



Departamento de Microbiología

Facultad de Medicina

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

TESIS DOCTORAL

**Desarrollo del uso terapéutico de Piocinas tipo R
en el tratamiento de infecciones por *Pseudomonas
aeruginosa* multirresistente**

María del Mar Redero Cascón

Sevilla, 2020

El **Prof. Dr. Jesús Blázquez Gómez**, investigador principal del Grupo de Estrés y Evolución Bacteriana en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC); la **Dra. Ana Isabel Prieto Márquez**, contrato Sara Borrell de la Universidad de Sevilla y el **Prof. Dr. Javier Aznar Martín**, Jefe de Servicio del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla y Catedrático del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN:

Que la Tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla y que lleva por título “Desarrollo del uso terapéutico de Píocinas tipo R en el tratamiento de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente” ha sido realizada por D^a María del Mar Redero Cascón bajo su supervisión, considerando que reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Sevilla, Septiembre 2020

Fdo. Jesús Blázquez Gómez

Fdo. Ana Isabel Prieto Márquez

Fdo. Javier Aznar Martín

A mi padre, Paco

me miro en tus ojos, me miro en ti

Agradecimientos

Como un capítulo igual de necesario, es el agradecimiento y el reconocimiento de todas las personas que de una manera u otra han hecho posible que por fin, emocionada, esté escribiendo estas ansiadas palabras.

Jesús Blázquez, gracias por dejarme formar parte de tu grupo e iniciarme en la investigación, exprimiendo el tiempo y aprendiendo de todos vosotros en los huecos que me dejaba mi ajetreada residencia en Microbiología. Sé que no fue fácil, por lo que Gracias.

Anabel Prieto, gracias y mil gracias por enseñarme todo lo que sé técnicamente, por no abandonar nunca mi barco, por apostar por este proyecto, que al final se convirtió en una lucha personal que había que acabar. Gracias por corregir mis manías (o intentarlo concienzudamente), gracias por los consejos y las charlas sobre la vida, porque cuando te enfrascas en esta tarea, se puede perder la noción de muchas cosas.

Javier Aznar, gracias por recuperar este proyecto en tiempos difíciles. Gracias por el soporte que nos proporcionaste. Sin duda, esta tesis no hubiera acabado sin tu ayuda.

Gracias a todas las personas, del ámbito sanitario y demás amigos, por ayudarme e interesaros sinceramente por mi tesis, por animarme a acabarla, por ahogar mis penas en los momentos duros, profesionales y personales, por asentir y hacer como que entendíais mi tesis cuando, enérgicamente, os la intentaba explicar, y por soportar mis momentos de histeria y enajenación mental, siempre con una cariñosa sonrisa.

Jose, mi alma gemela, el ánimo y la sonrisa personificados. Gracias por acompañarme todos estos años de locura, pero apasionantes como los que más. Has experimentado parte de esta tesis, con sus altos y bajos, éxitos y fracasos, disfrutando y sufriendo como si fueran propios. Gracias por recibirme todos los días con tu inmenso cariño.

Luz, mi hermana, gracias por cuidar de la familia los años que no pude estar ni tan cerca ni tanto tiempo como me hubiera gustado. Saber que estabas ahí me reconforta.

Mamá, la mujer más valiente que conozco. Gracias por darme la vida; gracias por cuidarnos a todos; gracias por estar tan orgullosa de mí. Gracias por hacerme ver cada día, que pese a los reveses que nos da la vida, esta tesis es importante. Sin tu empeño, desde luego, no la podría haber acabado.

Y por último, papá, esta tesis es tuya. Es para ti. Has sido y serás el motor de mi vida, la fuerza y el empuje necesarios en esta última etapa, mi fuente de inspiración y por supuesto, la persona más importante de mi vida. Gracias por haber estado tan orgulloso de mí. Gracias por haberme querido tanto. Porque siempre serás infinito, como el amor que siento por ti.

Resumen

La aparición y diseminación de cepas extensivamente-drogo-resistentes (XDR) junto con el desarrollo de biopelículas hacen que las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* supongan un auténtico desafío terapéutico. Para superar este escenario, las bacteriocinas se han propuesto como posibles alternativas al tratamiento antibiótico común. Por ello, el objetivo de esta tesis ha sido analizar la actividad de las piocinas R en infecciones por *P. aeruginosa*.

En la primera parte de esta tesis se ha analizado la actividad de las piocinas R frente a aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes con fibrosis quística y otras fuentes con distintos perfiles de sensibilidad, así como el estudio de correlación e interacción de las piocinas R con otros antibióticos. Nuestros datos sugieren que las cepas de *P. aeruginosa* procedentes de pacientes con fibrosis quística son más sensibles a las piocinas R que las de otros orígenes y no se encontraron interacciones entre las piocinas R y otros antibióticos usados en la práctica clínica habitual.

En la segunda parte, se estudió la actividad de las piocinas R en biofilms y en un modelo murino de neumonía utilizando un clon de alto riesgo de *P. aeruginosa*. Los resultados destacan la fantástica actividad de las piocinas R en el biofilm, así como en resolver una neumonía aguda en el modelo animal propuesto.

Este trabajo destaca el uso potencial de las piocinas R como agentes terapéuticos, solas o como adyuvantes en el tratamiento convencional. Por tanto, podría ser factible considerar a las piocinas R como una posible alternativa terapéutica en infecciones por *P. aeruginosa* XDR, donde las alternativas de tratamiento son muy limitadas.

Índice

I. Abreviaturas.....	1
II. Introducción.....	5
1. Sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
1.1. Generalidades	7
1.2. Importancia clínica	8
1.3. Infecciones respiratorias	9
Multirresistencia en <i>P. aeruginosa</i>	14
2. Sobre la Fagoterapia	18
2.1. Bacteriófagos	18
2.2. Necesidad de terapias alternativas	19
2.3. Historia de la fagoterapia	20
2.4. Panorama actual de la fagoterapia	23
2.5. Ventajas y limitaciones de la fagoterapia	26
3. Sobre las Piocinas	29
3.1. Piocinas tipo R	30
3.2. Piocinas en terapéutica	37
@@@Objetivos.....	39
@ Publicaciones.....	43
Sensibilidad a piocinas R de aislados clínicos de <i>Pseudomonas</i> procedentes de pacientes con fibrosis quística.	45
2. Eficacia antibacteriana de las piocinas de tipo R contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en biofilms y en un modelo murino de infección pulmonar aguda	55
V. Discusión.....	67

VI. Conclusiones.....	79
VII. Bibliografía.....	83
VIII. Anexos.....	103
ANEXO I: Producción científica adicional	105
ANEXO II: Material suplementar	107

CAPÍTULO I

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

AG O: antígeno O

AZT: aztreonam

AZM: azitromicina

BLEE: Betalactamasa de Espectro Extendido

CAZ: ceftazidima

CIP: ciprofloxacino

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

COL: colistina

CTX: cefotaxima

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FDA: administración de alimentos y medicamentos (del inglés Food and Drugs Administration)

FEP: cefepima

FQ: Fibrosis Quística

GEN: gentamicina

IP: imipenem

LB: caldo Lysogeny Broth

LBA: Agar Lysogeny Broth

LPS: lipopolisacárido

MBL: metalobetalactamasa

MDR: multiresistente (del inglés Multi-Drug-Resistant)

MER: meropenem

MH: caldo Mueller Hinton

MHA: agar Mueller Hinton

MIT C: mitomicina C

MYSTIC: Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection

NAVM: Neumonía Asociada a Ventilación Mecánica

NCF: Normas de Correcta Fabricación

ORF: marco de lectura abierta (Open Reading Frame)

PBS: Tampón Fosfato Salino

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PP/TZ: piperacilina tazobactam

PTLB: bacteriocinas como colas de fagos (del inglés Phage-Tail Like Bacteriocins)

R-PIOCINAS: piocinas tipo R

rpm: revoluciones por minuto

SCV: colonias enanas o puntiformes (del inglés Small Colony Variants)

TOB: tobramicina

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

UFC: Unidad Formadoras de Colonias

XDR: extensivamente resistente (del inglés Extensively-Drug-Resistant)

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN

1. Sobre *Pseudomonas aeruginosa*

1.1. Generalidades

Los primeros indicios acerca de *Pseudomonas aeruginosa* se remontan a 1850, cuando Sédillot fue el primero en sospechar la presencia de un agente transferible en las heridas quirúrgicas, debido a la coloración azul-verdosa que adquirían las vendas y gasas. *Pseudomonas aeruginosa* no se consiguió aislar en cultivo puro hasta 1882, en Francia, cuando Carle Gessard (químico y bacteriólogo de París) publicó un artículo titulado “*On the Blue and Green Coloration of Bandages*” refiriéndose al crecimiento de este microorganismo en heridas cutáneas de dos pacientes que presentaban una secreción purulenta verde-azulada. En 1916, Freeman publicó de forma detallada los mecanismos mediante los cuales *P. aeruginosa* era capaz de invadir el cuerpo humano, ocasionando una infección aguda o crónica ¹.

P. aeruginosa es un bacilo Gram-negativo incluido en la clase Gamma Proteobacteria, orden Pseudomonadales y familia Pseudomonadaceae, es no fermentador y no formador de esporas. Mide entre 1,5 y 5 µm de longitud y 0,5-1 µm de ancho, es recto o ligeramente curvado. Posee un flagelo polar lo que le confiere movilidad. A pesar de poseer un metabolismo aerobio estricto, es capaz de utilizar nitratos como aceptor final de electrones en condiciones de anaerobiosis. Es oxidasa y catalasa positivo y no fermentador de glucosa. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, aunque a diferencia de otras especies del mismo género ésta es capaz de crecer hasta 42°C. Gracias a su gran genoma (6,3 Mpb), *P. aeruginosa* dispone de una gran proporción de genes implicados en la regulación metabólica (más del 9,4%), lo cual caracteriza a microorganismos capaces de sobrevivir en ambientes muy diversos ².

P. aeruginosa es capaz de producir diversos pigmentos hidrosolubles como la pioverdina, de color verde-amarillento característico, cuya función biológica es actuar como sideróforo captando hierro. Otro pigmento sintetizado por este microorganismo es la piocianina, de color verde azulado, considerado una toxina de *P. aeruginosa*, capaz de reducir u oxidar otros compuestos y generar especies reactivas del oxígeno.

Otros pigmentos menos frecuentes son la piomelanina (marrón), y la piorrubina (rojo)².

Es un microorganismo ubicuo, capaz de persistir o incluso colonizar multitud de nichos ecológicos ambientales, así como también seres vivos, incluyendo plantas, animales y al hombre. En adultos sanos, se ha aislado en garganta, piel, mucosa nasal y mucosa intestinal. Es precisamente esa capacidad de sobrevivir en medios mínimos y la habilidad de tolerar gran variedad de condiciones físicas y químicas, lo que permite a *P. aeruginosa* persistir exitosamente tanto en la comunidad como en el ambiente hospitalario. En el hospital es frecuente aislar dicho microorganismo en antisépticos, jabones, equipos de respiración asistida, conductos de aire, colirios, etc³. Fuera de él, lo podemos encontrar en reservorios comunitarios como piscinas e hidromasajes, humidificadores, soluciones para lentes de contacto, en plantas, rizosfera y suelo³⁻⁵.

1.2. Importancia clínica

P. aeruginosa es un patógeno humano que aprovecha el estado de inmunosupresión del huésped como una oportunidad para causar un amplio abanico de infecciones agudas y crónicas.

La mayoría de infecciones adquiridas en la comunidad suelen ser leves y siempre condicionadas por el estado inmunológico del paciente, como otitis externa frecuentemente relacionada con el agua de las piscinas, foliculitis, conjuntivitis frecuentemente asociada al uso de lentes de contacto, queratitis, y algunas otras formas de infección ocular que pueden evolucionar desfavorablemente en muy poco tiempo y pueden conllevar la pérdida de visión, como en el caso de la endoftalmitis⁶.

Sin embargo, las infecciones graves y con peor curso tienen un origen nosocomial, cobrando especial relevancia en UCI y en unidades de críticos oncohematológicos, las cuales conllevan una alta mortalidad. Los largos periodos de estancia hospitalaria, la gravedad de los pacientes y la exposición a procedimientos invasivos, así como los factores de virulencia y la alta resistencia a antibióticos de este microorganismo están asociados a la adquisición de infecciones por *P. aeruginosa*⁷.

La tasa de colonización hospitalaria puede llegar hasta el 50%. Es causante del 20-30% de las neumonías asociadas a ventilación mecánica ⁸, 10-20% de infecciones del tracto urinario y del 3-10% de bacteriemias ⁹.

En la Tabla 1 se resumen las principales infecciones causadas por *P. aeruginosa* y los factores de riesgo relacionados.

Tabla 1. Principales infecciones causadas por *P. aeruginosa* y factores de riesgo relacionados ¹⁰.

Infección	Factores de riesgo
Tejidos blando	Quemaduras, heridas abiertas, herida quirúrgica
Tracto urinario	Uso de catéter urinario
Bacteriemia	Inmunosupresión
Pie diabético	Diabetes, circulación microvascular deteriorada
Neumonía	Edad avanzada, EPOC, FQ, ventilación mecánica
Otitis externa/media	Daño en tejido, acumulación de agua
Queratitis	Usuarios de lentes de contacto

1.3. Infecciones respiratorias

Es imprescindible destacar el papel que comporta *P. aeruginosa* en las **infecciones respiratorias**. Dentro de las infecciones **agudas**, es uno de los principales responsables de la neumonía asociada a ventilación mecánica (NAVVM) tardía. La presencia de lesiones secundarias a la intubación traqueal, ventilación mecánica, o traumatismos por la aspiración de secreciones, junto a la posibilidad de *P. aeruginosa* de crecer en forma de biofilm en la superficie del tubo endotraqueal, son los factores principales que favorecerán la colonización y la posterior infección. Las NAVVM por *P. aeruginosa* pueden llegar a tener una tasa de mortalidad de hasta el 50 % entre los pacientes afectados ¹¹.

Si no se erradica durante la fase de infección aguda, puede adaptarse al ambiente pulmonar causando **infección crónica**. La infección respiratoria crónica por *P. aeruginosa* es una de los principales impulsores de la morbilidad y la mortalidad en pacientes con fibrosis quística (FQ), bronquiectasias o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

La microbiota del tracto respiratorio de este tipo de pacientes representa un complejo ecosistema donde coexisten varias especies, siendo *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* y las especies pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia*, las más relevantes¹². De los pacientes con FQ un 80% de ellos en la pubertad ya resultan infectados de forma crónica por *P. aeruginosa*¹³. Tradicionalmente, la colonización inicial se considera producida por cepas únicas adquiridas a partir de fuentes ambientales que sufren una extensa adaptación dentro de los pulmones del paciente, que conduce a infecciones persistentes con poca transmisión de paciente a paciente. El establecimiento de las estructuras características de biofilms y la adquisición de una gran cantidad de mutaciones adaptativas son los principales responsables de la persistencia de estas infecciones a pesar de la extensa terapia antimicrobiana¹².

1.3.1. Desarrollo de mecanismos adaptativos

Algunos de estos mecanismos adaptativos más importantes son:

- **Fenotipo mucoide:** asociado a la hiperproducción del exopolisacárido alginato. El cambio de un fenotipo no mucoso hacia un fenotipo mucoso debe relacionarse con un empeoramiento de la función pulmonar^{14,15}.
- **Fenotipo hipermutador:** este tipo de variante se caracteriza por sufrir un aumento de la tasa de mutación espontánea, debido a mutaciones en los genes que codifican para el sistema de reparación de emparejamientos erróneos (mismatch repair system) del ADN tras su replicación. El fenotipo hipermutador presenta ventajas evolutivas en nichos ecológicos cambiantes, es la clave para la adaptación y la persistencia a largo plazo¹⁶, así como para el desarrollo de resistencias a prácticamente todos los antimicrobianos conocidos¹⁷.

- **Variantes defectivas en el sistema *quorum sensing*:** el *quorum sensing* es un sistema de estímulo-respuesta relacionado con la densidad poblacional. En bacterias coordina la expresión de ciertos genes según la densidad poblacional local. La variante defectiva en este sistema de comunicación es un fenotipo frecuente en aislados de FQ, y se cree que forma parte del proceso adaptativo de *P. aeruginosa* en las infecciones crónicas ¹⁸. La presencia de mutantes defectivos en este sistema indica que el *quorum sensing* deja de ser un elemento indispensable para el mantenimiento de la infección crónica, especialmente en las fases más avanzadas de la enfermedad ¹⁹.
- **Fenotipos resistentes a múltiples antibióticos:** durante el curso de la enfermedad respiratoria crónica y sus exacerbaciones se administran múltiples antibióticos en combinación con el fin de erradicar o disminuir la población bacteriana que coloniza las vías respiratorias del paciente. Así es muy frecuente que los aislados provenientes de estos individuos presenten multirresistencia a los antimicrobianos utilizados en esta patología.
- **Crecimiento en forma de biofilms.**

1.3.2. Formación de biofilms

Como se ha descrito anteriormente, *P.aeruginosa* posee múltiples mecanismos para evadir la respuesta del huésped y causar un amplio abanico de infecciones. Uno de ellos es la formación del biofilm.

Los biofilms son comunidades bacterianas organizadas, embebidas en una matriz extracelular polimérica asociada a una superficie vital o inerte. Están presentes en el 65-80% de las infecciones microbianas y representan una estrategia de adaptación para la supervivencia de los microorganismos en ambientes hostiles, entre los que se encuentra el ser humano ²⁰. La matriz extracelular que envuelve el biofilm constituye el 85% del total de la biomasa y está formada fundamentalmente por exopolisacáridos, ADN extracelular, productos derivados de la lisis bacteriana y polipéptidos que forman un entramado altamente hidratado, que aporta estabilidad frente a fuerzas mecánicas y dificulta la entrada de antibióticos y de moléculas del

sistema inmunitario ²¹. Aunque algunas características generales pueden ser consideradas comunes para todos los biofilms, cada uno tiene un comportamiento único ²².

La estructura del biofilm es heterogénea y presenta cambios constantemente, derivados de procesos internos y externos. El proceso de formación del biofilm comienza con una adhesión reversible de las células planctónicas a una superficie adecuada para su crecimiento (Figura 1A), gracias a los flagelos y pili en los bacilos gramnegativos y a las proteínas de superficie en grampositivos. Después, el biofilm prolifera en forma de microcolonias (Figura 1B) y se comienza a producir la matriz extracelular, formándose una unión irreversible entre ambas. Estas microcolonias evolucionan, se expanden y confluyen de forma que, progresivamente, el biofilm resulta más estructurado (células sésiles en el interior) (Figura 1C). Finalmente se produce la etapa de dispersión donde algunas bacterias son liberadas para colonizar nuevas superficies y comenzar el ciclo nuevamente (Figura 1D) ²³.

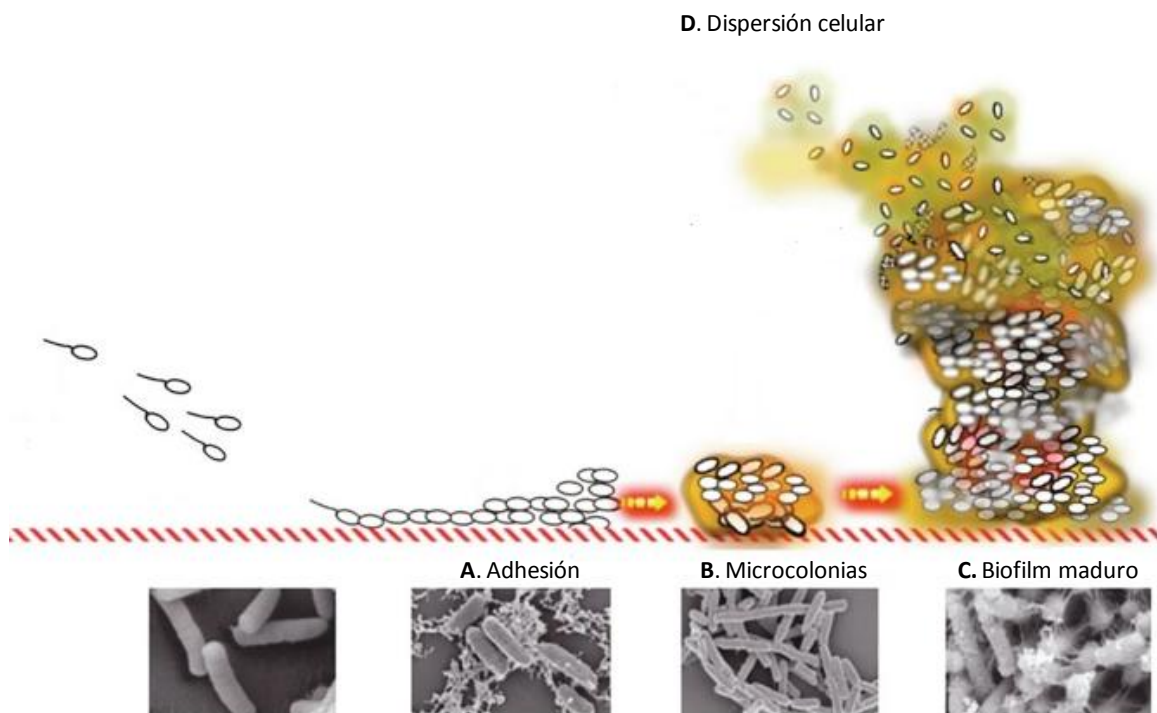


Figura 1. Esquema del proceso de formación de una biopelícula con imágenes de microscopía electrónica de barrido de cada etapa. (Figura adaptada de ²³)

P. aeruginosa produce tres tipos de polisacáridos implicados en la formación del biofilm: alginato, Pel y Psl. El alginato es un polímero (ácido gulurónico y ácido manurónico) que contribuye a la estabilidad y retención de agua y nutrientes. Pel y Psl son polisacáridos implicados en las etapas tempranas de la formación del biofilm. Los morfotipos de *P.aeruginosa* mucosos y no mucosos se diferencian en la proporción de estos polisacáridos: en los mucosos hay un predominio de alginato, mientras que en los no mucosos predominan Pel y Psl ²³.

La formación del biofilm está regulada por una serie de señales entre las células que logran la diferenciación de las bacterias planctónicas a comunidades complejas. Como se ha mencionado anteriormente, el **quorum sensing** es un mecanismo que detecta la densidad celular produciendo y percibiendo pequeñas moléculas llamadas autoinductores, que coordinan la producción de factores de virulencia, motilidad, y la formación de biofilm ²⁴. En su interior, las condiciones de este biofilm son microaerófilas o incluso anaerobias, y *P. aeruginosa* tiene la capacidad de crecer en este ambiente utilizando NO₃⁻ como aceptor terminal de electrones ²⁵. Durante el crecimiento anaerobio se ven reprimidos múltiples genes de virulencia, especialmente aquellos relacionados con la motilidad y los sistemas de secreción tipo III. Sin embargo, éstos también son responsables de la activación de la respuesta inmunológica del huésped y mientras están inactivados se hace más difícil la eliminación del patógeno ²⁵.

Implicación del biofilm en las infecciones

El impacto clínico de los biofilms en las infecciones es muy grande. Están presentes sobre todo en procesos crónicos, donde los microorganismos persisten a pesar de un tratamiento adecuado. La fibrosis quística, la endocarditis en válvula nativa, la otitis media, la periodontitis y la prostatitis crónica son ejemplos de infecciones causadas por microorganismos con crecimiento en forma de biofilm ²⁰.

La infección crónica por *P. aeruginosa* es la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística. El crecimiento en forma de biofilm, junto con la resistencia antibiótica que normalmente presentan estos aislados, hace imposible su erradicación. En este ambiente existe una mayor tolerancia a los

antimicrobianos, incluso hasta concentraciones 100-1000 veces mayores. Este hecho es debido principalmente a ²⁶:

- Baja actividad de algunos antibióticos en ambientes anaeróbicos presentes en el interior del biofilm.
- Presencia de células persistentes frente a las cuales los antibióticos son inactivos.
- Inducción de mecanismos de resistencia, como el aumento en la expresión de bombas de eflujo.
- Resistencia mutacional: la arquitectura del biofilm podría favorecer el desarrollo de resistencias mutacionales durante el tratamiento antibiótico.
- Transferencia de genes: dentro del biofilm está favorecida la transferencia genética horizontal entre bacterias.

1.4. Multirresistencia en *P. aeruginosa*

El tratamiento de infecciones causadas por *P. aeruginosa* constituye en muchos casos un auténtico reto clínico, ya que este microorganismo posee mecanismos de resistencia intrínseca a diversos antibióticos, y además puede desarrollar resistencias durante el tratamiento mediante mutaciones cromosómicas o a través de la adquisición horizontal de genes de resistencia de elementos móviles como plásmidos o integrones.

1.4.1. Resistencia intrínseca

La resistencia intrínseca se puede relacionar con distintos factores: escasa permeabilidad de la membrana externa, presencia de la β -lactamasa AmpC inducible y distintos sistemas de expulsión activa, así como por la formación de la capa de alginato que dificulta el acceso de los antibióticos (Figura 2) ²⁷.

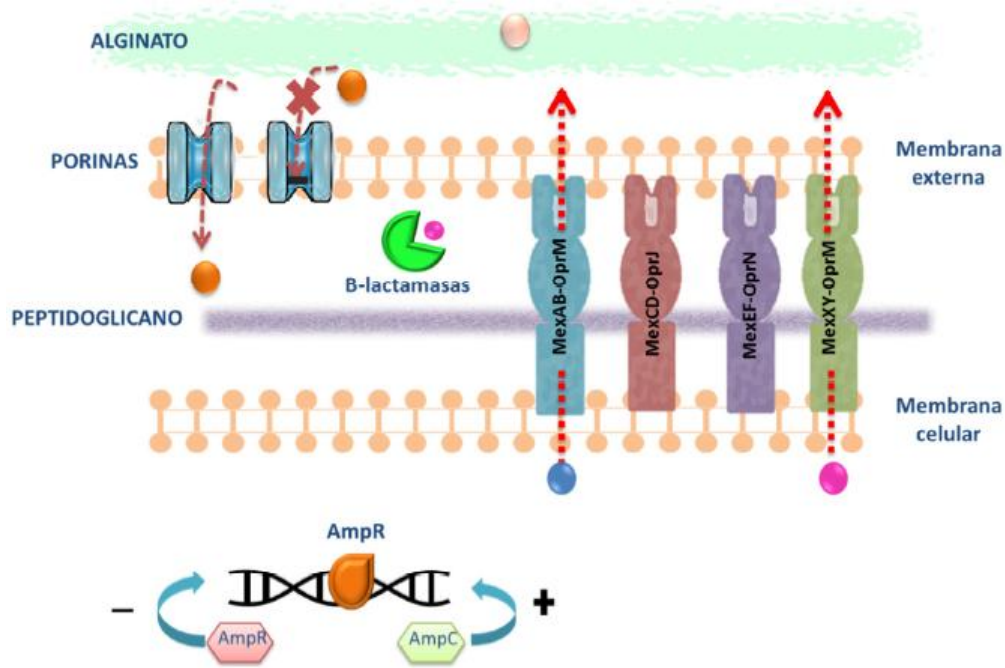


Figura 2. Esquema de los diferentes mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa*. Expulsión activa por sistemas Mex. Alteración en la expresión de las porinas. Hidrólisis por betalactamasas en el espacio periplásmico. Inducción/desrepresión del sistema AmpC. Capa de alginato que dificulta la entrada de antibióticos. (Figura tomada de ²⁷)

1.4.2. Resistencia adquirida

Además de su resistencia intrínseca ya mencionada, *P. aeruginosa* puede presentar mutaciones en sus genes que conducen al desarrollo de resistencia y/o adquirir elementos genéticos foráneos que le conferirán resistencia, como aquellos que codifican betalactamasas^{28,29} y enzimas modificantes de aminoglucósidos^{30,31} vía transferencia horizontal, los cuales representan los principales mecanismos contribuyentes en el desarrollo de resistencia en *P. aeruginosa*³²⁻³⁵.

Mutaciones en genes cromosómicos:

- Mutaciones en el sistema de regulación **AmpC**: constituyen el mecanismo más importante de resistencia a betalactámicos en *P. aeruginosa* y conducen a distintos grados de desrepresión de la producción de AmpC, reduciendo la sensibilidad a cefalosporinas de amplio espectro como ceftazidima^{36,37} y penicilinas como ticarcilina^{38,39}.

- Mutaciones en los genes que codifican **topoisomerasas** II (*gyrA* y *gyrB*) y IV (*parC* y *parE*) confieren resistencia a las fluoroquinolonas⁴⁰.

- Mutaciones en *oprD* que conllevan a la **pérdida de la porina OprD** se asocia con un aumento de resistencia a imipenem, y causa una pérdida de sensibilidad a meropenem^{41,42}.

- Mutaciones que conducen a la **hiperexpresión de bombas de expulsión activa**, se asocian a resistencias a diversos grupos de antibióticos como fluoroquinolonas, betalactámicos, macrólidos, tetraciclinas, aminoglucósidos...

Adquisición de determinantes de resistencia por transferencia horizontal:

De todo el arsenal terapéutico antipseudomónico, es en el grupo de los betalactámicos y en el de los aminoglucósidos donde los determinantes de resistencia adquiridos por transferencia horizontal tienen un mayor impacto. Existen numerosas enzimas cuyos genes se pueden transmitir horizontalmente entre cepas de *P. aeruginosa*, o incluso entre cepas de esta y otras especies bacterianas:

-La producción de **betalactamasas** juega un papel crucial en resistencia adquirida a betalactámicos. La variedad, la prevalencia y el significado clínico han sido motivo de alarma y preocupación, y por ello han sido ampliamente estudiadas en las últimas décadas^{33,43,44}. Las que más trascendencia clínica y epidemiológica están cobrando en los últimos años son las carbapenemasas, en las cuales su prevalencia ha ido incrementando de forma alarmante. Las metalobetalactamasas, o carbapenemasas de clase B son las carbapenemasas más prevalentes y preocupantes en *P. aeruginosa*, especialmente las VIM, seguidas de las IMP⁴⁵. La diseminación de estos determinantes de resistencia puede originar situaciones epidémicas de cepas multirresistentes.

-El otro grupo de enzimas que se adquiere por transferencia horizontal es el grupo de las **enzimas modificantes de aminoglucósidos**. Las más frecuentes en los aislados de *P. aeruginosa* son la acetiltransferasa AAC(6')-II y la nucleotidiltransferasas ANT(2'')-I³¹.

1.4.3.-Problema epidemiológico de la multirresistencia en *P. aeruginosa*

En Europa las tasas de multirresistencia de *P. aeruginosa* varían según el país. De acuerdo al último informe anual publicado de la EARS (2017)⁴⁶, España presentó un 10.9% de aislados invasivos de *P. aeruginosa* multirresistente, considerando resistencia a 3 o más grupos de las siguientes familias de antibióticos: piperacilina/tazobactam, ceftazidima, fluoroquinolonas, aminoglucósidos y carbapenémicos (Figura 3).

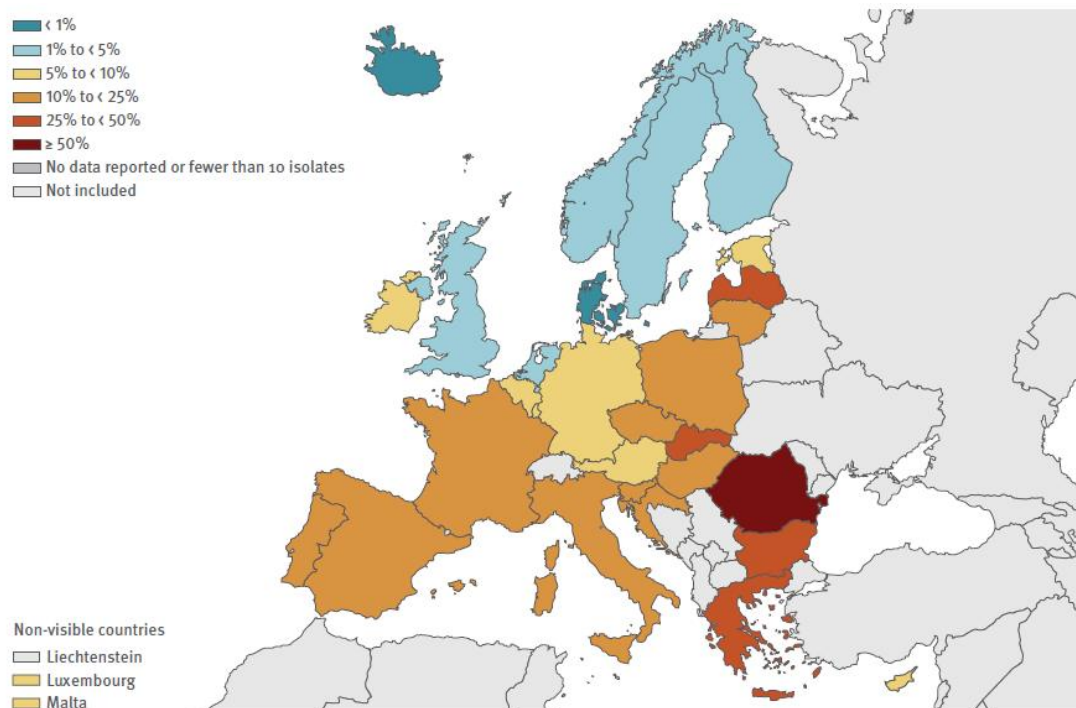


Figura 3. Porcentaje de aislados invasivos de *P. aeruginosa* multiresistente. (EARS 2017)

La multiresistencia en *P. aeruginosa* es un problema hospitalario que va en aumento y que afecta sobre todo a unidades de cuidados intensivos donde se han descrito brotes^{47,48}. En muchos países europeos, principalmente del área mediterránea, la resistencia a carbapenémicos en *P. aeruginosa* es una situación endémica. El mecanismo de resistencia a estos compuestos más comúnmente identificado es debido a metalo-carbapenemasas (MBL) de tipo VIM^{45,49}. Según el programa longitudinal MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) que se realiza desde el año 1997, la incidencia de *P. aeruginosa* multirresistente en unidades de cuidados intensivos fue de hasta el 50% en países como Turquía, mientras que en España, Reino Unido, Alemania, Bulgaria y Malta es del 3%⁵⁰.

