

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK**

**FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES**

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“Bacteriófagos como alternativa para eliminar cepas de *Acinetobacter baumannii* resistente a antibióticos presentes en tres hospitales del Ecuador”**

Realizado por:

**DIANA CAROLINA LOPEZ SALGUERO**

Director del proyecto:

**PhD. PABLO CASTILLEJO PONS**

Como requisito para la obtención del título de:

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

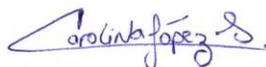
**Quito, 28 de Julio de 2015**



## Declaración Juramentada

Yo, DIANA CAROLINA LÓPEZ SALGUERO, con cédula de identidad # 171300857-9, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



Diana Carolina López Salguero

C.C.: 171300857-9

## **Declaratoria**

El presente trabajo de investigación titulado:

**“Bacteriófagos como alternativa para eliminar cepas de *Acinetobacter baumannii* resistente a antibióticos presentes en tres hospitales del Ecuador”**

Realizado por:

**DIANA CAROLINA LÓPEZ SALGUERO**

como requisito para la obtención del título de:

**INGENIERA BIOTECNÓLOGA**

ha sido dirigido por el profesor:

**PABLO CASTILLEJO PONS**

quien considera que constituye un trabajo original de su autor



Pablo Castillejo Pons

Director

## Los Profesores Informantes

Los Profesores Informantes:

**ESTEBAN OVIEDO**

**MAGDALENA DÍAZ**

Después de revisar el trabajo presentado,

lo han calificado como apto para su defensa oral ante

el tribunal examinador



Esteban Oviedo



Magdalena Díaz

Quito, 23 de Julio de 2015

## **Dedicatoria**

Este trabajo de fin de carrera lo dedico a todas aquellas personas que me apoyaron en este gran sueño, especialmente a mi familia por confiar en mí y apoyarme, y en especial a mi esposo que me brindó todo su amor y las fuerzas para nunca dejarme vencer y creer en mí.

Por todo eso.

Muchas gracias.

## **Agradecimiento**

Agradezco primeramente a Dios por regalarme la oportunidad de ser parte de este maravilloso mundo al cual me abro camino en este momento.

A mis padres, porque gracias a los valores inculcados en la infancia, a su apoyo incondicional y a su infinito amor, he logrado alcanzar una meta más en la vida.

A Andrés Granja, mi esposo, amigo, cómplice y maestro que ha guiado mi vida desde que lo conocí y gracias a él pude abrir mis ojos a lo verdaderamente importante de la vida. Gracias a tí mi vida, por las largas horas de espera, por creer en mí, por compartir tu vida conmigo y por todo el amor y entrega que me has brindado.

Finalmente quiero agradecer a los profesionales que me brindaron su apoyo en el desarrollo de este proyecto, principalmente a Pablo Castillejo y Esteban Fernández por su colaboración y apoyo.

## Índice De Contenido

Resumen .....	xv
Abstract.....	xvi
Símbolos y Abreviaturas .....	17
Capítulo 1 .....	18
Introducción.....	18
1.1. Antecedentes:.....	18
1.2. Objetivo General.....	27
1.3. Objetivos Específicos .....	27
1.4. Características del Sitio del Proyecto: .....	27
Capítulo 2 .....	29
Marco Teórico .....	29
Fagoterapia.....	30
Mecanismos de replicación .....	31
Capítulo 3 .....	40
Metodología.....	40
Cepas y aislados bacterianos.....	40
Medios de cultivo y buffers .....	42
Muestras de agua.....	43

Conservación de cepas .....	44
Cultivo saturado de <i>Acinetobacter Baumannii</i> .....	44
Obtención cultivo en fase exponencial .....	44
Siembra en doble capa .....	45
Procesamiento de muestras de agua.....	45
Aislamiento de fagos de la muestra de agua por enriquecimiento.....	48
Lisados en medio líquido .....	52
Prueba de la gota .....	53
Verificación de fagos no contaminados .....	55
Titulación de lisados fágicos.....	55
Cinética de infección de bacteriófagos .....	58
Capítulo 4 .....	59
Resultados y Discusión.....	59
4.1. Resultados.....	59
Parámetros fisicoquímicos muestras de agua.....	61
Obtención y aislamiento de bacteriófagos .....	62
Protocolo para la obtención de bacteriófagos a partir de muestras de agua:.....	62
Ensayo con distintas concentraciones de cloroformo .....	70
Ensayo con distintos buffers con 10 µL de cloroformo .....	71
Verificación de fagos no contaminados .....	73

Titulación de fagos.....	73
Protocolo para titulación de fagos: .....	73
Cinética fágica.....	76
4.2. Discusión .....	78
Capítulo 5 .....	82
Conclusiones y Recomendaciones .....	82
5.1. Conclusiones.....	82
5.2. Recomendaciones .....	84
Capítulo 6 .....	88
Referencias .....	88
Anexos.....	93
Anexo A: Muestreo.....	93
Anexo B: Calvas de lisis obtenidas del procesamiento de muestras de agua .....	97
Anexo C: Aislamiento de Bacteriófagos de Muestras de Agua.....	99
Anexo D: Prueba de la Gota .....	101

## Índice De Tablas

Tabla 1. Código INSPI de Cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> y su procedencia .....	40
Tabla 2. Resultados de determinación de <i>Acinetobacter</i> .....	41
Tabla 3. Antibiograma de cada cepa de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	42
Tabla 4. Parámetros físicoquímicos de muestras de agua de río.....	61
Tabla 5. Ensayo con 0 µl de cloroformo .....	70
Tabla 7. Ensayo con 10 µl de cloroformo .....	70
Tabla 8. Ensayo con 20 µl de cloroformo .....	71
Tabla 9. Ensayo con medio SM.....	71
Tabla 10. Ensayo con medio TB modificado .....	72
Tabla 11. Ensayo con medio SM + TB modificado .....	72
Tabla 12. Verificación fagos no contaminado.....	73
Tabla 13. Resultado número de calvas en recuento en placa .....	74
Tabla 14. Determinación de la concentración inicial del fago en lisado en medio líquido	75
Tabla 15. Concentración Inicial de Fago en lisado en medio líquido .....	75

## Índice De Ilustraciones

Ilustración 1. Objetivos Farmacológicos .....	20
Ilustración 2. Progreso del número de publicaciones a partir de 1986 hasta 2013 .....	30
Ilustración 3. Ciclo lítico y lisogénico.....	33
Ilustración 4. Curva de crecimiento Cepa 659 .....	59
Ilustración 5. Curva de Crecimiento Cepa 742 .....	60
Ilustración 6. Curva de Crecimiento Cepa 743 .....	60
Ilustración 7. Curva de Crecimiento Cepa 746 .....	61
Ilustración 8. Crecimiento cepa 659 con agua de río Machángara.....	63
Ilustración 9. Crecimiento cepa 659 con agua de río San Pedro .....	64
Ilustración 10. Crecimiento cepa 659 con agua de río Guayllabamba .....	64
Ilustración 11. Crecimiento cepa 742 con agua de río Machángara.....	65
Ilustración 12. Crecimiento cepa 742 con agua de río San Pedro .....	65
Ilustración 13. Crecimiento cepa 742 con agua de río Guayllabamba .....	66
Ilustración 14. Crecimiento cepa 743 con agua de río Machángara.....	66
Ilustración 15. Crecimiento cepa 743 con agua de río San Pedro .....	67
Ilustración 16. Crecimiento cepa 743 con agua de río Guayllabamba .....	67
Ilustración 17. Crecimiento cepa 746 con agua de río Machángara.....	68
Ilustración 18. Crecimiento cepa 746 con agua de río San Pedro .....	68
Ilustración 19. Crecimiento cepa 746 con agua de río Guayllabamba .....	69

Ilustración 20. Cinética fágica cepa 659.....	76
Ilustración 21. Cinética fágica cepa 742.....	76
Ilustración 22. Cinética fágica cepa 743.....	77
Ilustración 23. Cinética fágica cepa 746.....	77
Ilustración 24. Mapa de Muestreo .....	93
Ilustración 25. Envase de acero inoxidable para muestreo.....	93
Ilustración 26. Fotografías del sitio de muestreo en el Río Machángara .....	94
Ilustración 27. Fotografías del sitio de muestreo en el Río Guayllabamba.....	95
Ilustración 28. Fotografías del sitio de muestreo en el Río San Pedro.....	96
Ilustración 29. Calvas en cepa 659 obtenidas a partir de agua Río Machángara .....	97
Ilustración 30. Calvas en cepa 743 obtenidas a partir de agua Río Machángara .....	98
Ilustración 31. Procesamiento de muestras de agua. Grupo control y ensayos con agua de río.....	99
Ilustración 32. Aislamiento de Fagos en medio SM.....	100
Ilustración 33. Materiales para ensayo prueba de la gota.....	101
Ilustración 34. Calvas de lisis y contaminación en prueba de la gota .....	102
Ilustración 35. Procesamiento de Muestras de Agua.....	46
Ilustración 36. Procesamiento de muestras de agua (Continuación).....	47
Ilustración 37. Aislamiento de Fagos de Muestras de Agua .....	49
Ilustración 38. Aislamiento de Fagos de Muestras de Agua (Continuación) .....	50
Ilustración 39. Aislamiento de Fagos de Muestras de Agua (Continuación) .....	51
Ilustración 40. Lisado en medio líquido .....	52
Ilustración 41. Prueba de la Gota .....	54

Ilustración 42. Titulación de Lisados Fágicos.....	56
Ilustración 43. Titulación de Lisados Fágicos (Continuación).....	57
Ilustración 44. Cinética de Bacteriófagos.....	58

## Resumen

Las bacterias resistentes a múltiples antibiótico son cada vez más frecuentes y atentan contra el bienestar de las sociedades actuales. *Acinetobacter baumannii* es una de ellas y su peligrosidad radica en su presencia dentro de hospitales principalmente en la unidad de cuidados intensivos. Los controles comunes mediante la administración de antibióticos son poco efectivos por lo cual se propone la utilización de nuevas técnicas como lo es el uso de bacteriófagos. En este estudio se aislaron bacteriófagos de muestras de agua de los ríos Machángara, San Pedro y Guayllabamba, los cuales fueron probados en cuatro cepas de *A. baumannii* obtenidas de tres hospitales del Ecuador. Se realizaron técnicas de aislamiento de bacteriófagos, de eficacia por medio de la prueba de la gota, titulación de lisados fágicos y de cinética de infección. Se aislaron 12 fagos de los cuales se escogieron 5 de ellos para las pruebas de titulación y de cinética, uno por cepa y uno que afectara a todas ellas. Se logró establecer un protocolo útil para la obtención de bacteriófagos para este caso específico y se encontró un descenso en el crecimiento de la bacteria en presencia del fago. Para obtener resultados más completos se recomienda realizar un análisis genómico.

**Palabras Clave:** bacteriófagos, *Acinetobacter baumannii*, Ecuador.

## Abstract

Antibiotic resistant bacteria are becoming more frequent and threaten the well-being of today's societies. *Acinetobacter baumannii* is one of them and its danger lies in their presence within hospitals mainly in the intensive care unit. Common controls by administering antibiotics are ineffective and therefore the use of new techniques such as the use of bacteriophages is proposed. In this study bacteriophages were isolated from water samples from the Machángara, San Pedro and Guayllabamba rivers, which were tested in four strains of *A. baumannii* obtained from three hospitals in Ecuador. Some methodologies were applied like bacteriophage isolation techniques, the drop test, titration of phage lysates and infection kinetics. Twelve phages were isolated and only five of them were chosen for testing and kinetic titration, one which affected all of the strains and one for each strain specifically. It was possible to establish a useful protocol for obtaining bacteriophage for this particular case. A decrease was also found in the growth of the bacteria in the presence of phage. Finally, to obtain more results it is recommended to do a genomic analysis.

**Key Words:** bacteriophages, *Acinetobacter baumannii*, Ecuador.

## Símbolos y Abreviaturas

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ESKAPE</b>	<i>Enterococcus spp., Staphylococcus aureus</i> <i>Klebsiella spp., Acinetobacter baumannii,</i> <i>Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter spp</i>
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>INSPI</b>	Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública
<b>LEM</b>	Medio de lisogenia Luria Bertani con magnesio
<b>OD</b>	Optical Density/ Densidad Óptica
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ON</b>	Over night (16 horas)
<b>SM</b>	Tampón ( <i>Buffer</i> ) de Sodio y Magnesio
<b>TB modificado</b>	Terrific Broth modificado con fosfato similar al medio DSPB

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Antecedentes:

El descubrimiento de medicamentos se presenta desde tiempos antiguos, asociado principalmente al conocimiento ancestral del uso práctico de plantas, animales y minerales para tratar males en la vida diaria. Estos saberes se transmitían de manera oral entre generaciones y se desarrollaron en las civilizaciones antiguas en las cuales se comenzaron a tener registros escritos para su conservación. Este conocimiento más bien empírico permitió una primera aproximación a lo que se desarrollaría de manera científica en el futuro.

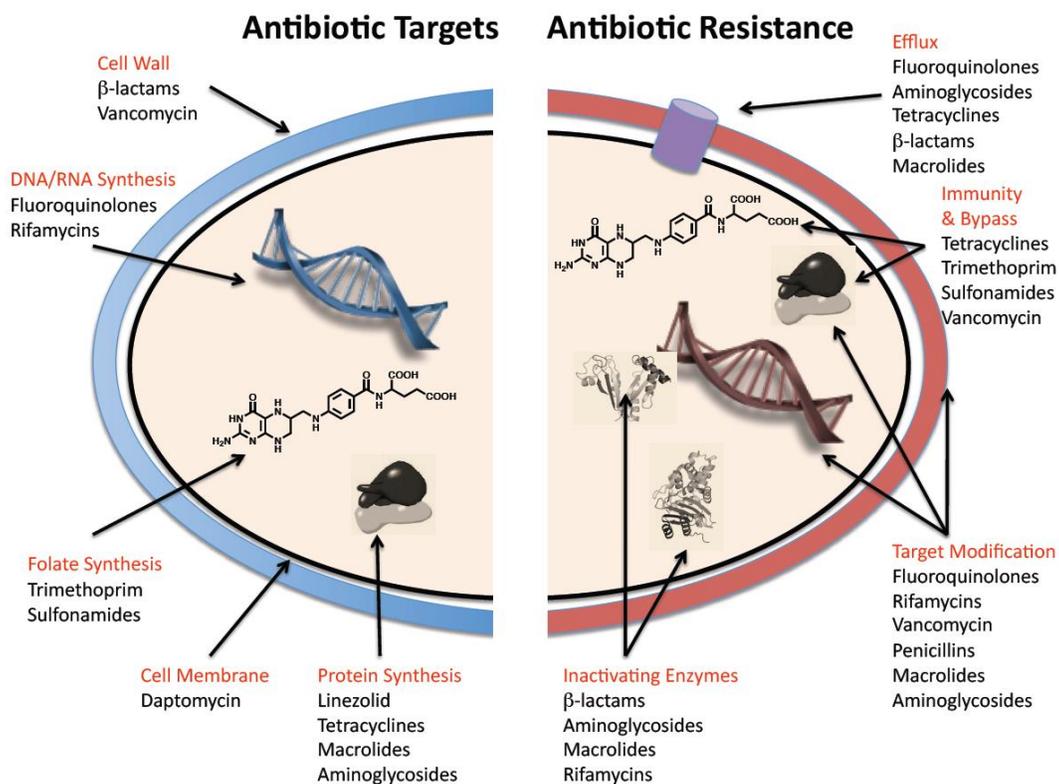
La historia de los avances médicos en el campo del desarrollo y descubrimiento de medicamentos es amplia. De estos destacan aquellos que se produjeron a finales del siglo XVII como la invención de las vacunas a partir de los experimentos de Edward Jenner con la viruela. Para inicios del siglo XIX se tenía acceso a pocas sustancias tales como la quinina, la aspirina y el mercurio; y en el transcurso del mismo comenzaron a afinarse los conocimientos llegando a obtener principios activos que tenían mejores resultados. A principios del siglo Alexander Fleming realizó su gran descubrimiento, la penicilina y de esta manera marcó el inicio del desarrollo de los antibióticos (Ng, 2008).

Como se puede apreciar el descubrimiento evolucionó de manera general en tres etapas, la primera a partir de extractos de fuentes naturales, la segunda se dirigió al desarrollo con métodos químicos y la creación de la industria farmacéutica; y la tercera la obtención de principios activos. La segunda etapa fue clave en la nueva era de descubrimiento de antibióticos gracias al conocimiento de sus estructuras, lo cual permitió modificaciones físicas hacia nuevas moléculas antibióticas que tuvo su auge entre los años cuarenta y sesenta (Ng, 2008; Roque, 2010).

El desarrollo de antibióticos se basa en el principio básico de los objetivos farmacológicos. Que se definen como entidades biológicas que incluyen proteínas, genes e incluso RNA (Hughes, Rees, Kalindjian, & Philpott, 2011). Algunos de ellos son: la unión al ribosoma lo cual genera una incorrecta traducción a proteínas, la inhibición de la síntesis de pared celular produciendo su lisis, la inhabilitación de la DNA girasa o DNA topoisomerasa que ocasionan el rompimiento de la cadena de DNA bacteriano, el mal funcionamiento de las DNA y RNA polimerasas y la interrupción de la rutas metabólicas (Ilustración 1) (Kohanski, Dwyer, & Collins, 2010; Lewis, 2013). Como se puede apreciar, los objetivos farmacológicos no son ilimitados lo cual demuestra la problemática de la creación de nuevos antibióticos.

## Ilustración 1. Objetivos Farmacológicos

Fuente: (Wright, 2010)



La gran mayoría de antibióticos han sido utilizados durante décadas por su efectividad en el control de microorganismos patógenos humanos, pero esta solución casi milagrosa es cada vez menos eficaz debido a que muchos de ellos han adquirido resistencia. La razón es sencilla, la evolución, aquellos individuos portadores de factores benéficos han sido seleccionados en pro de la supervivencia. Es así que sin darnos cuenta hemos forzado durante años a estos microorganismos a seleccionarse y a adaptarse a una gran velocidad.

Debido a la gran plasticidad que muestran los microorganismos, en especial las bacterias, su capacidad de sobrevivir en condiciones selectivas les ha conferido la habilidad de ser inmunes a la acción de los antibióticos. En estos casos, los objetivos farmacológicos se han visto

comprometidos por mecanismos que anulan su acción. Entre ellos se encuentran la destrucción del antibiótico, modificación del objetivo y el ingreso restringido del antibiótico en la célula o su expulsión (Lewis, 2013). Esta selección natural se ha visto forzada por la constante exposición a estas sustancias de manera abusiva e irresponsable.

Este uso excesivo de antibióticos ha generado cepas bacterianas multi-resistentes de difícil control, pertenecientes principalmente al grupo de bacterias conocidas como ESKAPE en el cual figuran *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp. (Howard, O'Donoghue, Feeney, & Sleator, 2012; Lewis, 2013).

Estas bacterias son de gran importancia en el tema de salud pública y su tratamiento hasta el momento se basa en la administración de cócteles de antibióticos con el objetivo de que alguno de ellos logre controlar la infección. La mayoría de antibióticos son de amplio espectro lo cual significa que no son específicos, el problema que esto genera es que además de eliminar la bacteria patógena también afecta a la flora natural humana repercutiendo en el bienestar del organismo.

Una de las principales preocupaciones acerca de estas bacterias es su capacidad de contaminación y colonización de sitios que deberían permanecer estériles, como es el caso de los hospitales, en donde se han encontrado una serie de bacterias resistentes a múltiples antibióticos como las anteriormente mencionadas y que causan graves enfermedades en los pacientes internados, principalmente en aquellos que se encuentran en la unidad de cuidados intensivos.

Dentro de este grupo se encuentra *Acinetobacter baumannii* que se define como bacilo Gram negativo, no fermentativo, inmóvil y oxidasa negativa (Howard et al., 2012) que se caracteriza por ser una bacteria nosocomial oportunista, esto quiere decir que es una bacteria

intrahospitalaria que invade los tejidos cuando las defensas del cuerpo se encuentran suprimidas (Shors, 2009) y algunas de las cepas de esta bacteria son resistentes a antibióticos y a desinfectantes.

Naturalmente se encuentra en el ambiente, aunque algunas cepas también colonizan el tracto respiratorio de las personas. Gracias a su capacidad de formar biofilms en superficies abióticas (plástico y vidrio) y también bióticas como es el caso de células epiteliales, es importante controlar su ausencia en instrumentos hospitalarios como catéteres de succión, tubos ventiladores, humidificadores, contenedores de agua destilada, viales de medicamentos y teclados de ordenador que son algunas de las fuentes potenciales de infección (Peleg, Seifert, & Paterson, 2008).

Un estudio realizado en 2010 acerca de la presencia de *A. baumannii* multirresistente en guantes de látex, batas hospitalarias y en las manos del personal; mostró que esta bacteria es altamente propensa a la transmisión por contacto incluso después de haber utilizado las practicas generales de limpieza y asepsia propias de centros de salud. Este factor podría explicar los brotes emergentes a nivel mundial en los últimos años (Morgan et al., 2010).

Esta bacteria infecta el tejido suave como la membrana mucosa y áreas de la piel expuestas por un trauma y puede provocar enfermedades como neumonía, meningitis, infección de las vías urinarias e infección sanguínea (Peleg et al., 2008; Savov et al., 2009).

Según Howard *et al* (2012) hasta 1970 esta bacteria era susceptible a antibióticos. Esto nos permite evidenciar claramente como el uso de los antibióticos ha repercutido en los grandes problemas del presente.

Esta bacteria ha ocasionado brotes infecciosos y provocado la muerte de varias personas en el área de cuidados intensivos en todo el mundo, por lo que se le considera de alto riesgo y que

requiere un control eficaz para su eliminación. A esto se debe la importancia del desarrollo de técnicas alternativas de control.

El tratamiento convencional para eliminar *Acinetobacter baumannii* resistente a antibióticos en instrumentos consta de la desinfección de material con agentes antimicrobianos (desinfectantes) y en el caso de pacientes el tratamiento consiste en suministrar cocteles de antibióticos que puedan actuar de manera sinérgica favoreciendo su eliminación. Estas alternativas no son completamente efectivas debido a la capacidad que presenta para resistir los desinfectantes, la desecación y los antibióticos; además la combinación de los mismos ejerce una presión selectiva que genera cepas resistentes a un número cada vez mayor de antibióticos. Es por ello que los controles típicos solamente detienen su crecimiento pero no la eliminan por completo. Es importante destacar que su gran resistencia se debe principalmente a características como: la baja permeabilidad de su membrana y por su sistema de expulsión, dos de los objetivos farmacológicos a los que se dirigen comúnmente los antibióticos (Peleg et al., 2008; Savov et al., 2009; Yang, Liang, Lin, & Jia, 2010).

