi, G. S. (2015). Origins of the Quinolone Class of Antibacterials: An Expanded 'Discovery Story'. *J. Med. Chem.* 58, 4874–4882. doi:10.1021/jm501881c.
- Bittar, F., Richet, H., Dubus, J.-C., Reynaud-Gaubert, M., Stremmer, N., Sarles, J., et al. (2008). Molecular Detection of Multiple Emerging Pathogens in Sputa from Cystic Fibrosis Patients. *PLoS One* 3, e2908. doi:10.1371/journal.pone.0002908.
- Borges-Walmsley, M. I., Mckeegan, K. S., and Walmsley, A. R. (2003). Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochem. J.* 376, 313–338. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1223791/pdf/13678421.pdf> [Accessed April 30, 2018].
- Bossi, L., Fuentes, J. A., Mora, G., and Figueroa-Bossi, N. (2003). Prophage Contribution to Bacterial Population Dynamics. *J. Bacteriol.* 185, 6467–6471. doi:10.1128/JB.185.21.6467–6471.2003.
- Boyd, E. F., Almagro-Moreno, S., and Parent, M. A. (2009). Genomic islands are dynamic, ancient integrative elements in bacterial evolution. *Trends Microbiol.* 17, 47–53. doi:10.1016/j.tim.2008.11.003.
- Bradford, P. A. (2001). Extended-Spectrum B-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 933–951.
- Bragg, L., and Tyson, G. W. (2014). 'Metagenomics Using Next-Generation Sequencing', in *Environmental Microbiology Methods and Protocols*, eds. I. T. Paulsen and A. J. Holmes (Totowa, NJ: Humana Press, Totowa, NJ), 183–201. doi:10.1007/978-1-62703-712-9_15.
- Breitbart, M., Felts, B., Kelley, S., Mahaffy, J. M., Nulton, J., Salamon, P., et al. (2004). Diversity and population structure of a near-shore marine-sediment viral community. *Proc. R. Soc. London. Ser. B*

- 271, 565–574. doi:10.1098/rspb.2003.2628.
- Breitbart, M., Haynes, M., Kelley, S., Angly, F., Edwards, R. A., Felts, B., et al. (2008). Viral diversity and dynamics in an infant gut. *Res. Microbiol.* 159, 367–373. doi:10.1016/j.resmic.2008.04.006.
- Breitbart, M., Hewson, I., Felts, B., Mahaffy, J. M., Nulton, J., Salamon, P., et al. (2003). Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *J. Bacteriol.* 185, 6220–3. doi:10.1128/JB.185.20.6220-6223.2003.
- Breitbart, M., and Rohwer, F. (2005). Method for discovering novel DNA viruses in blood using viral particle selection and shotgun sequencing. *Biotechniques* 39, 729–736. doi:10.2144/000112019.
- Breitbart, M., Salamon, P., Andresen, B., Mahaffy, J. M., Segall, A. M., Mead, D., et al. (2002). Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *PNAS* 99, 14250–14255. Available at: <http://www.pnas.org/content/pnas/99/22/14250.full.pdf> [Accessed May 5, 2018].
- Briani, F., Dehò, G., Forti, F., and Ghisotti, D. (2001). The Plasmid Status of Satellite Bacteriophage P4. *Plasmid* 45, 1–17. doi:10.1006/plas.2000.1497.
- Brown-Jaque, M., Calero-Cáceres, W., Espinal, P., Rodríguez-Navarro, J., Miró, E., González-López, J. J., et al. (2018). Antibiotic resistance genes in phage particles isolated from human feces and induced from clinical bacterial isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents* 51, 434–442. doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.11.014.
- Brown-Jaque, M., Calero-Cáceres, W., and Muniesa, M. (2015). Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements. *Plasmid* 79, 1–7. doi:10.1016/j.plasmid.2015.01.001.
- Brown-Jaque, M., Muniesa, M., and Navarro, F. (2016). Bacteriophages in clinical samples can interfere with microbiological diagnostic tools. *Sci. Rep.* 6:33000. doi:10.1038/srep33000.
- Burrus, V., and Waldor, M. K. (2004). Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res. Microbiol.* 155, 376–386. doi:10.1016/j.resmic.2004.01.012.
- Bush, K. (2013). Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1277, 84–90. doi:10.1111/nyas.12023.
- Bush, K., Jacoby, G. A., and Medeiros, A. A. (1995). A Functional Classification Scheme for B-Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1211–1233. Available at: <http://aac.asm.org/content/39/6/1211.full.pdf> [Accessed April 30, 2018].
- Bushman, F. (2002). *Lateral DNA Transfer: Mechanisms and Consequences*. 1st ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Calci, K. R., Burkhardt, W., Watkins, W. D., and Rippey, S. R. (1998). Occurrence of male-specific bacteriophage in feral and domestic animal wastes, human feces, and human-associated wastewaters. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 5027–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9835602> [Accessed January 7, 2018].
- Cambau, E., Lascols, C., Sougakoff, W., Bébéar, C., Bonnet, R., Cavallo, J.-D., et al. (2006). Occurrence of qnrA-positive clinical isolates in French teaching hospitals during 2002–2005. *Clin. Microbiol. Infect.* 12, 1013–1020. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01529.x.
- Cambray, G., Guerout, A.-M., and Mazel, D. (2010). Integrons. *Annu. Rev. Genet.* 44, 141–166. doi:10.1146/annurev-genet-102209-163504.
- Campbell, A. (2003). Opinion: The future of bacteriophage biology. *Nat. Rev. Genet.* 4, 471–477. doi:10.1038/nrg1089.
- Campbell, A. M. (1963). Episomes. *Adv. Genet.* 11, 101–145. doi:10.1016/S0065-2660(08)60286-2.
- Campbell, N. A., and Reece, J. B. (2011). *Biology*. 9th editio. Boston: Benjamin Cummings / Pearson.
- Canchaya, C., Fournous, G., Chibani-Chennoufi, S., Dillmann, M.-L., and Brü, H. (2003). Phage as agents of lateral gene transfer. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 417–424. doi:10.1016/S1369-5274(03)00086-9.

- Cantalupo, P. G., Calgua, B., Zhao, G., Hundesa, A., Wier, A. D., Katz, J. P., et al. (2011). Raw Sewage Harbors Diverse Viral Populations. *MBio* 2, e00180-11. doi:10.1128/mBio.00180-11.
- Cantón, R., and Coque, T. M. (2006). The CTX-M B-lactamase pandemic. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 466–475. doi:10.1016/j.mib.2006.08.011.
- Cantón, R., González-Alba, J. M., and Galán, J. C. (2012). CTX-M enzymes: Origin and diffusion. *Front. Microbiol.* 3, 110. doi:10.3389/fmicb.2012.00110.
- Carrara, L., Navarro, F., Turbau, M., Seres, M., Morá, I., Quintana, I., et al. (2013). Molecular diagnosis of bloodstream infections with a new dual-priming oligonucleotide-based multiplex PCR assay. *J. Med. Microbiol.* 62, 1673–9. doi:10.1099/jmm.0.064758-0.
- Castellani, C., and Assael, B. M. (2017). Cystic fibrosis: a clinical view. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 129–140. doi:10.1007/s00018-016-2393-9.
- CDC (2018). About Antimicrobial Resistance. Available at: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html> [Accessed July 8, 2018].
- Genens, W., Makumi, A., Mebrhatu, M. T., Lavigne, R., and Aertsen, A. (2013). Phage–host interactions during pseudolysogeny. *Bacteriophage* 3, e25029. doi:10.4161/bact.25029.
- Chambers, H. F., and DeLeo, F. R. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 629–641. doi:10.1038/nrmicro2200.
- Chancey, S. T., Zähler, D., and Stephens, D. S. (2012). Acquired inducible antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria. *Future Microbiol.* 7, 959–978. doi:10.2217/fmb.12.63.
- Chang, S., Sievert, D. M., Hageman, J. C., Boulton, M. S. L., Tenover, F. C., Downes, F. P., et al. (2003). Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the vanA Resistance Gene. *N. Engl. J. Med.* 348, 1342–1347. Available at: <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa025025> [Accessed April 30, 2018].
- Chehoud, C., Dryga, A., Hwang, Y., Nagy-Szakal, D., Hollister, E. B., Luna, R. A., et al. (2016). Transfer of Viral Communities between Human Individuals during Fecal Microbiota Transplantation. *MBio* 7, e00322-16. doi:10.1128/mBio.00322-16.
- Chibani-Chennoufi, S., Sidoti, J., Bruttin, A., Dillmann, M.-L., Kutter, E., Qadri, F., et al. (2004). Isolation of *Escherichia coli* Bacteriophages from the Stool of Pediatric Diarrhea Patients in Bangladesh. *J. Bacteriol.* 186, 8287–8294. doi:10.1128/JB.186.24.8287–8294.2004.
- Ciofu, O., Beveridge, T. J., Kadurugamuwa, J., Walther-Rasmussen, J., and Høiby, N. (2000). Chromosomal beta-lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 45, 9–13. doi:10.1093/jac/45.1.9.
- Clokic, M. R. J., Millard, A. D., Letarov, A. V., and Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage* 1, 31–45. doi:10.4161/bact.1.1.14942.
- Colombo, S., Arioli, S., Guglielmetti, S., Lunelli, F., and Mora, D. (2016). Virome-associated antibiotic-resistance genes in an experimental aquaculture facility. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92. doi:10.1093/femsec/fiw003.
- Colomer-Lluch, M. (2014). Antibiotic resistance genes in the viral DNA fraction of environmental samples. doi:10.1371/journal.pone.0017549.
- Colomer-Lluch, M., Imamovic, L., Jofre, J., and Muniesa, M. (2011a). Bacteriophages Carrying Antibiotic Resistance Genes in Fecal Waste from Cattle, Pigs, and Poultry. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4908–4911. doi:10.1128/AAC.00535-11.
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., and Muniesa, M. (2011b). Antibiotic Resistance Genes in the Bacteriophage DNA Fraction of Environmental Samples. *PLoS One* 6, e17549. doi:10.1371/journal.pone.0017549.
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., and Muniesa, M. (2014). Quinolone resistance genes (qnrA and qnrS) in

- bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 1265–1274. doi:10.1093/jac/dkt528.
- Coque, T. M., Baquero, F., and Cantón, R. (2008a). Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Eurosurveillance* 13, pii: 19044. Available at: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19044>.
- Coque, T. M., Novais, Â., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., et al. (2008b). Dissemination of Clonally Related Escherichia coli Strains Expressing Extended-Spectrum β -Lactamase CTX-M-15. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 195–200. doi:doi: 10.3201/eid1402.070350.
- Costello, E. K., Lauber, C. L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J. I., and Knight, R. (2009). Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. *Science* 326, 1694–1697. doi:10.1126/science.1180060.
- Cotten, M., Munnink, B. O., Canuti, M., Deijs, M., Watson, S. J., Kellam, P., et al. (2014). Full Genome Virus Detection in Fecal Samples Using Sensitive Nucleic Acid Preparation, Deep Sequencing, and a Novel Iterative Sequence Classification Algorithm. *PLoS One* 9, e93269. doi:10.1371/journal.pone.0093269.
- Courvalin, P. (2008). Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. *J. Intern. Med.* 264, 4–16. doi:10.1111/j.1365-2796.2008.01940.x.
- Cox, G., and Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 287–292. doi:10.1016/j.ijmm.2013.02.009.
- Crick, F. H. C., Barnett, L., Brenner, S., and Watts-Tobin, R. J. (1961). General Nature of the Genetic Code for Proteins. *Nature* 192, 1227–1232. doi:10.1038/1921227a0.
- D'Costa, V. M., McGrann, K. M., Hughes, D. W., and Wright, G. D. (2006). Sampling the Antibiotic Resistome. *Science (80-.)*. 311, 374–377. doi:10.1126/science.1122843.
- D'Hérelle, F. (1917). On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli. *Comptes Rendus Acad. des Sci.* 1651, 373–5. doi:10.4161/bact.1.1.14941doi.org/10.4161/bact.1.1.14941.
- Dallenne, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C., and Arlet, G. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important B-lactamases in Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 490–495. doi:10.1093/jac/dkp498.
- Dalmasso, M., Hill, C., and Ross, R. P. (2014). Exploiting gut bacteriophages for human health. *Trends Microbiol.* 22, 399–405. doi:10.1016/j.tim.2014.02.010.
- Danovaro, R., Manini, E., and Dell 'Anno, A. (2002). Higher Abundance of Bacteria than of Viruses in Deep Mediterranean Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1468–1472. doi:10.1128/AEM.68.3.1468–1472.2002.
- Dantas, G., Sommer, M. O. A., Oluwasegun, R. D., and Church, G. M. (2008). Bacteria Subsisting on Antibiotics. *Science* 320, 100–103.
- Darmon, E., and Leach, D. R. F. (2014). Bacterial Genome Instability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 1–39. doi:10.1128/MMBR.00035-13.
- Datta, N., and Kontomichalou, P. (1965). Penicillinase Synthesis Controlled By Infectious R Factors In Enterobacteriaceae. *Nature* 208, 239–241. doi:10.1038/208239a0.
- Davies, J., and Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 417–433. doi:10.1128/MMBR.00016-10.
- Davies, J., and Wright, G. D. (1997). Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol.* 5, 234–240. Available at: [https://www-cell-com.sire.ub.edu/trends/microbiology/pdf/S0966-842X\(97\)01033-0.pdf](https://www-cell-com.sire.ub.edu/trends/microbiology/pdf/S0966-842X(97)01033-0.pdf) [Accessed May 1, 2018].
- de la Cruz, F., and Davies, J. (2000). Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from

- bacteria. *Trends Microbiol.* 8, 128–133. Available at: [https://www-cell-com.sire.ub.edu/trends/microbiology/pdf/S0966-842X\(00\)01703-0.pdf](https://www-cell-com.sire.ub.edu/trends/microbiology/pdf/S0966-842X(00)01703-0.pdf) [Accessed April 30, 2018].
- De Paepe, M., Leclerc, M., Tinsley, C. R., and Petit, M.-A. (2014). Bacteriophages: an underestimated role in human and animal health? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 39. doi:10.3389/fcimb.2014.00039.
- Dedrick, R. M., Jacobs-Sera, D., Guerrero Bustamante, C. A., Garlena, R. A., Mavrich, T. N., Pope, W. H., et al. (2017). Prophage-mediated defence against viral attack and viral counter-defence. *Nat. Microbiol.* 2, 16251. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.251.
- Díaz, M. A., Hernández-Bello, J. R., Rodríguez-Baño, J., Martínez-Martínez, L., Calvo, J., Blanco, J., et al. (2010). Diversity of *Escherichia coli* Strains Producing Extended-Spectrum B-Lactamases in Spain: Second Nationwide Study. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2840–2845. doi:10.1128/JCM.02147-09.
- Dinakaran, V., Rathinavel, A., Pushpanathan, M., Sivakumar, R., Gunasekaran, P., and Rajendhran, J. (2014). Elevated Levels of Circulating DNA in Cardiovascular Disease Patients: Metagenomic Profiling of Microbiome in the Circulation. *PLoS One* 9, e105221. doi:10.1371/journal.pone.0105221.
- Doi, Y., Wachino, J.-I., and Arakawa, Y. (2016). Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 30, 523–537. doi:10.1016/j.idc.2016.02.011.
- Dougherty, T. J., and Pucci, M. J. (2012). *Antibiotic Discovery and Development*. Springer doi:10.1007/978-1-4614-1400-1.
- Drawz, S. M., and Bonomo, R. A. (2010). Three Decades of B-Lactamase Inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 160–201. doi:10.1128/CMR.00037-09.
- Dreiseikelmann, B. (1994). Translocation of DNA across Bacterial Membranes. *Microbiol. Rev.* 58, 293–316. Available at: <http://mmbr.asm.org/content/58/3/293.full.pdf> [Accessed April 30, 2018].
- Drlica, K., and Zhao, X. (1997). DNA Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-Quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 377–392. Available at: <http://mmbr.asm.org/content/61/3/377.full.pdf> [Accessed April 30, 2018].
- Dubos, R. J., Straus, J. H., and Pierce, C. (1943). The multiplication of bacteriophage in vivo and its protective effect against an experimental infection with *Shigella dysenteriae*. *J. Exp. Med.* 78, 161–168.
- Duerkop, B. A., Clements, C. V, Rollins, D., Rodrigues, J. L. M., and Hooper, L. V (2012). A composite bacteriophage alters colonization by an intestinal commensal bacterium. *PNAS* 109, 17621–17626. doi:10.1073/pnas.1206136109.
- Dunbar, J., White, S., and Forney, L. (1997). Genetic Diversity through the Looking Glass: Effect of Enrichment Bias. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1326–1331. Available at: <http://aem.asm.org/content/63/4/1326.full.pdf> [Accessed January 7, 2018].
- Duran, A. E., Muniesa, M., Méndez, X., Valero, F., Lucena, F., and Jofre, J. (2002). Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. *J. Appl. Microbiol.* 92, 338–347. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01536.x.
- Durante-Mangoni, E., Grammatikos, A., Utili, R., and Falagas, M. E. (2009). Do we still need the aminoglycosides? *Int. J. Antimicrob. Agents* 33, 201–205. doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.09.001.
- Dussoix, D., and Arber, W. (1962). Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: II. Control over acceptance of DNA from infecting phage λ . *J. Mol. Biol.* 5, 37–49. doi:10.1016/S0022-2836(62)80059-X.
- Dutilh, B. E. (2014). Metagenomic ventures into outer sequence space. *Bacteriophage* 4, e979664. doi:10.4161/21597081.2014.979664.
- Dutilh, B. E., Cassman, N., Mcnair, K., Sanchez, S. E., Silva, G. G. Z., Boling, L., et al. (2014). A highly

- abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nat. Commun.* 5, 4498. doi:10.1038/ncomms5498.
- Dykstra, M. J., and Reuss, L. E. (1992). *Biological Electron Microscopy: Theory, Techniques, and Troubleshooting*. 2nd ed. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- ECDC/EMEA (2009). ECDC/EMEA Joint Working Group. Technical Report. The bacterial challenge: time to react. Stockholm Available at: www.ecdc.europa.eu [Accessed April 30, 2018].
- ECDC (2016). Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm doi:10.2900/296939.
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., et al. (2005). Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* 308, 1635–8. Available at: <http://science.sciencemag.org.sire.ub.edu/content/sci/308/5728/1635.full.pdf> [Accessed January 7, 2018].
- Economou, V., and Gousia, P. (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infect. Drug Resist.* 8, 49–61. doi:10.2147/IDR.S55778.
- El Salabi, A., Walsh, T. R., and Chouchani, C. (2013). Extended spectrum β -lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 39, 113–122. doi:10.3109/1040841X.2012.691870.
- Elborn, J. S. (2016). Cystic fibrosis. *Lancet* 388, 2519–2531. doi:10.1016/S0140-6736(16)00576-6.
- Enault, F., Briet, A., Bouteille, L., Roux, S., Sullivan, M. B., and Petit, M.-A. (2017). Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses. *ISME J.* 11, 237–247. doi:10.1038/ismej.2016.90.
- Enright, M. C. (2003). The evolution of a resistant pathogen – the case of MRSA. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3, 474–479. doi:10.1016/S1471-4892(03)00109-7.
- Esparcia, O., Montemayor, M., Ginovart, G., Pomar, V., Soriano, G., Pericas, R., et al. (2011). Diagnostic accuracy of a 16S ribosomal DNA gene-based molecular technique (RT-PCR, microarray, and sequencing) for bacterial meningitis, early-onset neonatal sepsis, and spontaneous bacterial peritonitis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 69, 153–60. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.10.022.
- Evans, B. A., and Amyes, S. G. (2014). OXA B-Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 241–263.
- Evans, T. J., Crow, M. A., Williamson, N. R., Orme, W., Thomson, N. R., Komitopoulou, E., et al. (2010). Characterization of a broad-host-range flagellum-dependent phage that mediates high-efficiency generalized transduction in, and between, *Serratia* and *Pantoea*. *Microbiology* 156, 240–247. doi:10.1099/mic.0.032797-0.
- Fancello, L., Desnues, C., Raoult, D., and Rolain, J. M. (2011). Bacteriophages and diffusion of genes encoding antimicrobial resistance in cystic fibrosis sputum microbiota. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 2448–2454. doi:10.1093/jac/dkr315.
- Fancello, L., Monteil, S., Popgeorgiev, N., Rivet, R., Gouriet, F., Fournier, P.-E., et al. (2014). Viral Communities Associated with Human Pericardial Fluids in Idiopathic Pericarditis. *PLoS One* 9, e93367. doi:10.1371/journal.pone.0093367.
- Fineran, P. C., Petty, N. K., and Salmond, G. P. C. (2009). 'Transduction: Host DNA Transfer by Bacteriophages', in *The Desk of Encyclopedia of Microbiology*, ed. M. SCHAECHTER (San Diego, CA, USA: Elsevier), 1107–1120.
- Finley, R. L., Collignon, P., Larsson, D. G. J., McEwen, S. A., Li, X.-Z., Gaze, W. H., et al. (2013). The Scourge of Antibiotic Resistance: The Important Role of the Environment. *Clin. Infect. Dis.* 57, 704–710. doi:10.1093/cid/cit355.
- Flores, C. O., Valverde, S., and Weitz, J. S. (2013). Multi-scale structure and geographic drivers of cross-