2. Sobre la Fagoterapia

2.1. Bacteriófagos

Los bacteriófagos, a menudo abreviados como fagos, son virus que infectan bacterias y son las entidades más abundantes en la Tierra. 10^{31} partículas se distribuyen en nuestro planeta en todos los ecosistemas ⁵¹.

Los fagos se clasifican según su morfología en fagos filamentosos y fagos icosaédricos ⁵²:

Los **fagos filamentosos** se caracterizan por tener una hélice filamentosa. Los **fagos icosaédricos** se llaman así por la forma de su cabeza. Pueden ser de cola (96% de todos fagos) o sin cola. El Fago T4, perteneciente a la familia *Myoviridae* es un fago icosaédrico de cola cuya estructura ha sido estudiado en gran detalle. A continuación se explica brevemente la morfología de dicho fago, ya que posteriormente nos servirá para comprender mejor la estructura de las piocinas tipo R.

El fago T4 posee una cabeza icosaédrica con una cápside que encierra el ADN. La cabeza está unida a la placa de la base por una cola que consiste en una vaina helicoidal que cubre un tubo a través del cual el material genético se desliza durante la infección. Las fibras de la cola, conectadas a la placa base hexagonal, son necesarias para el reconocimiento de la bacteria huésped. Tras el reconocimiento, estas se unen irreversiblemente a la superficie de la célula asegurando la conexión. Después, el tubo de la cola penetra en la célula, y con la ayuda de enzimas hidrolíticas, inyecta el genoma viral ^{52,53}.

Tras la infección, los fagos pueden seguir el ciclo lítico o el ciclo lisogénico que conducen a diferentes resultados en el proceso infeccioso. En función de estos ciclos

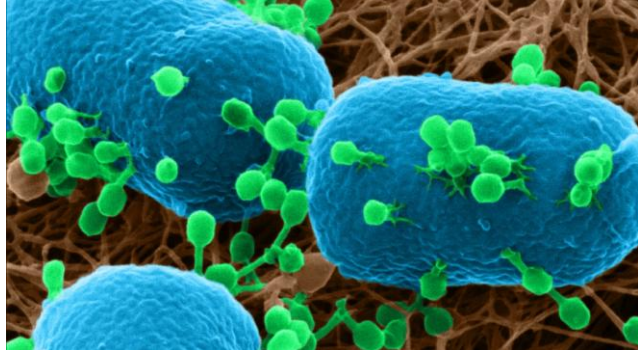


Figura 4. Imagen de microscopía de iones de helio de fagos T4 (verde) unidos a superficies bacterianas (azul). (Figura tomada de ⁵³)

de replicación, los bacteriófagos se clasifican como **virulentos** por medio de la vía lítica, o **atemperados**, los cuales una vez han infectado la célula pueden seguir en ciclo lítico o lisogénico.

En el **ciclo lítico**, el fago utiliza la maquinaria metabólica bacteriana para producir proteínas virales y copiar el genoma viral, sintetizando nuevos fagos inmediatamente seguida de una lisis celular, liberando la progenie.

Mientras que el **ciclo lisogénico** implica la integración del genoma viral en el ADN bacteriano, lo que se conoce como **profago**. De esta manera, el genoma del profago permanece en un estado quiescente. Cada vez que una célula divide, replica el ADN del fago junto con el propio y traslada las copias a las células hijas. La propagación pasiva de los profagos puede ser desplazada hacia un ciclo lítico, bajo determinadas circunstancias, como el estrés, condiciones ambientales específicas o la presencia de algunos antibióticos; derivando finalmente en la lisis celular ⁵².

2.2. Necesidad de terapias alternativas

Poco después del descubrimiento de la penicilina y el comienzo del uso generalizado de antibióticos por parte de la medicina occidental en la década de 1940, el propio Fleming advirtió que el mal uso de estos medicamentos pueden dar lugar a bacterias resistentes a los antibióticos. Sin embargo, el descubrimiento y el desarrollo de nuevos antibióticos floreció durante muchas décadas ⁵⁴. A finales del siglo XX, el descubrimiento de antibióticos se desaceleró, y el alarmante aumento en las tasas de resistencia a los antibióticos señalaron que la edad de oro de los antibióticos, tal vez había terminado. De hecho, aparte de tres nuevas clases de antibióticos descubiertas entre 2005 y 2018, no se han desarrollado nuevas clases de antibióticos desde la década de 1980 ⁵⁵⁻⁵⁷.

El mecanismo de acción similar entre estos nuevos antibióticos ha llevado a la evolución potencial de resistencia cruzada en las bacterias. Mientras que las modificaciones sintéticas a algunos antibióticos preexistentes han extendido temporalmente su utilidad clínica ⁵⁸, este enfoque también ha seleccionado

mecanismos de resistencia más amplios, como las betalactamasas de espectro extendido ⁵⁹, cambios adaptativos que han evolucionado más fácilmente en comparación con la aparición de mecanismos de resistencia de *novo*.

En 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) destacó la amenaza particular de patógenos gramnegativos resistentes a múltiples antibióticos. Es por tanto imprescindible el descubrimiento, diseño y desarrollo de nuevas terapias antibacterianas alternativas.

La capacidad de los bacteriófagos de lisar a sus bacterias hospedadoras, su amplia distribución y su elevada especificidad hicieron que estas entidades biológicas fueran propuestas desde un principio como herramientas de control de la población bacteriana.

2.3. Historia de la fagoterapia

La historia de los bacteriófagos comienza con el descubrimiento de los mismos durante la segunda década del siglo pasado (Twort, 1915; D'Herelle, 1917). Las primeras observaciones sobre la existencia de los mismos provienen del científico alemán Ernest Hankin quien informó acerca de una actividad antimicrobiana sobre *Vibrio cholerae* en el año 1896. Dos años después, Nikolay Fyodorovich Gamaleya observó el mismo fenómeno en *Bacillus subtilis*. Estos investigadores, sin embargo, no pudieron explicar la naturaleza del agente causante de esta actividad. En el año 1915 en Londres, Frederick Twort ⁶⁰ estableció la hipótesis de que esa actividad bactericida podía ser debida a un virus y en 1917 en el Institut Pasteur en París, el microbiólogo francocanadiense Félix D'Herelle demostró que la actividad antimicrobiana era producida por virus capaz de infectar bacterias ⁶¹. El propio D'Herelle propuso el término bacteriófagos [del griego griego phagein = comer] para designarlos, nombre con el que se los conoce hasta la actualidad.

D'Hérelle aplicó los fagos por primera vez en 1919 en el Hospital infantil Enfants Malades en París, en pacientes con disentería tóxica mediante la administración oral. En Alejandría, Egipto, d'Herelle trató cuatro pacientes con peste bubónica inyectando fagos directamente en los nodos linfáticos infectados. Los cuatro pacientes se recuperaron. Este fue un éxito notable y ampliamente divulgado en revistas médicas. Durante una epidemia de cólera en la India en 1927, d'Herelle trató a pacientes con fagos, reduciendo la tasa de mortalidad del 63% de los pacientes no tratados al 8% de los pacientes tratados con fagos⁶².

Félix d'Herelle colaboró con un científico georgiano, Georgi Eliava en los primeros trabajos del Instituto Pasteur y continuó desarrollándolos junto a él en Tbilisi, Georgia. Los dos finalmente fundaron la IBMV (Instituto de Microbiología y virología de bacteriófagos) en 1933 en Tbilisi, que fue explotado posteriormente por sus seguidores para ser el mayor centro de investigación y producción de fagos del mundo.

A pesar del entusiasmo de los resultados de estos primeros años, ya en 1934 comenzaron las primeras críticas. El escaso conocimiento de la biología de los fagos, la falta de resultados concluyentes, el descubrimiento de los antibióticos como la penicilina y su masiva utilización en la Segunda Guerra Mundial, hicieron que tanto en Europa occidental como en EE.UU, se abandonara progresivamente esta estrategia.

En cambio se mantuvo en Europa Oriental, especialmente en el Instituto Eliava de Tiflis (Georgia), donde siguieron desarrollando técnicas para la obtención, purificación y selección de bacteriófagos utilizados contra una variedad de infecciones bacterianas. Los casos de pacientes durante décadas anteriores han sido documentados recientemente. Particularmente durante la Segunda Guerra Mundial, se produjeron y se utilizaron grandes volúmenes de fagos. El Instituto se convirtió en



Figura 5. Frederick Twort (arriba), Félix D'Herelle (centro), Georgi Eliava (abajo).

una rama del Ministerio de Salud soviético, y en la década de 1980, 1000 empleados estaban produciendo más de una tonelada de fagos a la semana. El 80% se destinó a los militares soviéticos, principalmente para combatir la disentería ampliamente presente. Con la ruptura de la antigua Unión Soviética, el centro de producción gigante fue privatizado. Aún así, dicho instituto ha mantenido su investigación y desarrollo hasta hoy, con una reputación internacional incuestionable ⁶³. Se han documentado casos de pacientes durante décadas hasta ahora ⁶⁴, incluyendo un estudio de casos bilateral georgiano-alemán ^{65,66}. Sin embargo, todavía no se han realizado ensayos clínicos de acuerdo con los estándares occidentales.

También en Wrocław, Polonia, hay un centro de renombre para la investigación en terapia de fagos personalizada. Los científicos polacos dirigidos por A. Górski (Instituto Ludwik Hirszfeld de Inmunología y Terapia Experimental) investigan la respuesta inmune producida por la fagoterapia. En un estudio realizado de 2008 a 2010 con 153 pacientes, no pudieron describir una respuesta inmune no deseada; concluyendo que la eficacia de los fagos parece independiente de la respuesta inmune ⁶⁷⁻⁶⁹.

Se comenzaron aplicando principalmente cócteles de fagos elaborados por Eliava BioPreparations LTD, para aumentar la probabilidad de combatir diversas infecciones bacterianas. El gobierno de la República de Georgia aprobó estos cócteles, los cuales han evolucionado desde la década de 1930: Intestiphage[®], dirigidos a *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Enterococcus* y *Staphylococcus* procedentes de infecciones intestinales y Pyophage[®] para infecciones del lecho quirúrgico, contra *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *E. coli* y *Proteus*. Actualmente ambos productos son probados y actualizados cada seis meses, y están ampliamente distribuidos en las farmacias georgianas.



Figura 6. Intestiphage® y Pyophage®. Cócteles de fagos elaborados por Eliava BioPreparations LTD

Con la ayuda de Europa, actualmente están aplicando las Normas de Correcta Fabricación (NCF) (en inglés, Good Manufacturing Practice GMP) vigentes en países occidentales. Se puede decir que a partir de estos ensayos la utilización de fagos (o de sus productos) está viviendo una época de renovado interés científico y de gran esperanza para el tratamiento de ciertas infecciones recalcitrantes.

2.4. Panorama actual de la fagoterapia

La fagoterapia en los últimos años ha tenido una serie de importantes problemas. Así, debido a un escaso interés por parte de la industria farmacéutica no existen preparaciones comerciales de fagos en Europa o EEUU para uso humano. Por otro lado, las autoridades sanitarias mundiales no han previsto que la fagoterapia pudiera beneficiar a los pacientes y no se han elaborado guías sobre producción, calidad y seguridad de los mismos. El comportamiento de los fagos, al ser elementos infecciosos bacterianos, los hace biológicamente distintos de otras preparaciones farmacéuticas, aunque podrían regularse siguiendo las directrices de las vacunas víricas atenuadas^{70,71}. A pesar de ello, existen preparados de fagos que son utilizados en la industria alimentaria para la eliminación de las principales bacterias enteropatógenas y que están aprobados por la FDA como elementos “considerados generalmente como seguros”⁷².

Desde el año 2000, en Europa se han descrito varios ensayos clínicos. Especialmente en Bélgica y Francia se han utilizado fagos en casos únicos de

infecciones potencialmente mortales según la Declaración de Helsinki, art. 37. Un ejemplo es el caso de un paciente con sepsis de origen renal ⁷³.

Hasta 2005 no se realizó un estudio sobre la seguridad humana en la administración de preparaciones de fagos. En el trabajo de *Bruttin y cols.* ⁷⁴ los sujetos recibieron por vía oral el fago T4 en el agua de bebida. No se detectaron efectos adversos asociados a la ingesta. Este dato favoreció el inicio en Europa occidental de los primeros ensayos para el tratamiento de las otitis causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. Los resultados mostraron un 50% de disminución de los síntomas comparado con el 20% de los no tratados. Del mismo modo los pacientes tratados con fagos redujeron la carga bacteriana en un 80% mientras que los no tratados permanecieron igual a las 3 semanas del análisis ^{74,75}.

También los estudios realizados en modelos animales han mostrado unos resultados muy esperanzadores. Varios fagos han sido capaces de eliminar *Escherichia coli* multirresistentes del intestino murino ^{76,77} y han obtenido un porcentaje de supervivencia del 100% frente a sepsis por *P. aeruginosa* resistente a imipenem ⁷⁸. Sin embargo la mayoría de estudios en animales se han realizado bajo condiciones experimentales totalmente diferentes y no siempre comparables. A pesar de ello, y de forma global estos estudios demuestran la importancia del momento y de la vía de administración de estos fagos. De modo que su eficiencia disminuye a medida que se retrasa su administración y que la vía tópica o local parece obtener más eficacia que la oral ^{78,79}.

Como se ha mencionado anteriormente, la formación de biofilms durante la infección bacteriana es uno de los principales problemas en el control de las mismas. Las bacterias en los biofilms son extremadamente resistentes a los antibióticos, están protegidas de las defensas del huésped y acaban convirtiéndose en infecciones crónicas ⁸⁰. Algunos fagos son capaces de penetrar estos biofilms y podrían complementar al tratamiento antibiótico convencional. Algunos autores han comprobado como una mezcla de diferentes fagos frente a *Clostridium difficile* reducen significativamente los biofilms y previenen la colonización bacteriana de los mismos ⁸¹. También se ha observado una disminución significativa en la formación de

biofilms por parte de *Proteus mirabilis* en las infecciones asociadas a catéter urinario 70,77,80 .

La sencillez del genoma de los fagos permite realizar innumerables alteraciones mediante ingeniería genética. Así se han modificado para que al utilizarlos conjuntamente con un antibiótico se incremente su actividad bactericida ⁷¹. También su modificación genética ha permitido disminuir el desarrollo de resistencias bacterianas a ciertos antibióticos; la administración de fagos con genes de resistencia dominantes determina una disminución de la resistencia en las bacterias receptoras ⁷¹.

Recientemente se han elaborado fagos genéticamente modificados que incluyen el sistema de edición génica CRISPRCas9 para que detecten los genes bacterianos de resistencia y los inactiven ⁷¹.

En 2006 la FDA aprobó un ensayo clínico en Fase I con 42 pacientes con úlceras cutáneas para evaluar la seguridad de ocho combinaciones de fagos capaces de lisar a *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*; se obtuvieron unos resultados excelentes tanto en la seguridad como en la eficacia terapéutica (clinicaltrials.gov NCT00663091) ⁸². Tres años más tarde se realizó otro estudio sobre la seguridad, tolerabilidad y eficacia de la administración oral del fago T4 en el tratamiento de la diarrea toxigénica por *E. coli* en niños; los resultados mostraron ser una alternativa a la terapia antibiótica especialmente en los países en vías de desarrollo sin modificaciones sobre la flora intestinal de los pacientes (clinicaltrials.gov NCT00937274) ⁸². En 2013 se puso en marcha el estudio "Phagoburn", auspiciado por la Comisión Europea bajo el 7º programa de investigación y desarrollo, destinado a evaluar el uso tópico de cócteles de fagos en las quemaduras infectadas por *E. coli* y *P. aeruginosa*. Además servirá para establecer las guías de utilización de esta nueva terapia en infecciones cutáneas (clinicaltrials.gov NCT0216010) ⁸². En septiembre del 2017 en Alemania se lanzó "Phage4Cure" financiado completamente por el gobierno alemán, para demostrar la seguridad de preparaciones de fagos altamente purificados y finalmente reducir la infección crónica de *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística o bronquiectasias, mediante la inhalación de fagos. El ensayo clínico se realizará en el Charité University Hospital, Berlín (<http://phage4cure.de/en/>). Este ensayo clínico se utilizará para establecer las NCF de purificación para futuras preparaciones de fagos en Alemania.

AmpliPhi Biosciences Corporation (<http://www.ampliphbio.com>) ha lanzado otro ensayo clínico, focalizado en *P. aeruginosa* en pacientes con FQ⁸³. En Estados Unidos se están desarrollando varios trabajos de fagoterapia de uso tópico para el tratamiento de las úlceras diabéticas^{84,85}. Para el tratamiento de infecciones del lecho quirúrgico por *S. aureus*, se han formulado matrices similares a un parche que liberan continuamente fagos⁸⁶.

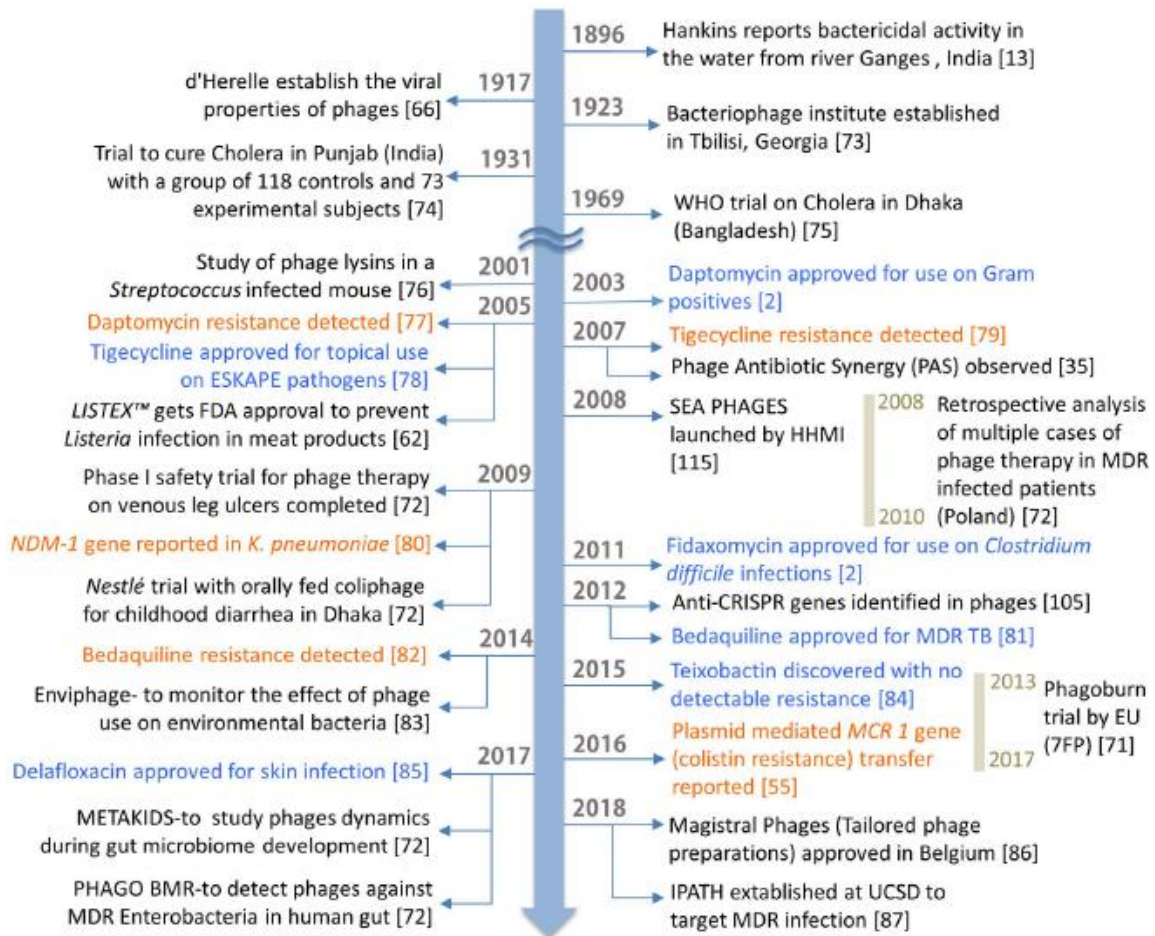


Figura 7. Hitos importantes logrados y esfuerzos realizados en el desarrollo de la terapia con fagos. También se mapean en orden cronológico las aprobaciones para nuevas entidades químicas (azul) y el desarrollo de resistencia a los medicamentos (naranja). Tomado de Saha y cols.⁵².

2.5. Ventajas y limitaciones de la fagoterapia

La característica principal de los fagos es su **alta especificidad de infección**, que generalmente reconoce un rango limitado de cepas bacterianas. Esto reduce el daño causado a la flora microbiana habitual del huésped, evitando así disbiosis y desarrollo de infecciones secundarias, pero también requiere la identificación del patógeno y la

selección de un fago efectivo ^{87,88}, lo cual puede retrasar el tratamiento. Además, como la propagación de los fagos depende de su huésped, la replicación se produce únicamente en el sitio de la infección, son **autodosificantes** y **autolimitantes**, con lo que no persisten al eliminar a su patógeno bacteriano específico.

Otra ventaja de los fagos es su **baja propensión a inducir resistencia** y la ausencia de resistencia cruzada a los antibióticos ⁸⁹. Esto hace que los fagos sean una solución efectiva contra bacterias resistentes a múltiples fármacos y biopelículas ⁹⁰. Sin embargo, se pueden seleccionar bacterias fago-resistentes. Algunos mecanismos de resistencia ya han sido identificados. Estos incluyen el bloqueo de adsorción de fagos debido a la pérdida o mutación del receptor bacteriano ^{87,91}, así como la adquisición horizontal de un sistema de restricción-modificación o desarrollo de inmunidad adaptativa, ambos dando como resultado la degradación del ADN del fago inyectado ^{91,92}.

Uno de los inconvenientes más preocupantes de los fagos está relacionado con su **material genético**. Los fagos puedan portar genes de resistencia a los antibióticos u otros factores de virulencia bacteriana que se puedan transferir a la bacteria a través de la transducción generalizada ^{93,94}. Como esto es más común en fagos capaces de infectar bacterias mediante un ciclo lisogénico, sólo se utilizan fagos líticos (no transductores) en terapéutica ⁹⁵. Sin embargo, los fagos líticos también pueden ser problemáticos, ya que la lisis rápida de una gran cantidad de bacterias *in vivo* puede conducir a la liberación de endotoxinas y superantígenos que puede inducir una respuesta inflamatoria, que potencialmente puede causar efectos secundarios graves ^{87,96}.

También es importante la **inmunogenicidad** que puedan generar los fagos y su consiguiente eficacia *in vivo*. Los fagos son percibidos por el sistema inmune como invasores y puede ser rápidamente eliminados de la circulación sistémica, lo que dificulta mantener una concentración efectiva de fagos ⁹⁶. Un estudio de *Łusiak-Szelachowska y cols.* demostró la inducción de anticuerpos antifágicos después de la terapia con fagos, siendo dependiente de la ruta de administración y tipo de fago ⁹⁷.

Sin embargo, los autores consideraron que la detección de actividad antifágica durante y después la terapia con fagos no excluye un tratamiento favorable ⁹⁷.

Finalmente, desde el punto de vista del desarrollo, los fagos tienen las ventajas de un aislamiento rápido, **menores costes de desarrollo** que los antibióticos y más versatilidad en las formulaciones y aplicaciones ^{90,95}.

Los pocos cientos de fagos actualmente descritos en bases de datos públicas representan una nimiedad si se comparan con los 10^{31} viriones estimados presentes en la naturaleza. Tal diversidad les confiere potencial como para ser una de las estrategias terapéuticas más prometedoras identificadas hasta la fecha.

Para poner solución a las limitaciones más importantes de la fagoterapia (inmunogenicidad, estrecho rango de acción y transmisión de elementos génicos) se están investigando diversas vertientes, como la mezcla y combinación de fagos y/u otros recursos genéticos para crear nuevos fagos o partículas similares a fagos (ingeniería de fagos sintéticos) y la utilización y/o ingeniería de proteínas derivadas de fagos para crear nuevas proteínas antibacterianas (ingeniería de proteínas de fagos), como por ejemplo el uso y el desarrollo de las **PIOCINAS** ⁹⁸.

3. Sobre las Piocinas

Las **bacteriocinas** son toxinas proteicas producidas por bacterias para matar las cepas competidoras de la misma especie, además de parientes cercanos. Se cree que funcionan como un medio para invadir y defender su nicho ecológico, y probablemente ayudar a mantener la diversidad microbiana y los niveles poblacionales ^{99,100}.

La producción de bacteriocinas se ha estimado que ocurre en más del 99% de las bacterias ¹⁰¹. Las bacteriocinas producidas por *Pseudomonas aeruginosa* se denominan **PIOCINAS**.

La piocinogenia, o la capacidad de producir piocinas, está muy extendida en las especies de *P. aeruginosa*, pero su nivel de producción espontáneo o basal es bajo. El tratamiento de los cultivos con agentes mutagénicos aumentan considerablemente la tasa de producción.

Las piocinas se clasifican en cuatro grupos. Las dos primeras, las piocinas tipo R y tipo F, son grandes estructuras macromoleculares homólogas a las colas de fagos. Las otra dos, piocinas tipo S y tipo M, son pequeños complejos proteicos homólogos a las conocidas colicinas de *E. coli*.

La acción bactericida de las piocinas implica un mecanismo "**single hit**" (de un solo golpe o de una sola vez) ¹⁰²⁻¹⁰⁴. Es decir, la acción de matar a una bacteria de *P. aeruginosa* se debe a una única partícula/molécula de piocinas. Por lo tanto, si una unidad bactericida comprende 200 moléculas, significa que sólo es activa una de cada 200 piocinas adsorbidas. Por ejemplo, la unidad bactericida de las piocinas R es de 1 a 2 ¹⁰⁴ y para las piocinas de tipo F y S 280 y 300, respectivamente ¹⁰³. Es decir, para matar a una célula de *P. aeruginosa* se requieren entre 1 y 2 moléculas de piocinas tipo R y entre 280 y 300 de tipo F y S. Las piocinas tipo R son las más activas.

Las piocinas R son típicamente muy específicas, con un estrecho rango de hospedador. Una célula es resistente a las piocinas R producidas por ella misma o por sus células hermanas. Sin embargo, una célula individual debe sacrificarse para

producirlas porque sólo libera piocinas R mediante su propia lisis. Se puede ver como una forma de altruismo en la que las células producen piocinas para proporcionar una ventaja competitiva a las células hermanas. Dada la alta potencia de las piocinas R, es posible que sólo una pequeña fracción de una población se necesite lisar y liberar partículas para proteger a los parientes y dar a la población una ventaja selectiva¹⁰⁵.

Las piocinas de tipo R son el grupo más estudiado y se ha demostrado que matan no sólo a una diversidad de cepas de *P. aeruginosa*, sino también a varias especies de *Campylobacter spp.*¹⁰⁶, *Neisseria gonorrhoea*¹⁰⁷, *Neisseria meningitidis*¹⁰⁷, *Haemophilus ducreyi*¹⁰⁸, *Pseudomonas fluorescens*¹⁰⁹ y *Pseudomonas putida*¹⁰⁹.

3.1. Piocinas tipo R

Las piocinas tipo R están incluidas dentro del grupo "Phage-tail like bacteriocins (PTLB)" o "bacteriocinas como colas de fagos" también conocidas como "fagos sin cabeza", o "fagos defectivos". Al no tener cabeza, tampoco tienen material genético, eliminando la posibilidad de transmisión horizontal de genes de resistencia antimicrobiana o genes de virulencia entre bacterias, una de las limitaciones más importantes en fagoterapia.

Se han caracterizado cinco tipos diferentes de piocinas de tipo R, R1–R5, en base a su actividad bactericida¹⁰⁴ y a las secuencias de aminoácidos de la proteína Prf15 de la fibra de la cola (PA0621 de PAO1). La secuencia de las proteínas de la fibra de la cola de las piocinas R2, R3 y R4 es casi idéntica. Sin embargo, la secuencia de la región C-terminal de la proteína Prf15 de R1- y R5-piocinas difiere considerablemente¹¹⁰. Por lo tanto, las R-piocinas se pueden clasificar en tres tipos: R1, R2 y R5

3.1.1. El loci de las R-piocinas

Poco después de su descubrimiento, mediante microscopía electrónica, se demostró que las piocinas tipo R eran estructuras que parecían colas de fago, y desde

entonces se cree que están relacionadas evolutivamente con estos orgánulos de fagos (Figura 8).

El loci de piocinas tipo R y tipo F se ubica en el cromosoma de *P. aeruginosa* PA01, entre los genes *trpE* y *trpG* (síntesis de triptófano) ^{111,112}. Esta región se caracteriza por cuatro características principales: la región de la piocina R que contiene todos los genes que codifican sus proteínas estructurales y de ensamblaje, la región de la piocina F que contiene sus equivalentes, los genes reguladores de piocinas, y el casete de lisis de piocinas.

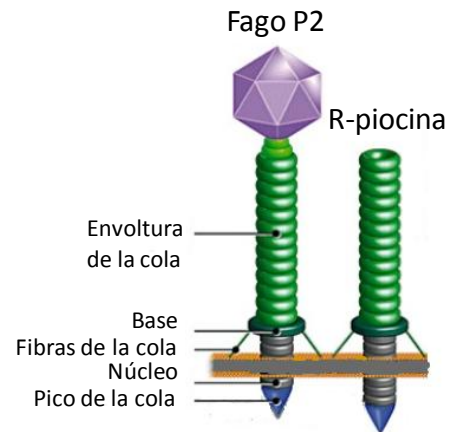


Figura 8. Relación estructural entre el fago P2 y la piocina tipo R

Concomitante con el lanzamiento de la secuencia del genoma PA01 en 2000, *Nakayama y cols.* publicaron una comparación de los marcos de lectura abierta (Open Reading Frame, ORF) de piocinas de tipo R con fagos P2, y los ORF de piocinas de tipo F con fagos lambda ¹¹³. Se observó una alta homología genética concluyendo que hay relaciones evolutivas entre ellos.

Cabe destacar que no se encontraron genes para la formación o replicación de la cabeza, lo que sugiere que las piocinas se han especializado evolutivamente como bacteriocinas en lugar de ser fagos defectuosos. El alto porcentaje GC en la mayoría de las regiones del genoma indica que son altamente conservadas, excepto los genes que codifican la fibra de la cola, lo que sugiere una transferencia horizontal más reciente e indica una región de mayor variabilidad ¹¹¹.

3.1.2. Inducción de las piocinas R

P. aeruginosa cultivada en medios enriquecidos produce frecuentemente un nivel basal de piocinas. Sin embargo, desde el descubrimiento de las piocinas de tipo R se sabe que la radiación ultravioleta induce a *P. aeruginosa* a producir piocinas antes de causar su lisis celular ¹⁰², a un ritmo de aproximadamente de 200 partículas por

célula ¹⁰⁴. Kageyama identificó la mitomicina C, un intercalante de ADN, como un potente inductor de piocinas ¹⁰⁴. La inducción de piocinas (aproximadamente 200 veces mayor) por esta sustancia sugirió que el daño al ADN, y por lo tanto, la respuesta bacteriana SOS conservada juega un papel en la regulación de las piocinas. Es probable que la producción basal de piocinas se derive de un subconjunto de células que, durante la replicación normal, sufren daño en el ADN y son inducidas a producir piocinas. Quizás la mayor parte de la población celular reciba una ventaja competitiva por la producción de bacteriocinas en individuos que están irreparablemente dañados ¹⁰⁵.

La respuesta SOS en bacterias es responsable de la reparación del ADN y depende en gran medida del regulador RecA. En respuesta al daño en el ADN, RecA se activa e induce LexA, un represor transcripcional, para auto-escindir, lo que permite la producción de proteínas SOS para la reparación del ADN.

La síntesis de piocinas es efectivamente dependiente del gen *recA* ¹¹⁴, pero las cajas P no comparten similitud con las cajas SOS y el represor LexA al parecer no está involucrado en la síntesis de piocinas ¹¹². Estudios en mutantes nulos en piocinas derivados de la cepa PAO permitieron identificar dos genes: el gen *prtN*, ubicado aguas arriba del loci de R-F, codifica un nuevo tipo de regulador positivo PrtN ¹¹³. Este se une a las secuencias conservadas de la caja P ¹¹². El gen *prtR* codifica una proteína represora PrtR, que regula a la baja la actividad promotora del gen *prtN* y presenta un sitio de escisión para la proteína RecA activada. El mecanismo de regulación de la síntesis de piocinas, involucra a los tres genes *recA*, *prtR* y *prtN* ¹¹⁵ y se resume en la Figura 9.

Además de los genes que codifican para la síntesis de piocinas, PrtN activa la expresión de un casete de lisis que codifica varias proteínas, incluidas las enzimas similares a las holinas y las quitinasas ¹¹². Después de la síntesis de piocinas, el casete de lisis media la lisis celular, matando la célula y liberando las piocinas al medio ambiente ¹¹².