Según la guía de Prevención de enfermedades nosocomiales de la Organización Mundial de la Salud (2002), este tipo de infecciones se encuentran entre las principales causas de muerte en pacientes hospitalizados, principalmente en aquellos tratados en el área terapia intensiva. Además indica que su frecuencia máxima en el mundo tiene una media del 9,6%, considerando que en la Región del Pacífico Occidental es de 9,0%, en la Región de Asia Sudoriental representa el 10,0% y en la Región del Mediterráneo Oriental constituye el 11,8%.

Solamente en América Latina las infecciones registradas, causadas por *A. baumannii* en los años de 1997-1999 correspondían al 5,3% de los aislados de bacteriemias nosocomiales. Cabe mencionar que un estudio realizado en Colombia en los años de 2006 a 2009 mostró un gran

número de infecciones por cepas multirresistentes y una disminución en la presencia de cepas sensibles (Lemos et al., 2011). Según Peleg *et al.* (2008), en esta zona existen altos índices de resistencia a antibióticos como meropenem, imipenem, ceftazina, piperacilina-tazobactam, ciprofloxacina y gentamicina en comparación con resto del mundo. Esto provoca que existan cada vez más casos reportados de brotes infecciosos de cepas de bacterias resistentes.

Uno de los problemas por los cuales existe mayor incidencia en la zona es que no se mantiene un seguimiento adecuado a este tipo de infecciones. Para sobrellevar este inconveniente, se han venido realizando reportes, informes y documentos que permitan conocer el estado actual a nivel mundial. Es así que existe lo que se conoce como el Consorcio Internacional de Control de Enfermedades Nosocomiales o INICC por sus siglas en inglés, que ha realizado reportes a escala mundial desde el año de 2002. En su último reporte realizado entre los años de 2004-2009, se muestra la incidencia de infecciones nosocomiales en unidades de cuidados intensivos, producidas por las bacterias del grupo ESKAPE tomando en cuenta tres características, estas son: infecciones al tracto urinario asociadas a catéteres, infecciones al torrente sanguíneo asociadas a una vía central y neumonía asociada al uso de ventiladores; las cuales son las vías más comunes de infección. En el informe constan 36 países entre los que se encuentra, por primera vez, el Ecuador con el Hospital Andrade Marín como representante (Rosenthal et al., 2012).

Además, según un análisis situacional realizado por el Servicio de Epidemiología del Hospital de Especialidades Eugenio Espejo (2011), en 2011 se registraron 38 casos de infecciones nosocomiales de *Acinetobacter baumannii* e indica que su frecuencia ha incrementado desde el año 2007 (SIVICEIN, 2011).

Un estudio realizado en 2013 en este hospital identificó a la bacteria *A. baumannii* en aislados de muestras de sangre, orina, secreción traqueal y otras secreciones. La bacteria fue

sometida a pruebas de antibiosis mostrando que casi todas las muestras analizadas pertenecían a cepas resistentes a levofloxacin, ceftazidima, meropenem, amikacina, imipenem, ampicilina, sulbactam, ciprofloxacina, piperaciclina/tazobactam. Además se determinó que *Acinetobacter baumannii* presentaba el mayor índice de prevalencia entre los pacientes analizados y que su frecuencia fue mayor en muestras de secreción traqueal (Escobar, C, Hurtado, J, & Gavilanes, M, 2014). Todo esto es evidencia de que en el Ecuador, el problema de resistencia a múltiples antibióticos, en este caso para bacterias nosocomiales, es un hecho.

Los antibióticos comúnmente usados en el Ecuador por parte de las dependencias de salud pública son en primer lugar los antibióticos penicilínicos (amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulónico, ampicilina + sulbactam, oxacilina, piperaciclina + tazobactam, gentamicina), cefalosporinas (Ceftriazona, Ceftazidime, Cefepime, Cefalexina) y carbapenemes (imipenem, meropenem) (SIVICEIN, 2011).

Es por lo anteriormente expuesto que el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), en el Área de Microbiología, mantiene un control del estado actual de un gran número de bacterias, entre las que se encuentra *Acinetobacter baumannii*. Sus registros muestran que varias cepas de distintos hospitales del país son multirresistentes a la mayoría de los antibióticos utilizados en el presente.

En el Ecuador ya se han reportado casos de infección con *A. baumannii*, uno de ellos en el hospital Verdi Cevallos Balda de Portoviejo y otro en el hospital Eugenio Espejo de la ciudad de Quito, en donde 7 pacientes del área de cuidados intensivos se vieron afectados (“Se abre expediente a hospital por presencia de bacteria,” 2011). Además, existen registros de cepas multirresistentes presentes en hospitales del Ecuador. Esto evidencia que el país no está exento de la posibilidad de un brote infeccioso que pueda ocasionar pérdidas significativas.

Si bien evitar el uso excesivo de antibióticos es una primera aproximación a la solución, no es la mejor de todas debido a que se ha llegado a un punto sin retorno en el cual el uso de cócteles de antibióticos es la única manera de controlar dichas infecciones. Esta aproximación lograría evitar que se genere un mayor número de cepas resistentes, pero no lograría controlar las actuales.

Es por ello, de gran interés e importancia que la ciencia genere alternativas al uso de antibióticos que permitan un control adecuado y de esta manera logren brindar una buena calidad de vida. Una de las nuevas propuestas para evitar el uso de antibióticos es la terapia con bacteriófagos. Esta técnica ha tenido gran interés y acogida en los últimos años principalmente debido a su especificidad y eficacia. (Howard et al., 2012).

Este recurso, bastante novedoso y aclamado, que se plantea dentro de este proyecto de investigación ha sido probada y es actualmente utilizada en países como Rusia, Polonia y Georgia.

Un punto interesante a conocer es que la FDA (Food and Drug Administration) ha aprobado a los bacteriófagos como aditivos alimentarios en productos de consumo directo para prevenir enfermedades transmitidas por alimentos (Yang *et al.*, 2010). Esta resolución muestra la confianza que se tiene en este tipo de tecnologías, debido principalmente a los estudios previos realizados.

Según el Plan Nacional del Buen Vivir, dentro de su objetivo de mejorar la calidad de vida de la población, busca “*promover la investigación en servicios sanitarios, en articulación con el Sistema de Vigilancia Epidemiológica, que permita la detección oportuna de patologías, virus y demás enfermedades, así como la identificación de mecanismos y acciones para contrarrestar una posible propagación de epidemias*” (Plan Nacional del Buen Vivir, 2013). Esto muestra claramente una base oportuna para la investigación de esta alternativa para el control epidemiológico que beneficie a la sociedad.

Es por lo anteriormente expuesto, ésta técnica puede ser de gran utilidad para conseguir el objetivo que dicta el Plan Nacional del Buen Vivir en cuanto a salud pública.

## 1.2. Objetivo General

- Analizar a los bacteriófagos como una alternativa para eliminar cepas de *Acinetobacter baumannii* resistente a antibióticos presentes en tres hospitales del Ecuador

## 1.3. Objetivos Específicos

- Obtener bacteriófagos específicos para *Acinetobacter baumannii*
- Determinar la efectividad de la aplicación.

## 1.4. Características del Sitio del Proyecto:

Las muestras de cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a múltiples antibióticos son parte de la colección de cepas del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI). Se proveerán en cultivo en placa, siembra estriada por agotamiento. Esta muestra deberá ser procesada preparando un cultivo líquido saturado a partir del aislamiento de una sola colonia y se deberán conservar en glicerol en una concentración del 70% a una temperatura de -80C.

Ya que *Acinetobacter baumannii* es una bacteria hospitalaria, su presencia en aguas residuales de dichos establecimientos es más probable, es importante tomar en cuenta que esta bacteria resiste incluso desinfectantes y por lo tanto los métodos de limpieza no aseguran su eliminación. Se considera a la fuente de agua residual ideal debido a la presencia de secreciones y excreciones de pacientes infectados, además del agua de limpieza de superficies e instrumentación previa esterilización.

Si bien el agua de descarga directa del hospital es la que mejores resultados podría generar, su alta peligrosidad la hace no recomendable. Además se conoce que el agua residual no pasa por un tratamiento previa descarga en los ríos de la ciudad, es por ello que se decidió tomar muestras de agua en los ríos en los cuales se presume existe mayor contaminación.

De esta manera se eligió el río Machángara el cual se conoce es el río más contaminado del Distrito Metropolitano de Quito, además para tener resultados comparables se decidió tomar muestras de otros dos ríos que se relacionan con el Machángara, estos son el río San Pedro y el río Guayllabamba. Se tomaron muestras de los tres ríos con el objetivo de relacionar su proximidad con zonas urbanas con la presencia de bacteriófagos. Ambos ríos, el Machángara y el San Pedro, desembocan en el río Guayllabamba esto permitió crear un triángulo geográfico de análisis de resultados.

## Capítulo 2

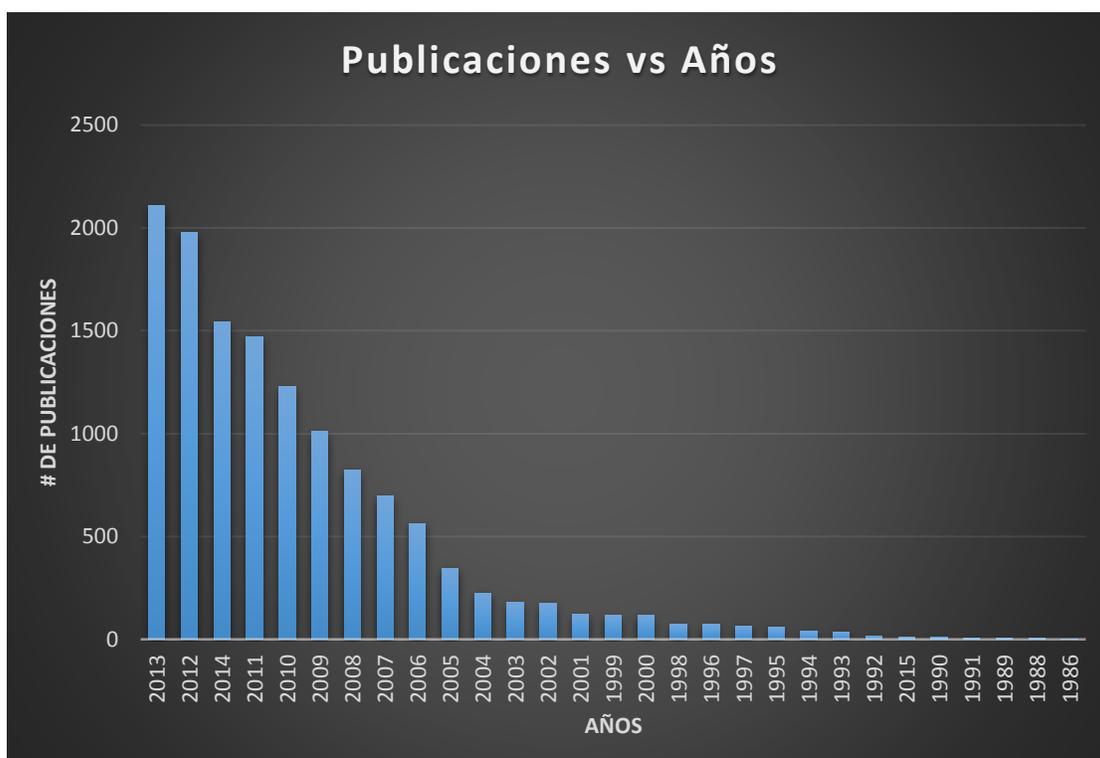
### Marco Teórico

#### 2.1. Estado Actual Del Conocimiento Sobre El Tema

En la actualidad existe un gran interés en la bacteria *Acinetobacter baumannii* y se han realizado varios estudios en temas como las infecciones nosocomiales, la resistencia que presenta a varios antibióticos y su creciente importancia como bacteria infecciosa. Así lo muestran los resultados acerca de las publicaciones realizadas hasta el año 2013 según la base de datos SCI Finder, la cual evidencia claramente el crecimiento acelerado que ha tenido el interés de estudio de esta bacteria en la última década (Ilustración 2).

## Ilustración 2. Progreso del número de publicaciones a partir de 1986 hasta 2013

Fuente: Generado de datos SCI Finder, Diciembre 2014



Este creciente interés en el estudio de *Acinetobacter baumannii* se debe principalmente a la gran importancia que se ha generado en el ámbito de la salud. Uno de los temas de estudio más atractivos se refiere a la formulación de nuevos métodos de eliminación y control de esta bacteria.

En cuanto a los tratamientos utilizados, además de los tradicionales como la utilización de mezclas de antibióticos y tratamientos convencionales de desinfección, se ha propuesto la “fagoterapia”. Este es uno de los más atractivos y tiene aplicaciones principalmente en la industria de alimentos y en el sector de la salud.

### FAGOTERAPIA

Esta nueva técnica corresponde a lo que se conoce como bioterapia que es el uso de organismos vivos en medicina humana. La fagoterapia es el uso de bacteriófagos para tratar

infecciones bacterianas. Estos virus son especialmente particulares debido a que solamente pueden infectar a bacterias (Kutter, Gvasalia, Alavidze, & Brewster, 2013).

La fagoterapia se ha venido utilizando desde 1930 cuando fue desarrollada en el Instituto Pasteur en Paris y difundida principalmente por Europa y la Unión Soviética. Lastimosamente al llegar la maravillosa invención de los antibióticos en los años cuarenta, esta técnica estuvo cada vez más en desuso (Kutter et al., 2013).

Como se ha descrito previamente, se conoce que el uso de antibióticos en la actualidad, es más bien un problema que una solución. Es por ello que se le considera ventajosa sobre la terapia química tradicional. Su efectividad contra cepas multi resistentes, además de su alta especificidad, su capacidad de mutación y sus bajos costos de producción son algunos de sus puntos a favor (Matsuzaki et al., 2005).

Es por ello que en 2006 la FDA (Food and Drug Administration) de Estados Unidos y la Unión Europea aprobaron el uso de bacteriófagos contra *Listeria monocytogenes* en comidas preparadas. Con este precedente la Corporación Nestlé mantiene un proyecto sobre bacteriófagos para tratar *Escherichia coli* que produce diarrea en niños en Bangladesh. En la actualidad esta terapia es ampliamente utilizada en la República de Georgia y está disponible en países como Rusia, Polonia y otros países de Europa del este (Kutter et al., 2013).

### **MECANISMOS DE REPLICACIÓN**

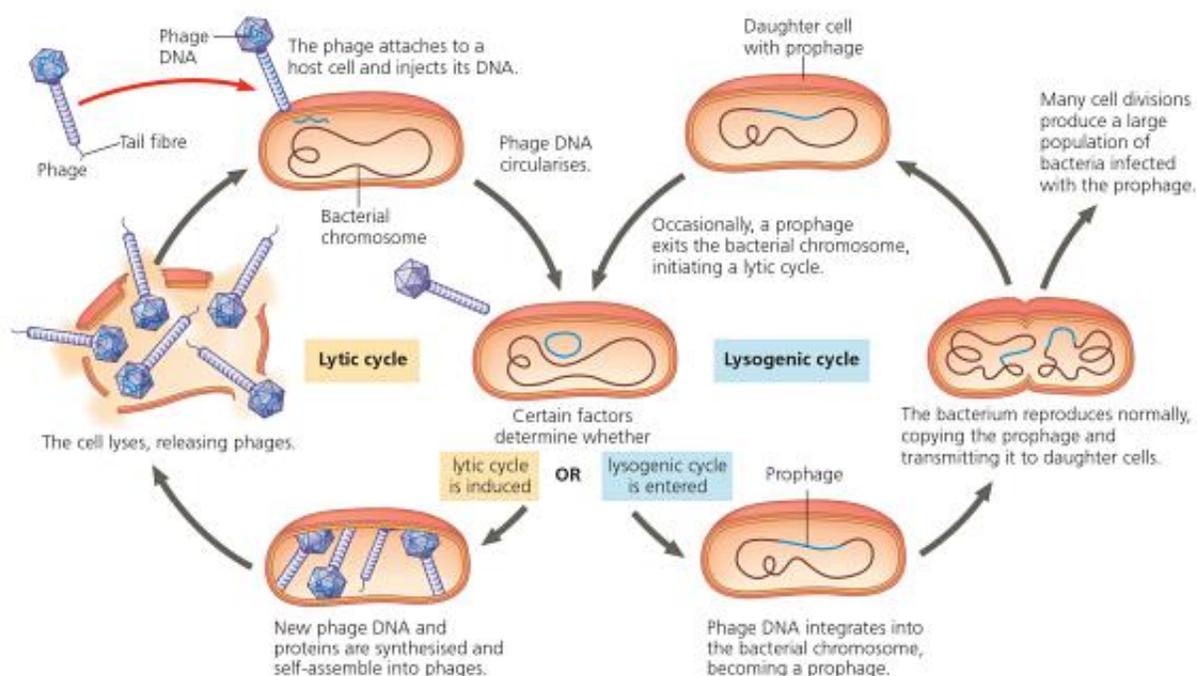
Los bacteriófagos son virus que solamente pueden replicar su ADN en bacterias, algunos son específicos para ciertas cepas mientras otros pueden tener un rango más amplio. Constan de una cubierta proteica que carga dentro una molécula de ADN o ARN. A diferencia de los virus que infectan eucariotas, estos presentan lo que se conoce como una cola que se une a proteínas de

superficie y permite el ingreso del material genético a la célula bacteriana (Dini, 2011; Spricigo, Denis Augusto, 2011).

Existen dos ciclos de infección que pueden presentar los bacteriófagos (Ilustración 3), el primero de ellos se denomina ciclo lítico en el cual la infección provoca la reprogramación de la célula y finaliza con la lisis de la misma en poco tiempo. El segundo ciclo se conoce como ciclo lisogénico, en este el material genérico del bacteriófago se integra al ADN propio de la bacteria el cual puede llegar a producir la lisis celular después de mucho tiempo (Dini, 2011; Kutter et al., 2013).

### Ilustración 3. Ciclo lítico y lisogénico

Fuente: (Reece et al., 2014)



El aislamiento de fagos puede realizarse a partir de una variedad de fuentes como agua, suelo, heces, profundidades del océano y fuentes termales. Algo que se debe considerar es que “es más fácil aislar bacteriófagos para algunas bacterias que para otras” (Kutter et al., 2013).

Las bacterias presentan un arreglo específico de proteínas de superficie, lípidos y carbohidratos a las cuales se unen los bacteriófagos, estos son distintos entre bacterias gram-positivas y gram-negativas. Cuando una cepa se vuelve resistente a un fago esto implica un cambio estructural en la célula lo cual afecta directamente a sus funciones como por ejemplo en la virulencia. Es importante conocer que un bacteriófago no debe contener genes tóxicos en su material genético para aprobar su uso terapéutico (Dini, 2011; Kutter et al., 2013; Spricigo, Denis Augusto, 2011).

Los primeros descubrimientos en este tema se produjeron en los años de 1915 por Edward Twort y 1917 por Felix d'Herelle los cuales lograron aislar entidades capaces de lisar bacterias y este último fue quien les dio el nombre de bacteriófagos. Sus estudios fueron realizados para combatir la disentería y el primer tratamiento con bacteriófagos fue suministrado a niños que presentaron resultados favorables. Sus estudios fueron claves en el conocimiento acerca de los bacteriófagos y sus aplicaciones. D'Herelle incluso creó su propio laboratorio y comercializó cocteles de bacteriófagos (Gill & Hyman, 2010).

Mucho antes de la era antibiótica, los bacteriófagos eran ampliamente utilizados para tratar enfermedades como disentería, cólera, infecciones del tracto urinario y tifoidea; y eran administrados vía oral, en aerosol, por infusiones en el colon y mediante inyecciones. Los mejores resultados se obtuvieron al aplicarlos de forma intravenosa, conservándose aún esta metodología (Kutter et al., 2013).

En la actualidad, esta tecnología se evolucionó en institutos de tres principales países. El Instituto Pasteur en Francia, el Instituto Hirsfeld de Inmunología y Terapia Experimental en Polonia y el Instituto Eliava de Bacteriofagia, Microbiología y Virología en Georgia la antigua Unión Soviética (Parasion, Kwiatek, Gryko, Mizak, & Malm, 2014).

Existen protocolos para el aislamiento de fagos los cuales han sido analizados, principalmente aquellos que se obtienen de muestras ambientales, muchos de los cuales requieren en sus metodologías el uso de equipos a los cuales no se tiene acceso.

## **2.2. Estudios Previos**

Se han realizado varias investigaciones sobre este tema principalmente en los campos de la medicina y de la industria alimenticia. Como se ha descrito previamente, el aislamiento y

utilización de bacteriófagos para eliminar bacterias se ha realizado durante décadas, teniendo como mayor exponente a Félix d'Herelle el cual realizó la mayoría de avances.

En los últimos años se han experimentado principalmente con bacterias como *Salmonella thypimorium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. Sin embargo existen reportes de 2010 en los cuales se han realizado los primeros aislamientos de bacteriófagos para *Acinetobacter baumannii*, sus fagos han sido caracterizados principalmente como fagos con cola, que poseen un material genético de ADN de doble cadena y que se comprenden dentro de las familias *Myoviridae*, *Podoviride* y *Siphoviridae* (Van Twest & Kropinski, 2009; Yang et al., 2010).

Se han aislado bacteriófagos de distintas fuentes naturales que contengan o puedan contener el patógeno. Las fuentes naturales son una de las alternativas para la obtención de bacteriófagos. La muestra puede tomarse en forma de agua, suelo, efluentes, materia fecal, entre otros. Es así, que es más probable obtener fagos contra patógenos entéricos en materia fecal o en aguas negras. Es por esto que las muestras se toman dependiendo el ambiente en el que se encuentre la bacteria objetivo (Gill & Hyman, 2010).

Dentro de las metodologías que han sido realizadas para el análisis de bacteriófagos destacan el aislamiento de fagos, el enriquecimiento de fagos y la caracterización de fagos.

En los estudio realizados por Van Twest & Kropinski (2009), Yang *et al* (2010), Cecilia Dini (2011), Spricigo (2011) y Sheng *et al* (2012), por nombrar algunos, para el aislamiento y caracterización de bacteriófagos de bacterias entero patogénicas, las metodologías utilizadas son generales y apropiadas para cualquier tipo de bacteria.

