

2003-A

698000038

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



**“EFICACIA DE LA TERAPIA BACTERIOFÁGICA EN
NEUMONÍAS OCASIONADAS POR *Klebsiella
pneumoniae* EN RATON”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE
T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA

RUTH REYES CORTÉS

Las Agujas, Zapopan, Jal.; Junio de 2003



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. RUTH REYES CORTÉS
PRESENTE.**

Manifiestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción Tesis con el título "Eficacia de la terapia bacteriofágica en neumonías ocasionadas por *Klebsiella pneumoniae* en ratón", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado/a como Director de dicho trabajo el/la **LUIS YOSHIO KAMAYAMA KAWABE** y como Asesor el/la **JOSEFINA CASAS SOLÍS**.

**ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan, Jal., 07 de enero del 2003



**DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Leticia Hernández López
**M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

c.c.p. **LUIS YOSHIO KAMAYAMA KAWABE**.- Director del Trabajo.
c.c.p. **JOSEFINA CASAS SOLÍS**.- Asesor del Trabajo.
c.c.p. Expediente del alumno

MERL/LHL/mam

C. DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN
DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E

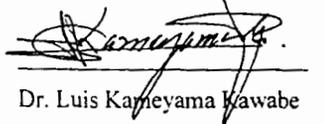
Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Titulación en modalidad de Tesis e Informes opción Tesis que realizó el (la) pasante: Ruth Reyes Cortés código 698000038 con el título Eficacia de la terapia bacteriofágica en neumonías ocasionadas por *Klebsiella pneumoniae* en ratón. Consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y, en su caso, programación de fecha de examen respectivo.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

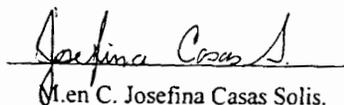
Las Agujas, Zapopan, Jal., a junio del 2003

Director del Trabajo


Dr. Luis Kameyama Kawabe

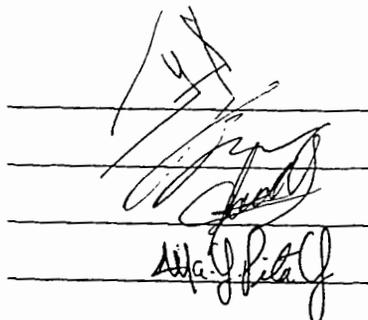


El asesor


M. en C. Josefina Casas Solis.

SINODALES

1. Dr. Alfonso Islas Rodríguez
2. Dra. Galina Zaitseva Petrovna
3. M. en C. Luz Elena Claudio García.
4. M. en C. Maria Luisa Pita López.



El presente estudio se realizó en el laboratorio 6 a cargo del Dr. Jaime García Mena en el departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV). Dicho estudio estuvo bajo la dirección del Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe y la asesoría de la M. en C. Josefina Casas Solís.

Dedicatoria

A mis padres:

A Margarita Cortés por haber sido una gran mamá, y dar siempre todo por sus hijos.

A Julio Reyes por ser mi padre y brindarme su cariño.

A mis hermanos:

A ellos dedico este trabajo por la gran ayuda que me han brindado durante mi carrera.
espero algún poder recompensar todo lo que han hecho por mí.

A David, por sus sabios consejos, además de ser un gran guía en mi vida.

A Eunice por ser el lado sensato en mi vida.

A Lidia por ser mi amiga además de mi hermana.

A Edgar Alex, por haber sido mi hermanito menor.

Y a un gran compañero:

Alejandro Ramos Rodríguez por su gran apoyo y confianza en mí.

CUCBA

Agradecimientos

Un agradecimiento muy especial va dirigido al Dr. Luis Kameyama, ya que sin su confianza y apoyo no hubiera sido posible la realización de este trabajo. Sin embargo, su ayuda fue mas allá de la realización de un experimento, por lo que agradezco sus consejos personales y su interés para una formación mas completa como estudiante y como persona.

Al Dr. Jaime, doy las gracias por haberme permitido ser parte de su laboratorio, además de las sugerencias brindadas para mejorar este trabajo.

A la M. en C. Patricia Arzate, agradezco la donación del material para la realización de este trabajo de investigación.

A la M. en C. Josefina Casas Solís, por fungir como asesora y demostrar dedicación e interés en las correcciones de este trabajo.

A mis sindonales, por el tiempo dedicado a la corrección de este documento.

A mi Universidad, por haberme permitido ser parte de ella.

Un agradecimiento especial, al Dr. Miguel Ángel Guevara por su apoyo y comprensión al emprender un nuevo camino en mi vida. Gracias por sus consejos y buenos deseos.

Al M. en C. Alejandro Muños Urias, agradezco su enriquecimiento en la cuestión estadística implicada en este trabajo. Gracias por ser un amigo y estar siempre en la mejor disposición de ayudar.

A Eva Martínez y Alberto Piña les doy las gracias por haber dedicado gran parte de su tiempo a guiarme y a compartir sus conocimientos conmigo.

A todos mis compañeros cuyos nombre omito por falta de espacio, quisiera darles las gracias por permitirme ser su amiga, por mostrarme su cariño y respeto.

ÍNDICE

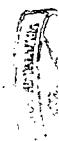
	Paginas
Índice de Cuadros	ix
Índice de Figuras	x
RESUMEN	xi
I. Introducción	1
II. Antecedentes	7
III. Justificación	10
IV. Hipótesis	11
V. Objetivos	
a. Objetivo General	11
b. Objetivos Particulares	11
VI. Material y Métodos	
a. Cepas Bacterianas	12
b. Pruebas bioquímicas	13
c. Medios de cultivo	14
d. Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos	14
e. Obtención de Fagos	15
f. Tratamiento de Aguas residuales	15
g. Realización de Tapices Bacterianos	15
h. Aislamiento de Fagos	16
i. Purificación de Fagos	16
j. Expansión de Fagos	16
k. Selección del cóctel de Fagos	17
l. Eficiencia antibacteriana del cóctel de fagos <i>in vitro</i>	17
m. Animales de experimentación	17
n. Curva de crecimiento de K06	17
o. Procedimientos de inoculación	18
p. Eficiencia antibacteriana del cóctel de fagos <i>in vivo</i>	18
q. Análisis de Datos	19

VII. Resultados	
a. Pruebas bioquímicas	21
b. Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos	22
c. Obtención de Fagos	25
d. Selección del cóctel de fagos	26
e. Eficiencia antibacteriana del cóctel de fagos <i>in vitro</i>	30
f. Curva de crecimiento	30
g. Ensayo LD ₅₀	31
h. Efecto antibacterial del cóctel de fagos a diferentes concentraciones	32
i. Efecto antibacterial del cóctel de fagos a diferentes tiempos	35
j. Efecto antibacterial del tratamiento con bacteriófagos y del tratamiento con antibióticos	38
VIII Discusión	40
IX. Conclusión	46
X. Bibliografía	47
XI. Apéndice	
I. Clasificación de Antibióticos	50
II. Composición de Medios de Cultivo	55

Índice de Cuadros

- Cuadro 1.** Mecanismos de resistencia a antibióticos.
- Cuadro 2.** Aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* de pacientes del Instituto Nacional de Pediatría.
- Cuadro 3.** Características bioquímicas de las cepas de *K. pneumoniae*.
- Cuadro 4.** Patrón de sensibilidad a antimicrobianos de 10 cepas de *K. pneumoniae*.
- Cuadro 5.** Medidas de clasificación de resistencia o susceptibilidad de diferentes antimicrobianos.
- Cuadro 6** Concentración Mínima Inhibitoria de diferentes antimicrobianos.
- Cuadro 7.** Lista de fagos obtenidos para cada cepa de *K. pneumoniae*.
- Cuadro 8.** Matriz de Infección.
- Cuadro 9.** Selección de fagos líticos.
- Cuadro 10.** Eficiencia de la actividad bacteriana del "cóctel" de fagos *in vitro*.
- Cuadro 11.** Establecimiento de la LD₅₀.
- Cuadro 12.** Sobrevivientes al tratamiento con fagos a diferentes concentraciones.
- Cuadro 13.** Sobrevivientes al tratamiento con fagos a diferentes tiempos.
- Cuadro 14.** Sobrevivientes al tratamiento con fagos y con antibióticos.

BIBLIOTECA



Índice de figuras

Figura 1. Efecto bactericida del cóctel de fagos a diferentes concentraciones.

Figura 2. Efecto bactericida del tratamiento a diferentes tiempos con el cóctel de fagos.

Figura 3. Efecto bactericida del tratamiento con fagos y con antibióticos.

RESUMEN

La idea de la aplicación de los bacteriófagos ó fagos en el tratamiento de enfermedades infecciosas, no es una idea nueva. En 1917 se reconoció que los bacteriófagos eran los causantes de infectar a las bacterias, e inmediatamente después se aplicó este conocimiento en la utilización de los fagos como una terapia antibacteriana. Así, y con el surgimiento e introducción de nuevos antibióticos como la penicilina derivados de otros microorganismos como los hongos y cuyo espectro contra diversos patógenos era muy amplio, rápidamente cambió el giro de la investigación médica. Hoy en día, el interés por esta terapia ha regresado debido al problema del surgimiento y difícil erradicación de un mayor número de infecciones inducidas por bacterias multirresistentes. El problema de la multirresistencia concierne directamente a las infecciones a las infecciones intrahospitalarias, no solo con aquellos patógenos resistentes a los antibióticos como es el caso del *Staphylococco*, sino también a bacterias Gram-negativas como: *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia* y *Proteus*.

Debido a la apremiante necesidad de contar con nuevas terapias alterativas, el objetivo de este estudio se enfocó en mostrar la efectividad de los bacteriófagos para rescatar a ratones de una infección letal ocasionada por *Klebsiella pneumoniae*. El estudio inició aislando los bacteriófagos y consistió en aplicar el tratamiento con estos fagos específicos para las cepas patógenas de *K. pneumoniae*, utilizando diferentes concentraciones y tiempos post-infección. Se obtuvieron aproximadamente 100 fagos, de los cuales se seleccionaron 9 para conformar un cóctel. Los fagos utilizados en ese estudio tuvieron una actividad lítica *in vitro* del 80% al ser retados con un total de 36 aislados clínicos. Una de estas cepas la K06 fue seleccionada para inducir la infección en ratones, vía punción pulmonar a una concentración de 10^7 UFC/ml. Los resultados de la infección mostraban letalidad dentro de las primeras 48 horas. Al aplicarles una simple dosis de fagos a una concentración de 10^9 UFP, administrada hasta 4 horas después de la inoculación bacteriana, fue suficiente para obtener un 100% de supervivencia. En adición a otras ventajas en el uso de la fago-terapia podemos inferir que en éste caso en particular, el tratamiento con los bacteriófagos resultó ser tan eficaz como el tratamiento con antibióticos.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día existe una gran variedad de compuestos químicos de bajo peso molecular tanto naturales como sintéticos y semi-sintéticos, capaces de impedir el crecimiento bacteriano. A estos compuestos se les ha denominado antibióticos o agentes antimicrobianos (11).

Debido al gran número de antibióticos, y ya que algunos de estos han sufrido modificaciones químicas para ser más efectivos en el tratamiento, a estos compuestos se les han clasificado en: Antibióticos β -lactámicos, Aminoglucósidos, Quinolonas, Tetraciclinas, Macrólidos, Glicopéptidos y polipéptidos, Sulfonamidas y Trimetoprima, y Cloramfenicol (21).

Desafortunadamente, el constante uso y abuso de los antibióticos esta generando la resistencia o multiresistencia en una gran cantidad de bacterias, creando serios problemas para su eliminación. Las bacterias antes sensibles a los antibióticos ahora ya no lo son y las bacterias que eran poco agresivas se han convertido en microorganismos patógenos difíciles de erradicar (14).

En la naturaleza es posible encontrar bacterias que por sí mismas son resistentes a los antibióticos. Sin embargo, las bacterias sensibles pueden llegar a ser resistentes debido principalmente al intercambio del material genético vía plásmidos, transposones o por fagos transductores. Así, sin lugar a dudas, el uso indiscriminado de estos productos por la comunidad en general, así como en los hospitales ha incentivado la multiresistencia (11).

Los mecanismos principales mediante los cuales las bacterias son resistentes a la acción de los antibióticos son tres básicamente: 1) por inactivación del antibiótico; 2) por alteración del sitio blanco del antibiótico y 3) por disminución del transporte del antibiótico al interior de la célula (cuadro1). Estos mecanismos pueden ocurrir simultáneamente en un microorganismo, o bien, puede manifestarse un solo mecanismo para diferentes clases de antibióticos (11).

Cuadro 1. Mecanismos de resistencia de ciertos antibióticos

Antibiótico	Mecanismo de resistencia	Base genética de la resistencia	Patógenos que presenta la resistencia.
β-láctamicos	a) Alteraciones en el ensamblaje de proteínas b) Reducción de permeabilidad. c) β- lactamasas	a) Cromosomal b) Cromosomal c) Plásmidos y/o cromosomal	<i>Staphylococci aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Enterococci</i>
Aminoglucósidos	a) Modificación del antibiótico impidiendo el transporte b) Modificación enzimática	a) Cromosomal b) Via plásmidos	<i>Streptococci</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Staphylococci</i>
Quinolonas	a) Alteración de la DNA girasa b) Reducción de la permeabilidad	a) Cromosomal b) Cromosomal	<i>S. aureus</i> <i>Enterobacteriaceae</i>
Tetraciclinas	a) Alteración de proteínas ribosomales	a) Plásmidos	<i>Neiseria gonorrhea</i> <i>Mycoplasma</i>
Macrólidos	a) Metilación enzimática	a) Plásmido y/o Cromosomal	<i>Streptococci</i> <i>Streptococci pneumoniae</i>
Glicopéptidos	a) Alteración del blanco	a) Plásmido y/o cromosomal	<i>Enterococci</i> <i>Lactobacillus</i>
Cloramfenicol	a) Modificación del antibiótico evitando así su unión al ribosoma	a) Plásmido y/o cromosomal	<i>Staphylococci</i> <i>Streptococci</i> <i>S. pneumoniae</i>

Tabla. Tomada y Modificada de Mecanismos de Resistencia, "The Crisis in Antibiotic Resistance" (21).

La resistencia hacia uno o varios antibióticos es una característica importante que se asocia sobre todo a infecciones nosocomiales (las infecciones nosocomiales son aquellas que aparecen 72 horas de estancia hospitalaria y que no están presentes cuando el paciente ingresa al hospital). En 1992 las infecciones nosocomiales reportaron ser la causa de 8 millones de accesos al día a hospitales, de los cuales aproximadamente 80,000 se resolvían en muertes, al mismo tiempo estas infecciones eran las causantes de inversiones de \$4.5 billones de dólares en el sistema de cuidados para la salud (31).

Dentro de los principales agentes patógenos resistentes a antibióticos causantes de infecciones nosocomiales encontramos a cepas bacterianas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de β-lactamasas de amplio espectro y cepas de *Enterococos* resistentes a la vancomicina (21).

