

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

AISLAMIENTO DE BACTERIOFAGOS ESPECÍFICOS PARA *Klebsiella*
oxyloca MULTIRRESISTENTE

Informe de Tesis

Presentado por

JUAN ERNESTO VOSSBERG ORDÓÑEZ

Para optar al título de

QUÍMICO BIÓLOGO

Guatemala, Marzo del 2003

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
BIBLIOTECA CENTRAL

DL
06
T(2135)

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANO	M.Sc. GERARDO LEONEL ARROYO CATALÁN
SECRETARIA	LICDA. JANNETTE SANDOVAL DE CARDONA
VOCAL I	LICDA. GLORIA ELIZABETH NAVAS ESCOBEDO
VOCAL II	LIC. JUAN FRANCISCO PÉREZ SABINO
VOCAL III	DR. FEDERICO ADOLFO RICHTER MARTÍNEZ
VOCAL IV	BR. JORGE JOSÉ GARCÍA POLO
VOCAL V	BR. LIZA LEONOR CARRANZA JUÍ

ACTO QUE DEDICO A

AL UNIVERSO, AL INFINITO, A LA ENTROPIA, A LA MADRE
NATURALEZA, AL UNO Y AL CERO.

A mis padres: Ana María Ordoñez
 Enrique Guillermo Vossberg †

Al asar por escribir estas líneas.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Mario González-Pérez, por su colaboración, asesoría y orientación, que me brindó para la elaboración del presente trabajo de investigación.

Licda. Támara Velázquez por su colaboración durante la elaboración de este estudio.

Licda. Alba Marina de Valdés de García por su tiempo en la revisión de este estudio.

MSc. Blanca Samayoa Herrera por la ayuda proporcionada durante la revisión de este estudio.

En especial a FFCR Heidy Azucena Florián Oliveros, por su amistad, apoyo y ayuda incondicional durante el transcurso de mis estudios universitarios y en la realización de esta investigación.

INDICE

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	3
III.	ANTECEDENTES	4
	A. Contexto histórico	4
	B. Estructura y composición de los bacteriófagos	5
	C. Ciclo reproductivo	6
	D. Ciclo lítico y lisogénico	9
	E. Aislamiento y cultivo de bacteriófagos	12
	F. Infección nosocomial	12
	G. Resistencia bacteriana	13
	H. <i>Klebsiella oxytoca</i> , cepa multirresistente	14
	I. Utilidad de los bacteriófagos	16
IV.	JUSTIFICACIÓN	19
V.	OBJETIVOS	20
VI.	HIPÓTESIS	21
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	22
VIII.	RESULTADOS	28
IX.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	30
X.	CONCLUSIONES	32
XI.	RECOMENDACIONES	33
XII.	REFERENCIAS	34
XIII.	ANEXOS	37

I. RESUMEN

Los virus bacterianos, fagos o bacteriófagos son capaces de infectar y lisar las células bacterianas con una alta especificidad que depende de la unión molecular de receptor-inductor. Esta característica fue utilizada durante algún tiempo para clasificar las cepas bacterianas y posteriormente se utilizaron como agentes antibacterianos.

Por ello los objetivos del presente estudio fueron implementar la metodología para el aislamiento y la búsqueda de bacteriófagos específicos de *Klebsiella oxytoca* multirresistente, implicada en varios casos de infección nosocomial en unidades de cuidado crítico pediátrico de un hospital nacional de la Ciudad de Guatemala.

Para lograr los objetivos, se recolectaron aguas de los ríos Villalobos y Las Vacas (Ver Anexo No. 1), los cuales sirven de efluentes de las aguas servidas de la Ciudad Capital. Este tipo de aguas tiene un alto contenido en coliformes y fagos, así mismo se realizaron lavados de superficies en las áreas donde se aislaron las cepas bacterianas.

Por otro lado, con el fin de obtener fagos, se activó el sistema lisogénico de estos, el cual es un ciclo alternativo de los virus para permanecer latente dentro de su hospedero, por medio de la exposición a luz ultravioleta.

Los filtrados de las aguas fueron enfrentados con cepas de *K. oxytoca* multirresistente, utilizando *Escherichia coli* ATCC (American Type Cultivate Collection) 25923 como control para el método de obtención de fagos.

Los resultados demuestran la ausencia de fagos específicos para *K. oxytoca*, pero afirman la presencia de estos para la *E. coli* ATCC 25923. No se pudo llevar a cabo la prueba de especificidad de los bacteriófagos de *K. oxytoca* multirresistente con otras cepas bacterianas, tales como *Pseudomonas aeruginosa* cepa INCAP (Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá), *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 y dos cepas de *K. oxytoca* cepa INCAP.

Así mismo los cultivos efectuados en las aguas de los ríos evidenciaron la presencia de *E. coli*, no obstante en los cultivos derivados de los lavados en superficies de las salas hospitalarias demostraron la presencia de una bacteria Gram positivo y una no fermentadora, sin identificación posterior.

En este estudio no fue posible el aislamiento de bacteriófagos específicos para *K. oxytoca*, pero se demostró que es posible el aislamiento de fagos para cepas

de *E. coli* de ríos de aguas negras. La ausencia de fagos para las dos bacterias utilizadas, en los filtrados provenientes de las salas hospitalarias, posiblemente se deba a que actualmente están en un proceso de remodelación y desinfección, tanto de paredes como de pisos. Por lo que se recomienda que posterior a la identificación de una cepa nosocomial o multirresistente, se proceda inmediatamente al aislamiento de algún agente viral para su control biológico.

II. INTRODUCCION

Los bacteriófagos o virus que infectan bacterias, fueron aislados y observados hace más de un siglo. Estos son capaces de lisar células bacterianas específicas, sin dañar células de otra especie. Esto dio la pauta para pensar que los bacteriófagos podrían ser útiles en la "guerra" constante contra las bacterias que causan patologías humanas; se realizaron varios estudios con respecto a este campo antes de 1940, pero el descubrimiento de los antibióticos como un arma poderosa en contra de las bacterias opacó estos estudios y fueron abandonados (1,2).

En la actualidad, las cepas bacterianas han desarrollado sistemas para desactivar a la mayoría de los antibióticos, en especial las cepas hospitalarias, las cuales son resistentes a la mayoría de ellos, lo que aumenta vertiginosamente la tasa de mortalidad y morbilidad en los hospitales. En Rusia existen técnicas para el aislamiento y purificación de bacteriófagos específicos de cepas nosocomiales o multirresistentes, los cuales son aplicados en superficies, material quirúrgico y heridas operatorias con el fin de eliminar estas bacterias (2).

En Guatemala se desconoce si existen estudios sobre bacteriófagos específicos de cepas multirresistentes hospitalarias, lo que es vital para el desarrollo de la virología, los campos de biología molecular y la implementación de técnicas como las existentes en Rusia, para su utilización en un futuro cercano dentro de las estrategias de control de infecciones nosocomiales (3,4).

En el año 2000 se realizaron estudios epidemiológicos en un brote nosocomial dentro de un hospital de la ciudad capital, aislándose como agente causal *Klebsiella oxytoca* multirresistente. Este estudio pretende comprobar la existencia de bacteriófagos específicos de *Klebsiella oxytoca* multirresistente, (3,5).

III. ANTECEDENTES

A. Contexto histórico

Hankin, en 1896 reportó que las aguas de los ríos Ganges y Jumna en la India tenían un marcado poder antibacteriano el cual atravesaba filtros muy finos de porcelana; y era destruido por el calentamiento. Él estudió particularmente los efectos que tenían estas aguas sobre el *Vibrio cholerae* y sugirió que esta sustancia era la responsable de evitar los brotes epidémicos de cólera por ingestión de las aguas de estos ríos. Las investigaciones hechas por Hankin nunca se centraron en la exploración del fenómeno (1).

Posteriormente Edward Twort en 1915 y Felix d'Herelle en 1917 reportaron independientemente, el aislamiento de un agente filtrable capaz de destruir los cultivos bacterianos y producir pequeñas áreas claras (lisis); concluyéndose que estas partículas estaban involucradas con el fenómeno (2).

Por su parte E. Twort, al estudiar el virus de la vaccinia, observó que algunas colonias de micrococcos presentaban zonas de lisis y que este material, transferido a otras colonias, producía la misma alteración.

Fue d'Herelle quien encontró que el filtrado de las evacuaciones fecales de un paciente convaleciente de disentería bacilar, lisaba los cultivos jóvenes de *Shigella dysenteriae*, fenómeno transmisible en serie. Después de estos descubrimientos, se ha comprobado que los bacteriófagos tienen acción lítica frente a hospederos ampliamente diseminados en el reino bacteriano (3).

A E. Twort y F. d'Herelle se les dan el crédito del descubrimiento de los bacteriófagos. Aunque Twort describió por primera vez el papel esencial de los bacteriófagos en estos fenómenos, fue d'Herelle quien le puso el nombre de bacteriófagos y realizó un estudio más extenso que describe la mayor parte del conocimiento básico que se tiene (1,4).