Existen algunos métodos de aislamiento de los cuales los más comunes son el directo y el enriquecido. En el aislamiento directo solamente se debe esterilizar la muestra, aunque

dependiendo de las características de la misma se deben realizar distintas metodologías por ejemplo, en el caso de aguas la centrifugación o filtración es suficiente pero en una muestra sólida se debe añadir un medio líquido que diluya el fago y luego se lo recupera por las mismas metodologías. En el caso del aislamiento por enriquecimiento se debe preparar un cultivo en fase exponencial de la bacteria de interés junto con un inóculo de la muestra estéril (Gill & Hyman, 2010).

La técnica más usada en obtención de bacteriófagos es la siembra en doble capa y para el recuento se presentan dos tipos, la primera es el análisis de la gota y la segunda es mediante estrías (Dini, 2011; Spricigo, Denis Augusto, 2011).

El medio recomendado y utilizado para el cultivo de cualquiera de las bacterias que fueron analizadas en los distintos estudios es Luria-Bertani (LB), que es un medio básico para el crecimiento de bacterias, modificado con la adición de  $MgSO_4$  ya que algunos fagos necesitan iones divalentes sea de magnesio o calcio en concentraciones entre 1-10mM para su adhesión o crecimiento celular. Además se utilizó bottom agar de 1,5% - 2% y top agar de 0,4 - 0,7% para los ensayos de doble capa, estos se han realizado en estudios previos con *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Bacillus* y también para *Acinetobacter baumannii* para la obtención de bacteriófagos (Dini, 2011; Kropinski, Mazzocco, Waddell, Lingohr, & Johnson, 2009; Shen et al., 2012; Spricigo, Denis Augusto, 2011; Van Twest & Kropinski, 2009).

Las condiciones de cultivo generales son de una temperatura de 35<sup>0</sup>C a 37<sup>0</sup>C y en agitación que puede ir de 50 a 150 rpm. Estos parámetros pueden variar dependiendo de las exigencias de la bacteria. Incluso se considera el uso de antibióticos para mantener el cultivo puro (Dini, 2011; Spricigo, Denis Augusto, 2011; Van Twest & Kropinski, 2009; Yang et al., 2010).

Para el aislamiento de los bacteriófagos de muestras de agua uno de los primeros pasos es la concentración, esto se logra añadiendo una cantidad determinada de muestra de agua a un cultivo en fase exponencial de la bacteria. Además según algunos protocolos se recomienda realizar diluciones para obtener una mejor placa. Las diluciones se realizan en buffer fosfato salino (PBS) suelen ser utilizadas para la obtención de placas producidas por bacteriófagos (Alexander, Strete, & Niles, 2003; Spricigo, Denis Augusto, 2011; Yang et al., 2010).

Estudios como el de Van Twest y Kropinski (2009) recomiendan el uso de filtros con un tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$  que presenten baja adherencia a proteínas. Por otro lado, el medio de conservación más utilizado fue el tampón SM y entre 25-50  $\mu\text{l}$  cloroformo/ml de SM y en algunos casos el buffer PBS. Algunos bacteriófagos de los géneros *Crystoviridae*, *Corticoviridae*, *Plasmaviridae* y *Tectiviridae* pueden presentar envoltura por lo cual pueden resultar muy sensibles a solventes orgánicos como lo es el cloroformo (Kropinski et al., 2009; Shen et al., 2012).

Una manera práctica para conocer la eficacia de los fagos obtenidos en los ensayos es un análisis de la densidad óptica del cultivo en presencia y ausencia del bacteriófago. Esto se definió como la cinética de infección y para ello se utilizó una dilución 1:100 de un cultivo de toda la noche (*overnight*, ON). Uno de sus estudios realiza mediciones de densidad óptica (OD) de 550 nm a diferentes temperaturas hasta alcanzar una OD de 0,2 después de este tiempo se inocula el fago y se continúan las mediciones cada 5 o 30 minutos (Spricigo, Denis Augusto, 2011). Se ha visto una tendencia que varios estudios presentan al momento de realizar pruebas de eficacia, esto es mediante el análisis de unidades de formación de placas (*plaque forming units*, PFU) (Dini, 2011; Shen et al., 2012; Spricigo, Denis Augusto, 2011; Yang et al., 2010).

Existen estudios de aislamiento de bacteriófagos para *Acinetobacter baumannii* realizados a partir del 2010, estos trabajos van dirigidos principalmente a la caracterización molecular de los

fagos obtenidos. De ellos se pueden tomar los parámetros de crecimiento utilizados, por ejemplo en el estudio de Yang *et al* (2010) utilizan una temperatura de incubación de 35<sup>0</sup>C durante 4 horas aunque pueden los parámetros varían entre experimentos dentro de los rangos generales previamente establecidos.

Los antecedentes descritos muestran el gran interés e importancia que presenta el estudio de *Acinetobacter baumannii*, aún más en este tiempo en el que los antibióticos resultan una solución poco efectiva a largo plazo. Es claro que las nuevas técnicas desarrolladas brindan una alternativa a la eliminación y control de bacterias resistentes a múltiples antibióticos lo cual muestra un futuro próspero en cuanto a salud mundial.

### 2.3. Marco Conceptual

**Antibióticos:** “La Real Academia de la lengua define como una sustancia química producida por un ser vivo o fabricada por síntesis, capaz de paralizar el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos, por su acción bacteriostática, o de causar la muerte de ellos, por su acción bactericida” (Real Academia Española, 2014).

**Bacteriófagos (fagos):** “virus que infecta y se replica dentro de las células bacterianas” (Shors, 2009, p. 605).

**Cepas resistentes a antimicrobianos:** La Real Academia de la lengua Española (2014) define a cepa como “grupo de organismos emparentados, como las bacterias, los hongos o los virus, cuya ascendencia común es conocida”. Y según la OMS la resistencia a antimicrobianos se define como “la resistencia de un microorganismo a un medicamento antimicrobiano al que originalmente era vulnerable. Los organismos resistentes (bacterias, hongos, virus y algunos parásitos) pueden resistir ataques de medicamentos antimicrobianos tales como antibióticos, fungicidas, antivirales y

antipalúdicos, de tal forma que los tratamientos convencionales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten, lo que incrementa el riesgo de propagación. La evolución de las cepas resistentes es un fenómeno natural que ocurre cuando los microorganismos se ven expuestos a fármacos antimicrobianos, y es posible un intercambio de características de resistencia entre ciertos tipos de bacterias. El uso inapropiado de medicamentos antimicrobianos acelera ese fenómeno natural. Las prácticas inapropiadas para el control de las infecciones propician la propagación de la resistencia a los antimicrobianos” (“OMS | Resistencia a los antimicrobianos,” 2013).

**Calvas:** “Área clara en una placa de cultivo bacteriano o en una mono capa en la que los virus destruyeron las células” (Shors, 2009, p. 614).

## Capítulo 3

### Metodología

#### 3.1. Materiales y Métodos

##### CEPAS Y AISLADOS BACTERIANOS

Se utilizaron cuatro cepas de *Acinetobacter baumannii* resistente a múltiples antibióticos provenientes de tres hospitales del Ecuador las cuales fueron facilitadas por el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI).

Las cepas utilizadas son:

**Tabla 1. Código INSPI de Cepas de *Acinetobacter baumannii* y su procedencia**

**Fuente:** INSPI, 2014.

**Elaborado por:** López, 2015

<b>CEPA</b>	659	742	743	746
<b>HOSPITAL</b>	Provincial General de Latacunga	Cuenca	Cuenca	Pablo Arturo Suarez
<b>CÓDIGO</b>	1	2	3	4

Todas las cepas pertenecen a aislados obtenidos de pacientes hospitalizados y corresponden a los registros del año 2014.

Cada una de las cepas presenta un cuadro de resistencia el cual se detalla a continuación. Además mediante un análisis bioquímico se verificó en el mismo INSPI que las muestras entregadas fueran verdaderamente *Acinetobacter baumannii*.

**Tabla 2. Resultados de determinación de *Acinetobacter***

**Fuente:** INSPI, 2014.

**Elaborado por:** López, 2015

<b>PRUEBA BIOQUÍMICA</b>	
<b>MÉTODO</b>	<b>RESULTADO</b>
<b>Kliger</b>	No fermentador
	no enterobacteria
<b>Citrato</b>	Positivo
<b>Lisina</b>	Positivo
<b>Malonato</b>	Positivo
<b>SIM</b>	No motil
	Indol negativo
<b>MRVP</b>	Rojo de Metilo Negativo
	Vogesproskauer Negativo
<b>Oxidasa</b>	Negativa

**Tabla 3. Antibiograma de cada cepa de *Acinetobacter baumannii***

Fuente: INSPI, 2014.

Elaborado por: López, 2015

ANTIBIOGRAMA					
Antibiótico	Abreviación	1	2	3	4
Meropenem	MEM	R (6)	R (6)	R(6)	R(7)
Imipenem	IMP	R (6)	R (10)	R(10)	R(10)
Ampicilina/Sulbactam	SAM	R(8)	S (15)	S(15)	R(9)
Piperaciclina/Tazobactam	TPZ	R(9)	R (6)	R(6)	R(9)
Ceftriaxone	CRO	R (6)	R (6)	R(6)	R(8)
Cefepime	FEP	R (6)	R (6)	R(6)	R(6)
Gentamicina	CN	R (6)	-	-	-
Amikacina	AK	R(11)	-	-	-
Ciprofloxacina	CIP	R (6)	-	-	-
Sulfatrimetoprim	SXT	R (6)	R (6)	-	-
Ceftazidima	CAZ	-	-	R(6)	R(12)

(0): diámetro en mm, R: resistente, S: susceptible, -: sin datos

Las muestras fueron entregadas en placa y se encontraban en medio semisólido con siembra por desgaste.

### MEDIOS DE CULTIVO Y BUFFERS

Los medios de cultivo y buffers fueron adaptados de Van Twest & Kropisnki, 2009; Alexander et al, 2003.

#### Medios de Cultivo:

<b>LEM- LB modificado</b>	<b>1L</b>
Extracto de Levadura	5 g
NaCl	5 g
Bacto Triptona	10 g
1M MgSO4	10 ml

**Top Agar**

Al medio LEM se le agregó Agar-Agar en una concentración del 0,7%

**Bottom Agar**

Al medio LEM se le agregó Agar-Agar en una concentración del 1,5%

<b>Terrific Broth TB modificado</b>	<b>100 mL</b>
Peptona	10 g
Extracto levadura	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8 g

Ajustar pH a 7,6 HCl

**Buffers:**

<b>SM</b>	<b>1L</b>
NaCl	5.8 g
MgSO <sub>4</sub> & H <sub>2</sub> O	2.0 g
1M Tris HCl pH 7,4	50 ml
Agar-Agar	0,1 g

Todos los medios y buffers fueron esterilizados en autoclave a 121<sup>0</sup>C y 1 atm durante 15 minutos.

El top agar se fundió y se colocó en el inoculo a una temperatura entre 45-50 <sup>0</sup>C.

**MUESTRAS DE AGUA**

Las muestras de agua fueron obtenidas de los ríos Machángara, San Pedro y Guayllabamba. La muestra del río Machángara se obtuvo antes de llegar al Reservorio de Cumbayá, la muestra del río San Pedro se tomó en San Pedro de Taboada y la muestra del río Guayllabamba se tomó cerca

de la carretera Panamericana junto a las canteras ([Anexo A](#)). Estas zonas fueron elegidas por su posibilidad de acceso al río y considerando no tomar muestras de agua previamente tratada.

Se utilizaron frascos de acero inoxidable previamente esterilizados con yodo y alcohol, la muestra fue tomada a un metro de profundidad para evitar los efectos de la luz en las muestras de agua. Las muestras fueron transportadas al laboratorio en contenedores que mantengan la temperatura. Además se tomaron mediciones de pH y temperatura de cada muestra obtenida.

### **CONSERVACIÓN DE CEPAS**

Para su uso en los experimentos realizados se realizó un cultivo líquido saturado en medio LEM. Para ello se tomó una sola colonia de la placa con una punta de micro pipeta y se colocó dentro del medio líquido LEM al cual previamente se le agregó ampicilina de un stock de 100 mg/ml, en una proporción de 1:1000.

Después de 16 horas, lo cual se considerará overnight (ON), se conservó en glicerol en una concentración del 70%, a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  en un congelador.

### **CULTIVO SATURADO DE *Acinetobacter Baumannii***

Los cultivos de cada una de las cepas de *Acinetobacter baumannii* se realizaron en medio LEM líquido al cual se añadió ampicilina en una proporción 1:1000 y se incubó a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  y con agitación de 150 rpm durante 16 horas (ON).

### **OBTENCIÓN CULTIVO EN FASE EXPONENCIAL**

Los cultivos en fase exponencial se obtuvieron tomando un cultivo en fase saturado del día anterior (También cultivos líquidos que no tuvieran más de una semana en el laboratorio). Y se

realizó una dilución 1:5 del cultivo saturado en medio LEM líquido y se incubó a 37<sup>0</sup>C en una incubadora con agitación de 150 rpm durante 2 horas.

### **SIEMBRA EN DOBLE CAPA**

La siembra en doble capa se realizó preparando previamente placas con bottom agar y conservándolas a 4<sup>0</sup>C en una refrigeradora. Al momento del ensayo las placas de bottom agar fueron temperadas a 37<sup>0</sup>C en una incubadora y se colocó top agar que se encontraba a una temperatura entre 45-50<sup>0</sup>C.

### **PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE AGUA**

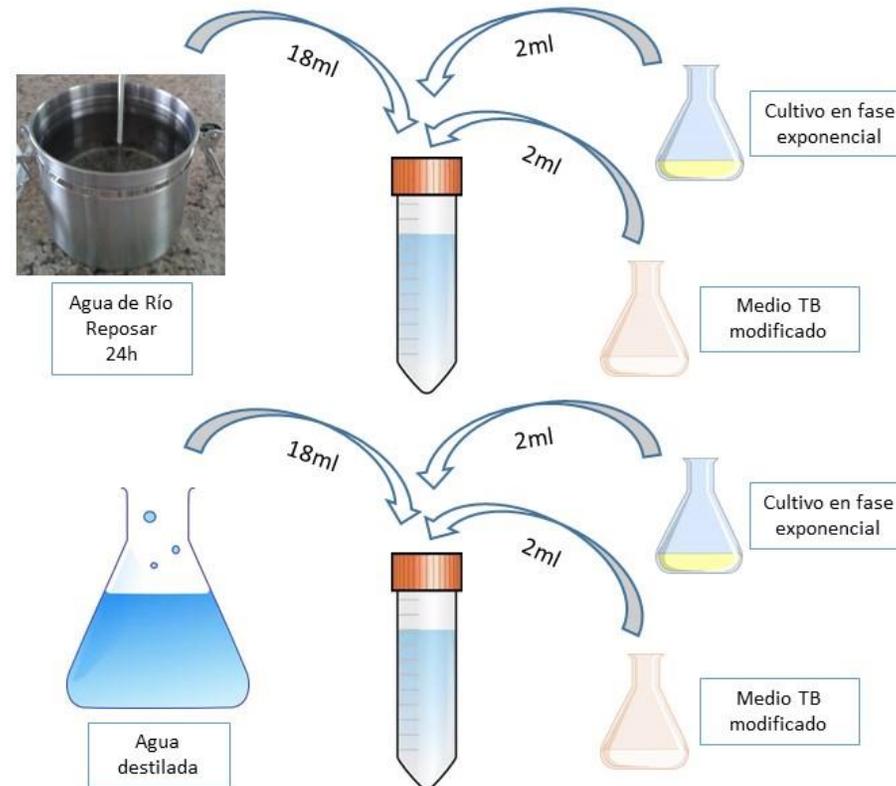
Las muestras de agua debieron ser procesadas previo al aislamiento de bacteriófagos. Este proceso se realizó sedimentando la muestra de agua durante 24 horas mínimo. Después de este tiempo, en 2 tubos Falcon de 50 ml se colocó 2 ml de TB modificado junto con 2 ml de cultivo en fase exponencial y 18 ml de agua en cada uno. En uno de ellos se añadió agua destilada, el cual representaría el grupo control, y en el otro el agua de río sin filtrar.

Se midió la densidad óptica inicial de ambas muestras a 600 nm y se tomó una medición después de una hora y a partir de allí se realizaron mediciones en intervalos de 30 minutos. Aquella muestra que presentó una disminución en la curva de crecimiento se consideró que contenía bacteriófagos por lo que se priorizó el uso de dicha muestra de agua para el aislamiento de bacteriófagos. Las muestras se dejaron ON y se centrifugaron a 5000 rpm por 20 minutos, el sobrenadante (SN) se traspasó a un nuevo tubo Falcon de 50 ml y se centrifugó nuevamente a 5000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se pasó por un filtro de nylon de 0,45 µm de diámetro solamente en uno de los ensayos.

#### Ilustración 4. Procesamiento de Muestras de Agua

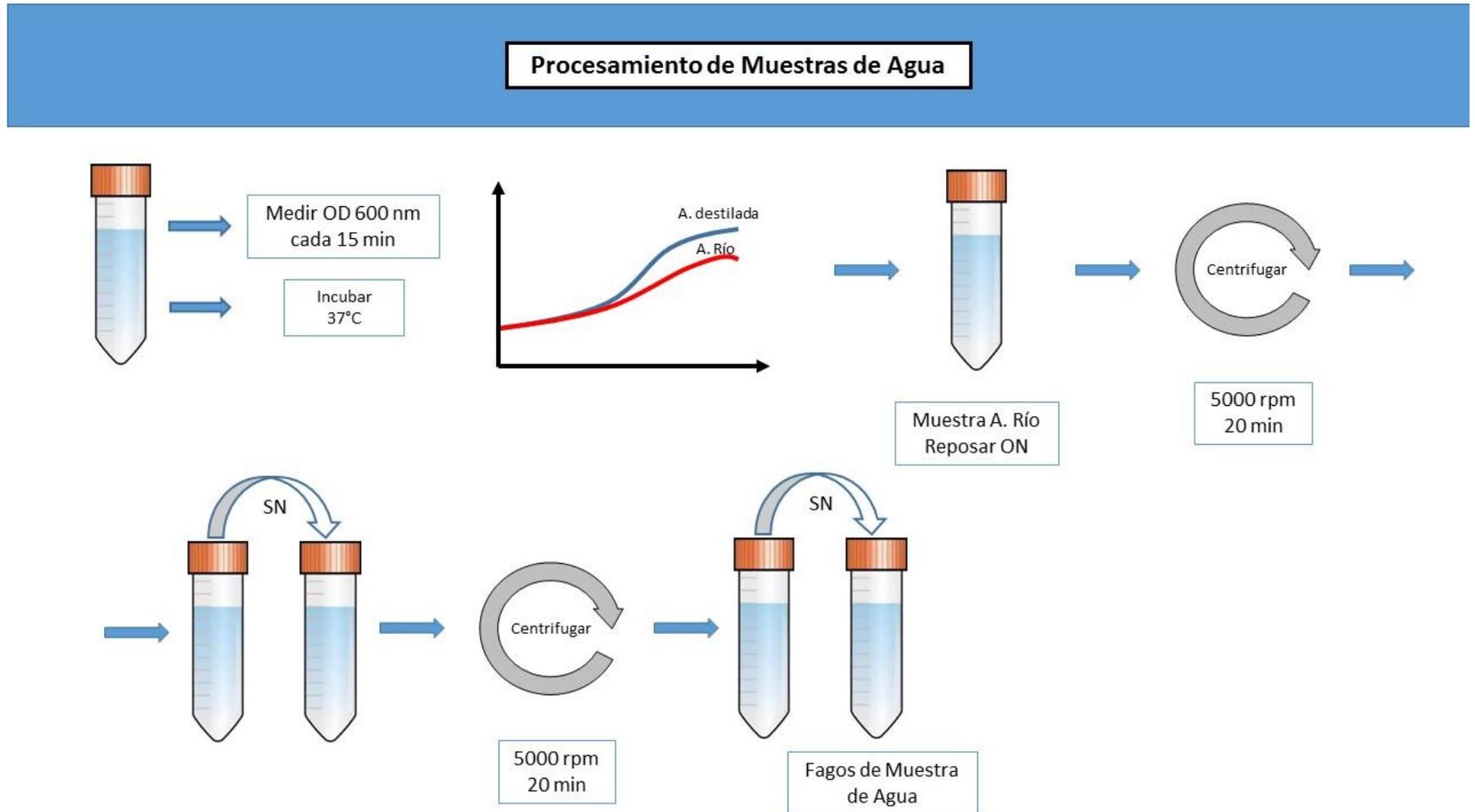
Elaborado por: López, 2015

##### Procesamiento de Muestras de Agua



## Ilustración 5. Procesamiento de muestras de agua (Continuación)

Elaborado por: López, 2015



## **AISLAMIENTO DE FAGOS DE LA MUESTRA DE AGUA POR ENRIQUECIMIENTO**

Para el aislamiento de fagos fue necesario preparar una dilución seriada de la muestra de agua procesada. Para ello se colocaron 5 tubos de ensayo estériles en una gradilla, a cada uno de los tubos se le añadieron 9 ml TB modificado. Al primer tubo se le adicionó 1 ml de muestra de agua procesada se agitó y se tomó 1 ml del tubo uno y se añadió al tubo 2 este se agitó y se procedió de la misma manera con el resto de tubos.

Por otro lado se preparó un cultivo ON de cada cepa en medio LEM líquido, se colocaron 2 ml del cultivo ON en un tubo de ensayo estéril junto con 1 ml de la muestra de agua procesada y se incubó a 37<sup>0</sup>C durante 10 minutos. Después de este tiempo se añadieron 10 ml de top agar (Medio LEM 0,7) al tubo.