- infection within marine bacteria and phages. *ISME J.* 7, 520–532. doi:10.1038/ismej.2012.135.
- Fortier, L.-C., and Sekulovic, O. (2013). Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence* 4, 354–65. doi:10.4161/viru.24498.
- Fothergill, J. L., Mowat, E., Walshaw, M. J., Ledson, M. J., James, C. E., and Winstanley, C. (2011). Effect of Antibiotic Treatment on Bacteriophage Production by a Cystic Fibrosis Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 426–428. doi:10.1128/AAC.01257-10.
- Frenkel, D., and Solomon, B. (2002). Filamentous phage as vector-mediated antibody delivery to the brain. *PNAS* 99, 5675–5679. Available at: <http://www.pnas.org/content/pnas/99/8/5675.full.pdf> [Accessed April 29, 2018].
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., and Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 722–732. doi:10.1038/nrmicro1235.
- Fuchs, S., Mühldorfer, I., Donohue-Rolfe, A., Kerényi, M., Emödy, L., Alexiev, R., et al. (1999). Influence of RecA on in vivo virulence and Shiga toxin 2 production in *Escherichia coli* pathogens. *Microb. Pathog.* 27, 13–23. Available at: <http://www.idealibrary.com> [Accessed April 29, 2018].
- Gaidelyte, A., Vaara, M., and Bamford, D. H. (2007). Bacteria, Phages and Septicemia. *PLoS One* 2, e1145. doi:10.1371/journal.pone.0001145.
- Galimand, M., Courvalin, P., and Lambert, T. (2003). Plasmid-Mediated High-Level Resistance to Aminoglycosides in Enterobacteriaceae Due to 16S rRNA Methylation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2565–2571. doi:10.1128/AAC.47.8.2565–2571.2003.
- García-Aljaro, C., Ballesté, E., and Muniesa, M. (2017). Beyond the canonical strategies of horizontal gene transfer in prokaryotes. *Curr. Opin. Microbiol.* 38, 95–105. doi:10.1016/j.mib.2017.04.011.
- Geier, M. R., Trigg, M. E., and Merrill, C. R. (1973). Fate of bacteriophage lambda in non-immune germ-free mice. *Nature* 246, 221–223. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4586796> [Accessed April 29, 2018].
- Gill, J., and Abedon, S. T. (2003). Bacteriophage Ecology and Plants. *APSnet Featur.*, Online. doi:10.1094/APSnetFeature-2003-1103.
- Giwerzman, B., Meyer, C., Lambert, P. A., Reinert, C., and Høiby, N. (1992). High-Level B-Lactamase Activity in Sputum Samples from Cystic Fibrosis Patients during Antipseudomonal Treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 71–76. Available at: <http://aac.asm.org/content/36/1/71.full.pdf> [Accessed May 27, 2018].
- Goerke, C., Köller, J., and Wolz, C. (2006). Ciprofloxacin and Trimethoprim Cause Phage Induction and Virulence Modulation in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 171–177. doi:10.1128/AAC.50.1.171–177.2006.
- Gogarten, M. B., Gogarten, J. P., and Olendzenski, L. (2009). *Horizontal gene transfer*. doi:10.1007/978-1-60327-853-9.
- Gonçalves, D., Cecílio, P., and Ferreira, H. (2013). First detection of OXA-48-like-producing *Acinetobacter baumannii* in the faecal flora of nursing home residents in northern Portugal. ECCMID 2013 Berlin, Germany, eP748.
- Górski, A., Wazna, E., Dabrowska, B.-W., Dabrowska, K., Sżwitala-Jelen, K., and Miedzybrodzki, R. (2006). Bacteriophage translocation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 46, 313–319. doi:10.1111/j.1574-695X.2006.00044.x.
- Granier, S. A., Hidalgo, L., San Millan, A., Escudero, J. A., Gutierrez, B., Brisabois, A., et al. (2011). ArmA Methyltransferase in a Monophasic *Salmonella enterica* Isolate from Food. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 5262–5266. doi:10.1128/AAC.00308-11.

- Greenwood, J., Willis, A. E., and Perham, R. N. (1991). Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage: Peptides from *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein as antigens. *J. Mol. Biol.* 220, 821–827. doi:10.1016/0022-2836(91)90354-9.
- Griffiths, A. J., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C., and Gelbart, W. M. (2000). 'Gene Transfer in Bacteria and Their Viruses', in *An Introduction to Genetic Analysis* (New York: W. H. Freeman and Company).
- Guy, L., Nystedt, B., Toft, C., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Berglund, E. C., Granberg, F., et al. (2013). A Gene Transfer Agent and a Dynamic Repertoire of Secretion Systems Hold the Keys to the Explosive Radiation of the Emerging Pathogen *Bartonella*. *PLoS Genet.* 9, e1003393. doi:10.1371/journal.pgen.1003393.
- Haaber, J., Leisner, J. J., Cohn, M. T., Catalan-Moreno, A., Nielsen, J. B., Westh, H., et al. (2016). Bacterial viruses enable their host to acquire antibiotic resistance genes from neighbouring cells. *Nat. Commun.* 7, 13333. doi:10.1038/ncomms13333.
- Hall, L. M. C., Livermore, D. M., Gur, D., Akova, M., and Akalin, H. E. (1993). OXA-11, an Extended-Spectrum Variant of OXA-10 (PSE-2), B-Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 1637–1644. Available at: <http://aac.asm.org/content/37/8/1637.full.pdf> [Accessed April 30, 2018].
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., and Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* 5, R245-249. Available at: <http://biomednet.com/elecref/10745521005R0245> [Accessed May 5, 2018].
- Hanssen, A.-M., and Ericson Sollid, J. U. (2006). SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 46, 8–20. doi:10.1111/j.1574-695X.2005.00009.x.
- Hauser, P. M., Bernard, T., Greub, G., Jaton, K., Pagni, M., and Hafen, G. M. (2014). Microbiota Present in Cystic Fibrosis Lungs as Revealed by Whole Genome Sequencing. *PLoS One* 9, e90934. doi:10.1371/journal.pone.0090934.
- Hawkey, P. M. (1998). The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *Br. Med. J.* 317, 657–660. doi:10.1136/bmj.317.7159.657.
- Hawkey, P. M. (2003). Mechanisms of quinolone action and microbial response. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 29–35. doi:10.1093/jac/dkg207.
- Hawkey, P. M., and Jones, A. M. (2009). The changing epidemiology of resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, i3–i10. doi:10.1093/jac/dkp256.
- Haynes, M., and Rohwer, F. (2011). 'The Human Virome', in *Metagenomics of the Human Body*, ed. K. E. Nelson (New York: Springer), 63–77. Available at: <https://books.google.es/books?id=Onkn0W08FRUC&pg=PA77&lpg=PA77&dq=The+Human+Virome+2010%2Bhaynes&source=bl&ots=oZrvAhrqkM&sig=bMJI4unLVdG72eWyYVTaUCpyR4Y&hl=es&a=X&ved=0ahUKEwjDg82E54LbAhVDAZoKHRE0Bn04ChDoAQhI MAU#v=onepage&q=The Human Virome 2010%2Bhayne> [Accessed May 13, 2018].
- Hennes, K. P., and Suttle, C. A. (1995). Direct counts of viruses in natural waters and laboratory cultures by epifluorescence microscopy. *Limnol. Oceanogr.* 40, 1050–1055. Available at: <https://aslopubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.4319/lo.1995.40.6.1050> [Accessed May 7, 2018].
- Hersh, D. S., Wadajkar, A. S., Roberts, N., Perez, J. G., Connolly, N. P., Frenkel, V., et al. (2016). Evolving Drug Delivery Strategies to Overcome the Blood Brain Barrier. *Curr. Pharm. Des.* 22, 1177–1193. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4900538/pdf/nihms-787102.pdf> [Accessed May 15, 2018].
- Hershey, A. D., and Chase, M. (1952). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of

- bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 36, 39–56. doi:10.1085/jgp.36.1.39.
- Heuer, H., and Smalla, K. (2007). Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environ. Microbiol.* 9, 657–666. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01185.x.
- Hiramatsu, K., Ito, T., Tsubakishita, S., Sasaki, T., Takeuchi, F., Morimoto, Y., et al. (2013). Genomic Basis for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infect Chemother* 45, 117–136. doi:10.3947/ic.2013.45.2.117.
- Hjelmsø, M. H., Hellmér, M., Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Lukjancenko, O., Seidel, M., et al. (2017). Evaluation of Methods for the Concentration and Extraction of Viruses from Sewage in the Context of Metagenomic Sequencing. *PLoS One* 12, e0170199. doi:10.1371/journal.pone.0170199.
- Hooper, D. C. (2001). Emerging Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 337–341. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2631735/pdf/11294736.pdf> [Accessed April 30, 2018].
- Howe, A., Ringus, D. L., Williams, R. J., Choo, Z.-N., Greenwald, S. M., Owens, S. M., et al. (2016). Divergent responses of viral and bacterial communities in the gut microbiome to dietary disturbances in mice. *ISME J.* 10, 1217–1227. doi:10.1038/ismej.2015.183.
- Hyman, P., and Abedon, S. T. (2009). 'Bacteriophage (overview)', in *The Desk of Encyclopedia of Microbiology*, ed. M. Schaechter (San Diego, CA, USA: Elsevier), 166–181.
- Hynes, A. P., Mercer, R. G., Watton, D. E., Buckley, C. B., and Lang, A. S. (2012). DNA packaging bias and differential expression of gene transfer agent genes within a population during production and release of the *Rhodobacter capsulatus* gene transfer agent, RcGTA. *Mol. Microbiol.* 85, 314–325. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08113.x.
- IAWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology (1991). Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Res.* 25, 529–545. Available at: https://ac-els-cdn-com.sire.ub.edu/004313549190126B/1-s2.0-004313549190126B-main.pdf?_tid=03d42c10-b154-40b7-b943-93845c1cd02c&acdnat=1524998821_33c70a0ca5ba7e0dc98e5f4adea24236 [Accessed April 29, 2018].
- Illumina (2018a). Illumina. Available at: <https://www.illumina.com/> [Accessed May 6, 2018].
- Illumina (2018b). MiSeq Specifications | Key performance parameters. Available at: <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/miseq/specifications.html> [Accessed May 5, 2018].
- Imamovic, L., and Muniesa, M. (2012). Characterizing RecA-Independent Induction of Shiga toxin2-Encoding Phages by EDTA Treatment. *PLoS One* 7, e32393. doi:10.1371/journal.pone.0032393.
- Imamovic, L., Serra-Moreno, R., Jofre, J., and Muniesa, M. (2010). Quantification of Shiga toxin 2-encoding bacteriophages, by real-time PCR and correlation with phage infectivity. *J. Appl. Microbiol.* 108, 1105–1114. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04664.x.
- Infante, B., Grape, M., Larsson, M., Kristiansson, C., Pallecchi, L., Rossolini, G. M., et al. (2005). Acquired sulphonamide resistance genes in faecal *Escherichia coli* from healthy children in Bolivia and Peru. *Int. J. Antimicrob. Agents* 25, 308–312. doi:10.1016/j.ijantimicag.2004.12.004.
- IWG-SCC (2018). <http://www.sccmec.org/>. Available at: <http://www.sccmec.org/> [Accessed April 30, 2018].
- Jacoby, G. A. (2005). Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clin. Infect. Dis.* 41, S120–6. Available at: https://watermark.silverchair.com/41-Supplement_2-S120.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAb4wggG6BgkqhkiG9w0BBwagggGrMIIBpwIBADCCAaAGCSqGSib3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMntPm777fJYoWLLMHAqEQqIIBce_lq4nyTMSLu1Z6FtYDgnSSsbxsX75dkR [Accessed April 30,

- 2018].
- Jacoby, G. A., Gacharna, N., Black, T. A., Miller, G. H., and Hooper, D. C. (2009). Temporal Appearance of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 1665–1666. doi:10.1128/AAC.01447-08.
- Jacoby, G., Cattoir, V., Hooper, D., Martínez-Martínez, L., Nordmann, P., Pascual, A., et al. (2008). qnr Gene Nomenclature. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2297–2299. doi:10.1128/AAC.00147-08.
- Jacquet, C., Rocourt, J., and Reynaud, A. (1993). Study of *Listeria monocytogenes* contamination in a dairy plant and characterization of the strains isolated. *Int. J. Food Microbiol.* 20, 13–22.
- Jensen, E. C., Schrader, H. S., Rieland, B., Thompson, T. L., Lee, K. W., Nickerson, K. W., et al. (1998). Prevalence of Broad-Host-Range Lytic Bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 575–580. Available at: <http://aem.asm.org/content/64/2/575.full.pdf> [Accessed April 29, 2018].
- Jofre, J. (2007). 'Indicators of Waterborne Enteric Viruses', in *Human Viruses in Water: Perspectives in Medical Virology*, ed. A. Bosch (Amsterdam: Elsevier), 227–249. doi:10.1016/S0168-7069(07)17011-7.
- Jofre, J., Lucena, F., Blanch, A. R., and Muniesa, M. (2016). Coliphages as model organisms in the characterization and management of water resources. *Water* 8, 199. doi:10.3390/w8050199.
- Johnson, C. M., and Grossman, A. D. (2015). Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work. *Annu. Rev. Genet.* 49, 577–601. doi:10.1146/annurev-genet-112414-055018.
- Johnson, T. A., Looft, T., Severin, A. J., Bayles, D. O., Nasko, D. J., Wommack, K. E., et al. (2017). The In-Feed Antibiotic Carbadox Induces Phage Gene Transcription in the Swine Gut Microbiome. *MBio* 8, e00709-17. doi:10.1128/mBio.00709-17.
- Jordan, J. A., and Durso, M. B. (2000). Comparison of 16S rRNA Gene PCR and BACTEC 9240 for Detection of Neonatal Bacteremia. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2574–2578. Available at: <http://jcm.asm.org/> [Accessed July 10, 2018].
- Jover, L. F., Cortez, M. H., and Weitz, J. S. (2013). Mechanisms of Multi-strain Coexistence in Host-Phage Systems with Nested Infection Networks. *J. Theor. Biol.* 332, 65–77. Available at: <https://arxiv.org/pdf/1304.2301.pdf> [Accessed April 29, 2018].
- Juhas, M., Roelof Van Der Meer, J., Gaillard, M., Harding, R. M., Hood, D. W., and Crook, D. W. (2009). Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol Rev.* 33, 376–393. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00136.x.
- Katayama, Y., Ito, T., and Hiramatsu, K. (2000). A New Class of Genetic Element, Staphylococcus Cassette Chromosome mec, Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1549–1555. Available at: <http://aac.asm.org/content/44/6/1549.full.pdf> [Accessed April 30, 2018].
- Keller, R., and Engley, F. B. (1958). Fate of bacteriophage particles introduced into mice by various routes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 98, 577–580. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13567777> [Accessed April 29, 2018].
- Keller, R., and Traub, N. (1974). The Characterization of *Bacteroides fragilis* Bacteriophage Recovered from Animal Sera: observations on the Nature of Bacteroides Phage Carrier Cultures. *J. Gen. Virol* 24, 179–89. Available at: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jgv/24/1/JV0240010179.pdf?expires=1515363713&id=id&accname=guest&checksum=D550004416321A6ACE7FE3527B2BDC43> [Accessed January 7, 2018].
- Kenzaka, T., Tani, K., and Nasu, M. (2010). High-frequency phage-mediated gene transfer in freshwater

- environments determined at single-cell level. *ISME J.* 4, 648–659. doi:10.1038/ismej.2009.145.
- Khan, M. A., Satoh, H., Katayama, H., Kurisu, F., and Mino, T. (2002). Bacteriophages isolated from activated sludge processes and their polyvalency. *Water Res.* 36, 3364–3370. Available at: https://ac-els-cdn-com.sire.ub.edu/S0043135402000295/1-s2.0-S0043135402000295-main.pdf?_tid=5e9d6a43-d04f-4c09-8f56-81ad50959f0c&acdnat=1524957191_39fd094ea64e19dbcaecafac5dc9023a [Accessed April 29, 2018].
- Kim, M.-S., Park, E.-J., Woon Roh, S., and Bae, J.-W. (2011). Diversity and Abundance of Single-Stranded DNA Viruses in Human Feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 8062–8070. doi:10.1128/AEM.06331-11.
- Kimmitt, P. T., Harwood, C. R., and Barer, M. R. (2000). Toxin Gene Expression by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*: the Role of Antibiotics and the Bacterial SOS Response. *Emerg. Infect. Dis.* 6, 458–465. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2627954/pdf/10998375.pdf> [Accessed April 7, 2018].
- King, A., Adams, M., Cartstens, E., and Lefkowitz, E. (2011). *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. USA: Elsevier.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., and Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 423–435. doi:10.1038/nrmicro2333.
- Kong, K.-F., Schneper, L., and Mathee, K. (2010). Beta-lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology. *APMIS* 118, 1–36. doi:10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x.
- Ksendzovsky, A., Walbridge, S., Saunders, R. C., Asthagiri, A. R., Heiss, J. D., and Lonser, R. R. (2012). Convection-enhanced delivery of M13 bacteriophage to the brain. *J. Neurosurg.* 117, 197–203. doi:10.3171/2012.4.JNS111528.
- Kuai, L., Nair, A. A., and Polz, M. F. (2001). Rapid and simple method for the most-probable-number estimation of arsenic-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3168–73. doi:10.1128/AEM.67.7.3168-3173.2001.
- Kulp, A., and Kuehn, M. J. (2010). Biological Functions and Biogenesis of Secreted Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 163–184. doi:10.1146/annurev.micro.091208.073413.
- Kutter, E., and Sulakvelidze, A. (2005). *Bacteriophages: biology and applications*. , eds. E. Kutter and A. Sulakvelidze Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.
- Lachmayr, K. L., Kerkhof, L. J., Dirienzo, A. G., Cavanaugh, C. M., and Ford, T. E. (2009). Quantifying Nonspecific TEM Beta-Lactamase (blaTEM) Genes in a Wastewater Stream. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 203–211. doi:10.1128/AEM.01254-08.
- Lahey Clinic (2017). β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes. Available at: <https://www.lahey.org/Studies/> [Accessed February 1, 2018].
- Lahey Clinic (2018). qnr Numbering and Sequence. Available at: <https://www.lahey.org/qnrStudies/> [Accessed May 1, 2018].
- Lang, A. S., and Beatty, J. T. (2007). Importance of widespread gene transfer agent genes in α -proteobacteria. *Trends Microbiol.* 15, 54–62. doi:10.1016/j.tim.2006.12.005.
- Lang, A. S., Zhaxybayeva, O., and Thomas Beatty, J. (2012). Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 472–482. doi:10.1038/nrmicro2802.
- Lanz, R., Kuhnert, P., and Boerlin, P. (2003). Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet. Microbiol.* 91, 73–84.

