

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO
BIOQUÍMICAS
BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA



POTENCIAL ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA DE
BACTERIÓFAGOS, AISLADOS DE MUESTRAS
AMBIENTALES, FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli*
MULTIRESISTENTES.

Tesis de grado para la obtención del Grado de Licenciatura

POR: VALERIA SANZ CÁRDENAS

TUTOR: Ph.D. MARÍA TERESA ÁLVAREZ ALIAGA
MsC. ADALID ALFARO
MsC. ÓSCAR CÁRDENAS ALEGRÍA

LA PAZ – BOLIVIA

Dedicatoria

El presente trabajo de investigación está dedicado a Dios principalmente, ya que sin los conocimientos que él me ha dado, no habría logrado esta gran meta.

A mi hija Tamyl quié es la personita que me da las fuerzas de continuar y ser mejor día a día, que me llena de amor y compañía, que me enseñó que tengo capacidades inimaginables y cualquier esfuerzo y/o sacrificio vale la pena con tal de verla feliz y darle un mejor futuro.

A mi mamá Mirtha Cárdenas quié es un ejemplo de mujer y madre, me ha enseñado a ser fuerte y luchar por mis ideales hasta alcanzar cualquier meta plantada y es la persona que siempre ha estado a mi lado y me ha apoyado en todo momento de mi vida.

“Cuando el objetivo te pareciera difícil, no cambies de objetivo; busca un nuevo camino para llegar a él” – Confucio

AGRADECIMIENTOS

¶ Dios.

Por darme salud y sabiduría a lo largo de mi vida y por haberme rodeado de personas maravillosas que me apoyan en cada etapa.

¶ mi familia.

¶ mi hija Tamara Belén que es el motor de mi vida y mi mundo entero, a mi mamá que es la persona que me impulsa a salir adelante y me apoya en todo momento, a mi papá por guiarme y aconsejarme, a mis hermanos por el apoyo incondicional y a Rafael una persona muy especial en mi vida que siempre estuvo a mi lado apoyándome. Sin ellos no hubiera logrado ésta meta más en mi vida. Gracias.

¶ mis maestros.

María Teresa Álvarez, Adalid Alfaro, Marisel Mamani, Óscar Cárdenas y Danitza Romero por el tiempo y esfuerzo que dedicaron a compartir sus conocimientos, sin su instrucción profesional no habría llegado a este nivel. Gracias.

¶ mis amigos.

Alicia Mamani, Lilia Catacora, Marisol Blancos, Lidia Mamani, Omar Fernández, Ariel de la Fuente, April Villagas, Marcelo Gutiérrez, Tatiana Callejas, Andra Guachalla Francisca Gutiérrez, Jonatan Aliaga, Beatriz Medrano, Brenda Peñaranda, Herlan Colque, Lourdes Altamirano, Bernardo Mácerez, Patricia Álvarez y Carola Arzabe que me apoyaron en todo este proceso. Gracias.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	10
ABSTRACT	11
I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
A. JUSTIFICACIÓN.....	14
A. OBJETIVOS	16
1. OBJETIVO GENERAL.....	16
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
II. DISEÑO TEÓRICO.....	17
A. MARCO REFERENCIAL	17
1. ANTECEDENTES	17
<i>Estado del Arte de la aplicación de bacteriófagos como agentes de control biológico</i>	17
2. DESCRIPCIÓN DEL ÁMBITO DE ESTUDIO.....	26
B. MARCO TEÓRICO	27
1. El desarrollo del estudio de los bacteriófagos a lo largo del tiempo ..	27
2. Morfología y características moleculares de los bacteriófagos	28
3. Ciclo de multiplicación de los bacteriófagos.....	32
<i>Ciclo lítico</i>	32
• <i>Primera etapa: reconocimiento y adsorción</i>	32
• <i>Inyección del material genético del bacteriófago</i>	33
• <i>Transcripción</i>	33
• <i>Replicación</i>	34
• <i>Biosíntesis de proteínas estructurales</i>	34
• <i>Ensamblaje</i>	34
• <i>Lisis y liberación de los bacteriófagos</i>	35
<i>Ciclo lisogénico</i>	35
• <i>El interruptor genético o terminación de la lisogenia</i>	36
4. Coevolución entre bacteriófagos y bacterias	37
<i>Impedir la adsorción del bacteriófago</i>	38
<i>Inhibir la inyección del DNA</i>	39

	<i>Silenciar mediante el represor lisogénico</i>	40
	<i>Escisión mediante sistema de restricción y modificación</i>	40
	<i>Escisión mediante sistemas CRISPR-cas</i>	41
	<i>Sistema toxina – antitoxina</i>	42
	<i>Infección abortiva</i>	42
	<i>Interferencia en el ensamble de los bacteriófagos</i>	43
	<i>Relación infectiva determinación de placas</i>	43
	<i>Multiplicidad de infección</i>	44
	<i>Probabilidad de infección bacteriófago:bacteria determinada a través de la distribución de Poisson</i>	46
6.	<i>Aplicación de los bacteriófagos</i>	47
	<i>Aplicaciones agrícolas de bacteriófagos</i>	47
	<i>Aplicación de los bacteriófagos en la acuicultura</i>	48
	<i>Bacteriófagos como indicadores de contaminación fecal en agua</i>	49
	<i>Bacteriófagos aprobados como agentes con actividad bactericida en la industria alimenticia</i>	49
	<i>Aplicación de los bacteriófagos en biosensores</i>	51
	<i>Utilización de proteínas derivadas de bacteriófagos</i>	51
	<i>Comercialización de los bacteriófagos</i>	53
	<i>Los bacteriófagos como agentes de control biológico de cepas bacterianas multirresistentes</i>	57
	<i>Profagos como herramienta para biocontrol</i>	58
7.	<i>Resistencia antimicrobiana de cepas de Escherichia coli</i>	59
III.	HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	61
IV.	OPERACIONALIZACION DE LAS VARIABLES EN ESTUDIO	62
V.	DISEÑO METODOLÓGICO	62
	A. <i>Población en estudio, ámbito y periodo de investigación</i>	62
	B. <i>Tipo de investigación</i>	62
	C. MATERIALES, MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS	63
	1. <i>Materiales</i>	63
	1.1. <i>Agentes biológicos</i>	63
	• <i>Aislamiento de bacteriófagos de muestras ambientales</i>	63

• Cepas de <i>Escherichia coli</i>	64
1.2. Medios de cultivo	65
1.3. Soluciones buffer	65
2. Procedimientos	66
2.1. Caracterización de los bacteriófagos aislados.....	66
2.2. Determinación de la capacidad infectiva de bacteriófagos sobre cepas de <i>E. coli</i> ATCC 25922, P008 y multirresistentes.....	66
3. Métodos	66
3.1. Determinación de la cinética de crecimiento y cuantificación de la población bacteriana.....	66
3.2. Determinación de la sensibilidad antimicrobiana por el método de Kirby – Bauer (Antibiograma).....	67
3.3. Determinación de la actividad bactericida de los bacteriófagos líticos mediante placas de lisis	68
3.4. Determinación de la multiplicidad de infección (MDI) y distribución de Poisson	70
3.5. Microscopía de epifluorescencia	71
3.6. Microscopía electrónica de transmisión.....	72
3.7. Medidas de bioseguridad	72
D. PROCESAMIENTO DE LOS DATOS.....	74
1. Recolección	74
2. Elaboración.....	74
3. Análisis	74
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	75
A. Aislamiento y caracterización de los bacteriófagos.	75
• <i>Caracterización de bacteriófagos por microscopía de epifluorescencia.</i> ..	77
• <i>Caracterización de bacteriófagos mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM).</i>	78
B. Determinación del antibiograma de las cepas de <i>E. coli</i> empleadas en el presente estudio.....	83
C. Determinación de la capacidad infectiva de bacteriófagos sobre cepas de <i>E. coli</i> ATCC 25922, P008 y multirresistentes.	84
<i>Establecimiento de la relación Bacteriófago:Bacteria</i>	86

	<i>Multiplicidad de Infección (MDI)</i>	87
	<i>Aplicación de la distribución de Poisson para la relación Bacteriófago : Bacteria</i>	90
VII.	CONCLUSIONES	98
VIII.	RECOMENDACIONES	99
IX.	BIBLIOGRAFÍA	99

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Morfotipos y clasificación de los bacteriófagos de acuerdo a su forma, familia y particularidades.	30
Tabla 2. Características de los bacteriófagos respecto al tamaño, largo de cola, porcentaje de lípidos y ácido nucleico.....	31
Tabla 3. Principales mecanismos de resistencia antibiótica estudiados en <i>E. coli</i> (Mosquito, S. Ruiz, J. & Ochoa, T., 2011).....	60
Tabla 4. Antibiotipo de las cepas de <i>E. coli</i> multirresistentes y P008.	84
Tabla 5. Carga bacteriana de las cepas de <i>E. coli</i> empleadas en el estudio.....	86
Tabla 6. Titulación de los bacteriófagos F, C1 y D2 sobre cepas de <i>E. coli</i> multirresistentes (S.S.U. 1 - 11) ATCC 25922 y P008.....	87
Tabla 7. Multiplicidad de infección (MDI) de los bacteriófagos F, C1 Y D2 sobre cepas de <i>E. coli</i> multirresistentes, ambiental P008 Y ATCC 25922	87
Tabla 8. Relación entre el Porcentaje de adsorción de bacteriófagos respecto a cada cepa de <i>E. coli</i> estudiada.	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de cepas de <i>E. coli</i> multirresistentes a varios antibióticos LRNBC-INLASA (2010-2015).	22
Figura 2. Análisis de correspondencia de las cepas de <i>E. coli</i> intrahospitalarias y de aislamientos ambulatorios del S.S.U. con respecto a sus perfiles de resistencia.	23
Figura 3. Morfotipos de los bacteriófagos. (Ackermann, H. & Prangishvili, D., 2012)	29
Figura 4. Ciclo lítico de los bacteriófagos (Punil, R 2017).	35
Figura 5. Ciclo lisogénico de los bacteriófagos (Punil, R., 2017).	36
Figura 6. Etapas del ciclo de vida de un bacteriófago lítico que puede ser atacado por diferentes mecanismos de defensa bacterianos (Rostøl, J., 2019).	38
Figura 7. Tipos de placas de lisis causadas por los bacteriófagos.	44
Figura 8. Ensayo de doble capa agarizada del bacteriófago D2 (Dilución 10^{-5}) sobre la cepa de <i>E. coli</i> P008.	76
Figura 9. Microscopia de Epifluorescencia, A: Bacterias; B: Bacteriófago “F”; C: Bacteriófago “C1”; D: Bacteriófago “D2”.	78
Figura 10. TEM del Bacteriófago D2 con el aumento de 20K.	79
Figura 11. TEM del Bacteriófago D2 con el aumento de 80K.	80
Figura 12. TEM del Bacteriófago C1 con el aumento de 25K.	81
Figura 13. TEM del Bacteriófago C1 con el aumento de 20K.	82
Figura 14. Análisis de ordenación NMDS de bacteriófagos F, C1 y D2 respecto a su capacidad infectiva a cepas de <i>E. coli</i> multirresistentes	85
Figura 15. Cinética de crecimiento bacteriano de la cepa de <i>E. coli</i> P008.	106

RESUMEN

La resistencia bacteriana a múltiples sustancias es un problema de salud pública a nivel mundial, debido principalmente al uso masivo de antibióticos. En la actualidad, una alternativa a la terapia antimicrobiana es el uso de agentes biocidas: probióticos, bacteriocinas, metabolitos primarios y el control biológico de cepas bacterianas con bacteriófagos.

Materiales y Métodos: Los bacteriófagos se aislaron de muestras de agua y suelo mediante la técnica de filtración por membranas y tamizaje respectivamente. Las características morfológicas de los mismos fueron determinadas por microscopía de Epifluorescencia y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). Por otro lado se determinó el antibiograma de las cepas de *E. coli* nativa ambiental (P008), ATCC 25922 y cepas de origen hospitalario multirresistentes. Finalmente, se determinó la capacidad infectiva de los bacteriófagos sobre las cepas de *E. coli* a través de ensayos de titulación (UFP/mL) y la determinación de la Multiplicidad de Infección (MDI) estableciendo una distribución de Poisson que determine la relación infectiva Bacteriofago:Bacteria.

Resultados y Discusión: Se aislaron bacteriófagos de tres nichos ecológicos: el bacteriófago F de agua del río Choqueyapu, C1 de suelo de jardín particular y D2 de agua de la laguna Janko Khota de Milluni. Luego del establecimiento de las titulaciones UFP/mL y la determinación del MDI, se estableció la relación Bacteriofago:Bacteria mediante una distribución de Poisson estableciendo la relación entre el porcentaje de adsorción de bacteriófagos respecto a cada cepa de *E. coli* estudiada. El bacteriófago D2 de tipo filamentoso de longitud aproximada de 2000 nm (determinada por TEM) probablemente perteneciente a la familia *Inoviridae* tuvo mayor capacidad de infección y actividad lítica sobre las cepas de *E. coli* multirresistentes en comparación con los otros bacteriófagos.

Conclusiones: Se aislaron tres bacteriófagos con actividad bactericida sobre cepas de *E. coli*, siendo el primer aislamiento de bacteriófagos reportado a nivel nacional.

Palabras Clave: Bacteriófagos, *Escherichia coli*, Multiplicidad de Infección, Resistencia antibiótica.

ABSTRACT

Bacterial resistance to multiple substances is a worldwide public health problem, mainly due to the massive use of antibiotics. Nowadays, an alternative to antimicrobial therapy is the use of biocidal agents: probiotics, bacteriocins, primary metabolites and the biological control of bacterial strains with bacteriophages.

Materials and Methods: Bacteriophages were isolated from water and soil samples using the membrane filtration technique and screening, respectively. The morphological characteristics of them were determined by Epifluorescence Microscopy and Transmission Electron Microscopy (TEM). On the other hand, the antibiotype of the native *E. coli* strains (P008), ATCC 25922 and multidrug resistant strains of hospital origin was determined. Finally, the infective capacity of bacteriophages on *E. coli* strains was determined through titering assays (PFU/mL) and the determination of Multiplicity of Infection (MOI) by establishing a Poisson distribution that determines the infective relationship Bacteriophage:Bacteria.

Results and Discussion: Bacteriophages were isolated from three ecological niches: the bacteriophage F from water of the Choqueyapu River, C1 from private garden soil and D2 from water of the Janko Khota lagoon in Milluni. After the establishment of the UFP/mL titers and the determination of the MOI, the relationship between the percentage of adsorption of bacteriophages with respect to each strain of *E. coli* studied (Bacteriophage:Bacteria) was established through a Poisson distribution. The filamentous bacteriophage D2 of approximate length of 2000 nm (determined by TEM) probably belonging to the *Inoviridae* family had greater capacity for infection and lytic activity on multidrug resistant *E. coli* strains compared to the other bacteriophages.

Conclusions: Three bacteriophages with bactericidal activity on strains of *E. coli* were isolated, being the first bacteriophage isolation reported nationwide.

Key words: Bacteriophages, *Escherichia coli*, multidrug resistant, multiplicity of infection.

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia bacteriana a los antibióticos, se define como una condición microbiológica caracterizada por la capacidad natural o adquirida de una cepa bacteriana para permanecer refractaria a la acción de agentes bacteriostáticos o bactericidas de un antibiótico; lo cual lleva a la humanidad de vuelta a la "era pre-antibiótica". La incidencia de cepas de *E. coli* resistentes a múltiples antibióticos constituye un importante problema terapéutico tanto a nivel nacional como a nivel mundial.

El tratamiento para las infecciones para determinados patotipos de *E. coli* se basan en la terapia antimicrobiana de mediano y amplio espectro y además de espectro ampliado como ser: Ampicilina, Amoxicilina con Ácido Clavulánico, Cefotaxima, Cotrimoxazol, Gentamicina, Amikacina, Ciprofloxacina e Imipenem (según el criterio del médico responsable y el resultado de antibiograma). Sin embargo, el incumplimiento del tratamiento en el tiempo y la dosis indicada conllevan a que las cepas generen resistencia al antibiótico prescrito, además de la transferencia horizontal de genes de resistencia en la comunidad que está propiciada por los malos hábitos higiénicos y la contaminación fecal tanto en agua como en los alimentos.

En la actualidad una alternativa a la terapia con antibióticos es la utilización de agentes biológicos, en este sentido se han utilizado los probióticos por su modulación de la respuesta inmune, producción de bacteriocinas y metabolitos primarios inhibidores del crecimiento microbiano y los bacteriófagos para ejercer un control biológico en las cepas de interés o como agentes terapéuticos.

El interés renovado en la terapia con bacteriófagos que son los agentes biológicos más abundantes en el planeta, está dictado por sus ventajas la más importante es la alta especificidad con sus bacterias diana; ya que se encuentran en una relación directa con estas bacterias para mantener el balance natural de los ecosistemas, es por esta razón que en nichos ecológicos donde se presume la posible contaminación fecal, se puede inferir que se encontrarían bacteriófagos específicos de cepas de *E. coli*.

El Laboratorio de Referencia Nacional en Bacteriología Clínica (LRNBC) del Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA) ha reportado que en el año 2015 se aislaron 7413 cepas de *E. coli* con resistencia a múltiples antibióticos. En el Hospital Seguro Social Universitario (H.S.S.U.) se han reportado 709 aislamientos de cepas de *E. coli* multirresistentes el año 2015 y 671 cepas aisladas en el año 2016.

Esto conlleva a definir políticas de prevención y control de la resistencia antimicrobiana a todo nivel, debido a este panorama del flujo de las cepas de *E. coli* en distintos tipos de infecciones y además el antibiograma y la prevalencia de determinadas poblaciones.

Es lógico pensar que estas cepas se hallan presentes y distribuidas en el medio ambiente debido a diversos factores de proliferación e inoculación. Por lo tanto, como una alternativa innovadora a la aplicación de antisépticos, desinfectantes y antimicrobianos en general, el control biológico reflejado en la aplicación de bacteriófagos en el tratamiento de aguas de desecho o residuos sólidos de origen municipal, e industrial, podría ser una alternativa eco amigable y eficiente para el control de cepas multirresistentes de *E. coli*.

A. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones causadas por las cepas de *E. coli* en nuestro medio se dan por diferentes patotipos donde *E. coli* uropatogénica (UPEC) es la que se encuentra con mayor frecuencia, seguida de los patotipos intestinales tales como *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) y *E. coli* enteropatógena (EPEC) y otros patotipos menos comunes tales como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), *E. coli* adherente invasora (AIEC), *E. coli* enteroagregativa productora de toxina Shiga (STEAEC), *E. coli* asociada a meningitis neonatal (NMEC) y en animales la *E. coli* patógena aviar (APEC). Las enfermedades causadas por patotipos intestinales de *E. coli* generalmente son transmitidas por los alimentos con contaminación fecal por la mala manipulación y/o falta de higiene. Además que la presión de selección en el uso indebido de antimicrobianos, tanto en humanos como en animales, propaga los problemas de resistencia a los antimicrobianos.

La resistencia a los antimicrobianos está alcanzando niveles alarmantes de manera rápida, de tal manera que son un componente muy importante en el problema de salud pública a nivel mundial. La resistencia a múltiples fármacos en la familia de bacterias gramnegativas, principalmente *Salmonella*, *E. coli* y *Klebsiella*, se complica por la presencia de elementos genéticos móviles que pueden conferir resistencia entre una y otra cepa bacteriana.

Se ha reportado la frecuencia de patrones de resistencia específicos que implica resistencia a cefalosporinas y fluoroquinolonas de tercera generación en *E. coli* lo cual es de particular importancia. Se categoriza a la cepa estudiada como multirresistente si presenta resistencia a 2 o 3 antimicrobianos que se usan con frecuencia.

Los patrones de resistencia presentes en los aislamientos genéricos de *E. coli* de muestras veterinarias en un estudio realizado en Canadá en el año 2017, describe que los patrones de resistencia involucran quinolonas y cepasporinas de tercera generación y/o β -lactamasas (MacKinnon, M. Pearl, D. Carson, C. Parmley, E. & McEwen, S., 2018). En nuestro medio, las cepas de *E. Coli* multirresistentes que fueron reportadas en el INLASA desde el año 2006 hasta el 2015 contaban con el perfil de resistencia a β -lactamasas nitroderivados, animoglucósidos, quinolonas, sulfonamidas y/o diaminopiridinas. A la fecha no se encuentra previsto el lanzamiento de un nuevo antibiótico frente a bacterias gram negativas (Morejon, M., 2013).

Es por esta razón que el aislamiento y caracterización de bacteriófagos en nuestro medio puede ser muy importante para generar un banco de bacteriófagos que puedan utilizarse como estrategias de biocontrol o como agentes terapéuticos potenciando así su actividad bactericida.

El aislamiento de bacteriófagos específicos para cepas de *E. coli*, puede darse a partir de muestras ambientales ya sean de agua o suelo tomando en cuenta de que la muestra debe tener una posible contaminación fecal para la diseminación de cepas de *E. coli* en estos nichos ecológicos. Una vez aislados los bacteriófagos, es necesaria la purificación para conseguir bacteriófagos de la misma progenie, la amplificación del bacteriófago es útil para incrementar la población del mismo e potenciar su posible actividad bactericida que se verá reflejada con las playas de lisis en los ensayos de doble capa agarizada. La multiplicidad de infección de los bacteriófagos es la relación entre la cantidad de bacteriófagos que se adsorben a una determinada cantidad de bacterias, para corroborar el resultado de la multiplicidad de infección es necesario hallar la distribución de Poisson, en la cual se determina el

porcentaje de la cantidad de bacteriófagos que se adsorben a la membrana de una bacteria (dentro de una cantidad determinada de inóculo).

Desde una perspectiva científica, se considera que los bacteriófagos líticos pueden presentar ventajas para las estrategias basadas en el control biológico de microorganismos patógenos por lo cual se han estado investigando las propiedades de los bacteriófagos como agentes terapéuticos; a este campo de estudio se lo denomina fagoterapia y es uno de los más estudiados en la actualidad (Kiros, A. Gashaw, T. & Teshale, A., 2016; Pirnay, J. et al., 2018; Qadir, M., 2015).

El alcance inmediato de este trabajo pretende generar un banco de bacteriófagos que sean capaces de ejercer un control biológico en cepas de *E. coli* resistentes a múltiples antibióticos, para que puedan aplicarse a distintos ambientes donde potencialmente se encuentren cepas de *E. coli* multirresistentes. Esto podría dar lugar a la formación a ventajas biotecnológicas para el control bilógico de este tipo de cepas a largo plazo.

A. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad de infección y actividad litica de bacteriófagos aislados de muestras ambientales (agua y suelo), sobre cepas de *Escherichia coli* multirresistentes aisladas de muestras clínicas del S.S.U. en el año 2017.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar y caracterizar morfológicamente bacteriófagos de muestras ambientales con capacidad de infectar a cepas de *Escherichia coli*.
- Establecer la relación bacteriófago:bacteria a través de la determinación de la capacidad de infección y lisis de cepas de *E. coli* ATCC 25922, nativa ambiental P008 y multirresistentes S.S.U. 1-11.

II. DISEÑO TEÓRICO

A. MARCO REFERENCIAL

1. ANTECEDENTES

Estado del Arte de la aplicación de bacteriófagos como agentes de control biológico

El uso comercial de los bacteriófagos se aplica en el desarrollo de la terapia pre-clínica, control biológico mediado por bacteriófagos, aplicación de productos líticos de bacteriófagos, tecnologías de detección de bacterias, entre otros. Las compañías que se encargan de la investigación y el desarrollo de la terapia con bacteriófagos específicos para cepas de *E. coli* resistentes a múltiples antibióticos son: Adaptive Phage Therapeutics, AmpliPhi Biosciences, C3J Therapeutics, Enbiotix e Intralytix, en Estados Unidos, Evolution Biotechnologies, Phico Therapeutics y APS Biocontrol en Reino Unido, InnoPhage y Technophage en Portugal, Phagelux en China, Pherecydes Pharma, Eligo Bioscience y Clean Cells en Francia. Además existen otras industrias al rededor del mundo que trabajan con bacteriófagos para otros fines (Segundo, N. et al., 2010).

Existen muchas ventajas en la terapia con bacteriófagos una de las principales es la alta especificidad frente a las bacterias que reducen el daño a la microbiota del huésped, además son eficaces contra bacterias patógenas resistentes a los antibióticos. En el caso de que las bacterias desarrollen resistencia a la infección por bacteriófagos responden rápidamente por la frecuencia de mutación del bacteriófago que es significativamente mayor que la de las bacterias. También se pueden modificar genéticamente a los bacteriófagos, para que integren el material genético esencial para inducir sensibilidad hacia los antibióticos o generar antibacterianos específicos para la bacteria que se quiere eliminar. Se puede utilizar un coctel de bacteriófagos que tenga distintas cepas blanco de infección para erradicar a la mayor cantidad de bacterias posibles, o administrar las proteínas derivadas de bacteriófagos y no así todo el bacteriófago que de la misma manera generarán su actividad bactericida. El desarrollo de costos para un tratamiento con bacteriófagos es más barato que el de nuevos antibióticos. Son pocos los reportes de efectos secundarios (Segundo, N. et al., 2010).

A pesar de que las ventajas y los resultados son prometedores, aún existen algunas desventajas y situaciones que son preocupantes como en el caso de la utilización de un único bacteriófago para biocontrol es necesario identificar primero la bacteria para utilizar el bacteriófago específico. Son auto limitados, es decir, es necesario que sus hospedadores crezcan continuamente; ya que, en ausencia de los mismos, no persistirán el tiempo suficiente. Después de su administración, los bacteriófagos pueden disiparse muy rápidamente por todo el cuerpo y llegar a casi todos los órganos; pero el sistema inmunológico borra rápidamente los bacteriófagos sistémicos, lo que plantea otro problema para su aceptación como agente terapéutico. Otro inconveniente es que en algunas condiciones fisiológicas externas a la célula bacteriana, los bacteriófagos entran en ciclo lisogénico. Es

necesario que durante la preparación de las reservas de bacteriófagos asegurarse que estén libres de bacterias y toxinas bacterianas para evitar infecciones secundarias, pero esterilizar los bacteriófagos pudiese inactivarlos. La lisis bacteriana muy rápida puede provocar la liberación de una gran cantidad de endotoxinas unidas a la membrana bacteriana y generar algún tipo de patogenia. Aun no se tienen muchos datos farmacocinéticos en humanos (Segundo, N. et al., 2010).