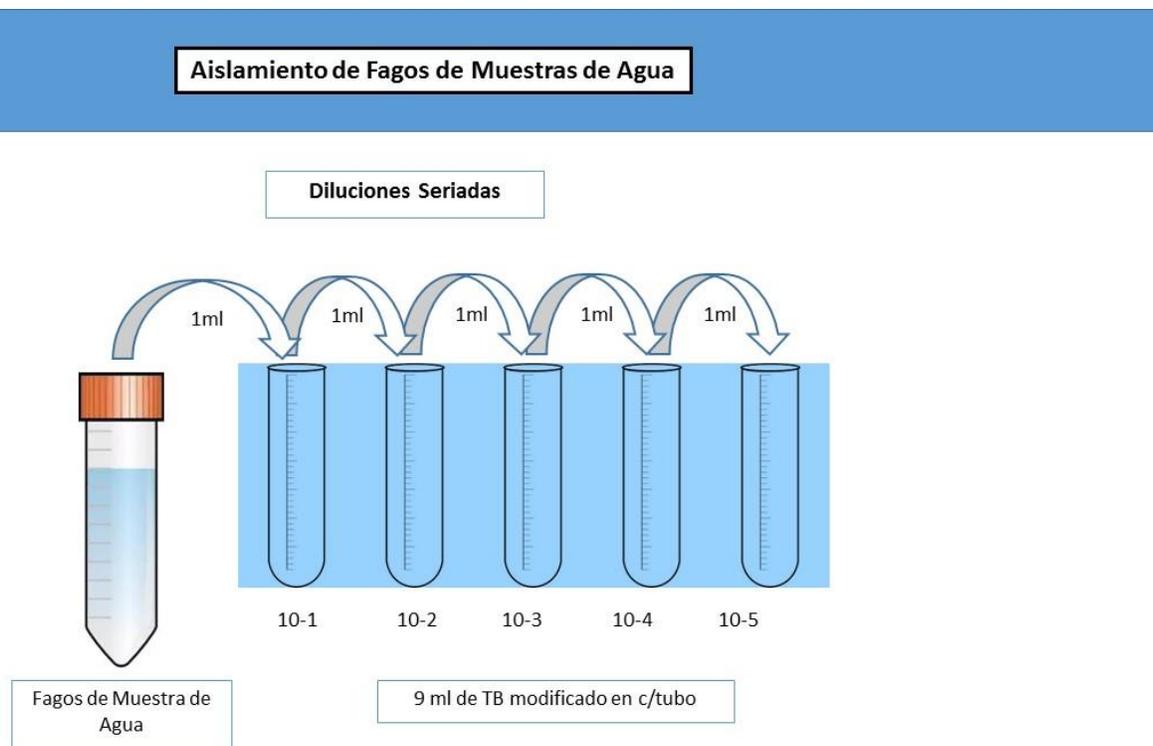
Previamente se colocaron las placas de bottom agar (LEM 1,5%) en la incubadora a 37<sup>0</sup>C para evitar colocar el top agar en placas frías. Y se colocó la mezcla previa de top agar junto con el cultivo sobre las placas temperadas y se incubaron ON a 37<sup>0</sup>C.

Después de transcurrido este tiempo se evaluaron las placas y se buscó la presencia de calvas. Cada calva fue extraída, tanto el top agar como el bottom agar, mediante una punta de micro pipeta esterilizada previamente cortada al tamaño aproximado de una calva. Ambas capas de medio extraídos se colocaron en un tubo Eppendorf que contenía 1 ml de buffer SM junto con 10 µl de cloroformo. El medio se mezcló completamente en el buffer con la ayuda de una micropipeta y se almacenó a una temperatura de 4<sup>0</sup>C.

Se realizaron ensayos probando diferentes medios de conservación de bacteriófagos, entre ellos TB, SM y LEM con concentraciones de cloroformo de 0  $\mu$ l, 10  $\mu$ l y 20  $\mu$ l.

### Ilustración 6. Aislamiento de Fagos de Muestras de Agua

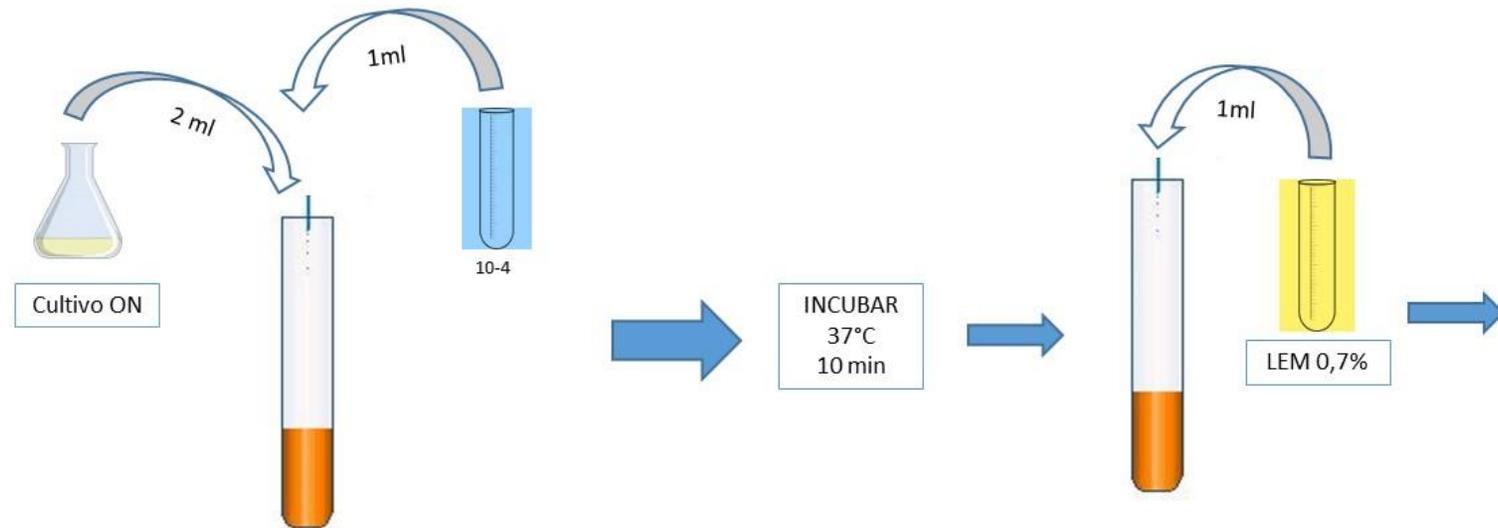
Elaborado por: López, 2015



### Ilustración 7. Aislamiento de Fagos de Muestras de Agua (Continuación)

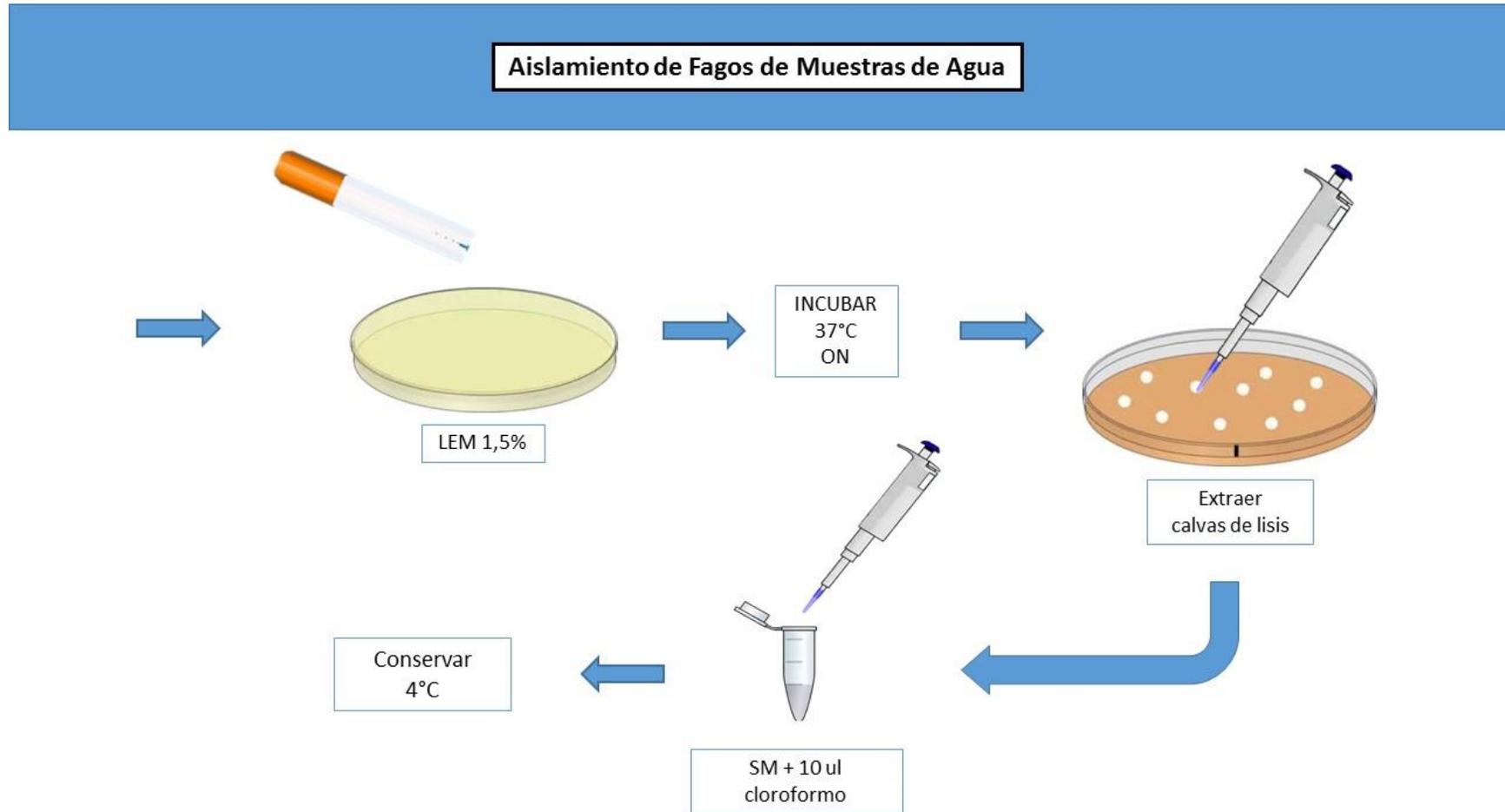
Elaborado por: López, 2015

#### Aislamiento de Fagos de Muestras de Agua



## Ilustración 8. Aislamiento de Fagos de Muestras de Agua (Continuación)

Elaborado por: López, 2015



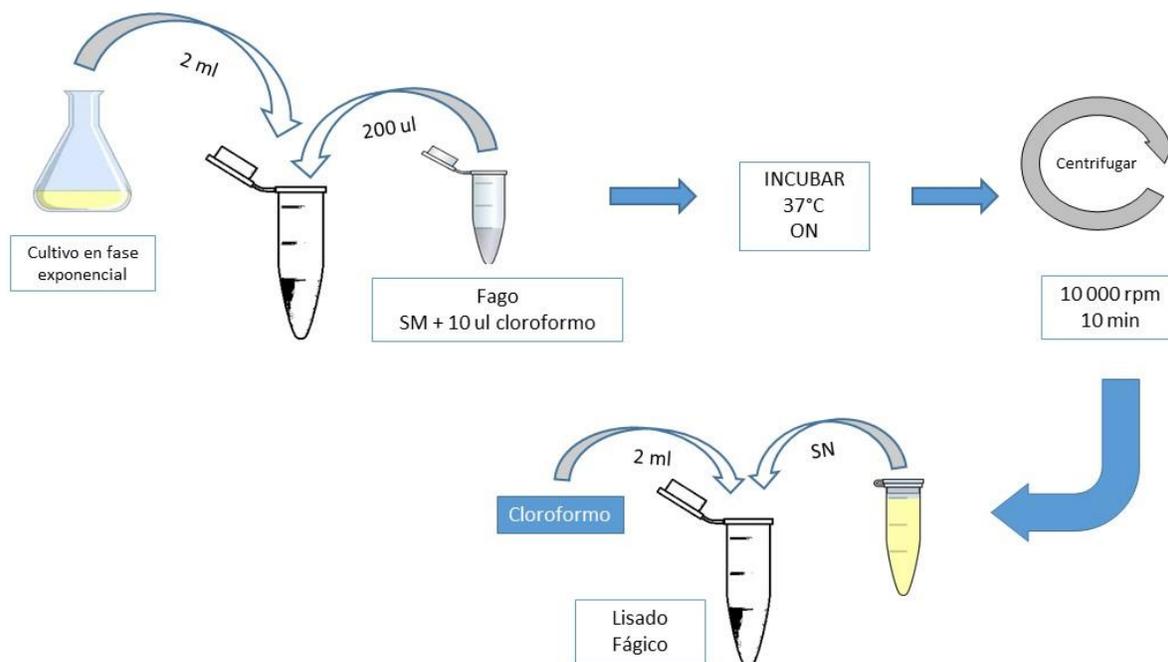
## LISADOS EN MEDIO LÍQUIDO

Para obtener una mayor concentración de bacteriófagos se tomó 2 ml de un cultivo en fase exponencial y se agregó 200  $\mu$ l de aislado fágico. Se incubó a 37<sup>0</sup>C durante 16 horas, se centrifugó el cultivo a 10 000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante, se añadieron 10  $\mu$ l de cloroformo y se conservaron las muestras a 4<sup>0</sup>C.

### Ilustración 9. Lisado en medio líquido

Elaborado por: López, 2015

#### Lisado en Medio Líquido



## PRUEBA DE LA GOTA

Para la realización de esta prueba se preparó un cultivo en fase exponencial, y se colocaron 2 ml de este cultivo a un tubo de ensayo estéril al cual se le adicionó 10 ml de top agar, el cual se colocó sobre una placa Petri con bottom agar previamente temperada a 37<sup>0</sup>C. Se dejaron enfriar las placas en una cámara de flujo laminar o en la zona estéril alrededor de un mechero durante 10 minutos.

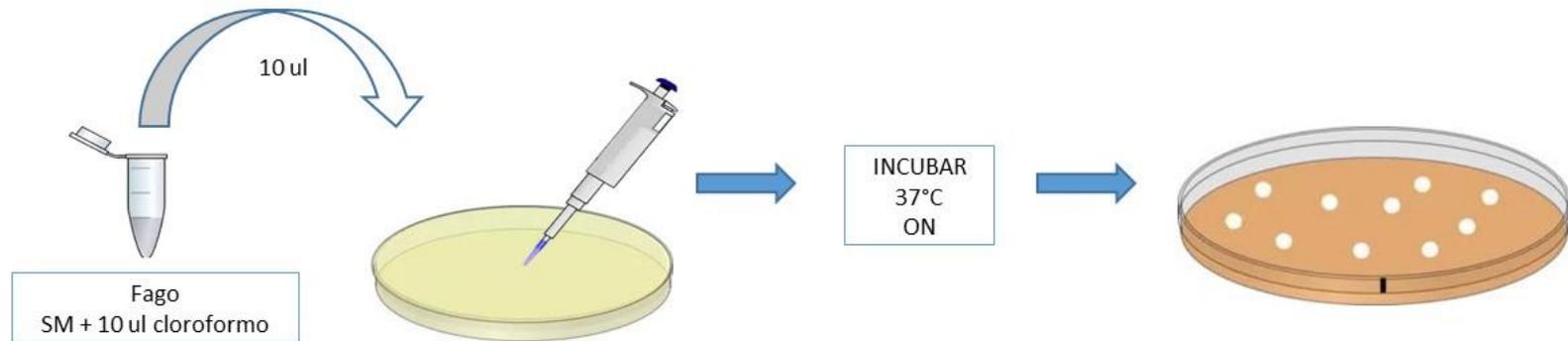
Después de este tiempo el agar estaba completamente solidificado por lo que se procedió a realizar la prueba de la gota. Para ello se colocaron 10 µl de cada fago conservado en los distintos medios en una distribución que permitiera su identificación posterior.

Se dejaron secar las gotas durante 10 minutos en una cámara de flujo laminar o alrededor de un mechero y se incubaron las placas boca abajo a 37<sup>0</sup>C durante 16 – 20 horas. Después de este tiempo se observó si existían zonas de lisis.

## Ilustración 10. Prueba de la Gota

Elaborado por: López, 2015

### Prueba de la Gota



### **VERIFICACIÓN DE FAGOS NO CONTAMINADOS**

Se verificó que los lisados en medio líquido y los fagos conservados en SM no estuvieran contaminados mediante la colocación de 10 µl de cada lisado fágico en una placa Petri con bottom agar. Se incubó ON a 37<sup>0</sup>C tiempo después del cual se observó la presencia de contaminaciones bacterianas en cada marca de gota colocada.

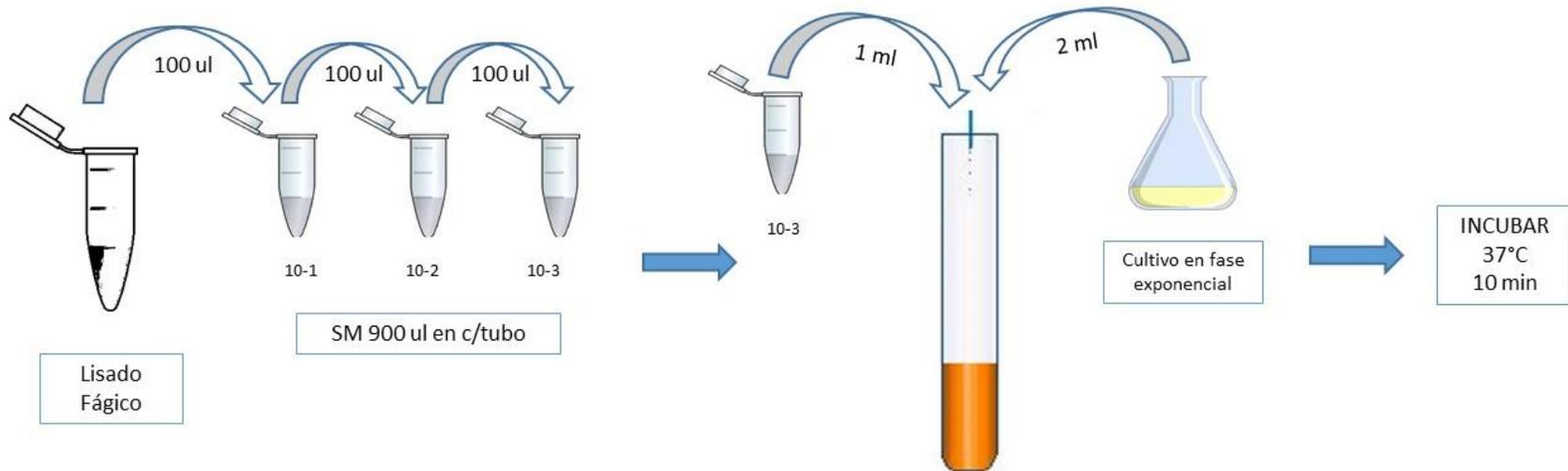
### **TITULACIÓN DE LISADOS FÁGICOS**

Se realizaron diluciones seriadas del lisado en medio líquido LEM, se añadieron 900 µl de SM y 100 µl de fago en SM + 10 µl de cloroformo y se sembraron las diluciones en cultivo de doble capa añadiendo 1 ml de la dilución, 2 ml de cultivo en fase exponencial, se incubó durante 10 minutos a 37<sup>0</sup>C, se agregaron 10 ml de top agar y se realizó siembra en doble capa.

## Ilustración 11. Titulación de Lisados Fágicos

Elaborado por: López, 2015

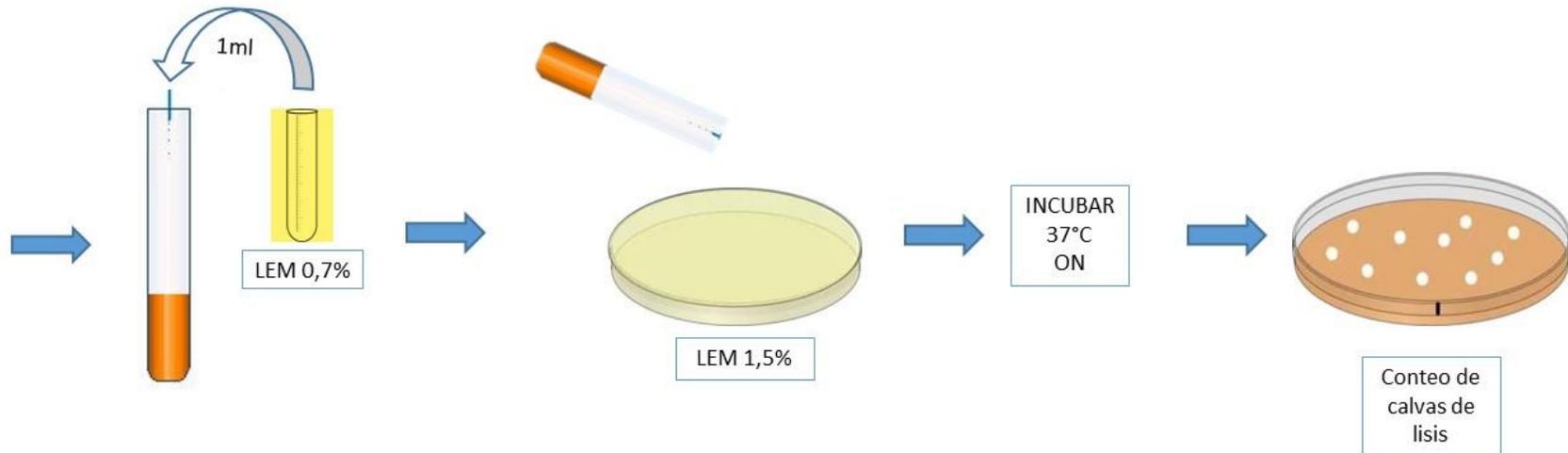
### Titulación de Lisados Fágicos



## Ilustración 12. Titulación de Lisados Fágicos (Continuación)

Elaborado por: López, 2015

### Titulación de Lisados Fágicos



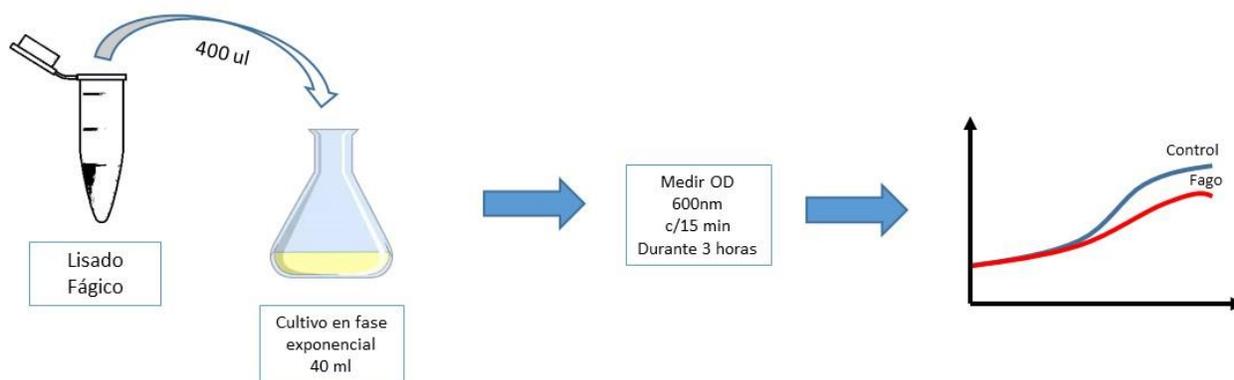
## CINÉTICA DE INFECCIÓN DE BACTERIÓFAGOS

Para conocer la cinética de infección de bacteriófagos se preparó un cultivo en fase exponencial al cual se inoculó el fago correspondiente a un lisado en medio líquido, se midió la densidad óptica inicial a 600 nm en un espectrofotómetro y se realizaron mediciones cada 15 minutos durante 3 horas.