- Available at: https://ac-els-cdn-com.sire.ub.edu/S0378113502002638/1-s2.0-S0378113502002638-main.pdf?_tid=f4988dc2-2afe-45a6-a1c9-098beb95a570&acdnat=1525207776_c25827dd2f385d1258db2f5d8329f46e [Accessed May 1, 2018].
- Laponogov, I., Sohi, M. K., Veselkov, D. A., Pan, X.-S., Sawhney, R., Thompson, A. W., et al. (2009). Structural insight into the quinolone–DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 667–669. doi:10.1038/nsmb.1604.
- Lara, E., Vaqué, D., Sà, E. L., Boras, J. A., Gomes, A., Borrull, E., et al. (2017). Unveiling the role and life strategies of viruses from the surface to the dark ocean. *Sci. Adv.* 3, e1602565. Available at: <http://advances.sciencemag.org/> [Accessed July 9, 2018].
- Laurettil, L., Riccio, M. L., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., et al. (1999). Cloning and Characterization of blaVIM , a New Integron-Borne Metallo-B-Lactamase Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1584–1590. Available at: <http://aac.asm.org/content/43/7/1584.full.pdf> [Accessed April 30, 2018].
- Lavilla, S., González-López, J. J., Sabaté, M., García-Fernández, A., Larrosa, M. N., Bartolomé, R. M., et al. (2008). Prevalence of qnr genes among extended-spectrum b-lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 61, 291–295. doi:10.1093/jac/dkm448.
- Le Romancer, M., Gaillard, M., Geslin, C., and Prieur, D. (2006). ‘Viruses in extreme environments’, in *Life in Extreme Environments* (Dordrecht: Springer Netherlands), 99–113. doi:10.1007/978-1-4020-6285-8_6.
- Lee, J. H. (2006). Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cattle and chicken, and analyses of their mecA, mecR1 and mecl genes. *Vet. Microbiol.* 114, 155–159. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16625709> [Accessed April 30, 2018].
- Lekunberri, I., Subirats, J., Borrego, C. M., and Balcázar, J. L. (2017). Exploring the contribution of bacteriophages to antibiotic resistance. *Environ. Pollut.* 220, 981–984. doi:10.1016/j.envpol.2016.11.059.
- Leshner, G. Y., Froelich, E. J., Gruett, M. D., Bailey, J. H., and Brundage, R. P. (1962). 1,8-Naphthyridine Derivatives. A New Class of Chemotherapeutic Agents. *J. Med. Chem.* 5, 1063–1065. Available at: <https://pubs-acsc-org.sire.ub.edu/doi/pdf/10.1021/jm01240a021> [Accessed April 30, 2018].
- Letarov, A., and Kulikov, E. (2009). The bacteriophages in human- and animal body-associated microbial communities. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1–13. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04143.x.
- Levy, S. B., and Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nat. Med.* 10, S122-9. doi:10.1038/nm1145.
- Ley, R. E., Peterson, D. A., and Gordon, J. I. (2006). Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine. *Cell* 124, 837–848. doi:10.1016/j.cell.2006.02.017.
- Lim, E. S., Zhou, Y., Zhao, G., Bauer, I. K., Droit, L., Ndao, I. M., et al. (2015). Early life dynamics of the human gut virome and bacterial microbiome in infants. *Nat. Med.* 21, 1228–1234. doi:10.1038/nm.3950.
- Lin, Z., Lai, Y. M., Zaw, M. T., and Samsudin, A. T. (2016). Distribution of sul genes and their variants in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from two hospitals of Sabah. *Asian J. Med. Biol. Res.* 2, 213–220. doi:10.3329/ajmbr.v2i2.29063.
- Lindell, D., Sullivan, M. B., Johnson, Z. I., Tolonen, A. C., Rohwer, F., and Chisholm, S. W. (2004). Transfer of photosynthesis genes to and from *Prochlorococcus* viruses. *PNAS* 101, 11013–11018. Available at: <http://www.pnas.org/content/pnas/101/30/11013.full.pdf> [Accessed April 30, 2018].

- Livermore, D. M. (1995). B-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 557–584. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC172876/pdf/080557.pdf> [Accessed April 30, 2018].
- Livny, J., and Friedman, D. I. (2004). Characterizing spontaneous induction of Stx encoding phages using a selectable reporter system. *Mol. Microbiol.* 51, 1691–1704. doi:10.1111/j.1365-2958.2003.03934.x.
- Loh, G., and Blaut, M. (2012). Role of commensal gut bacteria in inflammatory bowel diseases. *Gut Microbes* 3, 544–555. doi:10.4161/gmic.22156.
- Lood, R., Ertürk, G., and Mattiasson, B. (2017). Revisiting Antibiotic Resistance Spreading in Wastewater Treatment Plants – Bacteriophages as a Much Neglected Potential Transmission Vehicle. *Front. Microbiol.* 8, 2298. doi:10.3389/fmicb.2017.02298.
- Loft, T., Johnson, T. A., Allen, H. K., Bayles, D. O., Alt, D. P., Stedtfeld, R. D., et al. (2012). In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *PNAS* 109, 1691–1696. doi:10.1073/pnas.1120238109.
- López-Causapé, C., De Dios-Caballero, J., Cobo, M., Escribano, A., Asensio, Ó., Oliver, A., et al. (2017). Antibiotic resistance and population structure of cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a Spanish multi-centre study. *Int. J. Antimicrob. Agents* 50, 334–341. doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.03.034.
- Loś, J. M., Loś, M., Węgrzyn, G., and Węgrzyn, A. (2009). Differential efficiency of induction of various lambdoid prophages responsible for production of Shiga toxins in response to different induction agents. *Microb. Pathog.* 47, 289–298. doi:10.1016/j.micpath.2009.09.006.
- Łoś, M., and Węgrzyn, G. (2012). Pseudolysogeny. *Adv. Virus Res.* 82, 339–349. doi:10.1016/B978-0-12-394621-8.00019-4.
- Los, M., Węgrzyn, G., and Neubauer, P. (2003). A role for bacteriophage T4 rI gene function in the control of phage development during pseudolysogeny and in slowly growing host cells. *Res. Microbiol.* 154, 547–552. doi:10.1016/S0923-2508(03)00151-7.
- Lu, Y., Shen, Y., Warren, W., and Walter, R. (2016). 'Next Generation Sequencing in Aquatic Models', in *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges* (London: InTech), 61–79. doi:10.5772/61657.
- Lundin, D., Gribaldo, S., Torrents, E., Sjöberg, B.-M., and Poole, A. M. (2010). Ribonucleotide reduction - horizontal transfer of a required function spans all three domains. *BMC Evol. Biol.* 10, 383. doi:10.1186/1471-2148-10-383.
- Łusiak-szelachowska, M., Weber-Dąbrowska, B., Jończyk-Matysiak, E., Wojciechowska, R., and Górski, A. (2017). Bacteriophages in the gastrointestinal tract and their implications. *Gut Pathog.* 9, 44. doi:10.1186/s13099-017-0196-7.
- Ma, X. X., Ito, T., Tiensasitorn, C., Jamklang, M., Chongtrakool, P., Boyle-Vavra, S., et al. (2002). Novel Type of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Identified in Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1147–1152. doi:10.1128/AAC.46.4.1147-1152.2002.
- Madigan, M., Martinko, J., and Parker, J. (2006). *Brock Biology of Microorganisms*. 11th Editi. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall.
- Maiques, E., Úbeda, C., Campoy, S., Salvador, N., Lasa, Í., Novick, R. P., et al. (2006). B-Lactam Antibiotics Induce the SOS Response and Horizontal Transfer of Virulence Factors in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 188, 2726–2729. doi:10.1128/JB.188.7.2726-2729.2006.
- Malki, K., Sible, E., Cooper, A., Garretto, A., Bruder, K., Watkins, S. C., et al. (2016). Seven Bacteriophages Isolated from the Female Urinary Microbiota. *Genome Announc.* 4, e01003-16.

- doi:10.1128/genomeA.01003-16.
- Mankiewicz, E., and Liivak, M. (1967). Mycobacteriophages isolated from Human Sources. *Nature* 216, 485–486. doi:10.1038/216485a0.
- Mann, B. A., and Slauch, J. M. (1997). Transduction of Low-Copy Number Plasmids by Bacteriophage P22. *Genetics* 146, 447–456. Available at: <http://www.genetics.org/content/genetics/146/2/447.full.pdf> [Accessed April 30, 2018].
- Manrique, P., Bolduc, B., Walk, S. T., Van Der Oost, J., De Vos, W. M., and Young, M. J. (2016). Healthy human gut phageome. *PNAS* 113, 10400–10405. doi:10.1073/pnas.1601060113.
- Marti, E., Variatza, E., and Balcázar, J. L. (2014). Bacteriophages as a reservoir of extended-spectrum β -lactamase and fluoroquinolone resistance genes in the environment. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, O456-9. doi:10.1111/1469-0691.12446.
- Martínez-Castillo, A., and Muniesa, M. (2014). Implications of free Shiga toxin-converting bacteriophages occurring outside bacteria for the evolution and the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 46. doi:10.3389/fcimb.2014.00046.
- Martínez-Castillo, A., Quirós, P., Navarro, F., Miró, E., and Muniesa, M. (2013). Shiga toxin 2-encoding bacteriophages in human fecal samples from healthy individuals. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4862–8. doi:10.1128/AEM.01158-13.
- Martínez-Martínez, L., Eliecer Cano, M., Rodríguez-Martínez, J. M., Calvo, J., and Pascual, Á. (2008). Plasmid-mediated quinolone resistance. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 6, 685–711. doi:10.1586/14787210.6.5.685.
- Martínez-Martínez, L., Pascual, A., and Jacoby, G. A. (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 351, 797–799.
- Martínez, J. L., Coque, T. M., and Baquero, F. (2015). What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 116–123. doi:10.1038/nrmicro3399.
- Maruri, F., Sterling, T. R., Kaiga, A. W., Blackman, A., van Der Heijden, Y. F., Mayer, C., et al. (2012). A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 819–831. doi:10.1093/jac/dkr566.
- Mazaheri, R., Barton, M. D., and Heuzenroeder, M. W. (2011). Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in enterococci. *Letts. Appl. Microbiol.* 52, 559–564. doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03043.x.
- McCaughey, G., Gilpin, D., Elborn, J., and Tunney, M. M. (2013). The future of antimicrobial therapy in the era of antibiotic resistance in cystic fibrosis pulmonary infection. *Expert Rev. Respir. Med.* 7, 385–396. doi:10.1586/17476348.2013.814411.
- McDaniel, L. D., Young, E. C., Ritchie, K. B., and Paul, J. H. (2012). Environmental Factors Influencing Gene Transfer Agent (GTA) Mediated Transduction in the Subtropical Ocean. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0043506.
- McDaniel, L. D., Young, E., Delaney, J., Ruhnau, F., Ritchie, K. B., and Paul, J. H. (2010). High Frequency of Horizontal Gene Transfer in the Oceans. *Science* 330, 50. doi:10.1126/science.1192243.
- McManus, M. (1997). Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Am. J. Heal. Pharm.* 54, 1420–1433. Available at: <http://www.ajhp.org/content/54/12/1420> [Accessed April 30, 2018].
- Meessen-Pinard, M., Sekulovic, O., and Fortier, L.-C. (2012). Evidence of In Vivo Prophage Induction during *Clostridium difficile* Infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7662–7670. doi:10.1128/AEM.02275-12.
- Mesa, R. J., Blanc, V., Blanch, A. R., Cortés, P., González, J. J., Lavilla, S., et al. (2006). Extended-

- spectrum B-lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 211–215. doi:10.1093/jac/dkl211.
- Messing, J. (2016). Phage M13 for the treatment of Alzheimer and Parkinson disease. *Gene* 583, 85–89. doi:10.1016/j.gene.2016.02.005.
- Międzybrodzki, R., Borysowski, J., Kłak, M., Jończyk-Matysiak, E., Obmińska-Mrukowicz, B., Suszko-Pawłowska, A., et al. (2017a). *In Vivo* Studies on the Influence of Bacteriophage Preparations on the Autoimmune Inflammatory Process. *Biomed Res. Int.* 2017, 1–9. doi:10.1155/2017/3612015.
- Międzybrodzki, R., Kłak, M., Jończyk-Matysiak, E., Bubak, B., Wójcik, A., Kaszowska, M., et al. (2017b). Means to Facilitate the Overcoming of Gastric Juice Barrier by a Therapeutic Staphylococcal Bacteriophage A5/80. *Front. Microbiol.* 8, 467. doi:10.3389/fmicb.2017.00467.
- Miller-Ensminger, T., Garretto, A., Brenner, J., Thomas-White, K., Zambom, A., Wolfe, A. J., et al. (2018). Bacteriophages of the Urinary Microbiome. *J. Bacteriol.* 200, e00738-17. doi:10.1128/JB.00738-17.
- Miller, C., Thomsen, L. E., Gaggero, C., Mosseri, R., Ingmer, H., and Cohen, S. N. (2004). SOS Response Induction by B-Lactams and Bacterial Defense Against Antibiotic Lethality. *Science* 305, 1629–1631. Available at: <http://science.sciencemag.org.sire.ub.edu/content/sci/305/5690/1629.full.pdf> [Accessed April 6, 2018].
- Minot, S., Bryson, A., Chehoud, C., Wu, G. D., Lewis, J. D., and Bushman, F. D. (2013). Rapid evolution of the human gut virome. *PNAS* 110, 12450–12455. doi:10.1073/pnas.1300833110.
- Minot, S., Sinha, R., Chen, J., Li, H., Keilbaugh, S. A., Wu, G. D., et al. (2011). The human gut virome: Inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Res.* 21, 1616–1625. doi:10.1101/gr.122705.111.
- Moat, A. G., Foster, J. W., and Spector, M. P. (2003). 'Bacteriophage Genetics', in *Microbial Physiology* (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), 239–276. doi:10.1002/0471223867.ch6.
- Moayyedi, P., Surette, M. G., Kim, P. T., Libertucci, J., Wolfe, M., Onischi, C., et al. (2015). Fecal Microbiota Transplantation Induces Remission in Patients With Active Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology* 149, 102–109. doi:10.1053/j.gastro.2015.04.001.
- Modi, S. R., Lee, H. H., Spina, C. S., and Collins, J. J. (2013). Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature* 499, 219–222. doi:10.1038/nature12212.
- Mojica, F. J. M., Díez-Villasenõr, C., García-Martínez, J., and Soria, E. (2005). Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *J. Mol. Evol.* 60, 174–182. doi:10.1007/s00239-004-0046-3.
- Mojica, F. J. M., Juez, G., and Rodríguez-Valera, F. (1993). Transcription at different salinities of *Haloferox mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol. Microbiol.* 9, 613–621. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x.
- Mojica, F. J. M., and Rodríguez-Valera, F. (2016). The discovery of CRISPR in archaea and bacteria. *FEBS J.* 283, 3162–3169. doi:10.1111/febs.13766.
- Monson, R., Foulds, I., Foweraker, J., Welch, M., and Salmond, G. P. C. (2011). The *Pseudomonas aeruginosa* generalized transducing phage ϕ PA3 is a new member of the ϕ KZ-like group of 'jumbo' phages, and infects model laboratory strains and clinical isolates from cystic fibrosis patients. *Microbiology* 157, 859–867. doi:10.1099/mic.0.044701-0.
- Motoshima, M., Yanagihara, K., Morinaga, Y., Matsuda, J., Sugahara, K., Yamada, Y., et al. (2010). Genetic Diagnosis of Community-Acquired MRSA: A Multiplex Real-Time PCR Method for Staphylococcal Cassette Chromosome mec Typing and Detecting Toxin Genes. *Tohoku J. Exp. Med.* 220, 165–170. doi:10.1620/tjem.220.165.

- Moustafa, A., Xie, C., Kirkness, E., Biggs, W., Wong, E., Turpaz, Y., et al. (2017). The blood DNA virome in 8,000 humans. *PLoS Pathog.* 13, e1006292. doi:10.1371/journal.ppat.1006292.
- Muhlebach, M. S. (2017). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis: how should it be managed? *Curr. Opin. Pulm. Med.* 23, 544–550. doi:10.1097/MCP.0000000000000422.
- Müller, M. G., Ing, J. Y., Cheng, M. K.-W., Flitter, B. A., and Moe, G. R. (2013). Identification of a Phage-Encoded Ig-Binding Protein from Invasive *Neisseria meningitidis*. *J. Immunol.* 191, 3287–3296. doi:10.4049/jimmunol.1301153.
- Muniesa, M., Blanch, A. R., Lucena, F., and Jofre, J. (2005). Bacteriophages may bias outcome of bacterial enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4269–75. doi:10.1128/AEM.71.8.4269-4275.2005.
- Muniesa, M., Blanco, J. E., De Simó, M., Serra-Moreno, R., Blanch, A. R., and Jofre, J. (2004a). Diversity of stx 2 converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Microbiology* 150, 2959–2971. doi:10.1099/mic.0.27188-0.
- Muniesa, M., Colomer-Lluch, M., and Jofre, J. (2013a). Could bacteriophages transfer antibiotic resistance genes from environmental bacteria to human-body associated bacterial populations? *Mob. Genet. Elements* 3, e25847. doi:10.4161/mge.25847.
- Muniesa, M., Colomer-Lluch, M., and Jofre, J. (2013b). Potential impact of environmental bacteriophages in spreading antibiotic resistance genes. *Future Microbiol.* 8, 739–751. doi:10.1093/jac/dkr189.
- Muniesa, M., García, A., Miró, E., Mirelis, B., Prats, G., Jofre, J., et al. (2004b). Bacteriophages and Diffusion of Beta-Lactamase Genes. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1134–1137. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3323147/pdf/03-0472.pdf> [Accessed February 2, 2018].
- Muniesa, M., and Jofre, J. (2004). Factors influencing the replication of somatic coliphages in the water environment. *Antonie Van Leeuwenhoek* 86, 65–76. doi:10.1023/B:ANTO.0000024909.75523.be.
- Muniesa, M., and Jofre, J. (2014). Identifying and analyzing bacteriophages in human fecal samples: what could we discover? *Future Microbiol.* 9, 879–886.
- Muniesa, M., Lucena, F., and Jofre, J. (1999). Study of the potential relationship between the morphology of infectious somatic coliphages and their persistence in the environment. *J. Appl. Microbiol.* 87, 402–409. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00833.x.
- Navarro, F., and Muniesa, M. (2017). Phages in the Human Body. *Front. Microbiol.* 8, 566. doi:10.3389/fmicb.2017.00566.
- Neu, H. C. (1992). The crisis in antibiotic resistance. *Science* 257, 1064–1073. doi:10.1126/SCIENCE.257.5073.1064.
- Ng, T. F. F., Marine, R., Wang, C., Simmonds, P., Kapusinszky, B., Bodhidatta, L., et al. (2012). High Variety of Known and New RNA and DNA Viruses of Diverse Origins in Untreated Sewage. *J. Virol.* 86, 12161–12175. doi:10.1128/JVI.00869-12.
- Nguyen, S., Baker, K., Padman, B. S., Patwa, R., Dunstan, R. A., Weston, T. A., et al. (2017). Bacteriophage Transcytosis Provides a Mechanism To Cross Epithelial Cell Layers. *MBio* 8, e01874-17. doi:10.1128/mBio.01874-17.
- Nicolas-Chanoine, M.-H., Blanco, J., Leflon-Guibout, V., Demarty, R., Alonso, M. P., Caniça, M. M., et al. (2008). Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J. Antimicrob. Chemother.* 61, 273–281. doi:10.1093/jac/dkm464.
- Nielsen, K. M., Ray, J. L., and Johnsen, P. J. (2009). 'Horizontal Gene Transfer: Uptake of Extracellular DNA by Bacteria', in *The Desk of Encyclopædia of Microbiology*, ed. S. Moselio (San Diego, CA, USA: Elsevier), 663–672.