Hasta el momento en nuestro medio no se han realizado trabajos de investigación sobre la aplicación de los bacteriófagos como agentes terapéuticos o como estrategias basadas en el biocontrol en cepas multirresistentes de *E. coli*.

Incidencia Mundial De La Resistencia A Los Antibióticos En Cepas De E. coli.

De acuerdo al Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) y el Centro de Prevención y Control de Enfermedades (CDC), definen a los Multirresistentes (MDR) como microorganismos resistentes a por lo menos un antibiótico en tres o más categorías. Estas bacterias son las causantes principales para la ineficiencia en los tratamientos de enfermedades infecciosas.

En los últimos años se ha reportado la diseminación de cepas de *E. coli* multirresistentes a los antibióticos de amplio espectro que se ha convertido en un problema significativo a nivel mundial. Por lo cual, las nuevas generaciones de antibióticos tienen baja expectativa de efectividad (Ibrahim, M. Bilal, N. & Hamid, M., 2012).

Se han aislado cepas *E. coli* con betalactamasas de espectro extendido (BLEE) también llamadas betalactamasas de espectro

ampliado (BLEA) en muestras de hospital y también de la comunidad. Las BLEE son enzimas producidas por los bacilos gran negativos principalmente enterobacterias, con más frecuencia por *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Su función es inactivar las penicilinas y a las cefalosporinas de primera y segunda generación, a las oximinocefalosporinas y al aztreonam. En la actualidad en España se ha encontrado un nuevo tipo de BLEE, que generan resistencia a las cefotaximasas CTX-M de naturaleza plasmídica (Cefotaxima, cefuroxima y cefepime) Las cepas productoras de BLEE confieren resistencia a los betalactámicos excepto a las cefamicinas y a los carbapenémicos; pero además los plásmidos que codifican las BLEE portan genes de resistencia (transposones) a otros antimicrobianos como aminoglucósidos, tetraciclinas y cotrimoxazol, es por lo que el fenómeno de resistencia cruzada es muy frecuente y el tratamiento de las infecciones producidas por estas cepas tiene una mayor dificultad. Además, las cepas productoras de BLEE presentan mayor resistencia a fluoroquinolonas que las que no lo son.

En Arabia Saudita la resistencia a los antibióticos en los aislamientos de *E. coli* está aumentando debido a la utilización sin restricciones de los antibióticos. Por lo tanto, un porcentaje considerable de cepas de *E. coli* indicó un fenotipo de resistencia a múltiples fármacos, entre ellos la categoría más resistente fue contra ampicilina seguida de Ciprofloxacina, Gentamicina, ácido nalidíxico, Cefotaxima, ofloxacina, Amikacina e Imipenem, en las muestras clínicas. En las muestras de alimentos se observaron resultados de resistencia a sulfafurazol, la ampicilina, el ácido nalidíxico, la estreptomina, el cloramfenol y la Gentamicina por parte de las cepas de *E. coli* (Taha, M. Homeida, H. Dafalla, O. & Abdelwahab, S., 2018).

En Estados Unidos los aislados de *E. coli* presentan resistencia a las penicilinas de espectro extendido, cefalosporinas de tercera y cuarta generación, carbapenemes, nitrofurantoína, fluoroquinolonas y aminoglucósidos (0 % a 4 %). En contraste, las tasas de resistencia fueron mayores para ampicilina (43 %), ampicilina-sulbactam (55 %), trimetoprim-sulfametoxazol (20 %) y cefalosporinas de primera generación (15 % a 24 %) (Uzodi, A. Lohse, C. & Banerjee, R., 2017).

- ***Incidencia en La Paz – Bolivia de la resistencia a los antibióticos en cepas de E. coli.***

El Laboratorio de Referencia Nacional en Bacteriología Clínica (LRNBC) del INLASA ha reportado entre el 2010 y el 2015 los patrones de resistencia antimicrobiana de cepas de *E. coli* provenientes de aislamientos ambulatorios e intrahospitalarios (Figura 1).

Los perfiles de resistencia en estos años reflejan una resistencia múltiple a Ampicilina, Trimetoprim-Sulfametoxazol, Cefalotina, Ciprofloxacina, Ácido Nalidíxico, Amoxicilina + Ácido Clavulánico, Gentamicina y Cefotaxima.

Es necesario comprender la diseminación de la resistencia bacteriana a los agentes antimicrobianos para poder controlar el problema tanto nacional como internacionalmente. En general, la resistencia a los agentes antimicrobianos utilizados en patógenos comúnmente aislados como es *E. coli* es el resultado de la presión selectiva causada por el uso frecuente de estos agentes. Debido al cambio en los patrones de resistencia que están ocurriendo en La Paz, Bolivia y en todo el mundo, se necesita una vigilancia continua de la resistencia que presentan estos patógenos para optimizar la atención al paciente (Sander, H. et al., 2001).

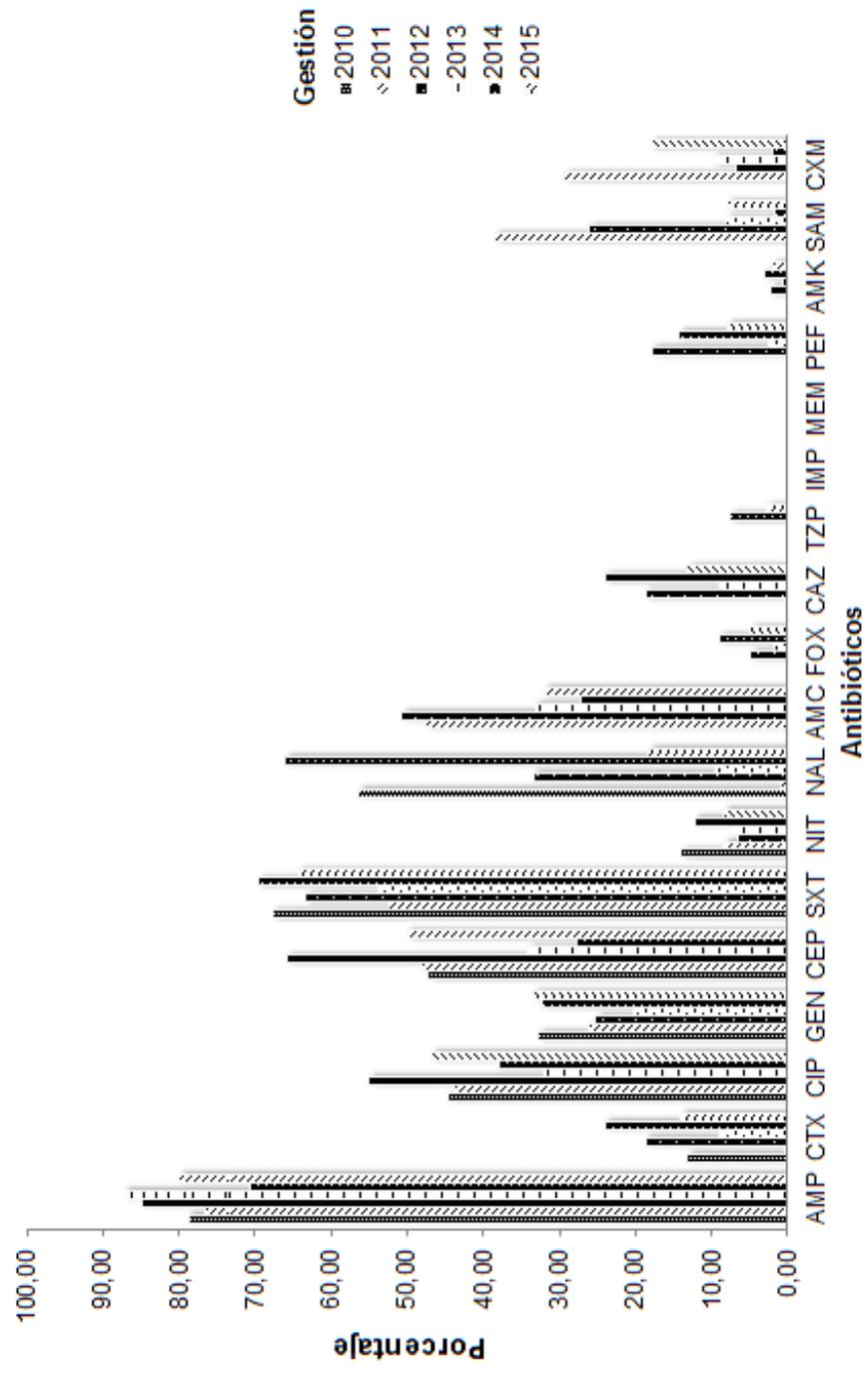


Figura 1. Porcentaje de cepas de *E. coli* multiresistentes a varios antibióticos. LRNBC-INLASA (2010-2015)

AMP: Ampicilina, CTX: Cefotaxima, CIP: Ciprofloxacina, GEN: Gentamicina, CEP: Cefalotina, SXT: Trimetoprim-Sulfametoxazol, NIT: Nitrofurantoina, NAL: Acido Nalidixico, AMC: Amoxicilina + Acido Clavulánico, FOX: Cefoxitina, CAZ: Ceftazidima, TAZ: Piperacilina + Tazobactam, IMP: Imipenem, MEM: Meropenem, PEF: Pefloxacinna, AMK: Amikacina, SAM: Ampicilina + Sulbactam, CXM: Cefuroxima.

En la Figura 2 se observan los patrones de resistencia de las cepas de *E. coli* tanto de aislamientos intrahospitalarios como ambulatorios del S.S.U. desde el 2014 hasta el 2016.

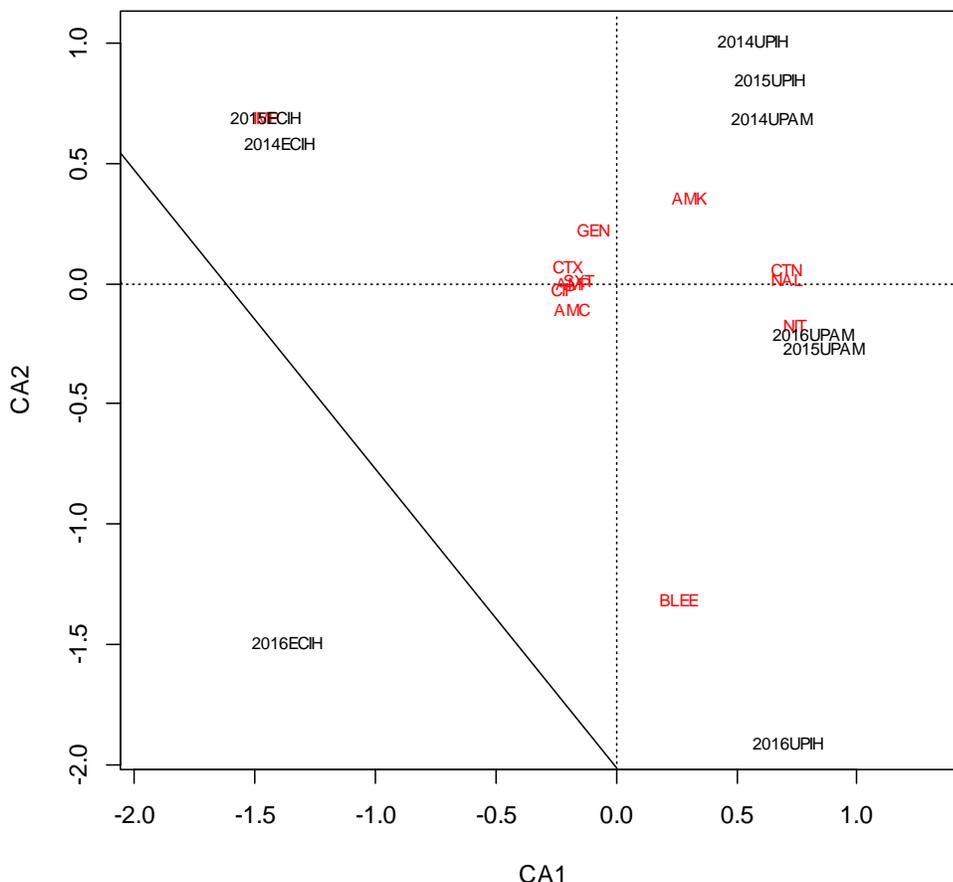


Figura 2. Análisis de correspondencia de las cepas de *E. coli* intrahospitalarias y de aislamientos ambulatorios del S.S.U. con respecto a sus perfiles de resistencia.

ECIH: Cepas de *E. coli* no Uropatógena de Aislamientos Intrahospitalarios, UPIH: Cepas de *E. coli* Uropatógena de Aislamientos Intrahospitalarios, UPAM: Cepas de *E. coli* Uropatógena de Aislamientos Ambulatorios. El número que se presenta antes de cada sigla corresponde al año en el que fueron aisladas. AMP: Ampicilina, CTX: Cefotaxima, CIP: Ciprofloxacina, GEN: Gentamicina, CEP: Cefalotina, SXT: Trimetoprim – Sulfametoxazol, NIT: Nitrofurantoína, NAL: Ácido Nalidíxico, AMC: Amoxicilina + Ácido Clavulánico, FOX: Cefoxitina, CAZ: Ceftazidima, TZP: Piperaciclina + Tazobactam, IMP: Imipenem, MEM: Meropenem, PEF: Pefloxacina, AMK: Amikacina, SAM: Ampicilina + Sulbactam, CXM: Cefuroxima

Las cepas de *E. coli* aisladas entre el 2014 y el 2016 muestran una resistencia elevada a la familia de las penicilinas, siendo la Ampicilina y Amoxicilina los dos antibióticos estudiados, en el caso de la Ampicilina no existe una variación significativa sobre la cantidad de cepas aisladas en este periodo de tiempo que sean resistentes a este antibiótico, sin

embargo las cepas resistentes a la Amoxicilina aisladas fueron aumentando a lo largo de estos años; en el caso de las cefalosporinas de tercera generación, se estudiaron la Cefalotina y Cefotaxima, en el caso de la Cefalotina se encontró que las cepas resistentes aisladas han aumentado a través de este tiempo, no obstante en el caso de la Cefotaxima el aislamiento de cepas resistentes a este antibiótico fueron disminuyendo a través de los años. Las cepas de *E. coli* aisladas también mostraron una alta resistencia a las Quinolonas estudiadas como Ácido Nalidíxico y la Ciprofloxacina junto con las Sulfonamidas como Cotrimoxazol que también fue aumentando a lo largo de estos años. Por otro lado, las cepas estudiadas presentaron mayor sensibilidad a los aminoglucósidos como Gentamicina y Amikacina (mayor sensibilidad que hacia Gentamicina) igual que a las nitrofuranos (Nitrofurantoína) y carbapenémicos (Imipenem).

De acuerdo a la procedencia de las cepas aisladas de *E. coli*, en la Figura 2 se puede observar el perfil de resistencia de estas cepas. Mientras más cerca se encuentran las abreviaturas de los antibióticos con el tipo de aislamiento junto con el año en el que se aisló quiere decir que las cepas son más resistentes a ese antibiótico, por el contrario, mientras más lejos se encuentren el uno del otro sugiere mayor sensibilidad al antibiótico por parte de este tipo de aislamiento en ese año.

Las cepas de *E. coli* Uropatógena de Aislamientos Intrahospitalarios (UPIH) muestran que las cepas aisladas tienen un patrón de resistencia muy alto hacia las penicilinas (Ampicilina y Amoxicilina), quinolonas (Ácido Nalidíxico y Ciprofloxacina) y sulfonamidas (Cotrimoxazol) estudiadas. Además en los tres años de estudio se aislaron más cepas con este perfil de resistencia a los antibióticos estudiados; en el caso de las cefalosporinas, las cepas presentaron mayor resistencia a la

Cefalotina y mayor sensibilidad a la Cefotaxima. Sin embargo, los aislamientos mostraron alta sensibilidad a los aminoglucósidos (Amikacina) y nitrofuranos (Nitrofurantoína); en este tipo de aislamiento no se registraron cepas resistentes a carbapenémicos (Imipenem).

En el caso de las cepas de *E. coli* No Uropatógena de Aislamientos Intrahospitalarios se puede observar que las cepas aisladas mantienen la resistencia a las penicilinas, sulfonamidas y quinolonas (no se utilizó Ácido Nalidixico) estudiadas, en el caso de las cefalosporinas (no se utilizó Cefalotina) y Gentamicina (Aminoglucósido) se observó que existe baja resistencia a estos antibióticos en las cepas aisladas, sin embargo las cepas presentaron alta sensibilidad a Amikacina (Aminoglucósido) e Imipenem (Carbapenémicos) en ambos casos solo en el año 2015 se reportaron cepas resistentes a estos antibióticos.

Las cepas de *E. coli* Uropatógena de Aislamientos Ambulatorios mostraron alta resistencia a las penicilinas, sulfonamidas y quinolonas, al igual que los otros aislamientos, presentaron también resistencia intermedia a las cefalosporinas de tercera generación y a la Gentamicina, sin embargo, tienen alta sensibilidad a Amikacina y son totalmente sensibles a Imipenem.

En Colombia se realizó una vigilancia nacional de resistencia antimicrobiana de enterobacterias entre las gestiones 2012 y el 2014 en el cual se encontró que la resistencia presentada por las cepas de *E. coli* aisladas hacia las penicilinas, Ciprofloxacina (quinolonas) y Amikacina (aminoglucósidos) es menor que los resultados del SSU en el caso de la Cefotaxima (cefalosporinas) el perfil de resistencia presentado por las cepas de *E. coli* es similar y la resistencia reportada de las cepas aisladas hacia el Imipenem es mayor al del S.S.U. (Ovalle, M., 2017).

La OMS publica un reporte anual sobre el análisis de la resistencia a los antimicrobianos a nivel mundial, según el reporte del 2015, se tienen 35 países miembros en el continente Americano, de los cuales 13 países enviaron información sobre el monitoreo de la resistencia antimicrobiana. Cerca del 50% de los países miembros reportaron que se venden antimicrobianos sin necesidad de una prescripción médica, solo el 40% de los países miembros pueden preparar un tratamiento estándar reglamentado y el 17% monitorean la resistencia antimicrobiana anualmente. No existen datos actualizados, no obstante, el conjunto de estos factores confieren alta resistencia de las cepas a los antimicrobianos, que se ha constituido ya en un problema a nivel mundial.

2. DESCRIPCIÓN DEL ÁMBITO DE ESTUDIO

Las investigaciones sobre el aislamiento de bacteriófagos provenientes de muestras ambientales se realiza a nivel mundial tanto en aguas residuales como en suelo, la característica principal de las muestras es la potencial contaminación fecal (Adibi, M. et al., 2017; Shende, R. Hirpurkar, S. Sannat, C. Rawat, N. & Pandey, V., 2017), estos bacteriófagos tuvieron una actividad biocontroladora sobre cepas de *E. coli* O157:H7; en Latinoamérica se han realizado trabajos de investigación aislando bacteriófagos específicos de *E. coli* para verificar la contaminación fecal en suelo y aguas residuales tanto en Ecuador, Perú, Argentina y Brasil entre otros. En nuestro país aún no existen publicaciones sobre el aislamiento de bacteriófagos.

En Canadá, el Programa Canadiense Integrado para la Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (CIPARS) proporciona vigilancia de las bacterias resistentes a múltiples antibióticos en bacterias entéricas (*Escherichia coli*, *Salmonella* y *Campylobacter*). Los programas de

vigilancia como el CIPARS o el equivalente estadounidense [Sistema Nacional de Monitoreo de la Resistencia Antimicrobiana (NARMS)] identifican tendencias temporales en la resistencia bacteriana a múltiples antibióticos que sirven para mantener la efectividad de los agentes antimicrobianos actuales y mejorar la crisis de la multiresistencia. En nuestro medio el INLASA es el encargado de estudiar el antibiograma de las cepas de *E. coli* multiresistentes emergentes anualmente, lo que permite el estudio y comparación de los perfiles de resistencia de las cepas a través de los años. Sin embargo, es necesario generar un banco de cepas de *E. coli* multiresistentes para realizar estudios posteriores de acuerdo al requerimiento de antibióticos y a las alternativas terapéuticas.

B. MARCO TEÓRICO

1. El desarrollo del estudio de los bacteriófagos a lo largo del tiempo

En 1896 el bacteriólogo Ernest Hankin indicó que el agua de los ríos Ganges y Junna, en la India, tenían una acción bactericida marcada, estudió el efecto de estas aguas sobre el *Vibrio cholerae* y surgió la hipótesis de que si se ingería estas aguas, la epidemia del cólera ya no se extendería, pues se había encontrado la sustancia responsable de la acción bactericida frente a este microorganismo (Fernández, J. 2004). En 1898 Nikolay Gamaleya un bacteriólogo ruso observó un fenómeno similar (Elbreki, M. et al., 2014); Sin embargo, fue Frederick Twort, un médico bacteriólogo Británico en 1915 quien reporta haber observado la presencia de agentes filtrables y fue él quien dio la hipótesis que sugería que eran partículas virales, no obstante debido a diversas circunstancias Twort no continuó con sus experimentos y fue hasta dos años después que se consideró a los bacteriófagos oficialmente descubiertos por un Francocanadiense Félix d'Herelle en 1917, quien les dio el nombre de

bacteriófagos por su capacidad de lisar bacterias (Segundo, N. Hernández, E. López, O. & Torres, O., 2010).

A fines de los años 30, hubo una reunión en Copenhague, donde se trataron de explicar la biología y la herencia, lo que llevó a Max Delbrück, un físico, a interesarse por las bacterias y bacteriófagos, como elementos de estudio y fue él quien les dio mayor desarrollo (Sanchez, C., 2015).

En 1942 Thomas Anderson, obtuvo las primeras microfotografías electrónicas de los bacteriófagos (Fernández, J., 2004).

Hacia los años 70, las bacterias, sus bacteriófagos y además plásmidos, ayudaron a crear dos áreas nuevas en investigación la Ingeniería Genética por la “Revolución del DNA recombinante”, con la cual se logró introducir genes de cualquier organismo, (sin importar su complejidad) en genes de bacteriófagos, y la Biotecnología (Sanchez, C., 2015) por la utilización de los bacteriófagos en terapias y control biológico de bacterias patógenas. Los tratamientos exitosos se han desarrollado para tratar infecciones en humanos, ganado e incluso en plantas (Golkar, Z. Bagasra, O. & Gene, D., 2014).

2. Morfología y características moleculares de los bacteriófagos

Existen muchas similitudes entre los bacteriófagos y los virus de células animales, por lo cual los bacteriófagos pueden ser visualizados como sistemas modelo de los virus que infectan a células bacterianas. Los bacteriófagos son los agentes biológicos que más abundan en el planeta, se estima que se encuentran en un rango de diversidad de 10^{31} - 10^{32} partículas virales, cumpliendo un rol importante en el balance de los ecosistemas bacterianos (Kutter, E. & Sulakvelidze, A., 2005; Lin, D. et al., 2017; Punil, R., 2017). Estudios en aguas residuales hasta el 2006,

sugieren que los bacteriófagos pueden llegar a 10^5 UFP/mL (Espigares, M., 2006) mientras que se calcula alrededor de 10^{30} - 10^{32} UFP/mL, o más en el agua de mar en estudios desde el 2010 hasta el 2017 (Hernández, R. et al., 2011; Segundo, N. et al., 2010). En cuanto a las muestras de suelo, en estudios del 2008 se encontró que existían $20 - 390 \times 10^7$ UFP/g de suelo (Lee, J., 2008) mientras que, en el 2011 un estudio reveló que en suelo subterránea existen aproximadamente $0.25 - 2.5 \times 10^{30}$ UFP/g y en los sedimentos oceánicos $1.2 - 2.6 \times 10^{29}$ hasta 3.5×10^{30} UFP/g (Clokic, M. Millard, A. Letarov, A. & Heaphy, S., 2011).

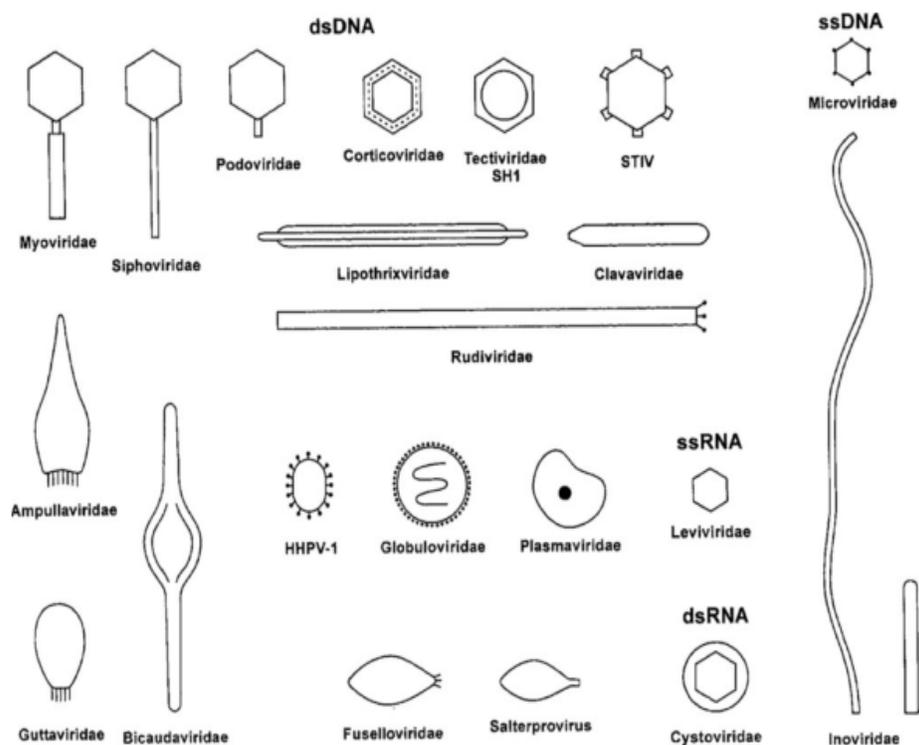


Figura 3. Morfotipos de los bacteriófagos. (Ackermann, H. & Prangishvili, D., 2012)

Actualmente se ha podido examinar por Microscopía electrónica más de 5500 bacteriófagos, que de acuerdo a su morfología pertenecen al menos a 10 familias ya clasificadas. Esta clasificación se basa tanto en las características morfológicas como la presencia o ausencia de cubierta externa y el tipo de ácido nucleico. Es así que los bacteriófagos incluyen

virus con DNA doble cadena (DNAds; la mayor parte de la población), DNA simple cadena (DNAss), RNA simple cadena (RNAss), y RNA doble cadena (RNAdc; muy raras ocasiones). Aproximadamente el 96% de la población tienen cola; otros tipos son: de simetría icosaédrica (cúbicos), filamentosos y pleomórficos. Algunos tipos contienen una envoltura lipídica (Ackermann, H., 2007; Ackermann, H. & Prangishvili, D. 2012). En la figura 3 se pueden observar las morfologías encontradas gracias a la Microscopía electrónica de Transferencia (TEM) descritas por H. Ackermann en distintas publicaciones. La tabla 1 es información que complementa los morfotipos y clasifica los bacteriófagos de acuerdo a su forma, familia y describe algunas particularidades.