Las investigaciones realizadas en el campo de los bacteriófagos como agentes líticos de bacterias patógenas, fueron realizados en Rusia y pocos de ellos en el resto del mundo. Con la desintegración de la Unión Soviética y los conflictos socio-políticos de este país, la información existente no fue publicada o adecuadamente archivada, por lo que existe poca documentación sobre este tema, observándose un nuevo interés en el resto del mundo por este tipo de aplicación (1,2).

B. Estructura y composición de los bacteriófagos

1. Morfología

La forma y tamaño de los bacteriófagos varía de una especie a otra, pero al observarlos al microscopio electrónico, todos presentan una estructura básica que puede ser poliédrica o filamentosa. Los virus son partículas que introducen el material genético a sus células hospedero y allí se reproducen. Cada virus posee información genética codificada en ácidos nucleicos (ARN o ADN) que determina todas las propiedades del virus. Este ácido nucleico está rodeado por una cubierta proteica llamada nucleocápside, formada por subunidades llamadas capsómeros, además la nucleocápside puede poseer una envoltura lipoprotéica. Estas proteínas confieren especificidad al virus y le proporcionan la morfología característica (1,5).

Los virus bacterianos presentan seis tipos morfológicos: el primer tipo es el más complejo ya que tiene una cabeza poliédrica, cola rígida con una vaina contráctil y fibras caudales. Los segundos son similares a los anteriores, excepto que carecen de una vaina contráctil, su cola es flexible y tienen o no apéndices terminales. El tercer tipo se caracteriza por tener cabeza poliédrica y cola más corta que la cabeza, su cola no es contráctil y puede o no tener apéndices. El cuarto tipo posee una morfología poliédrica con un capsómero grande en cada vértice, no tiene cola. El quinto tipo es un poliedro simple, sin los grandes capsómeros del grupo anterior. Y los más simples, el sexto tipo, son un filamento sencillo y largo sin cabeza u otra estructura (3).

Los bacteriófagos específicos de *Klebsiella oxytoca*, poseen una morfología de primer tipo, es decir los más complejos, los cuales están provistos de una cola que varía en cuanto a tamaño, forma y complejidad. Puede poseer a su vez varios apéndices, fibras o estructuras terminales. Todas estas estructuras confieren especificidad al bacteriófago para infectarla (4,5).

2. Composición química

Los fagos están compuestos por un solo tipo de ácido nucleico y nunca por ambos. Según el tipo de ácido nucleico que contenga se les denomina fagos ADN o ARN. Los fagos de *K. oxytoca* son de tipo ADN, es decir que en su estructura este es el único material genético presente. Estos poseen una cubierta protéica que protege el material genético. También contienen enzimas, que son utilizadas en los procesos de reproducción y transducción. El ácido nucleico del fago contiene información necesaria para la reproducción de éste en la bacteria hospedera (2,6).

El ADN de los bacteriófagos es bicatenario y tiene forma lineal, pero no es infrecuente observar la aparición de formas circulares durante su replicación. Mientras que en bacteriófagos ARN este es monoténico y lineal. A pesar de ser monoténico, presenta una estructura secundaria que da a las moléculas una forma bastante compacta, lo que se refleja en su alto coeficiente de sedimentación. La estructura secundaria de estas moléculas monoténicas se debe a la existencia de regiones complementarias, presentes en el mismo polinucleótido, capaces de aparearse por medio de puentes de hidrógeno (2,5).

C. Ciclo reproductivo

La reproducción de los bacteriófagos se realiza dentro de las células bacterianas. Estos infectan un tipo de célula específica y no pueden atacar a otras más complejas como las vegetales, humanas o animales; debido a las diferencias en los códigos de la maquinaria intracelular y las proteínas de superficie. Es decir que los bacteriófagos de *K. oxytoca*, son capaces de lisar a estas, o a bacterias pertenecientes al mismo género (7).

Los bacteriófagos presentan los siguientes pasos para su reproducción:

- Adsorción
- Inyección
- Período de latencia y eclipse
- Maduración o ensamblaje
- Lisis

La adsorción se lleva a cabo cuando la punta de la cola viral se adhiere a la pared bacteriana de la bacteria hospedero. Aunque aún no está claro, se ha sugerido que la adsorción se debe a la interacción entre las configuraciones moleculares complementarias en los sitios receptores oponentes. Esto ocurre porque el hospedero lleva una carga eléctrica negativa y el medio contiene cierta concentración de cationes, para que el fago y la célula se aproximen lo suficiente para que ocurra la adsorción a la superficie del hospedero a través de proteínas, polisacáridos o complejos lipoproteína-polisacáridos los cuales constituyen los elementos donde se adhieren las partículas virales. En ausencia del sitio receptor, los virus no pueden ser adsorbidos y, en consecuencia no pueden infectar la célula. Si el sitio receptor se modifica, el hospedero puede volverse resistente a la infección viral, pero también pueden aparecer mutantes del virus que sean capaces de ser adsorbidos por hospedero resistentes (5,6).

El fago una vez adsorbido a la célula bacteriana, introduce en ella el material genético que transporta la información necesaria para la síntesis de su progenie; este mecanismo se denomina inyección y depende de la naturaleza de la célula hospedero, especialmente de las estructuras de su superficie, aunque básicamente los pasos de la inyección son los siguientes:

- 1) Adhesión de fibras caudales a la membrana celular.
- 2) La vaina de la cola se contrae y la porción hueca interior de la cola penetra en la célula, esto se logra por la presencia de una lisozima en la cola viral que hidroliza la capa rígida de la pared bacteriana.
- 3) La inyección de ADN se hace como lo haría una "jeringa al inyectar".

En esta etapa puede existir un mecanismo de resistencia contra el bacteriófago, este consiste en la destrucción del ácido nucléico viral por las enzimas del hospedero, fragmentando el ADN viral en uno o varios sitios específicos, evitando de esta forma su replicación. Este fenómeno se llama "restricción" y es parte de un mecanismo general del hospedero para evitar la invasión por ácido nucléico extraño. Pero los virus pueden superar los mecanismos de restricción del hospedero modificando sus ácidos nucleicos de modo que los sitios de restricción no sean reconocidos por las enzimas (6).

Si no existe ningún mecanismo de resistencia contra el virus se da el período latente, o sea el intervalo de tiempo comprendido entre la adsorción irreversible y la aparición de las primeras partículas infecciosas extracelulares, para el cual el ácido nucléico del fago debe desencadenar una secuencia de eventos, que producirán finalmente las partículas infecciosas de la progenie. Durante este período en que el fago no es infeccioso se denomina fago vegetativo, y el lapso, durante el cual no se encuentran partículas infecciosas en el interior de la célula, se denomina período de eclipse. Durante este periodo el ácido nucléico del fago induce la síntesis de los componentes virales que formarán los fagos infecciosos. La secuencia y los mecanismos de estos eventos constituyen uno de los aspectos más fascinantes de la biología molecular (8,9).

Durante la biosíntesis de los componentes virales, la célula infectada sirve de fuente de energía, proveyéndole la mayoría de los precursores y la maquinaria necesaria para la síntesis de las macromoléculas virales. La formación de estas macromoléculas requiere ciertos cambios en la biosíntesis normalmente destinada a la formación de los componentes celulares. Tales cambios se producen por la inducción de nuevas enzimas o de elementos estructurales que actúan en sitios claves del sistema (2).

La estructura viral está compuesta por proteínas ausentes en la bacteria infectada, las cuales son sintetizadas a partir de aminoácidos presentes en la bacteria. Este hecho fue mencionado ya en relación con la ausencia de antígenos comunes al fago y a la bacteria hospedero (1).

Las distintas proteínas inducidas por el fago no se sintetizan en forma simultánea, ni en cantidades equimolares; hay un eficiente mecanismo de regulación, tanto en la secuencia del tiempo, como en la cantidad en que se sintetizan diversas clases de proteínas (8).

La biosíntesis del ácido nucléico viral requiere una fuente de energía, así como precursores de bajo peso molecular, ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos para ARN o ADN, respectivamente, y la maquinaria sintetizadora. Experimentos de diversa índole han establecido que el fago depende de la bacteria hospedera en cuanto a suministro de biomoléculas requeridas para la síntesis de polinucleótidos. Cualquier mutante de una bacteria que requiera algún nucleósido será incapaz de sintetizar el ácido nucléico viral, a menos que el nucleósido sea suministrado a la bacteria infectada. Algunos fagos que contienen bases raras como el T4, son sin embargo, capaces de inducir las enzimas necesarias para la síntesis de ellas. El fago T4 induce una hidroximetilasa dCMP (desoxicitidina monofosfato) que hidroliza el dCMP normalmente encontrado en la bacteria para dar el dHCMP (desoxihidrocitidina monofosfato) que posteriormente se incorporará a su ADN (8).