- Norman, J. M., Handley, S. A., Baldrige, M. T., Droit, L., Liu, C. Y., Keller, B. C., et al. (2015). Disease-Specific Alterations in the Enteric Virome in Inflammatory Bowel Disease. *Cell* 160, 447–460. doi:10.1016/j.cell.2015.01.002.
- Novick, R. P., Christie, G. E., and Penadés, J. R. (2010). The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 541–551. doi:10.1038/nrmicro2393.
- Nüesch-Inderbilen, M., Zurfluh, K., Hächler, H., and Stephan, R. (2013). No evidence so far for the dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the community in Switzerland. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 2, 23. doi:10.1186/2047-2994-2-23.
- O'Brien, A. D., Newland, J. W., Miller, S. F., Holmes, R. K., Smith, H. W., and Formal, S. B. (1984). Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* 226, 694–696. doi:10.1126/SCIENCE.6387911.
- Oh, J., Byrd, A. L., Deming, C., Conlan, S., Kong, H. H., Segre, J. A., et al. (2014). Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. *Nature* 514, 59–64. doi:10.1038/nature13786.
- Otawa, K., Lee, S. H., Yamazoe, A., Onuki, M., Satoh, H., and Mino, T. (2007). Abundance, Diversity, and Dynamics of Viruses on Microorganisms in Activated Sludge Processes. *Microb. Ecol.* 53, 143–152. doi:10.1007/s00248-006-9150-9.
- Pallecchi, L., Lucchetti, C., Bartoloni, A., Bartalesi, F., Mantella, A., Gamboa, H., et al. (2007). Population Structure and Resistance Genes in Antibiotic-Resistant Bacteria from a Remote Community with Minimal Antibiotic Exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 1179–1184. doi:10.1128/AAC.01101-06.
- Pardridge, W. M. (2005). The Blood-Brain Barrier: Bottleneck in Brain Drug Development. *NeuroRx* 2, 3–14. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC539316/pdf/neurorx002000003.pdf> [Accessed May 15, 2018].
- Parent, K., and Wilson, I. D. (1971). Mycobacteriophage in Crohn's disease. *Gut* 12, 1019–1020. doi:10.1136/gut.12.12.1019.
- Paul, J. H., and Kellogg, C. A. (2000). 'Ecology of bacteriophages in nature', in *Viral Ecology*, ed. C. J. Hurst (Academic Press, CA, USA), 211–246. doi:10.1016/B978-012362675-2/50006-9.
- Penadés, J. R., and Christie, G. E. (2015). The Phage-Inducible Chromosomal Islands: A Family of Highly Evolved Molecular Parasites. *Annu. Rev. Virol.* 2, 181–201. doi:10.1146/annurev-virology-031413-085446.
- Penders, J., Stobberingh, E. E., Savelkoul, P. H. M., and Wolfs, P. F. G. (2013). The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance. *Front. Microbiol.* 4, 87. doi:10.3389/fmicb.2013.00087.
- Pérez-Brocal, V., García-López, R., Nos, P., Beltrán, B., Moret, I., and Moya, A. (2015). Metagenomic Analysis of Crohn's Disease Patients Identifies Changes in the Virome and Microbiome Related to Disease Status and Therapy, and Detects Potential Interactions and Biomarkers. *Inflamm. Bowel Dis.* 21, 2515–2532. doi:10.1097/MIB.0000000000000549.
- Pérez-Brocal, V., García-López, R., Vázquez-Castellanos, J. F., Nos, P., Beltrán, B., Latorre, A., et al. (2013). Study of the Viral and Microbial Communities Associated With Crohn's Disease: A Metagenomic Approach. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 4, e36. doi:10.1038/ctg.2013.9.
- Pérez-Trallero, E., and Iglesias, L. (2003). Tetraciclina, sulfamidas y metronidazol. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21, 520–529. doi:10.1016/S0213-005X(03)72999-1.
- Pitout, J. D. D., and Laupland, K. B. (2008). Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect. Dis.* 8, 159–166. Available at: [https://www.thelancet.com.sire.ub.edu/pdfs/journals/laninf/PIIS1473-3099\(08\)70041-0.pdf](https://www.thelancet.com.sire.ub.edu/pdfs/journals/laninf/PIIS1473-3099(08)70041-0.pdf)

- [Accessed April 30, 2018].
- Poirel, L., Naas, T., Nicolas, D., Collet, L., Bellais, S., Cavallo, J.-D., et al. (2000). Characterization of VIM-2, a Carbapenem-Hydrolyzing Metallo- B-Lactamase and Its Plasmid- and Integron-Borne Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 891–897. Available at: <http://aac.asm.org/content/44/4/891.full.pdf> [Accessed June 3, 2018].
- Prescott, L. M., Harley, J. P., and Klein, D. A. (2002). 'Los virus: bacteriófagos', in *Microbiología* (Madrid, España: McGRAW-HILL-INTERAMERICANA DE ESPANA, S. A. U), 411–428.
- Queralt, N., Jofre, J., Araujo, R., and Muniesa, M. (2003). Homogeneity of the Morphological Groups of Bacteriophages Infecting *Bacteroides fragilis* Strain HSP40 and Strain RYC2056. *Curr. Microbiol.* 46, 163–168. doi:10.1007/s00284-002-3813-7.
- Quintiliani, R., and Courvalin, P. (1996). Characterization of Tn1547, a composite transposon flanked by the IS16 and IS256-like elements, that confers vancomycin resistance in *Enterococcus faecalis* BM428 1. *Gene* 172, 1–8. Available at: https://ac-els-cdn-com.sire.ub.edu/0378111996001102/1-s2.0-0378111996001102-main.pdf?_tid=b2b6f054-d3fc-4106-9882-10e97d31a959&acdnat=1525074692_95ed0431c2e698ac94bb271e0e615490 [Accessed April 30, 2018].
- Quirós, P., Brown-Jaque, M., and Muniesa, M. (2016). Spread of bacterial genomes in packaged particles. *Future Microbiol.* 11, 171–173.
- Quirós, P., Colomer-Lluch, M., Martínez-Castillo, A., Miró, E., Argente, M., Jofre, J., et al. (2014). Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 606–609. doi:10.1128/AAC.01684-13.
- Quirós, P., Martínez-Castillo, A., and Muniesa, M. (2015). Improving detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by molecular methods by reducing the interference of free Shiga toxin-encoding bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 415–21. doi:10.1128/AEM.02941-14.
- Recktenwald, J., and Schmidt, H. (2002). The Nucleotide Sequence of Shiga Toxin (Stx) 2e-Encoding Phage φP27 Is Not Related to Other Stx Phage Genomes, but the Modular Genetic Structure Is Conserved. *Infect. Immun.* 70, 1896–1908. doi:10.1128/IAI.70.4.1896–1908.2002.
- Reyes, A., Haynes, M., Hanson, N., Angly, F. E., Heath, A. C., Rohwer, F., et al. (2010). Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* 466, 334–338. doi:10.1038/nature09199.
- Reyes, A., Semenkovich, N. P., Whiteson, K., Rohwer, F., and Gordon, J. I. (2012). Going viral: next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 607–617. doi:10.1038/nrmicro2853.
- Ritchie, D. F., and Klos, E. J. (1977). Isolation of *Erwinia amylovora* Bacteriophage from Aerial Parts of Apple Trees. *Phytopathology* 67, 101–104. Available at: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1977Articles/Phyto67n01_101.PDF [Accessed May 7, 2018].
- Robards, A. W., and Wilson, A. J. (1993). *Procedures in electron microscopy*, eds. A. W. Robards and A. J. Wilson Chichester: Wiley doi:10.1016/0962-8924(94)90207-0.
- Robicsek, A., Jacoby, G. A., and Hooper, D. C. (2006). The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect. Dis.* 6, 629–640. Available at: <http://infection.thelancet.com> [Accessed April 30, 2018].
- Robin, F., Hennequin, C., Gniadkowski, M., Beyrouthy, R., Empel, J., Gibold, L., et al. (2012). Virulence Factors and TEM-Type B-Lactamases Produced by Two Isolates of an Epidemic *Klebsiella pneumoniae* Strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1101–1104. doi:10.1128/AAC.05079-11.

- Rodriguez-Brito, B., Li, L., Wegley, L., Furlan, M., Angly, F., Breitbart, M., et al. (2010). Viral and microbial community dynamics in four aquatic environments. *ISME J.* 4, 739–751. doi:10.1038/ismej.2010.1.
- Rohwer, F. (2003). Global phage diversity. *Cell* 113, 141. doi:10.1016/S0092-8674(03)00276-9.
- Rolain, J.-M., François, P., Hernandez, D., Bittar, F., Richet, H., Fournous, G., et al. (2009). Genomic analysis of an emerging multiresistant *Staphylococcus aureus* strain rapidly spreading in cystic fibrosis patients revealed the presence of an antibiotic inducible bacteriophage. *Biol. Direct* 4, 1. doi:10.1186/1745-6150-4-1.
- Ronning, C. M., Losada, L., Brinkac, L., Inman, J., Ulrich, R. L., Schell, M., et al. (2010). Genetic and phenotypic diversity in *Burkholderia*: contributions by prophage and phage-like elements. *BMC Microbiol.* 10, 202. Available at: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1471-2180-10-202?site=bmcmicrobiol.biomedcentral.com> [Accessed March 7, 2018].
- Rosario, K., Nilsson, C., Lim, Y. W., Ruan, Y., and Breitbart, M. (2009). Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water. *Environ. Microbiol.* 11, 2806–2820. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01964.x.
- Ross, J., and Topp, E. (2015). Abundance of Antibiotic Resistance Genes in Bacteriophage following Soil Fertilization with Dairy Manure or Municipal Biosolids, and Evidence for Potential Transduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 7905–7913. doi:10.1128/AEM.02363-15.
- Roux, S., Brum, J. R., Dutilh, B. E., Sunagawa, S., Duhaime, M. B., Loy, A., et al. (2016). Ecogenomics and potential biogeochemical impacts of globally abundant ocean viruses. *Nat. Publ. Gr.* 537, 689–693. doi:10.1038/nature19366.
- Roux, S., Enault, F., Hurwitz, B. L., and Sullivan, M. B. (2015). VirSorter: mining viral signal from microbial genomic data. *PeerJ* 3, e985. doi:10.7717/peerj.985.
- Ruiz, J., Pons, M. J., and Gomes, C. (2012). Transferable mechanisms of quinolone resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* 40, 196–203. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.02.011.
- Sacha, P., Wiczorek, P., Hauschild, T., Zórawski, M., Olszańska, D., and Trynieszewska, E. (2008). Metallo-beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa* - a novel mechanism resistance to beta-lactam antibiotics. *Folia Histochem. Cytobiol.* 46, 137–142. doi:10.2478/v10042-008-0020-9.
- Sambrook, J. F., and Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. doi:10.1016/0092-8674(90)90210-6.
- Sander, M., and Schmieger, H. (2001). Method for Host-Independent Detection of Generalized Transducing Bacteriophages in Natural Habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1490–1493. doi:10.1128/AEM.67.4.1490–1493.2001.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage phiX174). *PNAS* 74, 5463–5467. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC431765/pdf/pnas00043-0271.pdf> [Accessed May 5, 2018].
- Santiago-Rodriguez, T. M., Ly, M., Bonilla, N., and Pride, D. T. (2015a). The human urine virome in association with urinary tract infections. *Front. Microbiol.* 6, 14. doi:10.3389/fmicb.2015.00014.
- Santiago-Rodriguez, T. M., Naidu, M., Abeles, S. R., Boehm, T. K., Ly, M., and Pride, D. T. (2015b). Transcriptome analysis of bacteriophage communities in periodontal health and disease. *BMC Genomics* 16, 549. doi:10.1186/s12864-015-1781-0.
- Scanlan, P. D., and Buckling, A. (2011). Co-evolution with lytic phage selects for the mucoid phenotype of *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *ISME J.* 6, 1148–1158. doi:10.1038/ismej.2011.174.
- Schatz, A., Bugie, E., and Waksman, S. A. (1944). Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram- Positive and Gram-Negative Bacteria. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 3–6. Available at: <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.3181/00379727-55-14461> [Accessed May 1, 2018].

- Scherrer, R., and Gerhardt, P. (1971). Molecular Sieving by the *Bacillus megaterium* Cell Wall and Protoplast. *J. Bacteriol.* 107, 718–735. Available at: <http://jb.asm.org/content/107/3/718.full.pdf> [Accessed April 30, 2018].
- Schuch, R., and Fischetti, V. A. (2009). The Secret Life of the Anthrax Agent *Bacillus anthracis*: Bacteriophage-Mediated Ecological Adaptations. *PLoS One* 4, e6532. doi:10.1371/journal.pone.0006532.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069. doi:10.1093/bioinformatics/btu153.
- Selva, L., Viana, D., Regev-Yochay, G., Trzcinski, K., Corpa, J. M., Lasa, Í., et al. (2009). Killing niche competitors by remote-control bacteriophage induction. *PNAS* 106, 1234–1238. Available at: <http://www.pnas.org/content/pnas/106/4/1234.full.pdf> [Accessed April 29, 2018].
- Serra-Moreno, R., Jofre, J., and Muniesa, M. (2007). Insertion Site Occupancy by stx2 Bacteriophages Depends on the Locus Availability of the Host Strain Chromosome. *J. Bacteriol.* 189, 6645–6654. doi:10.1128/JB.00466-07.
- Shakil, S., Khan, R., Zarrilli, R., and Khan, A. U. (2008). Aminoglycosides versus bacteria – a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *J. Biomed. Sci.* 15, 5–14. doi:10.1007/s11373-007-9194-y.
- Sible, E., Cooper, A., Malki, K., Bruder, K., Watkins, S. C., Fofanov, Y., et al. (2015). Survey of viral populations within Lake Michigan nearshore waters at four Chicago area beaches. *Data Br.* 5, 9–12. doi:10.1016/j.dib.2015.08.001.
- Siefert, J. L. (2009). 'Defining the Mobilome', in *Horizontal gene transfer*, 13–27. doi:10.1007/978-1-60327-853-9.
- Siegenthaler, W. E., Bonetti, A., and Luthy, R. (1986). Aminoglycoside antibiotics in infectious diseases. An overview. *Am. J. Med.* 80, 2–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3524216> [Accessed May 1, 2018].
- Simmons, L. A., Foti, J. J., Cohen, S. E., and Walker, G. C. (2008). The SOS Regulatory Network. *Ecosal Plus* 3. doi:10.1128/ecosalplus.5.4.3.
- Sims, D., Sudbery, I., Ilott, N. E., Heger, A., and Ponting, C. P. (2014). Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* 15, 121–132. doi:10.1038/nrg3642.
- Sirot, D., Sirot, J., Labia, R., Morand, A., Courvalin, P., Darfeuille-Michaud, A., et al. (1987). Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* 20, 323–334. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3316146> [Accessed April 30, 2018].
- Sköld, O. (2000). Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist. Updat.* 3, 155–160. doi:10.1054/drup.2000.0146.
- Sköld, O. (2001). Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet. Res.* 32, 261–273. Available at: <https://www.vetres.org/articles/vetres/pdf/2001/03/v1304.pdf> [Accessed May 1, 2018].
- Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C., and de La Cruz, F. (2010). Mobility of Plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 434–452. doi:10.1128/MMBR.00020-10.
- Solheim, H. T., Sekse, C., Urdahl, A. M., Wasteson, Y., and Nesse, L. L. (2013). Biofilm as an Environment for Dissemination of stx Genes by Transduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 896 – 900. doi:10.1128/AEM.03512-12.
- Solioz, M., Yen, H.-C., and Marrs, B. (1975). Release and Uptake of Gene Transfer Agent by *Rhodopseudomonas capsulata*. *J. Bacteriol.* 123, 651–657. Available at: <http://jb.asm.org/content/123/2/651.full.pdf> [Accessed April 30, 2018].

- Solomon, B. (2008). Filamentous Bacteriophage as a Novel Therapeutic Tool for Alzheimer's Disease Treatment. *J. Alzheimer's Dis.* 15, 193–198. doi:10.3233/JAD-2008-15205.
- Sommer, M. O. A., Church, G. M., and Dantas, G. (2010). The human microbiome harbors a diverse reservoir of antibiotic resistance genes. *Virulence* 1, 299–303. doi:10.1126/science.1176950.
- Sommer, M. O. A., Dantas, G., and Church, G. M. (2009). Functional Characterization of the Antibiotic Resistance Reservoir in the Human Microflora. *Science* 325, 1128–1131. doi:10.1126/science.1176516.
- Soriano, G., Esparcia, Ó., Montemayor, M., Guarner-Argente, C., Pericas, R., Torras, X., et al. (2011). Bacterial DNA in the diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 33, 275–284. doi:10.1111/j.1365-2036.2010.04506.x.
- Souza, K. A., Ginoza, H. S., and Haight, R. D. (1972). Isolation of a Polyvalent Bacteriophage for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Aerobacter Aerogenes*. *J. Virol.* 9, 851–856. Available at: <http://jvi.asm.org/content/9/5/851.full.pdf> [Accessed April 29, 2018].
- Srinivasiah, S., Bhavsar, J., Thapar, K., Liles, M., Schoenfeld, T., and Wommack, K. E. (2008). Phages across the biosphere: contrasts of viruses in soil and aquatic environments. *Res. Microbiol.* 159, 349–357. doi:10.1016/j.resmic.2008.04.010.
- Srivastava, A. S., Chauhan, D. P., and Carrier, E. (2004a). In utero detection of T7 phage after systemic administration to pregnant mice. *Biotechniques* 37, 81–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15283204> [Accessed April 29, 2018].
- Srivastava, A. S., Kaido, T., and Carrier, E. (2004b). Immunological factors that affect the in vivo fate of T7 phage in the mouse. *J. Virol. Methods* 115, 99–104. doi:10.1016/j.jviromet.2003.09.009.
- Sternberg, N., and Coulby, J. N. (1990). Cleavage of the bacteriophage P1 packaging site (pac) is regulated by adenine methylation. *PNAS* 87, 8070–8074. doi:10.1016/0378-1119(88)90287-9.
- Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Hooper, D. C., and Robicsek, A. (2009). Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 664–689. doi:10.1128/CMR.00016-09.
- Subirats, J., Sánchez-Melsió, A., Borrego, C. M., Balcázar, J. L., and Simonet, P. (2016). Metagenomic analysis reveals that bacteriophages are reservoirs of antibiotic resistance genes. *Int. J. Antimicrob. Agents* 48, 163–167. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.04.028.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., and Morris, J. G. (2001). Minireview Bacteriophage Therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 649–659. doi:10.1128/AAC.45.3.649-659.2001.
- Suttle, C. A. (2005). Viruses in the sea. *Nature* 437, 356–361. doi:10.1038/nature04160.
- Suttle, C. A., and Chan, A. M. (1994). Dynamics and Distribution of Cyanophages and Their Effect on Marine *Synechococcus spp.* *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3167–3174. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC201785/pdf/aem00026-0141.pdf> [Accessed April 29, 2018].
- Tato, M., Coque, T. M., Baquero, F., and Cantón, R. (2010). Dispersal of Carbapenemase bla VIM-1 Gene Associated with Different Tn402 Variants, Mercury Transposons, and Conjugative Plasmids in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 320–327. doi:10.1128/AAC.00783-09.
- Tejedor, C., Foulds, J., and Zasloff, M. (1982). Bacteriophages in Sputum of Patients with Bronchopulmonary *Pseudomonas* Infections. *Infect. Immun.* 36, 440–441. Available at: <http://iai.asm.org/content/36/1/440.full.pdf> [Accessed May 7, 2018].
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Am. J. Med.* 119, S3–S10. doi:10.1016/j.amjmed.2006.03.011.
- Thannesberger, J., Hellinger, H.-J., Klymiuk, I., Kastner, M.-T., Rieder, F. J. J., Schneider, M., et al.