Tabla 1. Morfotipos y clasificación de los bacteriófagos de acuerdo a su forma, familia y particularidades.

FORMA	ACIDO NUCLEICO	FAMILIA	GÉNERO	PARTICULARIDADES	EJEMPLO	MIEMBROS
Bacteriófagos con cola	DNAds, (L)	<i>Myoviridae</i>	6	Cola contractil	T4	1320
		<i>Siphoviridae</i>	7	Cola larga y no contractil	λ	3229
		<i>Podoviridae</i>	4	Cola corta	T7	771
Bacteriófagos poliédricos	DNAss (C)	<i>Microviridae</i>	4	Capsómeros visibles	ϕ X174	40
	DNAds (C,S)	<i>Corticoviridae</i>	1	Cápside compleja, lípidos	PM2	32
	DNAds (L)	<i>Tectiviridae</i>	1	Cápside doble, lípidos, pseudo-cola	PRD1	19
	DNAds (L)	SHI*		Cápside doble, lípidos	SH1	1
	DNAds (C)	STIV*		Protuberancias en forma de torreta	STIV	1
	RNAss (L)	<i>Leviviridae</i>	2	Como Poliovirus	MS2	39
Bacteriófagos filamentosos	DNAss (C)	<i>Inoviridae</i>	2	Filamentos largos, barras cortas	M13	67
	DNAds (L)	<i>Lipothrixviridae</i>	4	Envoltura, lípidos	TTV1	7
	DNAds (L)	<i>Rudiviridae</i>	1	Varillas rígidas, como el TMV	SIRV-1	3
Bacteriófagos pleomórficos	DNAds (C,S)	<i>Plasmaviridae</i>	1	Envoltura, sin cápside, lípidos	L2	5
	DNAds (C,S)	<i>Fuselloviridae</i>	1	Forma de limón, envoltura, lípidos?	SSV1	11
	DNAds (L,S)	-	1**	Forma de limón, envoltura	His1	1
	DNAds (C,S)	<i>Guttaviridae</i>	1	Forma de gota	SNDV	1
	DNAds (L)	<i>Ampullaviridae</i> *		Forma de botella, NC de hélice	ABV	1
	DNAds (C)	<i>Bicaudaviridae</i> *		Doble cola, desarrollo en ciclo, NC en hélice	ATV	1
DNAds (L)	<i>Globuloviridae</i> *		Envoltura, esférico, lípidos, NC en hélice	PSV	1	

C, circular; L, lineal; M, multipartita; NC, nucleocápside; S, superenrollado; —, sin nombre; *, no clasificado; **, género *Salterprovirus*. Los miembros indican numerosos bacteriófagos examinados por microscopía electrónica, excluyendo bacteriófagos como bacteriocinas y conocidos como bacteriófagos defectuosos. (Clokic, M. & Kropinski, A., 2009)

La mayoría de los bacteriófagos poseen distintas características como se muestran en la Tabla 2 respecto a: tamaños diferentes como el bacteriófago T4 que es uno de los bacteriófagos más grandes, tiene aproximadamente 200 nm de largo y 80 - 100 nm de ancho. La mayoría de los bacteriófagos están entre un rango de 24 - 200 nm de longitud. La cabeza o cápside también varía de tamaño y forma. Algunos son icosaédricos y otros son filamentosos. La cabeza o cápside está compuesta por copias de una o más proteínas diferentes y en el interior se encuentra el material genético. Y por último la cola puede o no estar presente en el fago unida a la cabeza, esta es un tubo hueco a través del cual el ácido nucleico pasa durante la infección.

Tabla 2. Características de los bacteriófagos respecto al tamaño, largo de cola, porcentaje de lípidos y ácido nucleico.

FAMILIA O GÉNERO	TAMAÑO DE CÁPSIDE, nm	LARGO DE COLA, nm	LÍPIDOS, %	ÁCIDO NUCLEICO	
				%	MW, kb
<i>Bacteriófagos con cola</i>	67	153	-	46	79
<i>Rango</i>	30-160	10-800	-	30-62	17-498
Myoviridae	27		-	26	4.4-6.1
Corticoviridae	60		13	14,3	9.0
Tectiviridae	63		15	14	15-16
<i>SHI*</i>	70		+		30.9
<i>STIV*</i>	74		-		17,6
Leviviridae	23		-	30	3.5-4.3
Cystoviridae	75-80		20	10	13.4
Inoviridae (Inovirus) (Plectrovirus)	760-1950x7 85-250x7		-	6-21	5.8-7.3
Lipothrixviridae	410-2200x24-38		22	3	16-42
Rudiviridae	610-900x23		-		33-36
Plasmaviridae	80		11		12
Fuselloviridae	85x55		10		15
Salterprovirus	74x44				15
Guttaviridae	110-185x70-95		-		20
<i>Ampullaviridae*</i>	230x75		-		24
<i>Bicaudaviridae</i>	130-150x56-70	260-760x24			62.7
<i>Gloculoviridae</i>	100		+		28.3

kb, kilobases; MW, peso molecular; nm, nanómetros, +, presente; -, ausente. (Clokic, M. & Kropinski, A., 2009)

3. Ciclo de multiplicación de los bacteriófagos

Los bacteriófagos presentan dos ciclos biológicos de replicación, el ciclo lítico (Bacteriófagos líticos o virulentos) y el ciclo lisogénico (Bacteriófagos temperados o profagos) (Zheng, S., 2013).

Ciclo lítico

Este ciclo comprende siete etapas desde la adsorción del bacteriófago y la bacteria hasta la lisis bacteriana liberando una nueva progenie de bacteriófagos.

- ***Primera etapa: reconocimiento y adsorción***

En esta etapa el fago reconoce los receptores presentes en la membrana bacteriana y se adsorbe, esto sucede de manera muy específica, los fagos se unen a la bacteria mediante cualquier parte que sea reconocida por el receptor de membrana (proteínas de cápside, cola, placa basal o fibras).

El receptor de membrana cambia de acuerdo al tipo de bacteria, puede ser gram-positiva con elementos como peptidoglicanos, ácidos teicoicos, lipoteicoicos y proteínas asociadas a la pared celular o ser gram-negativa que tiene componentes de los lipopolisacáridos (LPS), proteínas de la membrana externa, como porinas y proteínas de transporte.

Un mismo fago puede tener como receptores varias moléculas y poseer varias adhesinas diferentes en su estructura. Cuantas más moléculas pueda reconocer como receptores, más amplio será el rango de huésped del fago, es decir, mayor será el número de cepas, especies

y en algunos casos géneros bacterianos que podrá utilizar como huéspedes. Los bacteriófagos requieren cofactores como los iones Ca^{+2} y Mg^{+2} o cualquier catión divalente que magnifica la eficiencia de adsorción (Punil, R., 2017; Quiroz, E., 2005).

- ***Inyección del material genético del bacteriófago***

La adsorción suele tener una etapa reversible y otra irreversible. En esta última la proteína basal sufre un cambio en su estructura, provocando un poro en la membrana citoplasmática de la bacteria entonces se contrae la vaina del fago y ocasiona la inyección del genoma viral que se desplaza desde la cápside hasta el citoplasma bacteriano a través de la cola, y debido a que el poro no es lo suficientemente grande deja en el exterior al bacteriófago vacío (Letellier, L. Boulanger, P. Plancon, L. Jacquot, P. & Santamaria, M., 2004).

Luego del ingreso del material genético viral se detiene la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas del hospedador y comienza a sintetizar los ácidos nucleicos y proteínas del bacteriófago (Hernández, A., 2007).

- ***Transcripción***

Esta etapa inicia con el reconocimiento del RNA polimerasa por los promotores del bacteriófago en la bacteria hospedera, esto conduce a la transcripción de los genes tempranos inmediatos del bacteriófago. Los productos de estos genes se encargan de proteger el material genético del bacteriófago inactivando proteasas, enzimas de restricción, terminando procesos de biosíntesis de macromoléculas por parte del anfitrión y destruyendo macromoléculas del hospedador bacteriano (Fernández, I., 2016).

- ***Replicación***

La replicación del material genético se produce posteriormente a la transcripción temprana, su eficiencia depende tanto del genoma del bacteriófago como de la bacteria hospedera ya que para este proceso utilizará la maquinaria de replicación de su hospedero. y se considera el evento que marca la transición de las funciones virales tempranas a las tardías (Hernández, A., 2007).

La replicación del DNA del bacteriófago da lugar a una única molécula lineal de DNAs, denominada concatémero, que contiene varias copias del genoma del bacteriófago una a continuación de la otra (Engelkirk, P., 2013).

- ***Biosíntesis de proteínas estructurales***

El RNAm tardío dirige la síntesis de tres tipos diferentes de proteínas; proteínas estructurales, que son las piezas que van a componer la cabeza, cápside y la cola; proteínas que participan en el ensamblaje del bacteriófago, por ejemplo, las denominadas proteínas de andamio, que participan en el ensamblaje de las cápsides y son eliminadas una vez concluida su construcción; y además las proteínas responsables de la lisis celular y la liberación de los bacteriófagos (Hernández, A., 2007).

- ***Ensamblaje***

Después de haber sintetizado todas las estructuras necesarias para formar nuevos bacteriófagos, se da paso al ensamblaje de las piezas, se empaqueta el material genético en una envoltura proteica denominada cápside, que está ligado a su vez a estructuras como la cola que le

proporciona la capacidad de infección (Kutter, E. & Sulakvelidze, A., 2005).

- ***Lisis y liberación de los bacteriófagos***

El ciclo lítico termina con la lisis de las bacterias hospedadoras y la liberación de la progenie viral. Por lo general, la lisis bacteriana requiere la acción de dos enzimas codificadas por el genoma del bacteriófago: la lisina, que actúa degradando el peptidoglicano de la pared celular, y la holina, que provoca la desorganización de la membrana celular, generando poros que permiten el acceso de la lisina a la pared celular (Brussow, H., 2001; Wang, I. Deaton, J. & Young, R., 2003).

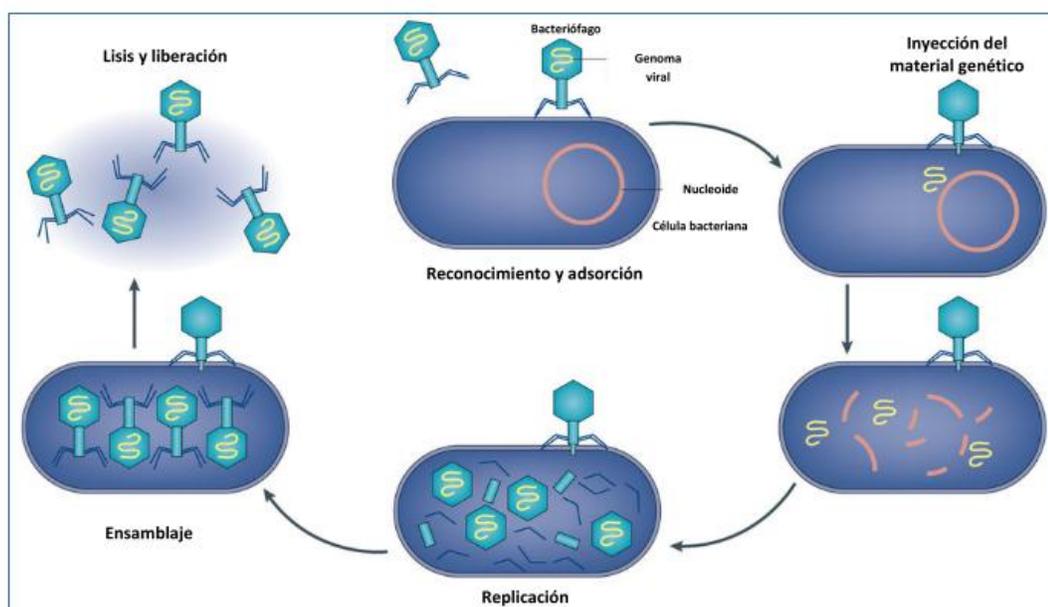


Figura 4. Ciclo lítico de los bacteriófagos (Punil, R 2017).

Ciclo lisogénico

En el ciclo lisogénico no ocurre la lisis bacteriana, porque los fagos temperados tienen la capacidad de formar una relación estable con la bacteria hospedadora.

Las primeras dos etapas son las mismas que en el ciclo lítico la adsorción y la inyección del material genético, sin embargo, luego de la segunda etapa el material genético del bacteriófago se integra en forma de profago en el genoma bacteriano, pudiendo replicarse junto a éste a lo largo de muchas generaciones (Hernández, A., 2007; Punil, R., 2017).

Una vez que un profago permanece integrado en el material genético de la bacteria hospedadora le genera inmunidad frente a una nueva infección del mismo bacteriófago, además los profagos han estado presentes a lo largo de la evolución, siendo importantes en la transferencia de material genético (Dini, C., 2011).

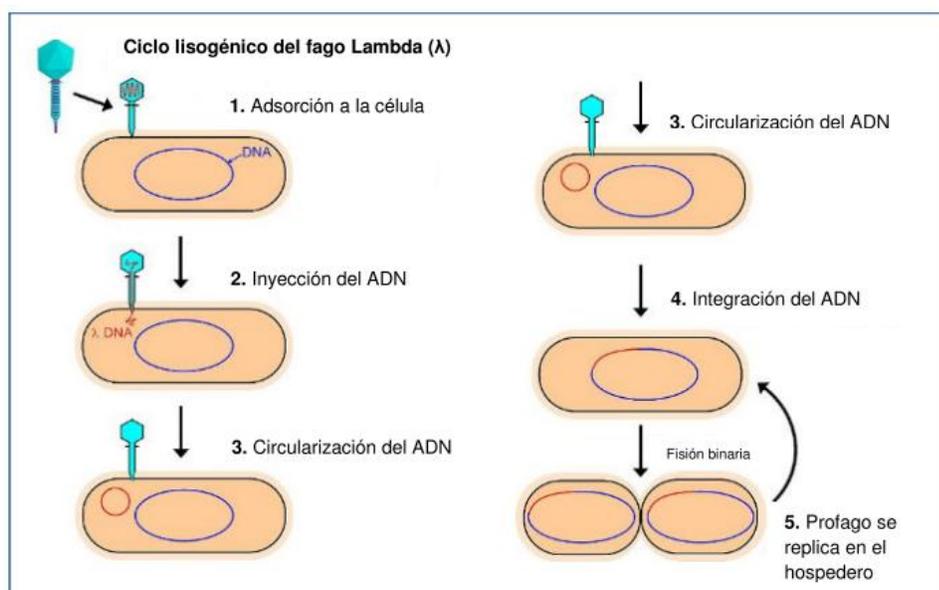


Figura 5. Ciclo lisogénico de los bacteriófagos (Punil, R., 2017).

- ***El interruptor genético o terminación de la lisogenia***

En determinadas condiciones, el profago puede comenzar un ciclo lítico conduciendo a la lisis bacteriana liberando los nuevos bacteriófagos. Las condiciones que favorecen la terminación del estado lisogénico incluyen: desecación, exposición a la luz UV o radiación

ionizante, exposición a químicos mutagénicos, a este proceso se le llama inducción (Punil, 2017).

Se conoce como interruptor genético al mecanismo que determina el desencadenamiento del ciclo lítico. Las condiciones adversas anteriormente mencionadas conducen a la producción de una proteasa (proteína rec A) la cual destruye a la proteína CI (reprime la expresión de los genes líticos provocando el establecimiento del ciclo lisogénico) y esto conduce a la activación de la proteína Cro (inhibe la expresión de los genes lisogénicos tempranos y activa la expresión de los genes líticos) lo que termina en la lisis bacteriana (Hernández, A., 2007).

4. Coevolución entre bacteriófagos y bacterias

La coevolución es un cambio evolutivo recíproco entre especies que interactúan impulsadas por la selección natural y es posible que esta sea una fuerza importante en la configuración de la biodiversidad. En las comunidades microbianas, el cambio evolutivo entre bacterias huéspedes y bacteriófagos ocurre a la misma escala que el cambio ecológico. Sin embargo, todavía no se ha logrado coleccionar evidencia experimental del papel de la coevolución en impulsar cambios en las comunidades microbianas (Bascompte, 2019).

A través de la evolución, las bacterias han coexistido con sus bacteriófagos respectivos, experimentando ciclos continuos de infección y como consecuencia para sobrevivir y prosperar, las bacterias han desarrollado mecanismos de defensa contra los bacteriófagos. Algunos de estos mecanismos pueden observarse en la Figura 6.

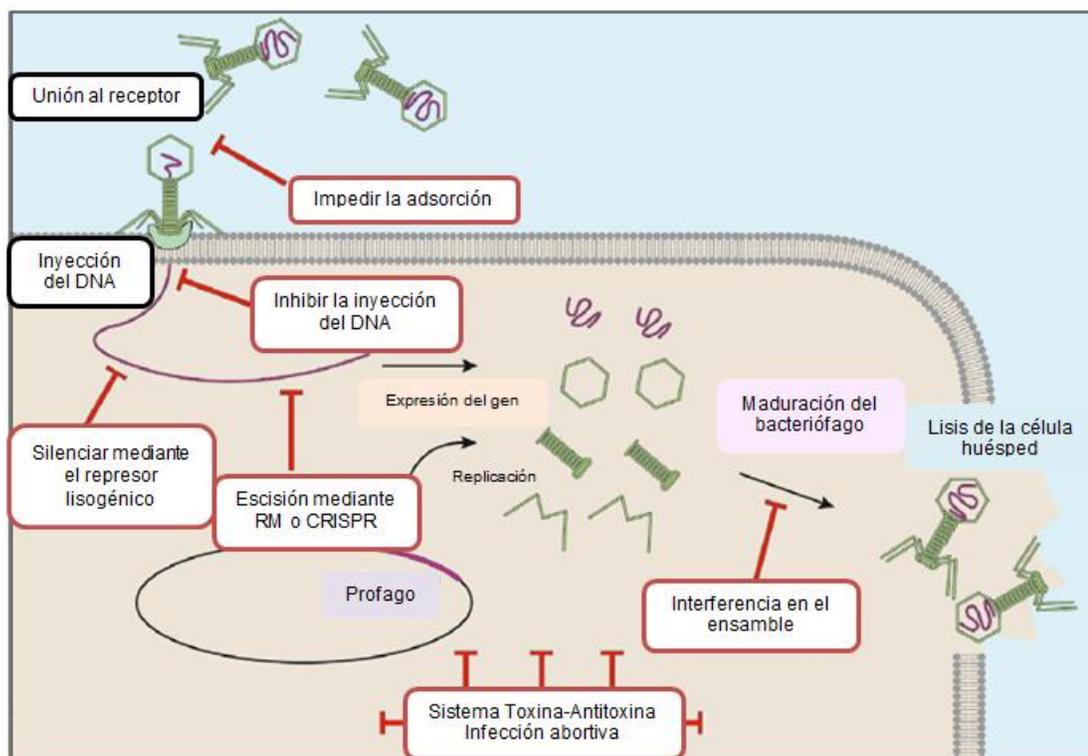


Figura 6. Etapas del ciclo de vida de un bacteriófago lítico que puede ser atacado por diferentes mecanismos de defensa bacterianos (Rostøl, J., 2019).

Impedir la adsorción del bacteriófago

En el caso de nichos ecológicos que tengan biopelículas se ha realizado un estudio virtual que mostró que el bacteriófago T7 infectó y erradicó las primeras colonias de *E. coli* dentro de biopelículas, sin embargo, las biopelículas formadas por colonias maduras de *E. coli* evitaron la infección del bacteriófago T7.

Además del escudo protector proporcionado por las biopelículas, las bacterias Gram negativas pueden segregar vesículas de membrana externa (OMV, Outer Membrane Vesicles), que son estructuras esféricas compuestas por componentes de membrana externa que pueden actuar como señuelos extracelulares de los bacteriófagos. En trabajos de investigación se mostró que la pre-incubación con OMVs redujo la infectividad del bacteriófago T4 en *E. coli*, y los complejos de OMV

unidos a los bacteriófagos podrían visualizarse con Microscopía electrónica. Las bacterias también pueden prevenir la adsorción al ocultar o enmascarar los receptores de superficie. Por ejemplo, en *Pseudomonas aeruginosa*, el pili IV se puede glicosilar para prevenir la unión de varios bacteriófagos específicos. Los receptores también pueden ser bloqueados por las cápsulas de polisacárido, que protegen al conjunto de la superficie bacteriana, la cápsula de ácido polisialico de *E. coli* K1 evita el enlace del bacteriófago T7 a su receptor, lipopolisacárido (LPS), lo que reduce la infectividad.

En respuesta, los bacteriófagos pueden tener enzimas en sus colas que degradan varias cápsulas, dando lugar a una competencia evolutiva que resulta en la extrema diversificación de la síntesis de cápsulas e hidrolización de las mismas. Finalmente, las proteínas de superficie pueden también esconder los receptores de bacteriófagos, como en el caso del bacteriófago lítico de *E. coli* T5 que utiliza el exterior de la proteína de membrana FhuA, que es una proteína de captación de hierro, como su receptor y expresa la lipoproteína Llp para enmascararla. Esto evita que las partículas virales del bacteriófago T5, y posiblemente otros bacteriófagos que usan FhuA como receptor, como el T1 y phi80, ingresen a la bacteria.

Inhibir la inyección del DNA

El bloqueo de la entrada del DNA del bacteriófago en el citoplasma es otro mecanismo de prevención de las infecciones por bacteriófagos. El profago de *E. Coli* HK97 se adsorbe a la proteína gp15 que es transmembranal e interactúa con el transportador de glucosa del huésped ptsg y probablemente interrumpe su asociación con los componentes de bacteriófagos que son requeridos para trasladar el

genoma viral a través del interior de la membrana, evitando así la transferencia de DNA al citoplasma.

Silenciar mediante el represor lisogénico

Una vez que el genoma del bacteriófago se inyecta en la célula huésped, inicia el ciclo lítico. Los bacteriófagos temperados tienen la opción de entrar en el ciclo lisogénico, este requiere la represión de los genes líticos por un factor de transcripción. El mecanismo que se dirige al ácido nucleico del bacteriófago es el uso del represor, expresado por profagos para mantener la lisogenia. Sin embargo, el mecanismo más directo para marcar a los ácidos nucleicos virales es el empleo de nucleasas que degraden el genoma inyectado.

Escisión mediante sistema de restricción y modificación

Los sistemas de modificación de restricciones (RM) son un método de defensa de los bacteriófagos que está compuesto por dos actividades: una endonucleasa de restricción y una metiltransferasa (el componente de modificación).

La endonucleasa de restricción reconoce motivos de DNA cortos, generalmente de 4 a 8 pares de bases de largo, y corta el DNA del bacteriófago. Estos motivos de DNA existen tanto en el hospedador bacteriano como en el bacteriófago invasor, pero el hospedador protege su genoma utilizando la metiltransferasa para modificar su propio DNA para evitar el reconocimiento por la enzima de restricción.

Un bacteriófago invasor generalmente no tiene metilado su material genético y por lo tanto puede ser cortado tras la inyección. Los sistemas de RM se clasifican en cuatro principales tipos basados en su

mecanismo de acción y composición de subunidades. Los sistemas de tipo I y III se translocan a lo largo del DNA y cortan los sitios de reconocimiento. El tipo II, conocido por su uso en la clonación molecular, corta dentro de o cerca del sitio de reconocimiento. Los sistemas tipo IV carecen de metilasa y solo contienen una endonucleasa de restricción, que solo escinde DNA modificado.

Los sistemas RM y las modificaciones de DNA están presentes entre *E. coli* y el bacteriófago T4, donde el bacteriófago T4 contiene hidroximetilcitosina (HMC) en lugar de citosina en su DNA, inhibiendo todos los sistemas RM de tipo I – III que reconocen sitios que contienen citosina. Para contrarrestar esto, *E. coli* utiliza McrBC, un sistema de tipo IV específico para DNA que contiene HMC; en respuesta, el bacteriófago T4 puede glicosilar su DNA, lo que altera la actividad de McrBC. Contra esto, *E. coli* ha desarrollado un sistema adicional de tipo IV, El sistema GmrS-GmrD, que puede romper el DNA glicosilado.

Escisión mediante sistemas CRISPR-cas

Uno de los avances científicos más significativos de las últimas décadas fue el descubrimiento de los sistemas inmunitarios bacterianos CRISPR - Cas. Estos sistemas Están presentes en aproximadamente el 50% de las bacterias secuenciadas y 90% de las arqueas secuenciadas; su función principal es proporcionar resistencia contra los bacteriófagos invasores y también de los plásmidos. Los sistemas CRISPR son sistemas inmunológicos adaptativos y no innatos, donde la exposición a una infección previa por bacteriófagos queda en la memoria inmunológica en consecuencia se crean secuencias "espaciadoras" de 30 a 40 pares de bases, adquiridas de los genomas invasores, estas se encuentran en medio de repeticiones semi-palindrómicas del mismo tamaño. Los espaciadores se transcriben y procesan en pequeños

CRISPR (Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente interespaciadas), se codifican RNA Guías (RNArc) que son los precursores y posteriormente se fragmentan en RNArc maduros, a su vez se codifican la maquinaria de proteínas Cas y para la eliminación de la secuencia del invasor, uno de los fragmentos del RNArc interacciona con las proteínas Cas (nucleasas) y guiadas por el mismo reconocen y cortan los ácidos nucleicos del invasor a través de un par de bases complementarias.