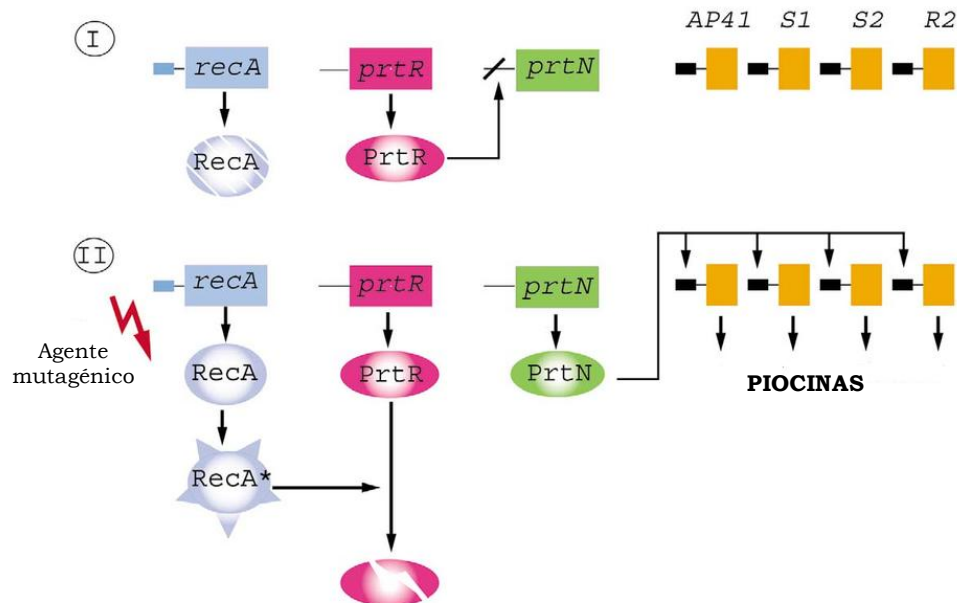


Figura 9. Regulación de la actividad de los genes de las piocinas

- (I) En ausencia de inductor, muy pocas células producen piocinas porque la proteína activadora PrtN es reprimida por el represor PrtR (*recA* produce muy pocas moléculas de proteína RecA).
- (II) En presencia de un agente mutagénico, este agente que daña el ADN aumenta la expresión del gen *recA* que codifica la proteína de reparación del ADN RecA, y activa la proteína RecA en RecA*, que escinde la proteína represora PrtR y libera la expresión del activador PrtN, siguiendo con la síntesis de las piocinas.

Caja SOS y caja P están representadas por cuadros azules y negros, respectivamente.

(Figura adaptada de Michel-Briand y cols. ¹¹⁴)

3.1.3. Estructura y Mecanismo de acción

Las piocinas de tipo R consisten en un **núcleo** que es un tubo de un polímero compuesto por un único polipéptido (Figura 10). Dicho núcleo finaliza en una proteína puntiaguda trimérica que tiene un resto de hierro en la punta ¹¹⁶. El núcleo está rodeado por una **envoltura** o vaina, que también es un polímero de un único polipéptido. El conjunto envoltura/núcleo en forma no contraída tiene una longitud de 120nm ¹¹⁷. En un extremo está la estructura de la base, que consta de siete polipéptidos separados. Las **fibras de la cola** se unen a la base, están compuestas de un solo polipéptido y sirven como proteínas de unión al receptor. Como se ha mencionado anteriormente, la región C-terminal de la proteína Prf15 de las fibras de la cola, difiere considerablemente entre las cinco distintas piocinas R. Esta diferencia es

responsable de las distintas especificidades del receptor. Esta región variable es la parte de unión que interactúa con diferentes restos en el receptor, que es el lipopolisacárido celular^{110,117,118}. Se requiere de una pequeña proteína chaperona para el ensamblaje de las fibras de la cola. Cada tipo de pirocina codifica una chaperona diferente correspondiente a las distintas proteínas de unión al receptor.

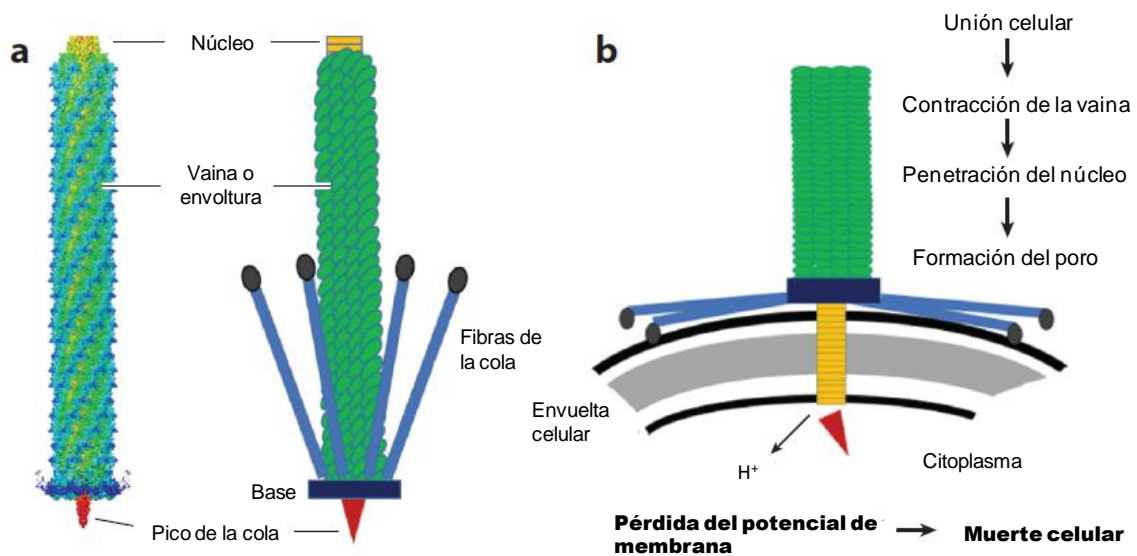


Figura 10: Pirocina tipo R. (a) Estructura. (b) Mecanismo de acción: las partículas se unen a la superficie celular mediante la unión al receptor, y la vaina se contrae, conduciendo el núcleo a través de la envoltura celular y dejando un canal que desacopla el gradiente de iones y para la respiración celular.

(Figura adaptada de Scholl¹⁰⁴)

El modelo propuesto para el **mecanismo de acción** es el siguiente (Figura 10): La pirocina R se unen al lipopolisacárido (LPS) de la superficie celular mediante las proteínas de unión al receptor (en las fibras de la cola)¹¹⁸. Una vez unida, la vaina se contrae, obligando al núcleo a penetrar en la envoltura celular, dirigida por la punta de la cola, a través de la membrana interna. Esto deja un canal a través del cual fluyen los protones y otros iones pequeños, interrumpiendo el gradiente de iones con la consecuente pérdida del potencial de membrana^{104,119}. Por lo tanto, el mecanismo de destrucción de las bacteriocinas de tipo R está relacionado con el mecanismo en el que los fagos *Myoviridae* introducen el ADN en la célula después de su unión. Pero en lugar de ADN, al entrar en la célula, se crea un poro¹¹¹. Como se ha dicho anteriormente, al no tener ADN, eliminan la posibilidad de transmisión horizontal de genes, una de las ventajas más importantes con respecto a la fagoterapia.

La lisis de *P.aeruginosa* se produce varias horas después de la muerte. Es probable que la lisis no sea parte del mecanismo de muerte, sino más bien se produzca debido a la posterior degradación de las células a partir de enzimas celulares¹⁰⁵.

3.1.4. Receptor de las piocinas R: el lipopolisacárido

Inicialmente se sugirió que el lipopolisacárido (LPS) podría jugar un papel importante en la interacción piocina-superficie celular, ya que se demostró que extractos del LPS de cepas de *P. aeruginosa* sensibles a las piocinas podían neutralizar las preparaciones de piocinas R¹²⁰.

El lipopolisacárido es un glucolípido complejo anclado en el exterior de la membrana de bacterias Gram-negativas que actúa como un escudo que protege a la bacteria de sustancias dañinas, pero también es en sí mismo es una endotoxina que puede desencadenar y activar las respuestas inmunes del huésped durante una infección¹²¹. El LPS consta de tres dominios: **el lípido A**, que contiene cadenas de ácidos grasos responsables de anclar el LPS a la membrana externa, un oligosacárido ramificado llamado **núcleo**, y un polímero de hidratos de carbono repetitivo conocido como el **antígeno O**. La mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* producen dos formas distintas de Ag O, una es un homopolímero de d-ramnosa que es un antígeno de polisacárido común (CPA, anteriormente denominado banda A), y la otra un heteropolímero de tres a cinco distintos (y a menudo únicos) didesoxiazúcares en sus unidades repetidas, conocidas como antígeno específico O (OSA, anteriormente denominado banda B). Las diferencias de composición en el antígeno O entre el OSA de diferentes cepas forman la base del Esquema Internacional de Tipificación Antigénica para la clasificación mediante serotipado de diferentes cepas de *P. aeruginosa*^{121,122}. Curiosamente, *Kohler y cols.*¹¹⁸ descubrieron que las cepas de ciertos serotipos tendían a ser más resistentes a las piocinas R (O10, O11, O12), mientras que aquellas con otros serotipos fueron más sensibles (O1, O3, O6). Los autores sugieren que los serotipos O1, O3, y O6 podría tener densidades de empaquetado más bajas en sus bandas A y B, permitiendo acceder a las piocinas a los receptores celulares necesarios pero desconocidos. Al estudiar diferentes mutantes en

el LPS de *P. aeruginosa* (*wbpP*, *wbpM*, *wbpL*, *rmIC* y *algC*), Köhler y cols. descifraron los sitios específicos de unión de las pirocinas R en el LPS ¹¹⁸ (Figura 11). Estos incluían dos residuos de glucosa separados que eran necesarios para la actividad de pirocinas R2 y R5 y un residuo de L-ramnosa para R1 ¹¹⁸. Estos datos en conjunto sugieren que el LPS actúa tanto como un escudo contra la actividad de la pirocinas en algunos casos, pero también como un receptor necesario para todas las pirocinas de tipo R.

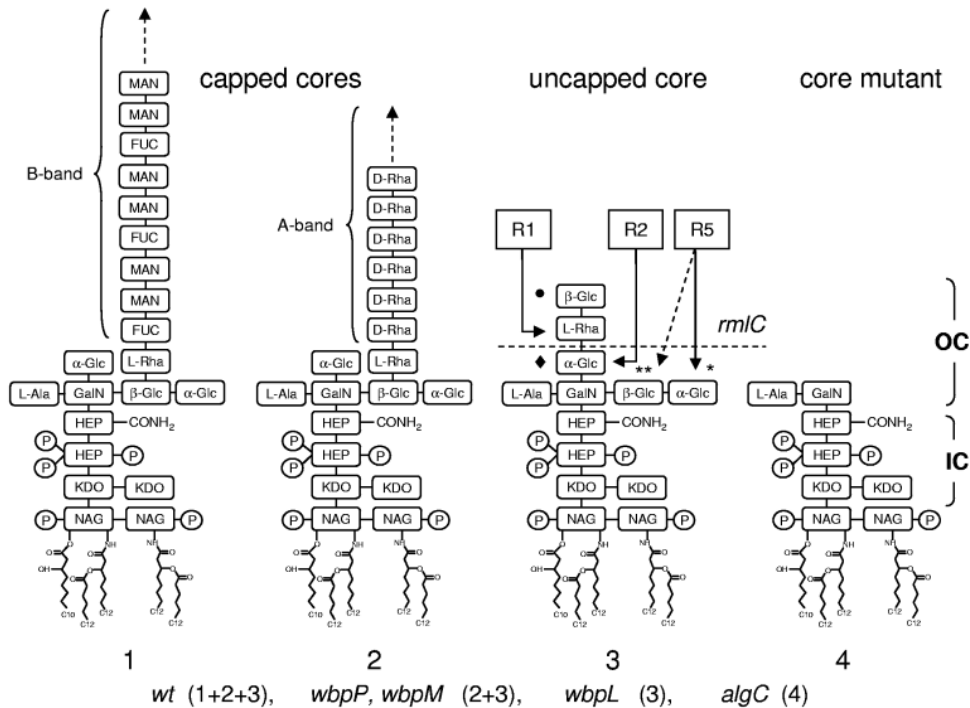


Figura 11. Estructuras de LPS de *P. aeruginosa* PAO1 (serotipo O5) y derivados mutantes. Las estructuras 1 y 2 muestran un núcleo cubierto por las cadenas polisacáridicas banda B y banda A, respectivamente. La Estructura 3 muestra el núcleo sin cubrir. El LPS de una cepa PAO1 salvaje (*wt*) se compone de las estructuras 1, 2 y 3. Los mutantes *wbpP* y *wbpM* carecen de banda B en el LPS, mientras que los mutantes *wbpL* son deficientes en bandas A y B. PAO1 *algC* (estructura 4) carece de residuos de glucosa en el núcleo externo (OC), mientras que contiene un núcleo interno intacto (IC). Los residuos de azúcar involucrados en el reconocimiento de R-pirocinas se indican con flechas. El mutante *rmIC* carece del residuo terminal L-Rha (línea discontinua). (Figura tomada de Köhler y cols. ¹¹⁷)

3.2. Piocinas en terapéutica

El primer ejemplo en el que se documentó el papel antiinfeccioso de las piocinas se remonta a 1969 cuando *Bird y Griebel*¹²³ mostraron que las piocinas de tipo R podrían rescatar embriones de pollo infectados con una cepa de *P. aeruginosa*. Tres años después, *Merrickin y Terry*¹²⁴ mostraron que las piocinas de tipo R eran eficaces en infecciones sistémicas por *P.aeruginosa* en ratones. En estos estudios, los animales fueron infectados por vía intravenosa con dosis altas (10^7 UFC) y tratados con piocinas R por vía intravenosa. En 1974, *Haas y cols.*¹²⁵ realizaron un estudio profiláctico en ratones en el que concluyeron que una dosis única de piocina intraperitoneal podría proteger a los animales de una infección letal por *P. aeruginosa* administrándose 4 días antes de la infección. Pese a los buenos resultados hallados, la falta de conocimiento de las piocinas y las limitaciones técnicas de la época, resultaron en experimentos poco concluyentes.

Pasaron más de 30 años hasta el siguiente estudio *in vivo* que mostró que la piocina R2 podría ser utilizado para tratar enfermedades infecciosas en un modelo murino de peritonitis por *P.aeruginosa*¹²⁶. En este estudio, que se realizó utilizando soluciones de piocinas purificadas y mejor cuantificadas que en los estudios anteriores, los ratones sobrevivían tras la administración intraperitoneal o intravenosa de dosis únicas de piocina R2.

Además de su potencia, la especificidad de especie de estas partículas es un rasgo deseable por dos razones. En primer lugar, a diferencia de los antibióticos de amplio espectro, la falta de presión selectiva limitará el desarrollo de resistencia a los antibióticos dentro de la población microbiana y, en segundo lugar, el estrecho espectro de acción permite tratar con éxito las infecciones bacterianas mientras se deja intacta la flora bacteriana normal. Las principales complicaciones asociados con la disbiosis inducida por antibióticos incluyen diarrea asociada a antibióticos y la infección por *Clostridium difficile*^{127,128}. Más recientemente, se ha sugerido que los desequilibrios microbianos desempeñan un papel importante en una variedad de enfermedades crónicas como la enfermedad de Crohn, diabetes, obesidad y artritis reumatoide¹²⁹⁻¹³².

Sin embargo, este estrecho rango de acción a veces se ha visto como una limitación, ya que no se conocen (hasta la fecha) tantas piocinas como para cubrir a muchos de los patógenos comunes. Muchos estudios se han centrado en la ingeniería genética de piocinas para redirigir el espectro antibacteriano de las piocinas R. Un estudio de *Williams y cols.*¹¹⁰ describió por primera vez la ingeniería de piocinas R para cambiar la diana de *P. aeruginosa* a *E. coli* simplemente a través de la sustitución de las proteínas de unión al receptor de la fibra de la cola. Se crearon piocinas quiméricas por fusión del extremo N-terminal de la fibra de cola de la piocina R y el extremo C-terminal de la fibra de la cola del fago P2. Como resultado, la piocina quimérica obtuvo actividad en *E. coli*, y la perdió contra *P. aeruginosa*¹¹⁰. Más tarde, se aplicó la misma estrategia con éxito para matar *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) O157: H7 y un *E. coli* enteroagregativo altamente virulento O104: H4^{133,134}. A diferencia de los antibacterianos tradicionales, las piocinas diseñadas no causaron la liberación de Toxina Shiga del EHEC en un modelo de infección de conejo, lo que se tradujo en la disminución de los síntomas de la enfermedad¹³⁵. Recientemente, la ingeniería de piocinas R también se ha aplicado para controlar *Clostridium difficile*¹³⁶. Debido a su estabilidad *in vivo*, la ingeniería de piocinas R tiene gran potencial, especialmente en la administración oral, para atacar patógenos intestinales, o para modificar el microbioma intestinal¹⁰⁵.

Recientemente, también se han realizado estudios *in vivo* para evaluar la eficacia de otro tipo de piocinas, S2, S5, L1, AP41¹³⁷ y SD2¹³⁸, donde fueron altamente efectivas para reducir la carga bacteriana en un modelo murino de neumonía aguda por *P. aeruginosa*.

Los estudios anteriores demuestran que las piocinas R pueden atacar bacterias patógenas muy específicas sin dañar la microbiota beneficiosa normal, siendo altamente efectivas. Estas bacteriocinas podrían ser utilizadas potencialmente como una alternativa terapéutica, o en coadyuvancia con los tratamientos comunes, para tratar una amplia gama de infecciones bacterianas, especialmente aquellas que ahora son resistentes a los antibióticos tradicionales, como *P. aeruginosa*.

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

Debido al progresivo aumento de resistencias antimicrobianas en *Pseudomonas aeruginosa* y al escaso desarrollo de nuevos fármacos que propongan una solución, el principal objetivo de esta Tesis ha sido estudiar la actividad de las piocinas R en infecciones por *P. aeruginosa* para evaluarlas como potenciales alternativas o adyuvantes en el tratamiento antibiótico convencional. Para ello, este trabajo pretenderá llevar a cabo los siguientes objetivos específicos:

1- Evaluar la actividad de piocinas R en aislados clínicos de *P. aeruginosa* bien caracterizados, procedentes de pacientes con fibrosis quística con infecciones de curso crónico, y aislados clínicos de otros orígenes con infecciones de curso agudo.

2- Analizar la evolución en la sensibilidad a piocinas R en aislados clínicos de *P. aeruginosa* procedentes de pacientes con fibrosis quística recogidos a lo largo de 8 años de enfermedad.

3- Analizar la correlación entre el perfil de sensibilidades a los antipseudomónicos comunes y a las piocinas R en aislados clínicos de *P. aeruginosa* procedentes de diversos orígenes.

4- Analizar la interacción entre los antipseudomónicos comunes y las piocinas R para proponer su administración como adyuvantes en el tratamiento convencional.

5- Evaluar la actividad de las piocinas R en el biofilm formado por *P. aeruginosa*, antes y después de su desarrollo.

6- Analizar la actividad *in vivo* de las piocinas R en un modelo animal de neumonía aguda por un clon de alto riesgo de *P. aeruginosa*.

CAPÍTULO IV

PUBLICACIONES

Publicación 1: Sensibilidad a piocinas R de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de pacientes con fibrosis quística.

P. aeruginosa es uno de los principales impulsores de morbi-mortalidad en pacientes con fibrosis quística. Dado el carácter de multiresistencia que con frecuencia presenta este agente, sus infecciones suponen un verdadero reto clínico. La aparición y diseminación de mecanismos de resistencia antibiótica entre bacterias patógenas, ha forzado la búsqueda de nuevas estrategias para combatirlas. Aunque la fagoterapia ya fuese originalmente propuesta como un tratamiento potencial para infecciones bacterianas, esta situación de emergencia ha estimulado el interés en los fagos, o sus derivados, como alternativas a los tratamientos antimicrobianos. Las piocinas son bacteriocinas producidas por *P. aeruginosa*, de origen fágico, para matar a bacterias relacionadas con fines de competencia y protección de su nicho ecológico. En los últimos años, se ha vuelto a proponer a las piocinas como una alternativa en potencia en el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa* con pocas opciones terapéuticas.

Es por ello que en el artículo que aquí se presenta¹, nos hayamos propuesto como objetivo principal analizar la sensibilidad de piocinas R en un conjunto de 254 aislados clínicos de *P. aeruginosa*, incluyendo una colección de 120 aislados bien caracterizados procedentes de pacientes con FQ¹³⁹ (con infección crónica) y de 30 aislados procedentes de pacientes con bacteriemia¹⁴⁰ (con infección aguda).

Nuestros resultados muestran que los aislados de *P. aeruginosa* de pacientes con fibrosis quística son más sensibles a las piocinas R que los aislamientos procedentes de otros orígenes. Analizando el serotipo de estas cepas, encontramos que la mayoría de cepas de FQ son no tipables y sensibles a las piocinas y que determinados serotipos también se asocian con sensibilidad a las piocinas R. Como se ha explicado en la introducción, las piocinas R tienen su diana en el núcleo externo del LPS, con lo que la pérdida del antígeno O, o conformaciones menos empaquetadas explicarían la elevada sensibilidad de las cepas de FQ a las piocinas R. Dentro de este

¹ Cuyo material suplementario puede consultarse en el Anexo II

estudio, también observamos que las cepas pertenecientes a un mismo clon y aisladas de pacientes con fibrosis quística durante 8 años de enfermedad, no muestran apenas cambios en la sensibilidad a las piocinas R, incluidos algunos clones con fenotipo hipermutador.

Por otro lado, nos propusimos analizar la relación entre el perfil de sensibilidad de estos aislados clínicos a los antibióticos comunes y a las piocinas R. Nuestros resultados no han encontrado una correlación entre el perfil de sensibilidad a antipseudomónicos comunes y a piocinas R. Por lo que el estado de multiresistencia de muchas de las cepas analizadas no influye en la sensibilidad a piocinas R.

Para evaluar el uso terapéutico de las piocinas R en combinación con los tratamientos estándar en infecciones por *P. aeruginosa*, se estudiaron cuantitativamente las interacciones entre piocinas R y distintos antipseudomónicos comunes. Nuestros resultados no muestran interacciones entre ellos, es decir, la actividad de ambos agentes no se ve afectada por la presencia del otro, sugiriendo el posible uso de piocinas R como adyuvantes de los tratamientos comunes.

Los resultados presentados aquí contribuyen al conocimiento de las piocinas R, y proporcionan evidencias de que podrían ser una valiosa alternativa terapéutica, particularmente en pacientes con FQ, donde sus aislados muestran una alta sensibilidad a estos agentes.

Susceptibility to R-pyocins of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from cystic fibrosis patients

Mar Redero^{1–3}, Carla López-Causapé⁴, Javier Aznar^{1–3}, Antonio Oliver⁴, Jesús Blázquez^{1,2,5†} and Ana I. Prieto^{1,2*†}

¹Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Avda. Manuel Siurot s/n, 41013 Seville, Spain; ²Unidad de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain; ³Universidad de Sevilla, Seville, Spain; ⁴Servicio de Microbiología y Unidad de Investigación, Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca, Spain; ⁵Centro Nacional de Biotecnología (CNB), Madrid, Spain

*Corresponding author. Institute of Biomedicine of Seville (IBIS), Campus Hospital Universitario Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot s/n, 41013 Seville, Spain. Tel: +34-955-923000; Fax +34-955-923101; E-mail: aiprieto@us.es

†These authors made an equal contribution to the article.

Received 14 February 2018; returned 3 April 2018; revised 15 May 2018; accepted 8 June 2018

Background: The appearance and dissemination of MDR among pathogenic bacteria has forced the search for new antimicrobials. Bacteriocins have been proposed as potential alternatives for the treatment of infections due to multiresistant strains.

Objectives: To analyse the activity of R-pyocins against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis and other sources and evaluate them as a potential adjuvant or alternative to the current antibiotic treatment.

Methods: The activity of R-pyocins against 150 strains of *P. aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis or bacteraemia was studied through spot assay. Interactions between R-pyocins and antipseudomonal agents were quantitatively studied by the checkerboard method.

Results: The proportion of *P. aeruginosa* isolates susceptible to R-pyocins was found to be higher in cystic fibrosis isolates compared with bacteraemia isolates (79.41% versus 50%). Moreover, no interactions were found between common antipseudomonal agents and R-pyocin susceptibility, except for the ST175 high-risk clone.

Conclusions: Our results highlight the possibility of using R-pyocins as therapeutic agents, alone or as adjuvants, against *P. aeruginosa* in cystic fibrosis.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative bacterium that is intrinsically resistant to a broad range of natural and anthropogenic inhibitors. Owing to its vast metabolic plasticity and its ability to form biofilms, *P. aeruginosa* can colonize multiple niches, making it a major public health concern.^{1,2} It is usually found in soil and natural water sources, and can be isolated from various living sources. In humans, it behaves as an opportunistic pathogen causing both acute and chronic infections, which are especially serious in individuals with compromised immune function such as patients undergoing chemotherapy and patients with AIDS or cystic fibrosis (CF).³

In CF, the establishment of chronic infection by this microorganism is generally associated with high levels of antibiotic resistance and worsening of the illness. In this context, *P. aeruginosa* infections are difficult to eradicate and in most cases contribute to early mortality in affected patients.^{3,4} In recent years, the treatment of

infections caused by *P. aeruginosa* has become a challenging task for clinicians due to the high incidence of infections caused by MDR strains. More than 10% of hospital-acquired infections are caused by this versatile pathogen.²

The emergence and spread of MDR represents a new threat against which traditional antibiotics offer little protection. Although phage therapy was originally proposed as a potential treatment for bacterial infections decades ago, the recent emergence and dissemination of MDR strains from multiple bacterial species has stimulated increased interest in phages as an alternative to antimicrobial treatment.^{5–7}

Most bacteria produce antimicrobial compounds, called bacteriocins, supposedly to kill closely related competitors.⁸ The chromosome of *P. aeruginosa* encodes at least three different types of bacteriocins (R-, F- and S-type), referred to as pyocins, whose production is induced in response to DNA-damaging agents.⁹ R-pyocins are genetically and structurally related to the contractile tail of P2 bacteriophages, although they lack a phage head

structure.¹⁰ When bound to the cell surface of susceptible bacteria, R-pyocins contract their sheath, insert their core structure through the cell envelope and produce depolarization of the cytoplasmic membrane, leading to cell lysis.¹¹ R-pyocin-specific receptors are located in the LPS molecule.⁹ By studying different LPS mutants in *P. aeruginosa* (*wbpP*, *wbpM*, *wbpL*, *rmlC* and *algC*), Köhler *et al.*¹² deciphered the R-pyocin binding sites in LPS.

Of all the pyocin types produced by this bacterium, R-pyocins show high killing activity (single-hit mechanism that involves one or two active pyocins killing one bacterium), with activity against a plethora of *P. aeruginosa* strains,^{13,14} in addition to a number of other species such as *Campylobacter* spp.,¹⁵ *Neisseria gonorrhoeae*,¹⁶ *Neisseria meningitidis*,¹⁷ *Haemophilus ducreyi*,¹⁸ *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*.¹⁹

Considering the current necessity of finding new antimicrobials, there has been interest in R-pyocins as specific bactericidal agents in recent years.^{20–22}

The antibacterial efficacy of engineered R-pyocins has been demonstrated in a mouse model of *P. aeruginosa* peritonitis²² and in food products contaminated by *Escherichia coli* O157:H7.²³

Five different types of R-pyocins have been described on the basis of their killing activities²⁴ and of the amino acid sequences of the tail fibre protein Prf15 (PAO621 of PAO1). The sequence of the tail fibre proteins of the R2-, R3- and R4-pyocins are nearly identical. However, the sequence of the C-terminal region of the Prf15 protein from R1- and R5-pyocins differs considerably.²¹ Therefore, R-pyocins can be classified into three types: R1, R2 and R5.

In the present study, we analysed the activity of R-pyocins (R1, R2 and R5) against clinical isolates of *P. aeruginosa* from patients with CF and other sources, to evaluate them as a potential adjunct or alternative to antibiotic treatment.

Methods

Bacterial strains and media

In total, 254 *P. aeruginosa* clinical isolates were studied. This collection included well-characterized isolates from the Son Espases University Hospital of Palma de Mallorca;^{25,26} 120 isolates from CF patients and 30 isolates from patients with bloodstream infection. Additionally, 104 isolates from varied sources (bronchial aspirates, sputum, skin, abdomen, urine etc.) from the Virgen del Rocio University Hospital (HUVR) were also studied. Patient, source of isolation and PFGE data suggested that all strains were non-replicate isolates. All *P. aeruginosa* clinical isolates used in this work are listed in Tables S1 and S2 (available as [Supplementary data](#) at JAC Online). *Pseudomonas* laboratory strains and R-pyocin indicator strains are listed in Table 1 (*Pseudomonas* R-pyocin indicator strains were a kind gift from Dr Köhler).

Bacterial cultures were grown in LB medium at 37°C with agitation (200 rpm).

R-pyocin susceptibility assays

A set of indicator strains was used to perform spot assays. PAK, PA14 and 15108 were used as R1, R2 and R5 pyocin sources, respectively, while WT PAO1 and its derivative mutants *wbpM*, *wbpL*, *algC*, *rmd* and *rmlC* were used as controls for testing pyocin susceptibility (Table 1).

Pyocin extracts were obtained as detailed in Köhler *et al.*¹² with minor variations. Briefly, R-pyocin producer strains were grown overnight in 5 mL of LB medium at 37°C with agitation (200 rpm) and cultures were

Table 1. Relevant characteristics of laboratory strains and R-pyocin indicator strains

Strain	Pyocin lysis			Pyocin production	Reference
	R1	R2	R5		
PAO1	–	–	–		12
PAO1 <i>algC</i>	–	–	–		12
PAO1 <i>wbpM</i>	+	+	+		12
PAO1 <i>rmd</i>	–	–	–		12
PAO1 <i>rmlC</i>	–	+	+		12
PAO1 <i>wbpL</i>	+	–	+		12
PA1016	+	+	–		this study
PA116	+	+	+		this study
PAK				R1	12
PAKΔR1				non-R1	12
PA14				R2	12
PA14ΔR2				non-R2	12
15108				R5	12
15108ΔR5				non-R5	12

centrifuged at 14 000 rpm for 5 min. To kill residual bacterial cells, 250 µL of chloroform was added to each supernatant. The resulting supernatant was used as a source of R-pyocins. Clinical strains were grown overnight in LB medium and diluted to obtain an OD at 600 nm of 0.64. Three microlitres of each suspension was added to 3 mL of top agar and poured onto fresh LB medium plates. For the spot assay, 10 µL of each supernatant was deposited on the top agar and plates were incubated overnight at 37°C. Clear halos (lysis) were considered as a positive result for R-pyocin activity. As negative control for R-pyocin production, susceptibility assays were performed using supernatants from strains carrying essential deletions for R-pyocin synthesis (PAKΔR1, PA14ΔR2 and 15108ΔR5). When supernatants from non-producer strains produced lysis halos on lawns of tested isolates, lysis activity was not considered a result of R-pyocin activity and was scored as negative.

R-pyocin concentration in each supernatant was estimated with the Bradford protein assay following the instructions of the manufacturer (Bio-Rad Laboratories, Inc.). The results were expressed in µg of total protein/mL.

Antibiotic susceptibility profiles

Antibiotic susceptibilities of clinical isolates were determined by broth microdilution according to EUCAST recommendations.²⁷

Synergy studies of pyocins and antipseudomonal agents

Interactions between R-pyocins and antipseudomonal agents (imipenem, ciprofloxacin, levofloxacin, tobramycin, gentamicin, amikacin and colistin) were quantitatively studied by the chequerboard method and analysed according to EUCAST recommendations. The fractional inhibitory concentration (FIC), which is the quotient of the MIC of a drug in combination and the MIC of the drug acting alone, was calculated. The FIC index (FICI) represents the sum of the FICs of each drug tested. Synergy was considered when FICI ≤0.5, no interaction when FICI >0.5 but ≤4, and antagonism when FICI >4.²⁷

Serotyping

O-antigen serotypes (O1–O16) of *P. aeruginosa* isolates were determined by agglutination using serotype-specific antisera (Bio-Rad, codes: 58901–58916) in accordance with the instructions of the manufacturer.

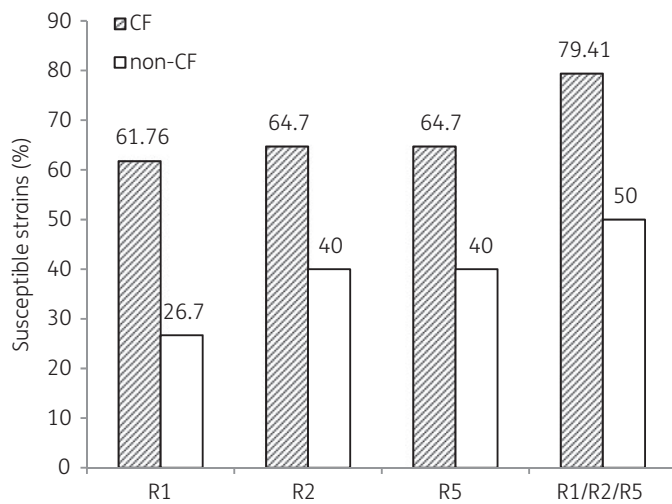


Figure 1. R-pyocin susceptibility of isolates from CF patients (CF) and non-CF patients (non-CF).

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R-commander (Rcmdr, version 2.1-7). Pearson's χ^2 test was used with significance level 0.05 unless the expected frequency was lower than 5, in which case Fisher's exact test was applied.