La síntesis del ácido nucléico consiste en la formación de polinucleótidos con una secuencia determinada. Los precursores inmediatos del ácido nucléico son los nucleósidos 5-trifosfato que son hidrolizados durante la formación del polinucleótido, liberando pirofosfato. La secuencia en que los nucleótidos se unen es especificada por el ácido nucléico viral, que actúa como hebra molde. Las enzimas que catalizan este proceso han sido identificadas en algunas especies de fagos. La síntesis del ácido nucléico viral no termina con la polimerización, sino que muchas veces se requiere la acción de otras enzimas para producir un ácido nucléico idéntico al del bacteriófago. Por ejemplo, el ADN de los fagos T2 y T4 deben ser flucosilados y metilados (8,9).

Durante el período latente se producen múltiples copias de ácido nucléico y de proteína viral, formándose en el interior de las células varios compartimentos de los distintos precursores del fago. La maduración consiste en el ensamblaje específico de estos componentes, sintetizados por separado para producir finalmente fagos infecciosos (7-9).

Durante el proceso de maduración los distintos componentes del fago que serán ensamblados, se toman de los varios compartimentos existentes para cada componente, sin otro requerimiento aparente que el poseer la estructura que le corresponde. Uno de los fenómenos que condujo a estas apreciaciones es el llamado mezcla fenotípica, que se puede observar al infectar una misma bacteria con dos mutantes de T4, distintos en cuanto a la especificidad de su hospedero. Al analizar la progenie resultante de la infección, se puede observar, además de fagos idénticos a los infectantes, otros que contienen genotipos de un mutante y fenotipo de otro; estos fagos poseen ADN de un mutante, pero las fibras de la cola tienen la especificidad para el otro hospedero (9).

El ensamblaje parece ser un proceso espontáneo, durante el cual los distintos componentes estructurales del fago se unen mediante enlaces no covalentes y en una secuencia ordenada. Con algunos fagos estructuralmente simples que contienen ARN, ha sido posible lograr su ensamblaje *in vitro* mezclando el ARN con las proteínas estructurales en condiciones apropiadas. Pero es más difícil que este proceso se lleve a cabo espontáneamente en fagos de estructuras complejas, donde deben ocurrir más de 30 ensamblajes, en perfecto orden, por lo que aún no se descarta la participación de algunas enzimas (9).

El período latente (ciclo lisogénico) termina con la lisis de las bacterias y la liberación de los nuevos fagos (ciclo lítico). En varios fagos se ha demostrado la acción de una enzima, capaz de desintegrar la pared rígida de las bacterias y provocar de esta forma la lisis. En el caso de los bacteriófagos de *K. oxytoca*, estos presentan estas enzimas, con lo que destruyen la pared bacteriana y liberan los fagos al entorno, para infectar nuevas bacterias. Estas enzimas, similares a la lisozima en su acción sobre el mucopéptido de la pared, se llaman lisinas. La lisis no es, sin embargo, concomitante con la aparición de esta enzima, sino que parece estar controlada por un sistema complejo, dependiente del estado fisiológico de la célula. Así, por ejemplo el bloqueo de la producción de energía o ATP en las células infectadas y el apareamiento de las lisinas, inducen una lisis prematura (8).

D. Ciclo lítico y ciclo lisogénico

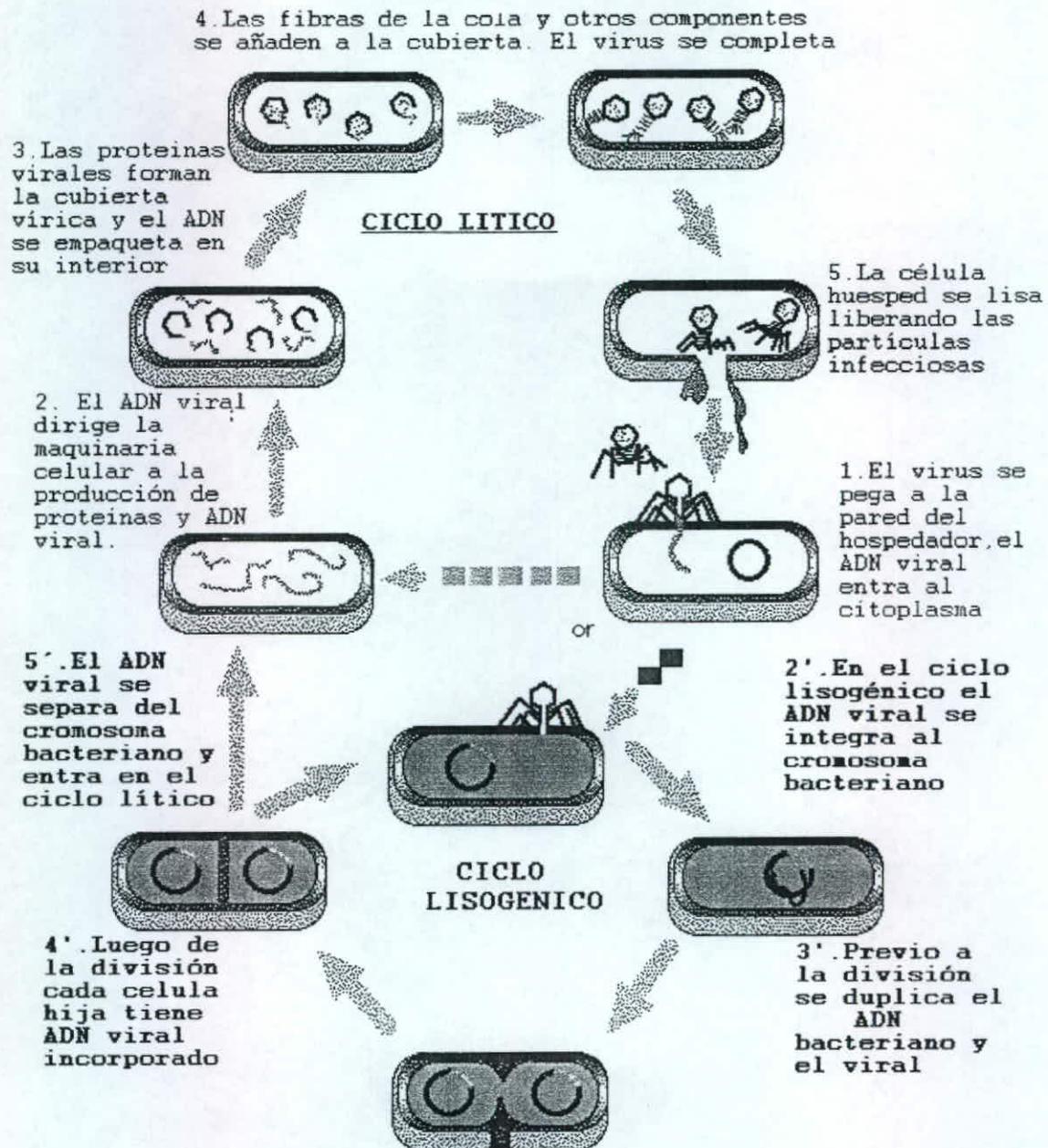
El anterior ciclo de reproducción corresponde al que se observa normalmente en los fagos que se multiplican en una bacteria sensible. Sin embargo, algunos fagos llamados fagos "temperados", no siempre se replican por esta vía sino que, en ciertas ocasiones, establecen una simbiosis de tipo molecular. Al infectar una bacteria sensible con estos fagos, su ácido nucléico puede, en vez de iniciar un ciclo lítico, duplicarse en sincronía con el cromosoma bacteriano, sólo una vez cada

división celular. El cromosoma viral en este estado se llama profago, y las células que lo contienen, bacterias lisogénicas. El profago puede espontáneamente, o por inducción con diversos agentes tales como luz ultravioleta, ciertos compuestos o condiciones, iniciar el ciclo lítico con la consiguiente reproducción de partículas infecciosas y la lisis celular. La frecuencia con que esto ocurre en forma espontánea, o sea, la fracción de las células que se lisan en cada generación bacteriana varía de 10^{-3} a 10^{-6} . Debido a la ocurrencia de estos ciclos líticos, los cultivos de bacterias lisogénicas contienen fagos maduros que pueden provocar la lisis de otras bacterias sensibles; las bacterias lisogénicas pueden multiplicarse normalmente en presencia de este fago debido a que el profago les confiere inmunidad (9).

Después de la infección con un fago temperado, algunas bacterias son sujeto de un ciclo lítico y otras del lisogénico (Ver Tabla N°.1). La elección entre ambos implica una competencia entre dos secuencias de eventos biosintéticos, que incluye un represor presente en los genes del profago, uno que conduce a la inmunidad y el otro hacia la duplicación del fago. Si la inmunidad se establece antes de una etapa irrevocable del ciclo lítico, este es bloqueado y la célula da una respuesta lisogénica; como resultado de esta inmunidad, las células son resistentes a una nueva infección con el mismo fago. Por esta razón, al titular ciertos fagos en agar con bacterias sensibles, las placas de lisis aparecen turbias debido a la aparición de proliferación de bacterias lisogénicas inmunes. Las bases genéticas de la decisión entre ambos ciclos han sido estudiadas aislando mutantes incapaces de provocar una repuesta lisogénica, los que se pueden reconocer fácilmente por formar placas de lisis claras debido a su incapacidad de generar bacterias lisogénicas inmunes (9).