Entre las cepas multirresistentes se encuentra en particular a *K. pneumoniae*, que fue la seleccionada en el presente estudio por las siguientes razones: 1) Se ha reportado tanto en el ámbito nacional como en el internacional ser el agente etiológico responsable de una gran diversidad de brotes, incluyendo enfermedades nosocomiales

principalmente en el área de cuidados intensivos. 2) La incidencia entre 5% al 7% con relación a todas las infecciones adquiridas en un hospital la hacen uno de los patógenos más importantes (21)

Klebsiella pneumoniae, bacilo Gram-negativo el cual carece de motilidad y se encuentra en la flora intestinal normal. Anteriormente se le consideraba como una bacteria no patógena. Actualmente, es capaz de infectar las vías del tracto urinario y el sistema respiratorio causando neumonía severa, dolor de pecho, dificultad para respirar y fiebre. Usualmente es un patógeno oportunista, característico de infecciones en niños e infantes y más comúnmente en adultos en edad avanzada. *K. pneumoniae* es capaz de infectar a ambos sexos por igual. Las personas con una mayor predisposición son las inmunosuprimidas, alcohólicas e individuos que sufren severas enfermedades como diabetes mellitus u obstrucción pulmonar crónica, neumonía, infecciones del tracto urinario y bacteremia. Esta bacteria se transmite vía fecal-oral y por el aire (22).

Los factores de patogenicidad de *Klebsiella* se reducen en cuatro: 1) La presencia de cápsula. Esta se compone de polisacáridos formando estructuras fibrosas densas sobre la superficie de la bacteria. La cápsula protege a la bacteria de la fagocitosis por células polimorfo nucleares del sistema inmune, adicionalmente inhibe la diferenciación y la capacidad funcional de los macrófagos. Existen 77 tipos capsulares, y muestran diferencias en la virulencia. Estos son conocidos como antígenos capsulares K. 2) Los pilis, estos son proyecciones filamentosas no flageladas localizadas sobre la superficie bacteriana. Estas estructuras miden de 1 a 11nm de diámetro y están formadas por proteínas globulares poliméricas. Los pilis son capaces de aglutinar eritrocitos de diferentes especies animales. Dependiendo si la reacción es inhibida por D-manosa se denomina hemaglutininas manosa-sensible (MSHA) o manosa-resistente (MRHA). En las *Klebsiella sp.* existen 2 diferentes tipos de pilis predominantes: 1) El pili tipo 1 es una adhesina sensible a manosa, la cual aglutina eritrocitos de cobayo, se localiza sobre el cuerpo fimbrial y es capaz de unirse a trisacáridos que contengan manosa dentro de las glicoproteínas del huésped. Esta se asocia a la patogénesis de infecciones de tracto urinario y pielonefritis. 2) El pili tipo 3 es una adhesina (MRHA) que aglutina solamente a los eritrocitos si son tratados con ácido tánico. Es característico de las cepas de *K. pneumoniae* que se adhiera a diferentes tipos de células: endoteliales, epiteliales

del tracto respiratorio y uroepiteliales de los riñones. Este pili media la adhesión bacteriana a la membrana basal tubular, a las cápsulas de Bowman's y al vaso renal. 3) Presencia de sideróforos. Los sideróforos son moléculas que capturan el hierro de bajo peso molecular, funcionando como agentes quelantes, son capaces de tomar el hierro y transportarlo a su huésped. Entre los sideróforos más importantes se encuentran los ferricromos, ferrioxaminas y aerobactina. Esta última media la salida de hierro y posiblemente contribuya de manera indirecta a la patogenicidad de *Klebsiella sp.*

4) Resistencia al efecto bactericida del suero, el cual es mediado por proteínas del complemento. Después de la cascada de activación del complemento estas proteínas se acumulan como un complejo que ataca a la membrana del microorganismo. Este complejo consiste en las proteínas C5b -C9, el cual produce un poro en la membrana de las bacterias permitiendo la infiltración de Na^+ y subsecuentemente la "lisis osmótica" de la bacteria. Desgraciadamente la mayoría de las bacterias Gram-negativas son resistentes a la acción del suero bactericida y la patogenicidad de estas bacterias regularmente es exhibida. En *Klebsiella sp.* existen dos hipótesis de mecanismos de resistencia al suero: a) la cápsula de lipopolisacáridos podría enmascarar los antígenos O (LPS) y por lo tanto no activar el complemento, b) regulación de la cantidad de C3b el cual media el grado de resistencia al suero (22).

A mediados de los 80's la terapia contra las infecciones ocasionadas por *K. pneumoniae* no fue exitosa, debido a que estas eran resistentes a cefotaxima, ceftriaxone, o ceftazidime (antibióticos β -lactámicos). La resistencia fue como resultado de β -lactamasas modificadas. Algunas de estas enzimas hidrolizan el anillo β -lactámico de los antibióticos como las que presentan las penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación, carbapenémicos y monobactámicos. Otras actúan contra inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico. Algunas β -lactamasas utilizan iones zinc para romper el anillo β -lactámico, pero un gran número de ellas opera por el mecanismo vía la formación de un enlace éster de serina, en donde la enzima primero se asocia con el antibiótico para producir el complejo no covalente de Michaelis. Este facilita que el anillo β -lactámico sea atacado por un hidroxilo libre de la cadena lateral de la serina, formando un enlace covalente éster acilo. La hidrólisis del éster libera el sitio activo de la enzima e inactiva el antibiótico (21).

El incremento de la multiresistencia bacteriana hacia los antibióticos, ha motivado en el ámbito científico a buscar nuevas alternativas para un eficiente tratamiento terapéutico. Un ejemplo es el uso de los ácidos orgánicos (por ejemplo ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico), ejercen el efecto antimicrobiano de dos formas: 1) debido a su acidez y como consecuencia la baja del pH, y 2) por el efecto antimicrobiano específico debido a su forma no disociada. Esto es: sabemos que la forma disociada del ácido, al ser un anión, es altamente polar y por lo tanto no puede atravesar la membrana plasmática de los microorganismos. En la forma no disociada el ácido es capaz de atravesar la membrana y una vez en el interior de la bacteria, puede afectar directamente el pH intracelular desequilibrando el gradiente de protones con el exterior e interfiriendo con los sistemas de transporte de aminoácidos, fosfatos y enzimas esenciales. Al mismo tiempo, la concentración interna de aniones al verse incrementada, desencadena un mecanismo de compensación respecto a la carga eléctrica obligando a la bacteria a aumentar los niveles de Na^+ , K^+ y/o glutamato, teniendo como consecuencia un incremento tal en la fuerza iónica intracelular que provoca un aumento de la presión mecánica sobre la pared del microorganismo, causando la lisis bacteriana (23).

Otra alternativa, que se consideró en este trabajo, es el uso de bacteriófagos ó fagos como agentes antimicrobianos. Desde su descubrimiento en 1915 los estudios en el área clínica han conducido a su utilización en el tratamiento de enfermedades infecciosas cuando el tratamiento con antibióticos es poco eficiente.

Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan a las bacterias. Cada clase de bacteria puede hospedar a fagos específicos, estos pueden ser encontrados en el medio donde crece la bacteria, aislarse y seleccionarse (16).

Los Fagos son por tanto entidades biológicas sencillas capaces de autoreplicarse. Constan de ácido desoxirribonucleico (ADN) ó ácido ribonucleico (ARN) en cadena doble o simple, y se encuentran envueltos por una cubierta proteica o cápside, conformada por subunidades denominadas capsómeros (5).

En cuanto a su diversidad existen al menos 12 grupos distintos de bacteriófagos los cuales son muy variados genética y estructuralmente. La morfología consta básicamente de dos formas: *simetría cúbica* o *simetría helicoidal*; los fagos cúbicos son

sólidos regulares, poliedros ó icosaedros y los fagos helicoidales son alargados con la característica de forma de bastón (7).

Después de la absorción mediante un receptor específico encontrado en la membrana externa, el genoma entra en la célula. Una vez dentro, existen 2 formas para llevar a cabo su desarrollo: La *lítica*: Por ejemplo el virus T4 adopta la maquinaria metabólica del huésped para su desarrollo, utiliza los ácidos nucleicos del mismo para replicar su cromosoma, transcribe y traduce una serie de proteínas necesarias para el ensamblaje y formación de nuevos fagos. También produce hidrolasas de la pared celular para matar o lisar a la bacteria y permitir a los nuevos viriones ser liberados (7). La *lisogénica*: Por ejemplo los fagos lambdoides pueden desarrollarse líticamente o también son capaces de integrar su material genético dentro del ADN de la bacteria, formando parte del cromosoma bacteriano. Al bacteriófago dentro de la bacteria se le denomina profago. En este estado la bacteria realiza normalmente sus funciones, tales como metabolismo y reproducción. El ADN viral es transmitido pasivamente a cada célula hija en forma indefinida. En ocasiones el ADN viral se escinde del cromosoma del huésped y entra en el ciclo lítico. Algunas veces por inducción espontánea, irradiación con luz ultravioleta o por exposición a algún agente químico (7).

Por su acción bactericida los bacteriófagos pueden presentar una dualidad: desde el punto de vista económico por ejemplo, los fagos de los lactobacilos podrían presentar un serio problema en la industria de lácteos, ya que acabaría con las bacterias fermentadoras, pero desde el punto de vista clínico los bacteriófagos podrían ser de gran importancia por actuar como agentes antibacteriales y acabar con la infección (29).

ANTECEDENTES

El descubrimiento de los fagos fue hecho por Towrt en 1915 en Inglaterra e independientemente por d'Herelle in 1917 en el Instituto Pasteur de París. Ellos fueron los primeros en observar que los virus eran capaces de infectar bacterias (2, 5.8.10). d'Herelle fue quien denominó a estos virus con el nombre de bacteriófagos (devoradores de bacterias), y así mismo, fue él quien propuso utilizar esta característica con fines terapéuticos. Desde entonces y hasta la fecha podemos encontrar en la literatura revisiones que datan desde 1920 hasta la fecha del uso de los fagos como una terapia efectiva (2).

Polonia, la antigua Unión Soviética y Gran Bretaña continuaron estos estudios y han administrado fagos para el tratamiento de una amplia variedad de patógenos resistentes a antibióticos, tanto en adultos como en niños. Las infecciones tratadas incluyen: gastroenteritis, sepsis, dermatitis, pulmonía y heridas supurativas. los microorganismos involucrados son: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Shigella* y *Salmonella*, con un éxito del 80 al 95% (2).

En 1921 se reportó el primer caso de infecciones en la piel tratado exitosamente con bacteriófagos causado por *Staphylococcus* (16). Sin embargo, hubo un intervalo en el cual la investigación no progresó, debido a que se intentó tratar con fagos. enfermedades como ezelema, piedras en riñón, y otras enfermedades de origen no bacteriano. Además, de que los experimentos realizados fueron sin un buen diseño, donde se incluían fagos no caracterizados, concentraciones desconocidas dadas a pacientes con infecciones bacterianas no determinadas. Por todo esto, el Consejo sobre Farmacia y Química de la Asociación Medica (Americana Council on Pharmacy and Chemistry of the American Medical Association), llegó a la conclusión de que "El uso de los bacteriófagos en el tratamiento de infecciones bacterianas es en su mayor parte, contradictorio" (16). No obstante, en otros países se continuaron con las investigaciones.

El freno para la utilización de los bacteriófagos como agentes terapéuticos, fue debido a que muchas características de estos eran desconocidas, por ejemplo la especificidad con la que cuentan, sus ciclos de replicación, mecanismos de interacción

fago-bacteria, incluso el desarrollo de la misma bacteria, de ahí el porque de algunos experimentos resultaban positivos y otros no.

Finalmente, en 1982 se publicó un artículo, en el cual se realizó un experimento donde se probaba la eficacia de los fagos en infecciones experimentales realizadas en animales, contra la cepa patógena de *Escherichia coli* (O18:K1:H7 Col V⁺) ya que comúnmente causa infecciones generalizadas en humanos y en animales. Debido a los resultados favorables obtenidos, se comparó la eficacia de los fagos y de los antibióticos, concluyendo que una simple dosis de fagos era equivalente a múltiples dosis de estreptomycin, y más efectiva que diversas dosis de tetraciclina, ampicilina, cloramfenicol (25). En 1983, se realizaron y se analizaron los resultados de las aplicaciones de bacteriófagos en 138 casos. Se utilizaron pacientes de todas las edades y de ambos sexos. Algunas categorías incluyeron: I. Enfermedades Infecciosas, III Desordenes inmunológicos, VII Enfermedades del sistema circulatorio, VIII Enfermedades del sistema respiratorio, IX Enfermedades digestivas, X Enfermedades urinarias, XII Enfermedades de piel o tejido subcutáneo (Clasificación Internacional de Enfermedades WHO, 1977). Los agentes infecciosos fueron *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas*. Se concluyó en primer lugar en que los fagos eran seguros en cualquier tipo de paciente, en segundo lugar, que los bacteriófagos son efectivos en el control de procesos infecciosos tanto como en el caso de desordenes inmunológicos complicados, y que pueden ser de gran importancia como un efectivo factor en el tratamiento de infecciones supurativas resistentes a antibióticos y quimioterapéuticos (26).

Pensando que los fagos no solo podrían ser útiles en el tratamiento, sino también en la prevención, se realizaron investigaciones con bacteriófagos líticos en infecciones experimentales de septicemia y meningitis. También fueron usados en infecciones ocasionadas por la cepa *Escherichia coli* H247 (O18:K1:H7 Col V⁺), *E. coli* O1:K1 y *E. coli* O2:K1, en animales de consumo humano tales como pollos y temeros. Demostrando así que los bacteriófagos son muy efectivos tanto en la prevención como en el tratamiento (3).

Del mismo modo se han utilizado fagos líticos para *Pseudomonas plecoglossicida*, (agente causal de una enfermedad hemorrágica) en cultivos de peces con importancia económica, como es el caso del pez ayu (*Plecoglossus altivelis*). Esto dio como resultado un decremento en el crecimiento bacteriano en el agua con un aumento rápido del título del fago, sugiriendo que los fagos pueden contribuir también en el control de enfermedades en peces (24).

Recientemente se trató infecciones producidas experimentalmente en ratón. Tal es el caso del *Enterococcus faecium*, resistente a la vancomicina obtenido de un aislado clínico. Se provocó la bacteremia en ratones y 45 minutos después de la infección se le administro una sola dosis de fagos (3×10^8 UFP), fue suficiente para salvar al 100% de los animales infectados (4).

JUSTIFICACIÓN

Debido a la gran capacidad de resistencia que presentan hacia uno o varios antibióticos un gran número de microorganismos patógenos, y dado la escasa o nula información en nuestro país sobre otras alternativas de terapia consideramos que era determinante la necesidad de contar con al menos otra opción en el tratamiento de las enfermedades infecciosas ocasionadas por bacterias.

A diferencia de los antibióticos, la terapia con fagos presenta las siguientes ventajas:

Acción bactericida ilimitada, ya que a diferencia de los antibióticos, estos son autoreplicables y su abundancia esta determinada por el número de bacterias presentes en el huésped.

Variabilidad ilimitada, ciertamente, las bacterias desarrollan resistencia a los bacteriófagos al igual que a los antibióticos, sin embargo los fagos presentan una alta capacidad de mutación, pudiendo así competir con la adaptación de las bacterias.