Results

Cystic fibrosis isolates show higher susceptibility to R-pyocins

Two different groups of clinical isolates were studied. The first group included a subset of 34 isolates from CF patients, corresponding to different clones (CF group, chronic infection), and the second group included 30 isolates from the bloodstream (non-CF group, acute infection) (see the Methods section). The R-pyocin susceptibility pattern was analysed by spot assays in both groups. Similar susceptibility profiles for each R-pyocin type were found among CF and non-CF isolates, with no significant differences between R1, R2 and R5 (61.76%, 64.7% and 64.7% of CF isolates and 26.7%, 40% and 40% of non-CF isolates were lysed by R1, R2 and R5, respectively) (Figure 1 and Table S1). However, comparing R1-, R2- and R5-pyocin susceptibility patterns between groups (CF and non-CF) demonstrated a statistically significant difference: 61.76% versus 26.7% for R1-pyocin ($\chi^2 = 7.9228$, $df = 1$, P value = 0.005); 64.7% versus 40% for R2-pyocin ($\chi^2 = 3.906$, $df = 1$, P value = 0.048); and 64.7% versus 40% for R5-pyocin ($\chi^2 = 3.906$, $df = 1$, P value = 0.048). This is even more dramatic when we consider isolates susceptible to at least one out of the three R-pyocins, where we find that 79.41% of CF strains were susceptible to R-pyocins versus 50% in non-CF strains ($\chi^2 = 6.111$, $df = 1$, P value = 0.013). Therefore, CF isolates showed higher susceptibility to R1, R2 and R5 compared with isolates from other sources.

We wanted to determine if this behaviour occurred in other isolates, therefore we analysed the pyocin susceptibility patterns of 104 isolates of *P. aeruginosa* from HUVR (Table S2). Although these

isolates came from different anatomical sites, they all caused acute infections in patients. The susceptibility pattern to R-pyocins was similar to that of isolates from bacteraemia (39.42% of isolates showed susceptibility to R1, 44.2% to R2, 40.4% to R5 and 55.76% to at least one out of the three R-pyocins; see the statistical analysis available as [Supplementary data](#) at JAC Online).

Correlation between serotype and R-pyocin susceptibility

Since sugar residues of the LPS O-specific antigen (OSA) are part of the receptor sites for R1-, R2- and R5-pyocins,¹² we determined the O-antigen serotypes of all clinical isolates included in Figure 1 (Table S1).

Serotyping reveals that 15 out of 34 CF isolates did not agglutinate with specific O-antiserum (non-typeable) suggesting the loss of the variable fraction O-antigen. Among non-CF isolates, only 4 out of 30 were non-typeable. The most frequently encountered serotypes were O1-type (7) within CF isolates and O6-type (9), O7-type (4) and O12-type (4) within non-CF isolates. Our results agree with previous observations for chronic strains.^{28,29} We found an increased percentage of non-typeable isolates among CF isolates (44.12% of CF isolates versus 13.33% of non-CF isolates, $\chi^2 = 7.235$, P value = 0.007). Among non-typeable strains, 86.7% of CF isolates were susceptible to R-pyocins (R1, R2 or R5) compared with 25% of non-CF isolates (P value = 0.03). In contrast, no significant differences were found for typeable strains (73.7% of CF isolates versus 53.8% of non-CF isolates, P value = 0.17; see the statistical analysis available as [Supplementary data](#) at JAC Online).

Noticeably, 9 out of 10 O1-type isolates were susceptible to R-pyocins and all 10 O6-type isolates showed susceptibility to R2- or R5-pyocin.

R-pyocin susceptibility evolution in CF patients

A total of 100 typed isolates (10 longitudinal isolates taken over an 8 year period from 10 CF patients), previously described by López-Causapé et al.,²⁶ were used to study the evolution of susceptibility to R-pyocins over time. Spot assays revealed a few changes in susceptibility to R1-, R2- and R5-pyocins of clinical strains from 10 CF patients throughout the course of their illness (Figure 2 and Table S3). The ST clones isolated from patients 2, 3, 4, 6, 7, 9 and 10 were the same during the entire study period (ST274, ST274, ST701, ST274, ST1073, ST1089 and ST1071, respectively), except a single isolate in patient 4 (ST254) and in patient 6 (ST1089). Susceptibility to R-pyocins remained stable over 8 years among the patients infected with one ST clone, with the exception of some isolates from patients 3, 6 and 7. The occurrence of R-pyocin resistance seems to be an event not associated with the mutator phenotype, pigmentation or morphology (Table S3). Despite the fact that an increased mutation rate was observed for clones ST1073, ST1089 and ST299, no association was found between mutation rate and R-pyocin resistance, suggesting that hypermutation does not impact R-pyocin resistance, as is the case for antibiotic resistance.^{26,30}

We also characterized R-pyocin production in 34 different clones (unique STs) using the indicator strains listed in Table 1 (PAO1 mutants *algC*, *rmlC*, *wbpL*, *wbpM* and *rmd*). Most of them

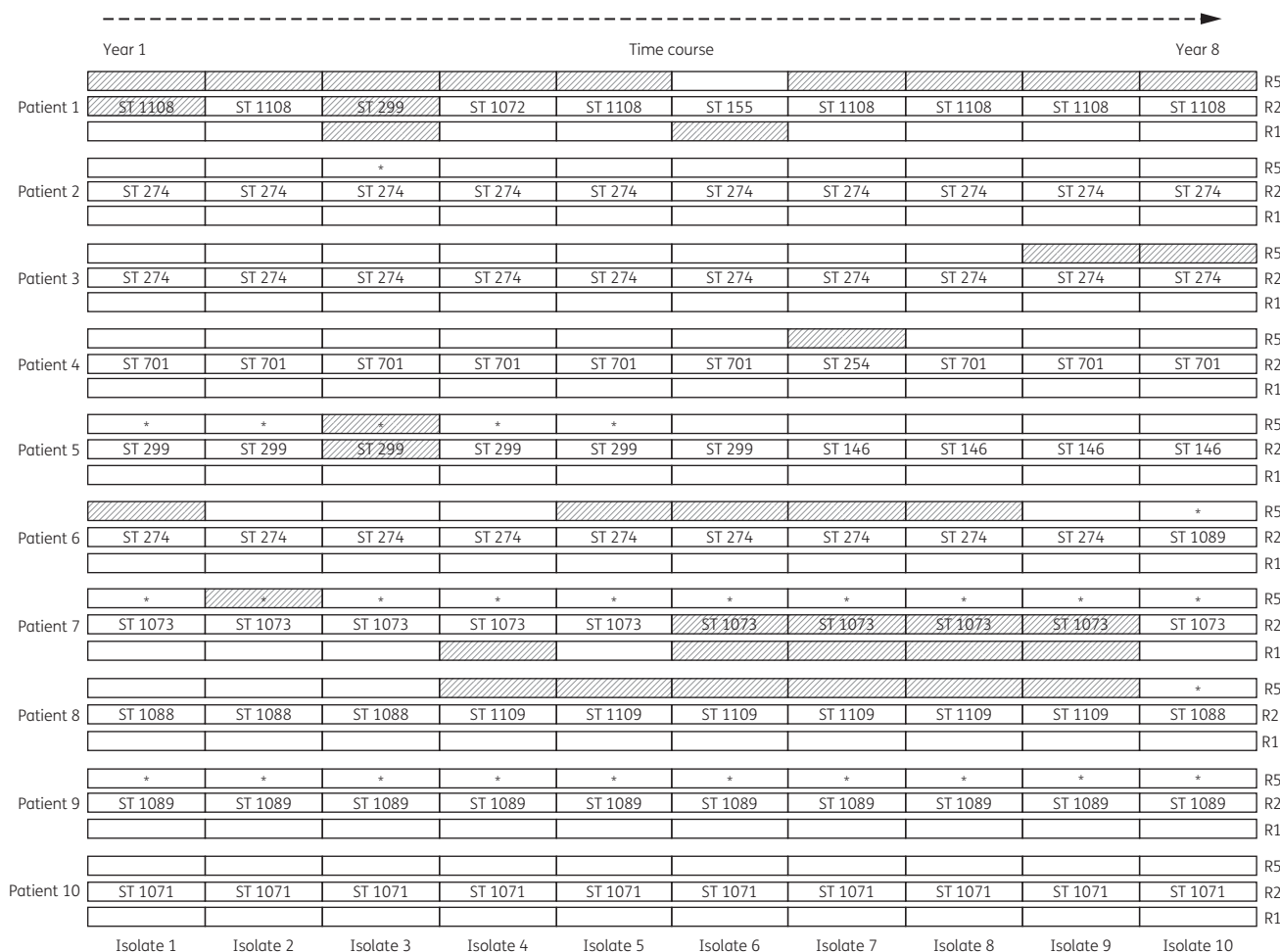


Figure 2. Evolution of R-pyocin susceptibility of *P. aeruginosa* isolates from CF patients. Susceptibility to R-pyocins of sequential isolates from CF patients over 8 years. White rectangles show R-pyocin-susceptible isolates and striped rectangles correspond to resistant isolates. An asterisk indicates a mutator isolate. ST clones are indicated; ST274 and ST1089 belong to the same PFGE clonal type.

did not produce R-pyocins, except two invading clones from patient 8 that produced pyocin R1 (Table S4). Some of them produced a diffuse halo over indicator strain lawns suggesting the production of another inhibitor.

Correlation between antibiotic and R-pyocin susceptibility profiles

Antibiotic and R-pyocin susceptibility patterns to six conventional antibiotics used in clinical practice against *P. aeruginosa* (ceftazidime, imipenem, meropenem, ciprofloxacin, tobramycin and colistin) were studied for 34 *P. aeruginosa* strains with unique STs from CF patients and 30 isolates from patients with bloodstream infection (non-CF). The χ^2 test showed no relationship between R-pyocin and antibiotic resistance for either CF isolates or non-CF isolates (MIC values are shown in Table S5).

Aminoglycoside resistance has been associated with changes in LPS (from smooth to rough).³¹ Among non-typeable isolates in our set, 3 out of 19 were resistant to tobramycin (of those, only

one was resistant to R-pyocins). A reduction in the number of LPS molecules has also been associated with colistin resistance.³² Only one colistin-resistant isolate was identified among 19 non-typeable strains.

Interactions between R-pyocins and antipseudomonal agents

To assess the therapeutic use of R-pyocins in combination with standard treatments for *P. aeruginosa* infections, interactions between R-pyocins and antipseudomonal antibiotics were quantitatively evaluated by the use of the checkerboard method according to EUCAST recommendations.²⁷ Isolates from different groups were chosen: three CF isolates (FQSE36-1111, FQSE02-1102-3 and FQSE12-1007), one laboratory strain (PAK *wbpP*) and two XDR/MDR nosocomial isolates (PA1016 and PA116, both belonging to the ST175 clone, which is considered a high-risk clone).³³

No interaction was found between R-pyocins and standard antipseudomonal antibiotics for the strains PA116, PAK *wbpP*, FQSE36-

Table 2. Interactions between R-pyocins and common antipseudomonal agents

Combination	FICI ^a					
	PA1016	PA116	PAK <i>wbpP</i>	FQSE12-1007	FQSE36-1111	FQSE02-1102-3
TOB + R1	0.75	1	0.75	–	0.75	–
TOB + R2	0.28	0.75	1	0.75	0.75	1
TOB + R5	–	0.75	1	0.75	0.75	–
GEN + R1	0.75	0.62	–	–	–	–
GEN + R2	0.08	1	–	0.7	–	–
GEN + R5	–	1	–	1	–	–
AMK + R1	0.75	–	–	–	–	–
AMK + R2	0.63	–	–	–	–	–
LVX + R1	1	–	–	–	–	–
LVX + R2	1	–	–	–	–	–
CIP + R1	1	–	–	–	–	–
CIP + R2	1	–	–	–	–	–
CST + R1	1	–	–	–	–	–
CST + R2	1	–	–	0.75	–	–
CST + R5	–	–	–	1	–	–
IPM + R1	1	–	–	–	–	–
IPM + R2	1	–	–	–	–	–

TOB, tobramycin; GEN, gentamicin; AMK, amikacin; LVX, levofloxacin; CIP, ciprofloxacin; CST, colistin; IPM, imipenem.

^aFICI values indicating synergy are shown in bold.

1111, FQSE02-1102-3 and FQSE12-1007 (Table 2). The FICI was between 0.62 and 1. Interestingly, a synergic effect between R2-pyocin and tobramycin and between R2-pyocin and gentamicin was observed for strain PA1016 (ST175) (FICI 0.28 and 0.08 respectively).²⁷

Discussion

The search for new effective antimicrobials to fight *P. aeruginosa* infections is a priority, especially in the context of CF, where the isolation of this bacterium is associated with a poorer disease progression.³⁴ Research in phage therapy is slowly resurging,⁷ mainly due to the lack of development of new antibiotics. Pyocins are bacteriocins of phage origin produced by *P. aeruginosa* strains, supposedly for intra-species competition purposes,⁸ although they are also active against non-related species. Notably, R-pyocins exhibit narrow bactericidal spectra and thus can be expected to have little effect on healthy microbiota. Also, they are not replicative structures (they do not contain DNA) and therefore they cannot promote the horizontal spread of MDR among other bacteria, which is a desirable characteristic for a therapeutic agent.

In the present study we compared isolates from CF patients, where the infection caused by this pathogen becomes chronic in later stages and a plethora of regulatory networks play a role in adaptation,^{35,36} with isolates from patients with bloodstream infection, where infections are usually acute.³⁷ Our results show that *P. aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients are more susceptible to R-pyocins. Almost 80% of the CF isolates were susceptible to at least one out of the three R-pyocins, while only 50% of isolates from bloodstream infections showed susceptibility. This

pattern was also demonstrated in isolates that caused acute infection from a different hospital (HUVR).

Little is known about the R-pyocin susceptibility pattern of *P. aeruginosa* clinical isolates. Köhler et al.¹² described the R-pyocin susceptibility profile of 47 isolates from tracheal aspirates. They found a similar proportion of isolates susceptible to R-pyocins (59% versus 50% in our study). They also analysed the R-pyocin-production profile and demonstrated a similar percentage of non-producers and R1, R2 and R5 producers (17%–29%). The R-pyocin deficient isolates were susceptible to R1-, R2- and R5-pyocins, while most R2- and R5-pyocin producers were resistant.¹²

Ghoul et al.³⁸ also used clinical isolates from CF patients and non-lung sources to study the role of pyocins in the dynamism of lung colonization. They concluded that isolates taken from strains causing chronic infections produce fewer types of pyocins and, at the same time, are more susceptible to pyocins produced by other strains than the strains causing acute infections. These findings are in agreement with the high susceptibility to R-pyocins of CF isolates in our collection.

The majority of strains of *P. aeruginosa* isolated from CF patients display the loss of O-serotype reaction (non-typeable) and susceptibility to normal human serum^{28,29} suggesting defects in LPS (e.g. loss of OSA). Our results are in agreement with previous publications as some CF isolates were also non-typeable. Interestingly, O1- and O6-type isolates showed increased susceptibility to R-pyocins suggesting that some LPS conformations may enable R-pyocins to find their targets. A previous study has also identified O1- and O6-types as highly susceptible serotypes.¹² Our results point to LPS architecture as the ultimate cause of R-pyocin susceptibility in CF isolates. The loss of O-antigen or evolution towards more accessible O-

types in chronic isolates may render these strains more susceptible to R-pyocins.

R-pyocin resistance is caused by modifications in the LPS molecule.¹⁹ Our evolutionary study carried out with 10 CF patients for 8 years revealed a few changes in the R-pyocin susceptibility profile over time (among the patients infected with one ST clone), suggesting that these modifications are not very frequent in the lung environment. In addition, most of the patients were colonized by one or two clones. Almost no changes in R-pyocin susceptibility were observed in clones that remain for years, some of them mutators (patients 2, 3, 9 and 10), in contrast to antibiotic resistance, which is developed throughout the illness.¹⁷ Our results are in contrast to those obtained by Köhler *et al.*¹² where a short evolution of 20 days in a patient's lung was monitored. They showed that a pyocin-producer clone, which was resistant to its own and the other colonizing clone pyocin, replaced the susceptible one. However, 20 days of colonization represent a very different scenario for a CF patient compared with the years of evolution considered in our study and others. For instance, Ghoul *et al.*³⁸ carried out a long-term study of infection within patients (6–10 years). Overall, the pyocin susceptibility profile did not change over time, in agreement with our results from patients 2, 4, 9 and 10. They found no support for the hypothesis that certain strains are dominant in the CF lung through pyocins. Along those lines, our results suggest that isolates able to reach the latest stages of infection are more susceptible to R-pyocins and produce fewer R-pyocins. The biological cost of pyocin production, together with the envelope peculiarities selected within the host, likely constitute a handicap in the context of infection.

We did not find a correlation between the susceptibility profile to R-pyocins and common antibiotics currently used in clinical practice for *Pseudomonas* infections. In the late 1980s, a study including 116 *P. aeruginosa* isolates from diverse clinical sources (which were not mentioned),³⁹ suggested a potential relationship between multiple antibiotic resistance (carbenicillin and gentamicin) and susceptibility to R2-pyocins. These authors suggested the impairment of the outer membrane permeability caused by LPS modifications as the likely cause. Carbenicillin and gentamicin have not been studied in this work. However, we studied tobramycin and colistin, which cause alterations in membrane permeability,^{40,41} and our results show that isolates susceptible to R-pyocins were not more susceptible to colistin or aminoglycosides.

Moreover, no interaction was found between antipseudomonal antibiotics and R-pyocins, i.e. the activity of both agents was not affected. The lack of interaction between aminoglycosides or colistin and R-pyocins indicate that they must be targeting different LPS components.

Surprisingly, we did find interaction between R2-pyocin and aminoglycosides (tobramycin and gentamicin) for strain PA1016 (resistant to gentamicin and tobramycin). In contrast, no synergy was observed for the PA116 strain (also resistant to gentamicin and tobramycin). PA1016 and PA116 are both susceptible to R2-pyocin. Therefore, this interesting interaction seems to be specific to the PA1016 strain and requires further investigation.

In summary, here we provide evidence that R-pyocins could be a valuable therapeutic alternative, alone or as adjuvants, in the treatment of *P. aeruginosa* infections, particularly in CF patients, where their isolates show a high susceptibility to these agents. Future studies addressing issues such as stability, effect on

pulmonary epithelial cells and routes of administration are necessary before the possible clinical application of pyocins for lung infection.

Acknowledgements

Pseudomonas R-pyocin indicator strains were a kind gift from Dr Köhler (Department of Microbiology and Molecular Medicine, University of Geneva, Switzerland).

We are grateful to Michael McConnell for useful scientific comments and English revision of the manuscript.

Funding

This work was supported by: Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (grant number PI-0062-2014); Subprograma Sara Borrell to A. I. P.; Instituto de Salud Carlos III, Spain (PI13/00063); Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/0016/0009); and European Development Regional Fund ERDF 'A way to achieve Europe', Operative programme Intelligent Growth 2014-2020.

Transparency declarations

None to declare.

Supplementary data

Tables S1 to S5 and statistical analysis are available as [Supplementary data](#) at JAC Online.

References

- 1 Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 2009; **22**: 582–610.
- 2 Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; **7**: 39.
- 3 Anderson GG. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the CF lung and its implications for therapy. In: Sriramulu D, ed. *Cystic Fibrosis—Renewed Hopes through Research*. InTech, 2012. <https://pdfs.semanticscholar.org/9624/d25d8341fa710e43cad5902290f9f8fc1366.pdf>.
- 4 Moore JE, Mastoridis P. Clinical implications of *Pseudomonas aeruginosa* location in the lungs of patients with cystic fibrosis. *J Clin Pharm Ther* 2017; **42**: 259–67.
- 5 Reardon S. Phage therapy gets revitalized. *Nature* 2014; **510**: 15–16.
- 6 Nobrega FL, Costa AR, Kluskens LD *et al.* Revisiting phage therapy: new applications for old resources. *Trends Microbiol* 2015; **23**: 185–91.
- 7 Pires DP, Vilas Boas D, Sillankorva S *et al.* Phage therapy: a step forward in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Virol* 2015; **89**: 7449–56.
- 8 Riley MA, Gordon DM. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends Microbiol* 1999; **7**: 129–33.
- 9 Ghequire MG, De Mot R. Ribosomally encoded antibacterial proteins and peptides from *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol Rev* 2014; **38**: 523–68.
- 10 Nakayama K, Takashima K, Ishihara H *et al.* The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. *Mol Microbiol* 2000; **38**: 213–31.

- 11 Uratani Y, Hoshino T. Pyocin R1 inhibits active transport in *Pseudomonas aeruginosa* and depolarizes membrane potential. *J Bacteriol* 1984; **157**: 632–6.
- 12 Köhler T, Donner V, van Delden C. Lipopolysaccharide as shield and receptor for R-pyocin-mediated killing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2010; **192**: 1921–8.
- 13 Fyfe JA, Harris G, Govan JR. Revised pyocin typing method for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 1984; **20**: 47–50.
- 14 Michel-Briand Y, Baysse C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 2002; **84**: 499–510.
- 15 Blackwell CC, Winstanley FP, Telfer Brunton WA. Sensitivity of thermophilic campylobacters to R-type pyocines of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 1982; **15**: 247–51.
- 16 Morse SA, Vaughan P, Johnson D et al. Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by a bacteriocin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1976; **10**: 354–62.
- 17 Stein DC, Hebel BH, Young FE. Effect of environment on sensitivity of *Neisseria gonorrhoeae* to *Pseudomonas aeruginosa* bacteriocins. *Infect Immun* 1980; **29**: 507–11.
- 18 Campagnari AA, Karalus R, Apicella M et al. Use of pyocin to select a *Haemophilus ducreyi* variant defective in lipooligosaccharide biosynthesis. *Infect Immun* 1994; **62**: 2379–86.
- 19 Jones LF, Thomas ET, Stinnett JD et al. Pyocin sensitivity of *Pseudomonas* species. *Appl Microbiol* 1974; **27**: 288–9.
- 20 Ritchie JM, Greenwich JL, Davis BM et al. An *Escherichia coli* O157-specific engineered pyocin prevents and ameliorates infection by *E. coli* O157:H7 in an animal model of diarrheal disease. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 5469–74.
- 21 Williams SR, Gebhart D, Martin DW et al. Retargeting R-type pyocins to generate novel bactericidal protein complexes. *Appl Environ Microbiol* 2008; **74**: 3868–76.
- 22 Scholl D, Martin DW Jr. Antibacterial efficacy of R-type pyocins towards *Pseudomonas aeruginosa* in a murine peritonitis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 1647–52.
- 23 Scholl D, Cooley M, Williams SR et al. An engineered R-type pyocin is a highly specific and sensitive bactericidal agent for the food-borne pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 3074–80.
- 24 Kageyama M. Bacteriocins and bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mitsuhashi S, Hashimoto H, eds. *Microbial Drug Resistance*. Baltimore, MD, USA: University Park Press, 1975; 291–305.
- 25 Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA et al. Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 6349–57.
- 26 López-Causapé C, Rojo-Molinero E, Mulet X et al. Clonal dissemination, emergence of mutator lineages and antibiotic resistance evolution in *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis chronic lung infection. *PLoS One* 2013; **8**: e71001.
- 27 European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). EUCAST Definitive Document E.Def 1.2, May 2000: terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clin Microbiol Infect* 2000; **6**: 503–8.
- 28 Hancock RE, Mutharia LM, Chan L et al. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. *Infect Immun* 1983; **42**: 170–7.
- 29 Penketh A, Pitt T, Roberts D et al. The relationship of phenotype changes in *Pseudomonas aeruginosa* to the clinical condition of patients with cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1983; **127**: 605–8.
- 30 Oliver A, Cantón R, Campo P et al. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 2000; **288**: 1251–4.
- 31 Richard B, Clark DHH, Janda JM et al. Increased susceptibility of gentamicin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* to human sera. *Curr Microbiol* 1986; **13**: 159–62.
- 32 Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* 2005; **40**: 1333–41.
- 33 Oliver A, Mulet X, López-Causapé C et al. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat* 2015; **21–22**: 41–59.
- 34 Bhagirath AY, Li Y, Somayajula D et al. Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Pulm Med* 2016; **16**: 174.
- 35 Marvig RL, Sommer LM, Molin S et al. Convergent evolution and adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* within patients with cystic fibrosis. *Nat Genet* 2015; **47**: 57–64.
- 36 Jelsbak L, Johansen HK, Frost AL et al. Molecular epidemiology and dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* populations in lungs of cystic fibrosis patients. *Infect Immun* 2007; **75**: 2214–24.
- 37 Engel JN. Molecular pathogenesis of acute *Pseudomonas aeruginosa* infections. In: Hauser AR, Rello J, eds. *Severe Infections Caused by Pseudomonas aeruginosa*. Boston, MA, USA: Springer US, 2003; 201–29. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0433-7_13.
- 38 Ghoul M, West SA, Johansen HK et al. Bacteriocin-mediated competition in cystic fibrosis lung infections. *Proc Biol Sci* 2015; **282**: doi: 10.1098/rspb.2015.0972.
- 39 Tzouveleki LS, Tumah H, Malliara K et al. Relationship of antibiotic resistance phenotype to the R-pyocin susceptibility pattern in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Chemother* 1989; **1**: 226–30.
- 40 Bialvaei AZ, Samadi Kafil H. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Curr Med Res Opin* 2015; **31**: 707–21.
- 41 Bulitta JB, Ly NS, Landersdorfer CB et al. Two mechanisms of killing of *Pseudomonas aeruginosa* by tobramycin assessed at multiple inocula via mechanism-based modeling. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 2315–27.

Publicación 2. Eficacia antibacteriana de las piocinas de tipo R contra *Pseudomonas aeruginosa* en biofilms y en un modelo murino de infección pulmonar aguda.

Como se explica en la introducción, la formación del biofilm mucóide es el sello distintivo de las infecciones crónicas debidas a *P. aeruginosa* y constituye una de las complicaciones más serias en pacientes con fibrosis quística, donde su presencia es indicativa de progresión de la enfermedad y persistencia a largo plazo. Las células bacterianas dentro de esta matriz se vuelven menos accesibles a los antimicrobianos. Este fenómeno junto con el incremento de cepas cada vez más resistentes, hace que sea necesario la búsqueda de nuevas moléculas con la capacidad de penetrar en el biofilm y ser activas dentro de él.

Tomando la propuesta anterior (Publicación 1) como premisa, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad de las piocinas R en un biofilm de *P. aeruginosa*, y su eficacia en un modelo murino de infección pulmonar aguda por un clon de alto riesgo, XDR, ST175 de *P. aeruginosa*, prevalente en servicios de UCI europeos.

Nuestros resultados demostraron que las piocinas R pueden atacar a las bacterias adheridas a una superficie evitando la formación del biofilm, así como penetrar dentro de la entramada estructura del biofilm manteniendo su alta eficacia, capaces de reducir la carga bacteriana hasta $8\log_{10}$ tras tres dosis, sin seleccionar mutantes resistentes.

En este trabajo, también se demuestra que la piocina R1 es activa administrada por vía intranasal en un modelo murino de infección pulmonar por un clon de alto riesgo, XDR, ST175 de *P. aeruginosa*, tanto si se administra antes de la infección como un tratamiento preventivo, como en la neumonía aguda como tratamiento curativo, con una eficacia superior al tratamiento con colistina estándar. Además, este trabajo es el primero en describir los cambios histopatológicos pulmonares producidos después de la administración de piocinas R que contribuyen a la resolución de la neumonía por *P. aeruginosa* en nuestro modelo murino.

Este trabajo complementa a los resultados presentados en la Publicación 1, ampliando nuestro conocimiento de las piocinas R, al mostrar su efectividad en biofilms, así como en un modelo murino de neumonía por el clon de alto riesgo de *P. aeruginosa*. Dadas las necesidades actuales, este trabajo destaca el uso potencial de las piocinas R como agentes terapéuticos, las cuales podrían considerarse como una posible alternativa terapéutica en las infecciones por *P. aeruginosa* XDR, donde las opciones de tratamiento son muy limitadas.

Antibacterial efficacy of R-type pyocins against *Pseudomonas aeruginosa* on biofilms and in a murine model of acute lung infection

Mar Redero^{1,2}, Javier Aznar¹⁻³ and Ana I. Prieto^{1*}

¹Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Avda. Manuel Siurot s/n, 41013 Seville, Spain; ²Unidad de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain; ³Universidad de Sevilla, Seville, Spain

*Corresponding author. E-mail: aprietomucho@gmail.com

Received 25 July 2019; returned 0 Month 2019; revised 13 February 2020; accepted 0 Month 2019

Background: The appearance of MDR strains and the development of biofilms make *Pseudomonas aeruginosa* infections a therapeutic challenge. To overcome this scenario, bacteriocins have been proposed as a potential adjuvant or alternative to antibiotic treatment.

Objectives: To study the activity of R-pyocins on biofilms and in a murine model of pneumonia using a high-risk clone of *P. aeruginosa*.

Methods: The activity of R-pyocins on *P. aeruginosa* biofilms was tested on bacteria attached to a silicone surface, before and after biofilm formation. The effectiveness of R1-pyocin was studied in a murine model of pneumonia using ST175, a high-risk clone of *P. aeruginosa*.

Results: R-pyocins attacked adherent bacteria, preventing biofilm formation, and penetrated into the biofilm, killing *P. aeruginosa* within it, resulting in a dramatic reduction in bacterial load. R1-pyocin was active in a murine model of *P. aeruginosa* lung infection, administered before infection as a preventive treatment, and in acute pneumonia, with efficiency higher than standard colistin treatment. In addition, this work is the first to describe histopathological lung changes after administration of R-pyocins, contributing to the resolution of *P. aeruginosa* pneumonia in a murine model.

Conclusions: This work highlights the potential use of the R-pyocins as therapeutic agents, alone or as adjuvants, due to its effectiveness on biofilms and in a murine model of pneumonia using ST175, a high-risk clone of *P. aeruginosa*. It may thus be feasible to consider R-pyocins as a possible therapeutic alternative in XDR infections, where treatment alternatives are limited.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic human pathogen capable of causing a wide array of life-threatening acute and chronic infections. *P. aeruginosa* can colonize the cystic fibrosis patient's airways and persist as an ineradicable infection until the end of patient's life in almost 70% of adults, being the main cause of morbidity and mortality.¹ Furthermore, this pathogen is also associated with hospital-acquired infections including ventilator-associated pneumonia, central line-associated bloodstream infection and urinary catheter-related infection.² Its prevalence and persistence in clinical settings are related to its extraordinary survival capabilities in different unfavourable conditions, such as antibiotic treatment and stress.³ One such capability is increased adherence leading to biofilm formation. Biofilms are cellular aggregations embedded in a polymeric substance

that protects them from the environment and provides persistence.^{4,5} The formation of biofilms in the lungs of patients with cystic fibrosis constitutes one of the most serious complications in the course of the disease.⁶

Bacteria immersed in a biofilm matrix become less accessible to the action of antimicrobials. This fact, together with the rapid emergence of MDR strains, makes it necessary to search for new therapeutic options, not only with antimicrobial activity on MDR strains, but also with the ability to penetrate the biofilm. In this scenario, the use of bacteriophages for the treatment of bacterial infections is re-emerging as an alternative therapeutic strategy.⁷⁻¹²

Bacteriophages were used as antimicrobial agents for the first time during the first half of the 20th century, but the lack of knowledge of phage biology and the advent of antibiotics in 1940 contributed to the abandonment of this application.¹³ However,

the alarming rise of MDR bacteria and the consequent need for antibiotic alternatives has renewed the interest in phage therapy.

Numerous *in vitro* and *in vivo* studies have evaluated the efficacy of phage therapy, alone or in combination with common antibiotics, in diverse *P. aeruginosa* infections and for biofilm dispersal.^{14–17} These studies have been carried out in clinical trials with humans, such as in chronic otitis or in burns,^{18,19} where high efficacy was demonstrated in eradication of *P. aeruginosa* without side effects.

Phage targets are highly specific and effective against a limited range of bacterial strains, and cause limited damage to the normal host microbiota. However, phages may carry antibiotic resistance genes or other bacterial virulence factors that can be transferred to the bacteria through generalized transduction.²⁰

The chromosome of certain *P. aeruginosa* strains encodes at least three different types of bacteriocins (R-, F- and S-type), referred to as pyocins.²¹ R-pyocins are genetically and structurally related to the contractile tail of P2 bacteriophages but lack the phage head structure,²² and therefore are incapable of transmitting any gene encoding antibiotic resistance or virulence factors. R-pyocins can be classified into three types (R1, R2 and R5). Their targets are located on the LPS structure,^{23,24} and the core structure of the R-pyocin is inserted through the cell envelope, causing depolarization of the cytoplasmic membrane, which leads to cell lysis.²⁵ R-pyocins are highly effective against a plethora of *P. aeruginosa* strains^{26,27} and other species.^{6,28,29}

The antibacterial efficacy of S-pyocins has been demonstrated *in vitro*^{30,31} and in murine models of acute lung infection.^{32,33} R-pyocins have been found to be active against different bacterial species, including *P. aeruginosa* in biofilms, as well as in a *P. aeruginosa* peritonitis murine model.^{34–38}

In previous work,³⁹ we demonstrated high antibacterial activity of R-pyocins on clinical isolates of *P. aeruginosa* from patients with cystic fibrosis, and showed that R-pyocins do not interfere with the antibiotics used in clinical practice, suggesting a potential use as adjuvant therapy.

In this work, we show the high activity of R-pyocins (R1, R2 and R5) on biofilms and in a murine model of acute lung infection by the ST175 high-risk clone of *P. aeruginosa*, to evaluate

them as potential adjuvants or as an alternative to antibiotic treatment.

Materials and methods

Strains and culture medium

The strains used in this study are described in Table 1. Clinical isolate PA1016 is an ST175 high-risk clone of an XDR *P. aeruginosa*, which has spread in European ICUs.

All strains were grown in LB broth at 37°C.

Pyocin purification

Pyocin production and purification were accomplished according to Ito et al.⁴⁰ The sources of pyocins for this study were *P. aeruginosa* strains PAK, PA14 and 15108,²³ which are R1-, R2- and R5-pyocin producers, respectively. R-type pyocins, whose expression is RecA-mediated,²⁷ were induced by adding mitomycin C to log-phase cultures growing in LB broth medium at 37°C and shaking at 200 rpm.