### Ilustración 13. Cinética de Bacteriófagos

Elaborado por: López, 2015

#### Cinética de Bacteriófagos



## Capítulo 4

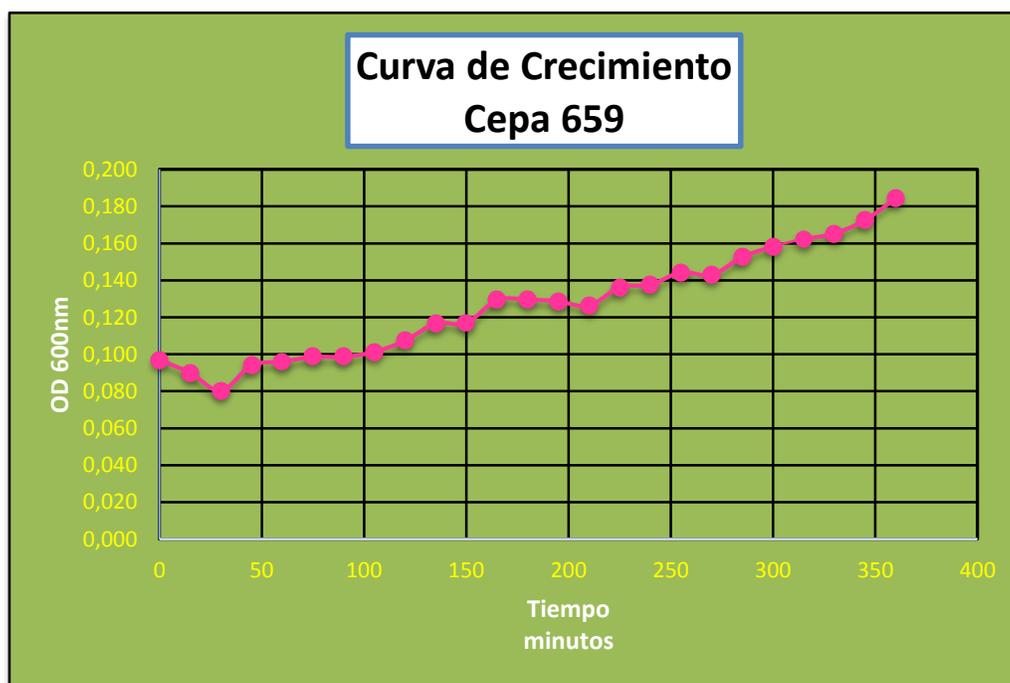
### Resultados y Discusión

#### 4.1. Resultados

Se realizaron curvas de crecimiento para determinar el tiempo en el cual las cepas de *Acinetobacter baumannii* se encontraban en fase exponencial. A continuación se muestran los resultados obtenidos para cada una de las cepas.

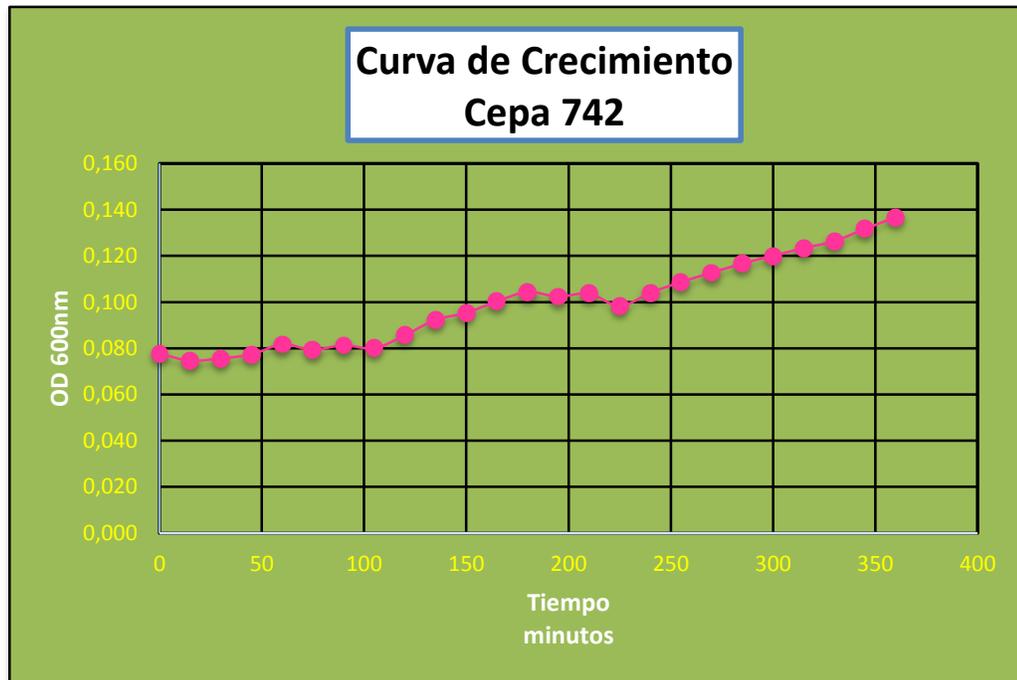
**Ilustración 14. Curva de Crecimiento Cepa 659**

Elaborado por: López, 2015

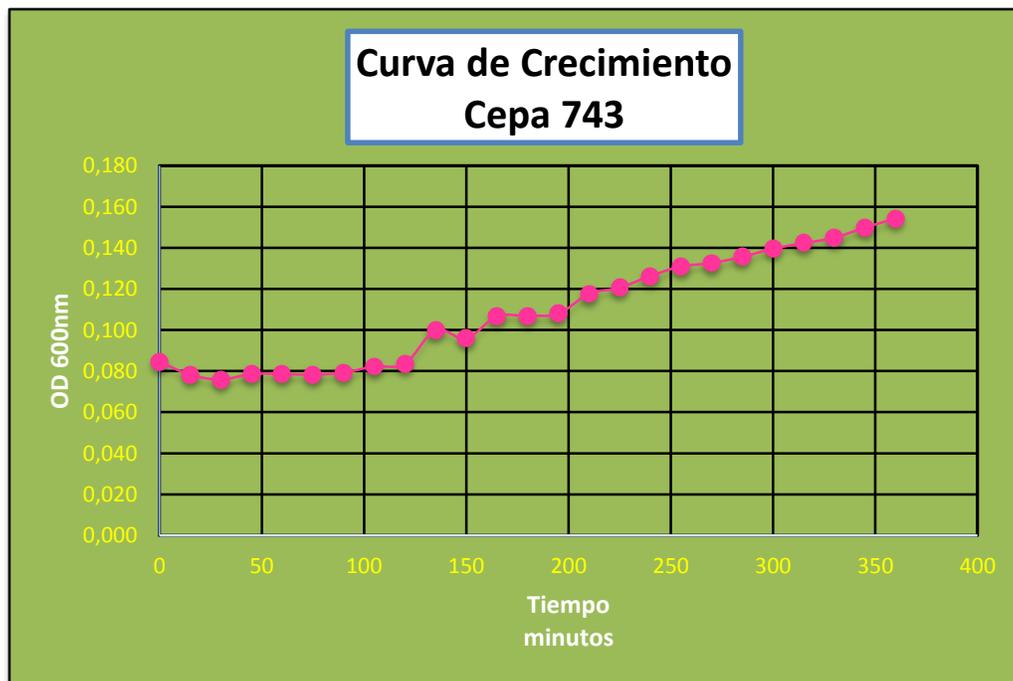


**Ilustración 15. Curva de Crecimiento Cepa 742**

Elaborado por: López, 2015

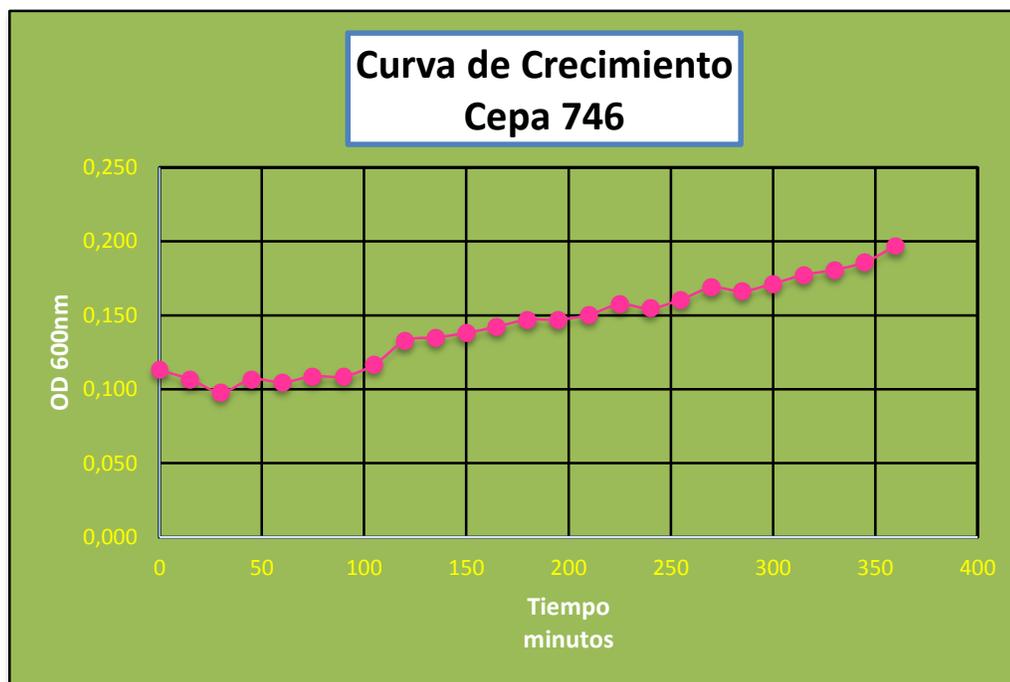
**Ilustración 16. Curva de Crecimiento Cepa 743**

Elaborado por: López, 2015



### Ilustración 17. Curva de Crecimiento Cepa 746

Elaborado por: López, 2015



### PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS MUESTRAS DE AGUA

Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos de muestras de agua de río

Elaborado por: López, 2015

Muestra	pH	Temperatura °C
Machángara	7,1	20
San Pedro	7,9	16
Guayllabamba	7,6	18

## **OBTENCIÓN Y AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS**

Se realizaron pruebas para obtener bacteriófagos a partir de muestras de agua variando protocolos encontrados en la literatura. Se logró obtener un protocolo útil para la obtención de calvas de lisis.

### **Protocolo para la obtención de bacteriófagos a partir de muestras de agua:**

1. Sedimentar la muestra de agua durante 24 horas mínimo.
2. En 2 tubos Falcon de 50 ml colocar 2 ml de TB modificado + 2 ml de cultivo en fase exponencial + 18 ml de agua de río en uno de ellos y agua destilada en el otro (control).
3. Medir la densidad óptica a 600nm realizar las curvas de crecimiento para conocer si existe un descenso en algún punto de la curva.
4. Incubar a 37°C ON.
5. Después del transcurrido este tiempo, preparar una dilución seriada de la muestra de agua procesada. Colocar 5 tubos de ensayo estériles en una gradilla, a cada uno de los tubos se añadir 9 ml TB modificado. Al primer tubo adicionar 1 ml de muestra de agua procesada agitar y tomar 1 ml del tubo uno y colocarlo al tubo 2, agitar y repetir el procedimiento con el resto de tubos.
6. Por otro lado preparar un cultivo ON de cada cepa en medio LEM líquido.
7. Colocar 2 ml del cultivo ON en un tubo de ensayo estéril junto con 1 ml de la muestra de agua procesada. Incubar a 37°C durante 10 minutos.
8. Añadir 10 ml de top agar (Medio LEM 0,7) al tubo y colocar en un placa con bottom agar previamente temperada a 37°C.
9. Dejar solidificar el top agar e incubar a 37°C ON.

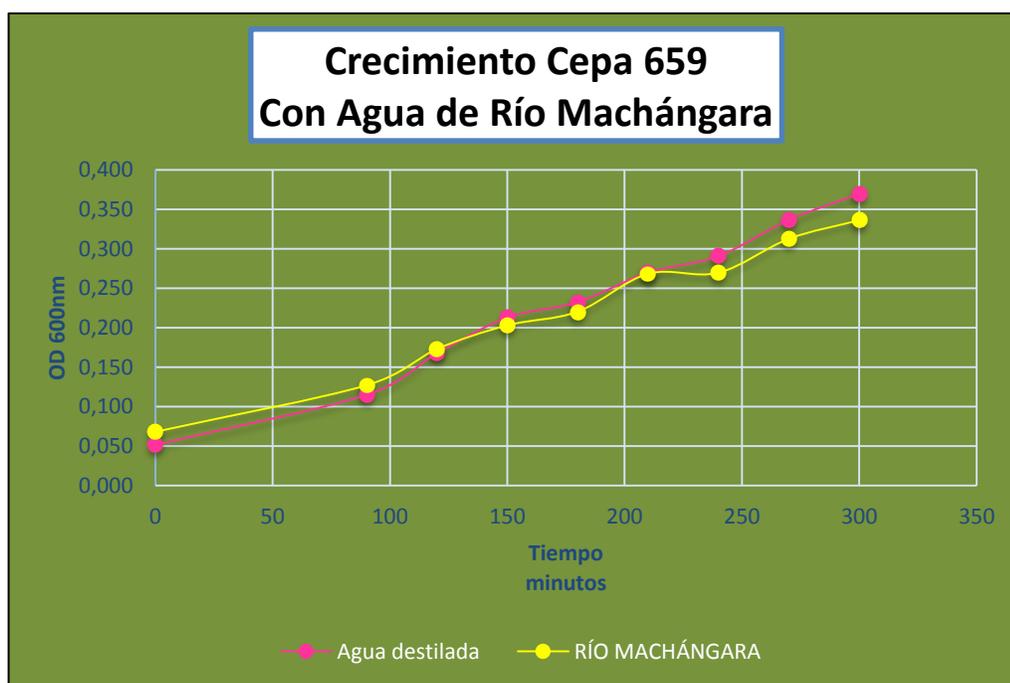
10. Después de este tiempo, buscar la presencia de calvas de lisis.
11. Extraer la calva con una punta cortada de micropipeta (ambas capas de agar).
12. Colocar ambas capas de medio extraídos en un tubo Eppendorf con 1 ml de buffer SM + 10  $\mu$ l de cloroformo. Homogeneizar la mezcla y conservar a 4<sup>o</sup>C en un congelador.

Las muestras del procesamiento de muestras de agua que fueron filtradas no produjeron calvas de lisis.

Por medio del método de procesamiento de muestras de agua se obtuvieron los siguientes resultados:

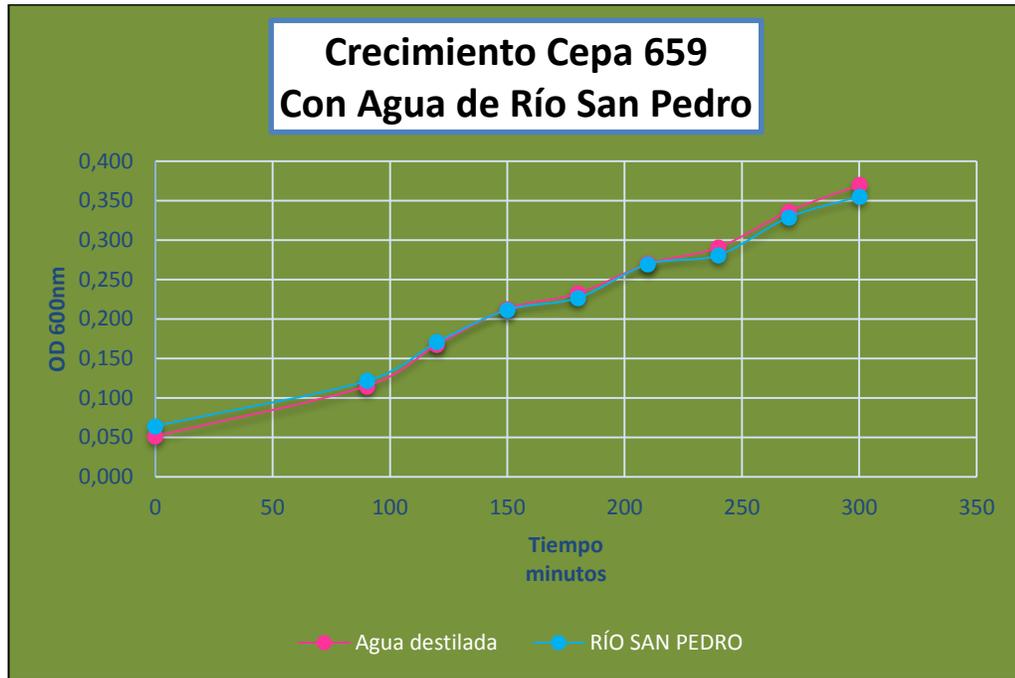
### Ilustración 18. Crecimiento cepa 659 con agua de río Machángara

Elaborado por: López, 2015



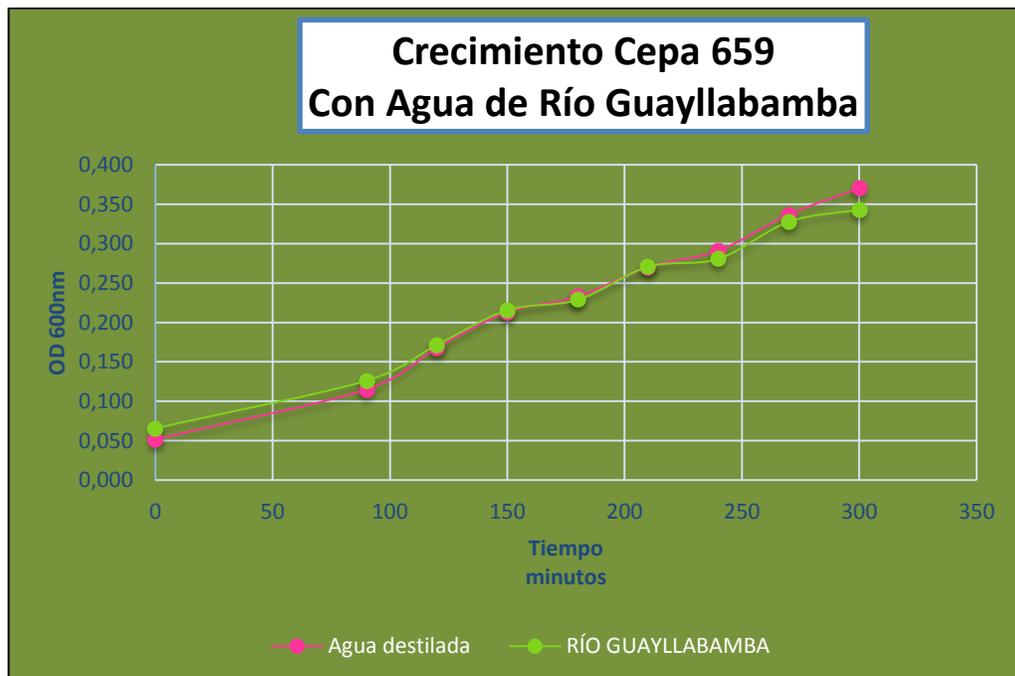
### Ilustración 19. Crecimiento cepa 659 con agua de río San Pedro

Elaborado por: López, 2015



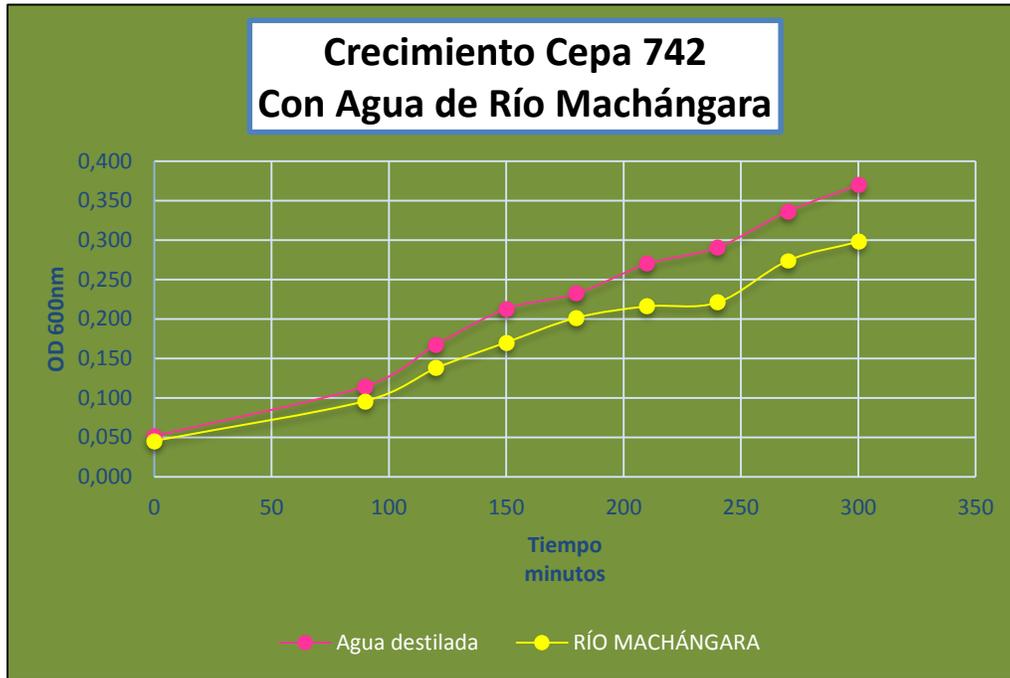
### Ilustración 20. Crecimiento cepa 659 con agua de río Guayllabamba