Blancos específicos, los fagos al ser específicos atacan a una clase de bacteria en particular, a diferencia de los antibióticos químicos, no causa daños en la flora intestinal normal, evitando de este modo que otras bacterias oportunistas sean capaces de ocasionar infecciones secundarias como es el caso de *Pseudomonas sp. o Clostridium difficile* (16).

Fácil producción. Si bien es necesario tener una amplia variedad de estos, su costo de producción es sumamente bajo, requiere de menos tiempo y es fácil capacitar al personal. En comparación con el alto costo en la producción de un nuevo antibiótico químico.

En los últimos años se han realizado un buen número de experimentos con modelos animales bien controlados, y se ha demostrado que los fagos son capaces de salvar a estos animales de las infecciones experimentales mortales. De ahí la propuesta del estudio de la terapia con bacteriófagos, para mostrar que puede ser considerada como una terapia alternativa e independiente contra las bacterias altamente resistentes a antibióticos o como una terapia adjunta a los antibióticos cuando las bacterias aún sigan siendo susceptibles (8).

OBJETIVO GENERAL

- Mostrar la eficacia de la terapia con bacteriófagos, en el tratamiento de neumonía ocasionadas por *Klebsiella pneumoniae*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar bioquímicamente las diferentes cepas de *K. pneumoniae*.
- Determinar un antibiótico idóneo para la infección experimental de *K. pneumoniae* con base a la realización pruebas de sensibilidad a antimicrobianos.
- Aislar y conservar fagos que cumplan con la condición de ser líticos y sean capaces de infectar a una amplia variedad de cepas de *Klebsiella pneumoniae*.
- Reproducir la infección experimental de neumonía ocasionada por la bacteria *K. pneumoniae* en ratones Balb/c
- Comprobar la eficacia del cóctel de fagos *in vitro*
- Comprobar la eficiencia de la terapia bacteriofágica *in vivo*.

HIPÓTESIS:

Los bacteriófagos pueden ser tan eficientes en el tratamiento de enfermedades de origen bacteriano como los antibióticos convencionales.

Materiales y Métodos:

Cepas Bacterianas:

Se utilizaron 36 cepas de *K. pneumoniae* provenientes de aislados clínicos de pacientes del Instituto Nacional de Pediatría. Las cepas K01, K02, K03, K04, K05, K06, K07, K08, K09, K10, K11, K12 y K147 provinieron de hemocultivos y fueron recolectados durante el año de 1994. Estas cepas sirvieron principalmente para la obtención de fagos. El resto de las cepas especificadas en el cuadro 2 fueron obtenidas en el periodo comprendido de diciembre 2001 a diciembre 2002.

Cuadro 2. Aislados clínicos de *K. pneumoniae* de pacientes del Hospital de Pediatría.

Cepa	Aislamiento	Edad	Observación	Nombre del paciente.
K-168	Hemocultivo	2 meses	Sepsis	Cruz Rivera Caterin Adamari
K-170	Hemocultivo		Herida de arma de fuego	Chavarría Blanco Diego A
K-171	Hemocultivo	2 años	Pb. Neumonía	Luciana Rodríguez Nancy A
K-174	Hemocultivo	3 años		Miranda González Paulino
K-175	Hemocultivo	S/edad	Flora única	Caute Vázquez José Luis
K-176	Hemocultivo	13 años	Lupus	Mejía Rebollo Claveli L
K-177	Coprocultivo	S/edad	Flora única	Ortega Esperon Jimena
K-178	Hemocultivo	14 años	Pielonefritis	Gabriel Tapia Miriam
K-179	Hemocultivo	4 días	Síndrome Distres Respiratorio	Flores Hernández Niña
K-180	Hemocultivo	S/edad	Pancitopenia en estudio	Arrieta Arrieta José
K-181	Hemocultivo	3 años	Neutropenia Fiebre	Sandoval Toledo Alfredo
K-182	Hemocultivo	9 meses	Sepsis	Zuñiga Concepción Niña
K-183	Hemocultivo	6 meses	Síndrome Intestino corto	Hernández Ponce Miguel
K-184	Hemocultivo	6 meses	Probable Pareplastia	Hernández Ponce Miguel
K-186	Hemocultivo	S/edad	Tiroides	Rivera Sandoval Jesús Saúl
K-188	Hemocultivo	4 años	Leucemia aguda mas foco Febril	Sandoval Toledo Alfredo
K-189	Hemocultivo	2 años		Cruz Alonso Yadira Gpe.
K-190	Hemocultivo	S/edad		Florentino Velarde Elizabeth
K-191	Hemocultivo	2 meses	Sepsis por Candida	Alarcón González Niña
K-192	Hemocultivo	3 meses	Sepsis foco abdominal	Alarcón González Niña
K-193	Hemocultivo	8 años	Vasculitis	Chávez Martínez Elizabeth
K-194	Coprocultivo	18 días	Probable Síndrome Colestasia	Pérez Sánchez Niño
K-195	Hemocultivo	2 meses	Probable. Sepsis	Canales Peñaloza Niño.

Pruebas bioquímicas:

Para el análisis de la caracterización de las cepas patógenas se utilizaron de diversos medios de cultivo diferenciales y selectivos que permitiera preferentemente el desarrollo de determinados géneros bacterianos. La formulación y composición de los medios se encuentran en el apéndice II.

Agar McConkey. Este medio funciona como inhibidor de la microflora Gram-positiva y además es útil para la visualización de la degradación de la lactosa.

Agar Verde Brillante. Este es un medio bastante selectivo para el aislamiento de *Salmonella* y es un inhibidor para la mayoría de las coliformes así como para el género *Shigella* y para la microflora Gram-positiva.

Agar Hektoen. Con este medio es posible diferenciar fácilmente las colonias lactosa positivas y a aquellas colonias con producción de ácido sulfhídrico. Además contiene una mezcla de sales biliares que inhibe a una gran parte de la flora intestinal normal.

Pruebas bioquímicas.

Agar Kligler. Determina la capacidad de un microorganismo de fermentar un carbohidrato específico en un medio de crecimiento básico, con la producción de gases, junto con la determinación de la posible producción de ácido sulfhídrico (H_2S).

SIM. Este es un medio diferencial, se usa para determinar la producción de indol, producción de H_2S y determinación de movilidad.

Malonato. El malonato es útil para determinar la capacidad de un organismo de utilizar el malonato de sodio como única fuente de carbono.

Citrato. Determinar si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono para su metabolismo, provocando alcalinidad.

Aminoácidos. Con la utilización de medios con aminoácidos es posible medir la capacidad enzimática de un organismo para decarboxilar un aminoácido para formar una amina, con la consiguiente alcalinidad.

Rojo de metilo. Con esta prueba es posible comprobar: a) la capacidad de un organismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa, y vencer la capacidad amortiguadora del sistema, y b) funciona como prueba cualitativa de la producción de ácido (determinación del pH)

Reacción de Vogues-Proskauer (VP). El principio de esta prueba consiste en determinar la capacidad de algunos organismos de producir un producto final neutro, el acetilmetilcarbino, a partir de la fermentación de la glucosa.

Medios de cultivo:

Los medios ricos utilizados para el crecimiento de las cepas de *K. pneumoniae* fueron: El medio Luria-Bertani (LB), Medio Tφ, y Medio para células DMEM. (Sus formulaciones se encuentran también el apéndice II de esta tesis).

Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos.

A diez diferentes cepas de *K. pneumoniae* seleccionadas al azar, se les realizaron pruebas de sensibilidad a antibióticos, con el fin de conocer si las cepas presentaban multirresistencia.

Prueba por sensidiscos.

Primeramente se preparó medio agar de Mueller-Hinton, con un pH final de 7.2 a 7.4, a temperatura ambiente (este medio favorece el crecimiento de casi todo microorganismo), se vació aproximadamente 25ml del medio en cajas petri. Por otro lado, con una asa se tomó de 4 a 5 colonias aisladas del mismo tipo morfológico, se incubaron en 4 o 5ml de medio de cultivo Mueller-Hinton líquido, a 35° C hasta la aparición de una turbidez ligera (de 4 a 5hrs). La turbidez fue ajustada con una solución salina estéril hasta tener una densidad comparable, con un estándar de sulfato de bario (0.5 en escala de MacFarland). El estándar correspondió aproximadamente a 10⁸ microorganismos/ml. Para inocular el agar se utilizó un hisopo de algodón estéril, el cual se humedeció con la suspensión, se quitó el exceso y se estrió en 3 direcciones sobre la superficie del agar. Cuando el inóculo se hubo secado se procedió a colocar los discos. Estos se tomaron con una pinza estéril y se colocaron en un tiempo menor de 15min. Después de haber colocado los discos, fue posible invertir la caja e incubar a 37° alrededor de 16 a 18 horas. Finalmente la medición de los halos de inhibición se realizó con un vernier. De acuerdo al tamaño del halo de inhibición se dedujo si la cepa fue resistente o sensible a dicho antibiótico.

Prueba por Microplaca Scan.

Para este ensayo se utilizó un “kit” el cual consta de una placa con pozos que contiene antibióticos a diferentes concentraciones, un tubo con 7ml de medio de cultivo líquido y un aplicador múltiple. Primeramente se tomó con una asa de 4 a 5 colonias aisladas de la cepa bacteriana las cuales fueron crecidas en el medio en caldo e incubados alrededor de 5 hrs a 37°C. Con el aplicador múltiple la placa fue inoculada y llevada a incubación alrededor de 16 horas a la misma temperatura. Finalmente la lectura se tomó en un espectrofotómetro a una densidad óptica OD 600 para determinar el crecimiento bacteriano en cada pozo.

Obtención de Fagos.

Debido a que no se contaba con una colección previa de bacteriófagos, uno de los primeros trabajos realizados fue la obtención, expansión y titulación de una gran variedad de fagos específicos para las diferentes cepas *K. pneumoniae*.

Muestras de aguas residuales

Los fagos fueron aislados de diferentes muestras de aguas residuales de la Ciudad de México, Tlaxcala e Iguala, Gro. Se tomó 1ml de cada muestra de agua, adicionando 4 gotas de cloroformo (100µl aprox), se agitó fuertemente con ayuda del vortex y se centrifugó 5 min a 10,000 rpm para eliminar la materia de alto peso molecular y restos bacterianos.

Realización de tapices bacterianos

Se inoculó una colonia de las cepas bacterianas en 3ml de medio LB líquido y se creció durante 8 hrs aproximadamente a una temperatura de 37° C. Posteriormente en un tubo de ensayo vacío y estéril se le adicionó 0.5ml del cultivo bacteriano y 3ml de Tϕ suave (previamente derretido en baño maría o con ayuda del microondas), se mezcló perfectamente con ayuda del vortex e inmediatamente después se vertió sobre la caja petri preparada con medio Tϕ sólido para formar un ligero tapiz bacteriano. Posteriormente se tomó una muestra de agua con una micropipeta y se vertieron 3 gotas

de 10 μ l c/u sobre el tapiz, se dejó secar a temperatura ambiente y se incubó a 37° por 8 horas para la observación posterior de las placas (19).

Aislamiento de fagos.

Indirectamente y mediante la observación de las placas líticas, se infirió la presencia de fagos sobre las cajas de T ϕ sólido. Estas placas claras se purificaron en repetidas ocasiones (2 o 3 veces) hasta obtener un solo tipo de fago, (esto en base al fenotipo de la placa) (19).

Purificación de fagos

La purificación de los fagos consistió en obtener una placa clara perfectamente aislada. Para ello se realizaron varios pases de las placas en cajas de T ϕ sólido. Con un palillo estéril se picó una placa clara en una caja diferente con medio T ϕ . Se deslizó el fago contenido en el palillo en forma de “zig-zag” y a la caja se le agregó cuidadosamente una mezcla previamente preparada de 0.5ml de bacteria y 3ml de T ϕ suave perfectamente homogenizado con la ayuda del vortex para la formación de un tapiz, se dejó secar alrededor de 5 minutos y fue llevado a incubarse a 37° C alrededor de 8 a 12 horas para observar placas (19). Posteriormente una placa perfectamente aislada y purificada fue tomada para su expansión.

Expansión de Fagos

Se depositó la placa aislada tomada con la punta de una pipeta pasteur en un matraz de 250 ml, se le adicionó 300 μ l de un cultivo bacteriano de toda la noche y 2 gotas de CaCl₂ (1 M), se mezcló y se esperó alrededor de 10 minutos, con el fin de tener una mejor absorción del fago hacia la bacteria. Posteriormente se agregaron 10 ml de medio LB y se llevó a incubarse a 37 ° C en agitación constante (200 rpm) por un periodo de 8 horas aproximadamente o hasta la lisis total del cultivo. Al lisado se le adicionó 1ml cloroformo y se dejó en agitación otros 5 minutos, se centrifugó nuevamente durante 5 min a 10,000rpm. Finalmente, se tomó el sobrenadante que contiene a los fagos y se mantuvieron en refrigeración a 4°C (19).

Selección de fagos

Se obtuvieron fagos que presentaran placas claras (como un indicativo de que su mecanismo de reproducción era exclusivamente lítico). Adicionalmente, se quiso obtener fagos que no solo fueran líticos, sino que además fueran súper virulentos, para ello se seleccionaron aquellos con la característica de una alta capacidad de infectar un gran número de cepas de *K. pneumoniae*. Así, se realizó una matriz de infección, que consistió en retar cada fago obtenido contra las varias cepas de *K. pneumoniae*.

Eficiencia de la terapia con bacteriófagos

El punto más importante y crucial en este estudio se centró en mostrar la efectividad de la terapia con bacteriófagos, para ello se observó el efecto de un cóctel de fagos sobre la cepa *K. pneumoniae in vitro e in vivo*.

Eficiencia antibacteriana del cóctel de fagos *in vitro*.

Se probó un "cóctel" de 9 fagos seleccionados de acuerdo al mayor número de cepas susceptibles de *K. pneumoniae*. Este ensayo consistió en gotear el cóctel de fagos directamente del "stock" (mezcla de los fagos seleccionados todos en similar concentración, aproximadamente 10^9 UFP/ml) a 36 tapices bacterianos de aislados clínicos de las cepas de *K. pneumoniae*.

Ensayo *in vivo*

Animales de experimentación

Se utilizaran ratones de la cepa Balb/c de entre 6 y 8 semanas de edad. del sexo femenino con un peso aproximado de 20 a 25 gr.

Curva de crecimiento para la cepa K06:

Para la cuantificación de la bacteria se realizó una curva de crecimiento de la cepa *K. pneumoniae* K06. Se preparó un cultivo de toda la noche (overnight) de la cepa bacteriana con una colonia aislada en medio LB líquido. En un matraz de 250ml se agregó 25ml de LB líquido mas 250µl del cultivo bacteriano. Se llevó a incubar a una temperatura de 37°C y a una agitación constante de 180 rpm. Se tomaron lecturas de la

densidad óptica a 600nm (OD 600) del cultivo cada 15 minutos por un tiempo de 4 horas. Relacionando la densidad óptica obtenida con las UFC/ml de la cepa bacteriana con el fin de obtener una curva de crecimiento y poder así cuantificar el inóculo.

Procedimientos de inoculación.