Mitomycin C was added to obtain a final concentration of 3 µg/mL, when the culture (100 mL) reached an OD at 600 nm of 0.25. Cultures were incubated for 2.5 h until complete lysis. Three microlitres of DNase I (1 U/µL; Invitrogen, ThermoFisher®) was added per 100 mL of culture and incubated for 30 min. The next steps were carried out at 4°C. Lysates were collected, and debris was removed from the lysate by centrifugation at 22000 g for 1 h. To each 100 mL of supernatant, 65 mL of saturated ammonium sulphate was slowly added, while stirring on ice. The suspension was stored at 4°C overnight. The ammonium sulphate precipitate was sedimented at 22000 g for 1 h at 4°C and the pellet resuspended in 16 mL of TN50 buffer (50 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.5). R-pyocin was then sedimented at 65000 g for 1 h at 4°C, and resuspended in 6 mL of TN50 buffer. The resulting preparation was an R1-, R2- and R5-pyocin-enriched extract.

To obtain extracts free of R-pyocins, named ΔR1, ΔR2 and ΔR5, the same process was carried out with the PAKΔR1, PA14ΔR2 and 15108ΔR5 strains, which carried essential deletions for R1-, R2- and R5-pyocin synthesis, respectively.

Quantification of R-pyocin extracts

Indicator strains with known susceptibility to R-pyocins, listed in Table 1, were grown overnight and diluted to obtain an OD at 600 nm of 0.64. Three microlitres of each suspension was added to 3 mL of top agar (0.4% LB

Table 1. Characteristics of *P. aeruginosa* strains used in this work

Strains	Lysis by ^a			Characteristics	References
	R1-pyocin	R2-pyocin	R5-pyocin		
PAK	0	1	1	R1 producer	23
PA14	0	0	0	R2 producer	23
15108	1	1	0	R5 producer	23
PAO1	0	0	0	laboratory strain	23
PAO1 <i>wbpM</i>	1	1	1	PAO1 mutant LPS	23
PAO1 <i>wbpL</i>	1	0	1	PAO1 mutant LPS	23
PAO1 <i>rmIC</i>	0	1	1	PAO1 mutant LPS	23
PAO1 <i>algC</i>	0	0	0	PAO1 mutant LPS	23
PA1016	1	1	0	ST175, high-risk-clone, XDR	this study

^a0, no lysis; 1, lysis.

agar) and poured onto fresh LB medium plates. In the spot assay, 7 µL of R-pyocins and serial dilutions (1:10) were deposited on the top agar, and the plates were incubated overnight at 37°C. Clear halos (lysis) were considered as a positive result for R-pyocin activity. As negative activity controls, susceptibility assays with ΔR1, ΔR2 and ΔR5 extracts were performed in parallel.

R-pyocin concentration (mg/L of total protein) was estimated with the Bradford protein assay according to the manufacturer (Bio-Rad Laboratories, Inc.). R-pyocin solutions were stable for at least 60 days at 4°C in TN50 buffer without preservative.

MIC

The MICs of R-pyocins for each bacterial strain were assessed in triplicate using the broth microdilution method, according to EUCAST.⁴¹ Overnight cultures were prepared and adjusted to a McFarland density of 0.5.

Time-kill curves in planktonic growth

Overnight cultures of the different strains were grown at 37°C in LB broth. Then, 5×10^5 cfu/mL from these cultures were inoculated into fresh LB containing 60, 20 and 20 mg/L of the R1-, R2- and R5-pyocins, respectively, and incubation was performed at 37°C for 8 h at 200 rpm. The growth control (GC, R-pyocin-free) and purified extracts from strains with deletion of the pyocin genes (ΔR1, ΔR2 and ΔR5) were used as negative treatment controls. Viable bacterial counts were determined by plating serial dilutions at different times onto LB agar plates incubated at 37°C for up to 24 h. If the cfu count in the first dilution was zero, the entire suspension was centrifuged and plated for colony counting.

Activity assays of R-pyocins on biofilm

The activity of R-pyocins on biofilm produced by the ST175 high-risk clone of *P. aeruginosa* (PA1016) was tested on the surface of silicone elastomer discs (15 mm in diameter × 1.5 mm in thickness; Merefsa SL) as previously described by Chandra *et al.*⁴² Two conditions were studied: bacteria adhered to a silicone surface (i) prior to biofilm formation (pre-biofilm assay) and (ii) after biofilm formation (post-biofilm assay).

Pre-biofilm assay

A total of 2 mL of 10^5 cfu/mL of the biofilm-forming strains was added to each well of a 12-well plate (TC Plate 12-Well, Suspension F, Sarstedt[®]) containing the silicone discs and the plate was incubated for 90 min at 37°C. Discs with attached bacteria were transferred to clean 12-well plates containing 2 mL of 60, 20 or 20 mg/L purified R1-, R2- and R5-pyocins. Plates were incubated at 37°C and shaken at 60 rpm for 24 h. After washing each well with 2 mL of fresh PBS to discard the planktonic cells, the silicone discs were placed into clean wells containing 2 mL of fresh PBS. Biofilm-forming cells on each silicone disc were detached with a cell scraper (Cell Scraper 25 cm, Sarstedt[®]) and homogenized. Viable cells were counted.

Post-biofilm assay: time-kill curves

Once the bacteria were adhered to the silicone discs as previously described, they were transferred to fresh 12-well plates, each containing 2 mL of fresh LB, and the plates were incubated at 37°C and shaken at 60 rpm for 24 h. Once the biofilm had developed, each disc was transferred to a clean well containing 2 mL of R-pyocin solution. The plates were incubated at 37°C and shaken at 60 rpm for 2, 4 and 8 h. For every timepoint, biofilm-forming bacteria were detached with a cell scraper, homogenized and counted as above.

Post-biofilm treatment studies

Using the same biofilm model, the efficacy of three consecutive treatments with R-pyocins every 4 h was evaluated. Spot assays were performed to test R-pyocin susceptibility of the viable cells after treatment.

Both pre-biofilm and post-biofilm assays, GC (R-pyocin-free) and purified extracts carrying a deletion in R-pyocins (ΔR1, ΔR2 and ΔR5) were used as negative controls. The results shown are the average of three independent experiments.

Ethics

All the experimental procedures were performed in accordance with the Spanish Royal Decree 14/2007 on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. All procedures were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University Hospitals Virgen Macarena and Virgen del Rocío (registration number 0732-N-15).

In vivo assays

Female C57/BL6 mice weighing 20–22 g were acquired from Charles River (Charles River, Barcelona, Spain) and Universidad de Sevilla (Sevilla, Spain). Upon arrival, animals were housed in regulation cages with HEPA filters, provided with water and food *ad libitum* throughout the experiments and housed under a reversed 12 h/12 h light/dark cycle. To produce the infection, mice (five per group) were anaesthetized by an intraperitoneal (IP) injection of ketamine 35 mg/kg and xylazine 5 mg/kg. Mice were infected by instillation of 30 µL of a 10^8 cfu/mL bacterial suspension of XDR *P. aeruginosa* PA1016 and treated with 30 µL of TN50 buffer (control group), 60 mg/L of R1-pyocin (R1 group) or 15 mg/kg sodium colistimethate (colistin group) administered intranasally. All mice were sacrificed by cervical dislocation, and their lungs were aseptically removed and homogenized in 2 mL of saline using a tissue homogenizer. Homogenates were serially diluted, plated onto LB agar plates and incubated for 24 h at 37°C. After incubation, colony counts were performed and the results were expressed as \log_{10} total cfu/lung.

Histopathological studies

Lungs were fixed *in situ* using 10% formalin solution before being removed and placed in fixative. Histology processing and haematoxylin and eosin (H&E) staining was carried out by the Histology Service Laboratory-IBIS. High-resolution whole images were captured and scored blind by independent assessors from the Compared Pathology Unit, Biobanco-Universitary Hospital Virgen del Rocío-IBIS.

Statistics

Due to small sample sizes, non-parametric tests were used for analysis. One-sided Mann-Whitney *U*-tests with a significance threshold of $P \leq 0.05$, adjusted for multiple comparisons using the Bonferroni correction, were then used to analyse specific sample pairs for significant differences. All mice, including outliers, were included in the statistical analysis.

Results

In vitro activity of R-pyocins

The *in vitro* activity of R-pyocins on *P. aeruginosa* cultures in planktonic growth and in biofilms was tested. The laboratory strain PAO1 and its PAO1 *wbpM* LPS mutant, together with the ST175 high-risk clone PA1016, were used (Table 1).

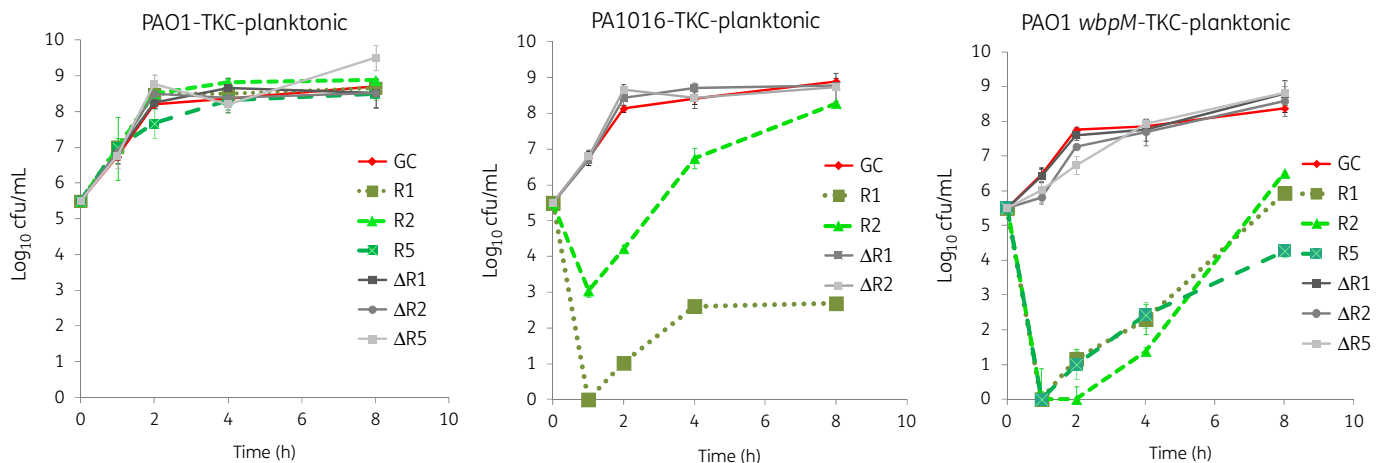


Figure 1. Activity of one dose of R-pyocins on three different bacterial strains during planktonic growth: PAO1 strain, resistant to R1-, R2- and R5-pyocins; PA1016 strain, susceptible to R1- and R2-pyocins and resistant to R5-pyocin; PAO1 *wbpM* strain, susceptible to R1-, R2- and R5-pyocins. R1, R2 and R5 indicate treatment with R1-, R2- and R5-pyocin, respectively; $\Delta R1$, $\Delta R2$ and $\Delta R5$ indicate treatment with extracts from strains lacking R1-, R2- and R5-pyocins, respectively. TKC, time-kill curve. This figure appears in colour in the online version of JAC and in black and white in the print version of JAC.

Table 2. Susceptibility of *P. aeruginosa* strains to R-pyocins

Strain	MIC (mg/L)		
	R1-pyocin	R2-pyocin	R5-pyocin
PAO1	–	–	–
PA1016	0.16	8	–
PAO1 <i>wbpM</i>	2	0.16	0.16

MICs are average values obtained from triplicate testing.
–, no activity.

R-pyocin activity in planktonic growth

A killing curve was produced to evaluate the activity of R-pyocins on planktonic *P. aeruginosa* cells. As shown in Figure 1, no statistically significant differences were found between the R-pyocin-resistant PAO1 strain and the GC, either with R-pyocins (R1, R2, R5) or with extracts from strains that do not produce R-pyocins ($\Delta R1$, $\Delta R2$, $\Delta R5$). These results showed that the purified pyocin solutions did not contain any other bactericidal compound against PAO1.

However, a significant decrease in bacterial load was found when R-pyocins were tried against the PA1016 isolate. R1- and R2-pyocins showed the highest activity after 1 h of treatment (5.50 and 2.50 \log_{10} cfu/mL, respectively). A similar observation was made in the PAO1 *wbpM* strain, with a decrease of 5.50 \log_{10} cfu/mL in the first hour after administration of R1-, R2- or R5-pyocin. In both strains, no statistically significant differences between GC and $\Delta R1$ or $\Delta R2$ treatments were found. These results point to R-pyocins as the responsible bactericidal agent and no other. These results are also consistent with the MIC of each R-pyocin for PA1016 (Table 2).

R-pyocin activity on biofilms

The R-pyocin activity assay was performed in two different stages of biofilm development. First, during the bacterial adhesion phase,

to evaluate the ability of R-pyocins to inhibit biofilm formation and second, on mature biofilm, to evaluate the ability of R-pyocins to destroy this bacterial structure.

In the pre-biofilm study (Figure 2a), R1-pyocin completely inhibited PA1016 biofilm formation, killing all adherent bacteria. Statistically significant differences were also shown between biofilm GC and R2-pyocin treatment (R2) (a decrease of 5.56 \log_{10} cfu/mL at 24 h post-treatment). Similar results were obtained with the PAO1 *wbpM* strain, with approximately a 5 \log_{10} cfu/mL decrease after R1-, R2- and R5-pyocin treatments. Therefore, these results suggest that R-pyocins are able to attack adherent bacteria and to prevent biofilm formation.

Figure 2(b) shows how R-pyocins can also be active against mature biofilm. After one dose of R-pyocins, the highest activity occurred at 2 h, with a 4.72 and 2.73 \log_{10} cfu/mL decrease in the PA1016 strain compared with the initial inoculum for R1- and R2-pyocins, respectively, and almost a 4.5 \log_{10} cfu/mL decrease in the PAO1 *wbpM* strain for R1-, R2- and R5-pyocins. Therefore, these results suggest that R-pyocins penetrate into biofilm and kill *P. aeruginosa* within it.

Regrowth of the bacteria that had not been lysed at 2 h was detected in the next 6 h. To evaluate whether complete biofilm eradication was possible, a three-dose treatment was administered. As shown in Figure 2(c), a progressive decrease in biofilm occurred after each R-pyocin dose. Thus, after three doses of R-pyocins (R1- + R2-pyocin cocktail) a drastic decrease compared with the initial inoculum of 5.67 and 6.03 \log_{10} cfu/mL occurred with PA1016 and PAO1 *wbpM*, respectively. Therefore, R-pyocins are able to kill growing *P. aeruginosa* in a biofilm.

In vivo activity of R-pyocins

To demonstrate the preventive efficacy of R1-pyocin in the development of acute *P. aeruginosa* acute pneumonia, two batches of mice were treated with R1-pyocin or TN50 buffer 6 h before PA1016 infection. As shown in Figure 3(a), a single dose of R1-pyocin showed a 3 \log_{10} lung bacterial load reduction in comparison with the group of untreated mice.

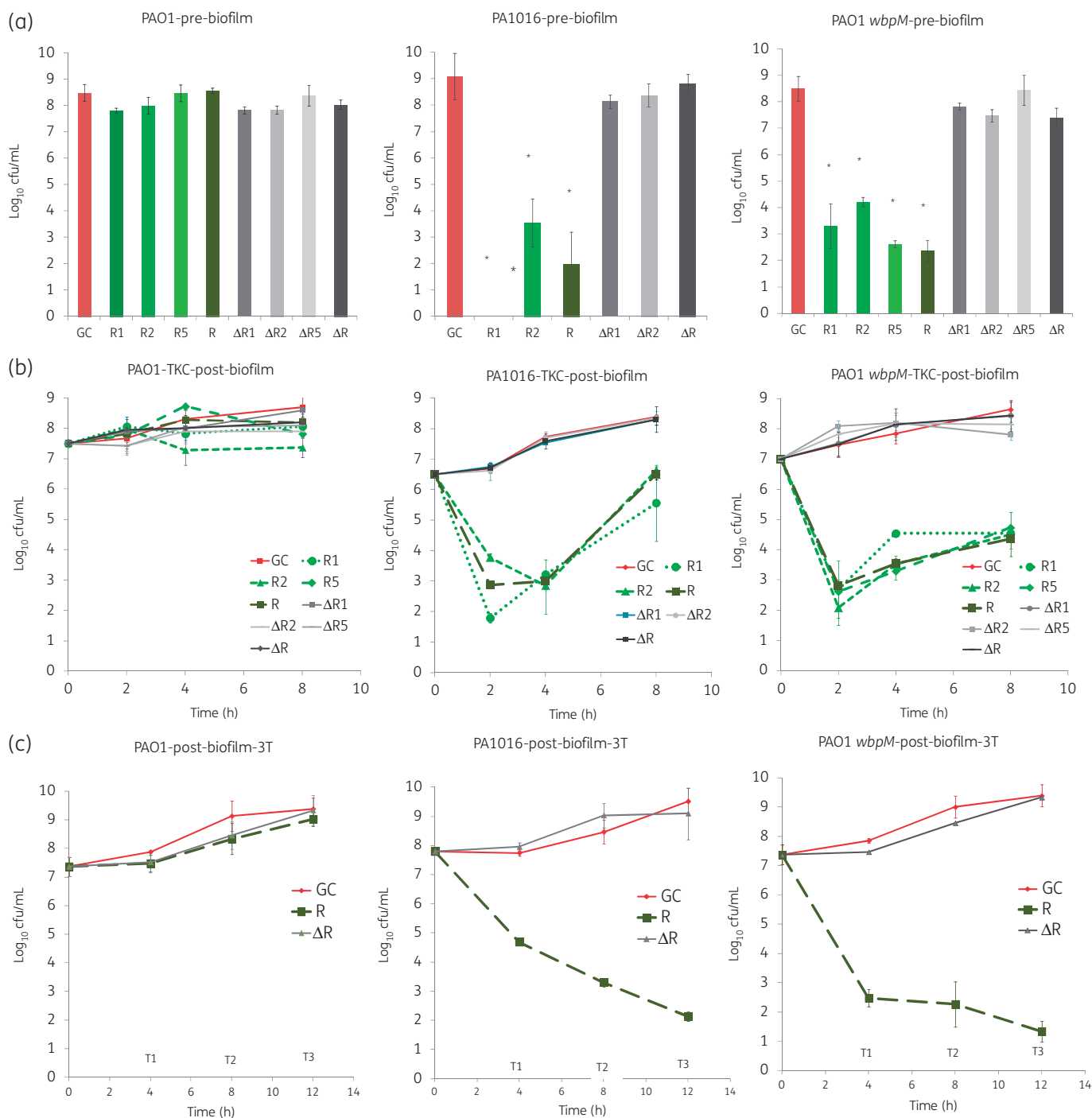


Figure 2. Effect of R-pyocins on bacteria adhered to a silicone elastomer surface. (a) Before biofilm formation. (b) After one dose of R-pyocins in a biofilm formed on a silicone elastomer surface. Samples were collected at 0, 2, 4 and 8 h after adding treatments. (c) After three doses of R-pyocins in a biofilm formed on a silicone elastomer surface. Samples were collected 4 h after the administration of the last dose. Strains: PAO1, resistant to R1-, R2- and R5-pyocins; PA1016, susceptible to R1- and R2-pyocins and resistant to R5-pyocin; PAO1, susceptible to *wbpM*, R1-, R2- and R5-pyocins. TKC, time-kill curve; R1, R2 and R5 indicate treatment with R1-, R2- and R5-pyocin, respectively; R indicates a treatment mixture containing R1-, R2- and R5-pyocin; ΔR1, ΔR2 and ΔR5 indicate treatment with extracts from strains with genetic deletions of R1-, R2- and R5-pyocins, respectively; ΔR indicates ΔR1, ΔR2 and ΔR5 treatment mix; T1, T2 and T3 indicate bacterial load after first, second and third treatment, respectively. This figure appears in colour in the online version of JAC and in black and white in the print version of JAC.

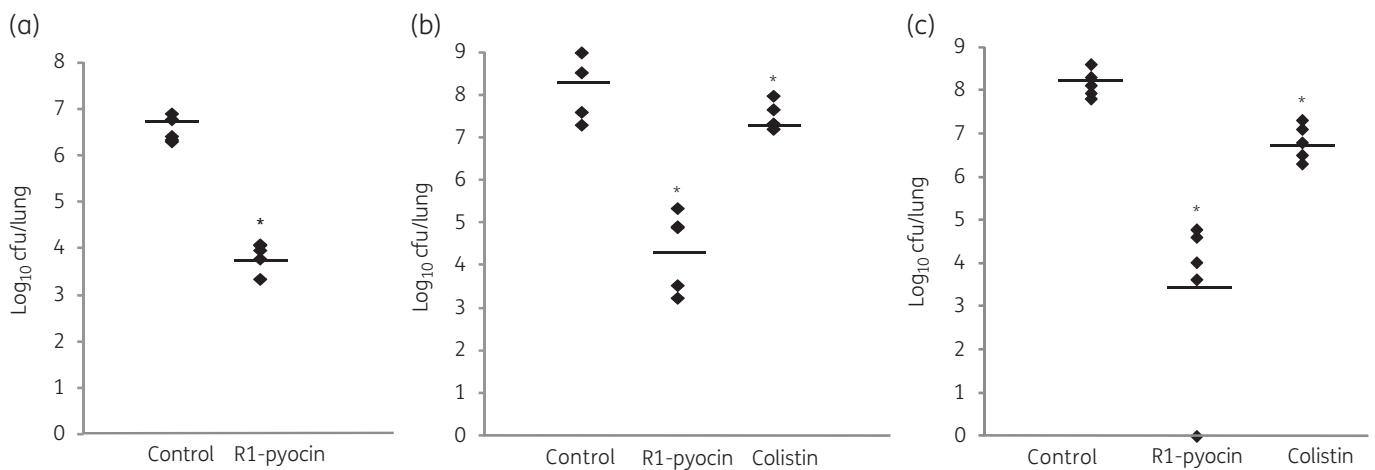


Figure 3. Recovery of ST175 high-risk clone PA1016 bacteria from pyocin-treated mice. All mice received 1.8 μ g of R1-pyocin and bacterial counts were determined as cfu counts in homogenized lungs. (a) Mice treated with one dose of R1-pyocin 6 h pre-infection. All mice were sacrificed 4 h post-infection. (b) Mice treated with one dose of R1-pyocin and one dose of sodium colistimethate 2 h post-infection. All mice were sacrificed 6 h post-infection. (c) Mice treated with three doses of R1-pyocin or sodium colistimethate, administered every 8 h. All mice were sacrificed 4 h after the last dose. Bars represent averages. *Statistical significance for comparison of treatment versus control (one-sided Mann–Whitney *U*-test with Bonferroni correction).

The activity of R1-pyocin in *P. aeruginosa* acute pneumonia was compared with colistin, a current frontline treatment, to which the ST175 high-risk clone PA1016 is susceptible. Two hours after inoculation of the mice with the PA1016 strain pneumonia was established, and the mice were then treated with either a single dose of R1-pyocin, or colistin or TN50 buffer. A growth reduction of 4 and 1 log₁₀ cfu/mL of the PA1016 strain was obtained with the R1-pyocin and colistin treatments (Figure 3b).

When infected mice were treated with three doses of R1-pyocin, colistin or TN50 buffer, administered every 8 h, a satisfactory response to colistin was observed (Figure 3c), with a significant bacterial load decrease of almost 2 log₁₀. However, the decrease was even more drastic in the group treated with R1-pyocin, which showed the greatest efficacy, with a bacterial load reduction of almost 5 log₁₀ compared with the control group.

Therefore, R1-pyocin was more effective than colistin in our model of infection, with a 100000-fold bacterial load decrease compared with the 100-fold reduction produced by colistin.

Histopathological examination of the lungs of mice infected with the PA1016 strain after administration of TN50 buffer and R1-pyocin is shown in Figure 4. The lungs of the mice treated with a single dose of TN50 buffer (Figure 4a, left) showed focal areas of alveolar haemorrhage and inflammatory infiltrate of alveolar and peribronchial spaces, suggesting acute interstitial pneumonia. However, no signs of inflammation were found in the lungs of the mice treated with a single dose of R1-pyocin (Figure 4a, right).

After three doses of TN50 buffer (Figure 4b, left), the lungs showed a significant pulmonary haemorrhage with a profuse fibrillar framework and acute inflammatory cells, altering the pulmonary architecture. All these findings were consistent with pulmonary haemorrhage and pneumonia, while the lungs of mice that received three doses of R1-pyocin (Figure 4b, right) showed focal and less intense involvement, suggesting that pneumonia had attained the resolution phase.

In summary, R-pyocin treatment was shown to be highly effective in reducing bacterial load in the infected lungs and

affording protection against a lethal *P. aeruginosa* infection when administered either pre- or post-infection.

Discussion

The alarming rise of MDR bacteria and the consequent need for antibiotic alternatives have renewed interest in pyocins as specific bactericidal agents against *P. aeruginosa*.^{7–10} R-pyocins are bacteriocins produced by *P. aeruginosa* (supposedly to kill closely related competitors), and have numerous advantages over current conventional therapies. Through a simple and effective mechanism, R-pyocins produce a pore in the cell membrane, leading to bacterial death. Unlike broad-spectrum antibiotics, R-pyocins have a reduced and specific spectrum, which will reduce the selection pressure towards generation of resistant bacteria. The limited bacterial species susceptible to the R-pyocins also protects the intestinal microbiota, thus preventing diseases such as antibiotic-associated diarrhoea due to *Clostridioides difficile*. Furthermore, unlike bacteriophages, R-pyocins do not carry any genetic material, and therefore a horizontal spread of antibiotic resistance genes is avoided.²⁷

The formation of mucoid biofilm is the hallmark of chronic infections due to *P. aeruginosa* and it is indicative of disease progression and long-term persistence. Bacterial cells within this matrix become less accessible to antimicrobials. This phenomenon, together with the rapid emergence of MDR strains, makes it urgent to search for new molecules, not only with antimicrobial activity on MDR strains but also with the ability to penetrate biofilms.

It is known that the same bacteria do not have the same adhesion capacity and biofilm formation on different surfaces.^{43–46} In this work, we have demonstrated the effect of R-pyocins on *P. aeruginosa* biofilm formation using silicone discs, a material widely used in clinical practice (catheters, prostheses, biomedical devices, etc.), whereas other work has studied the activity of S-pyocins and R-pyocins in *P. aeruginosa* biofilm on other materials.^{31,34} Additionally, our method makes it possible to know the real

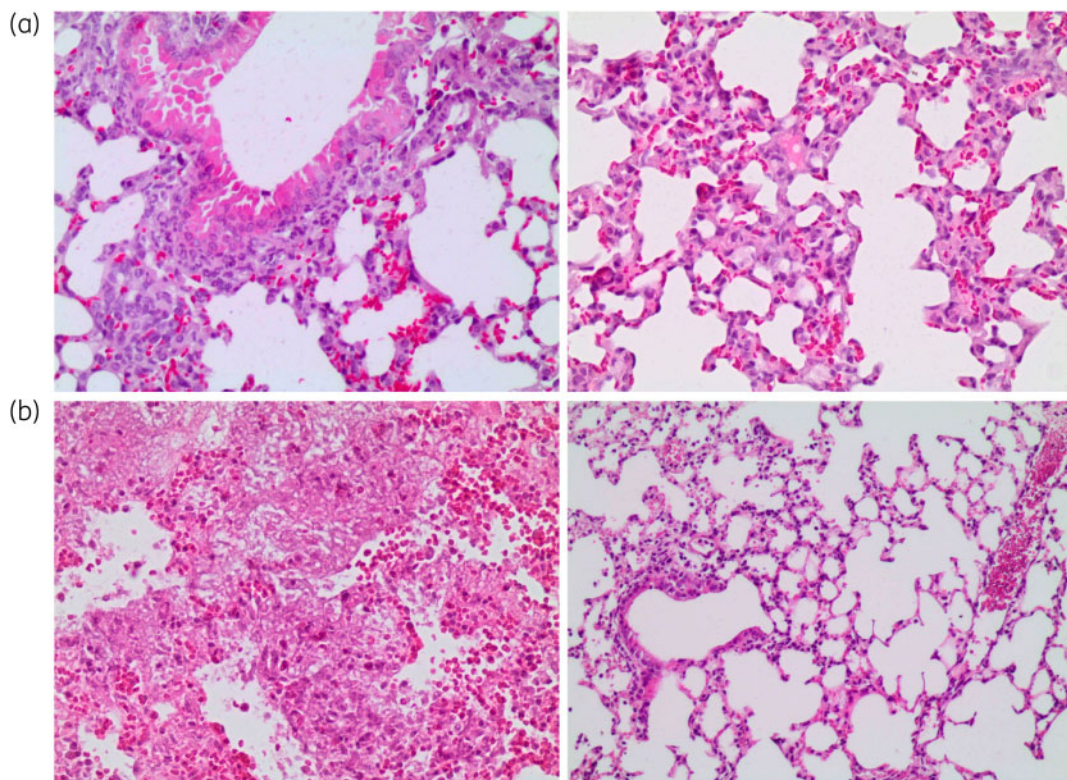


Figure 4. H&E staining of paraffin-embedded sections of lungs of mice infected with PA1016 and treated as follows: (a) left, one dose of TN50 buffer; right, one dose of R1-pyocin; or (b) left, three doses of TN50 buffer; right, three doses of R1-pyocin. Lack of inflammation or neutrophil influx was noted. All magnifications $\times 20$. This figure appears in colour in the online version of JAC and in black and white in the print version of JAC.

population of viable cells after antimicrobial treatment, which provides relevant and realistic information.

Lastly, we have been able to demonstrate that complete biofilm eradication was achievable after three doses of R-pyocin treatment. A progressive decrease in viable bacteria was observed, and this effect was more intense after the first dose than with the following ones. This is probably because the first dose of R-pyocins targeted bacteria located on the surface of the biofilm, which are more accessible. In the following doses, access to bacteria deeply embedded in the biofilm matrix may have been difficult, thus reducing R-pyocin efficacy.

Additionally, no changes regarding R-pyocin susceptibility occurred after the treatment (data not shown). No resistant mutants were selected after several doses of R-pyocins (a frequent problem with conventional antibiotics), suggesting that complete bacterial eradication may be possible after sequential treatments.

In our murine model, we have shown a great activity of R1-pyocin against the ST175 high-risk clone of XDR *P. aeruginosa*, whether administered before infection as a preventive treatment or in acute pneumonia. It is remarkable that the efficacy of the treatment was higher than that of the colistin standard treatment. We chose the ST175 strain because of its important clinical relevance, since it is endemic in many European ICU services, is highly virulent and produces ventilator-associated pneumonia with a serious course. This strain is also a carbapenemase type VIM producer and extremely resistant to antibiotics. Although the results shown in this work are promising, further data on R-pyocin activity against

a larger isolate collection is required before we can have confidence in these compounds.^{47,48}

In addition, this work is the first, to our knowledge, to describe histopathological lung changes after administration of R-pyocins, showing pneumonia in a resolution stage in a murine model.

In summary, this work expands our knowledge of the R-pyocins, showing their effectiveness in biofilms as well as in a murine model of pneumonia by the ST175 high-risk clone of *P. aeruginosa*. R-pyocin treatment may thus be considered a possible therapeutic alternative in XDR infections, where treatment alternatives are very limited.

Acknowledgements

Pseudomonas R-pyocin indicator strains were a kind gift from Dr Köhler (Department of Microbiology and Molecular Medicine, University of Geneva, Switzerland).

We are grateful to Dr Joan Gavaldà and Dr Jesús Blázquez for useful scientific contributions, and Dr María José Robles from the Comparative Pathology Unit, Biobank-University Hospital Virgen del Rocío-IBIS.

Funding

This work was supported by Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (grant number PI 0062–2014) and Sociedad de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Spain ‘Ayudas SEIMC para la Formación-2016’.

Transparency declarations

None to declare.