- (2017). Viruses comprise an extensive pool of mobile genetic elements in eukaryote cell cultures and human clinical samples. *FASEB J.* 31, 1987–2000. doi:10.1096/fj.201601168R.
- Thierauf, A., Perez, G., and Maloy, S. (2009). 'Generalized Transduction', in *Bacteriophages Methods and Protocols*, eds. M. R. J. Clokie and A. M. Kropinski (New York, USA: Humana Press), 267–286. doi:10.1007/978-1-60327-164-6.
- Thomas, T., Gilbert, J., and Meyer, F. (2012). Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microb. Inform. Exp.* 2, 3. doi:10.1186/2042-5783-2-3.
- Thurber, R. V., Haynes, M., Breitbart, M., Wegley, L., and Rohwer, F. (2009). Laboratory procedures to generate viral metagenomes. *Nat. Protoc.* 4, 470–483. doi:10.1038/nprot.2009.10.
- Touchon, M., Moura De Sousa, J. A., and PC Rocha, E. (2017). Embracing the enemy: the diversification of microbial gene repertoires by phage-mediated horizontal gene transfer. *Curr. Opin. Microbiol.* 38, 66–73. doi:10.1016/j.mib.2017.04.010.
- Twort, F. W. (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Bacteriophage* 186, 127–129. doi:10.1016/S0140-6736(01)20383-3.
- Vaara, M., Plachy, W. Z., and Nikaido, H. (1990). Partitioning of hydrophobic probes into lipopolysaccharide bilayers. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes* 1024, 152–158. doi:10.1016/0005-2736(90)90218-D.
- Valverde, A., Coque, T. M., Paz Sánchez-Moreno, M., Rollán, A., Baquero, F., and Cantón, R. (2004). Dramatic Increase in Prevalence of Fecal Carriage of Extended-Spectrum B-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae during Nonoutbreak Situations in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4769–4775. doi:10.1128/JCM.42.10.4769–4775.2004.
- Van Bambeke, F., Balzi, E., and Tulkens, P. M. (2000). Antibiotic Efflux Pumps. *Biochem. Pharmacol.* 60, 457–470. Available at: https://ac-els-cdn-com.sire.ub.edu/S0006295200002914/1-s2.0-S0006295200002914-main.pdf?_tid=d8efdbba-897c-405a-8295-c275b75183b2&acdnat=1525088625_2d8eda85d29a67330f964753d7428532 [Accessed April 30, 2018].
- Van Hoek, A. H. A. M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P., and Aarts, H. J. M. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front. Microbiol.* 2, 203. doi:10.3389/fmicb.2011.00203.
- Ventola, C. L. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis Part 1: Causes and Threats. *Pharm. Ther.* 40, 277–283. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378521/pdf/ptj4004277.pdf> [Accessed March 1, 2018].
- Virgin, H. W. (2014). The Virome in Mammalian Physiology and Disease. *Cell* 157, 142–150. doi:10.1016/j.cell.2014.02.032.
- Volkman, H., Schwartz, T., Bischoff, P., Kirchen, S., and Obst, U. (2004). Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *J. Microbiol. Methods* 56, 277–286. doi:10.1016/j.mimet.2003.10.014.
- Vollmers, J., Wiegand, S., and Kaster, A.-K. (2017). Comparing and Evaluating Metagenome Assembly Tools from a Microbiologist's Perspective - Not Only Size Matters! *PLoS One* 12, e0169662. doi:10.1371/journal.pone.0169662.
- von Wintersdorff, C. J. H., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., et al. (2016). Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Front. Microbiol.* 7, 173. doi:10.3389/fmicb.2016.00173.
- Vos, M., Hesselman, M. C., Te Beek, T. A., Van Passel, M. W. J., and Eyre-Walker, A. (2015). Rates of Lateral Gene Transfer in Prokaryotes: High but Why? *Trends Microbiol.* 23, 598–605.

- doi:10.1016/j.tim.2015.07.006.
- Wagner, J., Maksimovic, J., Farries, G., Sim, W. H., Bishop, R. F., Cameron, D. J., et al. (2013). Bacteriophages in Gut Samples From Pediatric Crohn's Disease Patients: Metagenomic Analysis Using 454 Pyrosequencing. *Inflamm. Bowel Dis.* 19, 1598–1608. doi:10.1097/MIB.0b013e318292477c.
- Wagner, P. L., and Waldor, M. K. (2002). Bacteriophage Control of Bacterial Virulence. *Infect. Immun.* 70, 3985–3993. doi:10.1128/IAI.70.8.3985–3993.2002.
- Waksman, S. A., and Flynn, J. E. (1973). History of the word 'antibiotic'. *J. Hist. Med. Allied Sci.* 28, 284–286. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4575271> [Accessed April 30, 2018].
- Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L., and Patrice, N. (2005). Metallo-B-Lactamases: the Quiet before the Storm? *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 306–325.
- Wan, Y., Renner, D. W., Albert, I., and Szpara, M. L. (2015). VirAmp: a galaxy-based viral genome assembly pipeline. *Gigascience* 4, 19. doi:10.1186/s13742-015-0060-y.
- Wax, R. G., Lewis, K., Salyers, A. A., and Taber, H. (2007). *Bacterial resistance to antimicrobials*. Second Edition. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.
- Weber-Dabrowska, B., Dabrowski, M., and Slopek, S. (1987). Studies on bacteriophage penetration in patients subjected to phage therapy. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 35, 563–568. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3332066> [Accessed April 29, 2018].
- Weigel, L. M., Clewell, D. B., Gill, S. R., Clark, N. C., McDougal, L. K., Flannagan, S. E., et al. (2003). Genetic Analysis of a High-Level Vancomycin-Resistant Isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 302, 1569–1571.
- Weinbauer, M. G. (2004). Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 127–181. doi:10.1016/j.femsre.2003.08.001.
- Weldhagen, G. F., Poirel, L., and Nordmann, P. (2003). Ambler Class A Extended-Spectrum B-Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Developments and Clinical Impact. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2385–2392.
- WHO (2014). Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance. Geneva, Switzerland Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf;jsessionid=AC9F68165B10BE0893DF2E7AC126C2CF?sequence=1 [Accessed April 30, 2018].
- Wiggins, B. A., and Alexander, M. (1985). Minimum Bacterial Density for Bacteriophage Replication: Implications for Significance of Bacteriophages in Natural Ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 19–23. Available at: <http://aem.asm.org/content/49/1/19.full.pdf> [Accessed January 7, 2018].
- Wilke, M. S., Lovering, A. L., and Strynadka, N. C. (2005). B-Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 525–533. doi:10.1016/j.mib.2005.08.016.
- Willi, K., Sandmeier, H., Kulik, E. M., and Meyer, J. (1997). Transduction of antibiotic resistance markers among *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains by temperate bacteriophages Aa phi 23. *C. Cell. mol. life sci* 53, 904–910. Available at: <https://link-springer-com.sire.ub.edu/content/pdf/10.1007%2F000180050109.pdf> [Accessed February 4, 2018].
- Willner, D., Furlan, M., Haynes, M., Schmieder, R., Angly, F. E., Silva, J., et al. (2009). Metagenomic Analysis of Respiratory Tract DNA Viral Communities in Cystic Fibrosis and Non-Cystic Fibrosis Individuals. *PLoS One* 4, e7370. doi:10.1371/journal.pone.0007370.
- Winter, C., Smit, A., Herndl, G. J., and Weinbauer, M. G. (2004). Impact of Virioplankton on Archaeal and Bacterial Community Richness as Assessed in Seawater Batch Cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 804–813. doi:10.1128/AEM.70.2.804–813.2004.
- Wolf, A., Wiese, J., Jost, G., and Witzel, K.-P. (2003). Wide Geographic Distribution of Bacteriophages

- That Lyse the Same Indigenous Freshwater Isolate (*Sphingomonas* sp. Strain B18). *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2395–2398. doi:10.1128/AEM.69.4.2395–2398.2003.
- Wood, D. E., and Salzberg, S. L. (2014). Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol.* 15, R46. Available at: <http://ccb.jhu.edu/software/kraken/>. [Accessed March 1, 2018].
- Wozniak, R. A. F., and Waldor, M. K. (2010). Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 552–563. doi:10.1038/nrmicro2382.
- Wright, G. D. (2007). The antibiotic resistome: The nexus of chemical and genetic diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 175–186. doi:10.1038/nrmicro1614.
- Wright, G. D. (2010a). Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? *BMC Biol.* 8, 123. Available at: <https://bmcbiol.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1741-7007-8-123> [Accessed May 8, 2018].
- Wright, G. D. (2010b). The antibiotic resistome. *Expert Opin. Drug Discov.* 5, 779–788. doi:10.1517/17460441.2010.497535.
- Yamamoto, T., Kojio, S., Taneike, I., Nakagawa, S., Iwakura, N., and Wakisaka-Saito, N. (2003). ⁶⁰Co irradiation of Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* induces Stx phage. *FEMS Microbiol. Lett.* 222, 115–121. doi:10.1016/S0378-1097(03)00259-3.
- Yaron, S., Kolling, G. L., Simon, L., and Matthews, K. R. (2000). Vesicle-Mediated Transfer of Virulence Genes from *Escherichia coli* O157:H7 to Other Enteric Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4414–4420. Available at: <http://aem.asm.org/content/66/10/4414.full.pdf> [Accessed May 21, 2018].
- Youle, M., Haynes, M., and Rohwer, F. (2012). ‘Scratching the Surface of Biology’s Dark Matter’, in *Viruses: Essential Agents of Life*, ed. G. Witzany (Dordrecht: Springer Netherlands), 61–81. doi:10.1007/978-94-007-4899-6_4.
- Yu, P., Mathieu, J., Li, M., Dai, Z., and Alvarez, P. J. J. (2016). Isolation of Polyvalent Bacteriophages by Sequential Multiple-Host Approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 808–815. doi:10.1128/AEM.02382-15.
- Zadoks, R. N., Van Leeuwen, W. B., Kreft, D., Fox, L. K., Barkema, H. W., Schukken, Y. H., et al. (2002). Comparison of *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine and Human Skin, Milking Equipment, and Bovine Milk by Phage Typing, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Binary Typing. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3894–3902. doi:10.1128/JCM.40.11.3894-3902.2002.
- Zakharova, I. B., and Viktorov, D. V. (2015). Integrative conjugative elements (ICEs) of microorganisms. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 30, 114–123. doi:10.3103/S0891416815030076.
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., et al. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2640–2644. doi:10.1093/jac/dks261.
- Zárate, S., Taboada, B., Yocupicio-Monroy, M., and Arias, C. F. (2017). Human Virome. *Arch. Med. Res.* 48, 701–716. doi:10.1016/j.arcmed.2018.01.005.
- Zehr, E. S., Tabatabai, L. B., and Bayles, D. O. (2012). Genomic and proteomic characterization of SuMu, a Mu-like bacteriophage infecting *Haemophilus parasuis*. *BMC Genomics* 13, 331. doi:10.1186/1471-2164-13-331.
- Zhang, Y., Agidi, S., and LeJeune, J. T. (2009). Diversity of staphylococcal cassette chromosome in coagulase-negative staphylococci from animal sources. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1375–1383. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04322.x.
- Zhu, W., Clark, N. C., McDougal, L. K., Hageman, J., McDonald, L. C., and Patel, J. B. (2008).

- Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Associated with Inc18-Like vanA Plasmids in Michigan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 452–457. doi:10.1128/AAC.00908-07.
- Zinder, N. D., and Lederberg, J. (1952). Genetic Exchange in Salmonella. *J. Bacteriol.* 64, 679–699. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC169409/pdf/jbacter00011-0097.pdf> [Accessed April 30, 2018].

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1. Otras publicaciones

Otras publicaciones del mismo autor que no fueron incluidas en esta tesis (orden cronológico):

- 1) **Brown-Jaque M, Calero-Cáceres W, Muniesa M.** 2015. Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements. *Plasmid*. 79:1-7.
- 2) **Tóth I, Sváb D, Bálint B, Brown-Jaque M, Maróti G.** 2016. Comparative analysis of the Shiga toxin converting bacteriophage first detected in *Shigella sonnei*. *Infect Genet Evol*. 37:150-7.
- 3) **Quirós P, Brown-Jaque M, Muniesa M.** 2016. Spread of bacterial genomes in packaged particles. *Future Microbiol*. 11(2):171-3.
- 4) **López-Goñi I, Martínez-Viñas MJ, Antón J, Cid VJ, González AM, Brown-Jaque M, García-Lobo JM, Sánchez M, Vilchez JI, Robledo-Mahón T, Seder-Colomina M, Tapia-Paniagua ST, de Rojas AH, Mira A, Gallego-Parrilla JJ, Díaz TM, Prieto SM, Villalobo E, Quindós G, Balboa S, Romalde JL, Aguilar-Pérez C, Tomás A, Linares M, Zaragoza Ó, Gil-Serna J, Ferrer-Espada R, Camacho AI, Vinué L, García-Lara J.** 2016. Twitter as a Tool for Teaching and Communicating Microbiology: The #microMOOCSEM Initiative. *J Microbiol Biol Educ*. 17(3):492-494.
- 5) **Piedra-Carrasco N, Fàbrega A, Calero-Cáceres W, Cornejo-Sánchez T, Brown-Jaque M, Mir-Cros A, Muniesa M, González-López JJ.** 2017. Carbapenemase-producing enterobacteriaceae recovered from a Spanish river ecosystem. *PLoS One*. 12(4):e0175246.
- 6) **Larrañaga O, Brown-Jaque M, Quirós P, Gómez-Gómez C, Blanch AR, Rodríguez-Rubio L, Muniesa M.** 2018. Phage particles harboring antibiotic resistance genes in fresh-cut vegetables and agricultural soil. *Environ Int*. 115:133-141.



Review

Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements



Maryury Brown-Jaque, William Calero-Cáceres, Maite Muniesa *

Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 December 2014

Accepted 13 January 2015

Available online 15 January 2015

Communicated by Saleem Khan

Keywords:

Bacteriophages

MGE

Antibiotic resistance

ICE

GTA

ABSTRACT

Antibiotic resistance is a major concern for society because it threatens the effective prevention of infectious diseases. While some bacterial strains display intrinsic resistance, others achieve antibiotic resistance by mutation, by the recombination of foreign DNA into the chromosome or by horizontal gene acquisition. In many cases, these three mechanisms operate together. Several mobile genetic elements (MGEs) have been reported to mobilize different types of resistance genes and despite sharing common features, they are often considered and studied separately. Bacteriophages and phage-related particles have recently been highlighted as MGEs that transfer antibiotic resistance. This review focuses on phages, phage-related elements and on composite MGEs (phages-MGEs) involved in antibiotic resistance mobility. We review common features of these elements, rather than differences, and provide a broad overview of the antibiotic resistance transfer mechanisms observed in nature, which is a necessary first step to controlling them.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	1
2. Classic elements involved in ARG transfer	2
2.1. MGEs that mediate ARG transfer with cell–cell contact	2
2.2. MGEs that mediate ARG transfer without cell–cell contact	4
3. MGEs composed by phages or phage-related elements	5
3.1. Plasmid-phage	5
3.2. Transposon-phage	5
3.3. GI-phage	5
3.4. Gene transfer agents (GTA)	5
4. Concluding remarks	6
Acknowledgments	6
References	6

1. Introduction

Bacterial genomes exhibit dynamic plasticity and are shaped by horizontal gene transfer (HGT), genome rearrangement, and the activities of mobile DNA elements (Darmon and Leach, 2014). The number of reports of HGT mechanisms between distinct organisms has

* Corresponding author. Department of Microbiology, Faculty of Biology, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain. Fax: +34 3 4039047. E-mail address: mmuniesa@ub.edu (M. Muniesa).



Research paper

Comparative analysis of the Shiga toxin converting bacteriophage first detected in *Shigella sonnei*István Tóth^{a,*}, Domonkos Sváb^a, Balázs Bálint^b, Maryury Brown-Jaque^c, Gergely Maróti^d^a Institute for Veterinary Medical Research, Centre for Agricultural Research, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary^b Seqomics Biotechnology Ltd., Mórahalom, Hungary^c Department of Microbiology, University of Barcelona, Barcelona, Spain^d Institute of Biochemistry, Biological Research Centre, Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Hungary

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 September 2015

Received in revised form 13 November 2015

Accepted 21 November 2015

Available online 23 November 2015

Keywords:

Shiga toxin (Stx)

Stx prototype

*Shigella sonnei**S. dysenteriae*

Converting phage

Stx-producing *Escherichia coli* (STEC)

ABSTRACT

Here we report the first complete nucleotide sequence of a Shiga toxin (Stx) converting phage from a *Shigella sonnei* clinical isolate that harbors *stx1* operon, first identified in the chromosome of *Shigella dysenteriae* type 1. The phage named *Shigella* phage 75/02 Stx displayed *Podoviridae* morphology. It proved to be transferable to *Escherichia coli* K-12 strains, and cytotoxicity of the lysogenized strains was demonstrated in Vero cell cultures. Genomic analysis revealed that the prophage genome is circular and its size is 60,875 nt that corresponds to 76 ORFs. The genome of *Shigella* phage 75/02 Stx shows a great degree of mosaic structure and its architecture is related to lambdoid phages. All the deduced proteins, including the 37 hypothetical proteins showed significant homologies to Stx phage proteins present in databases. The phage uniformly inserted into the *ynfG* oxidoreductase gene framed by phage integrase and antirepressor genes in parental *S. sonnei* and in the three lysogenized K-12 strains C600, DH5 α and MG1655. The Stx1 prophage proved to be stable in its bacterial hosts and remained inducible.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Shiga toxigenic *E. coli* (STEC) strains establish a group of pathogens with significant public health concern worldwide. Infection is usually characterized by diarrhea and hemorrhagic colitis (HC) that can lead to the development of life-threatening hemolytic-uremic syndrome (HUS) mediated by Shiga toxins (Stx) (reviewed by Kaper et al., 2004).

Shiga toxins as the key virulence factor of STEC and enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) strains are very effective protein synthesis inhibitors due to inactivating the 60S subunit of ribosome (Reisbig et al., 1981). Stx was first reported in *Shigella dysenteriae* type 1 more than a century ago (Trofa et al., 1999). Shiga toxins show great variety of toxins that can be categorized into Stx1 and Stx2 main types and these types include several subtypes and variants (Scheutz et al., 2012). So far three Stx1 (stx1a, stx1c, stx1d) and seven Stx2 (stx2a to stx2g) subtypes were identified in reflecting their relationship to Stx1 from *S. dysenteriae* type 1, the prototype toxin for the family (Calderwood et al., 1996; Scheutz et al., 2012).

The *stx* operon (*stxAB*) is located in the genomes of inducible lambdoid prophages (O'Brien et al., 1984) or in defective prophage remnants (McDonough and Buttermont, 1999; Unkmeir and Schmidt, 2000). Stx operons are consisting of the *stxA* and *stxB* subunit genes which encode the AB₅ holotoxin. Following infection of a susceptible *E. coli* strain by an induced Stx prophages, they are maintained into a lysogenic state in the host chromosome. The *stx* genes are located in the late gene region between the antiterminator gene Q gene and holing lysis protein gene of the prophages (Neely and Friedman, 1998; Plunkett et al., 1999). Since these genes are co-regulated, strong Stx expression and the phage lysis are both observable upon phage induction (Allison, 2007; Neely and Friedman, 1998). Importantly, the phage lysis genes provide a mechanism of the Shiga toxin release from the bacterial cells by the phage mediated bacterial lysis (Neely and Friedman, 1998). Stx phages show great diversity but they frequently integrate to characteristic integration sites in the bacterial chromosome if it is available (reviewed by Muniesa and Schmidt, 2014).

Stx phages have driven and are driving the evolution of STEC and STEC-like pathogens (Allison, 2007). Since the emergence of EHEC O157:H7 (Riley et al., 1983) more than 500 different serogroups of STEC have been reported as well as a few other organisms (Allison, 2007). Recently in 2011 a highly virulent EHEC O104:H4 strain has emerged and caused severe outbreak in Germany (Mellmann et al., 2011).

Importantly the genome of the Stx phages could contain further virulence related genes including type three secretion system effectors

* Corresponding author at: Institute for Veterinary Medical Research, Centre for Agricultural Research, Hungarian Academy of Sciences, H-1143 Budapest, Hungária krt. 21, Hungary.

E-mail addresses: tothi@vmri.hu (I. Tóth), svab.domonkos@agrar.mta.hu (D. Sváb), balintb@seqomics.hu (B. Bálint), mbrownja7@alumnes.ub.edu (M. Brown-Jaque), marotig@brc.hu (G. Maróti).

EDITORIAL

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Spread of bacterial genomes in packaged particles



Pablo Quirós¹, Maryury Brown-Jaque¹ & Maite Muniesa^{*1}

First draft submitted: 5 November 2015; Accepted for publication: 24 November 2015; Published online: 5 February 2016

Bacteria can evolve through mutations that can be transferred vertically, to the progeny, or horizontally, by acquisition or loss of genomic contents. When considering the exchange of the determinants of virulence or antimicrobial resistance genes between bacterial pathogens that can cause an infection, horizontal gene transfer becomes a major concern for modern medicine. Horizontal gene transfer is mediated by mobile genetic elements such as plasmids, transposons, integrative conjugative elements, integrons, mobile pathogenicity islands and bacteriophages.

In 1974, studies focusing on the marine bacterium *Rhodobacter capsulatus* reported extracellular elements that were capable of transferring genetic traits between strains [1]. Those elements were called gene transfer agents (GTAs) and showed a high frequency of transfer of antibiotic resistance genes; three orders of magnitude higher than any other known mechanism of genetic transfer [2]. GTAs are particles that resemble a bacteriophage capsid

(sometimes tailed). The genes that encode for the capsid are located in the ‘donor’ bacteria. Once formed upon entry into the stationary phase, the capsid packages DNA fragments from the donor bacteria. GTAs are subsequently released from the cells through cell lysis and can transfer their DNA content to other recipient bacteria [3].