Sistema toxina – antitoxina

Una característica fundamental de los sistemas de Antitoxina (AT) es la inestabilidad de la antitoxina: es lábil y debe expresarse continuamente para permanecer en proporciones estequiométricas apropiadas con las toxinas. Las toxinas pueden poseer diversas actividades catalíticas, incluyendo DNasa y RNasa, o pueden inhibir la replicación del DNA, síntesis de ATP o la maquinaria de división celular. Hay al menos seis tipos de AT, categorizados en base a la naturaleza de la toxina y la antitoxina (proteína o RNA). El sistema TA de *E. coli* MazF / MazE puede suprimir la infección del bacteriófago T4 mediante la activación de la actividad de la ribonucleasa de MazF. Para contrarrestar esto, el bacteriófago T4 transporta la ADP-ribosiltransferasa Alt que modifica e inhibe MazF.

Infección abortiva

La infección Abortiva (Abi) es un proceso por el cual las células impiden la liberación de bacteriófagos a expensas de la supervivencia de la célula hospedadora, ya que consiste en "muerte celular programada" que previene la diseminación e infección de los bacteriófagos a las bacterias adyacentes. Esto se logra a través de la perturbación de

Procesos celulares esenciales como la traducción, transcripción, y la replicación o induciendo la filtración de la membrana.

Los sistemas Lit y PrrC de *E. coli* son activados por el bacteriófago T4 y alteran la traducción. La proteasa encendida de *E. coli* K12 es activada por el péptido Gol de la proteína de la cápside mayor del bacteriófago T4, un gen de transcripción tardía y escinde el factor de alargamiento ribosomal EF-Tu, lo que detiene la traducción tanto para el bacteriófago como para su hospedador.

Interferencia en el ensamble de los bacteriófagos

Las islas cromosómicas inducibles por bacteriófagos (PICl) forman un grupo de elementos genéticos que parasitan los bacteriófagos para su replicación y diseminación. Los PICl se integran en el cromosoma bacteriano y se remueven en presencia de un "bacteriófago ayudante" específico (Rostøl, J., 2019).

5. Relación entre las bacterias y los bacteriófagos

Relación infectiva determinación de placas.

Cuando un virus infecta una bacteria libera una progenie que infecta a las bacterias vecinas lo que causa una lisis bacteriana que se ve reflejada en las placas de lisis, playas de lisis o calvas, que pueden ser de dos tipos turbias y claras (Ver figura 7), en las placas turbias los bacteriófagos no han causado la lisis completa de las bacterias infectadas; por otro lado, en las placas claras, los bacteriófagos lisan todas las bacterias infectadas. La lisis contundente se da cuando los bacteriófagos son capaces de infectar y lisar a todas las bacterias en el

medio de cultivo, razón por la cual no existe el crecimiento bacteriano (Davis, 1990).

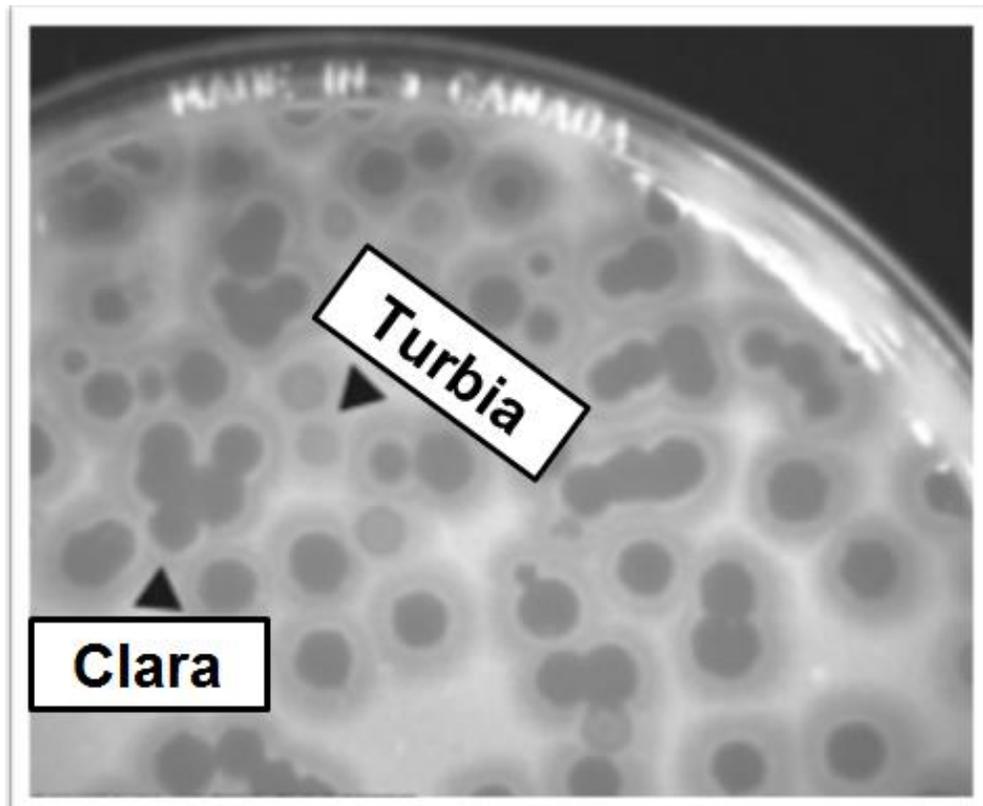


Figura 7. Tipos de placas de lisis causadas por los bacteriófagos.

El título del bacteriófago se calcula contando el número de placas de lisis que produce una determinada dilución de la muestra, la cual se denomina "Unidad Formadora de Placa" (UFP) y el título se expresa como "UFP/ml" (Davis, 1990).

Multiplicidad de infección

La multiplicidad de la infección (MDI) es la proporción entre el número de bacteriófagos y de bacterias hospedadoras en una infección. Tanto el bacteriófago como las bacterias se difunden al azar y van chocando y rebotando entre sí hasta que el bacteriófago encuentre e

interactúe con el receptor de membrana bacteriana apropiado (Abedon, S. & Bartom, E., 2013).

Existen dos maneras de calcular el MDI, la primera es una estimación útil pero limitada ($MDI_{ingreso}$) y la segunda es un mejor cálculo, pero más complicado (MDI_{actual}).

El $MDI_{ingreso}$ es la proporción de los bacteriófagos agregados a las bacterias blanco, esto se puede reflejar de la siguiente manera:

$$M.O.I.ingreso = \frac{[UFP/mL]}{[UFC/mL]}$$

Donde UFP/mL son la concentración del bacteriófago reflejada en las playas de lisis y las UFC/mL son la concentración bacteriana al momento de la infección.

Esta estimación de MDI es útil al momento de realizar experimentos, especialmente en circunstancias en las que se da la adhesión del 100% de los agentes (bacteriófagos) a los objetivos (bacterias).

El MDI_{actual} es una estimación de MDI que se basa en el tiempo necesario para obtener la mayor adsorción de los bacteriófagos en las membranas de las bacterias. Existen varios cálculos para el MDI_{actual} .

El primero no se toma en cuenta la concentración bacteriana ya que existe la suposición de que los agentes infecciosos no disminuyen en número o concentración con el tiempo, se aplica utilizando la siguiente fórmula:

$$M.O.I.actual = [UFP/mL] \times (k) \times (t)$$

Donde las UFP/mL son la concentración de los bacteriófagos reflejada en las playas de lisis, k es la constante de velocidad de adsorción que es igual a $2.5 \times 10^{-9} \text{ mL min}^{-1}$ y t es el tiempo (Clokier, M., 2018).

Probabilidad de infección bacteriofago:bacteria determinada a través de la distribución de Poisson

La distribución de Poisson es una función matemática que permite mostrar la infección de los bacteriófagos sobre las bacterias en cualquier MDI dada. Siendo así que en algunos casos, existirán bacterias que no serán infectadas por los bacteriófagos (inclusive a elevadas MDI) y otras serán infectadas por uno o más bacteriófagos. (Abedon, S. & Bartom, E., 2013). Es decir, el número promedio de bacteriófagos que se han adsorbido por bacteria. El valor equivalente para la generación de distribuciones de Poisson normalmente se abrevia como λ (Clokier, M., 2018).

La fórmula utilizada para la distribución de Poisson es la siguiente:

$$f(k, \lambda) = \frac{e^{-\lambda} \lambda^k}{k!}$$

Donde “ k ” es el número de sucesos del evento, “ λ ” es el parámetro positivo que representa el número de veces que se espera que ocurra el evento en un intervalo de tiempo y espacio determinados y “ e ” es la base de logaritmos naturales ($e = 2.71828\dots$). Sin embargo, para el análisis de la relación de las bacterias con bacteriófagos la fórmula es la siguiente:

$$f(n, m) = \frac{e^{-m} m^n}{n!}$$

Donde “ n ” reemplaza a “ k ” (para evitar la confusión con la constante de difusión de los bacteriófagos) y es el número de adsorciones que tuvieron las bacterias por uno o más bacteriófagos, “ m ” sustituye a “ λ ” (evitando la confusión con el bacteriófago λ) y es el valor de MDI que se obtuvo experimentalmente y e es la base de logaritmos naturales ($e = 2.71828\dots$) (Clokie, M., 2018).

6. Aplicación de los bacteriófagos

En la actualidad existe un gran interés en muchos campos de estudio, debido a su alta especificidad pueden ser utilizados en diferentes industrias.

Aplicaciones agrícolas de bacteriófagos

En 1926 se propuso por primera vez tratar enfermedades en la industria agrícola con bacteriófagos. Sin embargo, la mayor parte de los trabajos de investigación en este ámbito de estudio están orientados a la detección de bacterias patógenas con bacteriófagos.

Se han realizado algunos trabajos en los que se utiliza la terapia basada en bacteriófagos para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias como *E. herbicola* y *Pseudomonas syringae*.

Los resultados de estudios como estos son alentadores y sugieren que los bacteriófagos pueden ser herramientas valiosas para tratar diversas enfermedades de origen bacteriano en plantas (Haq U. et al., 2012; Kutter, E. & Sulakvelidze, A., 2005) .

Aplicación de los bacteriófagos en la acuicultura

La idea de utilizar bacteriófagos líticos como agentes terapéuticos en las enfermedades bacterianas constituye una alternativa prometedora tanto en el tratamiento, como en la prevención de enfermedades de la acuicultura.

Las primeras investigaciones en esta industria empezaron en Japón en 1999 con el uso de bacteriófagos específicos para *Lactococcus garvieae* y desde entonces ha sido un tema de gran interés para la comunidad científica; posteriormente, se realizaron estudios similares para el tratamiento de *Pseudomonas plecoglossicida*, y el tratamiento biológico de la vibriosis que ha sido bastante exitoso ya que se ha estudiado el efecto en nauplios, camarones y pepinos de mar sin reportes de respuesta inmune de los hospederos en estudio hacia los bacteriófagos.

Los métodos de administración de bacteriófagos son de vital importancia para una terapia exitosa. Por lo cual, se han revisado las rutas de administración de bacteriófagos y se concluyó que la inyección parenteral es la vía más exitosa, sin embargo, no es la más recomendable; en la mayoría de los ensayos *in vivo* se utilizan la adición de bacteriófagos en el agua circundante, sin embargo, este método no indica la cantidad de bacteriófagos ingeridos para el tratamiento, lo que sugiere que la mejor vía de administración es la vía oral, a través de alimentos recubiertos de bacteriófagos (Kalatzis, P. Castillo, D. Katharios, P. & Middelboe, M., 2018; Kutter, E. & Sulakvelidze, A., 2005).

Bacteriófagos como indicadores de contaminación fecal en agua.

La presencia de bacterias coliformes en el agua indica que se ha contaminado con heces humanas o de otros animales, y que existe un riesgo potencial para la salud de quienes usan el agua (Titer, P., 2016).

En el caso de los colifagos, se conocen los colifagos somáticos que son aquellos que se adsorben sobre los receptores situados en la pared bacteriana de cepas de *E. coli*. Por otro lado los colifagos F específicos se adsorben específicamente sobre los pelos sexuales codificados por plásmidos del grupo F de incompatibilidad de la cepa huésped (Espigares, M., 2006).

Bacteriófagos aprobados como agentes con actividad bactericida en la industria alimenticia.

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) de origen microbiano son problemas graves de seguridad alimentaria en todo el mundo. El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) estima que aproximadamente 76 millones de casos de ETAs ocurren cada año solo en los Estados Unidos.

Muchos patógenos bacterianos capaces de causar ETAs en humanos forman parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal de animales de granja (vacas, ovejas, aves de corral, etc.). Durante el sacrificio y el procesamiento de los animales, existen múltiples oportunidades para que las bacterias contaminen los productos crudos, lo que aumenta el riesgo de que los humanos los ingieran posteriormente y produzcan enfermedades. Los estudios realizados no se diseñaron con el fin de mejorar la seguridad alimentaria, sino el efecto profiláctico de la administración oral de bacteriófagos sobre enfermedades bacterianas en varias especies animales. Sin embargo, los resultados proporcionados

justifican la aplicación de los bacteriófagos en la inocuidad de los alimentos.

Otra forma de utilizar fagoterapia en la industria alimentaria es la aplicación directa sobre productos alimenticios crudos o sobre superficies ambientales en instalaciones de procesamiento de alimentos crudos (Kutter, E. & Sulakvelidze, A., 2005).

Las recientes investigaciones donde se han utilizado cocteles de bacteriófagos para reducir la incidencia de *Salmonella spp.* en productos a base de carne de pollos (canal y piel), en semillas germinadas, dulce de frutas cortadas y pavos procesados; esta terapia fágica también se ha utilizado para curar enfermedades infecciosas de aves infectadas evitando la colonización de *Salmonella spp.*, así como su utilización en el tratamiento de aguas residuales. También se han empleado para combatir otros microorganismos de importancia en alimentos como *Listeria monocytogenes* y *Enterobacter sakazakii*.

En los últimos años, las empresas dedicadas a la biotecnología comenzaron a desarrollar productos utilizando bacteriófagos específicos para eliminar las bacterias que causan ETAs; en septiembre de 2006, la Administración de drogas y alimentos de los Estados Unidos de Norteamérica (FDA), incluye a los bacteriófagos en la categoría de "aditivos alimentarios", para reducir la presencia de la bacteria *Listeria monocytogenes*; y el Departamento de Agricultura (USDA) aprobó posteriormente un producto a base de bacteriófagos diseñado para ser rociado con la finalidad de reducir la presencia de *E. coli* (Hernández, R. Jiménez, Z. & Pla, R. 2004).

Aplicación de los bacteriófagos en biosensores

La creciente demanda de una identificación temprana, rápida, sensible y específica de los microorganismos patógenos presentes en muestras clínicas, ambientales y de alimentos ha atraído un interés considerable en la investigación y desarrollo de nuevas metodologías de diagnóstico. Siendo el objetivo principal en el campo de los biosensores permitir la detección rápida e *In situ* de patógenos diana (Petrenko, V. & Smith, G., 2011).

Los biosensores basados en bacteriófagos se han utilizado con éxito para detectar bacterias directamente en productos frescos como la leche, el caldo, el tomate fresco y el agua. Hasta el momento se ha reportado que la aplicación de bacteriófagos en biosensores han permitido la detección de distintas bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella newport*, *E. Coli*, *Mycobacterium smegmatis*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus anthracis*, y *Bacillus cereus*, entre otros (Singh, A. Poshtiban, S. & Evoy, S., 2013).

Utilización de proteínas derivadas de bacteriófagos

El descubrimiento y análisis de las proteínas derivadas de bacteriófagos abre la posibilidad para el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos. Estas enzimas tienen una función similar a la enzima lisozima eucariótica, los genes que codifican estas enzimas se expresan por el huésped bacteriano durante el ciclo lítico y ayudan al bacteriófago a hidrolizar la pared celular para liberar la progenie viral.

Los bacteriófagos producen dos tipos de enzimas del tipo lisinas, holina y endolisina. Ambas se producen en la última etapa del ciclo lítico, y se acumulan en el citosol de la célula huésped. Las endolisinas

independientemente de la holina son capaces de producir lisis de células bacterianas, por lo cual se consideran a las lisinas como potenciales agentes antimicrobianos (Lin, D. et al., 2017).

Si se purifican y se aplican de forma exógena, las endolisinas solo son eficaces contra las bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium difficile*, *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*, ya que, la membrana externa de las bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, impide el acceso de estas enzimas exógenas (Elbreki, M. et al., 2014; Lin, D. et al., 2017; Uchiyama J. et al., 2011).

Bacteriófagos como vectores de clonación

Bacteriófago lambda ha desempeñado un papel crucial en la clonación y manipulación del DNA desde su introducción a principios de la década de 1970 como un vector de clonación. La capacidad de clonación relativamente grande de los vectores derivados de lambda y el proceso de empaquetamiento e infección del DNA altamente eficiente hacen que estos vectores sean vehículos atractivos para la construcción de bibliotecas de expresión de DNA tanto genómico como complementario.

Se ha dirigido una amplia investigación hacia el desarrollo de la clonación lambda (Haq, U. et al., 2012; Kutter, E. & Sulakvelidze, A., 2005).

Actividad bactericida de los bacteriófagos en la eliminación de biofilms

La formación de biopelículas o biofilms es una estrategia de supervivencia bacteriana muy importante, que es responsable de muchas patologías en los seres humanos. Los bacteriófagos son capaces de degradar el biofilm bacteriano a través de las proteínas estructurales que posee y de replicarse en el sitio de la infección. Esta terapia fue efectiva en los biofilms creados por *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, entre otros (Elbreki, M. et al., 2014; Kiros, A. et al., 2016; Lin, D. et al., 2017; Nanda, A. Thormann, K. & Frunzke, J., 2015; Reina, J., 2018).

Comercialización de los bacteriófagos

Existen diversas compañías que se encargan de hacer estudios, producir y comercializar los bacteriófagos para la erradicación de patógenos bacterianos mediante la utilización de bacteriófagos. El uso comercial de los bacteriófagos se puede diferenciar de acuerdo a la aplicación de las compañías aquellas que:

➤ *Investigan y desarrollan a los bacteriófagos como terapia pre-clínica*

Adaptive Phage Therapeutics, AmpliPhi Biosciences, C3J Therapeutics, Enbiotix, Intralytix, y Locus Biosciences en Estados Unidos, Evolution Biotechnologies en el Reino Unido, InnoPhage en Portugal, Phagelux en China, Pherecydes Pharma en Francia, Technophage,

- *Se interesan en el desarrollo y distribución de productos fágicos*

Biochimpharm en Alemania, Imbio y Microgen en Rusia

- *Facilitan el tratamiento con bacteriófagos en pacientes*

Center for Innovative Phage-Applications and Therapeutics y Phage International en Estados Unidos, Eliava Phage Therapy Center y Phage Therapy Center en Alemania y Phage Therapy Unit en Polonia.

- *Utilizan a los bacteriófagos como estrategia de biocontrol (no estrictamente como terapia)*

APS Biocontrol y Fixed Phage en el Reino Unido, Ecolyse, Epibiome, Intralyx y Omnilytics en Estados Unidos, InnoPhage y Technophage en Portugal, Microcos Food Safety en Holanda, Phage Biotech en Israel, Phagelux en China y Proteon Pharmaceuticals en Polonia.

- *Desarrollan de enzimas derivadas de bacteriófagos*

Contrafect, GangaGen y New Horizons Diagnostics en Estados Unidos, Lysando GmbH en Thailandia y Microcos Food Safety en Holanda.

- *Desarrollan tecnologías de detección de bacterias basadas en bacteriófagos*

GeneWeave y Sample6 en Estados Unidos y Micromensio en Canadá

- *Detectan la contaminación industrial asociada a bacteriófagos*

Phage Consultants en Polonia

- *Fabrican y producen bacteriófagos para otros fines*

JAFRAL en Eslovenia, Clean Cells en Francia y Paragon Bioservices en Estados Unidos

Estas compañías se han extendido a muchas áreas importantes tales como:

- Industria Alimenticia: Intralytix, EBI Food Safety, New Horizons.
- Sanitización ambiental: Intralytix, Novolytics.
- Aplicaciones veterinarias: Intralytix, EBI Food Safety, Novolytics.
- Aplicaciones en humanos: Intralytix, New Horizons.
- Bioterapias exponenciales: Novolytics, Phage-biotech.

En el caso de la compañía Intralytix en Maryland Estados Unidos, cuenta con patentes de preparaciones veterinarias para *Salmonella* y *Clostridium perfringens*. Así mismo, se cuenta con una preparación para el usuario "Listshield" ha sido aceptado por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) y por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) que puede ser empleado para la descontaminación ambiental en plantas productoras de alimentos contra bacterias de los géneros, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*. Además cuenta con las siguientes funciones productos: "Ecoshield" contra *Escherichia coli* O157: H7 "Salmshield" contra *Salmonella spp.* "ShigActive" contra *Shigella spp.* "SAP 100" contra *Staphylococcus aureus*, incluyendo a las cepas meticilino resistentes, y

vancomicina resistentes. "ABPP-100" contra *Acinetobacter baumannii*. Además estudia el desarrollo de nuevos productos como el resultado del "PhagoBioDerm™" como tratamiento frente a *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp.*, *Proteus spp*. (Segundo, N. et al., 2010).

La frecuencia de algunas mutaciones en el material genético bacteriano de manera espontánea pueden conferirles resistencia a la infección por bacteriófagos, por ejemplo, cambiar la configuración del receptor, esto impediría la unión de las fibras de la cola del bacteriófago con la membrana celular bacteriana, que disminuye la efectividad en la actividad del bacteriófago, aunque su frecuencia de mutación es mayor a la de las bacterias y de igual manera son capaces de infectarlas, las tasas de resistencia a los bacteriófagos podrían reducirse aún más utilizando una mezcla de bacteriófagos. En este contexto, se pueden utilizar mezclas de dos o más bacteriófagos, es decir, "cócteles de bacteriófagos" para aumentar el rango de infección (Kutter, E. & Sulakvelidze, A., 2005).

Las técnicas modernas de biotecnología y automatización, nos pueden permitir ampliar el rango de bacterias diana y reducir potencialmente el número de bacteriófagos necesarios en un coctel (Lu, T. & Koeris, M., 2011).

En general, los cócteles pueden aumentar la eficacia de los tratamientos con bacteriófagos porque son capaces de atacar a las bacterias con más de un tipo de bacteriófago.

Los bacteriófagos como agentes de control biológico de cepas bacterianas multirresistentes

Los bacteriófagos tienen muchas ventajas sobre los antibióticos principalmente su especificidad hacia la bacteria hospedadora, lo cual reduce el daño en la microbiota (Haq, I. Chaudhry, W. Akhtar, M. Andleeb, S. & Qadri, I., 2012). Además de no presentar la toxicidad de los antibióticos comúnmente utilizados.

El incremento actual a nivel mundial en la incidencia de resistencia antibiótica en las bacterias humanas y animales, ha generado el interés y la necesidad de aplicar el papel de los bacteriófagos como alternativa terapéutica frente a microorganismos multirresistentes. En el año 2015 se celebró una reunión organizada por la Agencia Europea del Medicamentos (EMA) para tratar el posible papel de la terapia con bacteriófagos en el tratamiento de las bacterias multirresistentes (Reina, J., 2018). Por lo cual hoy en día, varias empresas trabajan con bacteriófagos modificados genéticamente para combatir bacterias resistentes a los medicamentos. Se han trabajado con bacteriófagos capaces de infectar y lisar muchas especies y cepas bacterianas, incluidas *Brucellae*, *Enterococci*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Klebsiellae*, *Salmonellae*, *Staphylococci*, *Streptococci*, *Shigella spp.*, *Vibrio cholerae* y *Yersinia spp.* (Petrenko, V. & Smith, G., 2011).

La tecnología biomédica actual es muy diferente de lo que era en los primeros días de la investigación de la terapia con bacteriófagos, la comprensión de las propiedades biológicas de los bacteriófagos y los mecanismos básicos de la interacción del bacteriófago con la bacteria hospedadora ha mejorado dramáticamente (Golkar, Z. et al., 2014; Kutter, E. & Sulakvelidze, A., 2005).

Además de la creciente resistencia bacteriana a los antibióticos las reacciones adversas de los mismos están bien documentadas e incluyen casos de anafilaxis, nefrotoxicidad, cardiotoxicidad, neurotoxicidad hematológicas y principalmente de hepatotoxicidad, así como varias complicaciones gastrointestinales, reacciones adversas como efectos secundarios y alergias. Por otro lado, no se han reportado efectos colaterales en la administración de bacteriófagos en la aplicación terapéutica (Lin, D. Koskella, B. & Lin, H., 2017).

Por lo mencionado anteriormente no cabe duda de que los bacteriófagos son mucho más específicos que los antibióticos; y si bien esta alta especificidad de los bacteriófagos los hizo menos atractivos en comparación con los antibióticos de amplio espectro en las primeras investigaciones, hoy en día es muy importante para no afectar la microbiota del paciente o ecosistema a donde sea dirigida la terapia (Parisien, A. Allain, B. Zhang, J. Mandeville, R. & Lan, C., 2008).

Profagos como herramienta para biocontrol

En esta actividad se emplean profagos para la transferencia horizontal de genes para introducir la sensibilidad a los antibióticos en el genoma de la bacteria a través del genoma del bacteriófago, para que posteriormente se manifieste (Nanda, A. Et al., 2015).

En la actualidad, la fagoterapia está dirigida a reemplazar los antibióticos, pero existe la esperanza de que se utilicen de forma complementaria a los antibióticos, especialmente para cepas resistentes a los antibióticos, y así potenciar la actividad bactericida de ambos de manera conjunta (Haq,I. Et al., 2012; Parisien, A. Et al., 2008).

7. Resistencia antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria gram negativa de forma bacilar, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae. Se encuentra ampliamente distribuida en diferentes ecosistemas, habitante natural del tracto gastrointestinal de los mamíferos formando parte de su microbiota. (Rodríguez, G., 2002). Sin embargo, a consecuencia de la contaminación fecal humana y del resto de los animales el hábitat de estas bacterias ha cambiado considerablemente, también por efecto del cambio climático predisponiendo a las mismas a adaptarse a distintas condiciones. Esta adaptación conlleva la adquisición de mecanismos de resistencia (genes, bombas de flujo) a los agentes antimicrobianos. (Bolocan, A. Callanan, J. Forde, A. Ross, P. & Hill, C., 2016).