References

- Moore JE, Mastoridis P. Clinical implications of *Pseudomonas aeruginosa* location in the lungs of patients with cystic fibrosis. *J Clin Pharm Ther* 2017; **42**: 259–67.
- Nathwani D, Raman G, Sulham K et al. Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrob Resist Infect Control* 2014; **3**: 32.
- Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; **7**: 39.
- Leid JG, Kerr M, Selgado C et al. Flagellum-mediated biofilm defense mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* against host-derived lactoferrin. *Infect Immun* 2009; **77**: 4559–66.
- Olsen I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; **34**: 877–86.
- Morse S, Vaughan P, Johnson D et al. Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by a bacteriocin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1976; **10**: 354–62.
- Breederveld RS. Phage therapy 2.0: where do we stand? *Lancet Infect Dis* 2019; **19**: 2–3.
- Gordillo Altamirano FL, Barr JJ. Phage therapy in the postantibiotic era. *Clin Microbiol Rev* 2019; **32**: e00066–18.
- Kortright KE, Chan BK, Koff JL et al. Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. *Cell Host Microbe* 2019; **25**: 219–32.
- Monteiro R, Pires DP, Costa AR et al. Phage therapy: going temperate? *Trends Microbiol* 2019; **27**: 368–78.
- Trend S, Fonceca AM, Ditcham WG. The potential of phage therapy in cystic fibrosis: essential human-bacterial-phage interactions and delivery considerations for use in *Pseudomonas aeruginosa*-infected airways. *J Cyst Fibros* 2017; **16**: 663–70.
- Watts G. Phage therapy: revival of the bygone antimicrobial. *Lancet* 2017; **390**: 2539–40.
- Nobrega FL, Costa AR, Kluskens LD et al. Revisiting phage therapy: new applications for old resources. *Trends Microbiol* 2015; **23**: 185–91.
- Cafora M, Deflorian G, Forti F et al. Phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections in a cystic fibrosis zebrafish model. *Sci Rep* 2019; **9**: 1527.
- Dickey J, Perrot V. Adjunct phage treatment enhances the effectiveness of low antibiotic concentration against *Staphylococcus aureus* biofilms in vitro. *PLoS One* 2019; **14**: e0209390.
- Milho C, Andrade M, Vilas Boas D et al. Antimicrobial assessment of phage therapy using a porcine model of biofilm infection. *Int J Pharm* 2019; **557**: 112–23.
- Wang JL, Kuo CF, Yeh CM et al. Efficacy of ϕ km18p phage therapy in a murine model of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Infect Drug Resist* 2018; **11**: 2301–10.
- Kakasis A, Panitsa G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. *Int J Antimicrob Agents* 2019; **53**: 16–21.
- Morozova VV, Vlassov VV, Tikunova NV. Applications of bacteriophages in the treatment of localized infections in humans. *Front Microbiol* 2018; **9**: 1696.
- Gill JJ, Hyman P. Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy. *Curr Pharm Biotechnol* 2010; **11**: 2–14.
- Shinomiya T, Ohsumi M, Kageyama M. Defective pyocin particles produced by some mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1975; **124**: 1508–21.
- Nakayama K, Takashima K, Ishihara H et al. The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. *Mol Microbiol* 2000; **38**: 213–31.
- Köhler T, Donner V, Van Delden C. Lipopolysaccharide as shield and receptor for R-pyocin-mediated killing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2010; **192**: 1921–8.
- Meadow PM, Wells PL. Receptor sites for R-type pyocins and bacteriophage E79 in the core part of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* PAC1. *J Gen Microbiol* 1978; **108**: 339–43.
- Uratani Y, Hoshino T. Pyocin R1 inhibits active transport in *Pseudomonas aeruginosa* and depolarizes membrane potential. *J Bacteriol* 1984; **157**: 632–6.
- Fyfe JA, Harris G, Govan JR. Revised pyocin typing method for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 1984; **20**: 47–50.
- Michel-Briand Y, Baysse C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 2002; **84**: 499–510.
- Campagnari AA, Karalus R, Apicella M et al. Use of pyocin to select a *Haemophilus ducreyi* variant defective in lipooligosaccharide biosynthesis. *Infect Immun* 1994; **62**: 2379–86.
- Blackwell CC, Winstanley FP, Telfer Brunton WA. Sensitivity of thermophilic campylobacters to R-type pyocines of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 1982; **15**: 247–51.
- Ling H, Saeidi N, Rasouliha BH et al. A predicted S-type pyocin shows a bactericidal activity against clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates through membrane damage. *FEBS Lett* 2010; **584**: 3354–8.
- Smith K, Martin L, Rinaldi A et al. Activity of pyocin S2 against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 1599–601.
- McCaughey LC, Josts I, Grinter R et al. Discovery, characterisation and in vivo activity of pyocin SD2, a protein antibiotic from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J* 2016; **473**: 2345–58.
- McCaughey LC, Ritchie ND, Douce GR et al. Efficacy of species-specific protein antibiotics in a murine model of acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Sci Rep* 2016; **6**: 30201.
- Olyumbo O, Penfold CN, Diggle SP. Competition in biofilms between cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa* is shaped by R-pyocins. *MBio* 2019; **10**: e01828–18.
- Ritchie JM, Greenwich JL, Davis BM et al. An *Escherichia coli* O157-specific engineered pyocin prevents and ameliorates infection by *E. coli* O157:H7 in an animal model of diarrheal disease. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 5469–74.
- Scholl D, Cooley M, Williams SR et al. An engineered R-type pyocin is a highly specific and sensitive bactericidal agent for the food-borne pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 3074–80.
- Scholl D, Martin DW. Antibacterial efficacy of R-type pyocins towards *Pseudomonas aeruginosa* in a murine peritonitis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 1647–52.
- Williams SR, Gebhart D, Martin DW et al. Retargeting R-type pyocins to generate novel bactericidal protein complexes. *Appl Environ Microbiol* 2008; **74**: 3868–76.
- Redero M, Lopez-Causapé C, Aznar J et al. Susceptibility to R-pyocins of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother* 2018; **73**: 2770–6.
- Ito S, Kageyama M, Egami F. Isolation and characterization of pyocins from several strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Appl Microbiol* 1970; **16**: 205–14.

- 41** European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). EUCAST Definitive Document E.Def 1.2, May 2000: terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clin Microbiol Infect* 2000; **6**: 503–8.
- 42** Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nat Protoc* 2008; **3**: 1909–24.
- 43** Cerqueira L Oliveira JA, Nicolau A *et al.* Biofilm formation with mixed cultures of *Pseudomonas aeruginosa*/*Escherichia coli* on silicone using artificial urine to mimic urinary catheters. *Biofouling* 2013; **29**: 829–40.
- 44** Francolini I, Vuotto C, Piozzi A *et al.* Antifouling and antimicrobial biomaterials: an overview. *APMIS* 2017; **125**: 392–417.
- 45** Jing H, Shale-Demessie E, Sorial GA. Inhibition of biofilm growth on polymer-MWCNTs composites and metal surfaces. *Sci Total Environ* 2018; **15**: 167–78.
- 46** Kim DJ, Park JH, Chang M. Species-specific characteristics of the biofilm generated in silicone tube: an in vitro study. *BMC Ophthalmol* 2018; **18**: 1–6.
- 47** Cabot G, Lopez-Causape C, Ocampo-Sosa AA *et al.* Deciphering the resistance of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 175 international high-risk clone through whole-genome sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; **60**: 7415–23.
- 48** Viedma E, Juan C, Villa J *et al.* VIM-2-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175 clone, Spain. *Emerg Infect Dis* 2012; **18**: 1235–41.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

El alarmante aumento de bacterias resistentes a antibióticos constituye un auténtico reto en la salud mundial, con el consecuente aumento de morbilidad y mortalidad en todo el mundo.

P. aeruginosa es un patógeno humano que aprovecha el estado de inmunosupresión del huésped como una oportunidad para causar un amplio abanico de infecciones agudas y crónicas¹⁰. El tratamiento de estas infecciones en muchos casos resulta muy complicado, ya que este microorganismo posee mecanismos de resistencia intrínseca a diversos antibióticos, y además puede adquirir resistencias durante el tratamiento^{28,31,33-35}.

Además, *P.aeruginosa* posee múltiples mecanismos para evadir la respuesta del huésped como es la formación del biofilm. Aquí, las comunidades bacterianas organizadas están embebidas en una matriz extracelular polimérica asociada a una superficie vital, como por ejemplo el epitelio pulmonar en el caso de pacientes con fibrosis quística o EPOC, o a una superficie inerte como son los dispositivos biomédicos, causando infecciones relacionadas con ellos como es el caso de la neumonía asociada a ventilación mecánica, bacteriemia o ITU relacionadas con catéter, etc.²⁰. En este ambiente existe una mayor tolerancia a los antimicrobianos, debido principalmente a la baja actividad de algunos antibióticos en ambientes anaeróbicos, la presencia de células persistentes frente a las cuales los antibióticos son inactivos, la inducción de mecanismos de resistencia, el desarrollo de resistencias mutacionales durante el tratamiento antibiótico y la transferencia genética horizontal entre bacterias²⁶.

Como se ha mencionado anteriormente, las NAVM por *P. aeruginosa* pueden llegar a tener una tasa de mortalidad de hasta el 50 % y la infección respiratoria crónica por *Pseudomonas aeruginosa* es una de los principales impulsores de la morbilidad y la mortalidad en pacientes con FQ, bronquiectasias o EPOC¹³.

Por lo tanto, es una prioridad encontrar un tratamiento adecuado para tratar a estas bacterias cada vez más resistentes, y con mecanismo sofisticados que impiden, entre otros, el acceso al foco de infección y la correcta actividad de las moléculas conocidas hasta ahora.

En las últimas décadas, se ha desacelerado bruscamente el descubrimiento de antibióticos y el mecanismo de acción similar entre los pocos nuevos medicamentos ha llevado a la evolución potencial de resistencia cruzada en las bacterias. Aunque las modificaciones sintéticas a algunos antibióticos preexistentes han extendido temporalmente su utilidad clínica⁵⁸, se han seleccionado mecanismos de resistencia más amplios, como las betalactamasas de espectro extendido⁵⁹, cambios adaptativos que han evolucionado más fácilmente en comparación con la aparición de mecanismos de resistencia de *novo*.

Ante este escenario, es imprescindible el descubrimiento, diseño y desarrollo de nuevas terapias antibacterianas alternativas. La capacidad de los bacteriófagos de lisar a sus bacterias hospedadoras, su amplia distribución y su elevada especificidad, ha renovado su interés entre la comunidad científica. Numerosos ensayos clínicos en humanos proponen a los cócteles de fagos como una alternativa en potencia para tratar infecciones bacterianas recalcitrantes. Para poner solución a las limitaciones más importantes de la fagoterapia, como por ejemplo la transmisión de elementos génicos, se están investigando diversas vertientes, como es el uso y desarrollo de proteínas derivadas de los fagos.

Las piocinas de tipo R son bacteriocinas de origen fágico producidas por *P. aeruginosa*, supuestamente para fines de competencia intraespecie¹⁴¹, aunque son también activas contra especies no relacionadas¹⁰⁶⁻¹⁰⁹, y que agregan numerosas ventajas a las terapias convencionales actuales. A diferencia de los antibióticos de amplio espectro, las piocinas R tienen un espectro muy reducido y específico, lo que limitará la evolución de la resistencia bacteriana debido a la ausencia de presión selectiva. Este espectro reducido preserva la microbiota intestinal, evitando así enfermedades como la diarrea asociada a antibióticos por *Clostridioides difficile*¹²⁸. Además, a diferencia de los fagos, las piocinas R son estructuras no replicativas (no contienen ADN) por lo que no transportan material genético y, por lo tanto, evitan la propagación horizontal de genes de resistencia a antibióticos y otros elementos génicos que confieran virulencia entre otras bacterias, una característica deseable para un agente terapéutico. Su producción es sencilla, ya que al estar reguladas por RecA, se puede inducir su producción y obtener 200 veces más partículas que a su nivel

basal^{112,114}. Mediante un sencillo y eficaz mecanismo de acción, la piocina R produce un poro en la membrana celular con la consecuente despolarización de la membrana, ruptura de la respiración celular y lisis de la bacteria^{104,119}. Además, las piocinas tipo R son muy activas, tan sólo se necesitan 1 o 2 partículas para lisar una bacteria, mientras que se requieren entre 180 y 200 piocinas tipo F y tipo S para alcanzar el mismo efecto¹⁰²⁻¹⁰⁴. Es por ello, que en esta Tesis hayamos decidido trabajar con las piocinas tipo R, ya que son las más activas.

En la presente Tesis, tratamos de evaluar la actividad de las piocinas tipo R para proponerlas como una alternativa terapéutica o en adyuvancia con los antibióticos utilizados en la práctica clínica para combatir infecciones tanto crónicas como agudas por *P. aeruginosa*.

En la **Publicación 1**, hemos comparado aislamientos bien caracterizados de pacientes con FQ, donde la infección causada por este patógeno se vuelve crónica en etapas posteriores y una gran cantidad de redes reguladoras juegan un papel en la adaptación^{142,143}, con aislamientos procedentes de pacientes con bacteriemia, la cual habitualmente cursa de forma aguda.

Nuestros resultados muestran que los aislados de *P. aeruginosa* de pacientes con fibrosis quística son más sensibles a las piocinas R. Casi el 80% de los aislados de FQ fueron sensibles al menos a una de las tres piocinas R, mientras que sólo el 50% de los aislamientos de las infecciones del torrente sanguíneo fueron sensibles. Este patrón también se demostró en los aislamientos que causaron infección aguda en otras localizaciones, procedentes del Hospital Universitario Virgen del Rocío (Anexo II).

Poco se sabe sobre el patrón de sensibilidad de aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* a las piocinas R. *Kohler y cols.*¹¹⁸ describieron el perfil de sensibilidad a las piocinas R de 47 aislados de aspirados traqueales. En ellos se encontró una proporción similar de aislamientos sensibles a piocinas R (59% versus 50% en nuestro estudio). También analizaron el perfil de producción de piocinas R y demostraron un porcentaje similar de no productores y productores de piocinas R1, R2 y R5 (17%–29%). Los aislamientos deficientes en piocinas R fueron sensibles a las piocinas R1, R2 y R5, mientras que la mayoría de los productores de piocinas R2 y R5 eran resistentes¹¹⁸.

*Ghoul y cols.*¹⁴⁴ también analizaron aislamientos clínicos de pacientes con FQ y otras localizaciones extrapulmonares para estudiar el papel de las piocinas en el dinamismo de la colonización pulmonar. Llegaron a la conclusión de que los aislados procedentes de etapas posteriores en las infecciones crónicas producen menos tipos de piocinas y, al mismo tiempo, son más sensibles a las piocinas producidas por otras cepas, que las cepas que causan infecciones agudas. Concluyen que este patrón podría ocurrir por la competencia de cepas que se produce en un ambiente hostil como es el pulmón en FQ, con cepas más competitivas que producen menos piocinas¹⁴⁵⁻¹⁴⁸, ya que la producción de una mayor diversidad de piocinas podría ser más costoso en infecciones crónicas.

Estos hallazgos están de acuerdo con la alta sensibilidad a las piocinas R de los aislados procedentes de pacientes con FQ presentados en esta Tesis.

Para intentar dar una explicación a este resultado, se realizó un análisis del antígeno O del LPS. Al estudiar diferentes mutantes en el LPS de *P. aeruginosa*, *Kohler y cols.*¹¹⁸ descifraron los restos glucosídicos específicos de unión a las piocinas R, situados en el núcleo externo del LPS. Cubriendo esta estructura se sitúan las cadenas o bandas polisacáridas que conforman el antígeno O. Cada bacteria se compone de forma heterogénea, como si de un mosaico se tratara, de una variedad de bandas, con distintas longitudes y niveles de empaquetamiento¹²². La mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con FQ muestran una pérdida en la reacción del serotipo O (no tipificables) y sensibilidad al suero humano^{149,150}, lo que sugiere que estas cepas tienen defectos en el LPS, como por ejemplo, la pérdida del antígeno O. Nuestros resultados están de acuerdo con publicaciones anteriores donde aislamientos procedentes de FQ tampoco eran tipificables. Según nuestros resultados, estos aislados no tipificables fueron más sensibles a las piocinas R. Curiosamente, en la presente tesis y en un estudio anterior¹¹⁸, los aislados con serotipos O1 y O6 mostraron una mayor sensibilidad a las piocinas R. Esta correlación puede reflejar la densidad de empaquetamiento de las cadenas laterales del antígeno O del LPS, según las propiedades fisicoquímicas de los azúcares que las componen. Estos resultados sugieren que los aislados de serotipo O1 y O6 tienen una baja proporción de moléculas que conlleva a un empaquetamiento en el LPS de baja densidad. Este hecho

proporcionaría un acceso relativamente libre de las piocinas R a sus receptores de superficie.

Por lo tanto, algunas conformaciones de LPS pueden permitir que las piocinas R accedan más fácilmente a su lugar de unión en el núcleo del LPS. Nuestros resultados apuntan a la arquitectura del LPS como la última causa de sensibilidad a las piocinas R en aislados de FQ. Concluimos con que la pérdida del antígeno O o la evolución hacia conformaciones más accesibles en aislados crónicos pueden explicar que estas cepas sean más sensibles a las piocinas R.

La resistencia a piocinas de tipo R es causada por modificaciones en la molécula del LPS¹⁰⁹. Nuestro estudio evolutivo realizado con aislados clínicos procedentes de 10 pacientes con FQ recogidos durante 8 años de evolución de su enfermedad revelaron muy pocos cambios en el perfil de sensibilidad de piocinas R con el tiempo (entre los pacientes infectados con un clon ST), lo que sugiere que estas modificaciones no son muy frecuentes en el ambiente pulmonar. Además, la mayoría de los pacientes fueron colonizados por uno o dos clones. Se observaron muy pocos cambios en la sensibilidad de piocinas R en clones que permanecen durante años, algunos de ellos hipermutadores (pacientes 2, 3, 9 y 10), en contraste con la resistencia a los antibióticos, que se desarrolla a lo largo de la enfermedad¹³⁹. *Ghoul y cols.*¹⁴⁴ llevaron a cabo un estudio en pacientes con FQ de infección a largo plazo (6-10 años). En general, el perfil de sensibilidad a las piocinas no cambió con el tiempo, de acuerdo con nuestros resultados de los pacientes 2, 4, 9 y 10. Encontraron que las cepas más dominantes/persistentes, tomadas de etapas de infección posteriores, son menos capaces de matar, ya que producen menos piocinas y a su vez son más sensibles a ellas. Como se explica anteriormente, nuestros resultados también sugieren que los aislamientos capaces de alcanzar las últimas etapas de infección permanecen sensibles a las piocinas R y a su vez, producen menos piocinas R.

Las cepas más dominantes, que persisten y compiten a lo largo del tiempo para provocar infecciones crónicas, portan una menor diversidad de piocinas¹⁴⁴. En etapas más tempranas de la infección es favorable una mayor diversidad de piocinas, ya que compiten con una mayor diversidad de cepas, pero en etapas posteriores, esta

producción, lejos de ser ventajosa, conlleva un alto coste biológico, ya que hace disminuir la resistencia a agentes genotóxicos, tan comunes en el ambiente pulmonar de FQ¹⁵¹.

En los resultados presentados en la Publicación 1, no encontramos una correlación entre el perfil de sensibilidad a las piocinas R y a los antibióticos comunes utilizados actualmente en la práctica clínica para infecciones por *P. aeruginosa*. A finales de la década de 1980, un estudio incluyendo 116 aislados de *P. aeruginosa* de diversas fuentes clínicas (que no se mencionaron)¹⁵², sugirió una relación potencial entre resistencia a múltiples antibióticos (carbenicilina y gentamicina) y sensibilidad a piocinas R2. Estos autores sugirieron como causa probable el deterioro de la permeabilidad de la membrana externa causada por modificaciones en el LPS. La correlación con carbenicilina y gentamicina no ha sido estudiada en esta Tesis. Sin embargo, si lo hicimos con tobramicina y colistina, que causan alteraciones en la permeabilidad de la membrana^{153,154} y nuestros resultados muestran que los aislamientos sensibles a piocinas R no fueron más sensibles a colistina o aminoglucósidos.

Es importante destacar que muchas de las cepas de nuestra colección presentan resistencia a tres o más grupos de antibióticos, lo que las categoriza como multirresistentes (MDR) o incluso extensivamente resistentes (XDR). El estado de multirresistencia de los aislados clínicos analizados no se relaciona con la sensibilidad o resistencia a piocinas. Por lo tanto, el hecho de que una cepa posea múltiples mecanismos de resistencia antibiótica, no condiciona su sensibilidad a las piocinas R, una cuestión importante al plantear a las piocinas como una alternativa terapéutica para estos aislados con pocas posibilidades de tratamiento.

Hasta la fecha, no se han documentado trabajos que hayan realizado estudios de interacción entre piocinas R y antipseudomónicos comunes. Si se pretende considerar a las piocinas R como una alternativa potencial para realizar un tratamiento en adyuvancia con antibióticos comúnmente usados en la práctica clínica, es fundamental el estudio de sus interacciones.

En los resultados presentados en la Publicación 1, no se encontraron interacciones entre antibióticos antipseudomónicos como tobramicina, gentamicina, amikacina, levofloxacino, ciprofloxacino, colistina e imipenem y piocinas R, es decir, la actividad de los distintos agentes no se modificó en presencia de las piocinas R. Cabe destacar la falta de interacción entre la colistina y las piocinas R, ya que ambas moléculas tienen su diana en el LPS. Aunque el mecanismo exacto por el cual la colistina puede matar células bacterianas actualmente no está claro, si bien es cierto que la colistina interacciona con el lípido A del LPS para alterar la membrana lo que conlleva a la pérdida del material celular y su muerte^{153,155,156}. Como ya se ha mencionado anteriormente, los receptores específicos de las piocinas R se sitúan en el núcleo externo del LPS¹¹⁸. Con lo cual, nuestros resultados apuntan hacia la falta de competencia entre colistina y piocinas R para alcanzar sus distintas dianas en el LPS.

Sorprendentemente, encontramos una fuerte sinergia entre la piocina R2 y aminoglucósidos (tobramicina y gentamicina) en el clon de alto riesgo ST175, PA1016 (resistente a gentamicina y tobramicina). Por el contrario, no se observó sinergia en la cepa PA116 (también perteneciente al ST175 y resistente a la gentamicina y tobramicina) ni en el resto de las cepas estudiadas. PA1016 y PA116 son sensibles a la piocina R2. Por lo tanto, esta interacción parece ser específica de la cepa PA1016 y requerirá más investigación más profunda.

Aunque es temprano aún para considerar un tratamiento exclusivo con piocinas R, la falta de interacciones observada en nuestros resultados abre el camino para poder considerar una posible administración conjunta de piocinas R como adyuvantes de las terapias convencionales.

Como se explica en la introducción, la formación del biofilm mucoso es el sello distintivo de las infecciones crónicas debidas a *P. aeruginosa* y es indicativa de la progresión de la enfermedad y la persistencia a largo plazo. Las células bacterianas dentro de esta matriz se vuelven menos accesibles a los antimicrobianos. Este fenómeno hace que sea necesario buscar nuevas moléculas con la capacidad de penetrar en el biofilm y ser activas dentro de él.

Las bacterias no tienen la misma capacidad de adhesión y formación de biofilms sobre diferentes superficies¹⁵⁷⁻¹⁶⁰. En los resultados obtenidos en la **Publicación 2**, hemos demostrado la gran actividad de las piocinas R en biofilms de *P. aeruginosa* formados sobre elastómero de silicona, un material ampliamente utilizado en la práctica clínica (catéteres, prótesis, dispositivos biomédicos, etc.). Otros trabajos han estudiado la actividad de piocinas S y piocinas R en biofilms de *P. aeruginosa* sobre otros materiales^{161,162}. Además, nuestro método permite conocer la población real de células viables después del tratamiento antimicrobiano, lo que proporciona una información más relevante.

En la presente Tesis, se demuestra que las piocinas tipo R son capaces de atacar a las bacterias adheridas a la superficie de silicona, en la primera fase de formación del biofilm, impidiendo del desarrollo del mismo. A pesar de su gran tamaño, también se demuestra que las piocinas tipo R son capaces de penetrar dentro de la entramada estructura del biofilm manteniendo su alta eficacia, capaces de reducir la carga bacteriana 100.000 veces a las cuatro horas tras la administración de una sola dosis (utilizando concentraciones de 60 µg/ml, 20 µg/ml y 20 µg/ml de piocinas R1, R2 y R5, respectivamente). *Oluymba* y cols.¹⁶² llevaron a cabo un estudio similar, en el que midieron la actividad de las piocinas R en el biofilm, demostrando una eficacia parecida, pero no cuantificaron las dosis de piocinas R utilizadas con las que consiguieron dicho efecto, una información fundamental en cualquier estudio cuantitativo.

También hemos podido demostrar que la erradicación del biofilm se puede lograr después de tres dosis de tratamiento con piocinas R. La matriz extracelular que envuelve el biofilm está formada por una serie de diversos componentes que resultan en un entramado altamente hidratado, que aporta estabilidad frente a fuerzas mecánicas y dificulta la entrada de antibióticos y de moléculas del sistema inmunitario²¹. En nuestros resultados se observó una disminución progresiva de bacterias viables. Este efecto fue más intenso después de la primera dosis que con las siguientes. Probablemente en la primera dosis las piocinas R atacaron a las bacterias ubicadas en la superficie del biofilm, las cuales son más accesibles. En las siguientes dosis, el acceso a bacterias profundamente incrustadas en la matriz del biofilm pudo

haber sido más complejo, reduciendo así la eficacia de las piocinas R. Aún así, se consiguió una extraordinaria reducción en la carga bacteriana del biofilm, de aproximadamente 8 log₁₀.

Además, no se produjeron cambios en la sensibilidad de las bacterias viables a las piocinas R. No se seleccionaron mutantes resistentes después de varias dosis de piocinas R (un problema frecuente con antibióticos convencionales), lo que sugiere que la erradicación bacteriana total puede ser posible después de tratamientos secuenciales.

Por último, en la Publicación 2, hemos demostrado la gran actividad de la piocina R1 en nuestro modelo murino de infección pulmonar aguda por el clon de alto riesgo ST175, XDR de *P.aeruginosa*, solamente sensible a amikacina y colistina y prevalente en UCIs de hospitales europeos. Quisimos demostrar si las piocinas R eran activas administrándolas por vía intranasal, y analizar su actividad antes de la infección, como un tratamiento preventivo, y después, en la neumonía aguda como tratamiento curativo.

En la literatura reciente, sólo hay tres trabajos que demuestren la actividad de piocinas en modelos animales de infección por *P. aeruginosa*.^{126,137,138} Scholl y cols.¹²⁶ demostraron la actividad de la piocina R2 en un modelo murino de peritonitis por *P. aeruginosa*, obteniendo muy buena respuesta con las piocinas administradas por vía intravenosa e intraperitoneal. Quizás mejores tasas de supervivencia por vía intraperitoneal¹²⁶. Es lógico pensar que, dado su gran tamaño, podría haber una inadecuada difusión de las piocinas del torrente circulatorio al espacio peritoneal.

En la presente Tesis, las piocinas ofrecen protección frente a una neumonía letal por *P. aeruginosa*. Hemos demostrado que la piocina R1 es suficientemente activa administrándola por vía intranasal y que reduce extraordinariamente la carga bacteriana pulmonar, antes y después de la neumonía. Acorde con nuestros resultados, McCaughey y cols.¹³⁷ demostraron la alta actividad de piocinas distintas a las de tipo R en un modelo murino de infección pulmonar por *P. aeruginosa* administradas por vía intranasal también. Es importante destacar esta vía de administración, ya que McCaughey y cols. demostraron que tras la administración

repetida de la piocina S5 a dosis mucho mayores que su dosis efectiva por vía i.n. o i.p., fueron rutas muy poco inmunogénicas, donde no se generaron IgA y se produjeron sólo pequeñas cantidades de IgG específicas de piocinas, y que, incluso en presencia de estos bajos niveles de anticuerpos, la piocina S5 siguió siendo altamente efectiva en el tratamiento de infecciones bacterianas¹³⁷. Scholl y cols. también demostraron que al administrar dosis terapéuticas de piocinas vía i.p. o i.v. se generan anticuerpos neutralizantes, pero a títulos muy bajos (1:20) los cuales no antagonizaron el tratamiento¹²⁶.

Según nuestros resultados, es notable que la eficacia del tratamiento con piocinas R1 fuese muy superior a la del tratamiento estándar con colistina, administradas por vía intranasal. McCaughey y cols. también compararon el tratamiento de piocinas con otro antipseudomónico comúnmente utilizado en la práctica clínica como es la tobramicina inhalada, observando una mayor actividad con la piocina S5¹³⁷.

El estudio histopatológico realizado en nuestro modelo murino ilustra los resultados expuestos anteriormente, donde se muestran los cambios pulmonares producidos tras la administración de piocinas. El daño histológico observado en los animales que no fueron tratados con piocinas, demuestran la alta virulencia del clon de alto riesgo ST175 de *P. aeruginosa*. Acorde con la reducción de la carga bacteriana descrita, los cambios histopatológicos demuestran la fantástica respuesta de las piocinas R1 en la resolución de una neumonía aguda causada por dicho clon.

En resumen, la presente Tesis amplía nuestro conocimiento de las piocinas tipo R. Además, proporcionamos evidencias de que las piocinas R podrían ser una alternativa terapéutica, sola o como adyuvantes, en el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa*, particularmente en pacientes con FQ, donde sus aislados muestran una alta sensibilidad a estos agentes, y mostrando su efectividad en biofilms, así como en un modelo murino de neumonía por el clon de alto riesgo ST175 de *P. aeruginosa*. El tratamiento con piocinas R puede considerarse una posible alternativa terapéutica en las infecciones por *P.aeruginosa* XDR, donde las alternativas de tratamiento son muy limitadas

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

1. Las piocinas tipo R de origen fágico cumplen muchos de los requisitos necesarios para considerarlas como una nueva alternativa para tratar bacterias MDR/XDR .
2. Los aislados de *P. aeruginosa* procedentes de pacientes con FQ muestran mayor sensibilidad a las piocinas R, probablemente debido a la pérdida del AgO del LPS, o a la evolución en el AgO hacia conformaciones que permitan un mayor acceso a su diana en el LPS.
3. Los aislados de *P. aeruginosa* procedentes de pacientes con FQ pertenecientes a un mismo clon y recogidos a lo largo de ocho años, muestran una sensibilidad a las piocinas R estable en el tiempo, lo que sugiere que las modificaciones en la diana del LPS que confieren resistencia a las piocinas R no ocurren con frecuencia. Esta sensibilidad permanece estable incluso en clones con fenotipos hipermutadores, un efecto que no ocurre con los antibióticos comunes.
4. No se ha observado correlación entre el perfil de sensibilidad a piocinas R y a antibióticos comunes. La condición de multiresistencia antibiótica no afecta a la sensibilidad a las piocinas R, una cuestión importante al plantear a las piocinas como una alternativa terapéutica para aislados con pocas posibilidades de tratamiento.
5. No se han observado interacciones entre antipseudomónicos comunes y piocinas R. Incluso ni con la colistina, que al igual que las piocinas R, tiene su receptor en el LPS, lo que apunta hacia la falta de competencia entre ambas moléculas para alcanzar sus distintas dianas en el LPS. La falta de interacciones permitiría considerar una posible administración conjunta de piocinas R como adyuvantes de las terapias convencionales.
6. Las piocinas R atacan a las bacterias adheridas a una superficie de silicona e impiden el desarrollo de un biofilm de *P.aeruginosa*.

7. Las piocinas R penetran en el biofilm de *P. aeruginosa* y son altamente eficaces en reducir la carga bacteriana dentro de él. Además, no se seleccionan mutantes resistentes después de varias dosis de piocinas R, lo que sugiere que la erradicación bacteriana total puede ser posible después de tratamientos secuenciales.

8. La piocina R1 es altamente eficaz, como tratamiento preventivo y tratamiento curativo en nuestro modelo murino de neumonía aguda por el clon de alto riesgo ST175 de *P. aeruginosa*, al disminuir la carga bacteriana y provocar los cambios histopatológicos que conducen hacia la resolución de la neumonía, obteniendo resultados aún mejores que con el tratamiento estándar con colistina.

9. Las piocinas tipo R podrían suponer una alternativa terapéutica o en combinación con tratamientos estándares en infecciones agudas o crónicas por *P. aeruginosa* multiresistentes, donde las opciones terapéuticas son muy limitadas.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Alhazmi, A. *Pseudomonas aeruginosa* – Pathogenesis and Pathogenic Mechanisms. *Int. J. Biol.* 2015, **7** (2).
- 2 Stover, C. K.; Pham, X. Q.; Erwin, A. L. *et al.* Complete Genome Sequence of *Pseudomonas Aeruginosa* PAO1, an Opportunistic Pathogen. *Nature* 2000, **406** (6799), 959–964.
- 3 Pollack, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In *GL Mandell, R Dolan and JE Bennet. Principles and practices of infectious diseases. Churchill Livingstone. New York, NY; 1995; pp 1820–2003.*
- 4 Harris, A. A.; Goodman, L.; Levin, S. Community-Acquired *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia Associated with the Use of a Home Humidifier. *West. J. Med.* 1984, **141** (4), 521–523.
- 5 Pitt, T.; Kaufmann, M.; Patel, P.; Bengel, L.; Gaskin, S.; Livermore, D. Type Characterisation and Antibiotic Susceptibility of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis in the United Kingdom and the Republic of Ireland. *J Med Microbiol* 1996, **44** (3), 203–210.
- 6 Eifrig, C. W. G.; Scott, I. U.; Flynn Jr, H. W.; Miller, D. Endophthalmitis Caused by *Pseudomonas Aeruginosa*. *Ophthalmology* 2003, **110** (9), 1714–1717.
- 7 Aloush, V.; Navon-Venezia, S.; Seigman-Igra, Y.; Cabili, S.; Carmeli, Y. Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk Factors and Clinical Impact. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, **50** (1), 43 LP – 48.
- 8 Vallés, J.; Mariscal, D. Pneumonia Due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005, **23** (Suppl 3), 30–36.
- 9 European Centre for Disease Prevention and Control. Point Prevalence Survey of Health-Care Associated Infections and Antimicrobial Use in European Acute Care Hospitals. Stockholm: ECDC 2017.
- 10 Gellatly, S. L.; Hancock, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa* : New Insights into Pathogenesis and Host Defenses . *Pathog. Dis.* 2013, **67** (3), 159–173.