Elaborado por: López, 2015



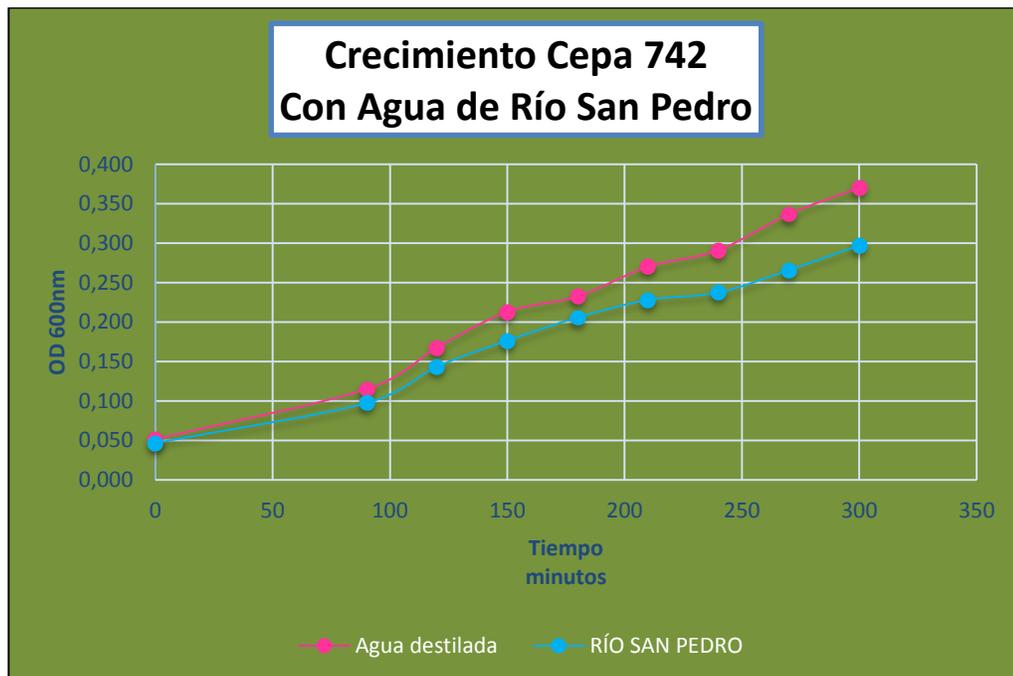
**Ilustración 21. Crecimiento cepa 742 con agua de río Machángara**

Elaborado por: López, 2015



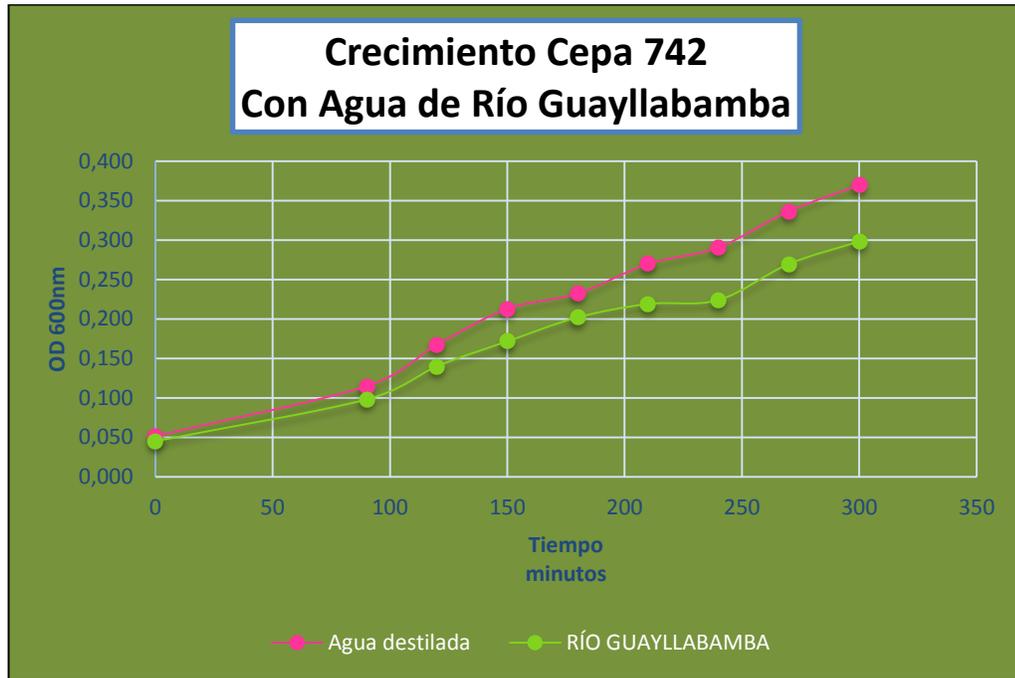
**Ilustración 22. Crecimiento cepa 742 con agua de río San Pedro**

Elaborado por: López, 2015



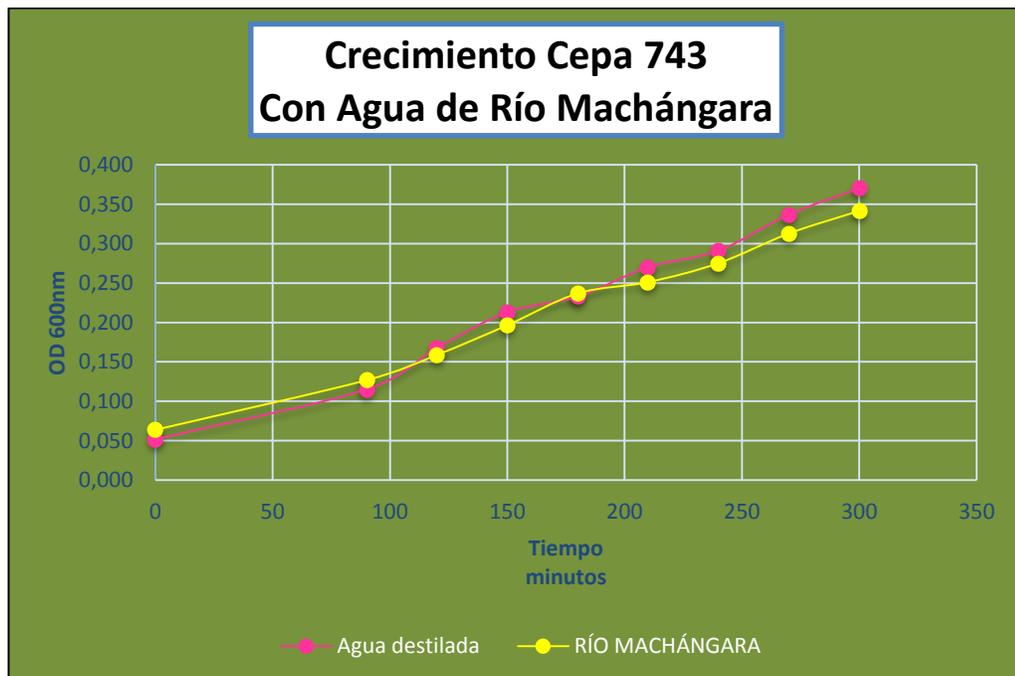
### Ilustración 23. Crecimiento cepa 742 con agua de río Guayllabamba

Elaborado por: López, 2015



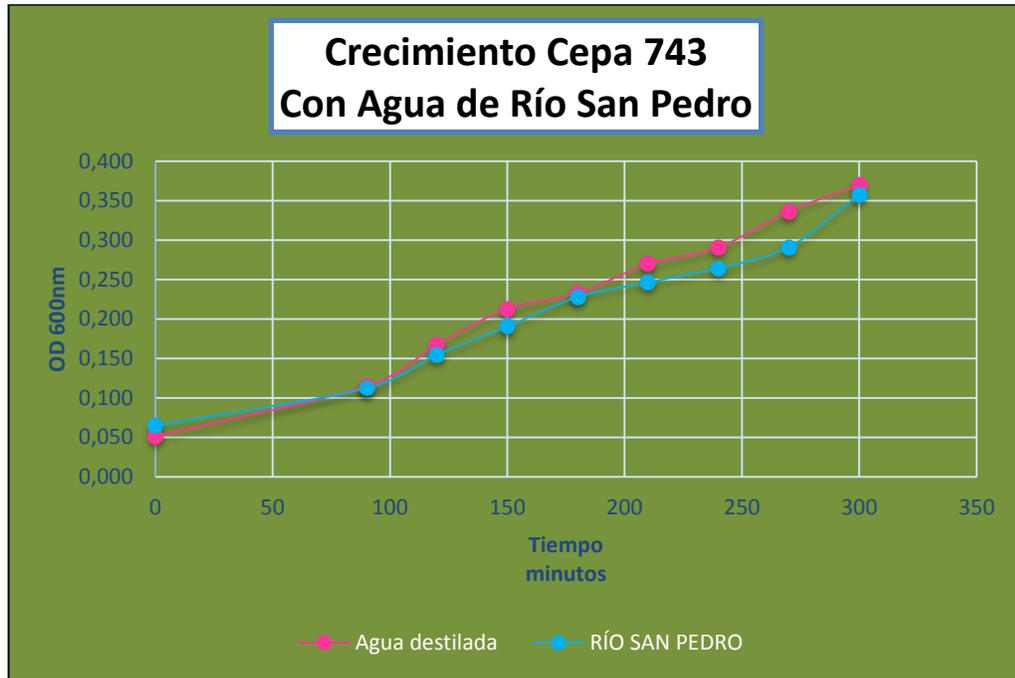
### Ilustración 24. Crecimiento cepa 743 con agua de río Machángara

Elaborado por: López, 2015



### Ilustración 25. Crecimiento cepa 743 con agua de río San Pedro

Elaborado por: López, 2015



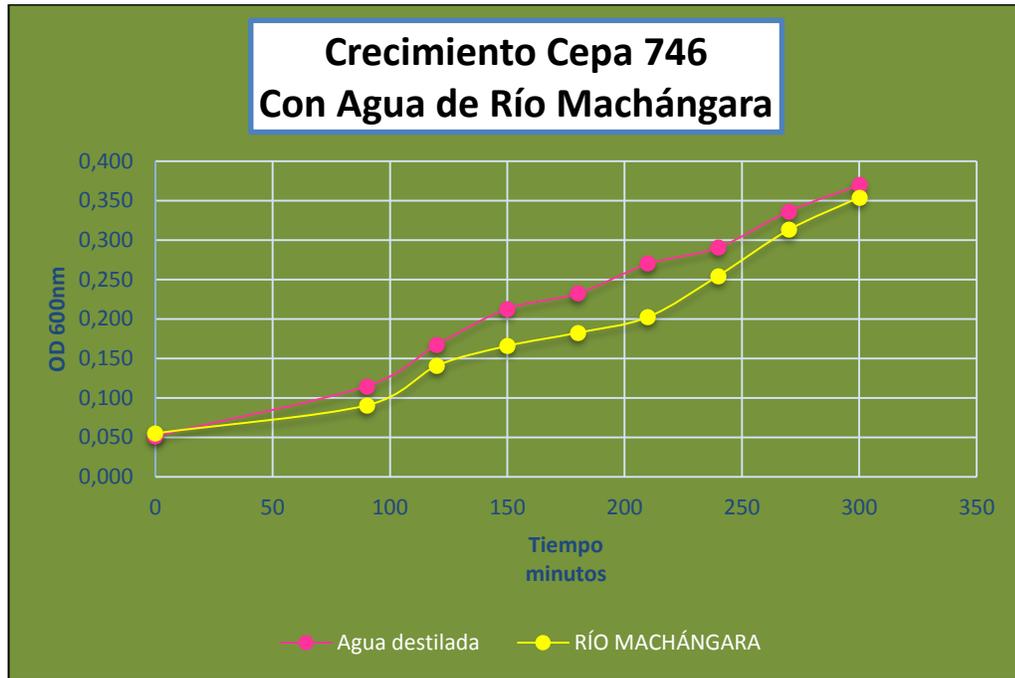
### Ilustración 26. Crecimiento cepa 743 con agua de río Guayllabamba

Elaborado por: López, 2015

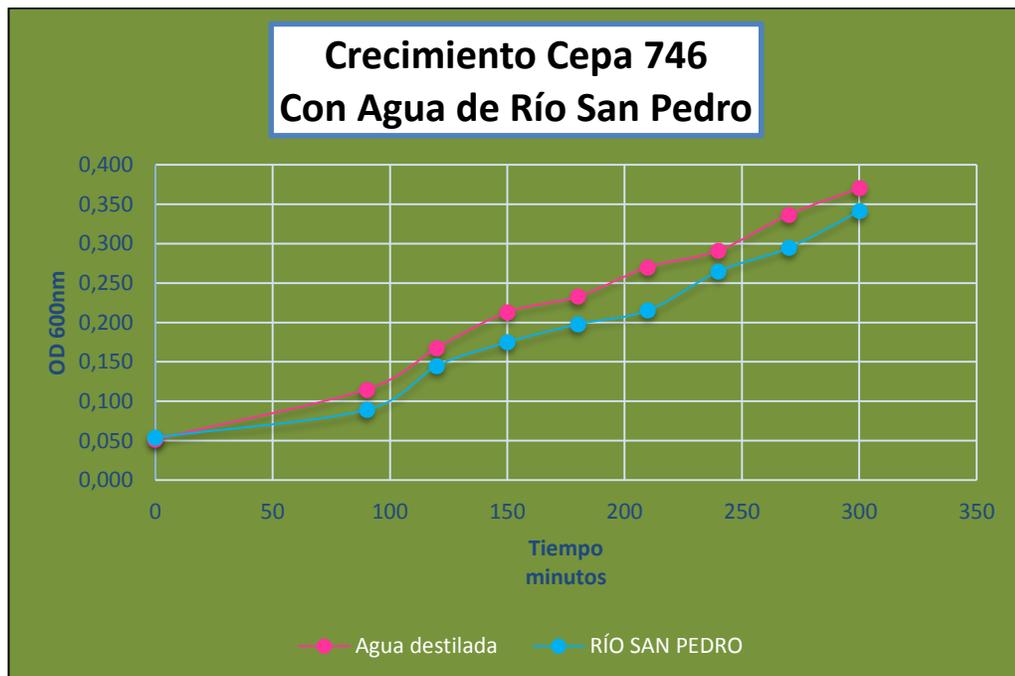


**Ilustración 27. Crecimiento cepa 746 con agua de río Machángara**

Elaborado por: López, 2015

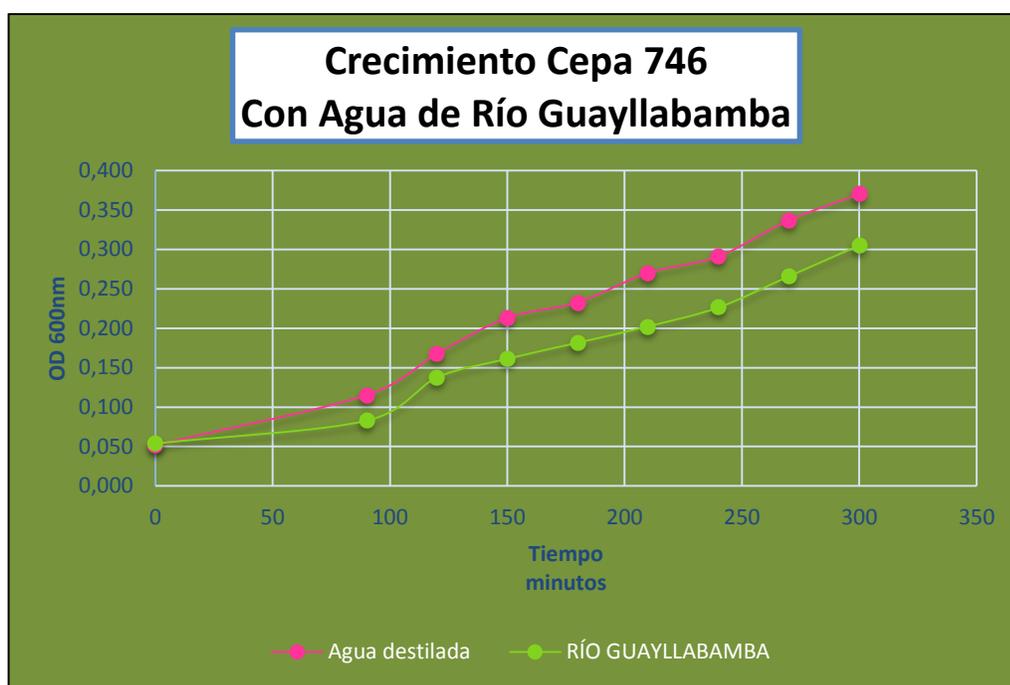
**Ilustración 28. Crecimiento cepa 746 con agua de río San Pedro**

Elaborado por: López, 2015



**Ilustración 29. Crecimiento cepa 746 con agua de río Guayllabamba**

Elaborado por: López, 2015



Se realizaron pruebas con concentraciones de 0, 10 y 20  $\mu$ l de cloroformo y con diferentes medios de conservación de fagos. Además se probaron tres tipos distintos de buffer de conservación de fagos. Se realizaron los ensayos por triplicado y se obtuvieron resultados de calvas totales y resultados de la incidencia de calvas en dos de los tres ensayos los cuales se muestran en las tablas a continuación.

## ENSAYO CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CLOROFORMO

### Leyenda:

O – calvas totales

# - contaminación

○ – calvas presentes en dos de tres ensayos

- sin resultados

**Tabla 5. Ensayo con 0 µl de cloroformo**

**Elaborado por: López, 2015**

0 µl	1	2	3	4
C01	#	#	#	#
C02	#	#	#	#
C03	#	#	#	#
C04	#	#	#	#
C05	#	#	#	#
C06	#	#	#	#
C07	#	#	#	#
C08	#	#	#	#
C09	#	#	#	#
C10	#	#	#	#
C11	#	#	#	#
C12	#	#	#	#

**Tabla 6. Ensayo con 10 µl de cloroformo**

**Elaborado por: López, 2015**

10 µl	1	2	3	4
C01	-	-	-	-
C02	-	-	-	-
C03	○	-	-	-
C04	-	-	-	-
C05	-	-	-	-
C06	-	O	-	-
C07	-	○	-	O
C08	-	-	-	-
C09	-	-	-	-
C10	O	-	O	-
C11	-	-	-	-
C12	-	-	-	-

**Tabla 7. Ensayo con 20 µl de cloroformo****Elaborado por: López, 2015**

20 µl	1	2	3	4
C01	-	-	-	-
C02	-	-	-	-
C03	-	-	-	-
C04	-	-	-	-
C05	-	-	-	-
C06	-	-	-	-
C07	-	-	-	-
C08	-	-	-	-
C09	-	-	-	-
C10	-	-	-	-
C11	-	-	-	-
C12	-	-	-	-

**ENSAYO CON DISTINTOS BUFFERS CON 10 µl DE CLOROFORMO****Leyenda:**

S – SM

O – calvas totales

TB - TB modificado

O – calvas presentes en dos de tres ensayos

S + T – SM + TB modificado

- Sin resultados

**Tabla 8. Ensayo con medio SM****Elaborado por: López, 2015**

S	1	2	3	4
C01	-	-	-	-
C02	-	-	-	O
C03	O	-	-	-
C04	-	-	-	-
C05	-	-	O	-
C06	-	-	-	-
C07	-	-	-	-
C08	O	O	-	O
C09	-	O	O	O
C10	-	-	O	-
C11	-	O	-	-
C12	-	-	-	O

**Tabla 9. Ensayo con medio TB modificado**

Elaborado por: López, 2015

TB mod	1	2	3	4
C01	-	-	-	-
C02	-	-	-	-
C03	-	-	-	-
C04	-	-	-	-
C05	-	-	-	-
C06	-	-	-	-
C07	-	-	-	-
C08	-	-	-	-
C09	-	-	-	-
C10	-	-	-	-
C11	-	-	-	-
C12	-	-	-	-

**Tabla 10. Ensayo con medio SM + TB modificado**

Elaborado por: López, 2015

S+T	1	2	3	4
C01	-	-	-	-
C02	-	-	-	-
C03	-	-	-	-
C04	-	O	-	-
C05	-	O	-	-
C06	-	O	-	O
C07	-	O	-	-
C08	-	-	O	-
C09	-	-	-	-
C10	O	-	-	-
C11	-	-	-	-
C12	O	-	-	-

## VERIFICACIÓN DE FAGOS NO CONTAMINADOS

**Tabla 11. Verificación fagos no contaminado**

**Elaborado por:** López, 2015

**Leyenda:**

( - ) SIN contaminación

( + ) contaminado

FAGO	LISADO	SM
C01	-	-
C02	-	-
C03	-	-
C04	-	-
C05	-	-
C06	-	-
C07	-	-
C08	-	-
C09	-	-
C10	-	-
C11	-	-
C12	-	-

## TITULACIÓN DE FAGOS

**Protocolo para titulación de fagos:**

1. Tomar 100 µl de SM + cloroformo + fago y colocar en un tubo Eppendorf con 1 ml de cultivo en fase exponencial.
2. Incubar ON a 37°C.
3. Centrifugar 5000 rpm durante 10 minutos y pasar el sobrenadante a un nuevo Eppendorf.
4. Agregar 10 µl de cloroformo al sobrenadante y conservar a muestra a 4°C en un congelador.
5. Realizar diluciones seriadas y colocar 1 ml de la dilución en un tubo de ensayo.
6. Añadir 2 ml de cultivo en fase exponencial + top agar.

7. Colocar sobre una placa con bottom agar dejar solidificar e incubar ON a 37°C.

Esto permitió determinar que los medios óptimos de conservación son el medio SM para una primera instancia previa a su uso en los lisados fágicos que fueron conservados finalmente en medio LEM con una concentración de cloroformo de 10 µl.