Por otra parte, los cultivos de bacterias lisogénicas contienen cierta cantidad de fagos maduros; su presencia se debe a la lisis ocasional de algunas células que espontáneamente, generan un ciclo lítico. El ciclo lítico puede ser inducido por medio de tratamientos diversos, pero que tienen en común afectar la síntesis o reparación del ADN. El fenómeno que consiste en el paso del estado de profago al ciclo lítico se llama inducción. En algunos casos este proceso se puede iniciar espontáneamente por causas genéticas accidentales o bien puede ser provocado artificialmente; el uso más frecuente consiste en la irradiación con luz ultravioleta, a cultivos de bacterias lisogénicas, que puede aumentar el número de las células que generan un ciclo lítico hasta un 100 por ciento. Como la luz ultravioleta no activa al represor, la inducción parece deberse a un cambio en la actividad del profago, producido por la acumulación de algún precursor del ADN o por la aparición de un inductor (2).

TABLA No.1 ESQUEMA DEL CICLO LÍTICO Y LISOGÉNICO



Tomado y adaptado de: www.Bacteriofages.htm.edu

E. Aislamiento y cultivo de bacteriófagos

Los bacteriófagos se cultivan y aíslan con facilidad en cultivos jóvenes de bacterias en desarrollo activo, en caldo o en placas de agar. En los cultivos líquidos, la lisis de las bacterias causa desde enturbiamiento hasta la aclaración del cultivo, mientras que en las placas de agar, las zonas claras son visibles a simple vista (4, 10).

La mejor fuente para recolectar bacteriófagos y la más usual, es el hábitat del hospedero. Por ejemplo en el presente estudio los fagos patógenos de *Klebsiella oxytoca* multirresistente, se pueden aislar con un mayor grado de éxito en aguas provenientes del drenaje, aguas de ríos utilizados como vertederos de desechos orgánicos o bien de superficies del mismo lugar donde fueron aisladas las bacterias.

Se ha reportado que *K. oxytoca* está difundida ampliamente en la naturaleza, se ha aislado en las vías respiratorias superiores y del tracto gastrointestinal de vertebrados, por lo que se ha utilizado como un indicador de contaminación fecal en aguas (4,10,11).

Las aguas de desechos poseen un alto contenido de bacteriófagos y coliformes, entre estas se encuentran *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, y *Citrobacter sp.*, permitiendo su utilización como control positivo para la búsqueda de bacteriófagos, en los filtrados de drenajes (4,12,13).

Los lavados de superficies se realizan limpiando el área de un metro cuadrado con una esponja que contenga agua estéril y se recolecta en un recipiente adecuado. Posteriormente se filtran las aguas provenientes del drenaje o del lavado de superficies, con filtros de nitrocelulosa de 0.45 micras, los cuales retienen todas las bacterias, pero dejan pasar los virus (4, 10).

El método estandarizado para el aislamiento de bacteriófagos ha sugerido el volumen de 20 microlitros del material filtrado, el cual se deposita en una capa de agar nutritivo enriquecido con cloruro de sodio o cloruro de magnesio con el objetivo de evitar la repulsión electrostática entre el bacteriófago y sus receptores en la célula hospedero. El medio debe estar previamente inoculado con una población de bacterias en división activa. Posterior a la incubación se observará zonas de lisis sobre la película opaca del crecimiento bacteriano. Esta zona de lisis recibe el nombre de placa lítica, puesto que estas placas son resultado de la infección de una partícula fágica se podrá determinar el número de unidades formadoras de placas por mililitro de suspensión (UFP/ml) mediante el recuento de dichas placas de lisis. El crecimiento bacteriano cesa sobre la placa como resultado del agotamiento de los nutrientes y la acumulación de productos tóxicos (10)

F. Infección nosocomial

La infección nosocomial se define como la infección que adquiere un paciente durante su hospitalización, que no se padecía previamente ni se estaba incubando al momento de la admisión (14,15). Así mismo, los signos, síntomas y cultivo son positivos después de las primeras 48-72 horas de su admisión. Por otro lado, si el período de incubación se desconoce, se toma como si la infección fuera nosocomial cuando se desarrolla en cualquier momento después de la admisión (16,17). O bien, si se padece de cualquier infección al momento de la admisión, ésta se puede considerar como una infección nosocomial si esta está relacionada a una admisión previa.

En un paciente con infección documentada con cultivo positivo, hay dos situaciones que deben considerarse cuando se trata de infecciones nosocomiales:

- 1) La aparición de una infección clínica en otro sitio diferente, con el mismo tipo de bacteria de una infección original, se considera como infección secundaria y probablemente una autoinfección (17).
- 2) Por el contrario, la aparición de un cultivo con nuevos microorganismos en un sitio que ha tenido otra bacteria, se debe considerar una infección nosocomial nueva, especialmente si hay deterioro clínico de las condiciones del paciente (17).

Hay que considerar que los brotes nosocomiales pueden presentarse en diferentes salas de los hospital, especialmente en las consideradas de alto riesgo, cuidados intensivos, pediatría y en general en aquellas unidades donde el uso de antibióticos no está regulado; generalmente las bacterias nosocomiales presentan patrones de multirresistencia a antibióticos, esto es resistencia a más de cuatro antibióticos específicos (16).

G. Resistencia bacteriana

Las drogas antimicrobianas se han venido utilizando por varios siglos. Entre las primeras terapias se encuentra el uso de las plantas como antihelmínticos y antibacterianos. Posteriormente la hexamina fue utilizada para el tratamiento de infecciones urinarias y la arsphenamina para sífilis, las cuales fueron desarrolladas a finales del siglo XIX y principio del siglo XX respectivamente. Varias drogas antiparasitarias aparecieron en el período entre las dos guerras mundiales, principalmente como resultado de los esfuerzos de la industria alemana que poseía los conocimientos más avanzados en farmacología. Sin embargo las drogas

realmente efectivas para el tratamiento de infecciones bacterianas han estado disponibles solamente en los últimos sesenta años (18).

Desde que se inició el uso de los antibióticos, la resistencia a estos agentes se anticipó como un problema potencial, debido al descubrimiento de microorganismos capaces de producir una enzima que destruía la penicilina (18,19).

Actualmente la resistencia a los antimicrobianos se ha convertido en un serio problema de salud pública a nivel mundial. Entre las cepas multirresistentes más frecuentes se encuentran las de *Vibrio sp.*, *Enterococcus sp.*, bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus sp.* entre otras. Esta situación se agrava por la falta de nuevos productos farmacéuticos que reemplacen a los que han perdido su eficacia. También es un factor contribuyente la actual tendencia a la globalización que propicia la transición de un país a otro de microorganismos patógenos resistentes por viajeros infectados. A todo esto se aúna la falta de un sistema general de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos que genere información para la toma de decisiones y la elaboración de políticas, tanto terapéuticas como reguladoras (16).

En los países subdesarrollados, el apareamiento de bacterias multirresistentes se puede atribuir a la prescripción arbitraria de los antibióticos, incluyéndose su uso innecesario y automedicación, lo cual produce un efecto socioeconómico severo en estos países por carecer de investigación, manufactura, distribución y uso racional de las drogas que se utilizan en los países industrializados, aunque la resistencia a los antibióticos es un fenómeno mundial (16,17). Por lo que es importante que se fomente y fortalezca la vigilancia de resistencia bacteriana a antibióticos, con el fin de conocer y anticipar las tendencias de las resistencias, y de esta manera tomar acciones que permitan un manejo más adecuado de este problema (17,20,21).

H. *Klebsiella oxytoca*, cepa multirresistente

Con el objetivo de identificar patrones de similitud entre las cepas bacterianas aisladas de pacientes pediátricos con aislados bacterianos provenientes de superficies, manos de personal de salud y equipo de terapia respiratoria, se realizó un muestreo de enero a abril del año 2000, en dos salas de alto riesgo de un hospital nacional de la ciudad capital de Guatemala. Durante este período se aislaron 77 cepas bacterianas, siendo las más frecuentes *Klebsiella sp.* (25/77, 32.47%), *Staphylococcus sp.* (14/77, 18.18%) y *Acinetobacter sp.* (12/77, 15.58%). De las cepas de *Klebsiella sp.* se aislaron 16 de cultivos orotraqueales y coprocultivos, mientras que 6 se aislaron de manos del personal de salud, 3 de superficies y

ninguna del equipo de terapia respiratoria. Las características de la *Klebsiella sp.* revelaron un patrón de multirresistencia similar al objeto del presente estudio, una identificación preliminar las consideró como *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozanae*, y *Klebsiella sp.*, todas con un patrón de multirresistencia similar (Tabla No. 1) (22,23).

Las cepas provenientes de la anterior investigación fueron conservadas en agar stock, recubiertas con aceite mineral estéril y almacenadas a temperatura ambiente. De estos tubos se seleccionaron diez de los que fueron clasificados preliminarmente como *Klebsiella* multirresistente para una posterior identificación y análisis del patrón de resistencia. De estas se identificaron cuatro como *Klebsiella oxytoca* con un patrón de sensibilidad antibiótica similar (Tabla No.1), el resto no fue posible identificarlas por presentar contaminación, desecación y muerte bacteriana, etc.