Se llevó a cabo una inoculación intrapulmonar de 100µl de la cepa *K. pneumoniae* K06 diluida en medio DMEM, equivalente a 2.5×10^7 CFU dentro del pulmón derecho. Para el tratamiento con bacteriófagos. Posteriormente fue inoculado un cóctel de 100µl de fagos líticos previamente seleccionado, a una concentración de 1×10^9 UFP e inoculada de la misma forma en que fue inoculada la bacteria patógena. Para el tratamiento con antibióticos, se administró una dosis de Gentamicina a una concentración de 25mg (kg de peso) a las 8 hrs post-infección y se repitió la aplicación del antibiótico cada 12 horas por un período de 4 días. En los primeros ensayos el antibiótico utilizado fue la Gentamicina, posteriormente el antibiótico fue cambiado a Ciprofloxacina, y fue administrado en igual concentración que el antibiótico anterior.

Eficiencia del tratamiento con bacteriófagos *in vivo*.

La eficacia de la terapia bacteriofágica fue evaluada en 2 experimentos por separado usando la cepa *K. pneumoniae* K06 (esta cepa fue escogida debido a su gran susceptibilidad hacia la infección de fagos), en el modelo murino de neumonía. En este estudio se utilizaron 3 grupos de 4 ratones cada uno tratados con una dosis intrapulmonar de *K. pneumoniae* K06 de 2.5×10^7 UFC. Cada grupo fue tratado 15 minutos después de la inoculación bacteriana con una sola dosis de fagos a concentraciones de 10^8 , 10^6 , 10^4 UFP para cada ensayo. Adicionalmente se utilizaron 2 grupos controles. El primer grupo estaba formado por 2 ratones inoculados con la bacteria patógena y una solución de LB sin fago y el otro de 2 ratones al cual se le inoculó una alta concentración de fago 10^9 UFP.

El segundo experimento consistió en el estudio del efecto de la aplicación del tratamiento retardado por varios periodos, y se dividió en 2 partes. En la primera parte se formaron 2 grupos de 5 ratones. A cada ratón de cada grupo se le aplicó por vía punción pulmonar 2.5×10^7 UFC de bacteria patógena disuelto en una solución de 100µl

de DMEM. Posteriormente los animales recibieron tratamiento a 15 minutos después (0 hrs) y a las 4 horas con una sola dosis de fagos a una alta concentración (10^9 UFP) inoculada por vía punción pulmonar. El experimento se repitió 2 ocasiones con lo cual se consiguió una N total de 10 ratones para su análisis. La segunda parte del experimento consistió en retardar un poco más el tratamiento, del mismo modo se formaron 2 grupos de 4 a 5 ratones, de igual forma a cada ratón de cada grupo se le aplicó una dosis de bacteria patógena (2.5×10^7 UFC), posteriormente el tratamiento fue retardado hasta las 8 y 16 hrs post-infección. Este ensayo igualmente se realizó en dos ocasiones y la N total fue de 11 y 9 ratones respectivamente.

Como grupos controles se tuvieron: a) grupo de ratones inoculado únicamente con la bacteria patógena; b) grupo inoculado con bacteria patógena mas una dosis del diluyente de los fagos (100 μ l de medio LB); c) un grupo inoculado con la bacteria patógena y tratado con antibiótico (25mg Kg/peso) de Gentamicina y/o Ciprofloxacina; d) un grupo de ratones inoculado con una alta concentración del cóctel de fago (10^9 UFP); e) un grupo con una administración de 100 μ l DMEM o PBS vía punción pulmonar y f) un grupo de animales sin tratamiento.

Análisis de Datos.

El análisis de la eficiencia del cóctel de fagos se realizó retando el mayor número posible de cepas de *K. pneumoniae*. Con el fin de obtener un porcentaje estimado de virulencia del cóctel.

Para llevar a cabo cualquier análisis estadístico se debe cumplir con 3 supuestos: Igualdad de varianzas, normalidad y aleatoriedad. Ocasionalmente las suposiciones que fundamentan el análisis de varianza no se cumplen en los datos. Cuando estas consideraciones no se cumplen un procedimiento alternativo es realizar una transformación (una transformación se refiere a un cambio en la escala de medición), de modo que se cumplan las suposiciones con más aproximación. Por lo general una transformación logra 2 o mas objetivos simultáneamente (30).

Para este trabajo se realizó una transformación del arcoseno. Esta transformación se utiliza cuando los datos se encuentran en proporciones o porcentajes y es necesario convertirlos a datos normales. Dicha transformación sigue la siguiente fórmula:

$$p' = \text{Arcoseno}\sqrt{p}$$

Donde p' es el dato transformado y p el dato original

Para la evaluación estadística, el análisis que ayudó a probar la hipótesis de que los tratamientos difieren experimentalmente fue el Análisis de Varianza (ANOVA). El ANOVA de una vía es el análisis utilizado cuando se requiere ver el efecto de un solo factor sobre determinada respuesta.

RESULTADOS

Las Pruebas bioquímicas (ver materiales y métodos) para la caracterización de las diferentes cepas de *K. pneumoniae* se realizaron con anterioridad en el laboratorio de Bacteriología en el Instituto Nacional de Pediatría. Adicionalmente se repitieron las pruebas bioquímicas únicamente con 12 cepas (cuadro 3). Con base a las pruebas bioquímicas realizadas se comprobó que la mayoría de las cepas mantienen las características propias del género y de la especie de *K. pneumoniae*.

Cuadro 3. Características bioquímicas de las cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

Prueba Bioquímicas Ceba	Malonato	Citrato	Urea	Arginin	Lysina	Ornitina	Rojo	VP	Kliger	SIM
K01	+	+	+	-	+	-	-	+	++--	--
K02	+	+	+	-	+	-	-	+	++--	--
K03	+	+	+	-	+	-	+*	-	++--	--
K04	+	+	+	-	+	-	-	+	++--	--
K05	+	+	+	-	+	-	-	+	++--	--
K06	+	+	+	-	+	-	-	+	++--	--
K07	+	+	+	-	+	-	-	+	++--	--
K08	+	+	+	-	+	-	-	+	++--	--
K09	+	+	+	-	+	-	+*	-	++--	--
K10	+	+	+	-	+	-	-	+	++--	--
K11	+	+	+	-	+	-	-	+	++--	--
K12	+	+	+	-	+	-	-	+	++--	--

+ positivo - negativo

BIBLIOTECA

Prueba de sensibilidad a Antimicrobianos.

A diferentes cepas escogidas al azar de nuestra colección (*Klebsiella pneumoniae* K01, K02, K03, K04, K06, K178, K181, K182, K183, K186) se les realizó la prueba de sensibilidad a diferentes antimicrobianos, utilizando sensidiscos (Bio Rad multidiscos gram negativos). El estudio de la sensibilidad bacteriana a 12 antimicrobianos se realizó *in vitro*. Entre los antibióticos probados fueron: Amikacina (AK) 30 μ g, Ampicilina (AM) 10 μ g, Carbencilina (CB) 100 μ g, Cefalotina (CF) 30 μ g, Cefotaxima (CTX) 30 μ g, Ceftriaxona (CRO) 30 μ g, Cloramfenicol (CL) 30 μ g, Gentamicina (GE) 10 μ g, Netilmicina (NET) 30 μ g, Nitrofurantoina (NF) 300 μ g, Pefloxacina (PEF) 5 μ g. Trimetoprima con sulfametoxazol (SXT) 25 μ g.

Las cepas fueron clasificadas en Resistentes (R) , Intermedias (I) o Susceptibles (S) dependiendo del diámetro en milímetros del halo de inhibición, de acuerdo a los estándares (ver cuadro 4) de la prueba sensidiscos Bio-rad según el antibiótico a la concentración utilizada.

Cuadro 4. Medidas estándar de clasificación de resistencia o susceptibilidad

Antibiótico	Resistente	Intermedia	Moderado	Sensible
Amikacina	≤ 14	15-16		≥ 17
Ampicilina	≤ 11	12-13		≥ 14
Carbencilina	≤ 17	18-22		≥ 23
Cefalotina	≤ 14	15-17		≥ 18
Cefotaxima	≤ 14		15-22	≥ 23
Ceftriaxona	≤ 13		14-20	≥ 21
Cloramfenicol	≤ 12	13-17		≥ 18
Gentamicina	≤ 12	13-14		≥ 15
Netilmicina	≤ 12	13-14		≥ 15
Nitrofurantoina	≤ 14	15-16		≥ 17
Pefloxacina	≤ 14	15-22		≥ 23
Trimetoprim-sulfametoxazol	≤ 10	11-15		≥ 16

Medidas del diámetro del halo de inhibición en mm incluyendo el tamaño del disco

Los resultados se muestran en la cuadro 4.

Cuadro 4. Patrón de sensibilidad a antimicrobianos de 10 cepas de *Klebsiella pneumoniae*

Bacteria	K01	K02	K03	K04	K06	K178	K181	K182	K183	K186
Antibiótico										
AK	14 (R)	14(R)	16(I)	14(R)	14(R)	17(S)	-	-	19(S)	20(S)
AM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9(R)
CF	-	-	-	-	11(R)	11(R)	-	-	20(S)	18(S)
CTX	12(R)	19(MS)	17(MS)	14(R)	26(S)	22(MS)	-	-	27(S)	26(S)
CRO	-	-	15(R)	12(R)	26(S)	21(S)	10(R)	-	25(S)	25(S)
CL	26(S)	-	-	-	-	21(S)	-	-	17(I)	20(S)
GE	17(S)	17(S)	8(R)	-	-	17(S)	-	-	17(S)	16(S)
NET	12(R)	10(R)	13(I)	10(R)	10(R)	18(S)	-	-	19(S)	18(S)
NF	10(R)	8(R)	12(R)	13(R)	12(R)	10(R)	12(R)	-	12(R)	10(R)
PEF	22(I)	21(I)	25(S)	25(S)	26(S)	17(I)	22(I)	23(S)	22(I)	24(S)
SXT	-	18(s)	-	-	-	-	-	-	25(S)	24(S)

(S) sensible (R) resistente (I) intermedia, (MS) moderadamente sensible (-) sin halo de inhibición. Medidas del diámetro del halo de inhibición en mm incluyendo el tamaño del disco.

Como se observó en los resultados del cuadro 4 tenemos diferentes grados de resistencia y susceptibilidad. Por ejemplo: la cepa K01 es sensible a Gentamicina y Cloramfenicol, la cepa K02 es sensible a Gentamicina y a Trimetoprima con sulfametoxazol, la cepa K03 es sensible a Pefloxacina al igual que la cepa K04. La cepa seleccionada aleatoriamente en este estudio (K06) es sensible a Ceftriaxona, Cefotaxima y Pefloxacina.

Debido a estos resultados, en la cual las bacterias K01, K02, K06 solo fueron susceptibles a 3 antibióticos; la cepa K03 a 2 antibióticos; la cepa K04 y la K182 únicamente a PEF; la cepa K181 no fue susceptible a ninguno de los 12 antimicrobianos retados; sin embargo la cepa K183 fue sensible a 7 antibióticos y la cepa K186 fue todavía más susceptible a 9 antibióticos, es posible concluir primero, que la mayoría de las cepas utilizadas presentan multiresistencia y segundo, de acuerdo a los diferentes patrones de susceptibilidad, las cepas son diferentes entre sí.

Debido a que aleatoriamente se seleccionó la cepa de *Klebsiella pneumoniae* K06, para llevar a cabo las posteriores infecciones adicionalmente, se le realizó a ésta únicamente la prueba de sensibilidad a antibióticos por la técnica micro placa Scan 032, para conocer y obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI) de diversos antibióticos. En la cuadro 6 se puede apreciar que esta cepa es multirresistente a varios antibióticos, pero susceptible a la mayoría de las Cefalosporinas.

Cuadro 6. Concentración Mínima Inhibitoria a diferentes antimicrobianos.

Cepa : *Klebsiella pneumoniae* K06

Antibiótico	CMI	Estado Microbiológico
Amikacina	32	Intermedio
Amp/Sulbacta	>16/8	Resistente
Ampicilina	>16	Resistente
Cefalotina	>16	Resistente
Cefazolina	>16	Resistente
Cefepime	≤4	Sensible
Cefotaxima	≤4	Sensible
Cefotetan	≤16	Sensible
Cefdopoxime	≤1	Sensible
Ceftazidima	≤2	Sensible
Ceftriaxona	≤18	Sensible
Cefuroxima	≤4	Sensible
Ciprofloxacina	≤0.5	Sensible
Gentamicina	>8	Resistente
Imipenem	≤1	Sensible
Ofloxacina	≤1	Sensible
Pip/Tazo	32	Intermedio
Piperacilina	>64	Resistente
Ticar/Clavato	64	Intermedio
Tobramicina	>8	Resistente
Trime/Sulfa	>2/38	Resistente

S= sensible I=intermedio R=resistente

CMI= µg/ml o mg/L

Obtención de fagos.

Los bacteriófagos fueron obtenidos de su medio natural de acuerdo a las técnicas descritas en materiales y métodos. De un total de 12 bacterias receptoras únicamente se logró aislar fagos de 8 cepas (K01, K02, K06, K08, K09, K10, K11, K12), y fueron seleccionados entre 5 a 10 fagos por cepa (ver cuadro 7). Estos fueron designados de acuerdo a nuestra nomenclatura, como ϕ K01-01 (donde ϕ se refiere al fago, el nombre de la cepa donde se obtuvo en este ejemplo K01- y el número seguido del guión por ejemplo, -01 nos indicó la muestra de agua residual de donde se obtuvo el fago. En ocasiones se utilizaron subíndices los cuales nos indican que en la muestra de agua hubo varios fagos con diferentes fenotipos).

Cuadro 7. Serie de fagos obtenidos para cada cepa de *Klebsiella pneumoniae*.

K01	K02	K06	K08	K09	K10	K11	K12	KL
ϕ K01-19	ϕ K02-14	ϕ K06-02 ₁	ϕ K08-04	ϕ K09-15	ϕ K10-02 ₁	ϕ K11-37	ϕ K12-32	ϕ KL-02 ₁
ϕ K01-23	ϕ K02-15	ϕ K06-04	ϕ K08-08 ₁	ϕ K09-19	ϕ K10-02 ₂	ϕ K11-38	ϕ K12-33	ϕ KL-02 ₂
ϕ K01-32	ϕ K02-19	ϕ K06-07	ϕ K08-08 ₂	ϕ K09-32	ϕ K10-04	ϕ K11-39	ϕ K12-34	ϕ KL-02 ₃
ϕ K01-38	ϕ K02-32	ϕ K06-08 ₁	ϕ K08-12 ₁	ϕ K09-33	ϕ K10-12	ϕ K11-40 ₁	ϕ K12-37	ϕ KL-04
ϕ K01-40	ϕ K02-33	ϕ K06-08 ₂	ϕ K08-16 ₁	ϕ K09-37	ϕ K10-14 ₁	ϕ K11-40 ₂	ϕ K12-39	ϕ KL-07
ϕ K01-40 ₁	ϕ K02-37	ϕ K06-11 ₂	ϕ K08-16 ₂	ϕ K09-39	ϕ K10-19 ₁	ϕ K11-41	ϕ K12-40	ϕ KL-08 ₃
ϕ K01-42	ϕ K02-38	ϕ K06-11 ₃	ϕ K08-19 ₁	ϕ K09-40	ϕ K10-37	ϕ K11-42	ϕ K12-41	ϕ KL-12
	ϕ K02-39	ϕ K06-12	ϕ K08-36		ϕ K10-38			ϕ KL-15
	ϕ K02-40 ₁	ϕ K06-13	ϕ K08-37		ϕ K10-39			ϕ KL-16
	ϕ K02-40 ₂	ϕ K06-15 ₁	ϕ K08-38		ϕ K10-41			ϕ KL-19
		ϕ K06-19 ₂	ϕ K08-39 ₁		ϕ K10-42			ϕ KL-23 ₁
		ϕ K06-23	ϕ K08-39 ₂		ϕ K10-48			ϕ KL-23 ₂
		ϕ K06-37	ϕ K08-41 ₁					
		ϕ K06-38	ϕ K08-41 ₂					
		ϕ K06-39	ϕ K08-42					
		ϕ K06-40 ₁	ϕ K08-47					
		ϕ K06-48 ₁	ϕ K08-48					
		ϕ K06-48 ₂	ϕ K08-49					
		ϕ K06-49	ϕ K08-52					
		ϕ K06-50						
		ϕ K06-54						

Selección de fagos super-virulentos

Para llevar a cabo la fago-terapia se utiliza preferentemente fagos líticos (evitar la lisogenia), y además súper virulentos (capacidad de infectar y lisar a más de una bacteria). Por lo que se realizó una matriz de infección para la elección de los fagos que constituyeron la mezcla o cóctel. El ensayo consistió en retar cada fago proveniente de una cepa contra las demás cepas de *K. pneumoniae*, obteniéndose el siguiente resultado (ver cuadro 8).