- ***Mecanismos de resistencia antibiótica de E. coli***

El fenotipo de resistencia antibiótica es evidente gracias a la presencia de uno o más mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en la cepa bacteriana. Destacan por su relevancia: inactivación enzimática, alteraciones en el sitio blanco y alteraciones de la permeabilidad. Las enterobacterias a nivel mundial presentan alta resistencia hacia ampicilina (betalactámico), trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, clorafenicol y ácido nalidíxico. Las cepas de *E. coli* poseen genes de resistencia antibiótica cuyas proteínas codificadas facilitan la resistencia hacia los antibióticos de distintas familias. (Ver tabla 3).

Tabla 3. Principales mecanismos de resistencia antibiótica estudiados en *E. coli* (Mosquito, S. Ruiz, J. & Ochoa, T., 2011).

<i>Familia de antibióticos</i>	<i>Mecanismo de acción del antibiótico</i>	<i>Mecanismos de resistencia bacteriana</i>	<i>Genes implicados</i>
<i>Betalactámicos</i>	Interfiere en las últimas fases de la síntesis del peptidoglicano, componente necesario en la formación de la pared bacteriana	Betalactamasas: enzimas que se caracterizan por hidrolizar el enlace amida del núcleo betalactámico, inactivando de esta manera el antibiótico	Genes que codifican betalactamasas: blaTEM, blaSHV, blaCARB, blaOXA, blaCTX-M y blaGES.
<i>Quinolonas</i>	Inhibe la acción de las topoisomerasas y de la DNA girasa bacterianas	Mutaciones puntuales que generan el cambio de aminoácidos en la enzima blanco del antibiótico Sistemas de expulsión Presencia de genes plasmídicos de resistencia antibiótica	Mutaciones a nivel de gyrA (gen que codifica una subunidad de la DNA girasa) y parC (gen que codifica una subunidad de la topoisomerasa IV). AcrAB-like (sistemas presente en diferentes enterobacterias) Familia de genes qnr (A, B, C, D S) que codifican proteínas Qnr que impiden estéricamente la unión del antibiótico al blanco. Gen que codifica la variante cr de la acetiltransferasa 6' (AAC (6')-Ib-cr), capaz de acetilar fluoroquinolonas
<i>Tetraciclinas</i>	Se unen al ribosoma bacteriano, inhibiendo la síntesis de proteínas	Presencia de bombas de eflujo específicas para tetraciclinas	Genes tetA y tetB que codifican sistemas de eflujo
<i>Cloranfenicol</i>	Inhibidor de la biosíntesis de las proteínas, previene la elongación de la cadena de péptidos al unirse al centro de la peptidiltransferasa del ribosoma 70S	Inactivación enzimática por acetilación Exportadores específicos de cloranfenicol	Gen cat que codifica a la enzima cloranfenicol acetiltransferasa Genes floR y cmlA
<i>Trimetoprim - Sulfametoxazol</i>	Inhibe la síntesis de la enzima dihidropteroato sintasa (Sulfametoxazol) y de la enzima dihidrofolato reductasa (Trimetoprim), las cuales son enzimas necesarias en la ruta del ácido fólico	Presencia de genes que codifican formas mutantes de la enzima blanco	Genes sul1 y sul2 (Sulfametoxazol) y genes dfr (Trimetoprim)

- ***Antibiotipo como herramienta de en determinación del origen de cepas.***

El antibiotipo es una técnica de tipificación bacteriana basada en la sensibilidad a los antimicrobianos. Se la utiliza como una herramienta en la determinación del origen clonal común entre dos o más bacterias. Existen situaciones en las cuales es necesario el empleo de este método fenotípico de tipificación como en el caso de infecciones causadas por múltiples cepas del mismo microorganismo, o infecciones recurrentes para discriminar entre la re-infección por una misma cepa bacteriana o una nueva. También es útil en la aparición de cepas de una especie con diferentes características fenotípicas (morfológicas o de sensibilidad), o cuando aparecen cepas con características fenotípicas similares en distintas muestras o provenientes de distintos pacientes. La información del origen clonal, es vital para que el médico, microbiólogo o epidemiólogo pueda tomar conductas terapéuticas, de laboratorio, o de intervención, sólidamente fundamentadas en el resultado de estos estudios (Labarca, J., 2002).

III. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

Presencia de bacteriófagos con actividad bactericida procedentes de muestras ambientales (agua de lagunas y/o de ríos y de suelo) capaces de infectar a cepas multirresistentes de *E. coli* de importancia clínica.

HIPOTESIS NULA: Los bacteriófagos aislados de muestras ambientales, no presentan una capacidad infectiva y lítica sobre cepas de *E. coli*.

HIPOTESIS ALTERNATIVA: La capacidad infectiva de los bacteriófagos aislados es dependiente del tipo de cepa (variedad) de *E. coli*.

IV. OPERACIONALIZACION DE LAS VARIABLES EN ESTUDIO

<i>Variable</i>	<i>Definición conceptual</i>	<i>Dimensiones</i>	<i>Indicadores</i>
<i>Independiente: Presencia de bacteriófagos</i>	Presencia de virus capaces de infectar y lisar bacterias de manera específica y replicarse dentro de ellas.	Presencia o ausencia	Recuento de placas de lisis (UFP/mL)
<i>Dependiente: Capacidad infectiva de bacteriófagos aislados</i>	Capacidad del bacteriófago de insertar su material genético dentro de cepas de <i>E. coli</i> y establecer la lisis celular a través de la replicación del mismo.	Relación de bacteriófago y bacteria	Índice de Multiplicidad de Infección (MDI) Distribución de Poisson

V. DISEÑO METODOLÓGICO

A. Población en estudio, ámbito y periodo de investigación

Para el aislamiento de los bacteriófagos se realizó la colecta de muestras ambientales de agua de la laguna Janko Khota de Milluni y agua del Río Choqueyapu, suelo de jardín particular y también del jardín del Hospital de Clínicas. Este estudio se realizó en la Ciudad de La Paz – Bolivia en el periodo del 2017-2018.

B. Tipo de investigación

El presente trabajo es investigación de tipo experimental.

C. MATERIALES, MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS

1. Materiales

1.1. Agentes biológicos

- **Aislamiento de bacteriófagos de muestras ambientales**

Se colectaron muestras ambientales, que potencialmente alberguen una diversidad microbiana rica en coliformes totales, a decir: 1) muestra de agua de la laguna Janko Khota de la zona de Milluni, La Paz obtenidas del laboratorio de Biotecnología Ambiental que se utilizan para verificar metales pesados en aguas, 2) muestra de agua del Río Choqueyapu en la zona Sur del Municipio Nuestra Señora de La Paz, Bolivia (Latitud: 16°32'40.115"S, Longitud: 68°5'38.365"), 3) muestra de suelo colectada de jardín particular y 4) muestra de suelo del jardín del Hospital de Clínicas.

El método para el aislamiento de bacteriófagos a partir de aguas se realizó de acuerdo a lo descrito por Ghugare et al., (2017) utilizando la técnica de filtración por membranas. Y en el caso de suelos se utilizó los métodos descritos en la página "*The Actinobacteriophage Database*" en "PhagesDB.org", que es análogo al procedimiento utilizado en el curso "*Bacteriófagos como el modelo para el análisis de datos biológicos a gran escala*" dictado por CELFI. Los dos métodos se describen a continuación.

En el caso de las muestras de agua, se filtraron 500 mL de cada muestra en papel filtro para análisis cuantitativo Whatman de grado 41. El filtrado obtenido fue centrifugado a 4.000 *g* por 15 min. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de membrana nitroceluosa de

0.45 μm , posteriormente se realizó una última filtración a través de un filtro de membrana de nitrocelulosa de 0.22 μm .

Para las muestras de suelos, se utilizó 1 gramo de suelo al que se agregó 5 – 10 mL de Buffer fago, con 2 mM de cloruro de calcio. Se procedió a mezclar por agitación por inversión y posteriormente las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos, permitiendo de esta manera que las partículas fágicas queden en suspensión en el buffer. Los tubos fueron centrifugados a 3500 rpm por 5 minutos, se tomaron 2 mL del sobrenadante y se filtraron a través de un filtro de membrana nitrocelulosa de 0.22 μm . Posteriormente a cada sobrenadante filtrado se añadió 2.5 mL de caldo BHI y 200 μL de cultivo bacteriano saturado (en fase exponencial) y se incubó a 37 °C durante 24 horas. Finalmente al día siguiente, los tubos fueron centrifugados a 3500 rpm durante 10 minutos y se filtró el sobrenadante nuevamente a través de un filtro de membrana nitrocelulosa de 0.22 μm .

Paralelamente, se procedió a la inoculación de la cepa bacteriana en un tubo de cultivo conteniendo 5 mL de caldo BHI e incubado a 37 °C por 18 - 24 horas.

Para el aislamiento de los bacteriófagos se realizó a través del empleo de la técnica de doble capa agarizada (Ver Método, sección 3.3.)

- **Cepas de *Escherichia coli***

Se utilizaron tres variedades de cepas de *Escherichia coli*: *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ambiental cepa P008, otorgadas por el Área de Bioquímica Molecular del Instituto de Investigaciones Fármaco - Bioquímicas y 11 cepas de *E. coli* multirresistentes (Denominadas S.S.U.

1 – 11), otorgadas por la Doctora Nilze Solís, encargada del laboratorio de Bacteriología del Seguro Social Universitario.

Para la confirmación de la especie de las cepas se sembraron en Agar MacConkey para observar el desarrollo característico de las colonias.

1.2. Medios de cultivo

Se utilizó caldo BHI (caldo infusión cerebro corazón – Brain heart infusion) para la activación de las cepas y enriquecimiento tanto de la cepa ATCC 25922 como de la P008 (nativa ambiental).

En el recuento en placa se utilizó el Agar BHI al 1.5 % (caldo BHI con Agar Bacteriológico al 1.5 %).

Para el ensayo en doble capa agarizada y Spot Test o Titulación se utilizó Agar BHI al 1.5 % para el agar base y Agar BHI al 0.75 % (caldo BHI junto a Agar Bacteriológico al 0.75 %) para el agar soft o agar top.

1.3. Soluciones buffer

Se prepararon dos soluciones Buffer, el Buffer Fago que contiene Tris-HCl (pH 7.5) 10 mM, NaCl 68.5 mM, MgSO₄ 10 mM y CaCl₂ 1 – 10 mM, este buffer permitió hacer las diluciones de los bacteriófagos, resuspender los bacteriófagos que formaron las placas de lisis, y amplificar la cantidad de bacteriófagos; el Buffer SM permitió almacenar los bacteriófagos a -80 °C por un tiempo prolongado sin que disminuya la población de los mismos, este buffer contiene NaCl 0.1 M, MgSO₄ 0.01 M, Tris-HCl 0.05 M y gelatina al 0.01 %.

2. Procedimientos

2.1. Caracterización de los bacteriófagos aislados

La caracterización de los bacteriófagos se realizó por microscopía de epifluorescencia y microscopía electrónica de transmisión que se encuentran descritos en MÉTODOS.

2.2. Determinación de la capacidad infectiva de bacteriófagos sobre cepas de *E. coli* ATCC 25922, P008 y multirresistentes

Para determinar la capacidad infectiva de los bacteriófagos se realizó el conteo de las playas de lisis descrita en el establecimiento de la relación bacteriófago:bacteria a partir de estos resultados se realizó el cálculo de MDI y la distribución de Poisson sección 3.4. de Métodos. Para el análisis multivariante se utilizó el Análisis de Correspondencia (CA) y el escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS).

3. Métodos

3.1. Determinación de la cinética de crecimiento y cuantificación de la población bacteriana.

Las cepas de *E. coli* criopreservadas (ATCC 25922 y P008) fueron activadas mediante la siembra en caldo BHI por tres veces consecutivas. Posteriormente, se estableció la cinética de crecimiento y la cuantificación de población bacteriana en caldo y Agar BHI (concentraciones descritas en la sección 1.1. de Materiales).

En un volumen de 5 mL de solución fisiológica estéril se inoculó 100 μ L de la última suspensión bacteriana proveniente del cultivo criopreservado ajustando al número 0.5 de la escala de McFarland (1.5 x

10^8 UFC/mL). Un Matraz Erlenmeyer de 500 mL de capacidad conteniendo 250 mL de caldo BHI fue inoculado con 250 μ L de la suspensión bacteriana ajustada al 0.5 de la escala de McFarland. Los cultivos así inoculados fueron incubados a 37 °C con agitación constante a 100 rpm en un shaker orbital por 18 horas. Con la finalidad de determinar la cinética de crecimiento, se colectaron muestras de 1.5 mL cada 40 minutos y se determinó la absorbancia de las mismas a una longitud de onda de 540 nm. 500 μ L de cada muestra fueron utilizados para realizar diluciones seriadas desde 10^{-2} – 10^{-7} . 100 μ L de las diluciones 10^{-5} – 10^{-7} fueron inoculados en Agar BHI mediante la técnica de extendido con asa de Drigalsky, la placas así inoculadas fueron incubadas a 37 °C por 24 horas, al cabo de las cuales se estableció el recuento de UFC/mL.

Con los datos obtenidos de absorbancia se estableció la gráfica de la cinética de crecimiento microbiano para cada cepa, y empleando los datos obtenidos a partir del recuento en placa (UFC/mL) se estableció la linearización de la fase exponencial de crecimiento en la curva obtenida de biomasa Ln (UFC/mL) vs. tiempo.

3.2. Determinación de la sensibilidad antimicrobiana por el método de Kirby – Bauer (Antibiograma)

Primero se realizó un cultivo en placa de agar no selectivo a 37 °C por 18 a 24 horas. Se seleccionó las colonias aisladas e inoculó en caldo o solución salina ajustando la turbidez a 0.5 de la escala de McFarland. Después de 15 minutos del ajuste de la turbidez, se sumergió un hisopo de algodón estéril en la suspensión, se giró el hisopo varias veces y se presionó firmemente contra la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para eliminar el exceso de líquido del hisopo, se realizó la siembra por inundación en la superficie de una placa de Agar Muller

Hinton, se repitió este procedimiento en dos direcciones distintas asegurando la distribución uniforme del inóculo. Se distribuyó la batería predeterminada de discos antimicrobianos uniformemente para que no estén a menos de 24 mm de centro a centro en la superficie de la placa de agar inoculada y se presionó ligeramente cada disco hacia abajo para asegurar un contacto completo con la superficie de agar y no perforarlo. Por último, se invirtieron las placas y se las incubó a 37 °C por 18 – 24 horas.

3.3. Determinación de la actividad bactericida de los bacteriófagos líticos mediante placas de lisis

Uno de los métodos de caracterización de los bacteriófagos es la determinación de la concentración de partículas infecciosas del bacteriófago en los ensayos de placa, Durante la incubación, la bacteria hospedadora forma un césped en el medio sólido, excepto en las zonas en las que las partículas de bacteriófagos infectan y lisan o inhiben el crecimiento de las células bacterianas, lo que da como resultado una zona transparente o translúcida localizada, denominada placa de lisis o calva. La unidad de bacteriófago infeccioso se denomina así una unidad formadora de placa por mililitro (UFP/mL). La visualización de placas individuales es la base para el aislamiento de bacteriófagos y ayudan en su caracterización por la morfología de la placa (lisis clara versus turbia, tamaño de la placa, presencia o ausencia de un halo) (Walker, J., 2009)

Se usaron las técnicas del ensayo en doble capa agarizada para evidenciar las placas de lisis causadas por los bacteriófagos, Spot Test o Titulación para calcular el título de infección de los bacteriófagos y múltiples ensayos en doble capa agarizada resuspendiendo con Buffer fago y filtrando posteriormente para la purificación y amplificación de los bacteriófagos.

Se realizó el recuento de bacteriófagos por el método de doble capa agarizada, mediante la técnica de siembra por placa vertida. Se mezcló 100 μ L del sobrenadante de las muestras preparadas, en presencia de cloruro de calcio 10 mM con 100 μ L de cultivo bacteriano en fase exponencial, e incubó a temperatura ambiente por 30 minutos para favorecer la adsorción de bacteriófago - bacteria. Una vez transcurrido el tiempo se mezcló 4 mL de Agar Top (Ver MATERIALES en la sección 1.2.), y se mezcló por inversión (evitando la formación de burbujas), esta solución fue vertida sobre el agar base e incubó a 37 °C por 24 horas hasta que se visualizaron las placas de lisis.

La purificación de los bacteriófagos se realizó recogiendo la placa de lisis con ayuda de un tip estéril y se resuspendió en 150 μ L de Buffer Fago (Ver MATERIALES en la sección 1.3.), se mezcló con la micropipeta e incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, se repitió el ensayo de doble capa agarizada (anteriormente mencionado) con los bacteriófagos resuspendidos y *E. coli*. Se repitió este procedimiento cinco veces.

Después de la purificación, se realizó el Spot Test para determinar el título de una suspensión de bacteriófagos. Se realizaron diluciones seriadas de un décimo de la suspensión de bacteriófagos a testear. Se mezcló 100 μ L de cultivo bacteriano en fase exponencial con 4 mL de top agar, se mezcló por inversión y se vertió sobre el agar base dentro de una caja petri y se dejó solidificar. 10 μ L de cada dilución fueron dispensadas sobre el agar anteriormente preparado y se dejó secar con la tapa abierta. Por último se llevó a la incubadora a 37 °C por 24 horas. Al día siguiente se observó la formación de las placas de lisis de acuerdo a cada dilución empleada. El título del bacteriófago se determinó por la

formación de placas de lisis aisladas en la mayor dilución y utilizando la siguiente fórmula:

$$UFP/mL = \frac{\text{número de placas de lisis} \times \text{dilución}}{\text{volúmen del inóculo}}$$

Para la amplificación de los bacteriófagos se realizó el ensayo de doble capa agarizada en 30 cajas Petri con el bacteriófago y la misma cepa de *E. coli*, después de que se observaron las placas de lisis se inundan las cajas con 5 mL de Buffer Fago (Ver MATERIALES en la sección 1.3.), se dejó a temperatura ambiente por 4 horas en agitación constante. Posteriormente se extrajo la solución formada (Buffer con los bacteriófagos) y se filtró a través de papel filtro para análisis cuantitativo Whatman de grado 41 para remover el agar soft. El filtrado obtenido se filtró a través de un filtro de membrana nitrocelulosa de 0.45 μm , posteriormente se realizó una última filtración a través de un filtro de membrana de nitrocelulosa de 0.22 μm .

Se comprobó la amplificación de los bacteriófagos realizando el procedimiento del Spot Test descrito anteriormente y se verificó que el título del bacteriófago había incrementado.

3.4. Determinación de la multiplicidad de infección (MDI) y distribución de Poisson

El cálculo del MDI se realizó de acuerdo a la fórmula anteriormente mencionada en el Marco Teórico 5. Correlación entre bacterias y bacteriófagos, gracias a los cálculos de MDI se puede obtener la distribución de Poisson que se utiliza para predecir a qué fracción de objetivos se ha unido un número dado de agentes individuales.

El cálculo de la Distribución de Poisson se obtiene utilizando Microsoft Excel en el cual se utiliza la función "POISSON.DIST". Los argumentos son X (número de bacteriófagos adsorbidos), media (valor del MDI obtenido experimentalmente) y Acumulado (Se utiliza VERDADERO para la probabilidad acumulativa y FALSO para la probabilidad bruta).

Los resultados de este análisis permiten calcular la probabilidad de que las bacterias no adsorbieran ningún bacteriófago, la probabilidad de que alguna bacteria adsorbiera a un bacteriófago respecto al total de las bacterias ensayadas y la probabilidad de que algunas bacterias ensayadas hayan adsorbido a más de un bacteriófago respecto al total de bacterias ensayadas. El valor numérico de las probabilidades se puede representar en porcentajes (Clokic, M., 2018).

3.5. Microscopía de epifluorescencia

Para observar los bacteriófagos mediante Microscopía de Epifluorescencia, se empleó el método descrito por Naicker K. y Durbach J. (2007), Ortmann A. y Suttle C. (2009).

Se preparó el colorante realizando una dilución 1:10 de SYBR Green (10.000 x) en agua desionizada y filtrada. Esta solución fue alicuotada en pequeños volúmenes. Luego se preparó la solución antifade con 50% de Glicerol y 50% de PBS y 50 μ L de esta solución fueron dispensados en cada portaobjetos. Para la tinción se utilizó una fuente al vacío con un filtro de membrana nitrocelulosa de 0.45 μ m, posteriormente se realizó la filtración a través de un filtro de membrana de nitrocelulosa de 0.22 μ m. Se retiró la membrana de nitrocelulosa de 0.22 μ m y se dispensó 10 μ L de la tinción de SYBR Green en una porción de la membrana sobre un portaobjetos con 15 μ L solución antifade, posteriormente fue incubada a

temperatura ambiente en oscuridad por 15 minutos. Por último, 20 μ L de solución antifade se agregaron por encima de la membrana de nitrocelulosa e inmediatamente se cubrió con el cubreobjetos para observar al microscopio de epifluorescencia con el aumento de 100x y con filtro de luz azul.

3.6. Microscopía electrónica de transmisión

Se analizaron las muestras de bacteriófagos por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) por medio de prestación de servicios del “Microscopy Facility, Department of Biology, Lund University” y la preparación y fotografías a cargo del Dr. Ola Gustafsson en Suecia. Se siguieron los métodos descritos por Hanssen, H. Uribe, G. & Escovar, G., (1982) que también se encuentra descrito por Ackermann, H., (2009).

Según la información del Dr. Ola Gustafsson las muestras se prepararon usando un procedimiento de tinción en negativo en la que 2,5 μ L de la solución de muestra se adsorbieron en una red de cobre revestida con pioliform, se lavaron con dos gotas de agua desionizada y se tiñeron con una gota de acetato de uranilo al 2%.

3.7. Medidas de bioseguridad

Para la manipulación de las muestras con los agentes biológicos se cumplieron las normas de bioseguridad de nivel 2.

Se aplicaron las medidas higiénicas como lavarse las manos con jabón líquido y agua, antes y después de manipular el material potencialmente contaminado al igual que se aplicó alcohol en gel continuamente. Así mismo, se mantuvo limpia y ordenada el área de trabajo en todo momento.

En cuanto a los equipos de protección individual durante todos los experimentos se utilizó calzado cerrado con suela antideslizante y bata de laboratorio con manga larga, sobremangas de vinil, guantes de látex, barbijo y cofia desechable.

Para la manipulación de los agentes biológicos y las muestras potencialmente infectadas se trabajó dentro de una cabina de seguridad biológica de tipo II, precautelando la seguridad del personal y al mismo tiempo protegiendo la muestra. Se siguió un protocolo para el trabajo dentro de la cabina en el cual primero se introdujeron los materiales necesarios para realizar el experimento que fueron esterilizados anteriormente en autoclave a 1.5 atmósferas por 15 minutos, luego se irradió la cabina con luz ultravioleta por 15 minutos. Seguidamente se cerró la puerta para evitar el flujo externo de aire. Posteriormente, se introdujeron las muestras con los agentes biológicos para la realización de los experimentos. Una vez terminados los experimentos, se limpió la superficie con agua y jabón, luego se desinfectó la cabina utilizando Hipoclorito de Sodio al 1 % (preparada el mismo día), esta solución se dejó en contacto con la superficie y material potencialmente contaminado por 20 minutos, una vez transcurrido el tiempo se enjuagó la superficie con agua, se dejó secar y se aplicó una solución fresca de etanol al 70% y se dejó actuar por 5 minutos, finalmente se irradió la cabina 10 minutos con luz ultravioleta.

Para la esterilización de los medios de cultivo y materiales utilizados en los ensayos, se realizó el autoclavado a 1.5 atmosferas por 15 minutos, luego se lavaron todos los materiales en agua con lavavajillas e Hipoclorito de Sodio al 1% y se enjuagaron cuatro veces en agua limpia. Por otro lado, los medios de cultivo autoclavados se desecharon como residuos biológicos dentro de dos bolsas plásticas rojas.

El transporte de las muestras biológicas se realizó con bolsas cerradas de manera hermética para evitar los posibles derrames accidentales.

D. PROCESAMIENTO DE LOS DATOS

1. Recolección

Los datos recolectados fueron de dos tipos: cualitativos por la formación o no de placas de lisis si los bacteriófagos infectan a las bacterias y cuantitativos por el cálculo de la MDI (Multiplicidad de infección).

2. Elaboración

Se realizaron los ensayos de doble capa agarizada para comprobar la formación de las placas de lisis, el Spot Test junto con el recuento en placa de las UFC/mL de las bacterias ensayadas, para el cálculo del MDI de cada bacteriófago frente a cada cepa.

3. Análisis

Los resultados cualitativos se analizaron de manera que, una vez comprobado que los bacteriófagos aislados de muestras ambientales infectan a las bacterias ensayadas, son capaces de ejercer un biocontrol sobre las mismas.

Los análisis de los resultados cuantitativos revelaron la capacidad de infección de cada bacteriófago sobre cada bacteria, si infecta a más de

una cepa multirresistente, analizar el posible patrón entre ellas respecto a su antibiograma.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivo poder aislar bacteriófagos como agentes de control biológico de cepas multirresistentes de *E. coli*, en tal sentido, los resultados están enfocados en el aislamiento y caracterización morfológica de bacteriófagos de muestras ambientales, consecuentemente la determinación de características que determinan su capacidad infectiva y de lisis sobre cepas multirresistentes de *E. coli* aisladas del Seguro Social Universitario S.S.U. en la gestión 2017.

A. Aislamiento y caracterización de los bacteriófagos.

Se aislaron tres bacteriófagos con capacidad lítica sobre la cepa nativa de *E. coli* P008: 1) bacteriófago F, proveniente de muestra de agua del río Choqueyapu; 2) bacteriófago C1, aislado de muestra de suelo de jardín y por último 3) bacteriófago D2, aislado de muestra de agua de la laguna Janko Khota de la zona de Milluni (mismo nicho ecológico que la cepa de *E. coli* P008). El aislamiento de estos tres tipos de bacteriófagos podría indicar que en los ecosistemas de los que provienen las muestras existe contaminación de coliformes totales, ya que un requisito natural para que los bacteriófagos existan y se repliquen en un nicho ecológico es que necesitan de su hospedero (Haq et al., 2012; Parisien et al., 2008).