Tabla No.1
Patrón de resistencia antibiótica de las cepas de *Klebsiella oxytoca* aisladas de Enero a Abril de 2000

Antibiótico (§)	Halo de Inhibición (mm) X ± 1 DS	Interpretación
Aml	6	Resistente
Atm	6	Resistente
Tic	6	Resistente
K	6	Resistente
Sxt	6	Resistente
Tob	6	Resistente
Caz	8 ± 2	Resistente
Prl	9 ± 1	Resistente
An	11 ± 3	Resistente
F/M	20 ± 1	Susceptible
Fep	22 ± 2	Susceptible
Ipm	29 ± 1	Susceptible
Nor	35 ± 2	Susceptible

(§) Aml: Ampicilina, Atm: Aztreonam, Tic: Ticarcilina, K: Kanamicina, Sxt: Trimetoprim/sulfametoxazole, Tob: Tobramicina, Caz: Ceftazidima, Prl: Piperacilina, An: Amikacina, F/M: Nitrofuratoína, Fep: Cefepime, Ipm: Imipenem, Nor: Norfloxacin.

X: Promedio.

DS: Desviación estándar.

I. Utilidad de los bacteriófagos en las infecciones multirresistente

1. Fagotipificación de cepas bacterianas

El fagotipificado, es en comparación con los métodos convencionales, un procedimiento útil, sencillo y barato para la identificación de cepas bacterianas dentro de una misma especie, permitiendo la identificación a nivel de especie, subespecie e incluso cepa. Se basa en el hecho de que los fagos, al reproducirse de forma continua en una misma cepa hospedero, llegan a modificarse genéticamente, adaptarse y especializarse para dicha cepa (5,10,24).

Dentro de la metodología para el fagotipificado se requiere, en primer lugar, de una siembra de la cepa bacteriana desconocida sobre la superficie de un medio sólido de agar. Posteriormente, se debe aplicar la suspensión del fago específico, sobre la superficie del agar. Tras la incubación a temperaturas apropiadas, se observará la aparición de zonas claras o conocidas como "placas de lisis" en aquellas áreas donde la infección fágica haya ocurrido, esto permite identificar aquellos fagos para los que la cepa bacteriana es un hospedero susceptible. Este procedimiento se ha aplicado eficientemente en estudios epidemiológicos, cuando se precisa determinar el agente causal de una enfermedad, su origen o sus portadores; siendo útil también, en la identificación de brotes de infecciones nosocomiales, haciendo más rápida y efectiva la identificación bacteriana. También ha sido utilizado para la identificación de cepas multirresistentes, así como de cepas de interés industrial, cepas indicadoras de contaminación fecal, cepas patógenas, etc. Se ha empleado de forma rutinaria en varios países para la identificación de *Listeria sp.*, *Brucella sp.*, *Mycobacterium sp.*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus sp.*, entre otras (5,10,24).

El que un fago se pueda multiplicar en una cepa específica depende, en principio, de tres factores: en primer lugar, que la bacteria hospedero posea el receptor de superficie que interacciona específicamente con el fago, ya que esta estructura posee un papel fundamental en la virulencia del fago sobre la bacteria, entre estas estructuras se pueden citar la cápsula, adhesinas, pili, lipopolisacáridos, etc.; en segundo lugar, que los sistemas enzimáticos de restricción bacterianos puedan degradar el ADN extraño del fago, y en tercer lugar, la presencia previa de un fago lisogénico, debido a que normalmente una bacteria lisogenizada mantiene integrado en su genoma un fago (profago) el cual le proporciona inmunidad a la reinfección o a la infección por otro tipo de fago (24).

2. Fagoterapia

La aplicación de la terapia fágica fue iniciada en 1921 por Bruynoghe y Maisin en el tratamiento de enfermedades de la piel causadas por estafilococos. Sin embargo, el grado de interés por esta terapia fue disminuido sustancialmente por el apareamiento de las sulfonamidas y otros antibióticos. La investigación de los bacteriófagos fue retomado con el surgimiento de bacterias resistentes a la quimioterapéutica durante los años 40. Este problema no solo se dio en estafilococos antibiótico-resistente, sino también en bacterias Gram negativo como: *Pseudomonas sp.*, *Klebsiella sp.*, *Escherichia sp.*, *Proteus sp.* y otros tipos inusuales de bacterias (5,24).

Actualmente se cree que la terapia fágica utilizada a mediados del siglo pasado no fue apropiada, debido a que en esa época no se contaba con el conocimiento suficiente y apropiado, pero es conveniente considerar algunos detalles por los cuales la terapia fágica fracasó:

- El escaso conocimiento de la ecología heterogénea de ambos organismos, a saber: la bacteria y el fago.
- La falla en la selección de fagos más virulentos para las bacterias en el tratamiento de pacientes infectados.
- La utilización de un solo bacteriófago para infecciones mixtas.
- El surgimiento de bacterias resistentes a los fagos. Estas pueden emerger por la selección de mutantes resistentes (esto ocurre sí se usa un solo fago muchas veces en una bacteria en particular) o lisogenización.
- Inadecuada caracterización del fago o titulaciones inexactas de la suspensión fágica, observándose que muchas de estas eran totalmente inactivas.
- Inadecuada neutralización del pH gástrico cuando se administraba por vía oral.
- Identificación errónea del patógeno involucrado, lo que es indispensable para un tratamiento fágico efectivo (5,10,24).

El rápido desarrollo en el campo de la biología molecular, ha incrementado el conocimiento de la biología viral y fágica, lo cual potencializa y facilita los procesos de selección para la terapia fágica, siendo sus ventajas:

- Los fagos son más específicos en sus objetivos que los antibióticos, causando menor daño a la microbiota normal, reduciendo el porcentaje de infecciones secundarias, que normalmente generan bacterias resistentes a los antibióticos.

- Los fagos pueden tener como objetivo alguno de los receptores de superficie de la bacteria involucrado en el proceso patológico, reduciendo así la virulencia bacteriana.
- En comparación con la terapia antibiótica, no se han reportado al momento ningún efecto secundario en la terapia fágica.
- La fagoterapia puede ser particularmente adecuada en personas alérgicas a los antibióticos o sus derivados.
- La selección apropiada de los fagos es fácil y puede ser utilizada con fines profilácticos, ayudando a prevenir las infecciones bacterianas en personas o animales que están expuestos a estas o en la desinfección de áreas hospitalarias, lo que ayuda a disminuir de manera significativa el número de infecciones nosocomiales y aparición de cepas multirresistentes.
- La aplicación de soluciones con fagos para la desinfección hospitalaria o en el tratamiento de infecciones externas, pueden prepararse de una forma sencilla, económica y localmente.
- Los fagos pueden ser utilizados independientemente o en combinación con antibióticos, ayudando a reducir el desarrollo de bacterias resistentes.
- En el tratamiento de heridas infectadas, los fagos se multiplican y alcanzan las bacterias más profundas (5,10,24).

IV. JUSTIFICACIÓN

En Guatemala no se han realizado estudios para el aislamiento de bacteriófagos específicos de cepas nosocomiales, por lo que es vital realizar estudios para la implementación de técnicas de aislamiento viral que son instrumentos básicos en la comprensión de muchos procesos en el campo de biología molecular.

Como fundamento, los fagos son virus capaces de infectar células bacterianas, destruyéndolas y generando una nueva progenie de fagos con las mismas características. Estos virus son muy específicos con su hospedero, por lo que cada fago es capaz de infectar solamente a un tipo de bacteria o grupo de bacterias con características muy similares, sin atacar células humanas o animales.

Este estudio podrá demostrar la existencia de fagos específicos para *Klebsiella oxytoca* multirresistente, relacionando por tanto a los virus como agentes capaces de destruir cepas multirresistentes autóctonas, con lo cual se abrirá el campo al estudio de lisis de cepas multirresistentes por medio de fagos.

V. OBJETIVOS

GENERAL

- Comprobar la existencia de bacteriófagos específicos de *Klebsiella oxytoca* multirresistente.

ESPECÍFICOS

- Implementar las técnicas para el aislamiento de bacteriófagos en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Aislar bacteriófagos de aguas servidas y lavados de superficies de salas hospitalarias, específicos para *Klebsiella oxytoca* multirresistente.

VI. HIPÓTESIS

El presente es un estudio de tipo explorativo, con muestreo a conveniencia, no aleatorio, por lo cual no requiere hipótesis.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo: Cepas multirresistentes aisladas en unidades de cuidado crítico pediátrico de un hospital nacional de la ciudad de Guatemala.

B. Muestra: 4 cepas de *Klebsiella oxytoca* multirresistentes (cuatro o más antibióticos), de un hospital de la ciudad capital de Guatemala, aislados en unidades de cuidado crítico pediátrico, durante el período de enero a abril de 2000.

C. Cepa Control: Se utilizó una cepa de *Escherichia coli* ATCC 25923, como indicador de presencia de bacteriófagos, por ser descritos como abundantes en aguas contaminadas.