Cuadro 8. Infección de los diferentes fagos contra 9 diferentes cepas de *K. pneumoniae*.

Bacteria									
Fagos	K01	K02	K06	K08	K09	K10	K11	K12	KL
φK01-19	C	C	C	C	T	C	C	T	C
φK01-23	C	C	-	C	-	-	-	-	C
φK01-38	C	C	-	-	-	-	-	-	C
φK01-23	C	C	C	C	-	T	-	-	C
φK01-40	C	C	C	-	-	T	-	-	C
φK01-42	C	C	C	-	-	T	-	-	C
φK01-40 ₁	C	C	C	C	-	-	-	-	C
φK02-14	T	C	C	C	-	T	-	-	C
φK02-15	T	C	-	T	C	-	-	C	-
φK02-19	T	C	T	T	-	-	-	-	-
φK02-33	T	C	T	T	-	-	-	-	C
φK02-39	T	C	T	C	-	T	-	-	-
φK02-40 ₂	T	C	C	C	-	C	C	-	C
φK02-32	T	C	C	C	-	-	-	-	C
φK02-38 ₁	T	C	T	T	-	-	-	-	-
φK06-02 ₁	T	T	C	C	-	C	C	-	C
φK06-04	C	C	C	C	-	C	C	-	C
φK06-07	T	-	C	C	-	C	C	-	C
φK06-11 ₃	T	T	C	C	T	C	C	-	C
φK06-12	T	T	C	C	-	C	C	-	C
φK06-13	T	T	C	C	-	C	C	T	C
φK06-15	T	T	C	C	-	C	C	-	C
φK06-08 ₁	C	T	C	C	-	C	C	-	C
φK06-08 ₂	-	-	C	C	-	C	-	-	C
φK06-19	C	C	C	C	C	C	C	C	C
φK06-23	-	-	C	C	-	C	C	-	C

φK06-11 ₂	-	-	C	C	-	C	C	-	C
φK06-37	-	-	C	C	-	C	C	-	C
φK06-38	-	-	C	T	-	T	-	-	C
φK06-39	-	-	C	C	-	C	C	-	C
φK06-40	C	C	C	C	-	C	C	-	C
φK08-16 ₁	-	-	T	C	-	C	-	-	C
φK08-19 ₁	-	-	T	C	-	C	-	T	C
φK08-12 ₃	C	C	C	C	-	C	-	-	C
φK08-08 ₁	-	-	C	C	-	C	C	-	C
φK08-08 ₂	-	-	C	C	-	C	C	-	C
φK08-11 ₂	-	-	T	C	-	C	-	-	T
φK08-41 ₂	-	-	T	C	C	C	-	C	-
φK08-52	-	-	-	C	-	-	-	-	-
φK08-40	-	-	T	C	C	C	-	C	T
φK08-39 ₂	-	-	C	C	C	C	C	C	C
φK08-39 ₁	-	-	C	C	C	C	C	C	C
φK08-41 ₁	-	-	T	C	C	T	T	C	C
φK08-48	-	-	C	C	C	C	C	C	C
φK08-36	-	-	T	C	C	T	T	C	C
φK08-47	-	-	T	C	-	T	-	-	T
φK08-38	-	-	T	C	-	T	-	-	C
φK09-15	-	-	-	-	C	-	-	C	-
φK09-19	-	-	-	-	C	-	-	C	-
φK09-33	-	-	-	-	C	-	-	C	-
φK09-32	-	-	-	-	C	-	-	C	-
φK09-40	-	-	-	-	C	-	-	C	-
φK09-37	-	-	-	-	C	-	-	C	-
φK09-39	-	-	-	-	C	C	-	-	-
φK10-02 ₁	-	-	-	-	-	C	-	-	C
φK10-12	C	C	C	C	-	C	C	-	C
φK10-14	-	-	C	C	-	C	C	-	C
φK10-19	-	-	T	T	-	C	-	-	C
φK10-02 ₂	-	-	T	T	-	C	-	-	C
φK10-40	-	-	-	-	-	C	-	-	C
φK10-41	-	-	T	T	-	C	T	-	C
φK10-38	-	-	C	C	-	C	C	-	C
φK10-48	-	-	T	T	-	C	T	-	C
φK10-39	-	-	C	C	C	C	C	C	C
φK10-37	C	C	C	C	-	C	C	-	C

φK10-42	-	-	T	T	-	C	T	-	C
φK11-37	T	T	C	C	T	C	C	T	C
φK11-38	C	C	C	C	T	C	C	T	C
φK11-39	-	-	C	T	T	C	C	-	T
φK11-40 ₁	-	-	T	C	T	T	C	-	-
φK11-40 ₂	C	C	C	C	T	C	C	-	C
φK11-41	C	C	C	C	T	C	C	-	C
φK11-42	C	C	C	C	T	C	C	C	C
φK12-32	-	-	-	C	C	-	-	C	-
φK12-33	-	-	-	-	C	-	-	C	-
φK12-41	-	-	-	-	C	-	-	C	-
φK12-34	-	-	-	-	C	-	-	C	-
φK12-37	-	-	-	-	C	-	-	C	-
φK12-40	-	-	-	-	C	-	-	C	-
φK12-39	-	-	-	-	C	-	-	C	-
φKL-02	-	-	T	T	-	-	T	-	C
φKL-04	-	-	T	T	-	-	-	-	C
φKL-16	-	-	T	T	-	-	T	-	C
φKL-23 ₂	-	-	T	T	-	-	T	-	C
φKL-19	-	-	T	T	-	-	T	-	C
φKL-15	-	-	T	T	-	-	T	-	C
φKL-07	-	-	T	T	-	-	T	-	C
φKL-02 ₄	-	-	T	T	-	-	T	-	C

(C) Placa clara (T) Placa turbia (-) ausencia de placa

Entre estos, se seleccionaron 9 fagos. Cada fago fue capaz de lisar por lo menos 7 de las nueve cepas de *K. pneumoniae* (ver cuadro 9).

Cuadro 9. Infección de Fagos súper-virulentos en cepas de *K. pneumoniae*.

Bacteria									
Fago	K01	K02	K06	K08	K09	K10	K11	K12	KL
φK06-04	C	C	C	C	-	C	C	-	C
φK06-19	C	C	C	C	C	C	C	C	C
φK08-39 ₂	-	-	C	C	C	C	C	C	C
φK08-48	-	-	C	C	C	C	C	C	C
φK10-39	-	-	C	C	C	C	C	C	C
φK10-12	C	C	C	C	-	C	C	-	C
φK10-37	C	C	C	C	-	C	C	-	C
φK11-38	C	C	C	C	-	C	C	-	C
φK11-42	C	C	C	C	-	C	C	C	C

(C) Placa clara. (-) Sin presencia de placa.

Con relación a los fagos, podemos observar que la mayoría de los fagos tienen patrones diferentes de infección, lo cual indica que estos fagos son diferentes. Al observar la infección de los fagos provenientes de las cepas K09 y K12 podemos ver que ambas bacterias pudieran estar muy relacionadas debido a la similitud en la infección. Los fagos φK09- únicamente infectan de manera lítica a la cepa KL12 y de igual forma. los fagos φK12 únicamente pueden desarrollarse de forma lítica en la cepa K09.

Con relación a las bacterias, podemos observar en esta matriz que unas bacterias son más susceptibles que otras a la infección por fagos. Las bacterias K06, K08 y K12 son muy sensibles a la infección por fago, tanto de manera lítica o lisogénica, por otro lado la cepa K09 se comportó muy resistente a la infección de fagos de otras cepas. Posiblemente el grado de resistencia pudiera estar relacionado al número de profagos presentes en la bacteria.

Eficiencia de la actividad bactericida del cóctel de fagos *in vitro*

Este cóctel de fagos (stock de los 9 fagos juntos), fue retado con las 36 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, encontrándose que este grupo de fagos forma placas claras en un 47% de los aislados clínicos y en un 33% presentaba placas turbias.(ver cuadro 10). Con estos resultados podemos decir que el efecto antibacterial encontrado fue de un 80% en las cepas de nuestra colección. La razón por la cual la infección de varios fagos líticos pudiera producir el fenotipo de placas turbias, no nos es claro.

Cuadro 10. Eficiencia de la actividad bactericida del cóctel de fagos *in vitro*.

Bacteria	K01	K02	K03	K04	K05	K06	K07	K08	K09	K10
Cóctel	C	C	T	C	T	C	C	C	C	C
Bacteria	K11	K12	KL-147	K168	K170	K171	K174	K175	K176	K177
Cóctel	C	C	C	C	C	-	T	-	T	T
Bacteria	K178	K179	K180	K181	K182	K183	K184	K186	K188	K189
Cóctel	T	C	T	C	-	T	T	C	T	C
Bacteria	K190	K191	K192	K193	K194	K195				
Cóctel	T	-	-	-	T	-				

(C) Placa clara (T) Placa turbia (-) sin presencia de placa

Eficiencia de la actividad antibacterial del cóctel de fagos *in vivo*.

Curva de crecimiento de *K. pneumoniae* K06

En los experimentos *in vivo* se utilizó un cultivo que presentara un crecimiento bacteriano con una OD_{600nm} de 1.1 a 1.2 para la cuantificación de nuestro inóculo.

La densidad óptica fue leída en un espectrofotómetro a OD_{600nm}.

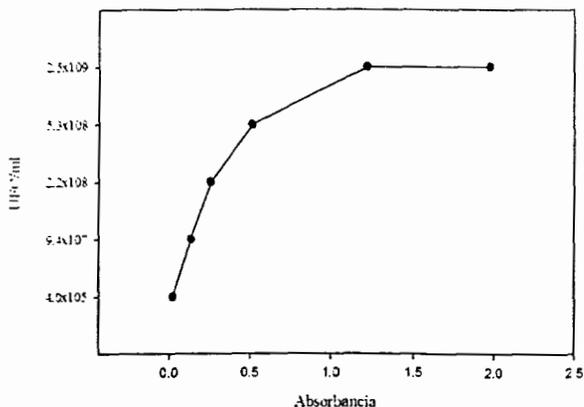


Figura 1. Gráfica de crecimiento de *K. pneumoniae*

Ensayo LD₅₀:

Para conocer el número de bacterias necesaria para causar la muerte a los ratones, primeramente se calculó la LD₅₀ de la cepa *K. pneumoniae* K06. Esta se realizó para ratones de la cepa Balb/c hembras de 6 a 8 semanas de edad y con un peso aproximado de 20 gr. Los animales de experimentación fueron alimentados *ad libitum* con una dieta normal de bioterio. Se formaron 4 grupos con 4 animales cada uno distribuidos al azar. La vía de administración de la bacteria fue punción pulmonar directa. El diluyente fue medio LB, el volumen administrado de cada dosis de ensayo fue de 100µl a concentraciones de 10⁸, 10⁷, 10⁶ y 10⁵ UFC. Se observaron las manifestaciones de la enfermedad aproximadamente a las 4 horas post-infección y se cuantificó el número de animales muertos a las 48 horas después de la infección.

Cuadro 11. Establecimiento de LD₅₀

Dosis UFC	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵
Muertos	4	3	2	0
Sobrevivientes	0	1	2	4

Animales muertos a las 48 horas post inoculación bacteriana.

En relación a este experimento, se estableció a la dosis de 10⁶ UFC como la cantidad de inóculo suficiente para eliminar el 50% de la población en 48 horas post-infección. La dosis de 10⁷ UFC de la cepa K06 fue la dosis para sacrificar al 75% de los ratones Balb/c de 6-8 semanas de edad dentro de las primeras 48 horas. La dosis de 10⁸ UFC elimina a todos los ratones dentro de las primeras 10 hrs. Por lo que la cepa *K. pneumoniae* K06 a una dosis de 10⁷ UFC/ml (no obstante, que hubo un sobreviviente) fue la condición utilizada para la infección. Los ensayos posteriores indicaron que ésta dosis eliminó a cada uno de los ratones a los que se les administró.

Efecto antibacterial del cóctel de Fagos a diferentes concentraciones.

En este ensayo se utilizaron 3 grupos de 4 ratones cada uno y se realizó por duplicado. Se les inoculó una dosis bacteriana de 100µl de *K. pneumoniae* K06 a una concentración de 10^7 UFC vía intrapulmonar. Posteriormente, 15 minutos después de la infección se dio tratamiento con el cóctel de fagos. A cada grupo se les inoculó una dosis de fagos de 100µl a diferente concentración 10^9 , 10^8 , 10^6 , 10^4 , UFP por la misma vía de inoculación que la bacteria.

El efecto bactericida producido por los fagos se observó al utilizar las dosis altas de 10^9 , 10^8 y 10^6 UFP, mostrando una sobrevivencia del 100% en los ratones, no obstante que durante las primeras horas los ratones presentaron signos de infección. Estos fueron reduciéndose durante el transcurso de los siguientes 4 días, donde finalmente su recuperación fue por completo. En cambio un decremento de 10^4 UFP en la dosis cóctel del fago resultó en un decremento en la supervivencia de los animales (cuadro 12).

Cuadro 12. Sobrevivientes al tratamiento con fagos a diferentes concentraciones.

Hora de Observaciones	Fagos 10^9 N=8	Fagos 10^8 N=8	Fagos 10^6 N=8	Fagos 10^4 N=8	Bacteria N=14	Sin tratamiento N=10
8 h	100	100	100	100	100	100
16h	100	100	100	100	92	100
24h	100	100	100	60	64	100
32h	100	100	100	50	35	100
40h	100	100	100	50	14	100
48h	100	100	100	50	7	100
56h	100	100	100	50	0	100
64h	100	100	100	50	0	100
72h	100	100	100	50	0	100

Los datos mostrados se expresan en porcentaje de supervivencia.

Grupo dosis 10^9 UFP= grupo control positivo.