Se había considerado una muestra de suelo proveniente del jardín del Hospital de Clínicas, sin embargo, no se logró aislar ningún tipo de bacteriófago posiblemente por la falta de tratamiento con fertilizantes del suelo del lugar, razón por la cual el nicho ecológico no contenía cepas de *E. coli* y por consiguiente tampoco sus bacteriófagos específicos. Por otro lado, la dinámica de evolución entre las bacterias resistentes a la infección

por bacteriófagos puede cumplir un rol muy importante en este nicho ecológico.

En la Figura 8 se observan las placas de lisis causadas por el bacteriófago D2 sobre la cepa de *E. coli* P008. Las placas de lisis evidencian que el bacteriófago es capaz de infectar a su bacteria diana y además, se evidencian placas de lisis francamente visibles. Las placas de lisis que se observan en la figura son claras o transparentes, es decir, los bacteriófagos infectaron a todas las bacterias de esa placa y causaron la lisis de todas ellas, por otro lado, si los bacteriófagos no hubieran logrado lisar todas las bacterias en esa región podrían causar una placa de lisis turbia.

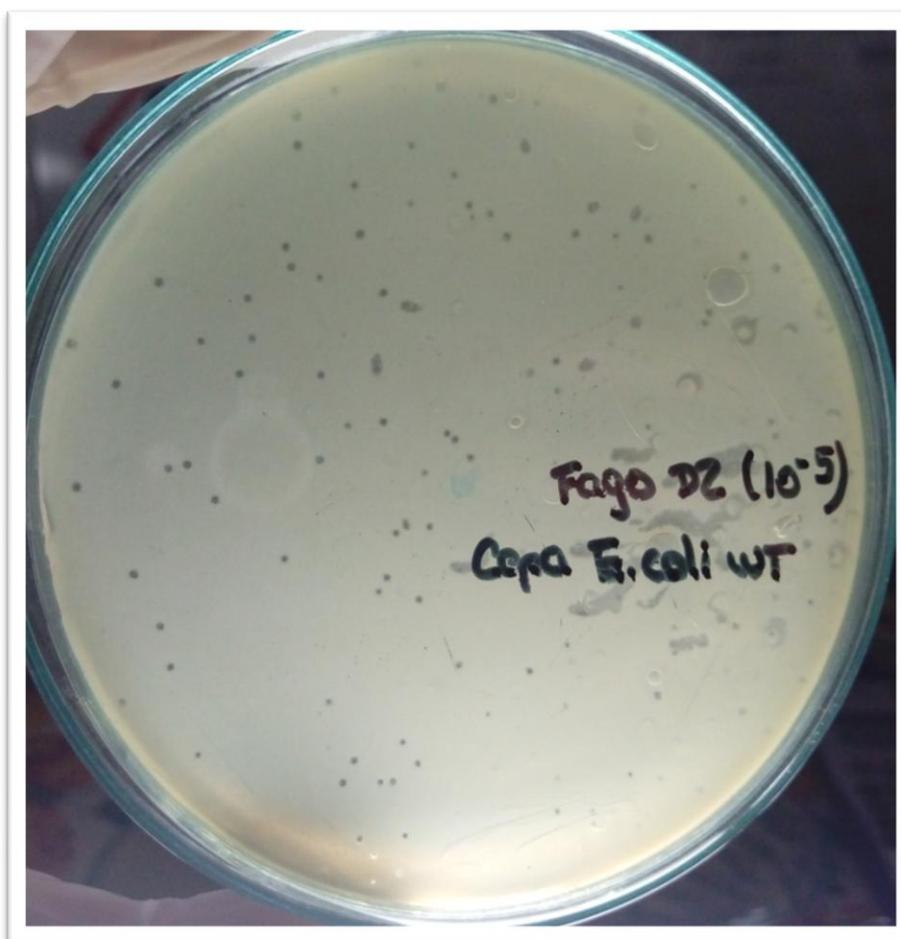


Figura 8. Ensayo de doble capa agarizada del bacteriófago D2 (Dilución 10^{-5}) sobre la cepa de *E. coli* P008.

La fase exponencial en el crecimiento bacteriano es el periodo de tiempo óptimo para realizar la infección por bacteriófagos, debido a que existe una estrecha relación entre la capacidad de lisis (burst size) y el estrés bacteriano en el cambio de fase exponencial a fase estacionaria, de modo que el inóculo de bacteriófagos en la fase exponencial conduce a una alta replicación de los bacteriófagos y diseminación posterior de los mismos que a su vez puede influir en el tamaño de las placas de lisis o calvas (Feiner et al., 2015; Li et al., 2016). En tal sentido, se estableció la cinética de crecimiento bacteriano de la cepa de *E. coli* P008 que se muestra en la Figura 15 (Anexos) para determinar el intervalo de tiempo en el cual la cepa se encontraría en fase exponencial, considerando que todas las cepas obtenidas pertenecen al mismo género y especie, y que además las condiciones químicas y físicas de cultivo fueron las mismas. De esta manera, se realizó la infección por bacteriófagos a las 6 horas de crecimiento de los aislados de *E. coli* en estudio.

- ***Caracterización de bacteriófagos por microscopía de epifluorescencia.***

Para la caracterización de bacteriófagos se empleó la técnica de microscopía de epifluorescencia con el fluoróforo SYBR Green I ($C_{32}H_{37}N_4S$) que es capaz de asociarse a la molécula de DNA doble cadena interactuando en la hendidura menor, por lo tanto, se puede detectar como puntos muy pequeños con un aumento de 1000X. (Naicker & Durbach, 2007). En la Figura 9 se observan las fotografías de las muestras tratadas con SYBR Green I.

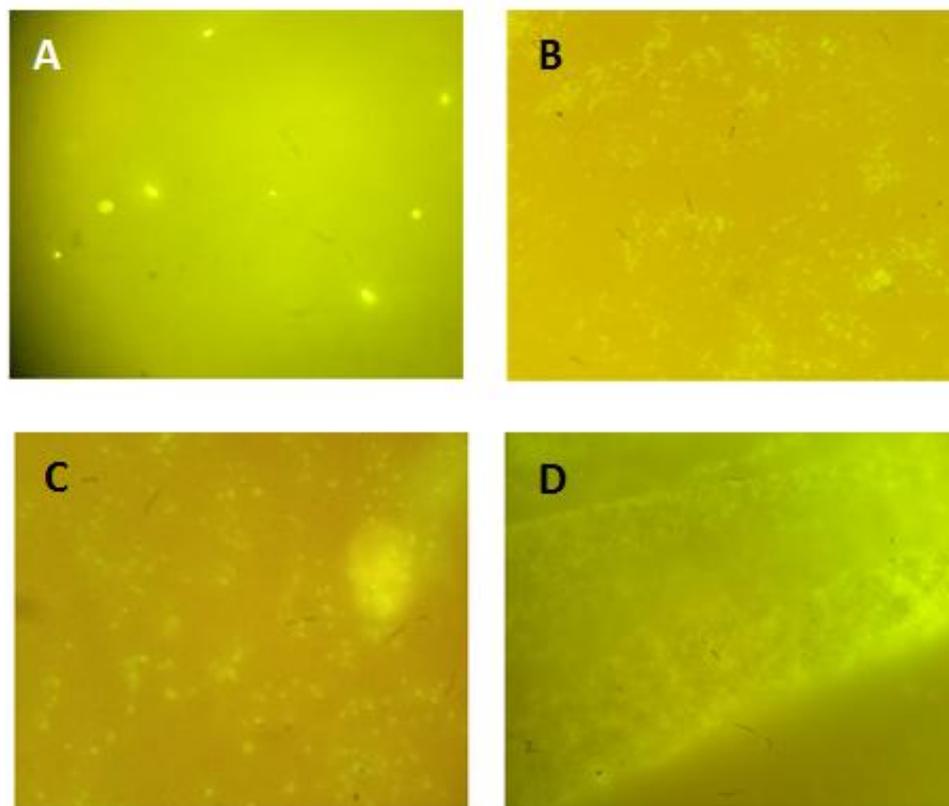


Figura 9. Microscopia de Epifluorescencia, A: Bacterias; B: Bacteriófago "F"; C: Bacteriófago "C1"; D: Bacteriófago "D2".

Es evidente que el tamaño de los bacteriófagos tratados con SYBR Green I es menor que el de las bacterias tratadas con el mismo fluoroforo.

- ***Caracterización de bacteriófagos mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM)***

A través de la microscopía transmisión electrónica (TEM) se lograron observar las morfologías e integridad de los bacteriófagos D2 (Figuras 10 y 11) y C1 (Figuras 12 y 13)

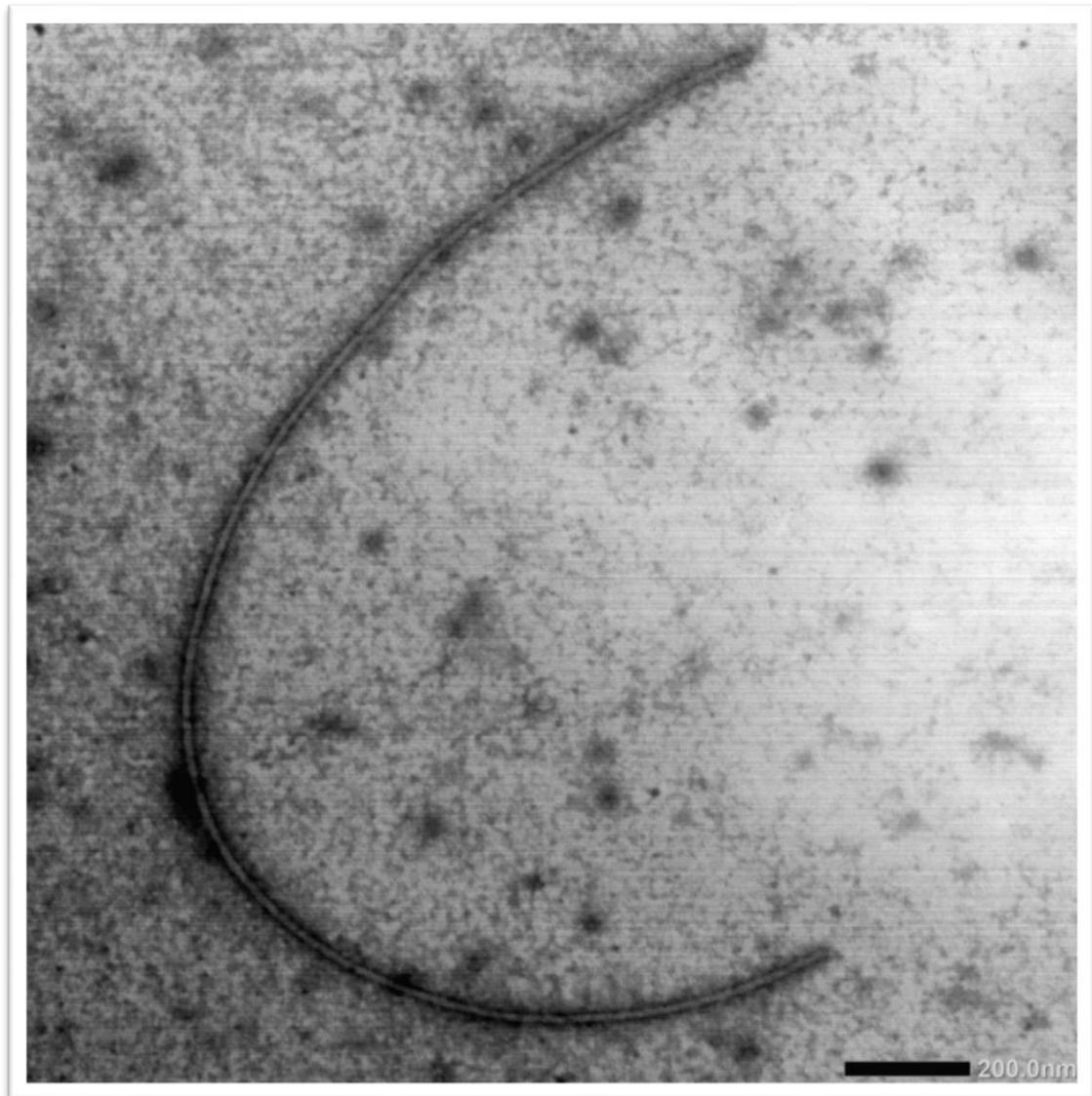


Figura 10. TEM del Bacteriófago D2 con el aumento de 20K.

En la Figura 10 se puede observar un bacteriófago de tipo filamentoso que podría pertenecer a la familia *Inoviridae* (RNA sc), tiene una longitud aproximada de 2000nm.

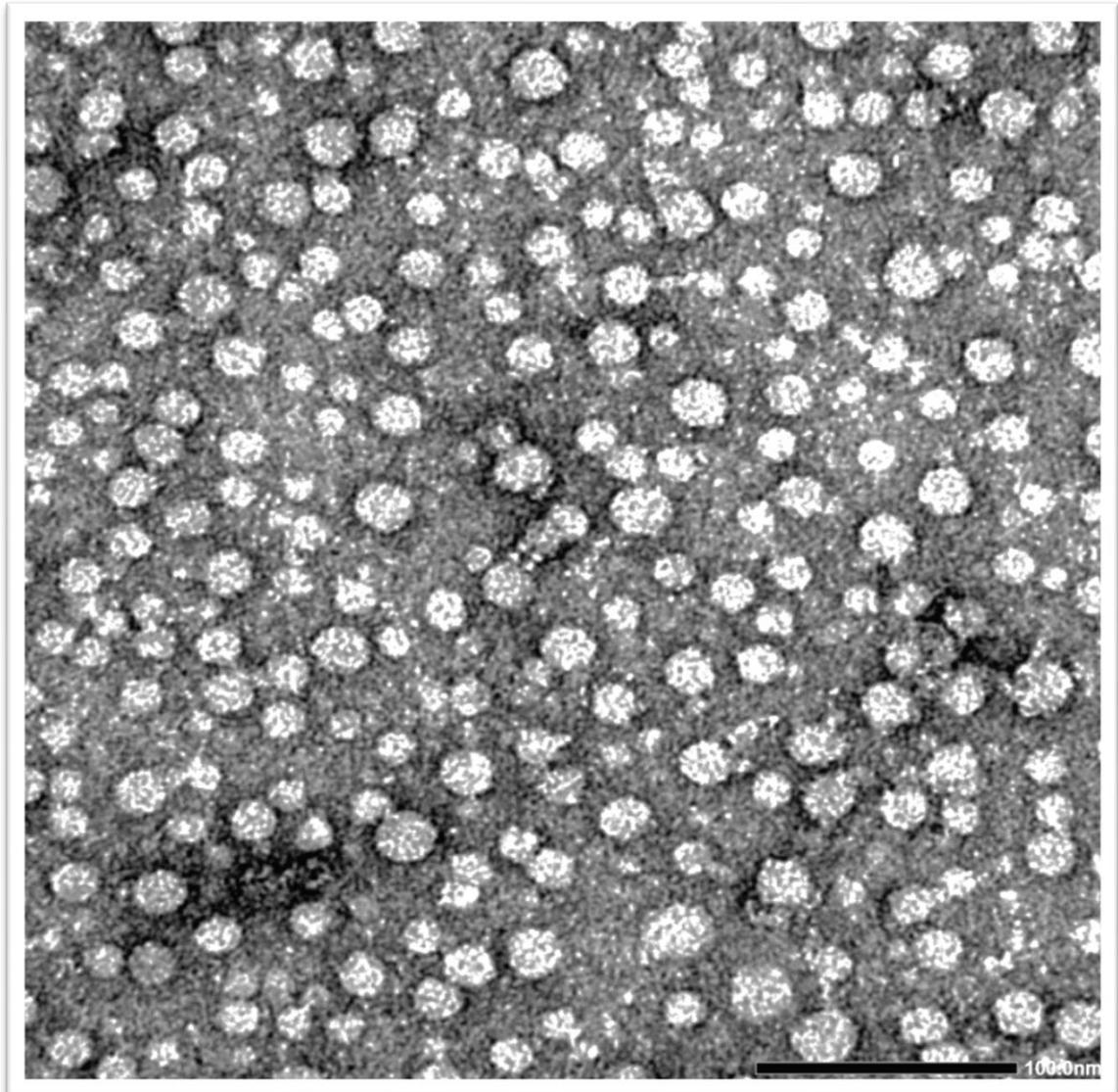


Figura 11. TEM del Bacteriófago D2 con el aumento de 80K.

La Figura 11 muestra bacteriófagos de tipo icosaédricos que podría pertenecer a la familia *Cystoviridae*, tiene un diámetro aproximado de 40nm. (Mikel, Vasickova, & Kralik, 2017).

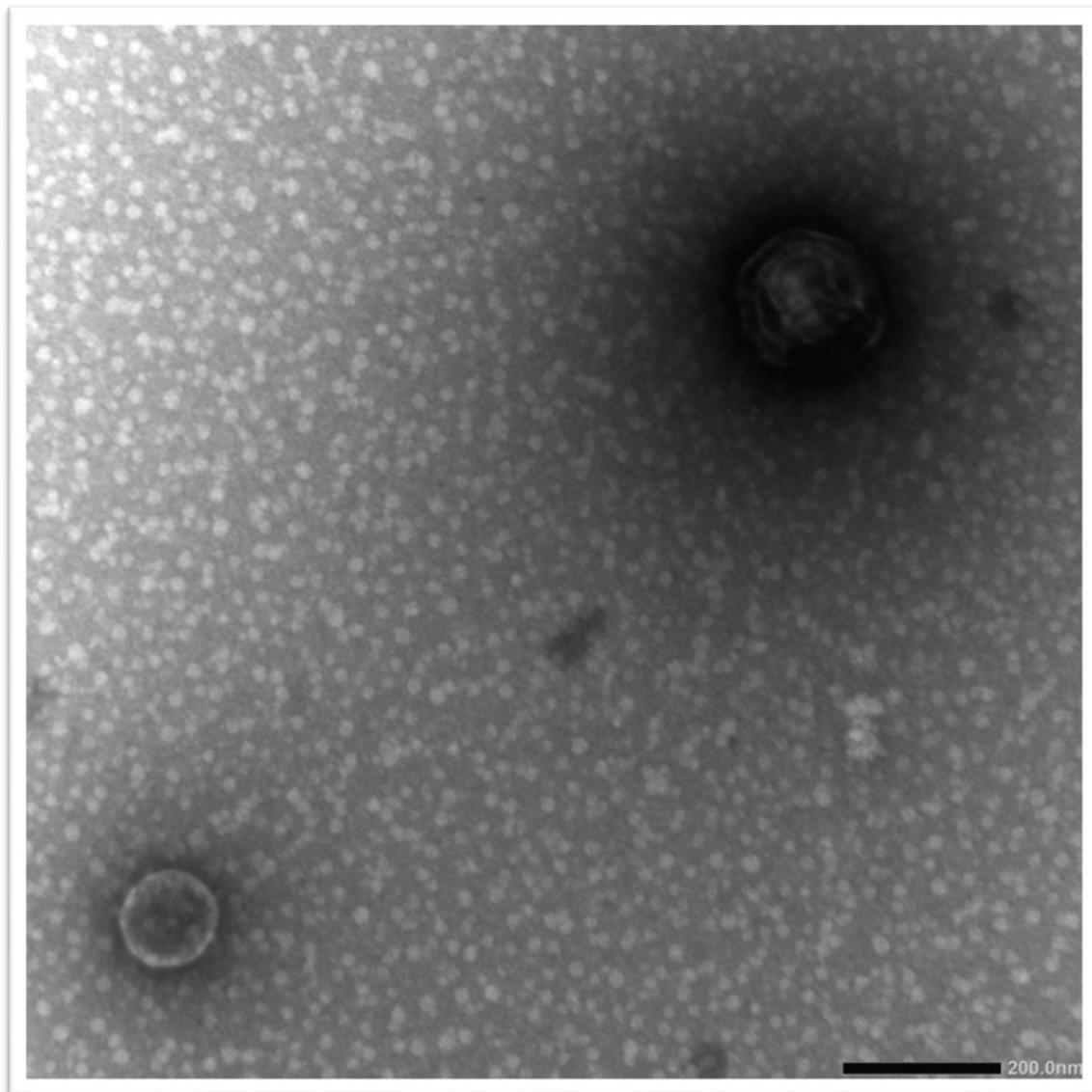


Figura 12. TEM del Bacteriófago C1 con el aumento de 25K.

En la Figura 12 se puede observar un bacteriófago de tipo circular e icosaédrico que podría pertenecer a la familia *Cystoviridae* (Jung, Ding, & Ahn, 2017), tiene un diámetro aproximado de 80nm.

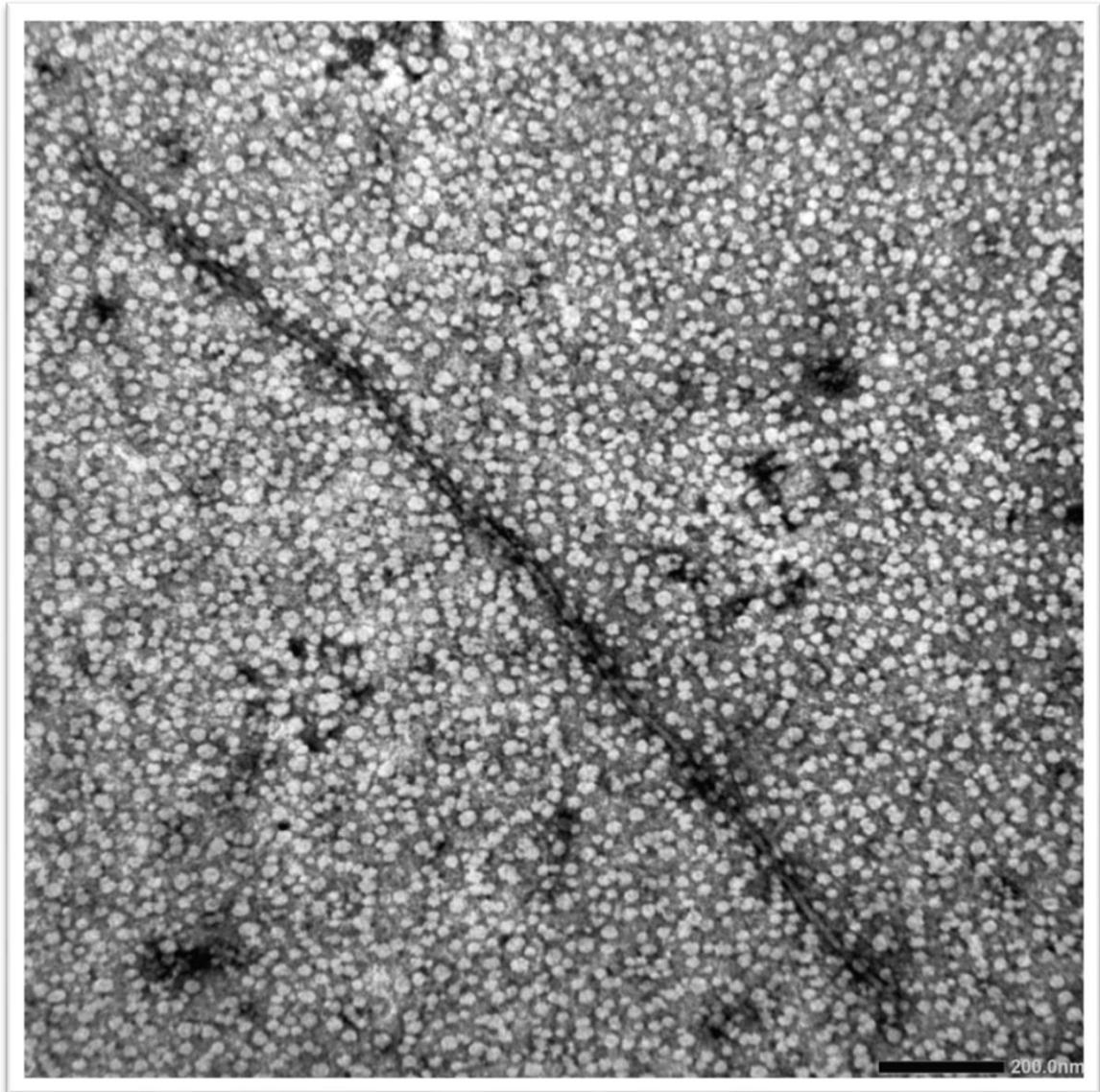


Figura 13. TEM del Bacteriófago C1 con el aumento de 20K.

La Figura 13 muestra un bacteriófago de tipo filamentoso que podría pertenecer a la familia *Inoviridae* y tiene una longitud aproximada de 900nm.

De acuerdo a las imágenes obtenidas se puede observar que cada muestra contenía dos bacteriófagos distintos, lo que nos sugiere que la purificación no se realizó de manera correcta, esto podría deberse a la

inexperiencia en la práctica del operador en el campo de estudio al momento de distinguir las placas de lisis de acuerdo al tamaño.

En el caso del bacteriófago F no se tomaron fotografías de Microscopía Electrónica de transmisión, por problemas en el procesamiento de la muestra.

B. Determinación del antibiograma de las cepas de *E. coli* empleadas en el presente estudio.

Para determinar si los bacteriófagos aislados de muestras ambientales tenían la capacidad de infectar cepas de *E. coli* multirresistentes se obtuvieron 11 cepas de *E. coli* resistentes a múltiples antibióticos seleccionadas de muestras de pacientes del Seguro Social Universitario S.S.U en el periodo comprendido desde Julio a Septiembre de 2017. La Tabla 4 muestra el antibiograma de las cepas de *E. coli* obtenidas, donde se puede observar que las cepas S.S.U. 1, S.S.U. 3 y S.S.U. 11 tienen el mismo antibiograma al igual que las cepas S.S.U. 2, S.S.U. 4, S.S.U. 5 y S.S.U. 7, las cepas S.S.U. 8 y S.S.U. 9 tienen antibiogramas similares mientras el antibiograma de las cepas S.S.U. 6 y S.S.U. 10 no tienen ninguna similitud con las otras cepas. Para la cepa nativa P008 se realizó la determinación del antibiograma en el laboratorio de Biología Molecular y el antibiograma correspondiente a la cepa de *E. coli* ATCC 25922 se determinó de acuerdo al artículo de referencia "*Multidrug Resistance Phenotype and Plasmid Profiling of Escherichia coli Isolates Causing Urinary Tract Infections in North East Part of Bangladesh*" por Rabbee en el 2016; en ambos casos presentan sensibilidad a todos los antibióticos.