Se obtuvieron los siguientes resultados de placa:

**Tabla 12. Resultado número de calvas en recuento en placa**

**Elaborado por: López, 2015**

		# Calvas		
Cepa		C03		
1	2	5	-	

		C07		
2	3	-	-	

		C10		
3	4	1	-	

		C06		
4	-	1	5	

		# Calvas		
Cepa		C09		
1	3	-	-	
2	-	1	-	
3	2	1	-	
4	2	-	2	

**Tabla 13. Determinación de la concentración inicial del fago en lisado en medio líquido**

**Elaborado por: López, 2015**

Cepa	Factor de Dilución $10^{-1}$	Promedio Concentración pfu/ml $10^{-1}$	Concentración Inicial pfu/ml
1	0,1	2,33	0,23
2	0,1	1,00	0,10
3	0,1	1,67	0,17
4	0,1	2,00	0,20
1,2,3,4	0,1	0,92	0,09

**Tabla 14. Concentración Inicial de Fago en lisado en medio líquido**

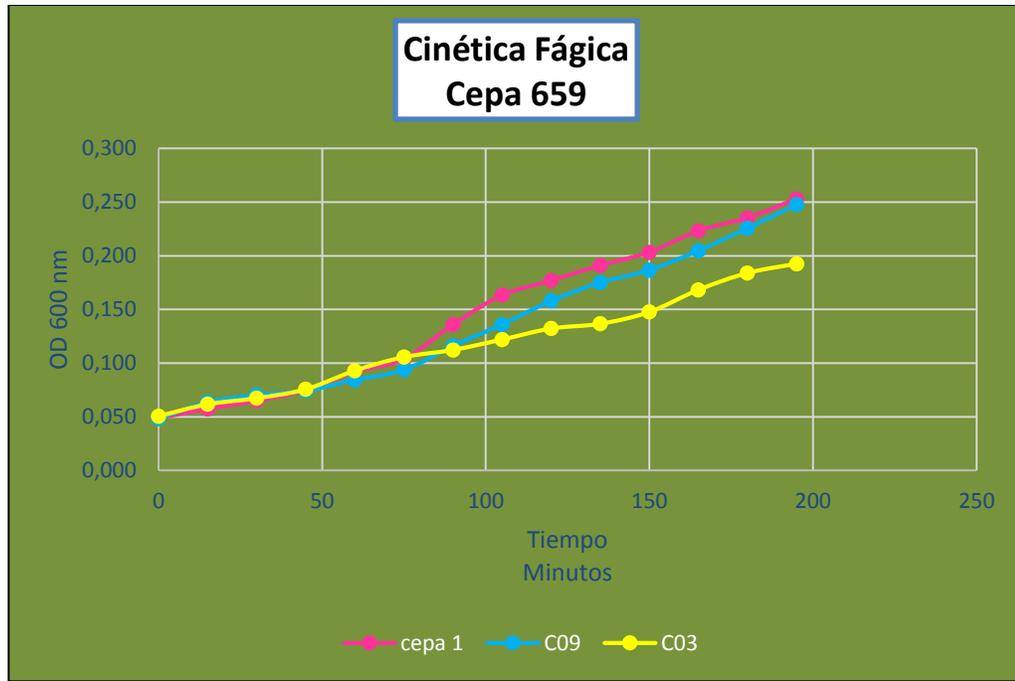
**Elaborado por: López, 2015**

Fago	Concentración Inicial pfu/ml
C03	0,23
C07	0,10
C10	0,17
C06	0,20
C09	0,09

## CINÉTICA FÁGICA

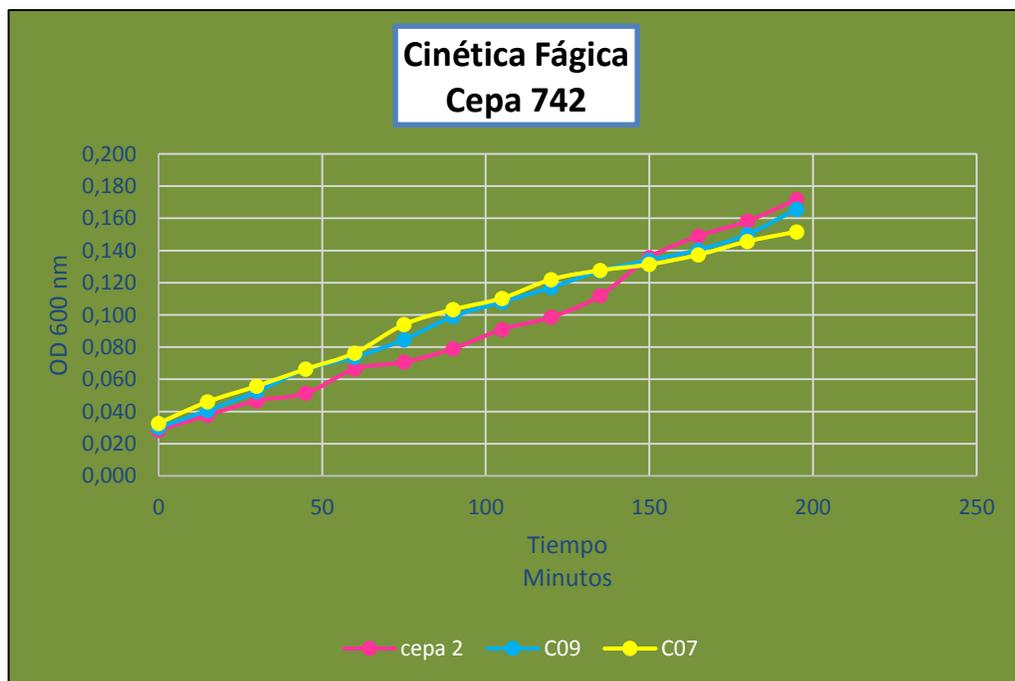
### Ilustración 30. Cinética fágica cepa 659

Elaborado por: López, 2015



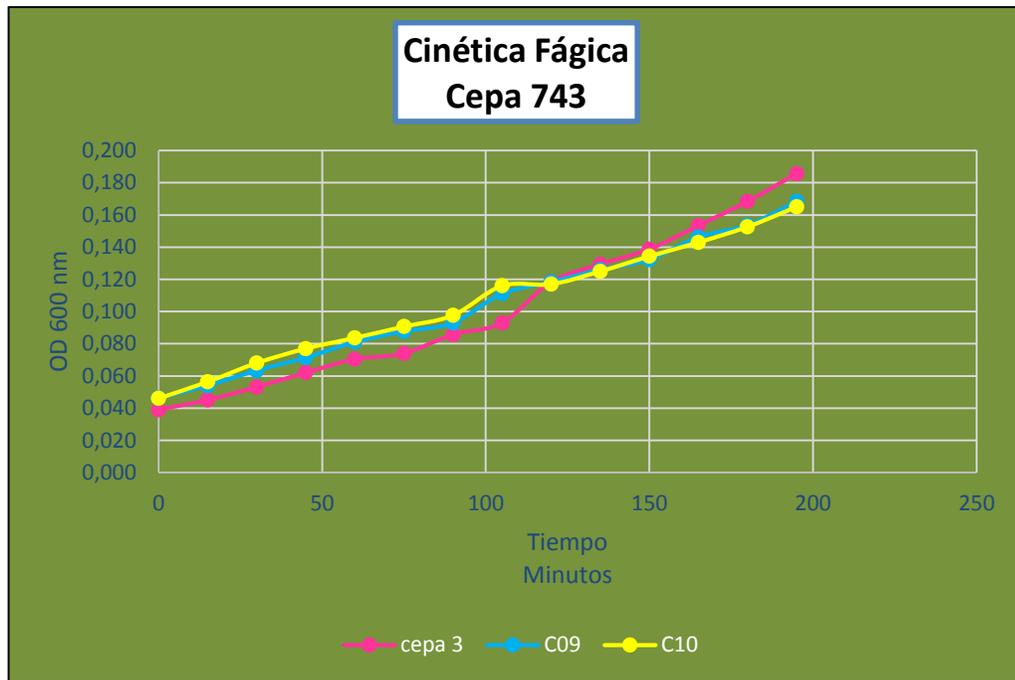
### Ilustración 31. Cinética fágica cepa 742

Elaborado por: López, 2015



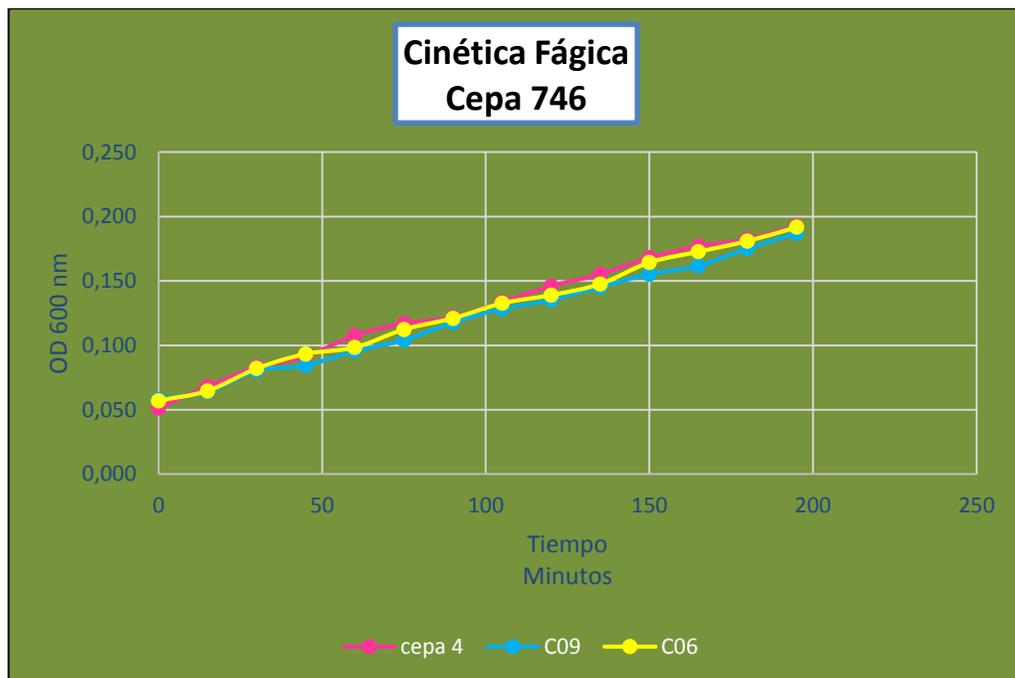
### Ilustración 32. Cinética fágica cepa 743

Elaborado por: López, 2015



### Ilustración 33. Cinética fágica cepa 746

Elaborado por: López, 2015



## 4.2. Discusión

Todos los ensayos fueron realizados en el laboratorio de Investigación de la Universidad SEK y se utilizaron los recursos disponibles.

Las curvas de crecimiento bacteriano permitieron notar el punto en el cual el cultivo se encuentra en fase exponencial, gracias a ello se pudo trabajar con los siguientes experimentos.

En cuanto a los ensayos, para la obtención de bacteriófagos a partir de muestras de agua, se obtuvieron resultados óptimos. La medición de la densidad óptica permitió conocer si existía la presencia de algún bacteriófago en la muestra, además las placas obtenidas por este método presentan un gran número de calvas ([Anexo B](#)).

Es importante comprender que después de los ensayos realizados se pudo evidenciar que *Acinetobacter baumannii* no forma calvas de lisis perfectas en la etapa de obtención de bacteriófagos a partir de muestras de agua sino que crea una calva rodeada por una sustancia mucosa. En un principio se consideró un tiempo de incubación excesivo por lo que se decidió vigilar las placas durante siete horas, transcurrido este tiempo las placas continuaban formando calvas imperfectas.

Otro aspecto a considerar en esta metodología es que, se obtuvieron mejores resultados al mezclar los cuatro tubos de muestras de agua cultivada con las diferentes cepas de *Acinetobacter baumannii* en un solo tubo. Esto se realizó considerando que era posible que existieran fagos en cada una de las muestras de agua, viables para otra de las cepas. Además las muestras fueron conservadas a 4°C en una refrigeradora.

En cuanto al medio óptimo para la conservación de los bacteriófagos, en la literatura se detallan algunos de los usados en esta investigación. Los resultados obtenidos muestran que un medio adecuado para la conservación de bacteriófagos de *Acinetobacter baumannii* es el buffer SM con una concentración de cloroformo de 10  $\mu$ l. Como se pudo evidenciar, si bien el medio que contenía SM + TB fue bastante aceptado en la prueba de la gota, podría deberse a la presencia de SM en la mezcla ya que como se pudo apreciar aquel medio que solamente contenía TB modificado no produjo calvas de lisis. Además se logró conocer que la cantidad de 20  $\mu$ l afecta al virus mientras que los 10  $\mu$ l podrían considerarse útiles para su conservación. También reconocer que la inexistencia de cloroformo en el medio de conservación ocasiona que el fago permanezca contaminado con bacterias y esto imposibilita su uso en la prueba de la gota y en el resto de metodologías.

El uso del cloroformo se justifica debido a la necesidad de eliminar cualquier contaminación bacteriana que pueda presentarse al momento de extraer la calva, pero se debe analizar la cantidad a usar, ya que existen virus que pueden presentar una membrana lipídica la cual en contacto con el cloroformo, que es un solvente orgánico, se desintegraría, perdiendo de esta manera el virus aislado. Es importante recalcar que si bien en la literatura se utilizan concentraciones mayores de cloroformo, hasta 50  $\mu$ l, en este caso en particular no funcionó.

La verificación de que los lisados en medio líquido y los fagos conservados en SM no se encontraban contaminados permitió la continuación del resto metodologías. Por ejemplo, los protocolos obtenidos para el aislamiento de bacteriófagos de muestras de agua y su titulación son útiles para prácticas laboratorio en el caso de bacterias no patógenas, y puede ser modificado según se requiera, ya que se conoce que cada bacteria tiene parámetros óptimos de funcionamiento.

Gracias a los resultados del protocolo de titulación de fagos y su contraposición a los de cinética fágica, se aprecia que a mayor concentración de fagos el decrecimiento en la densidad óptica es mayor. Como se puede apreciar en las Ilustraciones 20 hasta la 23, la mayor concentración fágica corresponde al fago C03 es cual genera una descenso en la curva mucho más pronunciado que cualquier otro fago ensayado, de igual manera la concentración más baja del fago C09, que permite un ensayo general en todas las cepas, generó las curvas menos pronunciadas de todos los ensayos.

En cuanto a las distintas muestras de agua tomadas, se puede apreciar que la muestra obtenida del río Machángara mostró curvas más distanciadas, pronunciadas y con un mayor descenso en comparación a las otras dos. En segundo lugar se ubica el río Guayllabamba y el último lo ocupa el río San Pedro. Todas las muestras de agua presentaron mejores resultados en cultivo junto con las cepas 742 y 746.

Considerando los parámetros fisicoquímicos de cada muestra se puede determinar que existe una relación directa entre el pH del agua y la carga vírica presente en ella. La temperatura al variar pocos grados y mantenerse en un rango de 20 – 16°C no se la considerará un parámetro influyente. Por otro lado la estabilidad química es muy sensible a cambios en el pH, en este caso el Río Machángara se acerca más al pH neutro con un valor de 7,1. Los ríos Guayllabamba y San Pedro poseen un pH más básico, 7,6 y 7,9 respectivamente. Se conoce por literatura que el pH es un factor importante en el mantenimiento de los virus. Un pH ácido generalmente es el óptimo mientras que un pH básico crea un medio hostil para un virus. Este análisis coincide con los resultados obtenidos, ya que las gráficas de densidad óptica en el ensayo del río Machángara muestran un mayor descenso.

En todos los casos se encontraron fagos para *Acinetobacter baumannii* esto significa que las aguas de los tres ríos se encuentran expuestas a esta bacteria, la explicación lógica indicaría que las aguas residuales hospitalarias no presentan un tratamiento previo a su descarga.

La efectividad de la aplicación de los bacteriófagos se define en este caso, como el descenso en la curva de crecimiento de cada cepa bacteriana en presencia del fago. Como se pudo apreciar todas las curvas correspondientes a las muestras que contienen fagos descienden en algún punto. Algunas con una mayor pendiente y otras con una menor; aquella que presenta una mayor diferencia entre el control y el tratamiento con bacteriófagos es la cepa 659. Además, las curvas de ambos tratamientos con fagos C09 y C03, son distintas al resto. Esto podría indicar una mayor afinidad o sensibilidad de esta cepa ante el bacteriófago elegido.

El resto de curvas para las cepas 742, 743 y 746 se mantienen constantes o varían un poco pero en todas existe un descenso en relación al grupo control. Esto muestra la presencia de bacteriófagos en el cultivo.

## Capítulo 5

### Conclusiones y Recomendaciones

#### 5.1. Conclusiones

El estudio realizado es útil para conocer cómo se pueden obtener bacteriófagos y permite ofrecerles una utilidad, la cual no se limita al campo de la salud. Si bien en este caso está dirigido específicamente a este, se puede ampliar al campo de los alimentos, de biorremediación y de productos biológicos de control de plagas, por mencionar algunas.

Es necesario conocer que el proyecto permitió obtener bacteriófagos para *Acinetobacter baumannii* pero se requiere de una mayor cantidad de tiempo y recursos para lograr mejores resultados. De todos modos se puede tomar en cuenta que los resultados de cada uno de las muestras de los tres ríos podrían ser útiles para extrapolar datos como la presencia y concentración de esta bacteria en cada uno de los afluentes y relacionarlo con las descargas que se realizan en ellos brindando la opción de control ambiental de las mismas.

En cuanto al muestreo, se concluye que no es necesario un cuidado excesivo de las muestras. Esto significa que no necesitan conservarse a una temperatura específica sino que pueden mantenerse a temperatura ambiente, además que los frascos útiles para este tipo de muestras son frascos de acero inoxidable que mantienen la temperatura y protegen a la muestra de la exposición solar de manera eficaz. De igual manera se detalla que el equipo de protección personal necesario

para esta metodología es un mandil, guantes y mascarilla. Principalmente para prevenir el posible contacto con muestras de agua que se conocen están altamente contaminadas y que representan un riesgo no solamente químico sino también biológico. Con respecto al transporte, el uso de un cooler que evite el contacto y la posibilidad de contaminación por derrame es el único requisito.

En lo correspondiente al manejo en el laboratorio se determina que se deben seguir normas de bioseguridad como el uso de equipo de protección como mandil, mascarilla y guantes, además el manejo de las muestras debe realizarse de preferencia en una cámara de flujo laminar que evite la contaminación hacia dentro y hacia afuera de la cámara lo cual mantiene la integridad tanto de la muestra como del manipulador. Cabe notar que las muestras de agua deben ser colocadas en un ambiente seco y lejos de la luz directa para evitar la degradación de la muestra.

Las metodologías utilizadas son de gran utilidad para la investigación universitaria e incluso puede otorgárseles una aplicación académica.

Para la conservación de cepas es útil mantenerlas en glicerina o en leche al 70% y al utilizarlas para los experimentos se debe realizar cultivos saturados, a partir de los glicerolados, que sean frescos. Para el desarrollo de las gráficas de crecimiento se determinó que el tiempo óptimo entre cada medición es de quince minutos y se lo debe realizar durante veinticuatro horas.

Se determinó además que la siembra de doble capa es una técnica útil en para la obtención de bacteriófagos y es una técnica de baja complejidad que permite su aplicación académica. Por otro lado la metodología de procesamiento de muestras de agua resulta útil para el aislamiento de bacteriófagos sin embargo se comprobó que se obtienen mejores resultados si la muestra de agua

no es filtrada previamente a su uso. Con respecto a la metodología de aislamiento de bacteriófagos se logró conocer que se obtiene una mayor cantidad de calvas si el tiempo de incubación es mayor pero no debe ser excesivo ya que se obtendrían demasiadas copias de un solo virus lo cual afecta al experimento.

Otra técnica ensayada es la titulación de fagos en medio líquido en la cual se logró determinar que la concentración utilizada y el tiempo de incubación fueron los adecuados, ya que al ser empleada en la prueba de titulación se logró obtener calvas que permitieran conocer la concentración utilizada posteriormente en la prueba de cinética.

Se logra concluir que las técnicas fueron útiles y que los resultados se muestran favorables aunque se recomienda realizar estudios más detallados y a profundidad de cada uno de los temas tratados.

## **5.2. Recomendaciones**

En la metodología de muestreo se recomienda el uso de material de protección personal que permita evitar el contacto directo con las fuentes de obtención de bacteriófago las cuales pueden resultar tóxicas. Además se recomienda el uso de extensores como cuerdas, alambres o varillas que permitan alcanzar de mejor manera las fuentes de agua. También es importante analizar a conciencia la ubicación de los sitios de muestreo para evitar la toma de muestras en aguas descontaminadas en las cuales existe poca probabilidad de encontrar material biológico.

En el manejo en laboratorio es recomendable el uso de bioseguridad como es el equipo de protección personal, cámaras de flujo, mecheros, autoclave, desinfectantes y evitar las corrientes de aire hacia el interior o exterior del laboratorio. Respecto al mantenimiento de muestras se recomienda colocarlas en un lugar en el que la temperatura se mantenga estable.

En cuanto a metodología se refiere, para la extracción de las calvas de lisis es recomendable cortar las puntas de la micropipeta a un tamaño considerable para que sea más sencilla su extracción. Además en el procesamiento de muestras de agua se recomienda plaquear diluciones mayores cuando el tiempo de almacenamiento excede las 16 horas (ON) establecidas en el protocolo. También es importante revisar las placas durante el mayor tiempo posible durante su incubación para evitar el sobrecrecimiento o saturación de la placa ya que por ejemplo *Acinetobacter baumannii* produce una gran cantidad de mucosidad lo cual dificulta la obtención de calvas perfectas en el procesamiento de muestras de agua, esto puede deberse no solamente a esta característica de la bacteria sino que al no filtrar la muestra de agua de río existe la posibilidad de mantener bacterias propias del río que ocasionan contaminación de la placa y principalmente de las calvas generadas por bacteriófagos de *Acinetobacter baumannii*.

También se recomienda tener cuidado con el uso de cloroformo, ya que si bien es útil para eliminar toda célula que podría contaminar la muestra de bacteriófago, una alta concentración puede dañar no solo a las bacterias o células indeseadas sino también al virus en sí.

Por otra parte, la prueba de la gota es útil muy útil para la detección de bacteriófagos en un medio de conservación pero se debe tener en cuenta que muchas veces la concentración de fago en el buffer es muy baja, casi imperceptible y puede ocasionar falsos positivos, por ello se recomienda realizar los ensayos por triplicado para tener una mejor aproximación a la realidad.

En cuanto al ensayo de titulación de fagos, tomar en cuenta que existen distintas concentraciones de fagos debido a que su eficacia y productividad en generación de nuevos virus son características propias de cada bacteriófago, por ello se recomienda un análisis a profundidad en el tema cuando el objetivo es una aplicación como terapia fágica ya que en este caso se utilizarían los fagos que generen una mayor progenie y que por ende sean más efectivos.

Si bien los resultados presentados en este trabajo se muestran favorables, se recomienda realizar estudios complementarios que permitan confirmar la validez de los datos obtenidos, realizando las metodologías en un ambiente adecuado con normas y características que permitan la esterilidad del sitio de trabajo. Además del uso de material de laboratorio adecuado para su análisis y de reactivos en estado óptimo. Es muy importante recalcar que las condiciones de bioseguridad deben encontrarse acordes a las necesidades del experimento, en este caso un laboratorio de tipo 2 que permita la manipulación de bacterias patógenas y virus con riesgo moderado.

Si se desea un alcance mayor de este estudio se recomienda analizar, en cualquier investigación de bacteriófagos que se realice en el futuro, el genoma del virus utilizado. Esto es importante ya que si se conoce qué genes posee se puede determinar su viabilidad para uso en una terapia fágica. Además que se podrían aislar genes de interés como aquellos que producen la lisozima, enzima encargada de la lisis bacteriana.