D. Cepas Control para Especificación: Se utilizaron dos cepas de *Klebsiella oxytoca* tipificadas en INCAP, una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 y una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* tipificada en INCAP, para comprobar, si fuese aislado, la especificidad del bacteriófago de cepas de *Klebsiella oxytoca* multirresistente.

E. Recurso Humanos:

1. Humanos

Investigador: Br. Juan Ernesto Vossberg Ordoñez

Asesor: Dr. Mario González

2. Instituciones

Universidad de San Carlos de Guatemala

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Escuela de Química Biológica

Departamento de Bioquímica

F. Materiales

1. Material Biológico

- 1 muestra de 100 ml de aguas negras del drenaje del Río de las Vacas (Zona 5).
- 1 muestra de 100 ml de aguas negras del drenaje del Río Villalobos (Zona 12).
- 4 muestras de 100 ml de lavados de superficies de dos salas de unidad de cuidado crítico de pediatría (suelos, paredes y áreas cercanas a las cunas de los pacientes).

- 4 cepas de *Klebsiella oxytoca* multirresistente aisladas en un hospital de la ciudad capital de Guatemala, en unidades de cuidado crítico pediátrico.
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Klebsiella oxytoca* (Tipificada por INCAP, Guatemala)
- *Pseudomonas aeruginosa* (Tipificada por INCAP, Guatemala)

2. Equipo y cristalería

- Mechero
- Autoclave
- Pipetas estériles de 10 ml
- Pipetas estériles de 1 ml
- Cajas de petri de vidrio
- Membranas de filtración de 45 μm Millex®-GS (Millipore, Bedford, MA)
- Membranas de filtración de 45 μm Millex®-HS (Millipore, Bedford, MA)
- Jeringas de 10 ml con Luer.
- Beaker de 250 ml
- Beaker de 500 ml
- Erlenmeyer de 250 ml
- Erlenmeyer de 500 ml
- Varilla de vidrio
- Lupa
- Incubadora a 37 °C
- Embudos de vidrio
- Unidad de filtración para membranas de 45 μm
- Bomba de vacío
- Crayón graso
- Tapones de tela para erlenmeyer
- Reloj cronómetro
- Tubos de ensayo 12 x 100 mm
- Soporte universal
- Tripié
- Rejilla de asbesto
- Centrífuga de mesa (6000rpm)
- Papel indicador de pH, rango 1-14
- Asa de nicromo
- Vortex

medio del método Microscan Walkaway 96® (Dade Behring/ Merck KGaA, Darmstadt, Alemania); estas cepas fueron aisladas de dos hisopados de superficies y dos de coprocultivos.

Posteriormente, se confirmó la susceptibilidad antibiótica a estas cepas por medio del método Kirby-Bauer, presentando el patrón descrito en la Tabla No.1. Se sembraron tres veces más con el objetivo de llevarlas todas al mismo estado dentro del ciclo celular, para su posterior utilización en la búsqueda fágica.

2. Obtención y purificación de bacteriófagos

a. Muestreo y procesamiento de aguas negras y lavado de superficies hospitalarias

Para la búsqueda de fagos, se tomó una muestra de 100 ml de agua del Río Villalobos (Zona 12) y otra similar del Río de Las Vacas (Zona 5) (Ver Anexo1), que son vertederos de aguas servidas de la ciudad capital de Guatemala. Adicionalmente se realizaron 4 lavados de superficies de las salas hospitalarias de cuidado crítico pediátrico donde anteriormente se habían obtenido las cepas multirresistentes, por medio de recipientes estériles conteniendo 200 ml de agua, con un intervalo de una semana entre cada muestra. Las muestras de agua fueron trasladadas al Laboratorio de Bioquímica para su procesamiento. Cada muestra de agua se filtró en un recipiente estéril, a través de un sistema de filtración de membrana de nitrocelulosa de 45 µm de poro (Millex-HS) con presión negativa.

b. Procedimiento para detección de bacteriófagos (Método de Goteo)

Preparar un cultivo en fase de crecimiento exponencial de cada una de las cepas de *Klebsiella oxytoca* multirresistente y de la cepa control de *E. coli* ATCC 25923 en caldo de tripticasa soya. Incubar por 4 horas a 37°C. Comparar la turbidez del medio contra el estándar de MacFarland 0.5. Sembrar cada cepa en una caja de agar tripticasa soya. Agregar 10 alícuotas de 25 microlitros del filtrado (Método de Goteo) de las aguas en la superficie del agar. Incubar por 24 horas a 37°C. Realizar el mismo procedimiento para las cepas de *K. oxytoca* y de *E. coli* sin agregar el filtrado, este será el control negativo. Observar el apareamiento de placas de lisis, como zonas claras dentro del cultivo bacteriano, indicando que el bacteriófago presenta ciclo lítico.

c. Purificación de fagos a partir de cultivos bacterianos

Remover las placas de lisis presente en los cultivos de *Klebsiella oxytoca*, a través del corte del agar. Disolver el corte de agar en 5 ml agua tibia estéril (45°C). Filtrar por medio de jeringa a través de una membrana de 45µm Millex-GS de poro. Inocular el filtrado en cajas de cultivo de *K. oxytoca* multirresistente, cepas control ATCC y cepas tipificadas por el INCAP. Incubar por 24 horas a 37°C.

Interpretar los resultados de la manera siguiente: la presencia de placas de lisis en cualquiera de las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, o en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella oxytoca* tipificadas en el INCAP, indica la presencia de un fago no específico para *K. oxytoca* multirresistente. Si no existe lisis en las otras cepas pero sí en la cepa de *K. oxytoca* multirresistente, es un bacteriófago específico para esta cepa.

Cortar las placas de lisis presentes en los cultivos de *K. oxytoca* multirresistente y colocarlas estérilmente en una botella con cloroformo. Homogenizar por agitación vigorosa en vortex por 3 minutos y colocar en tubos estériles. Centrifugar a 5000 r.p.m. por 10 minutos. Recoger el sobrenadante y guardar estérilmente a -20°C.

3. Preparación de medios de cultivo

a. Agar tripticasa soya

Pesar 40 gramos de agar tripticasa soya, 0.1 gramos de cloruro de sodio y 0.1 gramos de cloruro de magnesio. Disolver en 1 litro de agua destilada a temperatura ambiente. Calentar hasta ebullición y posteriormente colocar en el autoclave por 15 minutos a 121°C, 15 psi. Comprobar que no se haya quemado el medio, o desemulsificado. Medir el pH, este debe mantenerse en el rango de pH 7.0-7.1. Vertir el agar en cajas de petri estériles. Almacenar en bolsa plástica cerrada, a temperatura de 2 a 8°C.

b. Caldo tripticasa soya

Pesar 30 gr. de agar tripticasa soya, 0.1 gramos de cloruro de sodio y 0.1 gramos de cloruro de magnesio. Disolver en 1 litro de agua destilada a temperatura ambiente. Calentar hasta ebullición y posteriormente colocar en el Autoclave por 15 minutos a 121°C, 15 psi. Comprobar que no se haya quemado el medio. Medir el

pH, este debe mantenerse en el rango de pH 7.0-7.1. Vertir el caldo en erlenmeyers estériles. Tapar herméticamente y almacenar a temperatura de 2 a 8 °C.

4. Cultivos bacteriológicos de aguas negras y lavados de superficie

Agregar 1 ml de agua recolectada a 100 ml de caldo tripticasa soya. Incubar a 37°C por 24 horas. Observar el aparecimiento de turbidez en el medio. Sembrar una alicuota del caldo turbio con un asa de nicromo en medio MacConkey y en agar Sangre 5%. Incubar a 37°C por 24 horas. Identificar las bacterias presentes por métodos bioquímicos. Si no se presenta turbidez en el medio, reincubar por 24 horas a 37°C. Si aparece turbidez en la reincubación, realizar el procedimiento descrito previamente.

5. Inducción de profagos al ciclo lítico -desrepresión génica por luz UV-

Irradiar un cultivo masivo recién inoculado (células en fase logarítmica) de *K. oxytoca* multirresistente por medio de una lámpara ultravioleta de 340-360 nm, por 10-15 segundos a una distancia de 10-15 centímetros. Incubar por 24 horas a 37°C. Observar el aparecimiento de placas de lisis o halos claros sobre el cultivo. Cortar el agar en los bordes de las placas identificadas y purificar el fago según metodología descrita anteriormente.

H. Diseño experimental

1. Tipo de estudio

Estudio de tipo exploratorio, con muestreo a conveniencia, no aleatorio.

2. Análisis de datos

Tabular los datos obtenidos por medio de tablas realizadas en el paquete Word versión 97 (Microsoft Corporation, USA). Reportar los resultados de manera comparativa en presencia o ausencia.