Tabla 4. Antibiotipo de las cepas de *E. coli* multirresistentes y P008.

ATB CEPA	Inhibidores de la síntesis de pared bacteriana			Inhibidores de la síntesis de proteínas	Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos		
	Cefalosporinas de tercera generación	Penicilinas		Carbapenémicos	Aminoglucósidos	Quinolonas	
	CTX	AMP	AMC	IMP	GEN	NAL	CIP
<i>S.S.U. 1</i>	R	R	S	S	S	R	R
<i>S.S.U. 2</i>	R	R	R	S	R	R	R
<i>S.S.U. 3</i>	R	R	S	S	S	R	R
<i>S.S.U. 4</i>	R	R	R	S	R	R	R
<i>S.S.U. 5</i>	R	R	R	S	R	R	R
<i>S.S.U. 6</i>	R	R	R	R	S	R	S
<i>S.S.U. 7</i>	R	R	R	S	R	R	R
<i>S.S.U. 8</i>	R	R	I	S	S	R	R
<i>S.S.U. 9</i>	R	R	R	S	S	R	R
<i>S.S.U. 10</i>	R	R	I	S	R	R	R
<i>S.S.U. 11</i>	R	R	S	S	S	R	R
<i>ATCC 25922</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>P008</i>	S	S	S	S	S	S	S

CTX: Cefotaxima; AMP: Ampicilina; AMC: Amoxicilina + Acido Clavulanico; IPM: Imipenem; GEN: Gentamicina; NAL: Acido Nalidixico; CIP: Ciprofloxacina; BLEE: Beta Lactamasa de Espectro Extendido; R: Resistente; S: Sensible; I: Intermedio.

C. Determinación de la capacidad infectiva de bacteriófagos sobre cepas de *E. coli* ATCC 25922, P008 y multirresistentes.

Para la determinación de la capacidad infectiva de los bacteriófagos aislados de muestras ambientales sobre las cepas de *E. coli* se realizaron los ensayos de doble capa agarizada en los cuales se evidenciaron las placas de lisis, los resultados de la relación de los bacteriófagos que lograron infectar a las cepas de *E. coli* se ven reflejados en la figura 14.

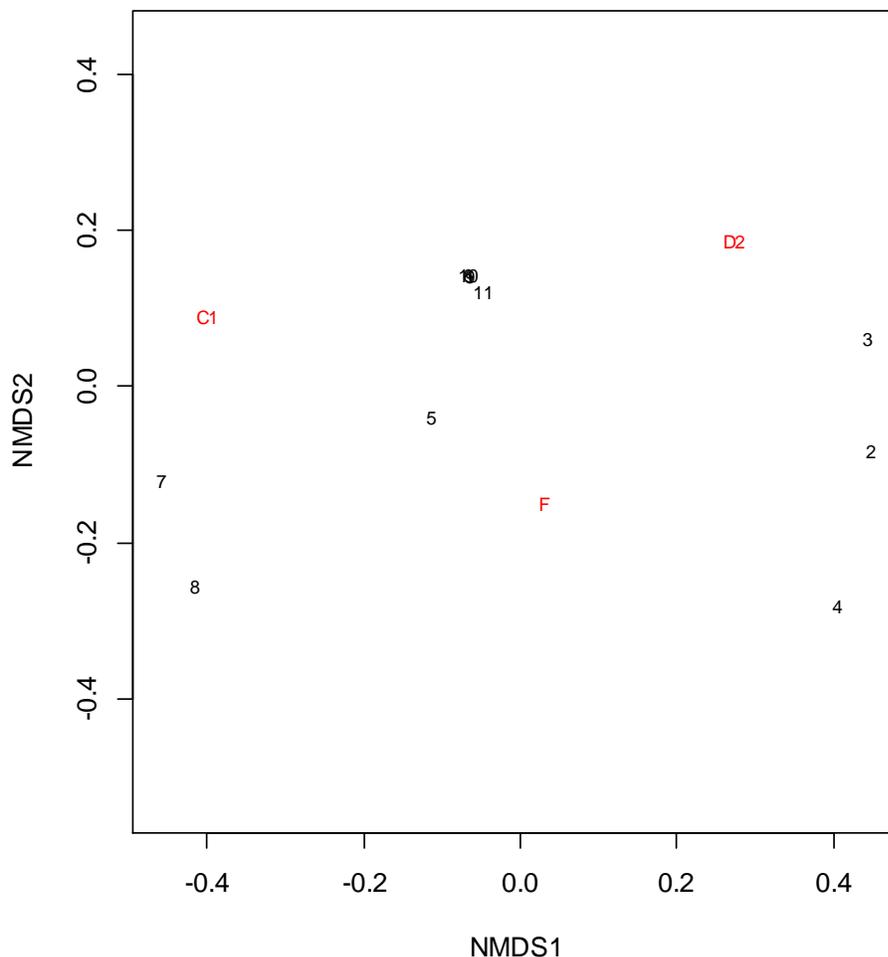


Figura 14. Análisis de ordenación NMDS de bacteriófagos F, C1 y D2 respecto a su capacidad infectiva a cepas de *E. coli* multirresistentes

La Figura 14 muestra la capacidad de cada uno de los bacteriófagos aislados de infectar y lisar a las cepas de *E. coli* multirresistentes cuyo antibiograma se describió anteriormente. En este sentido, la proximidad del bacteriófago con la cepa bacteriana indica la capacidad de infección y la actividad lítica exitosa, por lo tanto en la figura se puede observar que el bacteriófago C1 infectó y lisó a las cepas S.S.U. 5, S.S.U. 7 y S.S.U. 8. El bacteriófago D2 tuvo una infección y actividad lítica exitosa en las cepas S.S.U. 2, S.S.U. 3, S.S.U. 4 y S.S.U. 5. El bacteriófago F tuvo actividad lítica en la cepa S.S.U. 5 únicamente. Las demás cepas no mostraron placas de lisis en los ensayos en placa, por lo cual no se presentaron

datos de MDI y se encuentran agrupadas en un mismo lugar. Por el contrario, la cepa S.S.U. 5 fue infectada por los tres bacteriófagos y todos produjeron placas de lisis en mayor o menor proporción.

Las cepas P008 y ATCC 25922 fueron infectadas por los tres bacteriófagos por lo cual se presentarán los resultados del MDI.

Establecimiento de la relación Bacteriófago:Bacteria

La razón en la que la bacteria adsorbe a los bacteriófagos es proporcional a la liberación de una nueva progenie de bacteriófagos. La multiplicidad de infección o MDI, es la proporción de bacteriófagos que infectan al número total de bacterias presentes. También son relevantes para las cuestiones de multiplicidad de infección de los bacteriófagos, la aplicación de la distribución de Poisson para los bacteriófagos y la proporción de las bacterias infectadas.

Para determinar la relación entre los bacteriófagos y las bacterias, primeramente se determinó la carga bacteriana en Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) de cada cepa de *E. coli* utilizadas en el estudio, los valores se encuentran descritos en la Tabla 5.

Tabla 5. Carga bacteriana de las cepas de *E. coli* empleadas en el estudio

<i>S.S.U. 2</i> (UFC/mL)	<i>S.S.U. 3</i> (UFC/mL)	<i>S.S.U. 4</i> (UFC/mL)	<i>S.S.U. 5</i> (UFC/mL)	<i>S.S.U. 7</i> (UFC/mL)	<i>S.S.U. 8</i> (UFC/mL)	<i>P008</i> (UFC/mL)	<i>ATCC</i> <i>25922</i> (UFC/mL)
$1,36 \times 10^{10}$	$8,50 \times 10^{12}$	$1,03 \times 10^{12}$	$1,14 \times 10^{11}$	$1,16 \times 10^{14}$	$2,73 \times 10^{13}$	$2,97 \times 10^8$	$7,40 \times 10^8$

Posteriormente se realizó la titulación de los bacteriófagos para cuantificar la infección de los bacteriófagos sobre cada cepa de *E. coli*, estos valores se encuentran en UFP/mL que representan las Unidades Formadoras de Placas de lisis por mililitro (Ver la fórmula para la

obtención de estos valores en el subtítulo 3.4. de técnicas y procedimientos).

Tabla 6. Titulación de los bacteriófagos F, C1 y D2 sobre cepas de *E. coli* multirresistentes (S.S.U. 1 - 11) ATCC 25922 y P008

<i>CEPA</i> <i>FAGO</i>	<i>S.S.U. 2</i> (UFP/mL)	<i>S.S.U. 3</i> (UFP/mL)	<i>S.S.U. 4</i> (UFP/mL)	<i>S.S.U. 5</i> (UFP/mL)	<i>S.S.U. 7</i> (UFP/mL)	<i>S.S.U. 8</i> (UFP/mL)	<i>P008</i> (UFP/mL)	<i>ATCC</i> <i>25922</i> (UFP/mL)
<i>F</i>				1x10 ⁶			2,6x10 ⁷	3x10 ³
<i>C1</i>				2x10 ⁵	2x10 ⁶	8x10 ⁸	8,9x10 ⁷	2,5x10 ⁵
<i>D2</i>	3x10 ⁶	2x10 ⁶	3x10 ¹¹	1,4x10 ¹⁰			1x10 ⁹	1,13x10 ⁸

Multiplicidad de Infección (MDI)

La determinación de la Multiplicidad de infección o MDI es relevante debido a que constituye una medida directa del número promedio de bacteriófagos adsorbidos por cada bacteria de la cepa en estudio. Los bajos valores de MDI pueden implicar que pocas bacterias han sido infectadas por bacteriófagos con actividad lítica. Por otro lado, los valores más altos de MDI significan que la adsorción de un único bacteriófago usualmente es suficiente para la actividad lítica de esa bacteria.

De acuerdo a lo detallado en Métodos la MDI fue calculada a partir de la relación entre el número de bacteriófagos que han sido adsorbidos por bacterias. Para cada cepa multirresistente de *E. coli* infectada por cualquiera de los tres bacteriófagos en estudio F, C1 y D2, ver Tabla 7.

Tabla 7. Multiplicidad de infección (MDI) de los bacteriófagos F, C1 Y D2 sobre cepas de *E. coli* multirresistentes, ambiental P008 Y ATCC 25922

<i>CEPA</i> <i>FAGO</i>	<i>S.S.U. 2</i>	<i>S.S.U. 3</i>	<i>S.S.U. 4</i>	<i>S.S.U. 5</i>	<i>S.S.U. 7</i>	<i>S.S.U. 8</i>	<i>P008</i>	<i>ATCC 25922</i>
<i>F</i>				8.77×10^{-6}			0.0874	4.05×10^{-6}
<i>C1</i>				1.75×10^{-6}	1.72×10^{-8}	2.93×10^{-5}	0.299	3.38×10^{-4}
<i>D2</i>	2.21×10^{-4}	2.35×10^{-7}	0.291	0.123			3.36	0.1531

Los resultados obtenidos en la Tabla 7, reflejan la capacidad de infección que tiene cada uno de los bacteriófagos en las cepas de *E. coli* estudiadas, siendo evidente que la actividad lítica de los bacteriófagos tuvo mayor eficacia sobre la cepa P008 y no así en las cepas ATCC 25922 y multirresistentes que mostraron resultados del MDI bastante bajos, a excepción de las cepas S.S.U. 4 y S.S.U. 5 infectadas por el bacteriófago D2. Además, es notable que el valor de MDI más bajo es del bacteriófago D2 con la cepa *E. coli* multirresistente S.S.U. 3, lo cual muestra que el bacteriófago es capaz de infectar a esta cepa pero no tiene franca actividad lítica por lo cual no forma una gran cantidad de placas de lisis respecto a la población bacteriana, el valor más alto es del mismo bacteriófago con la cepa P008. De esta manera se puede evidenciar que existe una especificidad de infección del bacteriófago por la bacteria nativa P008 puesto que ambos provienen del mismo nicho ecológico expuesto a las mismas condiciones de estrés y presiones selectivas.

Según Boyd (2017) se ha determinado que si bien la coevolución de la bacteria con su bacteriófago ha determinado que hay una relación estrecha entre el receptor localizado a nivel de la membrana externa a la cual el bacteriófago se une con la finalidad de infectar a la bacteria. También existen otros receptores localizados en la misma membrana que pueden ser inespecíficos, lo cual permite la infección por distintas clases de bacteriófagos, determinando una especificidad no selectiva. Cuando los bacteriófagos usan las OMP (Outer Membrane Proteín / Proteínas de la membrana externa) como receptores, las bacterias como mecanismo de

defensa coevolutiva pueden reducir o modificar las OMP. La pérdida de un gen OMP podría afectar a los bacteriófagos ya sea directamente, por la pérdida del receptor de membrana, o indirectamente, a través de cambios en la expresión del receptor del bacteriófago.

Sin embargo, existen también algunos receptores proteicos (OMP) para los bacteriófagos que son específicos de *E. coli* descritos por Gabig (2002) quien determina por ejemplo que el antígeno proteico de superficie celular Ag43 facilita la infección del bacteriófago λ y se observa un comportamiento similar con los colifagos P1 y T4. La Ag43 está asociada con la autoagregación y sedimentación bacteriana. (Scanlan, Bischofberger, & Hall, 2017) Esta información sugiere que las cepas con MDI bajos podrían no expresar las proteínas receptoras de membrana necesarias para que los bacteriófagos las infecten. Sin embargo, la cepa P008 tiene mayor sensibilidad a la infección por bacteriófagos, por lo que se podría sugerir que tiene las proteínas receptoras de membrana para estos bacteriófagos, esto podría deberse a que tanto la bacteria diana como el bacteriófago provienen del mismo nicho ecológico y la coevolución puede tener un papel muy importante, ya que es el cambio recíproco que existe a través de la evolución de especies que interactúan constantemente conducida por la selección natural y produce un cambio en la estructura de la biodiversidad.

Diversas investigaciones han demostrado que la multiplicidad de infección juega un rol muy importante en el éxito de las terapias con bacteriófagos, a pesar de que los bacteriófagos tienen la capacidad de multiplicarse en la célula hospedadora, las terapias con bacteriófagos de mayor éxito han sido aquellas que utilizan una MDI elevada. Hasta la fecha, no existen en la literatura evidencias que sugieran utilizar dosis bajas de bacteriófagos (Borie et al., 2008). En algunas ocasiones la lisis causada por los bacteriófagos a su bacteria hospedadora no se da al final

del ciclo lítico completo, sino, existe el fenómeno llamado “lisis desde afuera” que ocurre cuando se enfrenta el bacteriófago con la bacterias a una MDI mayor a 20, en este caso se da el reconocimiento y adsorción de un gran número de bacteriófagos en la superficie bacteriana, esto provoca la lisis de la bacteria por desestabilización de la estructura de la membrana, por lo tanto, en este fenómeno no se aprecia un aumento en la progenie de bacteriófagos. (Punil, 2017) Esto sugiere que los bacteriófagos aislados producen la infección en las bacterias, pero existen diferencias en la cantidad de proteínas de membrana para facilitar la infección.

A partir de los resultados de MDI obtenidos se realizó la distribución de Poisson la cual es el número promedio de bacteriófagos adsorbidos por el número total de bacterias de la cepa.

Aplicación de la distribución de Poisson para la relación Bacteriófago:Bacteria.

La distribución de Poisson representa la probabilidad de que exista o no un porcentaje de bacterias que adsorban a los bacteriófagos, en este sentido se estudia la relación entre el porcentaje de bacteriófagos adsorbidos por las bacterias y además el porcentaje de bacterias que fueron infectadas por los bacteriófagos.

Tabla 8. Relación entre el Porcentaje de adsorción de bacteriófagos respecto a cada cepa de *E. coli* estudiada.

<u>Cepa de <i>E. coli</i></u>	<u>Porcentaje de Bacterias infectadas por bacteriófagos (%)</u>	<u>Porcentaje de bacterias que adsorbieron al menos un bacteriófago respecto al total de bacterias (%)</u>	<u>Porcentaje de bacterias que adsorbieron más de un bacteriófago respecto al total de bacterias que adsorbieron al menos un bacteriófago (%)</u>	<u>Porcentaje de las bacterias que no adsorbieron bacteriófagos (%)</u>
BACTERIÓFAGO F				
<i>S.S.U. 5</i>	0,00044	0,00098	0,00000	99,99
<i>P008</i>	4,30635	8,00850	0,36040	91,63
<i>ATCC 25922</i>	0,00020	0,00040	0,00000	99,99
BACTERIÓFAGO C1				
<i>S.S.U. 5</i>	0,00009	0,00017	0,00000	99,99
<i>S.S.U. 7</i>	0,00000	0,0000	0,00000	100,00
<i>S.S.U. 8</i>	0,00146	0,00293	0,00000	99,99
<i>P008</i>	14,20610	22,17263	3,67143	74,15
<i>ATCC 25922</i>	0,01690	0,03379	0,00001	99,96
BACTERIÓFAGO D2				
<i>S.S.U. 2</i>	0,01105	0,02210	0,00000	99,97
<i>S.S.U. 3</i>	0,00001	0,00002	0,00000	99,99
<i>S.S.U. 4</i>	13,84532	21,75271	3,49573	74,75
<i>S.S.U. 5</i>	6,02396	10,87644	0,69719	88,42
<i>P008</i>	87,90897	11,67105	84,85543	3,47
<i>ATCC 25922</i>	7,45500	13,12938	1,05764	85,81

La Tabla 8 representa la relación del porcentaje de Bacterias de cada una de las cepas de *E. coli* estudiadas que adsorbieron o no a los bacteriófagos, de acuerdo a la distribución de Poisson. En el caso de la relación entre la adsorción del bacteriófago F por la cepa S.S.U. 5 sugiere que el 99.99% de las bacterias no han adsorbido a ningún bacteriófago, por consiguiente el 0.00098% de las bacterias adsorbieron al menos un bacteriófago, el 0.00000% de las bacterias adsorbieron a más de un bacteriófago respecto a las bacterias que adsorbieron al menos a un bacteriófago, por último, el porcentaje de bacterias infectadas por bacteriófagos fue del 0.00044%. a más de un bacteriófago respecto al total de las bacterias en el cultivo y el 0.00044 de las bacterias. En la relación de la adsorción del bacteriófago F por la cepa ambiental P008 existe la probabilidad de que el 91.63% de las bacterias no adsorbieran ningún bacteriófago, por lo tanto el 8.0085% podría haber adsorbido al menos un bacteriófago respecto al total de bacterias del cultivo y el 0.36040% de las bacterias adsorbieron a más de un bacteriófago respecto al total de bacterias que adsorbieron al menos un bacteriófago, el 0.00020% de las bacterias fueron infectadas por los bacteriófagos. Respecto a la adsorción del bacteriófago F por bacterias de la cepa ATCC 25922 existe la probabilidad de que el 99.99% de las bacterias no adsorbieran ningún bacteriófago, el 0.00040% adsorbió al menos un bacteriófago respecto al total de bacterias del cultivo y el 0.00000% adsorbieron más de un bacteriófago respecto al total de bacterias que adsorbieron al menos un bacteriófago; el porcentaje de bacterias que fueron infectadas por los bacteriófagos es del 0.00020%.

En la adsorción del bacteriófago C1 por bacterias de la cepa S.S.U. 5 existe la probabilidad de que el 99.99% de las bacterias no adsorbieran ningún bacteriófago, el 0.00017% adsorbió al menos un bacteriófago respecto al total de bacterias del cultivo y el 0.00000% adsorbieron más de un bacteriófago respecto al total de bacterias que adsorbieron al menos un

bacteriófago; el porcentaje de bacterias que fueron infectadas por los bacteriófagos es del 0.00009%. en la relación de la adsorción de los bacteriófagos por la cepa S.S.U. 7 el 100% de las bacterias no han adsorbido a ningún bacteriófago, por consiguiente, el 0.0% de las bacterias adsorbieron al menos un bacteriófago, el 0.0% de las bacterias adsorbieron a más de un bacteriófago respecto a las bacterias que adsorbieron al menos a un bacteriófago, por último, el porcentaje de bacterias infectadas por bacteriófagos fue del 0.00%. En la relación de la adsorción del bacteriófago C1 por la cepa S.S.U. 8 existe la probabilidad de que el 99.99% de las bacterias no adsorbieran ningún bacteriófago, por lo tanto el 0.00293% podría haber adsorbido al menos un bacteriófago respecto al total de bacterias del cultivo y el 0.00000% de las bacterias adsorbieron a más de un bacteriófago respecto al total de bacterias que adsorbieron al menos un bacteriófago, el 0.00146% de las bacterias fueron infectadas por los bacteriófagos. En la relación de la adsorción del bacteriófago C1 por bacterias de la cepa ambiental P008 existe la probabilidad de que el 74.15% de las bacterias no adsorbieran ningún bacteriófago, el 22.17263% adsorbió al menos un bacteriófago respecto al total de bacterias del cultivo y el 3.67143% adsorbieron más de un bacteriófago respecto al total de bacterias que adsorbieron al menos un bacteriófago; el porcentaje de bacterias que fueron infectadas por los bacteriófagos es del 14.20610%. Respecto a la adsorción del bacteriófago C1 por bacterias de la cepa ATCC 25922 existe la probabilidad de que el 99.96% de las bacterias no adsorbieran ningún bacteriófago, el 0.03379% adsorbió al menos un bacteriófago respecto al total de bacterias del cultivo y el 0.00001% adsorbieron más de un bacteriófago respecto al total de bacterias que adsorbieron al menos un bacteriófago; el porcentaje de bacterias que fueron infectadas por los bacteriófagos es del 0.01690%.

En la adsorción del bacteriófago D2 por bacterias de la cepa S.S.U. 2 existe la probabilidad de que el 99.97% de las bacterias no adsorbieran

ningún bacteriófago, el 0.02210% adsorbió al menos un bacteriófago respecto al total de bacterias del cultivo y el 0.00000% adsorbieron más de un bacteriófago respecto al total de bacterias que adsorbieron al menos un bacteriófago; el porcentaje de bacterias que fueron infectadas por los bacteriófagos es del 0.01105%. En la relación de la adsorción de los bacteriófagos D2 por la cepa S.S.U. 3 el 99.99% de las bacterias no han adsorbido a ningún bacteriófago, por consiguiente el 0.00002% de las bacterias adsorbieron al menos un bacteriófago, el 0.0% de las bacterias adsorbieron a más de un bacteriófago respecto a las bacterias que adsorbieron al menos a un bacteriófago, por último, el porcentaje de bacterias infectadas por bacteriófagos fue del 0.00001%. En la relación de la adsorción del bacteriófago D2 por la cepa S.S.U. 4 existe la probabilidad de que el 74.75% de las bacterias no adsorbieran ningún bacteriófago, por lo tanto el 21.75271% podría haber adsorbido al menos un bacteriófago respecto al total de bacterias del cultivo y el 3.49573% de las bacterias adsorbieron a más de un bacteriófago respecto al total de bacterias que adsorbieron al menos un bacteriófago, el 13.84532% de las bacterias fueron infectadas por los bacteriófagos. En la relación de la adsorción del bacteriófago D2 por bacterias de la cepa S.S.U. 5 existe la probabilidad de que el 88.42% de las bacterias no adsorbieran ningún bacteriófago, el 10.87644% adsorbió al menos un bacteriófago respecto al total de bacterias del cultivo y el 0.69719% adsorbieron más de un bacteriófago respecto al total de bacterias que adsorbieron al menos un bacteriófago; el porcentaje de bacterias que fueron infectadas por los bacteriófagos es del 6.02396%. En la relación de la adsorción del bacteriófago D2 por bacterias de la cepa ambiental P008 existe la probabilidad de que el 3.47353% de las bacterias no adsorbieran ningún bacteriófago, el 11.67105% adsorbió al menos un bacteriófago respecto al total de bacterias del cultivo y el 84.85% adsorbieron más de un bacteriófago respecto al total de bacterias que adsorbieron al menos un bacteriófago; el porcentaje de bacterias que fueron infectadas por los bacteriófagos es del 87.90%. Respecto a la

adsorción del bacteriófago D2 por bacterias de la cepa ATCC 25922 existe la probabilidad de que el 85.81297% de las bacterias no adsorbieran ningún bacteriófago, el 13.12938% adsorbió al menos un bacteriófago respecto al total de bacterias del cultivo y el 1.05764% adsorbieron más de un bacteriófago respecto al total de bacterias que adsorbieron al menos un bacteriófago; el porcentaje de bacterias que fueron infectadas por los bacteriófagos es del 7.45500%.

Esta puede ser una de las razones por la cual los bacteriófagos no fueron adsorbidos por las cepas bacterianas. Sin embargo según Rostøl en su artículo “*(Ph)ighting Phages: How Bacteria Resist Their Parasites.*” Describe diversos mecanismos por los cuales las bacterias impiden los pasos del ciclo lítico del bacteriófago como en impedir la adsorción, inhibir la inyección del material genético, silenciar mediante el represor lisogénico, escisión mediante RM o CRISPR, Sistemas Toxina – Antitoxina e Infección Abortiva y la Interferencia en el ensamble; pero a su vez el bacteriófago desarrolla nuevos mecanismos de infección a las cepas bacterianas para poder continuar con el ciclo lítico, estos mecanismos se encuentran descritos y detallados en el marco teórico. En el caso de la cepa de ambiental de *E. coli* P008 provenía del mismo nicho ecológico que el bacteriófago aislado D2, sin embargo, la cepa fue aislada y caracterizada dos años anteriores al aislamiento de los bacteriófagos, posteriormente a la caracterización se criopreservó la cepa. Se puede inferir que en el nicho ecológico el mismo tipo de bacterias P008 que se quedaron en el lugar pueden haber desarrollado otros sistemas de defensa para la infección del bacteriófago y el bacteriófago otros mecanismos para continuar infectando las cepas bacterianas, por lo cual es posible que al interactuar con la cepa P008 criopreservada el bacteriófago contaba con más mecanismos de infección hacia la cepa y ese podría ser el motivo por el cual la relación bacteriófago:bacteria fue mayor que en los demás ensayos.