Grupo Bacteria sin tratamiento = grupo control negativo.

Adicionalmente en la figura 2 se presenta el análisis gráfico de los resultados obtenidos en el ensayo del efecto antibacterial del cóctel de fagos a diferentes concentraciones.

Efecto antibacterial del cóctel de fagos a diferentes concentraciones

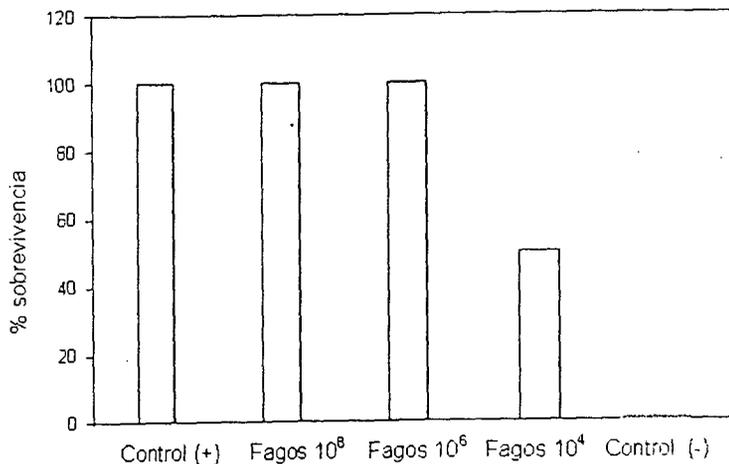


Figura 2. Efecto bactericida por el cóctel de fagos a diferentes concentraciones.

Los resultados presentados en la gráfica son los obtenidos a las 72 hrs post inoculación. Se designó grupo "control negativo" a aquel grupo de ratones inoculados con la bacteria patógena y que no recibieron tratamiento. El grupo denominado "control positivo" fue aquel grupo de ratones a los cuales únicamente se les inoculó una alta dosis de fago. La N (número de animales empleados) total fue de 8 ratones para cada grupo.

Análisis estadístico de la concentración del cóctel de fagos.

Posterior a la transformación de datos se aplicó un ANOVA de una vía ($\alpha=0.05$) encontrando diferencias significativas entre los grupos ($p=>.01$). Para determinar que concentraciones mostraban diferencias en el porcentaje de supervivencia, se realizó una prueba SNK (Student-Newman-Keuls). Los resultados se presentan en el cuadro 13.

Cuadro 13. Resultados de la prueba SNK para las diferentes concentraciones del cóctel de fagos

Concentración	N	Grupos		
		1	2	3
Control	9	0.44460721		
1.00E+04	9		0.769631824	
1.00E+06	9			1.570796327
1.00E+08	9			1.570796327
1.00E+09	9			1.570796327

El análisis nos muestra que el efecto de una alta concentración (10^8 , 10^6 UFP) tiene un comportamiento similar al grupo control positivo (10^9 UFP) el cual consiste en un porcentaje de supervivencia del 100%. El efecto de la concentración 10^6 UFP difiere significativamente tanto del grupo control negativo como del grupo control positivo, esto lo sitúa como una concentración intermedia de efectividad antibacteriana.

Efecto antibacterial del cóctel de fagos a diferentes tiempos con relación al porcentaje de supervivencia.

En este experimento se inyectó vía punción intrapulmonar un inóculo de 10^7 UFC de la cepa *K. pneumoniae* K06 a 4 grupos de 4-5 ratones para inducir la infección letal. Posteriormente se inoculó una alta dosis de fagos (10^9 UFP) a diferentes tiempos, 15min. 4hrs, 8hrs y 16 hrs. Este experimento se realizó en dos partes. La primera consistió en el tratamiento con fagos a 0 y 4 hrs. La segunda parte consistió en el tratamiento con fagos a las 8 y 16 horas. Los primeros síntomas de infección se manifestaron al transcurrir las primeras cuatro horas, los animales inoculados con la cepa patógena mostraron piloerección, coloración pálida y disminución de su actividad motora. Los signos de infección fueron mucho más marcados alrededor de las 8 horas, donde además de los síntomas antes mencionados se observó una disminución en la temperatura corporal, fluido nasal y dificultad para respirar. Los resultados muestran que una sola inyección de fagos es suficiente para rescatar al 100% de los animales, aún cuando el tratamiento es retardado hasta las 4 horas. Si el tratamiento es retardado por un tiempo mayor el porcentaje de supervivencia disminuye. Aun cuando el tratamiento fue retardado hasta las 16 horas post-infección, tiempo en que los signos de infección se presentaban muy marcados, una sola administración del fago a altas concentraciones fue suficiente para rescatar a un 66% de los ratones tratados (cuadro 14).

Cuadro 14. Porcentaje de sobrevivientes al tratamiento con fagos a diferentes tiempos.

Hora de Observ	Fagos 0h N=10	Fagos 4 h N=10	Fagos 8 h N=11	Fagos 16 h N=9	Antibiótico N=12	Bacteria S/tratamiento N=14	S/inoculación Bacteriana N=12
8 h	100	100	100	100	100	100	100
16h	100	100	100	100	100	92	100
24h	100	100	81	88	75	64	100
32h	100	100	72	66	66	35	100
40h	100	100	72	66	58	14	100
48h	100	100	72	66	50	7	100
56h	100	100	72	66	50	0	100
64h	100	100	72	66	50	0	100
72h	100	100	72	66	50	0	100

Resultados expresados en porcentaje de supervivencia. N= número de individuos por grupo.

En la figura 3 se muestra la representación gráfica de los resultados obtenidos al comparar el efecto antimicrobiano del tratamiento con el cóctel de fagos a diferentes tiempos.

Efecto del tratamiento con fagos a diferentes tiempos para rescatar a ratones de una infección letal inducida por *K. pneumoniae*

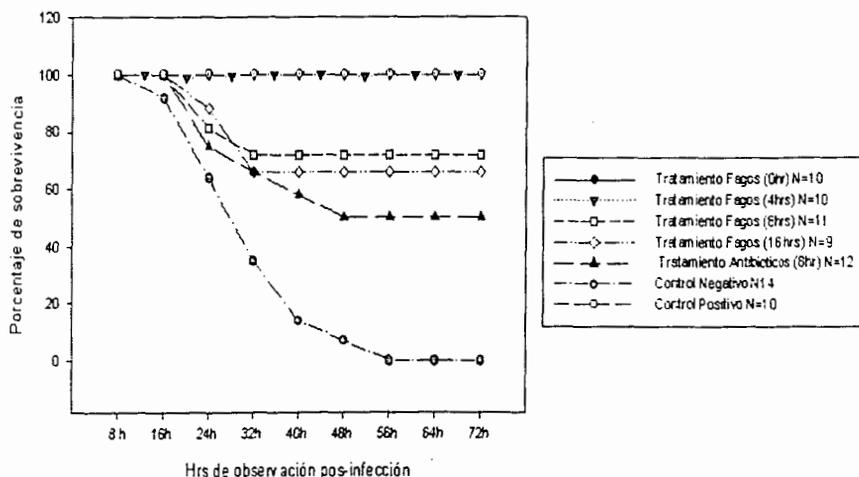


Figura 3. Efecto bactericida del tratamiento a diferentes tiempos con el cóctel de fagos.

Una sola inoculación de una alta concentración de fagos (10^9 UFP) administrado dentro de las primeras horas 4 horas después de la inoculación de la cepa patógena *K. pneumoniae* K06 fue suficiente para rescatar al 100% de la población. El efecto bactericida se expresa en porcentaje de supervivencia.

Análisis estadístico.

De igual forma, una vez transformados los datos obtenidos, se aplicó el ANOVA de 2 vías ($\alpha=0.05$) encontrando diferencias significativas entre los diferentes tratamientos y en las horas de observación con respecto a los porcentajes de supervivencia. ($p=>0.05$). Para determinar que tratamientos fueron diferentes se realizó una prueba SNK (Student-Newman-Keuls). Los resultados se presentan en el cuadro 15 y cuadro 16.

Cuadro 15. Resultados de la prueba SNK para los diferentes tratamientos

Tratamiento	N	Grupos		
		1	2	3
Control	9	0.484811111		
Antibio. 8 h	9		1.045911111	
Fago 16 h	9		1.122711111	
Fago 8 h	9		1.155522222	
Fago 0 h	9			1.5708
Fago 4 h	9			1.5708

El análisis estadístico nos mostró que las diferencias entre los tratamientos se encuentran clasificadas en 3 grupos. El primer grupo corresponde al control negativo cuya media difiere significativamente del resto de los tratamientos. El segundo grupo esta formado por el tratamiento con antibióticos aplicado a las 8 hrs. el grupo tratado con fagos a las 8 y a las 16 horas, lo que sugiere que estos 3 tratamientos no difieren estadísticamente. El tercer grupo esta comprendido por el tratamiento con fagos a las 0 y 4 hrs cuyas medias son iguales entre sí y difieren del resto de los grupos.

En cuanto a las diferencias observadas en el porcentaje de supervivencia y el tiempo transcurrido es posible la observación de 2 grupos. El primer grupo comprende las 8 y 16 horas las cuales transcurren sin muertes. El segundo grupo comprende las observaciones realizadas durante las 24 horas siguientes a la inoculación bacteriana. Es durante las 24 horas cuando el porcentaje de supervivencia empieza a disminuir significativamente.

Cuadro 16. Resultados de la prueba SNK para el tiempo de supervivencia en los diferentes tratamientos.

Hora obser.	N	Grupos	
		1	2
56 h	6	0.983933333	
64 h	6	0.983933333	
72 h	6	0.983933333	
48 h	6	1.028566667	
40 h	6	1.04195	
32 h	6	1.100516667	
24 h	6	1.2092	
16 h	6		1.523
8 h	6		1.5708

Tratamiento con Fagos contra Antibióticos

Una observación adicional se llevó a cabo al comparar el efecto de un antibiótico y el efecto de la terapia con bacteriófagos. Para este estudio el grupo de ratones tratado con antibióticos fungió como grupo control positivo (grupo donde el porcentaje de supervivencia es alto). Para producir la infección letal se inoculó la cepa patógena a una concentración de 10^7 UFC a 2 grupos de ratones. Al primer grupo, ocho horas después de la infección se les aplicó una dosis única de 10^9 UFP de la mezcla de fagos. A la misma hora a otro grupo se le administró la primera dosis de antibiótico a una concentración de 25 mg/kg peso. Inicialmente se administró Gentamicina (GE) a intervalos de 12 horas. Debido a que los resultados mostraron un bajo porcentaje de supervivencia (ver cuadro 17) se consideró un cambio de antibiótico. Se comprobó la baja participación de este antibiótico en el tratamiento de la infección ocasionada por *K. pneumoniae*. En un ensayo adicional se administró Ciprofloxacina (CPF) en igual concentración (25mg/Kg. de peso). Ambos resultados fueron tomados en cuenta para el análisis de los resultados.

Cuadro 17. Sobrevivientes al tratamiento con fagos y con antibióticos

Hora de Observa	Fagos 8 h N=11	Antibiótico 8h Gentamicina N=7	Antibiótico 8h Ciprofloxacina N=5	Aplicación Antibiótico Cada 12 hr.
8 h	100	100	100	1 dosis
16h	100	100	100	
24h	81	85	80	2 dosis
32h	72	71	80	3 dosis
40h	72	57	80	4 dosis
48h	72	42	60	
56h	72	42	60	5 dosis
64h	72	42	60	6 dosis
72h	72	42	50	7 dosis

Datos observados en porcentaje de supervivencia.

En la figura 4 se muestra la representación gráfica de los resultados obtenidos en el ensayo donde se comparó el efecto antimicrobiano del cóctel de fagos con el efecto antimicrobiano producido con los antibióticos.

Efecto antibacterial producido por el tratamiento con Fagos y con el tratamiento con Antibióticos

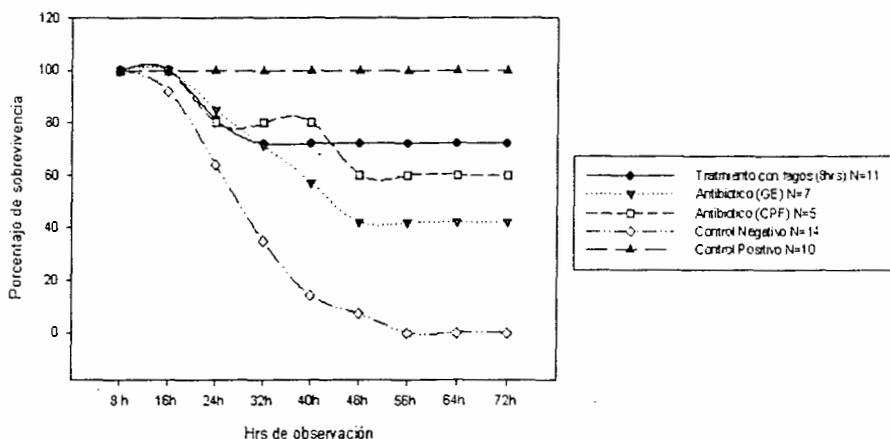


Figura 4. Efecto bactericida producido por una dosis única de fagos aplicada 8hrs después de la inoculación bacteriana y por el tratamiento con antibióticos administrada cada 12 hrs en repetidas dosis. En este gráfico se muestra el porcentaje de supervivencia al 3er día post infección. Un porcentaje de supervivencia del 72% es observado en el tratamiento con fagos en comparación a un 40 y 60% de supervivencia que presentaron los tratamientos con antibióticos.

Análisis estadístico.

Al observar el análisis del ANOVA de los diferentes tratamientos (ver cuadro 15) podemos observar que el tratamiento con antibióticos se encuentra en el mismo grupo del tratamiento con fagos a las 8 y 16 horas. Esto nos muestra que los 3 tratamientos no presentan diferencias significativas y por lo tanto los tratamientos son igualmente efectivos.

DISCUSIÓN

Los pruebas bioquímicas de las cepas bacterianas mostraron algunas variaciones. Las cepas K03 y K09 muestran un estado positivo en la prueba Rojo de Metilo y un estado negativo en la prueba Vogues Proskauer. Ambas cepas presentan un estado inverso en comparación al resto de las bacterias. Sin embargo, es posible afirmar que todas las bacterias pertenecen al genero *Klebsiella* especie *pneumoniae*. Regularmente un 98% presenta un estado positivo en la prueba del VP y un 2% positivo en la prueba Rojo de metilo. De ahí, que en raras ocasiones el patrón observado sea diferente. Sin embargo las bioquímicas mas importantes para la caracterización de *K. pneumoniae* son las pruebas de aminoácidos: Arginina (negativa), Lisina (positiva), Ornitina (negativa).

En relación a las pruebas de sensibilidad a antibióticos se mostró que la cepa *K. pneumoniae* es resistente a los antibióticos β -lactámicos, aminoglucósidos y cefalosporinas de 1° y 2° generación. Esto debido a que la cepa es productora de β -lactamasas de amplio espectro. Esta producción de enzimas se encuentra estrechamente relacionada con la adquisición de plásmidos que codifican la multiresistencia. Además se ha demostrado la existencia de una alta correlación en el uso de cefalosporinas de 3° generación como la ceftazidima y la resistencia a antibióticos por parte de *K. pneumoniae*.