Además de la parte metodológica, se debe considerar la importancia de mantener un ambiente controlado para evitar la contaminación del personal y del ambiente. Esta bacteria, si bien representa un riesgo mortal para personas inmunocomprometidas también afecta a todos aquellos individuos que se encuentren en contacto con la misma. Es muy probable que el personal de atención hospitalaria sea portador de la bacteria sin presentar síntomas lo cual representa un peligro

potencial hacia otras personas no solamente del ambiente de trabajo sino en cualquier lugar. Se recomienda que exista un protocolo para descontaminación individual en ambientes de trabajo para evitar la proliferación no solamente de esta bacteria sino de cualquier agente biológico que pueda resultar dañino para la sociedad. Por esta razón se debe considerar un enfoque dirigido a seguridad y salud ocupacional que permita evidenciar los posibles riesgos y sus soluciones para reducirlos como por ejemplo la implementación de talleres de capacitación del personal que se encuentre en contacto directo o indirecto con los agentes infecciosos.

## Capítulo 6

### Referencias

- Alexander, S. K., Strete, D., & Niles, M. J. (2003). *Laboratory Exercises in Organismal and Molecular Microbiology*. McGraw-Hill Education.
- Dini, C. (2011). *Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)* (Tesis). Facultad de Ciencias Exactas. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10915/2686>
- Escobar, C, Hurtado, J, & Gavilanes, M. (2014). Vigilancia Microbiológica en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital “Carlos Andrade Marín” durante el Primer Semestre del 2013. *Revista Médica HJCA*, 6(2), 133–138. <http://doi.org/10.14410/2014.6.2.010>.
- Gill, J. J., & Hyman, P. (2010). Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(1), 2–14.
- Howard, A., O’Donoghue, M., Feeney, A., & Sleator, R. D. (2012). *Acinetobacter baumannii*. *Virulence*, 3(3), 243–250. <http://doi.org/10.4161/viru.19700>
- Hughes, J., Rees, S., Kalindjian, S., & Philpott, K. (2011). Principles of early drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 162(6), 1239–1249. <http://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x>
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., & Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(6), 423–435. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2333>

- Kropinski, A. M., Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E., & Johnson, R. P. (2009). Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *501*, 69–76. [http://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6\\_7](http://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_7)
- Kutter, E. M., Gvasalia, G., Alavidze, Z., & Brewster, E. (2013). Phage Therapy. In M. Grassberger, R. A. Sherman, O. S. Gileva, C. M. H. Kim, & K. Y. Mumcuoglu (Eds.), *Biotherapy - History, Principles and Practice* (pp. 191–231). Springer Netherlands. Retrieved from [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-6585-6\\_8](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-6585-6_8)
- Lemos, E. V., De la Hoz Restrepo, F., Alvis, N., Quevedo, E., Cañon, O., & León, Y. (2011). *Acinetobacter baumannii* - related mortality in intensive care units in Colombia. *Revista Panamericana de Salud Pública*, *30*(4), 287–294. <http://doi.org/10.1590/S1020-49892011001000001>
- Lewis, K. (2013). Platforms for antibiotic discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, *12*(5), 371–387. <http://doi.org/10.1038/nrd3975>
- Matsuzaki, S., Rashed, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T., Kuroda, M., ... Imai, S. (2005). Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy*, *11*(5), 211–219. <http://doi.org/10.1007/s10156-005-0408-9>
- Morgan, D. J., Liang, S. Y., Smith, C. L., Johnson, J. K., Harris, A. D., Furuno, J. P., ... Perencevich, E. N. (2010). Frequent multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* contamination of gloves, gowns, and hands of healthcare workers. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, *31*(7), 716–721. <http://doi.org/10.1086/653201>

- Ng, R. (2008). Appendix 1: History of Drug Discovery and Development. In *Drugs* (pp. 391–397). John Wiley & Sons, Inc. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470403587.app1/summary>
- OMS | Resistencia a los antimicrobianos. (2013, May). Retrieved June 16, 2015, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- Parasion, S., Kwiatek, M., Gryko, R., Mizak, L., & Malm, A. (2014). Bacteriophages as an alternative strategy for fighting biofilm development. *Polish Journal of Microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologów = The Polish Society of Microbiologists*, 63(2), 137–145.
- Peleg, A. Y., Seifert, H., & Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3), 538–582. <http://doi.org/10.1128/CMR.00058-07>
- Real Academia Española. (2014). Diccionario de la lengua española. Retrieved April 30, 2015, from <http://lema.rae.es/drae/>
- Reece, J. B., Meyers, N., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., ... Cooke, B. N. (2014). *Campbell Biology Australian and New Zealand version*. Pearson Higher Education AU.
- Roque, A. C. A. (Ed.). (2010). *An Historical Overview of Drug Discovery* - Springer. Humana Press. Retrieved from [http://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-60761-244-5\\_1](http://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-60761-244-5_1)
- Rosenthal, V. D., Bijie, H., Maki, D. G., Mehta, Y., Apisarnthanarak, A., Medeiros, E. A., ... INICC members. (2012). International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 36 countries, for 2004-2009. *American Journal of Infection Control*, 40(5), 396–407. <http://doi.org/10.1016/j.ajic.2011.05.020>

- Savov, E., Mihaylova, G., Borisova, M., Stoeva, T., Kjoseva, E., & Trifonova, A. (2009). Multidrug-Resistant *Acinetobacter Baumannii*: A Major Threat Worldwide. In C. Dishovsky & A. Pivovarov (Eds.), *Counteraction to Chemical and Biological Terrorism in East European Countries* (pp. 213–218). Springer Netherlands. Retrieved from [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-90-481-2342-1\\_25](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-90-481-2342-1_25)
- Se abre expediente a hospital por presencia de bacteria. (2011, April 27). Retrieved April 22, 2015, from <http://www.eluniverso.com/2011/04/27/1/1447/abre-expediente-hospital-presencia-bacteria.html>
- Shen, G.-H., Wang, J.-L., Wen, F.-S., Chang, K.-M., Kuo, C.-F., Lin, C.-H., ... Hung, C.-H. (2012). Isolation and Characterization of  $\phi$ km18p, a Novel Lytic Phage with Therapeutic Potential against Extensively Drug Resistant *Acinetobacter baumannii*. *PLoS ONE*, 7(10), e46537. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0046537>
- Shors, T. (2009). *Virus: estudio molecular con orientación clínica*. Ed. Médica Panamericana.
- SIVICEIN. (2011). SITUACIÓN NACIONAL, PROVINCIAL E INSTITUCIONAL DE LAS INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS ANÁLISIS SITUACIONAL. Retrieved from [http://www.hee.gob.ec/descargas/SIVICEIN\\_ANALISIS\\_TOTAL\\_2007-2011.pdf](http://www.hee.gob.ec/descargas/SIVICEIN_ANALISIS_TOTAL_2007-2011.pdf)
- Spricigo, Denis Augusto. (2011). *La desinfección basada en bacteriófagos como herramienta de biocontrol de Salmonella en alimentos* (Tesis Doctoral). Universitat Autònoma de Barcelona, Departament de Genètica i de Microbiologia. Retrieved from <http://www.tdx.cat/handle/10803/84011>
- Van Twest, R., & Kropinski, A. M. (2009). Bacteriophage enrichment from water and soil. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 501, 15–21. [http://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6\\_2](http://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_2)

Wright, G. D. (2010). Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? *BMC Biology*, 8(1), 123. <http://doi.org/10.1186/1741-7007-8-123>

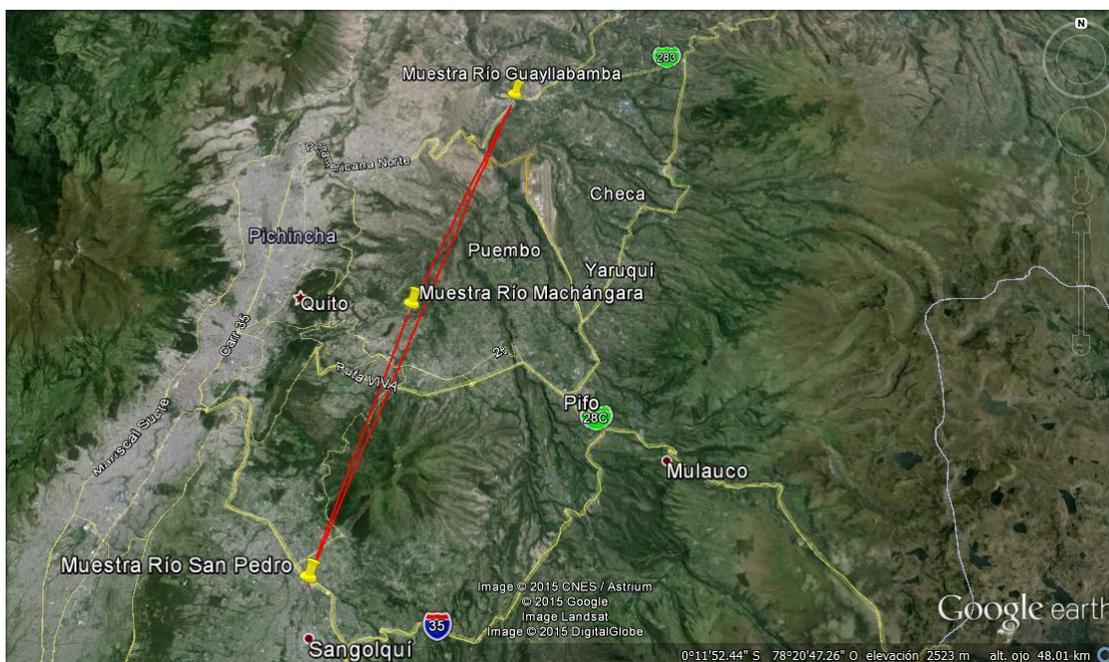
Yang, H., Liang, L., Lin, S., & Jia, S. (2010). Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiology*, 10, 131. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-10-131>

## Anexos

### Anexo A: Muestreo

#### Ilustración 34. Mapa de Muestreo

Fuente: Google Earth Elaborado por: López, 2015



#### Ilustración 35. Envase de acero inoxidable para muestreo

Tomada por: López, 2015



[Regresar](#)

## Río Machángara

### Ilustración 36. Fotografías del sitio de muestreo en el Río Machángara

Tomadas por: López, 2015



## Río Guayllabamba

### Ilustración 37. Fotografías del sitio de muestreo en el Río Guayllabamba

Tomadas por: López, 2015



## Río San Pedro

### Ilustración 38. Fotografías del sitio de muestreo en el Río San Pedro

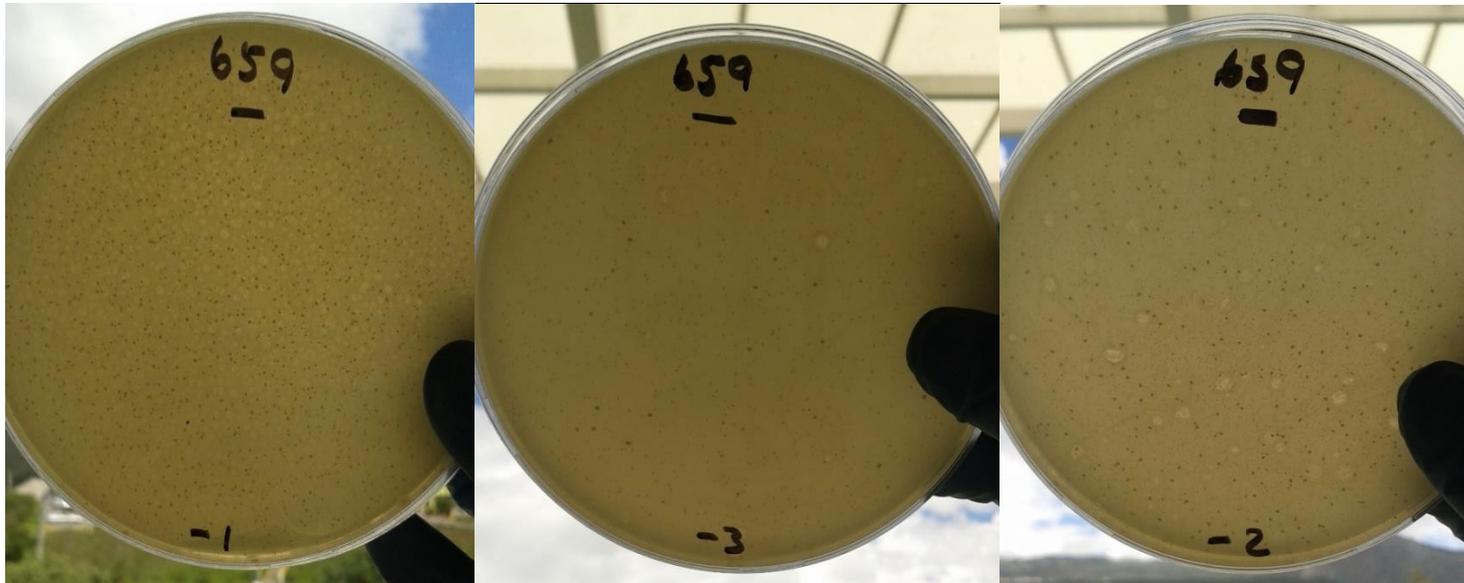
Tomadas por: López, 2015



## Anexo B: Calvas de lisis obtenidas del procesamiento de muestras de agua

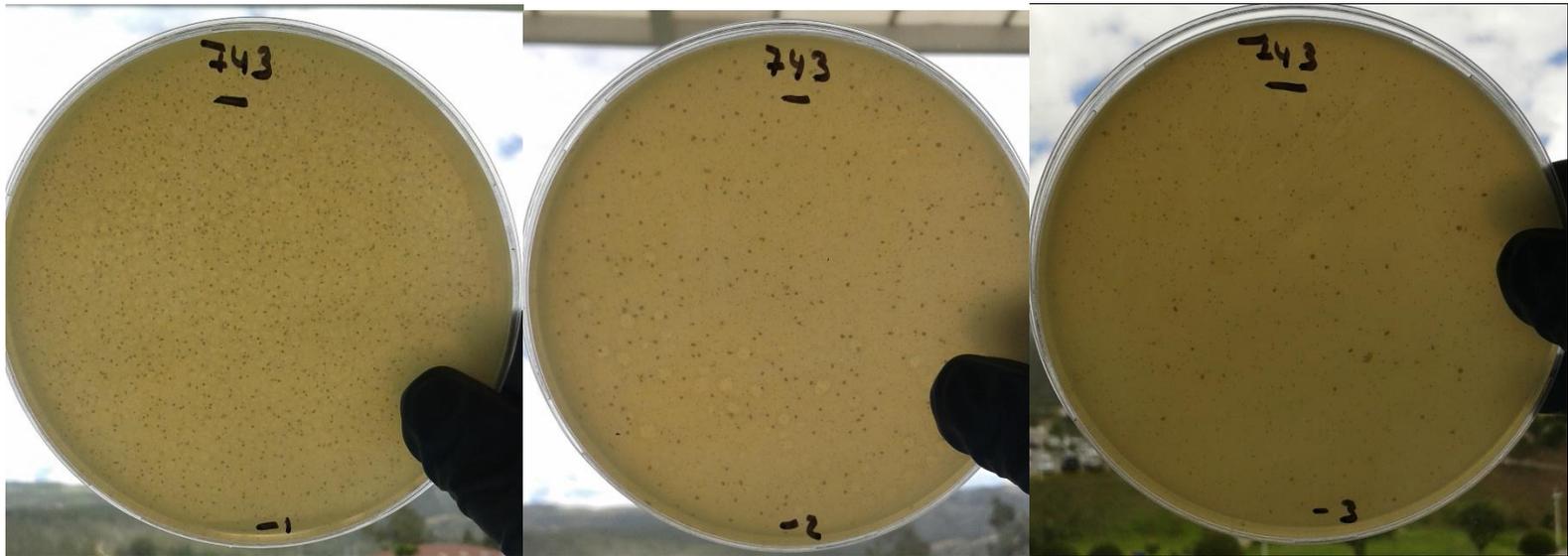
Ilustración 39. Calvas en cepa 659 obtenidas a partir de agua Río Machángara

Tomadas por: López, 2015



**Ilustración 40. Calvas en cepa 743 obtenidas a partir de agua Río Machángara**

Tomadas por: López, 2015

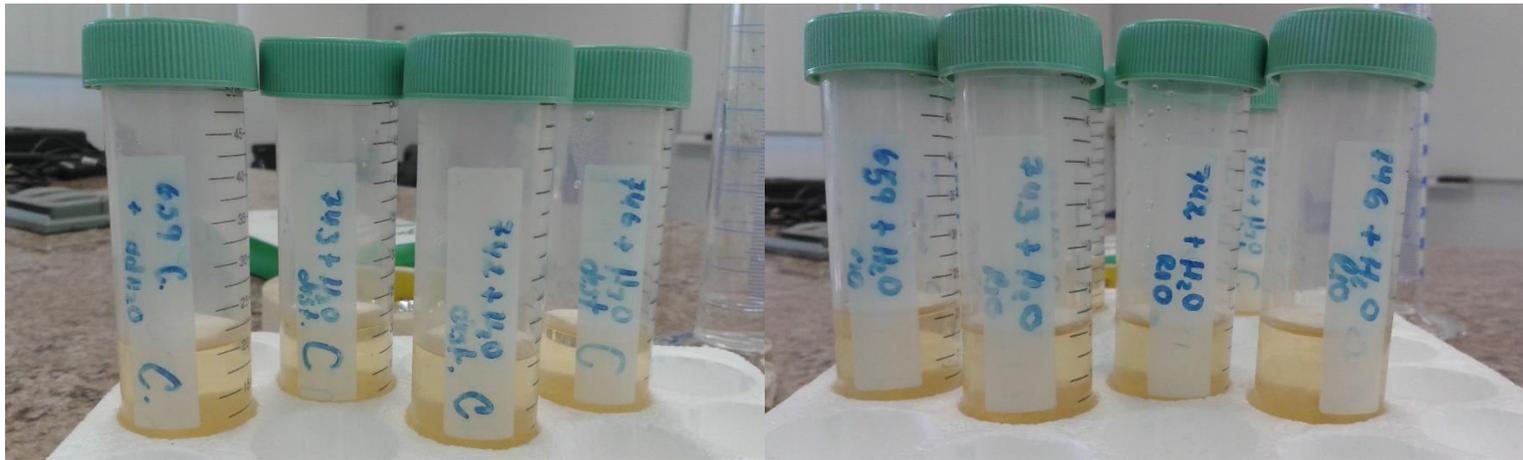


[Regresar](#)

## Anexo C: Aislamiento de Bacteriófagos de Muestras de Agua

Ilustración 41. Procesamiento de muestras de agua. Grupo control y ensayos con agua de río

Tomadas por: López, 2015

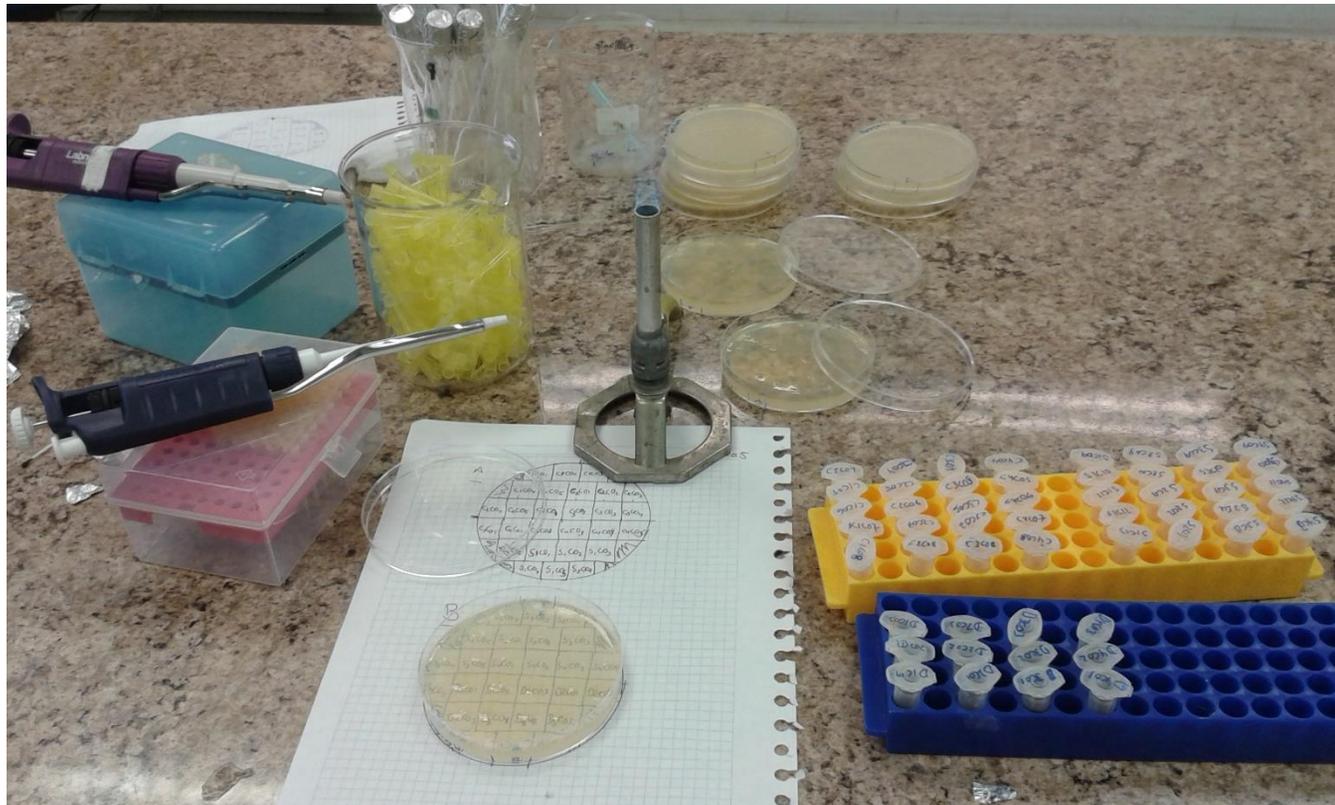


**Ilustración 42. Aislamiento de Fagos en medio SM****Tomadas por: López, 2015**

## Anexo D: Prueba de la Gota

### Ilustración 43. Materiales para ensayo prueba de la gota

Tomada por: López, 2015



**Ilustración 44. Calvas de lisis y contaminación en prueba de la gota**

**Tomadas por: López, 2015**