Se ha descubierto que los fenotipos bacterianos de resistencia a bacteriófagos y antibióticos están evolucionando en gran medida de forma independiente y sugiere que los bacteriófagos naturalmente presentes en entornos clínicos o ambientales probablemente no impulsarán la propagación de la resistencia a los antibióticos. Esto es prometedor para el desarrollo de la terapia con bacteriófagos y los tratamientos basados en combinaciones de bacteriófago-antibiótico, ya que es poco probable que sufran resistencia cruzada entre los dos componentes, más a menudo observados entre los antibióticos. (Allen, Pfrunder-Cardozo, Meinel, Egli, & Hall, 2017) Por otro lado, se ha demostrado que las dosis subletales de antibióticos producen un efecto sinérgico bacteriófago-antibiótico, reduciendo el número de bacterias, pero solo cuando las bacterias son sensibles a los antibióticos usados. El aumento en la inactivación bacteriana no se observó para la terapia combinada cuando el antibiótico era bacteriostático o cuando la bacteria era resistente a los antibióticos independientemente de sus mecanismos de acción. Se ha demostrado que la combinación de antibióticos con bacteriófagos es una alternativa que no solo puede ser eficaz para reducir el número de bacterias, sino también para contribuir a controlar los niveles de resistencia. Sin embargo, este punto de vista solo se ha discutido con respecto a la resistencia a los antibióticos y no para controlar la aparición de bacteriófagos mutantes (Valério et al., 2017).

Además, a partir de los resultados se puede inferir que las cepas de *E. coli* multirresistentes tuvieron una alta probabilidad de ser resistentes a los bacteriófagos aislados, lo cual puede significar que estas cepas bacterianas desarrollaron mecanismos de resistencia a la capacidad infectiva y/o actividad lítica de los bacteriófagos, estos sistemas de defensa solo pueden ser desarrollados si es que la cepa estuviera expuesta a bacteriófagos en algún momento, Según un estudio piloto

sobre la transducción de la resistencia antimicrobiana por bacteriófagos aislados de superficies en clínicas veterinarias, de esta manera se encontraron bacteriófagos en la superficie de la mesa quirúrgica, en las patas y bordes de la mesa quirúrgica, mangos del instrumental, control remoto de la grúa, interruptor quirúrgico, asiento de la silla, dispensador de jabón entre otros, lo cual sugiere que en ambientes hospitalarios se podría presentar la misma situación y esto podría sustentar la hipótesis de que las bacterias multirresistentes pudieron estar expuestas a bacteriófagos y gracias a esta situación generaron mecanismos de resistencia hacia los mismos.

Por otro lado, la cepa de *E. coli* ambiental P008 que provenía del mismo nicho ecológico que el bacteriófago D2 y que era sensible a todos los antibióticos ensayados, esta cepa de *E. coli* tuvo el mayor porcentaje de adsorción de bacteriófagos aislados, es posible que se deba a que en el mismo nicho ecológico de donde fue aislada existían bacteriófagos y esta cepa tiene los receptores de membrana necesarios para la adsorción, sin embargo, las cepas de *E. coli* multirresistentes tuvieron menor adsorción a los bacteriófagos aislados, lo cual podría sugerir que de alguna manera la resistencia a los antibióticos modifica el OMP de las bacterias impidiendo que los bacteriófagos puedan unirse a las mismas, sin embargo, en el presente trabajo no se ha logrado distinguir un patrón por el cual la resistencia a algún antibiótico en específico confiera la resistencia a la infección por bacteriófagos, lo cual puede ser un tema de investigación futura para determinar si existe o no relación entre la resistencia a los antibióticos y la resistencia a los bacteriófagos.

Los bacteriófagos fueron almacenados en Buffer SM (se encuentra descrito en la sección 1.3. de MATERIALES) de acuerdo a la información adquirida de "*Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas*

por alimentos (ETA)” Dini, 2011, se conservaron de cinco a siete muestras de cada bacteriófago a diferentes temperaturas (-80°C, -20°C y a 4°C). Según la información encontrada el buffer SM ayuda a mantener la integridad de las partículas virales a lo largo del tiempo a estas distintas temperaturas. Para la Microscopía Electrónica de Transmisión se trasladaron las muestras a temperatura ambiente, el título de los bacteriófagos a esta temperatura puede disminuir al cabo de 100 días aproximadamente, por lo cual no es recomendable almacenarlos a esta temperatura. Para una mejor conservación de los bacteriófagos se pueden utilizar metodologías de encapsulación que permiten la protección de bacteriófagos para superar condiciones ambientales críticas y además, mejoran la estabilidad y el suministro controlado de bacteriófagos. (Azeredo & Sillankorva, 2018; Choińska-Pulit, Mituła, Śliwka, Łaba, & Skaradzińska, 2015; Malik et al., 2017) Esta nueva herramienta puede aplicarse tanto en la clínica, como en la industria alimentaria para controlar los patógenos en animales de consumo. (Hussain et al., 2017)

VII. CONCLUSIONES

Se logró determinar la capacidad de infección de los bacteriófagos aislados de tres nichos ecológicos distintos, del agua del río Choqueyapu se encontraban los bacteriófagos denominados F, se aislaron los bacteriófagos D2 de aguas de la laguna Janko Khota de Milluni y los bacteriófagos C1 se aislaron de suelo de jardín particular. Estos bacteriófagos presentaron actividad bactericida en las cepas de *Escherichia coli* tanto la ambiental P008 y ATCC 25922 como las multirresistentes, en algunos casos se evidenció que esta capacidad lítica fue más efectiva que en otros.

De acuerdo a las imágenes realizadas por TEM y de acuerdo a las características morfológicas se observó que los bacteriófagos presentes en D2 fueron de las familias *Inoviridae* y *Cystoviridae*, en el caso de C1 los

bacteriófagos presentes pertenecían a la misma familia de D2; no se logró identificar la familia del bacteriófago F por problemas técnicos respecto a la muestra.

La relación en la proporción entre los bacteriófagos se logró determinar de acuerdo a la MDI y a la distribución de Poisson en las cuales pudimos observar que los bacteriófagos D2 fueron los que tuvieron mayor capacidad infectiva y al mismo tiempo la actividad lítica, los C1 tuvieron capacidad infectiva y actividad lítica menor a la de los bacteriófagos D2, en el caso del bacteriófago F su capacidad infectiva fue menor al igual que su actividad lítica. Hay que resaltar que la cepa de *E. coli* S.S.U. 5 multirresistente fue la única cepa multirresistente infectada por los tres tipos de bacteriófagos, además de la cepa ATCC 25922 y de la P008 con la cual el bacteriófago D2 tuvo mayor capacidad infectiva y actividad lítica. Por otro lado las cepas S.S.U. 1, S.S.U. 6, S.S.U. 9, S.S.U. 10 y S.S.U. 11 no fueron infectadas por los bacteriófagos.

VIII. RECOMENDACIONES

Se sugiere diseñar un estudio complementario para poder determinar el porcentaje de lisis que causan los bacteriófagos frente a las bacterias a las que estará dirigido el coctel.

Así mismo, realizar una caracterización molecular aislando el material genético en gradiente de sacarosa, ya que, el método de PCI/SDS para extracción de DNA y TRizol para RNA no generó resultados.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abedon, S. T. (2017). Multiplicity of Infection ☆. *Reference Module in Life Sciences*, 1–5. Elsevier. Retrieved from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128096338067480>

- Abedon, S. T., & Bartom, E. (2013). Multiplicity of Infection. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, 509–510.
- Ackermann, H. W. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 152(2), 227–243.
- Ackermann, H. W., & Prangishvili, D. (2012). Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Archives of Virology*, 157(10), 1843–1849.
- Adibi, M., Mobasher, N., Ghasemi, Y., Mohkam, M., Jokar, J., & Mobasher, M. (2017). Isolation, purification and identification of E. coli O157 phage for medical purposes. *Trends in Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 43–48.
- Allen, R. C., Pfrunder-Cardozo, K. R., Meinel, D., Egli, A., & Hall, A. R. (2017). Associations among antibiotic and phage resistance phenotypes in natural and clinical Escherichia coli isolates. *mBio*, 8(5), 1–13.
- Azeredo, J., & Sillankorva, S. (2018). *Bacteriophage Therapy*. Human Press (Vol. 1693). Retrieved from <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7395-8>
- Bascompte, M. A. (Mayo de 2019). Coevolutionary dynamics shape the structure of bacteria-phage infection networks. *Evolution*, 73(5), 1001–1011.
- Bolocan, A. S., Callanan, J., Forde, A., Ross, P., & Hill, C. (2016). Phage therapy targeting Escherichia coli—a story with no end? *FEMS Microbiology Letters*, 363(22), 1–5.
- Borie, C., Zurita, P., Sanchez, M. L., Rojas, V., Santander, J., & Robeson, J. (2008). Prevention of Salmonella enterica subspecies enterica serotype Enteritidis (Salmonella Enteritidis) infection in chickens using a bacteriophage. *Archivos De Medicina Veterinaria*, 40(2), 197–201.
- Boyd, E. & Brussow, H. (2002). Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *TRENDS in Microbiology*, 10 (11), 521–529.
- Brussow, H. (2001). PHAGES OF DAIRY BACTERIA. *Annual Review of Microbiology*, 55, 283–303.
- Choińska-Pulit, A., Mituła, P., Śliwka, P., Łaba, W., & Skaradzińska, A. (2015). Bacteriophage encapsulation: Trends and potential applications. *Trends in Food Science and Technology*, 45(2), 212–221. Elsevier Ltd. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.001>
- Clokier, M. R. J., & Kropinski, A. M. (2009). Bacteriophages : methods and protocols. *Methods in molecular biology* (Vol. 501, pp. 127–140).
- Clokier, M. R. J., Millard, A. D., Letarov, A. V., & Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage*, 1(1), 31–45. Retrieved from <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/bact.1.1.14942>
- Cockerill, F., Wikler, M., Alder, J., Dudley, M., Eliopoulos, G., Ferraro, M. J., Hardy, D., et al. (2012). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition*. Clinical and Laboratory Standards Institute - NCCLS (Vol. 32). Retrieved from <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/01-CLSI-M02-A11-2012.pdf>
- Davis, C., Dulbecco, A., Eisen, D., Ginsberg, F. (1990). Titulación Viral por el Método del Punto Final 50%. *Microbiology*. pp.789

- Dini, C. (2011). Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Retrieved from http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2686/Documento_completo.pdf?sequence=1
- Elbreki, M., Ross, R. P., Hill, C., O'Mahony, J., McAuliffe, O., & Coffey, A. (2014). Bacteriophages and Their Derivatives as Biotherapeutic Agents in Disease Prevention and Treatment. *Journal of Viruses*, 2014, 1–20. Retrieved from <http://www.hindawi.com/archive/2014/382539/>
- Engelkirk, P. (2013). *Microbiology for the Health Sciences 9th Ed.* (Intergovernmental Panel on Climate Change, Ed.) *The Point*. Cambridge: Cambridge University Press. Retrieved from https://www.cambridge.org/core/product/identifier/CBO9781107415324A009/type/book_part
- Espigares, M. (2006). Virus en aguas de consumo. *Hig. Sanid. Ambient 6*: 173–189, 189, 173–189.
- Feiner, R., Argov, T., Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I., & Herskovits, A. A. (2015). A new perspective on lysogeny: Prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 13(10), 641–650. Nature Publishing Group. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3527>
- Fernández, I. (2016). *Eficacia de la fagoterapia contra la infección inducida por Vibrio alginolyticus en cultivos de Artemia franciscana.*
- Fernández, J. R. (2004). Los Bacteriófagos en la Biología Molecular Pasada y Actual, 41–55.
- Gabig, M., Herman-Antosiewicz, A., Kwiatkowska, M., Los, M., Thomas, M. S., & Węgrzyn, G. (2002). The cell surface protein Ag43 facilitates phage infection of Escherichia coli in the presence of bile salts and carbohydrates. *Microbiology*, 148(5), 1533–1542.
- Ghugare, G. S., Nair, A., Nimkande, V., Sarode, P., Rangari, P., & Khairnar, K. (2017). Membrane filtration immobilization technique—a simple and novel method for primary isolation and enrichment of bacteriophages. *Journal of Applied Microbiology*, 122(2), 531–539.
- Golkar, Z., Bagasra, O., & Gene, D. (2014). Bacteriophage therapy: A potential solution for the antibiotic resistance crisis. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8(2), 129–136.
- Hanssen, H., Uribe, G., & Escovar, G. (1982). EL PAPEL DE LA MICROSCOPIA ELECTRONICA EN EL DIAGNOSTICO VIROLOGICO, 2(1).
- Haq, I. U., Chaudhry, W. N., Akhtar, M. N., Andleeb, S., & Qadri, I. (2012). Bacteriophages and their implications on future biotechnology: A review. *Virology Journal*, 9, 1–8.
- Hernández, A. (2007). *Aislamiento, caracterización y detección precoz de bacteriófagos de Streptococcus thermophilus en la industria láctea. Tesis Doctoral.*
- Hernández, R., Jiménez, Z., & Pla, R. (2004). Aplicación de bacteriófagos en alimentos, 1(12).

- Hernández, R., Jiménez, Z., & Pla, R. (2011). Aplicación de bacteriófagos en alimentos. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 12(3), 2–9.
- Hussain, M. A., Liu, H., Wang, Q., Zhong, F., Guo, Q., & Balamurugan, S. (2017). Use of encapsulated bacteriophages to enhance farm to fork food safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(13), 2801–2810.
- Ibrahim, M., Bilal, N., & Hamid, M. (2012). Increased multi-drug resistant *Escherichia coli* from hospitals in Khartoum state , Sudan. *African Health Sciences*, 12(3), 368–375.
- Jung, L. seung, Ding, T., & Ahn, J. (2017). Evaluation of lytic bacteriophages for control of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 16(1), 1–9. BioMed Central.
- Kalatzis, P., Castillo, D., Katharios, P., & Middelboe, M. (2018). Bacteriophage Interactions with Marine Pathogenic Vibrios: Implications for Phage Therapy. *Antibiotics*, 7(1), 15. Retrieved from <http://www.mdpi.com/2079-6382/7/1/15>
- Kiros, A., Gashaw, T., & Teshale, A. (2016). Phage Therapy ; A Review on the Biology and Therapeutic Application of Bacteriophage. *ARC Journal of Animal and Veterinary Sciences (AJAVS)*, 2(4), 15–25.
- Kutter, E., & Sulakvelidze, A. (2005). *Bacteriophages: biology and applications*. New York. Retrieved from http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=6sTBd2EJpmYC&oi=fnd&pg=PP2&dq=BACTERIOPHAGES+Biology+and+Applications&ots=j_fXYdh4lu&sig=JG1NNIDLPGS7aP84vH_ymHFsqBk%5Cnhttp://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=6sTBd2EJpmYC&oi=fnd&pg=PP2&dq=Bacteriophages:+bio
- Koneman, E. (2008). Koneman Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas en color. *Editorial Panamericana* (6ta Ed.) 938-939.
- Labarca, J. (2002). Utilización del antibiograma como marcador epidemiológico en infecciones intrahospitalarias: Comparación con la epidemiología molecular ANTIBIOTYPE UTILIZATION AS AN EPIDEMIOLOGICAL MARKER IN NOSOCOMIAL INFECTIONS: COMPARISON WITH MOLECULAR EPIDEMIOLOGY. *Rev Chil Infect*, 19(2), 157–160.
- Lee, J. (2008). The phage in the dirt : Studies in the ecology of terrestrial bacteriophages.
- Letellier, L., Boulamger, P., Plancon, L., Jacquot, P., & Santamaria, M. (2004). MAIN FEATURES ON TAILED PHAGE, HOST RECOGNITION AND DNA UPTAKE. *Frontiers in Bioscience*, 9, 1228–1239.
- Li, E., Yin, Z., Ma, Y., Li, H., Lin, W., Wei, X., Zhao, R., et al. (2016). Identification and molecular characterization of bacteriophage phiAxp-2 of *Achromobacter xylosoxidans*. *Scientific Reports*, 6(September), 1–11. Nature Publishing Group. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/srep34300>
- Lin, D. M., Koskella, B., & Lin, H. C. (2017). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 8(3), 162. Retrieved from <http://www.wjgnet.com/2150-5349/full/v8/i3/162.htm>
- Lu, T. K., & Koeris, M. S. (2011). The next generation of bacteriophage therapy.

- Current Opinion in Microbiology*, 14(5), 524–531. Elsevier Ltd. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2011.07.028>
- MacKinnon, M. C., Pearl, D. L., Carson, C. A., Parmley, E. J., & McEwen, S. A. (2018). Comparison of annual and regional variation in multidrug resistance using various classification metrics for generic *Escherichia coli* isolated from chicken abattoir surveillance samples in Canada. *Preventive Veterinary Medicine*, 154(March), 9–17. Elsevier. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.03.010>
- Malik, D. J., Sokolov, I. J., Vinner, G. K., Mancuso, F., Cinquerrui, S., Vladisavljevic, G. T., Clokie, M. R. J., et al. (2017). Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Advances in Colloid and Interface Science*, 249(May), 100–133. Elsevier. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.014>
- Mikel, P., Vasickova, P., & Kralik, P. (2017). One-plasmid double-expression His-tag system for rapid production and easy purification of MS2 phage-like particles. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. Springer US. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-17951-5>
- Morejon, M. (2013). Revista Cubana de Urología , Volumen 2 , *Escherichia coli* multirresistentes. *Revista Cubana de Urología*, 1, 1–3.
- Naicker, K., & Durbach, S. I. (2007). Epifluorescent microscopy to evaluate bacteriophage capsid integrity. *BioTechniques*, 43(4), 473–476.
- Nanda, A. M., Thormann, K., & Frunzke, J. (2015). Impact of spontaneous prophage induction on the fitness of bacterial populations and host-microbe interactions. *Journal of Bacteriology*, 197(3), 410–419.
- Ovalle, M., Saavedra, S., González, M., Hidalgo, A., Duarte, C. & Beltrán, M., (2017). Resultados de la vigilancia nacional de la resistencia antimicrobiana de enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores en infecciones asociadas a la atención de salud, Colombia, 2012-2014. *Journal of Applied Microbiology*, 104(1), 1–13.
- Parisien, A., Allain, B., Zhang, J., Mandeville, R., & Lan, C. Q. (2008). Novel alternatives to antibiotics: Bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Biomédica*, 37, 473-485.
- Petrenko, V., & Smith, G. (2011). *Phage Nanobiotechnology*. RSC Publishing (Vol. 17). Retrieved from <http://ebook.rsc.org/?DOI=10.1039/9781847559920>
- Pirnay, J. P., Verbeken, G., Ceyssens, P. J., Huys, I., de Vos, D., Ameloot, C., & Fauconnier, A. (2018). The Magistral Phage. *Viruses*, 10(64), 1–7.
- Punil, R. (2017). *Caracterización de un bacteriófago específico de Escherichia coli aislado de aguas residuales de “ La Taboada .”*
- Qadir, M. (2015). Phage therapy: A modern tool to control bacterial infections. *Pak. J. Pharm. Sci*, 28(1), 265–270.
- Quiroz, E. (2005). *Aislamiento de bacterias y fagos para el control biológico de Vibrio spp. durante la eclosión de Artemia.*
- Rabbee, M., Begum, M., Islam, J., Chowdhury, P., Chowdhury, O., Zohora, F., Sutradhar, P., (2016). Multidrug Resistance Phenotype and Plasmid Profiling of *Escherichia coli* Isolates Causing Urinary Tract Infections in North East Part of Bangladesh. *British Microbiology Research Journal*.

- 15(6), 1-11.
- Reina, J. (2018). Fagoterapia Una alternativa a la antibioticoterapia?, *31(2)*, 101–104.
- Rodriguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, *44(5)*, 464–475. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0036-36342002000500011&script=sci_arttext&tlng=pt
- Rostol, J. (2019). (Ph)ighting Phages: How Bacteria Resist Their Parasites. *Cell Host and Microbe*, *25*, 184-194.
- Sanchez, C. (2015). Bacteriófagos : su importancia en los inicios de la biología molecular. *Química Viva*, *14(3)*, 26–39.
- Sander, H., Gales, A., Pfaller, M., Menders, R., Zoccoli, C., Barth, A., & Jones, R. (2001). Pathogen Frequency and Resistance Patterns in Brazilian Hospitals: Summary of Results from Three Years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *5(4)*, 200–214.
- Scanlan, P. D., Bischofberger, A. M., & Hall, A. R. (2017). Modification of *Escherichia coli*-bacteriophage interactions by surfactants and antibiotics in vitro. *FEMS microbiology ecology*, *93(1)*, 1–9.
- Segundo, N., Hernández, E., López, O., & Torres, O. (2010). Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas (fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, *41(3)*, 17–26.
- Shende, R. K., Hirpurkar, S. D., Sannat, C., Rawat, N., & Pandey, V. (2017). Isolation and characterization of bacteriophages with lytic activity against common bacterial pathogens. *Veterinary World*, *10*, 973–978.
- Singh, A., Poshtiban, S., & Evoy, S. (2013). Recent advances in bacteriophage based biosensors for food-borne pathogen detection. *Sensors (Switzerland)*, *13(2)*, 1763–1786.
- Taha, M. M. E., Homeida, H. E., Dafalla, O. M. E., & Abdelwahab, S. I. (2018). Multidrug resistance, prevalence and phylogenetic analysis of genes encoding class II and III integrons in clinically isolated *Escherichia coli*. *Cellular and Molecular Biology*, *64(5)*, 122–126.
- Titer, P. (2016). Isolation of Bacteriophage from Sewage and Determination of Phage Titer 37. *Bacteriophage*, *37(1)*, 277–284.
- Uchiyama, J., Takemura, I., Hayashi, I., Matsuzaki, S., Satoh, M., Ujihara, T., Murakami, M., et al. (2011). Characterization of lytic enzyme open reading frame 9 (ORF9) derived from enterococcus faecalis bacteriophage ϕ EF24C. *Applied and Environmental Microbiology*, *77(2)*, 580–585.
- Uzodi, A. S., Lohse, C. M., & Banerjee, R. (2017). Population-Based Study of Incidence and Antimicrobial Resistance Patterns of Extraintestinal *Escherichia coli* Infections in Children in Olmsted County, Minnesota, 2012. *Clinical Pediatrics*, *56(4)*, 389–392.
- Valério, N., Oliveira, C., Jesus, V., Branco, T., Pereira, C., Moreirinha, C., & Almeida, A. (2017). Effects of single and combined use of bacteriophages and antibiotics to inactivate *Escherichia coli*. *Virus Research*, *240*, 8–17. Elsevier B.V. Retrieved from

<http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2017.07.015>

Walker, J. M. (2009). *Bacteriophages Methods and Protocols. Life Sciences* (Vol. 1). Retrieved from

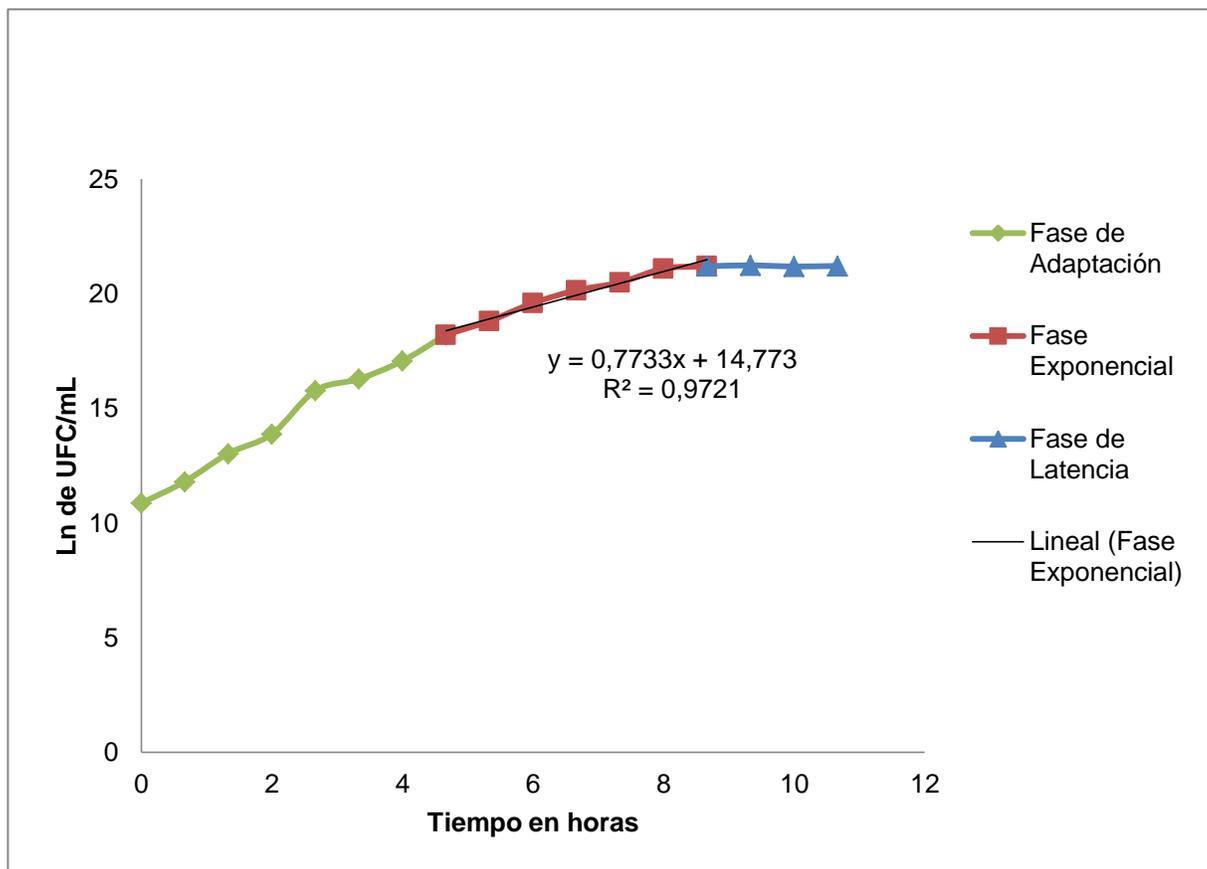
<http://books.google.com/books?id=Ku2wPAAACAAJ>

Wang, I., Deaton, J., & Young, R. (2003). Sizing the Holin Lesion with an Endolysin – α -Galactosidase Fusion. *Journal of Bacteriology*, 185(3), 779–787.

World Health Organization (2015) Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*.1-50.

Zheng, S. (2013). *ISOLATION AND CHARACTERISATION OF BACTERIOPHAGES AGAINST Shigella flexneri. Department of Biomedical Science.*

ANEXO 1

Figura 15. Cinética de crecimiento bacteriano de la cepa de *E. coli* P008.