Despite their resemblance to bacteriophages, GTAs display important differences. For instance, the donor bacterial cell possesses genes that encode capsid structural proteins and proteins involved in DNA packaging, but lack other bacteriophage genes. GTA genes are only present in the donor bacteria and are not transferred to the recipient bacteria. When compared with generalized transduction mediated by phages, the main difference is that GTA transfer does not require previous infection by a phage particle [3], because the information for DNA packaging by GTAs is already present in the bacteria. Theoretically, any bacterial gene may be transferred by GTAs, and the only

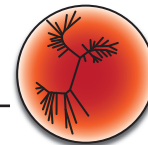
KEYWORDS

• bacterial evolution
• bacteriophages • horizontal gene transfer • mobile genetic element

“Bacteria can evolve through mutations that can be transferred vertically, to the progeny, or horizontally, by acquisition or loss of genomic contents.”

¹Department of Microbiology, University of Barcelona, Diagonal 645, Annex, Floor 0, 08028 Barcelona, Spain

*Author for correspondence: Tel.: +34 93 403 9386; Fax: +34 93 403 9047; mmuniesa@ub.edu



Twitter as a Tool for Teaching and Communicating Microbiology: The #microMOOCSEM Initiative †

Ignacio López-Goñi^{1*}, M^a José Martínez-Viñas², Josefa Antón³, Víctor J. Cid⁴, Ana Martín González⁵, Maryury Brown-Jaque⁶, Juan M. García-Lobo⁷, Manuel Sánchez⁸, Juan Ignacio Vilchez⁹, Tatiana Robledo-Mahón⁹, Marina Seder-Colomina¹⁰, Silvana Teresa Tapia-Paniagua¹¹, Alma Hernández de Rojas¹², Alejandro Mira¹³, José Jesús Gallego-Parrilla¹⁴, Teresa María López Díaz¹⁵, Sergi Maicas i Prieto¹⁶, Eduardo Villalobo¹⁷, Guillermo Quindós¹⁸, Sabela Balboa¹⁹, Jesús L. Romalde¹⁹, Clara Aguilar-Pérez²⁰, Anna Tomás²¹, María Linares²², Óscar Zaragoza²³, Jéssica Gil-Serna⁵, Raquel Ferrer-Espada¹, Ana I. Camacho¹, Laura Vinué²⁴, and Jorge García-Lara²⁵

¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Navarra, Pamplona, Spain, ²Secció Departamental de Microbiologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, ³Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología, Universidad de Alicante, Alicante, Spain, ⁴Departamento de Microbiología II, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, ⁵Departamento de Microbiología III, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, ⁶Departamento de Genética, Microbiología y Estadística, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁷Instituto de Biotecnología y Biomedicina de Cantabria, Santander, Spain, ⁸Departamento de Producción Vegetal y Microbiología, Universidad Miguel Hernández, Elche, Spain, ⁹Instituto del Agua, Universidad de Granada, Granada, Spain, ¹⁰Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Fontenay-aux-Roses, France, ¹¹Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Málaga, Spain, ¹²Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Gijón, Gijón, Spain, ¹³Centro Superior de Investigación en Salud Pública, Fundación FISABIO, Valencia, Spain, ¹⁴Grupo de Docencia y Difusión de la Microbiología, Sociedad Española de Microbiología, Spain, ¹⁵Departamento Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, León, Spain, ¹⁶Departament de Microbiologia i Ecologia, Universitat de València, Valencia, Spain, ¹⁷Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain, ¹⁸Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad País Vasco, Bilbao, Spain, ¹⁹Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain, ²⁰Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain, ²¹Departamento de Microbiología, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ²²Hospital Doce de Octubre-CNIO, Madrid, Spain, ²³Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, ISCIII, Madrid, Spain, ²⁴Division of Infectious Diseases, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA, ²⁵School of Medicine, University of Central Lancashire, Preston, UK

INTRODUCTION

Social networks are already being exploited for searching, storing, and sharing knowledge, demonstrating that they are an efficient vehicle for social learning. Consequently, they could be implemented as a competent tool for formal learning. Twitter is among the 10 most popular

online social networks, integrating a community of over 500 million users around the world. Twitter has already been used in several educational programs and evaluated as a positive teaching experience with an outstanding potential in academic and educational environments (1–6). However, there are scarce examples available in the literature about its use in science teaching and communication. In this work, we present and analyze the application of Twitter to create an online space for communication and learning of basic microbiology. With this aim, a team of professionals in the field has imparted, to our knowledge, the first worldwide open access microbiology course via

*Corresponding author. Mailing address: Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Navarra, C/ Irunlarrea n° 1, 31008, Pamplona, Spain. Phone: +34 948 425600. E-mail: ilgoni@unav.es.

†Supplemental materials available at <http://asmscience.org/jmbe>

RESEARCH ARTICLE

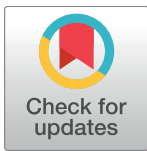
Carbapenemase-producing enterobacteriaceae recovered from a Spanish river ecosystem

Núria Piedra-Carrasco¹*, Anna Fàbrega¹*, William Calero-Cáceres², Thais Cornejo-Sánchez¹, Maryury Brown-Jaque², Alba Mir-Cros¹, Maite Muniesa², Juan José González-López¹*

1 Department of Clinical Microbiology, Hospital Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, **2** Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

* These authors contributed equally to this work.

* jjgonzal@vhebron.net (JGL); anna.fabrega@vhir.org (AF)



OPEN ACCESS

Citation: Piedra-Carrasco N, Fàbrega A, Calero-Cáceres W, Cornejo-Sánchez T, Brown-Jaque M, Mir-Cros A, et al. (2017) Carbapenemase-producing enterobacteriaceae recovered from a Spanish river ecosystem. PLoS ONE 12(4): e0175246. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175246>

Editor: Yung-Fu Chang, Cornell University, UNITED STATES

Received: December 14, 2016

Accepted: March 22, 2017

Published: April 5, 2017

Copyright: © 2017 Piedra-Carrasco et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad (<http://www.mineco.gob.es/>), Instituto de Salud Carlos III (<http://www.isciii.es/>), co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF) 'A Way to Achieve Europe' (http://ec.europa.eu/regional_policy/en/funding/erdf/), the Spanish Network for

Abstract

The increasing resistance to carbapenems is an alarming threat in the fight against multiresistant bacteria. The dissemination properties of antimicrobial resistance genes are supported by their detection in a diverse population of bacteria, including strains isolated from the environment. The objective of this study was to investigate the presence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) collected from a river ecosystem in the Barcelona metropolitan area (Spain). Identification of β -lactamases and other resistance determinants was determined as was the antimicrobial susceptibility profile. Moreover, screening of virulence factors, plasmid addiction systems, plasmid partition systems and replicon typing was performed. The results identified 8 isolates belonging to different species (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Raoultella ornithinolytica*). The most prevalent enzyme was KPC-2 (n = 6), followed by VIM-1 (n = 2) and IMI-2 (n = 1), whereas no OXA-48-type was detected. In addition, one strain was positive for both KPC-2 and VIM-1 enzymes. All the carbapenemase-encoding plasmids carried at least one plasmid addiction or partition system, being *vagCD* and *parAB* the most frequently detected, respectively. *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates carried a low number of virulence-associated factors and none of the detected clones has previously been identified in the clinical setting. These findings support the high dissemination potential of the carbapenemase-encoding genes and reinforce the idea that the environment is another reservoir that may play an important role in the capture, selection and dissemination of carbapenem resistance genes.

Introduction

The current therapeutic options to combat infections caused by the increasingly detected *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates resistant to third and/or fourth generation cephalosporins are becoming increasingly fewer [1]. Carbapenems are usually the last



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Environment International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envint

Phage particles harboring antibiotic resistance genes in fresh-cut vegetables and agricultural soil



Olatz Larrañaga, Maryury Brown-Jaque, Pablo Quirós, Clara Gómez-Gómez, Anicet R. Blanch, Lorena Rodríguez-Rubio, Maite Muniesa*

Department of Genetics, Microbiology and Statistics, University of Barcelona, Diagonal 643, Annex, Floor 0, E-08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Bacteriophages
Antibiotic resistance genes
Cropland
Lettuce
Cucumber
Spinach

ABSTRACT

Bacteriophages are ubiquitously distributed prokaryotic viruses that are more abundant than bacteria. As a consequence of their life cycle, phages can kidnap part of their host's genetic material, including antibiotic resistance genes (ARGs), which released phage particles transfer in a process called transduction. The spread of ARGs among pathogenic bacteria currently constitutes a serious global health problem. In this study, fresh vegetables (lettuce, spinach and cucumber), and cropland soil were screened by qPCR for ten ARGs (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1} group, *bla*_{CTX-M-9} group, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, *mecA*, *sulI*, *qnrA*, *qnrS* and *armA*) in their viral DNA fraction. The presence of ARGs in the phage DNA was analyzed before and after propagation experiments in an *Escherichia coli* host strain to evaluate the ability of the phage particles to infect a host. ARGs were found in the phage DNA fraction of all matrices, although with heterogeneous values. ARG prevalence was significantly higher in lettuce and soil, and the most common overall were β-lactamases. After propagation experiments, an increase in ARG densities in phage particles was observed in samples of all four matrices, confirming that part of the isolated phage particles were infectious. This study reveals the abundance of free, replicative ARG-containing phage particles in vegetable matrices and cropland soil. The particles are proposed as vehicles for resistance transfer in these environments, where they can persist for a long time, with the possibility of generating new resistant bacterial strains. Ingestion of these mobile genetic elements may also favor the emergence of new resistances, a risk not previously considered.

1. Introduction

The consumption of vegetables is accepted as part of a healthy lifestyle, especially when freshly cut. Vegetables cultivated in open fields are susceptible to contamination by microorganisms (Berger et al., 2010), mainly via soil, organic fertilizers, and irrigation water (Semenov and Franz, 2008; Tyler and Triplett, 2008). Moreover, as these foods are often consumed raw, microorganisms can persist on their surfaces despite good washing practices. Although not considered as contaminants, bacteriophages, or more precisely phage particles, have recently been explored as elements involved in horizontal gene transfer among bacterial species. The persistence of phage particles in different environmental conditions, greater than that of their bacterial hosts (Calero-Cáceres and Muniesa, 2016; Lucena et al., 2004; Skrabber et al., 2009), allows them to act as environmental reservoirs of the genes they mobilize.

Among genes of interest for human health, those encoding antibiotic resistances are of increasing concern because of their ability to generate

new multiresistant strains, rendering antibiotic treatments ineffective (World Health Organization, 2011). Resistance to antibiotics is as old as the antimicrobials themselves, which have existed in bacterial ecosystems for billions of years (von Wintersdorff et al., 2016), forming part of the competitive and antagonistic relations among microorganisms. However, over the last decades, resistances have become an increasingly serious global problem, arising from their overuse, globalization and industrialization (Ventola, 2015). Excessive application of antibiotics in areas such as medicine, livestock and even aquaculture has led to the excretion of antibiotics virtually unchanged into the environment, where they exert selective pressures on bacterial communities. Several species of environmental bacteria are known to be responsible for the transfer of resistance to pathogenic bacteria, as is the case of the genes *bla*_{CTX-M} with species of *Kluyvera* (Humeniuk et al., 2002), *qnrA* with *Shewanella algae* (Poirel et al., 2005), *qnrS* with *Vibrio splendidus* (Cattoir et al., 2007), and *bla*_{OXA-48} in other species of *Shewanella* (Cummings et al., 2011), etc. Wastewater from populated areas and treatment plants and the sludges they produce are considered “hot

* Corresponding author.

E-mail address: mmuniesa@ub.edu (M. Muniesa).

8.2. Anexo 2. Medios de cultivo, tampones y soluciones

Medios de cultivo

Caldo LB (Luria-Bertani):

10 g triptona

5 g extracto de levadura

10 g NaCl

1 L agua destilada

Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos y almacenar a 4°C.

LBss (semisólido):

10 g triptona

5 g extracto de levadura

10 g NaCl

1 L agua destilada

Dispensar en botellas de 100 ml, agregar 0,76 g de Agar Bacteriológico Europeo a cada botella y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Una vez estéril, suplementar con 0,6 ml de CaCl₂ 1M por cada 100 ml de medio de cultivo y almacenar a 4°C.

Agar LB:

10 g triptona

5 g extracto de levadura

10 g NaCl

15 g Agar Bacteriológico Europeo

1 L agua destilada

Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos, dispensar en placas de Petri y almacenar las placas a 4°C. Nota: Si se requiere el medio suplementado con algún antibiótico, después de esterilizar se deja enfriar hasta unos 50°C y se añade el antibiótico a la concentración adecuada antes de dispensarlo.

Caldo TSB (Trypticasein Soy Broth):

17 g caseína peptona

3 g peptona de soja

5 g NaCl

2,5 g KH₂PO₄

2,5 g dextrosa

1 L agua destilada

Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos y almacenar a 4°C.

TSA (Trypticasein Soy Agar):

40 g TSA comercial

1 L agua destilada

Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos, dispensar en placas de Petri y almacenar a 4°C.

Caldo MSB (Modified Scholten's Broth):

10 g peptona

3 g extracto de levadura

12 g extracto de carne

3 g NaCl

0,75 g Na₂CO₃

0,6 g MgCl₂

1 L agua destilada

Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos y almacenar a 4°C.

MSAss (Modified Scholten's agar semisólido):

10 g peptona

3 g extracto de levadura

12 g extracto de carne

3 g NaCl

0,75 g Na₂CO₃

0,6 g MgCl₂

1 L agua destilada

Dispensar en botellas de 100 ml, agregar 0,76 g de Agar Bacteriológico Europeo a cada botella y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Una vez estéril, suplementar cada botella con 0,6 ml de CaCl₂ 1M y almacenar a 4°C.

MSA (Modified Scholten's Agar):

10 g peptona

3 g extracto de levadura

12 g extracto de carne

3 g NaCl

0,75 g Na₂CO₃

0,6 g MgCl₂

15 g Agar Bacteriológico Europeo

1 L agua destilada

Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos, suplementar con 6 ml de CaCl₂ 1M, dispensar en placas de Petri y almacenar las placas a 4°C.

Tampones y soluciones

PBS (Phosphate Buffered Saline):

8 g NaCl

0,2 g KCl

0,2 g KH₂PO₄

1,15 g Na₂HPO₄

1 L agua bidestilada

Ajustar el pH a 7,1-7,2. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos y almacenar a temperatura ambiente.

Tampón de fagos:

3,5 g Na₂HPO₄

1,5 g KH₂PO₄

2,5 g NaCl

500 ml agua bidestilada

Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Una vez estéril, suplementar con 5 ml de MgSO₄ 0,1M y 5 ml de CaCl₂ 0,01M. Almacenar a temperatura ambiente.

Tampón proteinasa K:

2 ml Tris HCl 1M pH 8

2 ml EDTA 0,5 M pH 8

10 ml SDS 10%

Enrasar a 100 ml con agua bidestilada

Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos y almacenar a temperatura ambiente.

El tampón proteinasa K se usa en combinación con Proteinasa K de Roche® (concentración final 20 mg/ml).

TBE 10X (Tris Boric EDTA Buffer):

109 g Tris Base

55,6 g ácido bórico

9,2 g EDTA

1 L agua bidestilada

Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos y almacenar a temperatura ambiente.

TBE 1X:

100 ml TBE 10X

900 ml agua bidestilada estéril

Almacenar a temperatura ambiente.

Tampón de lavado (membranas de diálisis):

20 g NaHCO₃

0,37 g EDTA (Titriplex[®]) (ácido etilendiaminotetraacético)

1 L agua bidestilada

Disolver por agitación. Ajustar el pH a 8. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Preparar antes de usar.

Tampón EDTA (membranas de diálisis):

0,37 g EDTA

1 L agua bidestilada

Disolver por agitación. Ajustar el pH a 8. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Preparar antes de usar.

Tampón de diálisis:

12,11 g Tris Base

0,074 g EDTA

1 L agua bidestilada

Disolver por agitación. Ajustar el pH a 8. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Preparar antes de usar.

Mitomicina C (Sigma-Aldrich):

0,5 mg mitomicina C

1 ml agua bidestilada estéril

Disolver por agitación y almacenar a 4°C en oscuridad. Usar fresca si es posible y si no, no usar más allá de 1 mes desde su preparación.

ADNasa y ARNasa:

10 mg de ADNasa o ARNasa

1 ml agua bidestilada estéril

Disolver por agitación. Almacenar a -20°C.

Proteinasa K:

20 mg proteinasa K

1 ml agua bidestilada estéril

Disolver por agitación. Almacenar a -20°C.

Acetato de sodio 3M:

24,6 g acetato de sodio

100 ml agua bidestilada

Disolver por agitación. Ajustar el pH a 4,5-5,5 con HCl 37%. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos y almacenar a temperatura ambiente.

Etanol 70%:

70 ml EtOH 100%

30 ml agua bidestilada

Almacenar a temperatura ambiente.

Sacarosa 20% (p/v):

20 g sacarosa

100 ml agua bidestilada

Disolver por agitación. Esterilizar por filtración con filtros de ésteres mixtos de celulosa (MCE, por sus siglas en inglés) de alta adsorción proteica de 0,22 μm y almacenar a temperatura ambiente.

Cloruro de calcio 1M:

11,1 g CaCl_2

100 ml agua bidestilada

Disolver por agitación. Esterilizar por filtración con filtros MCE de alta adsorción proteica de 0,22 μm y almacenar a 4°C.

Cloruro de calcio 0,01M:

0,11 g CaCl_2

100 ml agua bidestilada

Disolver por agitación. Esterilizar por filtración con filtros MCE de alta adsorción proteica de 0,22 μm y almacenar a 4°C.

Sulfato de Magnesio 0,1M:

2,47 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

100 ml agua bidestilada

Disolver por agitación. Esterilizar por filtración con filtros MCE de alta adsorción proteica de 0,22 μm y almacenar a 4°C.

Gel de agarosa para electroforesis:

150 ml TBE 1X

Agarosa ajustada diferentes concentraciones: 0,8%, 1%, 1,5%, 2% p/v (porcentaje peso/volumen).

Calentar en el microondas hasta que la agarosa se haya disuelto por completo, evitando que hierva.

Bromuro de etidio para tinción de geles de agarosa de DNA:

Añadir 200 µl de la solución stock (1%; p/v) de bromuro de etidio (Merck®) a 1 L de agua bidestilada.

Molibdato de amonio 2% (p/V) pH 7:

0,2 g molibdato de amonio

10 ml agua bidestilada

Disolver por agitación. Ajustar el pH a 7. Esterilizar por filtración con filtros MCE de alta adsorción proteica de 0,22 µm y almacenar a 4°C.

Antibióticos:

Antibiótico	Concentraciones finales usadas (µg/ml)
Ampicilina	50, 100
Ciprofloxacina	4
Sulfametoxazol	350

Tabla 7.1. Antibióticos usados en estos estudios.

8.3. Anexo 3. Protocolos usados en este estudio

Purificación de bacteriófagos a partir de muestras clínicas humanas

Para el desarrollo de estos estudios se recolectaron muestras de heces, esputo, suero, orina, LCR (líquido cefalorraquídeo), líquido ascítico, cultivo de líquido ascítico y hemocultivo. La cantidad inicial y el procesamiento de cada muestra variaron de acuerdo al tipo de muestra y al protocolo en el que se emplearon posteriormente:

- Heces: 10 g de muestra fueron homogenizados en 50 mL de PBS 1X.
- Esputo: 1 ml de muestra fue homogenizado en 3 mL de PBS 1X.
- Suero: 5 ml de muestra
- Orina: 10 ml de muestra
- LCR: 0,3-0,5 ml de muestra (según disponibilidad, ya que son muestras de volumen limitado)
- Líquido ascítico: 5 ml de muestra
- Cultivo de líquido ascítico: 5 ml de muestra
- Hemocultivo: 15 ml de muestra

Para separar la fracción fágica de las células bacterianas y otras partículas, los homogenizados fecales fueron centrifugados a 2000xg por 10 minutos a 4°C. Tanto el sobrenadante de estos homogenizados como el resto de las muestras fueron filtrados a través de filtros de poliétersulfona (PES, por sus siglas en inglés) de baja adsorción proteica con un tamaño de poro de 0,22 µm (Millex-GP, Millipore, Bedford, MA, USA). Si el volumen era insuficiente para la filtración, como en el caso de las muestras de LCR, se elevó el volumen a 2 ml con PBS 1X.