- 11 Trouillet, J. L.; Vuagnat, A.; Combes, A.; Kassis, N.; Chastre, J.; Gibert, C. *Pseudomonas aeruginosa* Ventilator-Associated Pneumonia: Comparison of Episodes Due to Piperacillin-Resistant versus Piperacillin-Susceptible Organisms. *Clin. Infect. Dis.* 2002, **34** (8), 1047–1054.
- 12 Kiedrowski, M. R.; Bomberger, J. M. Viral-Bacterial Co-Infections in the Cystic Fibrosis Respiratory Tract. *Front. Immunol.* 2018, **9**, 3067.
- 13 Moreau-Marquis, S.; Stanton, B. A.; O'Toole, G. A. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation in the Cystic Fibrosis Airway. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2008, **21** (4), 595–599.
- 14 Pedersen, S. S.; Høiby, N.; Espersen, F.; Koch, C. Role of Alginate in Infection with Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis. *Thorax* 1992, **47** (1), 6–13.
- 15 Pedersen, S. S.; Kharazmi, A.; Espersen, F.; Høiby, N. *Pseudomonas aeruginosa* Alginate in Cystic Fibrosis Sputum and the Inflammatory Response. *Infect. Immun.* 1990, **58** (10), 3363–3368.
- 16 Mena, A.; Smith, E. E.; Burns, J. L.; Speert, D. P.; Moskowitz, S. M.; Perez, J. L.; Oliver, A. Genetic Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the Airways of Cystic Fibrosis Patients Is Catalyzed by Hypermutation. *J. Bacteriol.* 2008, **190** (24), 7910–7917.
- 17 Blázquez, J. Hypermutation as a Factor Contributing to the Acquisition of Antimicrobial Resistance. *Clin. Infect. Dis.* 2003, **37** (9), 1201–1209.
- 18 Smith, E. E.; Buckley, D. G.; Wu, Z. *et al.* Genetic Adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the Airways of Cystic Fibrosis Patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006, **103** (22), 8487–8492.
- 19 Schaber, J.; Carty, N.; McDonald, N.; Graham, E.; Cheluvappa, R.; Griswold, J.; Hamood, A. Analysis of Quorum Sensing-Deficient Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 2004, **53**, 841–853.
- 20 Donlan, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 2002, **8** (9), 881–890.

- 21 Lieleg, O.; Caldara, M.; Baumgärtel, R.; Ribbeck, K. Mechanical Robustness of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Soft Matter* 2011, **7** (7), 3307–3314.
- 22 Tolker-Nielsen, T.; Molin, S. Spatial Organization of Microbial Biofilm Communities. *Microb Ecol* 2000, **40** (2), 75–84.
- 23 Rasamiravaka, T.; Labtani, Q.; Duez, P.; El Jaziri, M. The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. *Biomed Res. Int.* 2015, **2015**, 759348.
- 24 Hadla, M.; Halabi, M. A. Chapter Three - Effect of Quorum Sensing. In *Fundamentals of Quorum Sensing, Analytical Methods and Applications in Membrane Bioreactors*; Chormey, D. S., Bakırdere, S., Turan, N. B., Engin, G. Ö. B. T.-C. A. C., Eds.; Elsevier, 2018; Vol. 81, pp 95–116.
- 25 Hassett, D. J.; Sutton, M. D.; Schurr, M. J.; Herr, A. B.; Caldwell, C. C.; Matu, J. O. *Pseudomonas aeruginosa* Hypoxic or Anaerobic Biofilm Infections within Cystic Fibrosis Airways. *Trends Microbiol.* 2009, **17** (3), 130–138.
- 26 Macia, M. D.; Rojo-Molinero, E.; Oliver, A. Antimicrobial Susceptibility Testing in Biofilm-Growing Bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014, **20** (10), 981–990.
- 27 Díez Aguilar, M. Nuevas Aportaciones de Fosfomicina Frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Caracterización Fenotípica y Molecular de La Resistencia, Asociaciones Antibióticas y Modelos de Biopelículas., 2016.
- 28 Gupta, V. Metallo Beta Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Expert Opin. Investig. Drugs* 2008, **17** (2), 131–143.
- 29 Zhao, W.-H.; Hu, Z.-Q. β -Lactamases Identified in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit. Rev. Microbiol.* 2010, **36** (3), 245–258.
- 30 Poole, K. Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, **49** (2), 479–487.
- 31 Ramirez, M. S.; Tolmasky, M. E. Aminoglycoside Modifying Enzymes. *Drug Resist. Updat.* 2010, **13** (6), 151–171.

- 32 Lister, P. D.; Wolter, D. J.; Hanson, N. D. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2009, **22** (4), 582–610.
- 33 Livermore, D. M. Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? *Clin. Infect. Dis.* 2002, **34** (5), 634–640.
- 34 Poole, K. *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to the Max. *Front. Microbiol.* 2011, **2**, 65.
- 35 Strateva, T.; Yordanov, D. *Pseudomonas aeruginosa* – a Phenomenon of Bacterial Resistance. *J. Med. Microbiol.* 2009, **58** (9), 1133–1148.
- 36 Queenan, A. M.; Shang, W.; Bush, K.; Flamm, R. K. Differential Selection of Single-Step AmpC or Efflux Mutants of *Pseudomonas aeruginosa* by Using Cefepime, Ceftazidime, or Ceftobiprole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010, **54** (10), 4092–4097.
- 37 Moya, B.; Dötsch, A.; Juan, C.; Blázquez, J.; Zamorano, L.; Haussler, S.; Oliver, A. Beta-Lactam Resistance Response Triggered by Inactivation of a Nonessential Penicillin-Binding Protein. *PLoS Pathog.* 2009, **5** (3), e1000353–e1000353.
- 38 Cavallo, J. D.; Hocquet, D.; Plesiat, P.; Fabre, R.; Roussel-Delvallez, M.; GERPA, on behalf of. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to Antimicrobials: A 2004 French Multicentre Hospital Study. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007, **59** (5), 1021–1024.
- 39 Dubois, V.; Arpin, C.; Dupart, V. *et al.* β -Lactam and Aminoglycoside Resistance Rates and Mechanisms among *Pseudomonas aeruginosa* in French General Practice (Community and Private Healthcare Centres). *J. Antimicrob. Chemother.* 2008, **62** (2), 316–323.
- 40 Jalal, S.; Ciofu, O.; Hoiby, N.; Gotoh, N.; Wretling, B. Molecular Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000, **44** (3), 710–712.

- 41 Livermore, D. M. Of *Pseudomonas*, Porins, Pumps and Carbapenems. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001, **47** (3), 247–250.
- 42 Pirnay, J.-P.; Vos, D. De; Mossialos, D.; Vanderkelen, A.; Cornelis, P.; Zizi, M. Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* OprD Gene from Clinical and Environmental Isolates. *Environ. Microbiol.* 2002, **4** (12), 872–882.
- 43 Hancock, R. E. W. Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and Other Nonfermentative Gram-Negative Bacteria. *Clin. Infect. Dis.* 1998, **27** (Supplement_1), S93–S99.
- 44 Livermore, D. M.; Woodford, N. The beta;-Lactamase Threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol.* 2006, **14** (9), 413–420.
- 45 Walsh, T. R.; Toleman, M. A.; Poirel, L.; Nordmann, P. Metallo-Beta-Lactamases: The Quiet before the Storm? *Clin. Microbiol. Rev.* 2005, **18** (2), 306–325.
- 46 European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of Antimicrobial Resistance in Europe. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). ECDC 2017.
- 47 Kohlenberg, A.; Weitzel-Kage, D.; van der Linden, P. *et al.* Outbreak of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infection in a Surgical Intensive Care Unit. *J. Hosp. Infect.* 2010, **74** (4), 350–357.
- 48 Naze, F.; Jouen, E.; Randriamahazo, R. T. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Outbreak Linked to Mineral Water Bottles in a Neonatal Intensive Care Unit: Fast Typing by Use of High-Resolution Melting Analysis of a Variable-Number Tandem-Repeat Locus. *J. Clin. Microbiol.* 2010, **48** (9), 3146–3152.
- 49 Sheu, C.-C.; Chang, Y.-T.; Lin, S.-Y.; Chen, Y.-H.; Hsueh, P.-R. Infections Caused by Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: An Update on Therapeutic Options. *Front. Microbiol.* 2019, **10**, 80.
- 50 Goossens, H. Susceptibility of Multi-Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Intensive Care Units: Results from the European MYSTIC Study Group. *Clin.*

- Microbiol. Infect.* 2003, **9** (9), 980–983.
- 51 Comeau, A. M.; Hatfull, G. F.; Krisch, H. M.; Lindell, D.; Mann, N. H.; Prangishvili, D. Exploring the Prokaryotic Virosphere. *Res. Microbiol.* 2008, **159** (5), 306–313.
- 52 Saha, D.; Mukherjee, R. Ameliorating the Antimicrobial Resistance Crisis: Phage Therapy. *IUBMB Life* 2019, **71** (7), 781–790.
- 53 Leppänen, M.; Sundberg, L.-R.; Laanto, E.; de Freitas Almeida, G. M.; Papponen, P.; Maasilta, I. J. Imaging Bacterial Colonies and Phage–Bacterium Interaction at Sub-Nanometer Resolution Using Helium-Ion Microscopy. *Adv. Biosyst.* 2017, **1** (8), 1700070.
- 54 Spellberg, B.; Guidos, R.; Gilbert, D. *et al.* The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections: A Call to Action for the Medical Community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2008, **46** (2), 155–164.
- 55 Samson, I. A New Class of Antimycobacterial Drugs: The Diarylquinolines. *Thorax* 2005, **60** (6), 495 LP – 495.
- 56 Hover, B. M.; Kim, S.-H.; Katz, M. *et al.* Culture-Independent Discovery of the Malacidins as Calcium-Dependent Antibiotics with Activity against Multidrug-Resistant Gram-Positive Pathogens. *Nat. Microbiol.* 2018, **3** (4), 415–422.
- 57 Ling, L. L.; Schneider, T.; Peoples, A. J. *et al.* A New Antibiotic Kills Pathogens without Detectable Resistance. *Nature* 2015, **517**, 455.
- 58 Fair, R. J.; Tor, Y. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspect. Medicin. Chem.* 2014, **6**, 25–64.
- 59 Heinz, E.; Ejaz, H.; Scott, J. B. *et al.* Emergence of Carbapenem, Beta-Lactamase Inhibitor and Cefoxitin Resistant Lineages from a Background of ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* Highlights Different Evolutionary Mechanisms. *bioRxiv* 2018, 283291.
- 60 Twort, F. W. Further Investigations on the Nature of Ultra-Microscopic Viruses and Their Cultivation. *J. Hyg. (Lond)*. 1936, **36** (2), 204–235.

- 61 D'Herelle, F. On an Invisible Microbe Antagonistic toward Dysenteric Bacilli: Brief Note by Mr. F. D'Herelle, Presented by Mr. Roux. *Res. Microbiol.* 2007, **158** (7), 553–554.
- 62 Nobrega, F. L.; Costa, A. R.; Kluskens, L. D.; Azeredo, J. Revisiting Phage Therapy: New Applications for Old Resources. *Trends Microbiol.* 2015, **23** (4), 185–191.
- 63
- 64 Abedon, S. T.; Kuhl, S. J.; Blasdel, B. G.; Kutter, E. M. Phage Treatment of Human Infections. *Bacteriophage* 2011, **1** (2), 66–85.
- 65 Chanishvili N. *A Literature Review of the Practical Application of Bacteriophage Research*. Hauppauge, New York: Nova Science Publishers; 2012.
- 66 Hoyle, N.; Zhvaniya, P.; Balarjishvili, N. *et al.* Phage Therapy against *Achromobacter xylosoxidans* Lung Infection in a Patient with Cystic Fibrosis: A Case Report. *Res. Microbiol.* 2018, **169** (9), 540–542.
- 67 Zhvania, P.; Hoyle, N. S.; Nadareishvili, L.; Nizharadze, D.; Kutateladze, M. Phage Therapy in a 16-Year-Old Boy with Netherton Syndrome. *Front. Med.* 2017, **4**, 94.
- 68 Międzybrodzki; Borysowski, J.; Kłak, M. *et al.* In Vivo Studies on the Influence of Bacteriophage Preparations on the Autoimmune Inflammatory Process. *Biomed Res. Int.* 2017, **2017**, 3612015.
- 69 Borysowski, J.; Międzybrodzki; Wierzbicki, P. *et al.* A3R Phage and *Staphylococcus aureus* Lysate Do Not Induce Neutrophil Degranulation. *Viruses* 2017, **9** (2), 36.
- 70 Łusiak-Szelachowska M.; Żaczek M.; Weber-Dąbrowska B. *et al.* Antiphage Activity of Sera during Phage Therapy in Relation to Its Outcome. *Future Microbiol.* 2016, **12** (2), 109–117.
- 71 Abedon, S. T.; García, P.; Mullany, P.; Aminov, R. Editorial: Phage Therapy: Past, Present and Future. *Front. Microbiol.* 2017, **8**, 981.
- Pires, D. P.; Cleto, S.; Sillankorva, S.; Azeredo, J.; Lu, T. K. Genetically Engineered

- Phages: A Review of Advances over the Last Decade. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2016, **80** (3), 523–543.
- 72 Endersen, L.; O’Mahony, J.; Hill, C. *et al.* Phage Therapy in the Food Industry. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2014, **5** (1), 327–349.
- 73 Jennes, S.; Merabishvili, M.; Soentjens, P. *et al.* Use of Bacteriophages in the Treatment of Colistin-Only-Sensitive *Pseudomonas aeruginosa* Septicaemia in a Patient with Acute Kidney Injury—a Case Report. *Crit. Care* 2017, **21** (1), 129.
- 74 Bruttin, A.; Brüssow, H. Human Volunteers Receiving *Escherichia coli* Phage T4 Orally: A Safety Test of Phage Therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, **49** (7), 2874–2878.
- 75 Górski A.; Międzybrodzki R.; Weber-Dąbrowska B. *et al.* Phage Therapy: Combating Infections with Potential for Evolving from Merely a Treatment for Complications to Targeting Diseases. *Front. Microbiol.* 2016, **7**, 1515.
- 76 Lu, T. K.; Koeris, M. S. The next Generation of Bacteriophage Therapy. *Curr. Opin. Microbiol.* 2011, **14** (5), 524–531.
- 77 Cisek, A. A.; Dąbrowska, I.; Gregorczyk, K. P.; Wyżewski, Z. Phage Therapy in Bacterial Infections Treatment: One Hundred Years After the Discovery of Bacteriophages. *Curr. Microbiol.* 2017, **74** (2), 277–283.
- 78 Brüssow, H. Phage Therapy for the Treatment of Human Intestinal Bacterial Infections: Soon to Be a Reality? *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2017, **11** (9), 785–788.
- 79 Viertel, T. M.; Ritter, K.; Horz, H.-P. Viruses versus Bacteria—Novel Approaches to Phage Therapy as a Tool against Multidrug-Resistant Pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.* 2014, **69** (9), 2326–2336.
- 80 Cooper, R. A.; Bjarnsholt, T.; Alhede, M. Biofilms in Wounds: A Review of Present Knowledge. *J. Wound Care* 2014, **23** (11), 570–582.
- 81 Azeredo, J.; Sutherland, I. The Use of Phages for the Removal of Infectious

- Biofilms. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2008, pp 261–266.
- 82 Criscuolo, E.; Spadini, S.; Lamanna, J.; Ferro, M.; Burioni, R. Bacteriophages and Their Immunological Applications against Infectious Threats. *J. Immunol. Res.* 2017, **2017**, 3780697.
- 83 Fong, S. A.; Drilling, A.; Morales, S. *et al.* Activity of Bacteriophages in Removing Biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Chronic Rhinosinusitis Patients. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017, **7**, 418.
- 84 Mendes, J. J.; Leandro, C.; Corte-Real, S. *et al.* Wound Healing Potential of Topical Bacteriophage Therapy on Diabetic Cutaneous Wounds. *Wound Repair Regen.* 2013, **21** (4), 595–603.
- 85 Fish, R.; Kutter, E.; Wheat, G.; Blasdel, B.; Kutateladze, M.; Kuhl, S. Compassionate Use of Bacteriophage Therapy for Foot Ulcer Treatment as an Effective Step for Moving Toward Clinical Trials. In *Bacteriophage Therapy: From Lab to Clinical Practice*; Azeredo, J., Sillankorva, S., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2018; pp 159–170.
- 86 Markoishvili, K.; Tsitlanadze, G.; Katsarava, R.; Glenn, J.; Sulakvelidze, A. A Novel Sustained-Release Matrix Based on Biodegradable Poly(Ester Amide)s and Impregnated with Bacteriophages and an Antibiotic Shows Promise in Management of Infected Venous Stasis Ulcers and Other Poorly Healing Wounds. *Int. J. Dermatol.* 2002, **41** (7), 453–458.
- 87 Drulis-Kawa, Z.; Majkowska-Skrobek, G.; Maciejewska, B. *et al.* Learning from Bacteriophages - Advantages and Limitations of Phage and Phage-Encoded Protein Applications. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2012, **13** (8), 699–722.
- 88 Vandamme, E. J. Phage Therapy and Phage Control: To Be Revisited Urgently!! *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2014, **89** (3), 329–333.
- 89 Ormälä, A.-M.; Jalasvuori, M. Phage Therapy: Should Bacterial Resistance to Phages Be a Concern, Even in the Long Run? *Bacteriophage* 2013, **3** (1), e24219–e24219.

- 90 Loc-Carrillo, C.; Abedon, S. T. Pros and Cons of Phage Therapy. *Bacteriophage* 2011, **1** (2), 111–114.
- 91 Hyman, P.; Abedon, S. T. B. T.-A. in A. M. Chapter 7 - Bacteriophage Host Range and Bacterial Resistance. In *Advances in Applied Microbiology*; Academic Press, 2010; Vol. 70, pp 217–248.
- 92 Labrie, S. J.; Samson, J. E.; Moineau, S. Bacteriophage Resistance Mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010, **8**, 317.
- 93 Kutter, E.; Vos, D. De; Gvasalia, G.; Alavidze, Z.; Gogokhia, L.; Abedon, S. K. and S. T. Phage Therapy in Clinical Practice: Treatment of Human Infections. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2010, pp 69–86.
- 94 Gill, J. J.; Hyman, P. Phage Choice , Isolation , and Preparation for Phage Therapy. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2010, **11**, 2–14.
- 95 Chan, B. K.; Abedon, S. T.; Loc-Carrillo, C. Phage Cocktails and the Future of Phage Therapy. *Future Microbiol.* 2013, **8** (6), 769–783.
- 96 Goodridge, L. D. Designing Phage Therapeutics. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2010, pp 15–27.
- 97 Łusiak-Szelachowska, M.; Żaczek, M.; Weber-Dąbrowska, B. *et al.* Phage Neutralization by Sera of Patients Receiving Phage Therapy. *Viral Immunol.* 2014, **27** (6), 295–304.
- 98 Kim, B.-O.; Kim, E. S.; Yoo, Y.-J. *et al.* Phage-Derived Antibacterials: Harnessing the Simplicity, Plasticity, and Diversity of Phages. *Viruses* 2019, **11** (3), 268.
- 99 Kerr, B.; Riley, M. A.; Feldman, M. W.; Bohannan, B. J. M. Local Dispersal Promotes Biodiversity in a Real-Life Game of Rock–Paper–Scissors. *Nature* 2002, **418** (6894), 171–174.
- 100 Riley, M. A.; Goldstone, C. M.; Wertz, J. E.; Gordon, D. A Phylogenetic Approach to Assessing the Targets of Microbial Warfare. *J. Evol. Biol.* 2003, **16** (4), 690–697.

- 101 Klaenhammer, T. R. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Biochimie* 1988, **70** (3), 337–349.
- 102 Jacob, F. Biosynthèse Induite et Mode d'action d'une Pyocine, Antibiotique de *Pseudomonas pyocyanea*. *Ann. Inst. Pasteur* 1954, **86**, 149–160.
- 103 Kuroda, K.; Kageyama, M. Biochemical Properties of a New Flexuous Bacteriocin, Pyocin FI, Produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biochem.* 1979, **85** (1), 7–19.
- 104 Kageyama, M.; Ikeda, K.; Egami, F. Studies of a Pyocin: III. Biological Properties of the Pyocin. *J. Biochem.* 1964, **55** (1), 59–64.
- 105 Scholl, D. Phage Tail-Like Bacteriocins. *Annu. Rev. Virol.* 2017, **4** (1), 453–467.
- 106 Caroline Blackwell, C.; Winstanley, F. P.; Telfer Brunton, W. A. Sensitivity of Thermophilic *Campylobacters* to R-Type Pyocines of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* 1982, **15**, 247–251.
- 107 Morse, S. a; Vaughan, P.; Johnson, D.; Iglewski, B. H. Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by a Bacteriocin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1976, **10** (2), 354–362.
- 108 Campagnari, A. A.; Karalus, R.; Apicella, M. *et al.* Use of Pyocin to Select a *Haemophilus ducreyi* Variant Defective in Lipooligosaccharide Biosynthesis. *Infect. Immun.* 1994, **62** (6), 2379–2386.
- 109 Jones, L. F.; Thomas, E. T.; Stinnett, J. D.; Gilardi, G. L.; Farmer 3rd, J. J. Pyocin Sensitivity of *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol.* 1974, **27** (1), 288–289.
- 110 Williams, S. R.; Gebhart, D.; Martin, D. W.; Scholl, D. Retargeting R-Type Pyocins to Generate Novel Bactericidal Protein Complexes. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, **74** (12), 3868–3876.
- 111 Shinomiya, T.; Shiga, S.; Kageyama, M. Genetic Determinant of Pyocin R2 in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. I. Localization of the Pyocin R2 Gene Cluster between the TrpCD and TrpE Genes. *Mol. Gen. Genet.* 1983, **189**, 375–381.
- 112 Matsui, H.; Sano, Y.; Ishihara, H.; Shinomiya, T. Regulation of Pyocin Genes in

- Pseudomonas aeruginosa* by Positive (*prtN*) and Negative (*prtR*) Regulatory Genes. *J. Bacteriol.* 1993, **175** (5), 1257–1263.
- 113 Nakayama, K.; Takashima, K.; Ishihara, H. *et al.* The R-Type Pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* Is Related to P2 Phage, and the F-Type Is Related to Lambda Phage. *Mol. Microbiol.* 2000, **38** (2), 213–231.
- 114 Sano, Y.; Kageyama, M. The Sequence and Function of the RecA Gene and Its Protein in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Mol. Gen. Genet.* 1987, **208**, 412–419.
- 115 Michel-Briand, Y.; Baysse, C. The Pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 2002, **84** (5–6), 499–510.
- 116 Browning, C.; Shneider, M. M.; Bowman, V. D.; Schwarzer, D.; Leiman, P. G. Phage Pierces the Host Cell Membrane with the Iron-Loaded Spike. *Structure* 2012, **20** (2), 326–339.
- 117 Ge, P.; Scholl, D.; Leiman, P. G.; Yu, X.; Miller, J. F.; Zhou, Z. H. Atomic Structures of a Bactericidal Contractile Nanotube in Its Pre- and Postcontraction States. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2015, **22** (5), 377–382.
- 118 Köhler, T.; Donner, V.; Van Delden, C. Lipopolysaccharide as Shield and Receptor for R-Pyocin-Mediated Killing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 2010, **192** (7), 1921–1928.
- 119 Uratani, Y.; Hoshino, T. Pyocin R1 Inhibits Active Transport in *Pseudomonas aeruginosa* and Depolarizes Membrane Potential. *J. Bacteriol.* 1984, **157** (2), 632–636.
- 120 Ikeda, K.; Egami, F. Receptor Substance for Pyocin R: I. Partial Purification and Chemical Properties. *J. Biochem.* 1969, **65** (4), 603–609.
- 121 King, J. D.; Kocíncová, D.; Westman, E. L.; Lam, J. S. Review: Lipopolysaccharide Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immun.* 2009, **15** (5), 261–312.
- 122 Lam, J. S.; Taylor, V. L.; Islam, S. T.; Hao, Y.; Kocíncová, D. Genetic and Functional Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide. *Front. Microbiol.*

- 2011, **2**, 118.
- 123 Bird, T.; Griebel, H. Pyocin Antibiosis in Chick Embryos. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1969, **9**, 495–498.
- 124 Merrikin, D. J.; Terry, C. S. Use of Pyocin 78-C2 in the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Mice. *Appl. Microbiol.* 1972, **23** (1), 164–165.
- 125 Haas, H.; Sacks, T.; Saltz, N. Protective Effect of Pyocin against Lethal *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Mice. *J. Infect. Dis.* 1974, **129** (4), 470–472.
- 126 Scholl, D.; Martin, D. W. Antibacterial Efficacy of R-Type Pyocins towards *Pseudomonas aeruginosa* in a Murine Peritonitis Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, **52** (5), 1647–1652.
- 127 Karen C., C.; John G., B. Biology of *Clostridium difficile*: Implications for Epidemiology and Diagnosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 2011, **65** (1), 501–521.
- 128 Gorkiewicz, G. Nosocomial and Antibiotic-Associated Diarrhoea Caused by Organisms Other than *Clostridium difficile*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2009, **33**, S37–S41.
- 129 Qin, J.; Li, Y.; Cai, Z. *et al.* A Metagenome-Wide Association Study of Gut Microbiota in Type 2 Diabetes. *Nature* 2012, **490**, 55.
- 130 Ni, J.; Wu, G. D.; Albenberg, L.; Tomov, V. T. Gut Microbiota and IBD: Causation or Correlation? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2017, **14** (10), 573–584.
- 131 Henao-Mejia, J.; Elinav, E.; Jin, C. *et al.* Inflammasome-Mediated Dysbiosis Regulates Progression of NAFLD and Obesity. *Nature* 2012, **482** (7384), 179–185.
- 132 Scher, J. U.; Abramson, S. B. The Microbiome and Rheumatoid Arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2011, **7** (10), 569–578.
- 133 Scholl, D.; Cooley, M.; Williams, S. R.; Gebhart, D.; Martin, D.; Bates, A.; Mandrell, R. An Engineered R-Type Pyocin Is a Highly Specific and Sensitive Bactericidal Agent for the Food-Borne Pathogen *Escherichia coli* O157:H7.

- Antimicrob. Agents Chemother.* 2009, **53** (7), 3074–3080.
- 134 Scholl, D.; Gebhart, D.; Williams, S. R.; Bates, A.; Mandrell, R. Genome Sequence of *E. coli* O104:H4 Leads to Rapid Development of a Targeted Antimicrobial Agent against This Emerging Pathogen. *PLoS One* 2012, **7** (3), e33637–e33637.
- 135 Ritchie, J. M.; Greenwich, J. L.; Davis, B. M. *et al.* K. An *Escherichia coli* O157-Specific Engineered Pyocin Prevents and Ameliorates Infection by *E. coli* O157:H7 in an Animal Model of Diarrheal Disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011, **55** (12), 5469–5474.
- 136 Gebhart, D.; Lok, S.; Clare, S. *et al.* A Modified R-Type Bacteriocin Specifically Targeting *Clostridium difficile* Prevents Colonization of Mice without Affecting Gut Microbiota Diversity. *MBio* 2015, **6** (2), e02368-14.
- 137 McCaughey, L. C.; Ritchie, N. D.; Douce, G. R.; Evans, T. J.; Walker, D. Efficacy of Species-Specific Protein Antibiotics in a Murine Model of Acute *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection. *Sci. Rep.* 2016, **6** (April), 30201.
- 138 McCaughey, L. C.; Josts, I.; Grinter, R. *et al.* Discovery, Characterisation and in Vivo Activity of Pyocin SD2, a Protein Antibiotic from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J.* 2016, **0** (2016), 2345–2358.
- 139 López-Causapé, C.; Rojo-Molinero, E.; Mulet, X. *et al.* Clonal Dissemination, Emergence of Mutator Lineages and Antibiotic Resistance Evolution in *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Chronic Lung Infection. *PLoS One* 2013, **8** (8), e71001–e71001.
- 140 Cabot, G.; Ocampo-Sosa, A. A.; Domínguez, M. A. *et al.* Genetic Markers of Widespread Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* High-Risk Clones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, **56** (12), 6349–6357.
- 141 Riley, M. A.; Gordon, D. M. The Ecological Role of Bacteriocins in Bacterial Competition. *Trends Microbiol.* 1999, **7** (3), 129–133.
- 142 Marvig, R. L.; Sommer, L. M.; Molin, S.; Johansen, H. K. Convergent Evolution and Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* within Patients with Cystic Fibrosis.

- Nat. Genet.* 2014, **47**, 57.
- 143 Jelsbak, L.; Johansen, H. K.; Frost, A.-L. *et al.* Molecular Epidemiology and Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* Populations in Lungs of Cystic Fibrosis Patients. *Infect. Immun.* 2007, **75** (5), 2214–2224.
- 144 Ghoul, M.; West, S. A.; Johansen, H. K. *et al.* Bacteriocin-Mediated Competition in Cystic Fibrosis Lung Infections. *Proceedings. Biol. Sci.* 2015, **282** (1814), 20150972.
- 145 Ernst, R. K.; D’Argenio, D. A.; Ichikawa, J. K. *et al.* Genome Mosaicism Is Conserved but Not Unique in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from the Airways of Young Children with Cystic Fibrosis. *Environ. Microbiol.* 2003, **5** (12), 1341–1349.
- 146 Eberl, L.; Tümmler, B. *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in Cystic Fibrosis: Genome Evolution, Interactions and Adaptation. *Int. J. Med. Microbiol.* 2004, **294** (2), 123–131.
- 147 Römling, U.; Fiedler, B.; Boßhammer, J.; Grothues, D.; Greipel, J.; von der Hardt, H.; Tümmler, B. Epidemiology Of Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Infections In Cystic Fibrosis. *J. Infect. Dis.* 1994, **170** (6), 1616–1621.
- 148 Tredgett, M. W.; Doherty, C.; Govan, J. R. W. Incidence of Common Pyocin Types of *Pseudomonas aeruginosa* from Patients with Cystic Fibrosis and Chronic Airways Diseases. *J. Med. Microbiol.* 1990, **32** (3), 169–172.
- 149 Hancock, R. E.; Mutharia, L. M.; Chan, L. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis: A Class of Serum-Sensitive, Nontypable Strains Deficient in Lipopolysaccharide O Side Chains. *Infect. Immun.* 1983, **42** (1), 170–177.
- 150 Penketh, A.; Pitt, T.; Roberts, D.; Hodson, M. E.; Batten, J. C. The Relationship of Phenotype Changes in *Pseudomonas aeruginosa* to the Clinical Condition of Patients with Cystic Fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1983, **127** (5), 605–608.
- 151 Penterman, J.; Singh, P. K.; Walker, G. C. Biological Cost of Pyocin Production

- during the SOS Response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 2014, **196** (18), 3351–3359.
- 152 Tzouvelekis, L.; Tumah, H.; Malliar, K.; Legakis, N. Relationship of Antibiotic Resistance Phenotype to the R-Pyocin Susceptibility Pattern in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Chemother* 1989, **1** (4), 226–230.
- 153 Bialvaei, A. Z.; Samadi Kafil, H. Colistin, Mechanisms and Prevalence of Resistance. *Curr. Med. Res. Opin.* 2015, **31** (4), 707–721.
- 154 Bulitta, J. B.; Ly, N. S.; Landersdorfer, C. B. *et al.* Two Mechanisms of Killing of *Pseudomonas aeruginosa* by Tobramycin Assessed at Multiple Inocula via Mechanism-Based Modeling. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015, **59** (4), 2315–2327.
- 155 Beceiro, A.; Moreno, A.; Fernández, N. *et al.* Biological Cost of Different Mechanisms of Colistin Resistance and Their Impact on Virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014, **58** (1), 518–526.
- 156 Falagas, M. E.; Rafailidis, P. I.; Matthaïou, D. K. Resistance to Polymyxins: Mechanisms, Frequency and Treatment Options. *Drug Resist. Updat.* 2010, **13** (4), 132–138.
- 157 Cerqueira, L.; Nicolau, A.; Azevedo, N.; Vieira, M.; Oliveira, J. Biofilm Formation with Mixed Cultures of *Pseudomonas aeruginosa*/*Escherichia coli* on Silicone Using Artificial Urine to Mimic Urinary Catheters. *Biofouling* 2013, **29**, 829–840.
- 158 Francolini, I.; Vuotto, C.; Piozzi, A.; Donelli, G. Antifouling and Antimicrobial Biomaterials: An Overview. *Apmis* 2017, **125** (4), 392–417.
- 159 Jing, H.; Sahle-Demessie, E.; Sorial, G. Inhibition of Biofilm Growth on Polymer-MWCNTs Composites and Metal Surfaces. *Sci. Total Environ.* 2018, **15** (633), 167–178.
- 160 Kim, D. J.; Park, J. H.; Chang, M. Species-Specific Characteristics of the Biofilm Generated in Silicone Tube: An in Vitro Study. *BMC Ophthalmol.* 2018, **18** (1), 1–

- 6.
- 161 Smith, K.; Martin, L.; Rinaldi, A.; Rajendran, R.; Ramage, G.; Walker, D. Activity of Pyocin S2 against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, **56** (3), 1599–1601.
- 162 Oluyombo, O.; Penfold, C. N.; Diggle, S. P. Competition in Biofilms between Cystic Fibrosis Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Is Shaped by R-Pyocins. *MBio* 2019, **10** (1), e01828-18.
- 163 Redero, M.; Lopez-Causapé, C.; Aznar, J.; Oliver, A.; Blázquez, J.; Prieto, A. I. Susceptibility to R-Pyocins of *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from Cystic Fibrosis Patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 2018, **73** (July), 2770–2776.

CAPÍTULO VIII

ANEXOS

ANEXO I: Producción científica adicional

Participación en congresos:

- Efficacy of R1-pyocin in a murine model of acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. **Mar Redero**, Antonio Oliver, Jesús Blázquez y Ana Isabel Prieto. **28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Madrid, España (2018).
- Hipersusceptibilidad to R-pyocins of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from cystic fibrosis patients. **Mar Redero**, Carla López-Causapé, José Antonio Lepe, Antonio Oliver, Jesús Blázquez y Ana Isabel Prieto. **26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Amsterdam, Holanda (2016).
- High effect of R-type pyocins on susceptible and multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Mar Redero**, Carla López-Causapé, Jana Basas, Joan Gavaldà, Antonio Oliver, Jesús Blázquez y Anabel Prieto. **XI Reunión del grupo especializado de Microbiología Molecular de la Sociedad Española de Microbiología**, Sevilla (2016).
- Killing effect of R-pyocins on susceptible and XDR *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Mar Redero**, Carla López-Causapé, Jana Basas, Joan Gavaldà, Antonio Oliver, Jesús Blázquez y Anabel Prieto. **X Jornadas Científica**, Sevilla (2016).
- Hipersensibilidad a piocinas de tipo R en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes con fibrosis quística. **Mar Redero**, Carla López-Causapé, José Antonio Lepe, Antonio Oliver, Jesús Blázquez y Ana Isabel Prieto. **XIX Congreso Nacional de la SEIMC**, Sevilla (2015).