VIII. RESULTADOS

Del muestreo realizado de enero a abril del año 2000, en dos salas de cuidados críticos de pediatría de un hospital nacional de la ciudad capital de Guatemala, se aislaron 77 cepas bacterianas, siendo la más frecuente *Klebsiella sp.* (25/77, 32.47%), identificadas como multirresistentes (Tabla No.1) (23). De esta investigación se recuperaron, de 10 tubos identificados como *Klebsiella sp.* multirresistente., 4 cepas (4/10, 40%), las cuales fueron identificadas como *Klebsiella oxytoca* por medio de los métodos bioquímicos rutinarios y por el sistema automatizado Microscan Walkaway 96® (Dade Behring/ Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Las cepas identificadas como *Klebsiella oxytoca*, originalmente fueron aisladas de superficies de las salas investigadas (2/4) y de coprocultivos (2/4) de los pacientes pediátricos.

De las aguas colectadas del Río Villalobos (Zona 12) y del Río De Las Vacas (Zona 5) se obtuvieron dos alicuotas de 100 ml cada una. De los filtrados de estas aguas se recuperaron 25 y 35 ml, respectivamente. Al enfrentar los filtrados por el método de goteo sobre las 4 cepas de *Klebsiella oxytoca* multirresistente y 1 cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25923), no se observaron placas de lisis sobre ninguno de los cultivos de *Klebsiella oxytoca* multirresistente (0/4, 0%), pero si se evidenció la presencia de placas de lisis sobre los cultivos de *Escherichia coli* ATCC 25923 (1/1, 100%) en el filtrado del Río Villalobos. Del filtrado del Río de Las Vacas, no se observaron placas de lisis en los cultivos de *Klebsiella oxytoca* multirresistente (0/4, 0%) y *Escherichia coli* ATCC 25923 (0/1, 0%).

De los cultivos bacteriológicos efectuados en las aguas recolectadas del Río Villalobos (Zona 12) y del Río de Las Vacas (Zona 5), se aisló *E. coli*, identificada por métodos bioquímicos, así como bacterias no fermentadoras y otras Gram positivo. No se aislaron cepas de *Klebsiella sp.*

De los 4 lavados realizados en las superficies de las unidades de cuidados críticos de pediatría, se obtuvieron aproximadamente 70 ml de filtrado de cada uno. Del enfrentamiento por el método de goteo sobre las 4 cepas de *Klebsiella oxytoca* multirresistente y la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25923, no se observaron placas de lisis para cada una de las cepas (0/16 y 0/4 respectivamente).

De los cultivos bacteriológicos de las aguas de lavados de superficie de las salas hospitalarias, se aislaron dos tipos de bacteria, a saber, una bacteria no fermentadora y una Gram positivo, esta última con morfología de coco. No se aislaron cepas de *Klebsiella sp.*

De la inhibición génica e inducción de fagos lisogénicos, por medio de la exposición a luz UV (390 nm) de cuatro cultivos de *K. oxytoca* multirresistente, no se evidenció la presencia de placas de lisis, a las 24 horas postirradiación (0/4, 0%).

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las cepas de *Klebsiella* multirresistente aisladas en la investigación realizada de enero a abril de 2000, fueron identificadas preliminarmente como *Klebsiella pneumoniae*, *K. ozanae* y *Klebsiella sp.* La recuperación de únicamente cuatro cepas de *K. oxytoca* a partir de diez aislados, se debió principalmente a la contaminación o muerte celular que presentaban la mayoría de estos cultivos preservados en agar stock. Estos resultados pudieron estar afectados por la limitación de nutrientes, presencia de otras bacterias contaminantes, o a que los cultivos no se almacenaron y preservaron adecuadamente. La contaminación bacteriana se debió principalmente a la presencia de *Pseudomonas sp.*, *Escherichia coli* y *Enterobacter sp.* Por el contrario, el patrón de susceptibilidad antibiótica si concordó exactamente con lo reportado en los estudios anteriores, lo que puede sugerir que la resistencia no es debida ha plasmidos, los cuales hubieran sido expulsados de la bacteria durante su almacenamiento (22, 23).

La recuperación de bacteriófagos para la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25923 de aguas negras provenientes del Río Villalobos, está relacionado con la presencia de la bacteria o célula hospedera en el material recolectado, por lo que se ha utilizado la bacteria *E. coli* como un marcador o control positivo de aguas altamente contaminadas (3). Los ríos de Las Vacas y Villalobos fueron seleccionados debido a que son afluentes de aguas de desecho de la Ciudad capital (Anexo 1) y por lo tanto, podrían contener a ambos organismos, esto es *Klebsiella sp.* y bacteriófagos específicos. Contrariamente a lo esperado fue la ausencia de cepas de *Klebsiella sp.* en estas aguas de desecho, debido a que se consideró que en aguas negras las enterobacterias son abundantes, y por lo tanto era de esperarse el aislamiento de esta bacteria (11-13). *Klebsiella oxytoca* se ha identificado en cultivos de aguas de desecho, aguas negras y otras fuentes (25).

La ausencia de bacteriófagos en los filtrados recolectados de las salas de cuidados críticos pediátricos, puede correlacionarse a la remodelación estructural que sufrieran las salas, se han realizado cambios, tales como reemplazo de pisos, azulejos, loza sanitaria, etc., esto influyó en la destrucción del hábitat de las bacterias multirresistentes (4,10). Así mismo, estas salas fueron desinfectadas, por los múltiples reportes de brotes nosocomiales (15). Estos resultados concuerdan con la ausencia de las cepas de *Klebsiella sp.* en los cultivos bacteriológicos de los lavados que se realizaron de las superficies, donde únicamente se aislaron otros microorganismos. Es importante hacer mención que de los filtrados de las aguas de los lavados superficiales, se observó la presencia de productos que cambiaron el color de las aguas, asumiéndose que podrían derivar de la pintura que se estaba

aplicando en las paredes. Se ha reportado que los componentes de algunas pinturas, v.g. óxido de titanio, son capaces de penetrar la cápsula proteica viral, y pueden generar cambios químicos en los ácidos nucleicos. Este efecto incide directamente en la presencia de mutaciones en el genoma viral o, que en último caso se inactive el fago. Aunque se desconoce la inactivación de fagos por medio de los otros agentes contenidos en las pinturas, tales como aldehídos, óxidos de metales pesados y peróxidos, entre otros, se ha reportado el efecto que producen diversos agentes químicos en los componentes fágicos, los cuales incluyen alteraciones en el ácido nucleico y proteínas de la cápside, lo cual impide la adsorción normal del virus o la penetración del ácido nucleico genómico (2).

El hallazgo de bacterias no fermentadoras y cocos Gram positivo en los lavados de superficie, y la ausencia de *Klebsiella sp.*, puede deberse a un posible cambio en la microbiota hospitalaria, generándose competencia entre las bacterias. Estos cambios dinámicos en las poblaciones bacterianas, hacen que se aumente la competencia entre cepas residentes, reduciéndose la población de otras colonias, así como de cepas patógenas u otras bacterias de interés nosocomial. El proceso de desinfección y remodelación que fuera aplicado a las superficies de las salas en estudio, influyó en los cambios de la microbiota; así como el cambio del personal que atiende a los pacientes. Estudios previos han demostrado que las bacterias que causan brotes nosocomiales pueden ser transportadas en las manos del personal médico y paramédico, lo cual hace que las bacterias nosocomiales queden circulando entre la población hospitalaria (16, 26). Otro factor que incidió en la ausencia de *Klebsiella sp.*, es la declinación de su ciclo epidemiológico, lo cual influye directamente en la tasa de población bacteriana (27).

La estimulación del ciclo lítico de los bacteriófagos por medio de la técnica de irradiación ultravioleta, demostró que no existían bacterias lisogenizadas o profagos en las bacterias multirresistentes estudiadas. Esto explica el hecho de que no todos los bacteriófagos pueden tener ciclo lisogénico, y únicamente poseen ciclo lítico. Este procedimiento de estimulación ultravioleta, ha sido utilizado en estudios fágicos para comprobar la existencia de profagos en las células bacterianas (23).

Por otro lado, la metodología utilizada en el presente estudio, fue implementada en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, de la Universidad de San Carlos de Guatemala, quedando registrada e implementada. Para el efecto se elaboró un manual que detalla las técnicas utilizadas y el material necesario para el aislamiento de fagos.

X. CONCLUSIONES

1. No se aislaron bacteriófagos específicos para *K. oxytoca* multirresistente, en los filtrados de las aguas de los ríos Villalobos (zona 12), y de Las Vacas (zona 5), así como de los lavados de superficies de las salas hospitalarias de cuidados críticos de pediatría.
2. No se obtuvo crecimiento bacteriano de *Klebsiella sp.* en las aguas de los ríos Villalobos (zona 12), y De Las Vacas (zona 5), así como de los lavados de superficies de las salas hospitalarias de cuidados críticos de pediatría.
3. El método empleado para la obtención de bacteriófagos de aguas de río fue adecuado para el aislamiento viral de fagos para *E. coli* ATCC 25923.
4. Dentro de las cepas de *Klebsiella oxytoca* multirresistente, no se identificaron bacterias lisogenizadas al utilizar el método de irradiación por luz ultravioleta.
5. La metodología para el aislamiento de bacteriófagos de aguas de ríos fue implementada en el Departamento de Bioquímica.