En el estudio de detección de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) en heces humanas, las muestras fecales filtradas fueron concentradas usando filtros concentradores de proteínas (100 kDa Amicon Ultra centrifugal filter units, Millipore, Bedford, MA, USA) y centrifugando a 2000xg por 25 minutos a 4°C. Este proceso se repitió hasta llegar a un volumen final de 0,5 ml, el cual fue transferido a un tubo de 1,5 ml. Para el análisis metagenómico de los fagomas fecales, las muestras no fueron concentradas y se partió directamente de los homogenizados (0,5 ml).

Se añadió cloroformo (1:10; v/v) a las suspensiones filtradas y/o concentradas, se agitaron en vórtex por 2 minutos y se centrifugaron a 16000xg durante 5 minutos. Los sobrenadantes, que contienen las partículas fágicas purificadas, se transfirieron a tubos de 1,5 ml.

Inducción de bacteriófagos a partir de aislamientos clínicos

Con el fin de obtener bacteriófagos atemperados inducibles que pudieran estar incorporados como profagos en el genoma de las cepas clínicas y las cepas aisladas de portadores fecales incluidas en este estudio, se realizó el siguiente protocolo:

- 1) Hacer una dilución 1:100 a partir de un cultivo bacteriano que se ha incubado durante toda la noche (O/N), en caldo LB. Incubar a 37°C en agitación (180 rpm) hasta alcanzar una DO_{600} entre 0,3-0,5 (fase exponencial).
- 2) Hacer dos alícuotas con el mismo volumen de cultivo.
- 3) Añadir mitomicina C a una concentración final de 0,5 µg/ml a una de las alícuotas, para inducir el ciclo lítico de los profagos que pudiera contener la cepa. La otra alícuota sin agente inductor se usará como control del protocolo de inducción. Incubar ambas alícuotas a 37°C en agitación durante 6-18 horas (incubar la que contiene mitomicina C en oscuridad).
- 4) Transcurrido el tiempo de incubación, filtrar el sobrenadante con filtros PES de baja adsorción proteica de 0,22 µm (Millex-GP, Millipore, Bedford, MA) para separar la fracción fágica.
- 5) Conservar esta suspensión de bacteriófagos a 4°C para posteriores experimentos.

Extracción de ADN fágico (modificado de Sambrook and Russell, 2001)

Se extrajo ADN fágico a partir de suspensiones fágicas purificadas de muestras fecales humanas y esputo, suspensiones fágicas provenientes de la inducción de bacteriófagos de aislamientos clínicos y bandas compatibles con la densidad de partículas fágicas, obtenidas de la purificación de bacteriófagos por gradientes de CsCl.

Las suspensiones fágicas purificadas de muestras de heces y esputo se obtuvieron como se mencionó anteriormente. En cuanto a las bandas provenientes de la purificación de bacteriófagos por gradientes de CsCl, una vez se recuperaron, se dializaron y se trataron con cloroformo, tal como se describió en el apartado *Purificación de bacteriófagos a partir de muestras clínicas humanas*. El volumen mínimo inicial de muestra para la extracción de ADN fágico fue de 0,5 mL; en el caso de las muestras que no alcanzaban dicho volumen, se añadió PBS 1X hasta alcanzar el volumen mínimo inicial.

Posteriormente, se siguió el protocolo descrito a continuación:

- 1) Tratamiento con ADNasa: Añadir 20 μ l de ADNasa (100 unidades/ml) e incubar 1 hora a 37°C. Después del tratamiento, inactivar la ADNasa a 75°C por 5 minutos. Tomar una alícuota (20 μ l) y conservarla a -20°C, para usarla posteriormente como control de eficiencia de la eliminación de cualquier DNA no encapsidado (ausencia de ADN bacteriano libre en el medio) en ensayos de qPCR.
- 2) Tratamiento con proteinasa K: Añadir 10 μ l de proteinasa K (20 mg/ml) y 250 μ l de tampón proteinasa K por 0,5 ml de muestra. Incubar 1 hora a 55°C.
- 3) Mezclar la muestra en proporción 1:1 (v/v) con fenol/cloroformo (1:1; v/v) en tubos de Phase Lock Gel™ de 2 ml (5-Prime, VWR Internacional, Madrid, Spain) y centrifugar a 16000xg durante 5 minutos.
- 4) Añadir cloroformo (1:1; v/v) y centrifugar de nuevo a 16000xg por 5 minutos. Recuperar la fase acuosa.
- 5) Para precipitar el ADN, añadir 100 μ l de acetato de sódico 3M y 1,5 ml de etanol absoluto. Incubar a -20°C O/N.
- 6) Recuperar todo el volumen de ADN precipitado en tubos de 1,5 ml y se centrifugar a 16000xg por 30 minutos a 4°C. Descartar el sobrenadante, lavar el pellet con 250 μ l de etanol 70% y centrifugar a 16000xg por 10 minutos a 4°C.
- 7) Remover el sobrenadante cuidadosamente y secar el pellet de ADN durante 30 minutos a temperatura ambiente en la vitrina de extracción de gases. Finalmente, eluir el ADN en 100 μ l de agua bidestilada estéril y conservarlo a -20°C.

Test de la gota (spot test)

Este protocolo tiene como finalidad detectar la presencia de bacteriófagos infecciosos en una muestra determinada:

- 1) Hacer una dilución 1:100 a partir de un cultivo bacteriano que se ha incubado O/N, en caldo LB. Incubar a 37°C en agitación (180 rpm) hasta alcanzar una DO₆₀₀ entre 0,3-0,5 (fase exponencial).

- 2) Mezclar en un tubo 1 ml de cultivo bacteriano (cepa huésped) en fase exponencial + 2,5 ml de LB semisólido (LBss) (previamente fundido), agitar con vórtex y verter sobre una placa de agar LB.
- 3) Esperar hasta que el LBss se solidifique y entonces, añadir una gota de 10 µl de la suspensión fágica sobre el mismo. Esta suspensión fágica puede provenir de muestras clínicas humanas, inducción de bacteriófagos a partir de cepas clínicas o bandas correspondientes a bacteriófagos obtenidas mediante el protocolo de purificación de partículas fágicas por gradiente de CsCl.
- 4) Esperar 10 minutos a que la gota se absorba e incubar 18 horas (O/N) a 37°C.

Recuento de unidades formadoras de calvas de lisis por mililitro (UFP/ml) mediante la técnica de doble capa de agar (titulación de bacteriófagos)

Para conocer el título fágico de una muestra (UFP/ml), es decir, el número de partículas fágicas infectivas por mililitro de muestra, se siguió un protocolo similar al del test de la gota, pero realizando diluciones decimales seriadas de la suspensión de fagos:

- 1) Hacer una dilución 1:100 a partir de un cultivo bacteriano que se ha incubado O/N, en caldo LB. Incubar a 37°C en agitación (180 rpm) hasta alcanzar una DO₆₀₀ entre 0,3-0,5 (fase exponencial).
- 2) Mezclar en un tubo 1 ml de cultivo bacteriano (cepa huésped) en fase exponencial + 2,5 ml de LBss (previamente fundido) + 1ml de la suspensión fágica directa o de la correspondiente dilución, agitar con vórtex y verter sobre una placa de agar LB.
- 3) Esperar hasta que el medio se solidifique e incubar 18 horas (O/N) a 37°C.
- 4) Contar las placas de lisis (calvas) (30-300) que corresponden a las unidades formadoras de calva (UFP) y calcular el número de UFP/ml mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Título fágico (UFP/ml)} = \frac{N}{\sum (V \cdot D \cdot n)}$$

Donde, N=número de calvas

V=volumen inoculado

D=dilución

n=número de réplicas de la dilución

Purificación de bacteriófagos por gradientes de CsCl (Sambrook and Russell, 2001)

La purificación de fagos mediante gradientes de CsCl es una técnica que permite separar y purificar las diferentes fracciones fágicas de una suspensión de fagos de una muestra. El protocolo se describe a continuación:

- 1) Preparar los stocks de diferentes densidades de CsCl:

Densidad	CsCl por muestra	H ₂ O por muestra
1,7 g/ml	1,124 g	0,875 ml
1,5 g/ml	0,908 g	1,09 ml
1,3 g/m	0,624 g	1,375 ml

Una vez preparados, esterilizar los stocks por filtración con filtros MCE de alta adsorción proteica de 0,22 μ m y conservar a temperatura ambiente.

- 2) Añadir 0,5 g de CsCl a 1 ml de la suspensión de bacteriófagos y disolver por agitación.
- 3) En un tubo Ultra-Clear BECKMAN[®], poner una pipeta Pasteur y añadir 2 ml de sacarosa al 20% (p/v).
- 4) Para hacer el gradiente con las tres soluciones de CsCl de diferente densidad (1,3 g/ml, 1,5 g/ml y 1,7 g/ml), añadir 1 ml de la de menor densidad sobre la pipeta Pasteur que se depositó previamente en el tubo. A continuación, ir añadiendo poco a poco las otras dos soluciones sucesivamente. Marcar con una señal la interfase entre los gradientes.
- 5) Extraer cuidadosamente la pipeta Pasteur y añadir la suspensión de bacteriófagos sobre el gradiente de 1,3 g/ml.
- 6) Centrifugar el tubo a 80000xg durante 2 horas a 4°C (ultracentrífuga Beckman[®], rotor SW41 de ángulo variable), asegurándose de equilibrar correctamente la centrífuga. Si es necesario ajustar el volumen de alguno de los tubos, agregar agua bidestilada estéril cuidadosamente para que se mantengan los gradientes.
- 7) Después de centrifugar, recuperar las bandas grises que se sitúen entre las densidades 1,3 g/ml y 1,5 g/ml (cada una corresponde a una fracción fágica de

la muestra) mediante punción del tubo con una aguja hipodérmica. Dejar gotear en un tubo de 1,5 ml.

Tratamiento de membranas de diálisis

- 1) Cortar unas 25 tiras de membrana de diálisis (MWCO - 12-14000 Da).
- 2) Hervir 10 minutos en tampón de lavado (bicarbonato de sodio 2% (p/v) -EDTA 1 mM pH 8).
- 3) Lavar con agua destilada.
- 4) Hervir 10 minutos en tampón EDTA (EDTA 1mM pH 8).
- 5) Conservar a 4°C con tampón EDTA.

Diálisis de bandas obtenidas de la purificación de bacteriófagos por gradiente de CsCl

Una vez se han recuperado las bandas obtenidas por gradiente de CsCl, es necesario eliminar los restos de CsCl antes de destinarlas a cualquier protocolo posterior: observación por microscopía electrónica, test de la gota, titulación y/o extracción de ADN fágico. Para esto es necesario dializar la banda como se describe a continuación:

- 1) Añadir el volumen de la banda a una membrana de diálisis que debe sellarse completamente con pinzas de diálisis o hilo, para evitar la fuga de la muestra durante el proceso.
- 2) Sumergir la membrana de diálisis en 1,5 L de tampón de diálisis (Tris 0,1 M-EDTA 0,2 mM pH 8) en agitación durante 1 hora.
- 3) Al cabo de este tiempo, cambiar el tampón de diálisis y dejar en agitación O/N.
- 4) Recuperar el volumen de banda dializado en un tubo de 1,5 ml.

Preparación de muestras para microscopía electrónica (Dykstra and Reuss, 1992; Robards and Wilson, 1993)

- 1) Usar rejillas de cobre de 200 mesh recubiertas con una película de formvar al 5%. Irradiar durante 5 minutos con luz ultravioleta (opcional), con la finalidad de que haya una mejor extensión de la muestra sobre la rejilla.

- 2) Depositar 10 μ l de la muestra sobre la cara limpia de un trozo de Parafilm[®], 3 gotas (10 μ l cada una) de agua bidestilada estéril y 1 gota (10 μ l) de molibdato de amonio al 2% (p/v) pH 7.
- 3) Contactar la rejilla con la muestra por la parte donde se encuentra la membrana de formvar durante 1 minuto.
- 4) Lavar pasando la rejilla sobre las 3 gotas de agua bidestilada estéril durante un tiempo total de 1 minuto.
- 5) Poner la rejilla en contacto con el agente de tinción (molibdato de amonio) durante 1-1,5 minutos. Eliminar el exceso de líquido con ayuda de un trozo de papel de filtro.
- 6) Dejar secar la rejilla sobre papel filtro dentro de una placa de Petri a temperatura ambiente O/N (tiempo mínimo de secado antes de observar la rejilla en el microscopio electrónico). En lo posible, secar y conservar las rejillas en una cámara de desecación con humedad controlada (servicio microscopia).
- 7) La observación se hace en el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1010 (JEOL USA, Inc. Peabody, MA, USA) operando a 100 kv entre 60000-150000 X.

Clonación de ARGs en plásmido pGEM[®]-T Easy (Promega) y transformación de células competentes por electroporación

Amplificación del gen de interés y purificación del amplímero

Se realiza la PCR del fragmento del gen que se quiere clonar y se purifica la banda resultante. Si al revelar el gel de agarosa se observa sólo una banda, dicha purificación se hará mediante el kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) a partir del producto de PCR, siguiendo las instrucciones del fabricante. Si se observa más de una banda, se hará usando el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) a partir del gel de agarosa, según las instrucciones del fabricante.

Ligación del gen de interés en plásmido pGEM[®]-T Easy (Promega Corp., Madison, WI, USA)

Preparar la mezcla de ligación siguiendo lo aconsejado por la casa comercial:

Reactivos	Volumen por reacción
Tampón de ligación 2X	5 µl
Vector pGEM [®] -T Easy*	1 µl
Producto de PCR	3 µl
T4 ADN ligasa	1 µl
Volumen final	10 µl

*Relación molar producto de PCR::vector (3:1)

Tabla 7.2. Mezcla de ligación usando pGEM[®]-T Easy.

Mezclar la reacción suavemente con la pipeta e incubar O/N a 4°C para alcanzar la máxima eficiencia de ligación. Alternativamente, incubar las reacciones O/N a 22°C.

Transformación de células competentes (*E. coli* DH5α) por electroporación

- 1) Inocular 2 ml de un cultivo O/N de la cepa *E. coli* DH5α en 20 ml de caldo LB e incubar a 37°C en agitación hasta alcanzar una DO₆₀₀ entre 0,3-0,5 (fase exponencial).
- 2) Una vez alcanzada la DO₆₀₀=0,3-0,5, detener el crecimiento dejando el cultivo 10 minutos en hielo.
- 3) Centrifugar 2000xg a 4°C durante 10 minutos.
- 4) Decantar el sobrenadante. Resuspender el pellet en 500 µl de agua bidestilada estéril fría y transferir a un tubo de 1,5 ml. A partir de este paso, mantener las células y el agua en hielo.
- 5) Hacer un pulso de centrifuga a las células, descartar el sobrenadante y volver a resuspender en 500 µl de agua bidestilada estéril fría. Repetir este paso de lavado 6-8 veces para remover las sales presentes en el cultivo.
- 6) En el último lavado, resuspender en 100 µl de agua bidestilada estéril fría.
- 7) Añadir la mezcla de ligación (10 µl) y mezclar suavemente con la pipeta.

- 8) Transferir todo el volumen a una cubeta de electroporación (que debe estar previamente en hielo) y electroporar. La electroporación de las células competentes se llevó a cabo a 2 kV, capacitancia 25 F y resistencia 200 Ω .
- 9) Recuperar el volumen de la cubeta e inocularlo en 3 ml de caldo LB. Incubar a 37°C en estático entre 2 y 3 horas (mínimo 1 hora).
- 10) Sembrar en placas de LB con ampicilina (50 $\mu\text{g/ml}$) (el vector pGEM[®]-T Easy tiene como marcador un gen de resistencia a ampicilina) e incubar O/N a 37°C.
- 11) Sembrar las colonias obtenidas en placas de LB con ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) e incubar O/N a 37°C.
- 12) Las colonias que crezcan han incorporado potencialmente el vector con el fragmento insertado. Verificar la presencia del vector recombinante y la orientación del inserto por PCR usando los cebadores del fragmento de interés (Tabla 7.5).
- 13) Hacer un cultivo de las colonias que contienen el vector con el inserto en caldo LB. Purificar el vector recombinante empleando el kit Pure Link HiPure Plasmid Filter Midiprep (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), según las instrucciones del fabricante.
- 14) Cuantificar la concentración del plásmido recombinante usando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies. Thermo Scientific, Wilmington, USA).

8.4. Anexo 4. Reacciones de PCR y qPCR

Reacción de PCR convencional

PCR (*Dream Taq Green PCR Master Mix, Fermentas*[®])

Reactivos	Volumen por reacción
Dream Taq	12,5 µl
Cebador Up (30 µM)	0,5 µl
Cebador Lp (30 µM)	0,5 µl
H ₂ O _{bd} * estéril	9,5 µl
ADN	2 µl
Volumen final	25 µl

*H₂O_{bd}: agua bidestilada

Tabla 7.3. Mezcla para reacción de PCR.

Realizar la PCR según las condiciones específicas del amplímero correspondiente.

Reacción de qPCR (PCR cuantitativa)

La qPCR es una de las técnicas más usadas en los laboratorios de microbiología y permite cuantificar el número de copias genómicas (GC) de un gen determinado presente en una muestra, de una manera simple y rápida. Esta técnica se caracteriza por ser altamente sensible y específica pero su éxito depende de un diseño óptimo de los cebadores y la sonda, y de la calidad del material partida.

Para la detección y cuantificación de la amplificación de ADN mediante qPCR, se emplean fluorocromos no específicos o sondas específicas marcadas fluorescentemente. Específicamente en esta tesis, se usaron sondas TaqMan[®] MGB (Minor Groove Binder, por sus siglas en inglés) marcadas con FAM (fluorocromo) y NFQ (Non Fluorescent Quencher). Para el diseño de cebadores y sondas, se usó el programa Primer Express v3.0.1 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante para el diseño:

- La secuencia diana deber tener un tamaño entre 50 y 150 pb.
- El tamaño de la sonda debe ser mayor al de los cebadores, siendo la T_m de los cebadores entre 58-60°C y la de la sonda entre 68-70°C.

- Evitar que hayan más de tres repeticiones de una base en los cebadores, sobretodo evitar repeticiones guanina (G) y que hayan más de 3 guaninas o citosinas (C) en los extremos 3'.
- Además, en el diseño de la sonda es importante que no haya G o la combinación GA (guanina-adenina) en el extremo 5', y 3 G juntas.

Condiciones generales

Se usó ADN fágico proveniente de diferentes muestras (heces, esputo, suspensiones fágicas obtenidas de la inducción de bacteriófagos de aislamientos clínicos y bandas compatibles con la densidad de partículas fágicas, obtenidas de la purificación de bacteriófagos por gradientes de CsCl) para la cuantificación de genes de resistencia a antibióticos por PCR en tiempo real. La reacción de qPCR se llevó a cabo como se describe a continuación:

Reactivo	Volumen por reacción
TaqMan [®] Enviromental Master Mix 2.0 (Applied Biosystems)	10 µl
Mezcla de cebadores (18 µM) y sonda TaqMan [®] (5 µM) (Applied Biosystems)	1 µl
ADN	9 µl
Volumen final	20 µl

Tabla 7.4. Mezcla para reacción de qPCR.

Condiciones de la qPCR:

- Paso inicial: 95°C por 10 minutos
- Desnaturalización: 95°C por 15 segundos
- Hibridación/Elongación: 60°C por 1 minuto (40 ciclos)

Elaboración de curvas estándar para qPCR

Los estándares de qPCR fueron creados a partir de plásmidos con un fragmento clonado del gen de resistencia que se quiere amplificar.