Dada su naturaleza los bacteriófagos, podrían ser considerados como buenos candidatos para una terapia antibacteriana, ya que son altamente específicos entre una u otras especies de bacterias, no son tóxicos en animales ni en plantas, y tienden a incrementar su título infectando y multiplicándose, por lo que una simple dosis resultaría suficiente (2,3,4).

En este estudio se trató de conocer la efectividad de la terapia con bacteriófagos. Primeramente, fue necesario contar con los fagos. Para ello partimos con una colección de 13 cepas de *K. pneumoniae*. Se obtuvieron únicamente fagos para 9 de las cepas y para cada una de estas, de 7 a 20 fagos. Desafortunadamente no fue posible la obtención de fagos para el resto de las cepas. La resistencia de las otras cepas podría estar asociada a profagos (fagos que integran su material genético dentro del de la bacteria y permanece en asociación con la ella). Los profagos dirigen la síntesis de un represor el cual bloquea la transcripción del resto de los genes propios y además de los fagos

lisogénicos estrechamente relacionados (homoímmunes). Esto puede ser considerado como una ventaja en la competencia por otros fagos, ya que evitan el secuestro de la célula hospedera y la protegen de la infección de varios fagos líticos (5). Contrariamente, también se encontró con cepas muy susceptibles a la infección de fagos, como en el caso de las cepas K06, K08, K147.

La lisis es la disolución de la célula bacteriana y el principal fenómeno por el cual se infirió la presencia de fagos. Sin embargo, existen fagos que simplemente entran en la célula sin destruirla, como fagos "defectuosos" al entrar a la célula, se multiplican pero no son capaces de lisarla. Otros fagos los llamados temperados, pueden integrarse dentro del material genético de la célula y lisarla solo cuando son inducidos por tratamientos especiales (9).

Así, como existe la posibilidad de que un fago inhiba la infección y/o el desarrollo de otro, de igual forma, es posible y en algunos casos imprescindible la necesidad de un fago para el desarrollo de otro. Existen evidencias de tres tipos de interacción entre bacteriófagos. 1) Bacteriófagos que transfieren ADN de bacteriófagos no relacionados, 2) Bacteriófagos que suplen los receptores de la célula hospedera para la infección de otros bacteriófagos, y 3) Bacteriófagos que potencializan el desarrollo de otros bacteriófagos. Como ejemplo de este último punto, tenemos a los fagos tipo P4 de *E. coli* el cual es dependiente del fago P2, ya que requiere del producto de los genes tardíos de este último para el ensamblaje, empaquetamiento de su ADN y lisis de la bacteria hospedera, requerimientos proteicos esenciales para que el fago P4 complete su ciclo lítico y produzca viriones (10).

Hoy, resulta absurda la idea de que un sólo bacteriófago pueda atacar a todas las bacterias aún cuando estas fueran de la misma especie. Las bacterias tienen fagos particulares y estos están cercanamente relacionados a las variaciones entre especie (9). Por ello, uno de los intereses adicionales de este estudio, fue el de encontrar una posible solución a uno de los muchos problemas que obstaculizó las aplicaciones de la terapia bacteriofágica: el rango de restricción del hospedero, el cual causó que a principios de siglos la terapia fallara.

Como primer paso se decidió buscar no solo un fago que fuera capaz de lisar a nuestra cepa bacteriana, sino obtener varios de ellos que cumplieran con la característica de ser virulentos y además de que su blanco de acción fuese más extenso. Se utilizó una mezcla de 9 fagos la cual pudiera ser efectiva para cualquier cepa de *K. pneumoniae*. Al probar esta mezcla con un total de 36 aislados clínicos obtuvimos un 80% de susceptibilidad por parte de las bacterias. Aunque no se probó el efecto antibacterial con un menor número de fagos, la idea con estos estudios es contar con un cóctel con pocos fagos y un porcentaje alto de susceptibilidad.

En el ensayo *in vivo* los resultados obtenidos fueron muy alentadores. Se mostró que una sola inyección de una alta dosis del cóctel de fagos (10^9 UFP) inoculado por punción pulmonar directa es suficiente para rescatar en un 100% a los ratones de una neumonía ocasionada por *K. pneumoniae*. En los casos donde el título del cóctel fue bajo se observó una disminución en el porcentaje de supervivientes. No se utilizó otra vía de administración para ver el efecto de la aplicación del fago. Sin embargo, los estudios anteriores indicaron que, por ejemplo, cuando el fago es aplicado intramuscularmente a una concentración de 3×10^4 o 3×10^3 partículas de fago vía intravenosa, estos fueron suficientes para curar a ratones de una dosis letal ocasionada por una *Escherichia coli* MW (25). En el tratamiento contra *Pseudomonas pleogoclossicida* en peces Ayu, la concentración utilizada de 10^7 UFP y administrada oralmente, indicó que el nivel de la actividad del fago fue alta (24). En un estudio para el control de septicemia y meningitis ocasionada por una infección de *E. coli* en pollos y terneros, donde la vía de administración de los fagos fue intramuscular a una concentración de 10^4 UFP y 10^6 UFP e intracraneal de 10^8 UFP, respectivamente, fue posible evitar la infección (3). Con estos resultados se puede sugerir que la concentración mínima necesaria para la inhibición del crecimiento bacteriano *in vivo* depende de la vía de administración del fago. Del mismo modo se sugiere que los fagos pueden ser capaces de atravesar diferentes barreras, utilizar el sistema circulatorio y llegar al foco de la infección

Adicionalmente, se quiso conocer hasta donde era posible retardar la administración del tratamiento por fagos y saber hasta que punto eran evidentes los signos o síntomas de la infección en los ratones. Los resultados nos muestran que una simple dosis con un título alto del cóctel de fagos (10^9 y 10^8 UFP) administrada hasta 4

horas post-infección es suficiente para rescatar al 100% de la población infectada. Similar a lo reportado en otros estudios (4) en donde una dosis única de una alta concentración de fagos CRMEN 44 (10^9 y 10^8 UFP) inoculados intramuscularmente fueron suficiente para rescatar al 100% de los ratones infectados con un aislado clínico de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina. Este tratamiento continuó siendo positivo aún a más de 5 horas post-infección. En este mismo estudio, el tratamiento fue retardado hasta que los animales estaban casi moribundos (signos de infección muy marcados a las 24 hrs post-infección) mostrando que aún fue posible rescatar el 50% de estos animales.

Por otra parte, al comparar al comparar el efecto del tratamiento con fagos aplicado a las 8 hrs post-infección contra el tratamiento con antibiótico, igualmente a las 8 hrs post-infección, observamos que la mezcla de fagos tuvo una ligera superioridad sobre las repetidas dosis de antibióticos (Gentamicina y Ciprofloxacina). Esta observación concuerda con otros experimentos anteriores. Por ejemplo en el tratamiento generalizado de una infección cerebral ocasionada por cepas de *Escherichia coli*, (25) ya que, una sola dosis de fagos anti-K1 fue más efectiva que múltiples dosis intramusculares de Tetraciclina, Ampicilina, Cloramfenicol o Trimetoprima con Sulfametoxazol para la cura de ratones. El fenómeno de una sola dosis se debe a la propia perpetuación natural de los fagos ante la presencia de bacterias susceptibles, característica que ningún tipo de agente químico antibacteriano posee. De este modo existen estudios de modelos de dinámica poblacional que demuestran que el crecimiento exponencial en número de partículas de fagos en una sola inyección resulta ser superior a múltiples dosis por inyecciones de antibióticos (4).

Podemos resumir que el efecto curativo de los fagos que componen el cóctel tiene la habilidad para destruir rápidamente a la cepa *K. pneumoniae* en el tejido del organismo infectado. En cada experimento realizado se demuestra indirectamente que los fagos están activos y son capaces de desarrollarse, por lo tanto de reinfectar y lisar a nuevas cepas bacterianas. Regularmente en los estudios de investigación con animales, el inoculo de bacteria patógena usado para producir una infección son altos, en comparación a las situaciones clínicas normales. La habilidad de los fagos como un

potencial agente terapéutico antibacterial para rescatar a los pacientes o animales infectados es por consiguiente muy convincente.

Reportes previos habían sugerido que los bacteriófagos presentaban una baja participación en el control de infecciones bacterianas tanto en animales como en humanos por la baja actividad *in vivo* observada (debido a su especificidad restringida, la rápida eliminación por filtración del organismo, la formación de anticuerpos hacia éstos y además por el surgimiento de bacterias fago-resistentes durante el tratamiento (8,20,27). Sin embargo, las observaciones concernientes directamente a la fago-terapia como la especificidad, podría reforzar el éxito de esta, ya que al ser los fagos específicos y usarlos en el tratamiento de una infección ocasionada por determinada bacteria se evitaría que otras bacterias de la flora intestinal normal se vean afectadas, efecto que, con los antibióticos de amplio espectro es difícil de impedir que suceda. En cuanto a la resistencia, al igual que con los antibióticos pueden aparecer bacterias resistentes, sin embargo, también se dan casos de mutaciones espontáneas en genes fágicos que pueden llegar a contrarrestar la resistencia bacteriana (28).

El estudio detallado de la terapia con bacteriófagos nos conduciría a una mejor utilización de esta alternativa para disminuir la resistencia tanto por parte de los antibióticos como de los fagos. Si bien es cierto que las bacterias adquieren resistencia hacia los fagos por mutaciones, esa resistencia no esta relacionada con la resistencia a un antibiótico, de igual forma si una bacteria adquiere cierta resistencia a un antibiótico, esta mutación no esta relacionada con la capacidad de resistencia hacia el fago. Por lo tanto si una bacteria es expuesta a ambos agentes, la terapia tendría una ventaja, ya que sería muy remota la posibilidad de expresar genes de resistencia a ambos. Los reportes relacionados a tendencias mutacionales en las bacterias sugieren que existe una mutación hacia un antibiótico cada 10^6 divisiones, mientras que la tendencia de mutación hacia un fago es de 10^7 . Por lo tanto la ventaja de que la bacteria adquiera la resistencia hacia el fago resultaría del producto de ambas $10^6 \times 10^7$, esto es, 10^{13} divisiones para tener una mutación de resistencia (8).

El inocular fagos al organismo puede desencadenar el reconocimiento del sistema inmune y del sistema retículo endotelial (bazo, hígado) contra estas partículas extrañas, y como consecuencia un posterior inculo podría no ser tan eficaz. Sin embargo, para

mejorar la terapia con bacteriófagos es posible la utilización de fagos que sean capaces de evadir ambos sistemas. Para ello, se han realizado experimentos en ratones para impedir la que sean reconocidos y eliminen al fago. La inoculación se lleva a cabo por varios pases en el ratón hasta seleccionar aquellas mutantes fágicas que sean ahora capaces de evadir el sistema inmune. Por ejemplo se aislaron mutantes de fagos λ de *Escherichia coli* que ahora no son reconocidos por los anticuerpos y siguen siendo útiles como agentes antibacterianos (20).

Con el surgimiento cada vez mayor de las bacterias resistentes a antibióticos, resulta sumamente importante y necesario el explorar las aplicaciones de los bacteriófagos con potencial terapéutico. Hoy en día, la exploración de esta nueva alternativa es facilitada por el desarrollo de la biología molecular, ya que los mecanismos de interacción de fago-bacteria son mayormente entendidos. Estos conocimientos aunados con rigurosos pruebas clínicas en modelos animales están permitiendo un racional desarrollo de la terapia con bacteriófagos.

Estos resultados indican que los bacteriófagos poseen el potencial de tratar las infecciones bacterianas en animales y en humanos, y que su uso debería o deberá ser considerado nuevamente.

CONCLUSIONES

1. Las cepas bacterianas de *K. pneumoniae* cumplieron con las características bioquímicas propias del género y especie.
2. La Ciprofloxacina fue ser un antibiótico efectivo capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de *K. pneumoniae in vitro*.
3. Se obtuvieron 7 fagos para la cepa K01, 10 fagos para la cepa K02, 19 fagos para la cepa K06, 19 fagos para la cepa K08, 7 fagos para la cepa K09, 12 fagos para la cepa K10, 7 fagos para la cepa K11, 7 fagos para la cepa K12 y 17 fagos para la cepa KL147
4. El cóctel de fagos fue constituido por 9 fagos virulentos: ϕ K06-19, ϕ K06-04, ϕ K08-39₂, ϕ K08-48, ϕ K10-39, ϕ K10-12, ϕ K10-37, ϕ K11-38, ϕ K11-42.
5. Una concentración de 10^7 UFC de la cepa *K. pneumoniae* K06 fue suficiente para ocasionar la muerte a los ratones dentro de las primeras 48 hrs.
6. La eficacia del cóctel de fagos *in vitro* fue de un 80% en un total de 36 aislados clínicos de *K. pneumoniae*.
7. La concentración del cóctel de fagos 10^8 UFP administrado vía intrapulmonar fue suficiente para observar una actividad antibacteriana *in vivo*.
8. La eficacia del cóctel de fagos *in vivo* fue de un 100%, en el tratamiento de una neumonía ocasionada por *K. pneumoniae* (K06) al aplicar el tratamiento durante las primeras 4 horas posterior a la infección.
9. El tratamiento con el cóctel de fagos no presentó diferencias estadísticamente significativas en relación al tratamiento con antibióticos.
10. La terapia con bacteriófagos es efectiva en el tratamiento de neumonía ocasionada por *K. pneumoniae* en ratón.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abul-Hassan H. S., El Tahan K. Massound B., Gomaa R. (1990). Bacteriophage Therapy of Pseudomonas Burn Wound sepsis. *Annals of The Mediterranean Council for Burns and Fiere Disasters*. Vol. 3. No. 4. p.262-266.
2. Alisky J., Iczkowski K., Rapoport A., Troitsky N. (1998). Bacteriophages Show Promise as Antimicrobial Agents. *Journal of Infection*. Vol. 36. p. 5-15.
3. Barrow P., Lovell M., and Berchieri Jr. (1998). Use of Litic Bacteriophage for Control of Experimental *Escherichia coli* Septicemia and Meningitis in Chickens and Calves. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. Vol. 5. No. 3. p. 294-298.
4. Biswas B., Sankar A., Washart P., Paul B., Trostel Andrei N., Powell B., Carlton R., and Merril Carl R. (2002). Bacteriophage Therapy Rescues Mice Bacteremic from a Clinical Isolate of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. *Infection and Immunity*. Vol. 7. No.1. p.204-210.
5. Calendar R. Edited. (1988). *The Bacteriophages*. Plenum Press, A Division of Plenum Publishing Corporation., New York.
6. Cambers H.E., Merle A S. Fármacos Antimicrobianos: Aminoglucósidos. En Hardman J. G., Limbrid E., Molinogg P. B., Ruddon R., Goddman G. (1996). *Las bases Farmacológicas de la Terapéutica*. MacGraw-Hill Interamericana. Novena edición. Vol II. p. 1173-1192.
7. Cann A. J. (2000). *Principles of Molecular Virology*. Academy Press. Third edition.
8. Carlton R. M. (1999). Phage Therapy: Past History and Future Prospects. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. Vol. 47. p.267-274.
9. Douglas J. (1975). *Bacteriophages*.Chapman and Hall, Edited. London
10. Feldman B., Davis B. M., and Hoechst B., (2001). Bacteriophage-bacteriophage interactions in the evolution of pathogenic bacteria. *TRENDS in Microbiology*. Vol. 9 No.3. p.137-144.
11. Fuchs L. Y., D, Chihu L., Conde C. González V. M., Noquez A. H., Calderon E., Avonce N., Ovando C., Departamento de Biología Molecular. (1994). Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana. *Salud Pública México*. Vol. 36. p. 428-438.