Conferencias:

→ **Título:** Uso de Piocinas, una variante de la Fagoterapia: evaluación de su actividad en infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* XDR.

Evento científico: Seminario Programa de Enfermedades Infecciosas y del Sistema Inmunitario.

Organizador: Instituto de Biomedicina de Sevilla.

Centro: Instituto de Biomedicina de Sevilla.

Fecha: 18 de marzo de 2019.

→ **Título:** Piocinas, la nueva era antimicrobiana post-antibiótica.

Evento científico: Seminario Enfermedades infecciosas.

Organizador: Instituto de Recerca, Hospital Vall d`Hebrón, Barcelona.

Centro: Instituto de Recerca, Hospital Vall d`Hebrón, Barcelona.

Fecha: 20 de enero de 2016

ANEXO II: Material suplementario

Supplementary material for:

Susceptibility to R-pyocins of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from cystic fibrosis patients

Mar Redero¹⁻³, Carla López-Causape⁴, Javier Aznar¹⁻³, Antonio Oliver⁴, Jesús Blázquez^{1,2,5†} and Ana I. Prieto^{1,2*†}

¹Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Avda. Manuel Siurot s/n, 41013 Seville, Spain

²Unidad de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain

³Universidad de Sevilla, Seville, Spain

⁴Servicio de Microbiología y Unidad de Investigación, Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca, Spain

⁵Centro Nacional de Biotecnología (CNB), Madrid, Spain

TABLE S1. R-pyocin susceptibility of clinical isolates

Strain ID	Clonal Origin	Lysis by*:				Source**	O-TYPE	Reference
		R1-pyocin	R2-pyocin	R5-pyocin	R1/R2/R5-pyocin			
FQSE05-0403	ST-1108	+	-	-	+	CF	O1	139
FQSE05-0704	ST-299	-	-	-	-	CF	NA	139
FQSE05-0305	ST-1072	+	+	-	+	CF	O1	139
FQSE05-0807	ST-155	-	+	+	+	CF	O6	139
FQSE06-1003	ST-274	+	+	+	+	CF	NA	139
FQSE11-0603	ST-701	+	+	+	+	CF	NA	139
FQSE11-0608	ST-254	+	+	-	+	CF	O1	139
FQSE12-0603	ST-299	+	+	+	+	CF	NA	139
FQSE12-1007	ST-146	-	+	+	+	CF	NA	139
FQSE16-0803	ST-1073	+	+	+	+	CF	O1	139
FQSE21-1003	ST-1088	+	+	+	+	CF	NA	139
FQSE21-0505	ST-1109	-	+	+	+	CF	O1	139
FQSE24-0304	ST-1089	+	+	+	+	CF	NA	139
FQSE28-1006	ST-1071	+	+	+	+	CF	NA	139
FQSE01-1205	ST-1837	+	-	+	+	CF	NA	139
FQSE02-1103-2	ST-1838	+	+	+	+	CF	NA	139
FQSE04-0213-4	ST-285	+	+	+	+	CF	NA	139
FQSE07-0810	ST-308	+	-	-	+	CF	O11	139
FQSE08-0503	ST-253	-	-	-	-	CF	O10	139
FQSE09-0213	ST-1839	-	-	-	-	CF	O5	139
FQSE13-0807-2	ST-1527	-	+	+	+	CF	NA	139
FQSE14-0703	ST-1840	+	+	+	+	CF	NA	139

FQSE16-0413	ST-1613	-	-	+	+	CF	O2	139
FQSE17-0612	ST-1841	-	-	-	-	CF	O2	139
FQSE20-0608-3	ST-505	-	-	-	-	CF	NA	139
FQSE23-0209-2	ST-1339	+	+	-	+	CF	O11	139
FQSE25-0208	ST-277	-	-	-	-	CF	O2	139
FQSE26-0406-2	ST-1842	+	+	+	+	CF	NA	139
FQSE29-0313-2	ST-606	-	-	+	+	CF	O13	139
FQSE30-0210-2	ST-938	-	-	-	-	CF	O11	139
FQSE31-0712	ST-312	+	+	+	+	CF	O1	139
FQSE32-1208	ST-1637	+	+	+	+	CF	O1	139
FQSE36-1111	ST-386	+	+	+	+	CF	O5	139
FQSE39-0910	ST-198	+	+	+	+	CF	O3	139
PAmb31	ST-1194	-	-	-	-	Bloodstream	O7	140
PAmb43	ST-175	+	-	-	+	Bloodstream	O4	140
PAmb62	ST-1111	-	+	+	+	Bloodstream	O6	140
PAmb97	ST-233	-	+	+	+	Bloodstream	O6	140
PAmb132	ST-1177	-	+	+	+	Bloodstream	O6	140
PAmb148	ST-274	+	+	+	+	Bloodstream	NA	140
PAmb191	ST-17	+	+	+	+	Bloodstream	O1	140
PAmb204	ST-377	-	-	-	-	Bloodstream	O7	140
PAmb205	ST-244	-	-	-	-	Bloodstream	O12	140
PAmb238	ST-111	-	-	-	-	Bloodstream	O12	140
PAmb37	ST-699	-	-	-	-	Bloodstream	O5	140
PAmb39	ST-1110	-	-	-	-	Bloodstream	NA	140
PAmb54	ST-179	-	+	+	+	Bloodstream	O6	140
PAmb60	ST-262	+	+	-	+	Bloodstream	O6	140

PAmb91	ST-1112	-	-	-	-	Bloodstream	O8	140
PAmb112	ST-179	-	+	+	+	Bloodstream	O6	140
PAmb113	ST-313	-	-	-	-	Bloodstream	O1	140
PAmb120	ST-1114	-	-	+	+	Bloodstream	O1	140
PAmb122	ST-511	+	+	+	+	Bloodstream	O7	140
PAmb129	ST-897	-	-	-	-	Bloodstream	NA	140
PAmb152	ST-1180	+	+	+	+	Bloodstream	O6	140
PAmb180	ST-281	+	+	+	+	Bloodstream	O6	140
PAmb181	ST-385	-	+	+	+	Bloodstream	O6	140
PAmb185	ST-1192	-	-	-	-	Bloodstream	O7	140
PAmb187	ST-381	-	-	-	-	Bloodstream	NA	140
PAmb199	ST-446	+	-	-	+	Bloodstream	O15	140
PAmb355	ST-244	-	-	-	-	Bloodstream	O12	140
PAmb396	ST-235	-	-	-	-	Bloodstream	O11	140
PAmb527	ST-253	-	-	-	-	Bloodstream	O10	140
PAmb667	ST-224	-	-	-	-	Bloodstream	O12	140

* +, lysis; -, non lysis. Lysed by R1, R2 or R5. R1/R2/R5 refers to lysis by any of the three R-pyocins. NA; no agglutination. **CF, cystic fibrosis.

TABLE S2. R-pyocin susceptibility of clinical isolates from the Hospital Virgen del Rocío

Strain ID	Lysis by*:				Source**	Reference
	R1-pyocin	R2-pyocin	R5-pyocin	R1/R2/R5-pyocin		
PAVR01	-	-	-	-	Sputum	163
PAVR02	+	-	+	+	Sputum	163
PAVR03	-	-	-	-	Sputum	163
PAVR04	-	-	-	-	Skin burn	163
PAVR05	+	-	-	+	Bronchial aspirate	163
PAVR06	+	+	+	+	Bronchial aspirate	163
PAVR07	+	+	+	+	Bronchial aspirate	163
PAVR08	+	-	-	+	Bronchial aspirate	163
PAVR09	+	+	+	+	Bronchial aspirate	163
PAVR10	+	+	+	+	Bronchial aspirate	163
PAVR11	+	+	+	+	Bronchial aspirate	163
PAVR14	-	-	-	-	Bronchial aspirate	163
PAVR15	-	+	+	+	Exudate	163
PAVR16	-	-	-	-	Bronchial aspirate	163
PAVR17	-	-	+	+	Bronchial aspirate	163
PAVR18	-	-	-	-	Intraabdominal abscess	163
PAVR19	-	-	-	-	Urine	163
PAVR20	-	-	-	-	Bronchial aspirate	163
PAVR22	-	-	-	-	Peritoneal fluid	163
PAVR23	-	-	-	-	Blood	163
PAVR24	-	-	-	-	Catheter	163
PAVR25	+	+	+	+	Skin burns	163
PAVR26	+	-	+	+	Bile	163

PAVR27	-	-	+	+	Bronchial aspirate	163
PAVR28	+	-	-	+	Bronchial aspirate	163
PAVR29	-	-	-	-	Urine	163
PAVR30	-	-	-	-	Urine	163
PAVR31	+	+	+	+	Sputum	163
PAVR32	-	-	-	-	Bile	163
PAVR33	-	-	-	-	Intra-abdominal abscess	163
PAVR34	+	+	+	+	Bile	163
PAVR35	-	-	-	-	Bronchial aspirate	163
PAVR39	-	-	-	-	Skin abscess	163
PAVR40	+	+	+	+	Sputum	163
PAVR42	+	+	+	+	Skin abscess	163
PAVR43	-	-	-	-	Skin abscess	163
PAVR44	-	-	-	-	Sputum	163
PAVR45	-	-	-	-	Sputum	163
PAVR46	+	+	+	+	Bronchial aspirate	163
PAVR47	-	-	-	-	Bronchial aspirate	163
PAVR48	-	-	+	+	Bronchial aspirate	163
PAVR49	+	+	+	+	Sputum	163
PAVR50	-	-	-	-	Bronchial aspirate	163
PAVR51	+	+	+	+	Bronchial aspirate	163
PAVR52	+	+	+	+	Bronchial aspirate	163
PAVR53	-	-	-	-	Bilis	163
PAVR54	+	-	-	+	Catheter	163
PAVR55	-	-	-	-	Peritoneal fluid	163
PAVR56	+	+	+	+	Pleural fluid	163

PAVR57	-	-	-	-	Wound	163
PAVR59	+	-	+	+	Liver abscess	163
PAVR60	-	-	-	-	Bronchial aspirate	163
PAVR61	+	+	+	+	Urine	163
PAVR62	+	+	+	+	Sputum	163
PAVR63	-	-	-	-	Bronchial aspirate	163
PAVR65	+	+	+	+	Bronchial aspirate	163
PAVR66	+	+	-	+	Peritoneal fluid	163
PAVR67	-	+	+	+	Skin abscess	163
PAVR68	-	-	-	-	Urine	163
PAVR69	+	+	+	+	Bronchial aspirate	163
PAVR70	-	+	-	+	Sputum	163
PAVR72	+	+	-	+	Bronchial aspirate	163
PAVR73	-	-	-	-	Sputum	163
PAVR74	-	+	-	+	Sputum	163
PAVR75	+	+	+	+	Wound	163
PAVR76	-	-	-	-	Bronchial aspirate	163
PAVR77	-	-	+	+	Skin biopsy	163
PAVR78	-	-	-	-	Bronchial aspirate	163
PAVR79	+	+	+	+	Sputum	163
PAVR80	+	+	+	+	Skin abscess	163
PAVR82	-	-	-	-	Bronchial aspirate	163
PAVR84	+	+	+	+	Wound	163
PAVR86	+	+	+	+	Skin abscess	163
PAVR87	+	+	+	+	Urine	163
PAVR89	-	+	+	+	Bronchial aspirate	163

PAVR90	-	-	-	-	Sputum	163
PAVR93	+	+	+	+	Bronchial aspirate	163
PAVR94	-	+	+	+	Sputum	163
PAVR95	-	-	-	-	Bronchial aspirate	163
PAVR96	+	+	+	+	Sputum	163
PAVR97	+	+	-	+	Bronchial aspirate	163
PAVR98	+	+	+	+	Wound	163
PAVR100	-	+	+	+	Exudate	163
PAVR101	-	-	-	-	Bronchial aspirate	163
PAVR102	-	-	-	-	Catheter	163
PAVR103	-	-	-	-	Bronchial aspirate	163
PAVR104	+	+	-	+	Bronchial aspirate	163
PAVR105	-	-	-	-	Bronchial aspirate	163
PAVR106	-	-	-	-	Bronchial aspirate	163
PAVR107	-	+	-	+	Intraabdominal abscess	163
PAVR108	-	-	-	-	Bronchial aspirate	163
PAVR109	-	-	-	-	Exudate	163
PAVR110	+	-	-	+	Sputum	163
PAVR111	+	+	-	+	Sputum	163
PAVR112	-	-	-	-	Bronchial aspirate	163
PAVR113	-	-	-	-	Bronchial aspirate	163
PAVR114	-	-	-	-	Bronchial aspirate	163
PAVR115	-	+	-	+	Bronchial aspirate	163
PAVR116	-	-	-	-	Bronchial aspirate	163
PAVR117	-	-	-	-	Bronchial aspirate	163
PAVR118	-	+	+	+	Bronchial aspirate	163

PAVR119	-	+	-	+	Sputum	163
PAVR120	-	+	+	+	Bronchial aspirate	163
PAVR121	-	+	-	+	Sputum	163

* +, lysis; -, non lysis. Lysed by R1, R2 or R5. R1/R2/R5 refers to lysis by any of the three R-pyocins. NA; no agglutination.

TABLE S3. Isolates of *P. aeruginosa* from 8 CF patients along 10 years

PATIENT	Strain ID	Characteristics	Lysis by*:				Mutator Phenotype	Isolate order	Pigment Production	Morphotype
			R1-pyocin	R2-pyocin	R5-pyocin	R1/R2/R5				
PATIENT 1	FQSE05-0403	Clone E; ST-1108	+	-	-	+	-	1	+	normal
	FQSE05-0104	Clone E; ST-1108	+	+	-	+	-	2	+	normal
	FQSE05-0704	Clone D; ST-299	-	-	-	-	-	3	+	Mucoid
	FQSE05-0305	Clone F; ST-1072	+	+	-	+	-	4	+	normal
	FQSE05-0506	Clone E; ST-1108	+	+	-	+	-	5	+	mucoïd
	FQSE05-0807	Clone G; ST-155	-	+	+	+	-	6	+	mucoïd
	FQSE05-0408	Clone E; ST-1108	+	+	-	+	-	7	-	normal
	FQSE05-0709	Clone E; ST-1108	+	+	-	+	-	8	+	normal
	FQSE05-0310	Clone E; ST-1108	+	+	-	+	-	9	+	normal
	FQSE05-0111	Clone E; ST-1108	+	+	-	+	-	10	+	normal
PATIENT 2	FQSE06-0403	Clone A; ST-274	+	+	+	+	-	1	+	scv
	FQSE06-1003	Clone A; ST-274	+	+	+	+	-	2	+	normal
	FQSE06-1104	Clone A; ST-274	+	+	+	+	+	3	-	normal
	FQSE06-0205	Clone A; ST-274	+	+	+	+	-	4	+	normal
	FQSE06-0106	Clone A; ST-274	+	+	+	+	-	5	+	normal
	FQSE06-1106	Clone A; ST-274	+	+	+	+	-	6	+	normal
	FQSE06-0807	Clone A; ST-274	+	+	+	+	-	7	+	normal
	FQSE06-1008	Clone A; ST-274	+	+	+	+	-	8	+	normal
	FQSE06-1209	Clone A; ST-274	+	+	+	+	-	9	+	normal
	FQSE06-0610	Clone A; ST-274	+	+	+	+	-	10	+	normal
PATIENT 3	FQSE10-0503	Clone A1; ST-274	+	+	+	+	-	1	-	scv

	FQSE10-0504	Clone A1; ST-274	+	+	+	+	-	2	+	muroid
	FQSE10-0105	Clone A1; ST-274	+	+	+	+	-	3	+	normal
	FQSE10-0106	Clone A1; ST-274	+	+	+	+	-	4	-	normal
	FQSE10-0606	Clone A1; ST-274	+	+	+	+	-	5	-	normal
	FQSE10-0607	Clone A1; ST-274	+	+	+	+	-	6	-	normal
	FQSE10-0408	Clone A1; ST-274	+	+	+	+	-	7	-	scv
	FQSE10-0109	Clone A1; ST-274	+	+	+	+	-	8	-	muroid
	FQSE10-0110	Clone A1; ST-274	+	+	-	+	-	9	+	scv
	FQSE10-0111	Clone A1; ST-274	+	+	-	+	-	10	-	scv
PATIENT 4	FQSE11-0603	Clone K; ST-701	+	+	+	+	-	1	+	muroid
	FQSE11-0304	Clone K; ST-701	+	+	+	+	-	2	-	muroid
	FQSE11-0205	Clone K; ST-701	+	+	+	+	-	3	-	muroid
	FQSE11-1205	Clone K; ST-701	+	+	+	+	-	4	+	normal
	FQSE11-1006	Clone K; ST-701	+	+	+	+	-	5	-	muroid
	FQSE11-0707	Clone K; ST-701	+	+	+	+	-	6	-	muroid
	FQSE11-0608	Clone L; ST-254	+	+	-	+	-	7	-	normal
	FQSE11-0609	Clone K; ST-701	+	+	+	+	-	8	-	normal
	FQSE11-0510	Clone K; ST-701	+	+	+	+	-	9	+	muroid
	FQSE11-1010	Clone K; ST-701	+	+	+	+	-	10	+	normal
PATIENT 5	FQSE12-0603	Clone C; ST-299	+	+	+	+	+	1	+	muroid
	FQSE12-0704	Clone C; ST-299	+	+	+	+	+	2	+	scv
	FQSE12-0605	Clone C; ST-299	+	-	-	+	+	3	+	normal
	FQSE12-0206	Clone C; ST-299	+	+	+	+	+	4	+	normal
	FQSE12-0506	Clone C; ST-299	+	+	+	+	+	5	+	normal
	FQSE12-1206	Clone C; ST-299	+	+	+	+	+	6	-	muroid
	FQSE12-1007	Clone B; ST-146	-	+	+	+	-	7	+	normal

	FQSE12-0108	Clone B; ST-146	-	+	+	+	-	8	+	normal
	FQSE12-0110	Clone B; ST-146	+	+	+	+	-	9	-	mucoïd
	FQSE12-1110	Clone B; ST-146	-	+	+	+	-	10	+	normal
PATIENT 6	FQSE15-0803	Clone A; ST-274	+	+	-	+	-	1	+	normal
	FQSE15-0204	Clone A; ST-274	+	+	+	+	-	2	+	normal
	FQSE15-1104	Clone A; ST-274	+	+	+	+	-	3	+	normal
	FQSE15-0905	Clone A; ST-274	+	+	+	+	-	4	+	normal
	FQSE15-0906	Clone A; ST-274	+	+	-	+	-	5	+	normal
	FQSE15-0307	Clone A; ST-274	+	+	+	+	-	6	+	normal
	FQSE15-0508	Clone A; ST-274	+	+	-	+	-	7	+	mucoïd
	FQSE15-1009	Clone A; ST-274	+	+	-	+	-	8	+	mucoïd
	FQSE15-0310	Clone A; ST-274	+	+	+	+	-	9	+	mucoïd
	FQSE15-1110	Clone A; ST-1089	+	+	+	+	+	10	+	mucoïd
PATIENT 7	FQSE16-0803	Clone M; ST-1073	+	+	+	+	+	1	+	normal
	FQSE16-0104	Clone M; ST-1073	+	+	-	+	+	2	-	normal
	FQSE16-1204	Clone M; ST-1073	+	+	+	+	+	3	+	scv
	FQSE16-0405	Clone M; ST-1073	-	+	+	+	+	4	+	normal
	FQSE16-1105	Clone M; ST-1073	+	+	+	+	+	5	+	normal
	FQSE16-0406	Clone M; ST-1073	-	-	+	+	+	6	-	normal
	FQSE16-0507	Clone M; ST-1073	-	-	+	+	+	7	+	normal
	FQSE16-0108	Clone M; ST-1073	-	-	+	+	+	8	+	mucoïd
	FQSE16-0908	Clone M; ST-1073	-	-	+	+	+	9	+	normal
	FQSE16-0910	Clone M; ST-1073	+	+	+	+	+	10	+	mucoïd
PATIENT 8	FQSE21-1003	Clone H; ST-1088	+	+	+	+	-	1	+	mucoïd
	FQSE21-0204	Clone H; ST-1088	+	+	+	+	-	2	+	mucoïd
	FQSE21-1004	Clone H; ST-1088	+	+	+	+	-	3	-	mucoïd

	FQSE21-0505	Clone I; ST-1109	-	+	+	+	-	4	-	scv
	FQSE21-0706	Clone I; ST-1109	-	+	+	+	-	5	-	scv
	FQSE21-0507	Clone I; ST-1109	-	+	+	+	-	6	-	normal
	FQSE21-0308	Clone I; ST-1109	-	+	+	+	-	7	-	scv
	FQSE21-1109	Clone I; ST-1109	-	+	+	+	-	8	-	normal
	FQSE21-0410	Clone I; ST-1109	-	+	+	+	-	9	+	mucoïd
	FQSE21-1110	Clone H; ST-1088	+	+	+	+	+	10	-	normal
PATIENT 9	FQSE24-0304	Clone A; ST-1089	+	+	+	+	+	1	+	normal
	FQSE24-0804	Clone A; ST-1089	+	+	+	+	+	2	+	normal
	FQSE24-0405	Clone A; ST-1089	+	+	+	+	+	3	+	normal
	FQSE24-1005	Clone A; ST-1089	+	+	+	+	+	4	+	normal
	FQSE24-0707	Clone A; ST-1089	+	+	+	+	+	5	+	normal
	FQSE24-1207	Clone A; ST-1089	+	+	+	+	+	6	+	normal
	FQSE24-0308	Clone A; ST-1089	+	+	+	+	+	7	+	normal
	FQSE24-1109	Clone A; ST-1089	+	+	+	+	+	8	+	normal
	FQSE24-0310	Clone A; ST-1089	+	+	+	+	+	9	-	scv
	FQSE24-1010	Clone A; ST-1089	+	+	+	+	+	10	+	normal
PATIENT 10	FQSE28-1006	Clone J; ST-1071	+	+	+	+	-	1	+	normal
	FQSE28-0207	Clone J; ST-1071	+	+	+	+	-	2	+	normal
	FQSE28-0807	Clone J; ST-1071	+	+	+	+	-	3	+	mucoïd
	FQSE28-1107	Clone J; ST-1071	+	+	+	+	-	4	+	mucoïd
	FQSE28-0308	Clone J; ST-1071	+	+	+	+	-	5	+	mucoïd
	FQSE28-0908	Clone J; ST-1071	+	+	+	+	-	6	+	mucoïd
	FQSE28-0409	Clone J; ST-1071	+	+	+	+	-	7	+	normal
	FQSE28-1009	Clone J; ST-1071	+	+	+	+	-	8	+	mucoïd
	FQSE28-0210	Clone J; ST-1071	+	+	+	+	-	9	+	mucoïd

FQSE28-1110 Clone J; ST-1071 + + + + - 10 + mucoid

* +, lysis; -, non lysis. Lysed by R1, R2 or R5. R1/R2/R5 refers to lysis by any of the three R-pyocins. SVC, small colony variants

TABLE S4. R-pyocin production

Strain ID	Characteristics	Lysed by			Lyses to					R-pyocin production
		R1	R2	R5	PAO1 <i>algC</i>	PAO1 <i>rmd</i>	PAO1 <i>rmIC</i>	PAO1 <i>wbpM</i>	PAO1 <i>wbpL</i>	
FQSE05-0403	Clone E; ST-1108	+	-	-	-	-	-	-	-	0
FQSE05-0704	Clone D; ST-299	-	-	-	-	-	-	-	-	0
FQSE05-0305	Clone F; ST-1072	+	+	-	-	-	-	-	-	0
FQSE05-0807	Clone G; ST-155	-	+	+	-	-	-	-	-	0
FQSE06-1003	Clone A; ST-274	+	+	+	-	-	-	-	-	0
FQSE11-0603	Clone K; ST-701	+	+	+	-	-	-	-	-	0
FQSE11-0608	Clone L; ST-254	+	+	-	-	-	-	-	-	0
FQSE12-0603	Clone C; ST-299	+	+	+	-	-	-	-	-	0
FQSE12-1007	Clone B; ST-146	-	+	+	-	-	-	-	+	?
FQSE16-0803	Clone M; ST-1073	+	+	+	-	-	-	-	-	0
FQSE21-1003	Clone H; ST-1088	+	+	+	-	-	-	+	+	R1
FQSE21-0505	Clone I; ST-1109	-	+	+	-	-	-	+	+	R1
FQSE24-0304	Clone A; ST-1089	+	+	+	-	-	-	-	-	0
FQSE28-1006	Clone J; ST-1071	+	+	+	-	-	-	-	-	0
FQSE01-1205	ST-1837	+	-	+	-	-	-	-	-	0
FQSE02-1103-2	ST-1838	+	+	+	-	-	-	-	-	0
FQSE04-0213-4	ST-285	+	+	+	-	-	-	-	-	0
FQSE07-0810	ST-308	+	-	-	-	-	+	+	+	R5
FQSE08-0503	ST-253	-	-	-	-	-	+	+	-	R2
FQSE09-0213	ST-1839	-	-	-	-	-	+	+	-	R2
FQSE13-0807-2	ST-1527	-	+	+	-	-	-	-	-	0
FQSE14-0703	ST-1840	+	+	+	-	-	-	-	-	0

FQSE16-0413	ST-1613	-	-	+	-	-	-	-	-	0
FQSE17-0612	ST-1841	-	-	-	-	-	+	+	-	R2
FQSE20-0608-3	ST-505	-	-	-	-	-	+	+	+	R5
FQSE23-0209-2	ST-1339	+	+	-	-	-	+	+	+	R5
FQSE25-0208	ST-277	-	-	-	-	-	+	+	-	R2
FQSE26-0406-2	ST-1842	+	+	+	-	-	-	-	-	0
FQSE29-0313-2	ST-606	-	-	+	-	-	+	+	-	R2
FQSE30-0210-2	ST-938	-	-	-	-	-	+	+	+	R5
FQSE31-0712	ST-312	+	+	+	-	-	-	-	-	0
FQSE32-1208	ST-1637	+	+	+	-	-	-	-	-	0
FQSE36-1111	ST-386	+	+	+	-	-	-	-	-	0
FQSE39-0910	ST-198	+	+	+	-	-	-	-	-	0

* +, lysis; -, non lysis; ?, unknown

TABLE S5. Antibiograms and R-pyocins susceptibility

Strain ID	Antibiotics*												R-PYOCINS**
	CAZ		IMP		MEM		CIP		TOB		COL		
	Eucast	MIC	Eucast	MIC	Eucast	MIC	Eucast	MIC	Eucast	MIC	Eucast	MIC	
FQSE05-0403	R	16,00	S	1,50	S	0,250	S	0,25	S	1,50	S	0,50	S
FQSE05-0704	S	2,00	S	3,00	S	0,75	R	3,00	S	1,50	S	0,75	R
FQSE05-0305	S	1,00	S	0,50	S	0,047	S	0,25	S	0,75	S	2,00	S
FQSE05-0807	S	0,75	S	1,50	S	0,19	S	0,047	S	0,50	S	1,50	S
FQSE06-1003	S	4,00	R	>32	R	6,00	S	0,25	R	64,00	S	1,50	S
FQSE11-0603	S	1,00	S	1,50	S	0,032	S	0,13	S	2,00	S	1,50	S
FQSE11-0608	S	1,00	S	1,00	S	0,02	S	0,38	S	2,00	S	1,50	S
FQSE12-0603	S	0,75	S	1,00	S	0,06	S	0,25	R	24,00	S	0,75	S
FQSE12-1007	R	24,00	R	>32	S	1,50	R	4,00	S	4,00	R	1024,00	S
FQSE16-0803	S	1,50	S	3,00	S	0,19	R	1,50	S	3,00	S	0,50	S
FQSE21-1003	S	0,50	S	0,38	S	0,19	S	0,25	S	0,38	S	1,00	S
FQSE21-0505	R	16,00	S	3,00	S	0,50	R	2,00	R	16,00	S	2,00	S
FQSE24-0304	S	1,00	R	>32	S	2,00	R	8,00	S	3,00	S	1,00	S
FQSE28-1006	S	1,50	S	4,00	S	0,09	S	0,13	S	3,00	S	2,00	S
FQSE01-1205	S	0,50	S	2,00	S	0,25	S	0,13	S	0,75	S	2,00	S
FQSE02-1103-2	S	2,00	S	3,00	S	0,75	S	0,01	S	2,00	S	1,50	S
FQSE04-0213-4	R	24,00	S	3,00	S	0,190	S	0,38	S	1,50	S	1,50	S
FQSE07-0810	R	256,00	R	32,00	R	32,00	R	1,50	R	8,00	S	1,00	S
FQSE08-0503	S	2,00	S	0,13	S	0,13	S	0,13	R	256,00	S	0,50	R
FQSE09-0213	S	1,00	S	4,00	S	0,50	S	0,19	S	2,00	R	3,00	R

FQSE13-0807-2	S	6,00	R	32,00	R	32,00	R	12,00	S	2,00	S	0,50	S
FQSE14-0703	S	1,50	R	32,00	I	4,00	R	4,00	S	2,00	S	0,06	S
FQSE16-0413	S	1,00	S	3,00	S	0,06	S	0,50	S	3,00	S	1,50	S
FQSE17-0612	S	1,00	S	2,00	S	0,09	S	0,19	S	1,00	S	1,50	R
FQSE20-0608-3	S	2,00	S	1,50	S	0,38	S	0,13	S	2,00	S	2,00	R
FQSE23-0209-2	S	1,00	S	2,00	S	0,25	S	0,13	S	2,00	S	2,00	S
FQSE25-0208	R	32,00	S	1,50	S	0,38	S	0,12	S	2,00	S	2,00	R
FQSE26-0406-2	S	0,75	S	1,50	S	0,06	R	2,00	S	1,50	S	2,00	S
FQSE29-0313-2	S	3,00	R	32,00	R	32,00	R	4,00	S	3,00	S	0,75	S
FQSE30-0210-2	S	1,50	S	1,50	S	0,38	S	0,19	S	1,50	S	0,75	R
FQSE31-0712	S	1,50	R	32,00	S	2,00	S	0,50	S	1,00	S	0,13	S
FQSE32-1208	S	4,00	R	32,00	R	32,00	R	0,75	R	12,00	S	0,50	S
FQSE36-1111	S	1,50	S	2,00	S	0,25	S	0,13	S	0,75	S	0,75	S
FQSE39-0910	S	1,00	S	1,50	S	0,38	S	0,25	S	1,50	S	1,50	S
PAmb37	S	2	S	2	S	0,5	R	4	S	1	S	0,5	R
PAmb39	S	2	S	1	S	1	S	0,125	S	1	S	0,5	R
PAmb54	S	2	S	0,5	S	0,25	S	0,125	S	1	S	2	S
PAmb60	S	8	R	>64	R	>64	R	1	S	0,5-2	S	1	S
PAmb91	S	4	S	1	S	2	S	0,06	S	0,5	S	0,5	R
PAmb112	S	2	S	4	S	1	S	0,25	S	1	S	1	S
PAmb113	S	2	R	8	S	0,06	S	0,125	S	0,5	S	0,25	R
PAmb120	S	4	R	64	S	2	S	0,125	S	0,5	S	0,125	S
PAmb122	R	16	S	1	S	0,5	S	0,125	S	1	S	0,5	S
PAmb129	R	64	R	32	R	8	R	16	S	1	S	0,55	R
PAmb152	R	128	R	8	R	8	R	1	S	0,5	S	1	S
PAmb180	S	2	S	1	S	0,25	S	0,5	S	0,25	S	1	S

PAmb181	S	4	S	2	S	0,5	S	0,125	S	0,5	S	0,25	S
PAmb185	S	8	S	2	S	0,25	S	0,25	S	1	S	1	R
PAmb187	R	>128	S	1	S	0,25	R	>32	S	0,5	S	0,03	R
PAmb199	R	32	S	4	S	0,5	S	0,06	S	0,5	S	0,5	S
PAmb355	R	32	S	4	R	16	R	>32	R	64	S	0,5	R
PAmb396	R	64	S	0,5	S	2	R	>32	S	2	S	0,5	R
PAmb527	R	32	R	16	R	16	R	>32	R	64	R	25	R
PAmb667	R	128	R	32	R	16	R	>32	R	32	S	0,5	R
PAmb31	S	2	S	1	S	0,125	R	1	S	0,25	S	1	R
PAmb43	R	64	R	32	R	16	R	>32	R	64	S	1	S
PAmb62	R	16	R	16	R	32	R	8	S	0,25	S	1	S
PAmb97	R	64	R	16	R	8	S	0,06	S	0,5	S	0,25	S
PAmb132	R	32	S	0,5	S	0,5	S	0,25	S	0,5	S	0,125	S
PAmb148	R	>128	S	2	S	1	S	0,25	S	4	S	1	S
PAmb191	S	2	S	0,5	S	0,5	R	32	S	1	S	0,25	S
PAmb204	S	2	S	2	S	0,5	S	0,125	S	0,25	S	0,25	R
PAmb205	S	8	S	2	R	8	R	>32	S	1	S	0,5	R
PAmb238	R	128	R	>64	R	>64	R	32	R	>64	S	2	R

* CAZ, ceftazidime; IMP, imipenem; MEM, meropenem; CIP, ciprofloxacin; TOB, tobramycin; COL, colistin, ** Resistance to all three R pyocins (R1, R2 or R5);
S, susceptible to at least, one of the 3 R-pyocin