XI. RECOMENDACIONES

- Se sugiere que se continúen realizando investigaciones para aislamiento de fagos para cepas multirresistentes, y por ser una alternativa en la desinfección, tratamiento, tipificación bacteriana y otros usos.
- El aislamiento de bacteriófagos para cepas específicas, debe realizarse en el mismo período y lugar de donde fue aislada la bacteria, para evitar cambios en el nicho ecológico.
- Se deben realizar cultivos bacteriológicos en los lugares donde se pretenden aislar bacteriófagos específicos, con el fin de comprobar la existencia de su hospedero.

XII. REFERENCIAS

1. Elizabeth, K. www.T4phages@elwha.evergreen.edu Evergreen State. Estados Unidos de Norteamérica. Noviembre 1997. Consultado en octubre 2001.
2. Espejo R. Bacteriófagos. Programa Regional de desarrollo científico y tecnológico. Secretaría general de la Organización de los Estados Unidos. Washington, D.C. 1973. V + 65 (p. 1-60).
3. Hans, Z. Bacteriología de Zinsser. México: Unión Tipográfica Editorial Hispano-Americana 1951. XX + 980 (p. 230-233).
4. Topley/Wilson's. Principles of Bacteriology Virology and Immunity. 6ta. Ed. London: Vol. I. Edwar Arnold Publishers. 1976. 256p
5. Pelczar, M. et al. Microbiología. (4ta Ed.) México: Editorial Mc-Graw-Hill, 1987. XV + 826 (425-430).
6. Brock/Madigan. Microbiología. 6ta. Ed. Prentice Hall Hispanoamericana México 1993. XX + 956 (p.192-230)
7. <http://www.combacteriophages.htm> octubre 2000. Consultado en octubre de 2001.
8. Lorch, Antje., Bacteriophages.<http://www.com.biotechnologyanddevelopmentmonitor,No-39,p-14-17>. Consultado en octubre de 2001.
9. <http://www.com.MCB229Spring2000virusgeneralprinciples-bacteriophages.htm>. Consultado en octubre de 2001.
- 10.<http://www.Reference@idrc.ca> Noviembre 1998. Consultado en octubre de 2001.
11. Pumarola, A. et al. Microbiología y parasitología médica. 2ª. Ed. Barcelona: Editorial Masson 1998. 916p (p442-43).
12. Metcaff, E. Ingeniería de aguas residuales, tratamiento, vertido y reutilización. México: McGraw-Hill 1996. 752p (p 108-109).

13. Kener, F. Manual del Agua. México: McGraw-Hill 1990. 430p (p51).
14. Balsells, M., Infecciones Nosocomiales en el Departamento de Pediatría del Hospital General San Juan de Dios. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala: (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1988. 56p.
15. Barrios, M., Estudio de las infecciones Intrahospitalarias en el Hospital San Juan de Dios. Guatemala: Universidad de San Carlos (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1988. 110p.
16. Steere, A., et al. Handwashing practices for prevention of nosocomial infection. USA, Atlanta, Georgia 1985. 83p.
17. Juárez, I., Vigilancia Epidemiológica. México: Protocolos de Vigilancia Epidemiológica. 1994. 348 (p125-130).
18. Robledo C, et al. Panorama de la Resistencia a los Antibióticos en Colombia: Revista Panamericana de Infectología. 1999; (sup1) s26-s31.
19. Koreman, A., et al. Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas a Color. 3ra. ed. Buenos Aires: Médica Panamericana. 1992.
20. Cooksop, B., Hand Washing. USA: San Diego. Public Health Laboratory. 1999; 318:686.
21. Begoglio R., Antibióticos. (5ta. Ed) Buenos Aires: Editorial Panamericana. 1993. 200 (p98-125).
22. Vossberg, J. Comparación de Cepas Bacterianas aisladas de las Manos de Personal de Salud con Cepas Aisladas de Cultivos Orotraqueales de las Salas de Cuidados Intensivos de Neonatos y Pediatría. Revista Científica. (Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 2001; 4-5.
23. Hernández, C. Uso de coprocultivos y cultivos orotraqueales como indicadores tempranos de colonización en pacientes de unidades de intensivo pediátrico del hospital San Juan de Dios. Guatemala: Universidad de San Carlos (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2002. 51+ iv.
24. Jorch, Antje. Bacteriophages.<http://www.combiotechnology.Developmentmonitor.htm>. Noviembre 1999. Consultado octubre 2001.

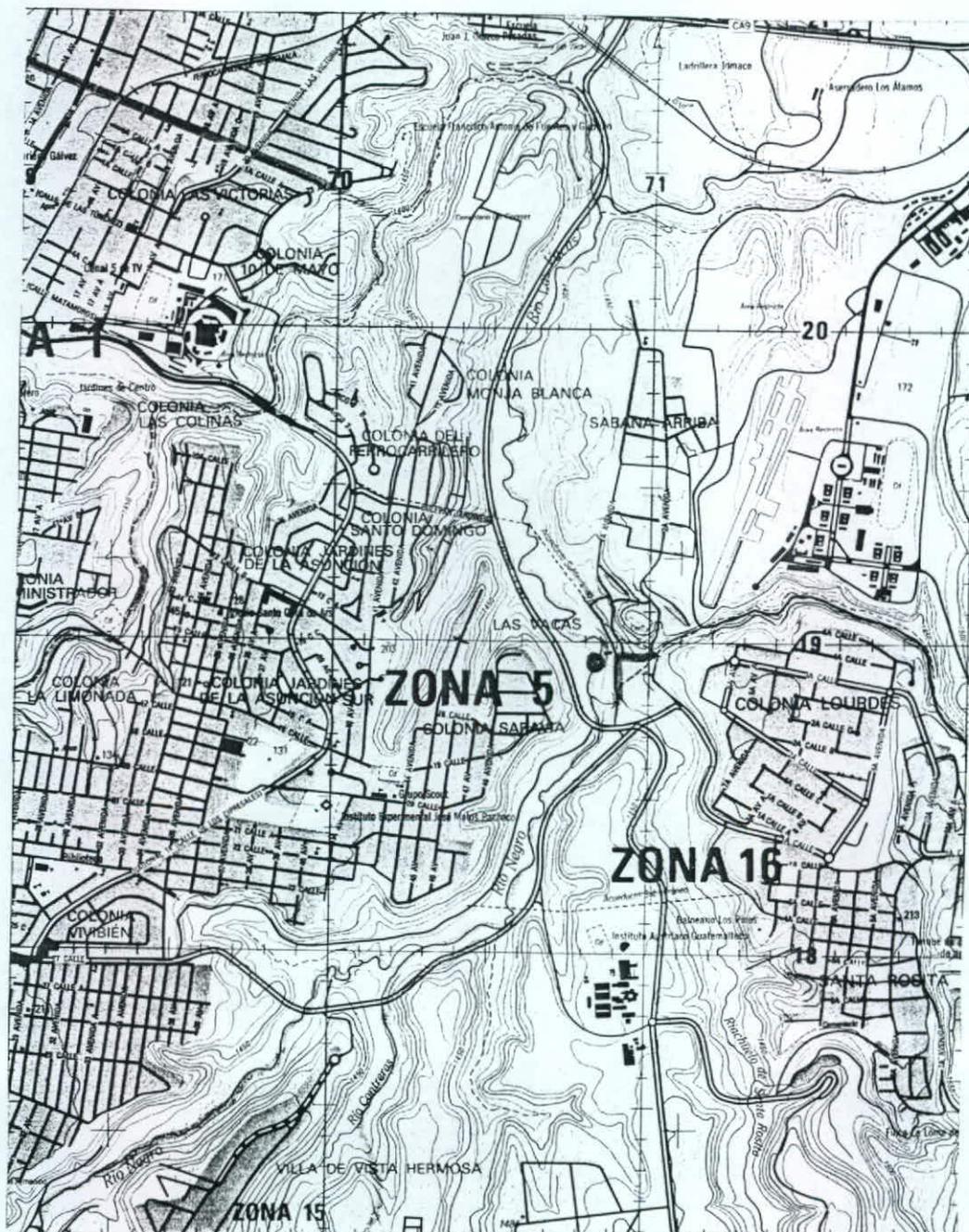
25. Murray PR, et al. Manual of Clinical Microbiology. 6 ed. ASM:USA 1995. Pp1482.

26. Goldmann, D. et al. Hand-washing and Nosocomial Infection. USA. Boston. The New Journal of Medicine. 1992; 2: 120-122.

27.-Schaberg, R. et al. Major Trends in the Microbial Etiology of Nosocomial Infection. USA. Atlanta, Georgia. The American Journal of Medicine 1991; 91: (sup3b) 3b-72s, 3b-75s.

ANEXOS

ANEXO No. 1



- PUNTO DE MUESTREO

Juan Ernesto Vossberg Ordoñez

Autor

Dr. Mario A. González Pérez

Asesor

Licda. Alba Marina Valdés de García

Revisora

Licda. Blanca Samayoa Herrera

Revisor

Licda. Alba Marina Valdés de García

Directora de Escuela

MSc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán

Decano