El fragmento de interés se amplificó por PCR usando los cebadores correspondientes (Tabla 7.5), se purificó y se clonó en el plásmido pGEM[®]-T Easy (Promega Corp., Madison, WI, USA), que es un vector diseñado para la clonación de productos de PCR. Posteriormente, se transformaron células competentes de *E. coli* DH5α por electroporación con el plásmido recombinante resultado de la clonación. Una vez

comprobado el éxito de la transformación, se purificó el ADN plasmídico y se cuantificó usando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies. Thermo Scientific, Wilmington, USA), como se describió anteriormente con más detalle en el apartado *Clonación de ARGs en plásmido pGEM[®]-T Easy (Promega) y transformación de células competentes por electroporación*.

Se hicieron diluciones decimales seriadas del ADN plasmídico obtenido, en agua bidestilada estéril libre de nucleasas con 5-6 réplicas por dilución. Se cuantificaron tres réplicas por qPCR en 4-6 procesos independientes para realizar la curva estándar. Finalmente, las diluciones se conservaron a -20°C y se utilizaron al menos 4 diluciones en cada placa de amplificación.

El número de copias genómicas (GC) por μl de cada plásmido recombinante se calculó asumiendo que 1 pb de dsADN tiene una masa molecular media de 660 Da (g/mol). El cálculo se realiza usando la siguiente fórmula:

$$\text{Copias genómicas (GC)/}\mu\text{l muestra} = \left(\frac{X \text{ (ng/}\mu\text{l)}}{P_{\text{pGEM}^{\text{®}}::\text{ARG}} \times 660 \times 10^9 \text{ ng/mol}} \right) \times 6,023 \times 10^{23}$$

Donde, X=concentración de ADN recombinante pGEM[®]-T Easy::ARG (ng/ μl)

$P_{\text{pGEM}^{\text{®}}::\text{ARG}}$ =longitud del plásmido con el inserto (pb)

Número de Avogadro= $6,023 \times 10^{23}$

Los valores de C_t (del inglés, *cycle threshold*) obtenidos por qPCR de cada una de las diluciones decimales seriadas del ADN recombinante pGEM[®]-T Easy::ARG fueron trazados contra el logaritmo del número de copias del gen correspondiente. La eficiencia de la amplificación (E), el coeficiente de correlación R^2 y el Y-intercepto fueron calculados mediante el método de pendiente C_t . Con este método, la pendiente esperada de una serie de diluciones de 10 veces del ADN molde es -3,32, cuando $E=1,0$. La eficiencia de la amplificación (E) fue calculada usando la siguiente ecuación:

$$E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

Por medio de las curvas de calibración obtenidas, se establecieron los límites de cuantificación y detección para cada uno de los genes incluidos en estos estudios. Así, el límite de cuantificación (LOQ, por sus siglas en inglés) fue establecido por el valor de C_t correspondiente a la menor concentración (número de CG) de ADN recombinante detectada, que produjo resultados con un nivel aceptable de exactitud y precisión en diversas réplicas bajo condiciones experimentales establecidas. Por otro lado, el límite de detección (LOD) se estableció como el valor de C_t correspondiente a

la concentración más baja de ADN recombinante (número de CG) que se pudo detectar pero que, debido a la inconsistencia de los valores, no se pudo cuantificar.

Dado que los resultados que se encuentran fuera del LOQ pero aún dentro del LOD son inconsistentes y poco reproducibles, debido al bajo número de GC presente en el estándar que aumenta la probabilidad de error en la reacción, no es posible calcular correctamente la densidad de GC de aquellas muestras fuera del LOQ. Por esta razón, en el capítulo 4 de esta tesis sobre ARGs en fibrosis quística, se usaron los resultados incluidos dentro de ambos límites para los análisis de prevalencia, pero para los análisis de cuantificación de cada gen solo se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos dentro del LOQ.

Controles de qPCR

La validación de los ensayos de qPCR, al igual que en las demás metodologías aplicadas en los laboratorios de microbiología, es indispensable para garantizar que los resultados obtenidos son el fiel reflejo del estado real de las muestras. Por ejemplo, debido a la gran sensibilidad de la PCR en tiempo real, no es infrecuente que algunos controles blancos crucen el umbral de amplificación junto con las muestras, ya sea en ciclos tempranos o tardíos de la reacción o que, por motivo de inhibiciones, deterioro de reactivos o mal funcionamiento en general de la qPCR no se produzca amplificación del ADN presente en la muestra. La realización de controles en la PCR en tiempo real es fundamental para validar la precisión del ensayo, ya que permiten distinguir resultados falsos positivos o falsos negativos de los resultados realmente positivos o negativos. Los controles de qPCR realizados en esta tesis fueron los siguientes:

- **Control negativo:** se añadieron todos los reactivos necesarios, pero en lugar de ADN, se usó agua bidestilada estéril libre de nucleasas. Como no se debería obtener amplificación, su resultado debe ser indeterminado o con un valor de C_t fuera del límite de cuantificación de cada gen ($C_t > 37$).
- **Controles de cuantificación (externos):** se incluyeron al menos 4 diluciones de los estándares correspondientes en cada placa de amplificación.
- **Controles de inhibición (internos):** se añadieron cantidades conocidas de GC de un estándar (estándares de *mecA*) al ADN fágico aislado a partir de las muestras, y los resultados obtenidos por qPCR fueron comparados con los resultados esperados para dichas concentraciones. De esta manera, se evaluó

si existía intervención de inhibidores enzimáticos presentes en el ADN de la fracción fágica de las muestras, en las reacciones de amplificación.

El ADN fágico proveniente de muestras complejas, como las heces, puede estar acompañado de partículas o compuestos que generan problemas de inhibición. En ese caso, si en alguna muestra se producía inhibición de la reacción, el procedimiento a seguir fue repetir el análisis con una dilución 1/10 del ADN fágico de dicha muestra en agua bidestilada estéril libre de nucleasas, para diluir a su vez los posibles inhibidores, vigilando siempre que la concentración de ADN molde se mantuviera dentro los límites de amplificación.

- **Controles de extracción de ADN fágico (internos):** en el capítulo 4 sobre ARGs en fibrosis quística se hizo una evaluación del protocolo de purificación fágica a partir de muestras de esputo, en el que se añadieron concentraciones conocidas de GC de un estándar (estándares de *bla_{TEM}*) a muestras FQ con varios grados de homogenización, y tras la extracción de ADN fágico se seleccionó el grado de homogenización que permitió la mayor detección de GC, para la realización de los experimentos.

Además, se llevó a cabo una segunda evaluación en la que se inocularon muestras FQ con suspensiones del fago 933W, que contienen una copia de la toxina Shiga 2 (*stx₂*) en su genoma. Se determinó el número de partículas fágicas 933W en las muestras de esputo por medio de qPCR, después de la extracción del ADN fágico, para verificar la efectividad del protocolo.

- **Controles de eficiencia de eliminación de ADN no encapsidado (internos):** el protocolo de extracción de ADN fágico que se usó en estos estudios estuvo siempre acompañado de varios controles, con el fin de asegurar que los resultados obtenidos fueran producto de la amplificación de ADN contenido dentro de las cápsides de partículas fágicas. Con este fin, se llevaron a cabo dos pasos adicionales en este protocolo:
 - 1) *Tratamiento con cloroformo:* una vez las muestras fueron filtradas y/o concentradas, se trataron con cloroformo para eliminar posibles vesículas de membrana libres en el medio que pudieran contener ADN.
 - 2) *Tratamiento con ADNasa:* las muestras fueron tratadas con ADNasa (100 unidades/ml) para remover todo el ADN libre no encapsidado. Luego del tratamiento, la ADNasa fue inactivada a 75°C por 5 minutos

para detener la actividad de la enzima. Después del tratamiento con ADNasa y antes de la desencapsidación, se tomó una alícuota de cada muestra para descartar la contaminación con ADN no encapsidado. Estas alícuotas se analizaron como controles de eficiencia de eliminación de ADN no empaquetado mediante ensayos de qPCR de cada uno de los ARGs y 16S rADN. El resultado de estas amplificaciones debía ser negativo, confirmando la remoción completa del ADN fuera de las cápsidas presente en las muestras.

Confirmación de la actividad de la ADNasa: con el fin de verificar el rendimiento del tratamiento con ADNasa, se trataron diluciones decimales seriadas de ADN recombinante pGEM[®]::ARG con ADNasa, seguido de inactivación térmica de la enzima. Se verificó la degradación del ADN correspondiente a las diluciones del estándar por medio de ensayo de qPCR del respectivo gen de resistencia a antibiótico. Los resultados fueron negativos, evidenciando la eficacia del tratamiento con ADNsa en la eliminación de ADN, incluso a altas concentraciones.

Inactivación térmica de la ADNasa: la completa inactivación de la ADNasa es fundamental para evitar resultados falsos negativos, ya que de no ser correctamente inactivada podría degradar los cebadores y sonda de qPCR, generando resultados negativos a partir de los controles por actividad de la ADNasa, en lugar ser causados por la ausencia real de ADN no encapsidado.

Para verificar la eficiencia de esta inactivación, se añadieron diluciones decimales seriadas de ADN recombinante pGEM[®]::ARG a controles ADNasa (alícuotas de las muestras tomadas después del tratamiento con ADNasa y antes de la desencapsidación). Después de la inactivación térmica de la ADNasa, estos controles fueron amplificados por qPCR en paralelo con los estándares del gen de resistencia a antibiótico usado en la prueba. Si la ADNasa fue inactivada correctamente, se esperarían los mismos resultados de amplificación en los controles con ADNasa que en las diluciones originales del estándar.

Los resultados obtenidos mostraron unos valores de C_t en los controles ADNasa bastante similares a los de los estándares originales (solo un C_t por debajo del C_t de la correspondiente dilución del estándar). Esto permitió confirmar que la ADNasa fue correctamente inactivada por este método y

que por lo tanto no interfirió en la reacción de qPCR. Las leves diferencias observadas en los valores de C_t obtenidos podrían atribuirse a una ligera degradación del ADN debida al tratamiento térmico.

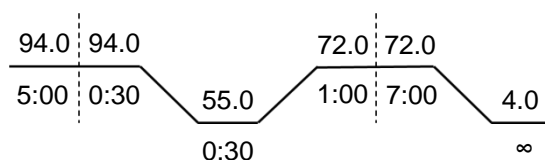
8.5. Anexo 5. Condiciones de PCR y qPCR

Condiciones de PCR

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en 25 ciclos:

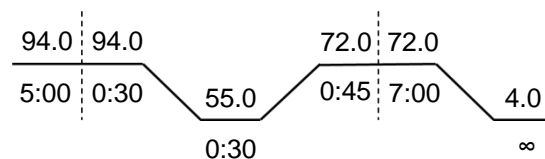
PCR *bla*_{TEM}:

temup + temlp



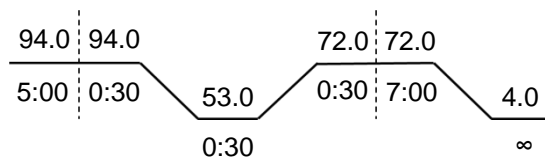
PCR *bla*_{CTX-M-1}:

ctx-m-15up + ctx-m-15lp



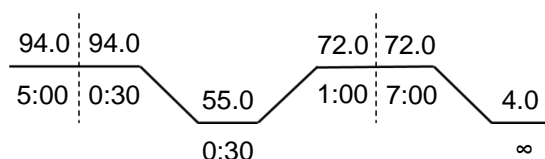
PCR *bla*_{CTX-M-9}:

ctx-m-9up + ctx-m-9lp



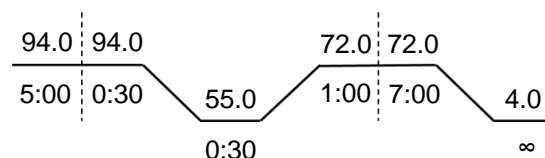
PCR *bla*_{OXA-48}:

OXA-48up + OXA-48lp



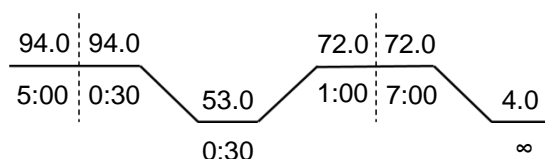
PCR *bla*_{VIM}:

VIMup + VIMlp



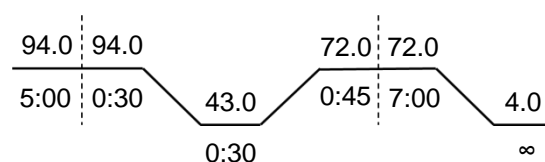
PCR *sul1*:

sul1up + sul1lp



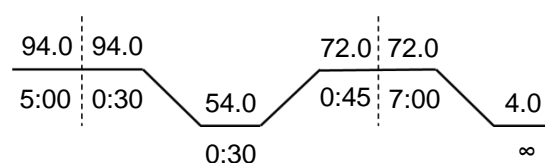
PCR *mecA*:

mecAup + mecAlp



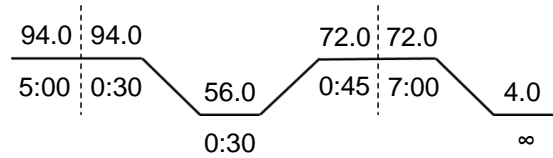
PCR *qnrA*:

qnrAup + qnrAlp



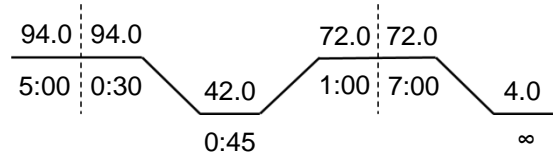
PCR *qnrS*:

qnrSup + *qnrSlp*



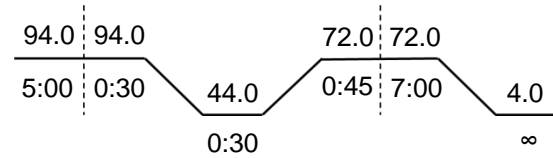
PCR *armA*:

AAC.metup + AAC.metlp



PCR pGEM:

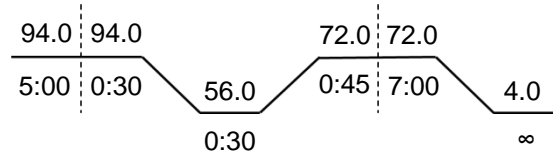
pGEMT7



PCR 16S rADN Eubacteria

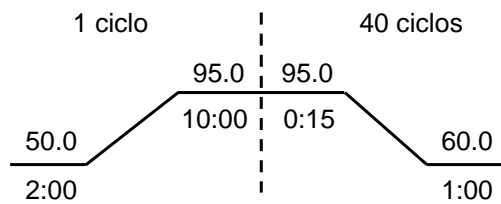
(35 ciclos):

28f + 1492r



Condiciones de qPCR

Las reacciones de qPCR en tiempo real fueron comunes para todos los ARGs. Estas condiciones fueron las siguientes:



Gen	Cebador	Secuencia	Amplímero (pb)	Referencia
<i>bla</i>_{TEM} PCR	UP	CTCACCCAGAAACGCTGGTG	569	(Colomer-Lluch et al., 2011b)
	LP	ATCCGCCTCCATCCAGTCTA		
<i>bla</i>_{TEM} qPCR	UP	CACTATTCTCAGAATGACTTGGT	85	(Lachmayr et al., 2009)
	LP	TGCATAATTCTCTTACTGTCATG		
	Sonda	6FAM-CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGG-MGBNFQ		
<i>bla</i>_{CTX-M-1} PCR	UP	ACGTTAAACACCGCCATTCC	356	(Colomer-Lluch et al., 2011b)
	LP	TCGGTGACGATTTTAGCCGC		
<i>bla</i>_{CTX-M-1} qPCR	UP	ACCAACGATATCGCGGTGAT	101	(Colomer-Lluch et al., 2011b)
	LP	ACATCGCGACGGCTTTCT		
	Sonda	6FAM-TCGTGCGCCGCTG-MGBNFQ		
<i>bla</i>_{CTX-M-9} PCR	UP	ACGCTGAATACCGCCATT	352	(Colomer-Lluch et al., 2011a)
	LP	CGATGATTCTCGCCGCTG		
<i>bla</i>_{CTX-M-9} qPCR	UP	ACCAATGATATTGCGGTGAT	85	(Colomer-Lluch et al., 2011a)
	LP	CTGCGTTCTGTTGCGGCT		
	Sonda	6FAM-TCGTGCGCCGCTG-MGBNFQ		
<i>bla</i>_{OXA-48} PCR	UP	CGTTATGCGTGTATTAGCCTTAT	790	Este estudio
	LP	TTTTTCCTGTTTGAGCACTTCTTT		
<i>bla</i>_{OXA-48} qPCR	UP	CGGTAGCAAAGGAATGGCAA	133	Este estudio
	LP	TGGTTCGCCCGTTTAAGATT		
	Sonda	6FAM-CGTAGTTGTGCTCTGGA-MGBNFQ		
<i>bla</i>_{VIM} PCR	UP	TCTACATGACCGCGTCTGTCT	748	(Poirel et al., 2000)
	LP	TGTGCTTTGACAACGTTTCGC		

Gen	Cebador	Secuencia	Amplímero (pb)	Referencia
<i>bla_{VIM}</i> qPCR	UP	AATGGTCTCATTGTCCGTGATG	61	Este estudio
	LP	TCGCACCCCACGCTGTA		
	Sonda	6FAM-TGATGAGTTGCTTTTGATTG-MGBNFQ		
<i>sul1</i> PCR	UP	TTCATGGGCAAAGCTTGATG	965	(Heuer and Smalla, 2007)
	LP	GGCCGGAAGGTGAATGCTA		
<i>sul1</i> qPCR	UP	CCGTTGGCCTTCCTGTAAAG	67	(Modificado de Heuer and Smalla, 2007)
	LP	TTGCCGATCGCGTGAAGT		
	Sonda	6FAM-CGAGCCTTGCGCGG-MGBNFQ		
<i>mecA</i> PCR	UP	GATAGCAGTTATATTTCTA	434	(Colomer-Lluch et al., 2011b)
	LP	ATACTTAGTTCTTTAGCGAT		
<i>mecA</i> qPCR	UP	CGCAACGTTCAATTTAATTTTGTTAA	92	(Volkman et al., 2004)
	LP	TGGTCTTCTGCATTCCTGGA		
	Sonda	6FAM-AATGACGCTATGATCCCAATCTAACTTCCACA-MGBNFQ		
<i>qnrA</i> PCR	UP	ACGCCAGGATTTGAGTGAC	565	(Lavilla et al., 2008)
	LP	CCAGGCACAGATCTTGAC		
<i>qnrA</i> qPCR	UP	AGGATTGCAGTTTCATTGAAAGC	138	(Colomer-Lluch et al., 2014)
	LP	TGAACTCTATGCCAAAGCAGTTG		
	Sonda	6FAM-TATGCCGATCTGCGCGA-MGBNFQ		
<i>qnrS</i> PCR	UP	AAGTGATCTCACCTTCACCGCTTG	425	(Colomer-Lluch et al., 2014)
	LP	TTAAGTCTGACTCTTTCAGTGATG		

Gen	Cebador	Secuencia	Amplímero (pb)	Referencia
qnrS qPCR	UP	CGACGTGCTAACTTGCCTGA	118	(Colomer-Lluch et al., 2014)
	LP	GGCATTGTTGGAACTTGCA		
	Sonda	6FAM-AGTTCATTGAACAGGGTGA-MGBNFQ		
armA PCR	UP	CAAATGGATAAGAATGATGTT	774	(Galimand et al., 2003)
	LP	TTATTTCTGAAATCCACT		
armA qPCR	UP	GAAAGAGTCGCAACATTAATGACTT	94	(Quirós et al., 2014)
	LP	GATTGAAGCCACAACCAAATCT		
	Sonda	6FAM-TCAAACATGTCTCATCTATT-MGBNFQ		
pGEM	UP	TGTAATACGACTCACTAT		Promega corp.
16S rADN	28f	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGA	1503	(Sander and Schmieger, 2001)
	1492r	TACGGCTACCTTGTACGACTT		
stx₂	UP	ACGGACAGCAGTTATACCACTCT	65	(Imamovic et al., 2010)
	LP	CTGATTTGCATTCCGGAACGT		
	Sonda	FAM-CCAGCGCTGCGACACG-MGBNFQ		

FAM: fluorocromo 6-carboxifluoresceína (reporter), **MGBNFQ:** quencher no fluorescente de unión al surco menor.

Tabla 7.5. Oligonucleótidos usados en esta tesis.