12. Kapasnik-Uner J. E., Merle A. S., Fármacos Antimicrobianos: Tetraciclinas, Cloramfenicol, Eritromicinas y diversos antimicrobianos. En Hardman J. G., Limbrid E., Molinoff P. B., Ruddon. R., Goddman G. (1996). Las bases Farmacológicas de la Terapéutica. MacGraw-Hill Interamericana. Novena edición. Vol II. p. 1193-1124.
13. Koerner B. (1998). Return of a Killer: Phages may once again fight tough bacterial infections. *U.S. News and World Report*. p. 51-52.
14. Kutter E. Evergreen state College, Olympia WA. (1997). Phage Therapy: Bacteriophages as Antibiotics. www.evergreen.edu/user/t4/phagatherapy/phage.htm
15. Lederberg J. (1996). Smaller fleas...and infinitum: Therapeutic Bacteriophage redux. *Proceeding of the National Academy Science or the United States of America* Vol. 93. p. 3167-3168.
16. Lorch A. (1999). Bacteriophages: An Alternative to antibiotics?. *Biotechnology and Development Monitor*. No. 39. p. 14-27.
17. Mandell L. y Petri W. A. Jr. Fármacos Antimicrobianos: Sulfonamidas, Trimetoprima-sulfametoxazol, Quinolonas y fármacos contra infecciones de vías urinarias. en :Hardman G., Limbrid E., Mlinoff P.B., Ruddor R., Goddman G. (1996). Las bases Farmacológicas de la Terapéutica. MacGraw-Hill Interamericana. Novena edición. Vol II. p. 1123-1140.
18. Mandell L. y Petri W. A Jr., Fármacos Antimicrobiano: Penicilinas, Cepalosporinas y otros antibioticos β -lactamicos. En: Hardman J. G., Limbrid E., Mlinoff P.B., Ruddor R., Goddman G. (1996) Las bases Farmacológicas de la Terapéutica. MacGraw-Hill Interamericana. Novena edición. Vol II. p.1141-1171.
19. Maniatis T., Fritsch E.F., and Sombrook J. (1989). *Molecular cloning and Laboratory manual*. Cold sprin (A1 tomo 3) Harbor laboratory USA.
20. Merril C. R., Biswas B., Carlton R., Jensen N. C., Creed J., Zullo S., and Adhya S. (1996). Long-circulating bacteriophages as antimicrobial agents. *Proceeding of the Natural Acadademy Science of the United States of America*. Vol. 93. p. 3188-3192
21. Neu H. C. (1992). The Crisis in antibiotic Resistance. *Science*. Vol. 257. p. 1064-1073.

22. Podschun R., Ullmann U. (1998). *Klebsiella* spp. As Nosocomial pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Review*. Vol. 11 No.4. p. 589-603.
23. Rodríguez P. Los ácidos orgánicos como Agentes Antimicrobianos. Departamento de Biotecnología. Universidad Politécnica de Madrid. XVI Curso de Especialización FEDNA.
www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/000CAP8.pdf.
24. Shimura I., Fukunaga M., Mori K., and Nakai T. (2000). Isolation of Bacteriophages Specific to a Fish Pathogen *Pseudomonas Plecoglossicida*, as a Candidate for Disease Control. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 66. No. 4. p. 1416-1422.
25. Smith W., Huggins M. B.. (1982). Successful treatment of Experimental *Escherichia* Infections in Mice Using Phage: its General Superiority over Antibiotics. *Journal of General Microbiology*. Vol. 128. p. 307-318.
26. Slopek S., Durlakowa I R., Weber-Dabrowska B., Kucharewicz-Krukows A., Dabrowski M., Bisikiewicz R. (1983). Results of Bacteriophage Treatment of Suppurative Bacterial Infections. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis* Vol. 35 No. 5. p.569-583
27. Sulakvelidze A., Zempira A., and Glenn M. Jr. (2001). Minireview. Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 45. No. 3. p 649-659.
28. Summers William C. (2001). Bacteriophage Therapy. *Annuals Review Microbiology*. Vol. 55. p. 437-451.
29. Solodovnikov Yu. (2000). Phage Therapy Review
http://www.biosci.ohio-ate.edu/~mgonzalez/Micro521/Lambda/phage_intro.html
30. Zar J. H. (1996). *Bioestadistical analysis*. Simon and shustar a Vincom company. Third edition, Prentice Hall. New Jersey.

APÉNDICE I

Clasificación de Antibióticos

Antibióticos β -lactámicos.

Dentro de este grupo se encuentran las penicilinas, las cefalosporinas, los inhibidores de β -lactamasas, los carbapenems y los monobactams. Se denominan β -lactámicos por tener un anillo conformado por $C_3H_3N_2O$ conocido como anillo β -lactámico. Estos antibióticos actúan como potentes inhibidores de la síntesis de pared celular (18).

Penicilinas:

Todas las penicilinas se caracterizan por presentar un grupo químico conocido como ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) que consta de un anillo de tiazolidina condensado con un anillo β -lactámico. La acción antibacteriana de las penicilinas consiste en la capacidad de inhibir la acción de las enzimas bacterianas esenciales para la síntesis del peptidoglucano, llamadas proteínas de unión a penicilinas (PBPs) (18).

Cefalosporinas:

Las cefalosporinas son producidas y secretadas de manera natural por el hongo *Cephalosporium*. Este grupo también contiene el anillo β -lactámico y difiere de las penicilinas porque en lugar del anillo tiazólico posee un anillo de dihidrotiacina. Las cefalosporinas se clasifican en función de su actividad antibacteriana como cefalosporinas de primera generación (cefadroxil, cefazolina, cefaloridina, cefalotina) tienen actividad satisfactoria contra bacterias Gram positivas y acción relativamente moderada contra las bacterias Gram negativas. Casi todos los *cocos* Gram positivos son sensibles. Las cefalosporinas de segunda generación (cefaclor, cefamandol, cefuroxima, cefotetan, cefoxitina) tienen acción un poco mayor contra Gram negativos, pero mucho menor que la de los compuestos de la tercera generación, también son activos contra el grupo de *B. fragilis*. Las cefalosporinas de tercera generación (cefixima, cefotaxima, ceftazidima, ceftriazona, moxalactam) casi siempre son menos activas que los medicamentos de la primera generación contra *cocos* Gram positivos, pero son más activas contra Enterobacteriaceae que incluyan cepas productoras de β -lactamasas. Las

cefalosporinas de cuarta generación (cefpirome y cefepime) presentan un amplio espectro de actividad en comparación con las de la tercera generación y una mayor estabilidad a la hidrólisis por β -lactamasas mediadas por plásmidos o cromosomas.

Las cefalosporinas tienen el mismo modo de acción que las penicilinas, es decir, se unen irreversiblemente a las PBP's e impiden la formación de los puentes de entrecruzamiento de las cadenas de azúcar del peptidoglucano (18).

Inhibidores de β -lactamasas.

Los antibióticos inhibidores de β -lactamasas tienen poca actividad bactericida. Existen 3 tipos de inhibidores β -láctámicos que son: ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. El ácido clavulánico es producido de manera natural por *Streptomyces clavuligeris*. Este ácido inhibe a las β -lactamasas actuando como un inhibidor suicida, formando irreversiblemente un complejo acilo con la β -lactamasa y disminuyendo la actividad de la enzima. El sulbactam, es un compuesto semisintético de la 6-desaminopenicilina sulfona inhibe de manera similar al ácido clavulánico pero con menos actividad antibacteriana. El tazobactam, es un compuesto de ácido penicilánico sulfona, esta relacionado estructuralmente con el sulbactam, y su actividad es más potente que la del ácido clavulánico (18).

Carbapenems

El primer antimicrobiano de este tipo es el imipenem (n-formimidóil tienamicina), el cual es un derivado semisintético de la tienamicina y es producido de manera natural por *Streptomyces spp.* Imipenem se une a las proteínas de unión de penicilinas 1 y 2 (PBP 1 y PBP 2) de las bacterias Gram negativas y Gram positivas, causando alargamiento y lisis celular (18).

Monobactams

Un antibiótico de este tipo es el aztreonam, cuenta con una estructura monocíclica y presenta actividad antibacteriana contra Gram negativos. Se une primeramente a PBP 3 de enterobacterias, *Pseudomonas sp.* y microorganismos Gram negativos anaeróbicos, produciendo estructuras filamentosas (las β -lactamasas no pueden hidrolisar) y por lo

tanto, se detiene la síntesis de la pared celular provocando la muerte de la célula bacteriana (18).

II. Aminoglucósidos.

Los aminoglucósidos son cadenas de aminoazúcares unidos por enlaces glicosídicos. Se han aislado de *Micromonospora sp.* (gentamicina, sisomicina y netilmicina) o de *Streptomices sp.* (estreptomicina, kanamicina, neomicina y tobramicina). Los aminoglucósidos actúan como agentes bactericidas inhibiendo la síntesis de proteínas y uniéndose irreversiblemente a la subunidad 30s del rRNA, evitando así la traducción del RNAm durante la síntesis de proteínas y provocando que la célula muera. Estos antibióticos constan de una potente actividad bactericida contra bacilos Gram negativos (6).

III. Quinolonas

Las quinolonas son compuesto químicos conocidos como fluoroquinolonas. contienen un átomo de fluor. Las quinolonas mas empleadas son el ácido nalidixico, la norfloxacin y la ciprofloxacina, entre otras. Las quinolonas actúan uniéndose primeramente a la DNAgirasa (enzima esencial para la replicación del ADN) ya que el ADN no se superenrolla provocando la muerte de la bacteria rápidamente. Las quinolonas pueden presentar una actividad antibacteriana reducida en presencia de pH y cationes divalentes (Mg^{2+} y Ca^{2+}) (17).

IV. Tetraciclinas

Las tetraciclinas son antibióticos bacteriostáticos de amplio espectro con un núcleo hidronaftaceno, el cual contiene 4 anillos fusionados. Se clasifican basados en la duración de su acción en 3 grupos: Grupo 1. acción corta, (oxitetraciclina y clortetraciclina) Grupo 2. acción intermedia (demeclociclina y metaciclina) y Grupo 3. acción prolongada (doxyciclina y minociclina). Las tetraciclinas actúan inhibiendo la síntesis de proteínas de los microorganismos. Estos antibióticos entran a la bacteria por un proceso dependiente de energía y se unen a la subunidad 30s del rARN, lo cual ocasiona un bloqueo de acceso del aminoácil-tRNA hacia el complejo ribosomal e

impidiendo así la síntesis de polipéptidos. Las tetraciclinas son efectivas contra Gram positivos, Gram-negativos, mycoplasmas, clamydiae, rickettsiae y algunos protozoarios (12).

V. Macrólidos

Los Macrólidos son derivados de *Streptomyces erythreus*. Se caracterizan por contener anillos lactónicos grandes unidos a una fracción glucosídica. Es posible que existan variaciones tanto en el anillo lactónico como en la parte glucosídica, generando una gran variedad de estos. Los macrólidos más conocidos son la eritromicina, la oleandomicina, la espiramicina, la tilosina, la claritromicina y la azitromicina. En general los macrólidos actúan como inhibidores de la síntesis de proteínas uniéndose a la subunidad 50s de rRNA, bloqueando la reacción de translocación de la cadena de alargamiento del polipéptido. Estos antibióticos pueden actuar contra microorganismos Gram-positivos y algunos Gram-negativos (12).

VI. Glicopéptidos y polipéptidos

Dentro de los polipéptidos se encuentra la vancomicina, antibiótico producido por *Streptomyces orientales* y la daptomicina, lipopéptido semisintético producido por *Streptomyces roseosporus*. Los glicopéptidos inhiben la síntesis del peptidoglucano a través de la formación de complejos con la D-alanil-D-alanina (porción precursora de la formación de la pared celular). Los glicopéptidos actúan contra microorganismo Gram positivos aeróbicos y anaeróbicos (12).

VII. Sulfonamidas y Trimetoprima

Estos antibióticos son agentes antimicrobianos semisintéticos, se derivan de la sulfanilamida, la cual es similar en la estructura química del ácido para-aminobenzoico, un factor esencial para la síntesis del ácido fólico. La Trimetoprima es un análogo de pirimidina que inhibe la enzima dihidrofolato reductasa interfiriendo con el metabolismo del ácido fólico y bloqueando la vía metabólica de este ácido. Las sulfonamidas actúan contra una variedad de bacterias Gram positivos y Gram negativos, así como contra

actinomycetes, clamidia, toxoplasma y plasmodia. El Trimetoprima es activo contra bacterias Gram positivos y Gram negativos (17).

VIII. Cloramfenicol

El cloramfenicol es un antimicrobiano de amplio espectro que contiene un anillo nitrobenzeno y es producido por *Streptomyces venezuelae*. Es un agente bacteriostático, inhibe la síntesis de proteínas uniéndose a la subunidad 50s del rARN y evita el proceso de transpeptidación durante el alargamiento de la cadena peptídica (12).

APENDICE II

Preparación de medios

Los medios de cultivo y soluciones empleados en el cultivo de la cepa bacteriana y en la detección de bacteriófagos se esterilizan por autoclave durante 15 minutos a 121° C a 15 libras de presión. El sulfato de magnesio se adiciona una vez esterilizado el medio.

Medio Luria-Bertani (LB) para cajas petri 1L.

Bacto-triptona	10g
Bacto-levadura	5g
Bacto-agar	15g
Cloruro de sodio (NaCl)	5g
Sulfato de magnesio (MgSO ₄) 1M	10ml

Medio LB liquido 0.5 L

Bacto-triptona	5g
Bacto-levadura	2.5g
Cloruro de sodio (NaCl)	2.5g
Sulfato de magnesio (MgSO ₄) 1M	5ml

Medio Tβ (Tryptona "broth" medio) para cajas petri 1L

Bacto-triptona	10g
Bacto-agar	11g
Cloruro de sodio (NaCl)	5g
Sulfato de magnesio (MgSO ₄) 1M	10ml

Medio Tβ suave 0.5 L

Bacto-triptona	5g
Bacto-agar	3.5g
Cloruro de sodio (NaCl)	2.5g
Sulfato de magnesio (MgSO ₄) 1M	5ml

Medios de Cultivo Diferenciales**Medio MacConkey para cajas Petri 1 L**

Bacto- peptona	17g
Mezcla de peptonas	3g
Mezcla de sales biliares	1.5g
Cloruro de sodio	5g
Bacto- agar	13.5g
Rojo neutro	0.03g
Cristal violeta	0.001g

Microorganismos	Colonias
<i>Escherichia coli</i>	Rojas con halo turbio
<i>Klebsiella spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i>	Rosadas mucosas
<i>Salmonella spp.</i> , <i>Shigella spp.</i>	Incoloras, transparentes
<i>Proteus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i>	Diminutas, opacas

Agar Verde Brillante para cajas Petri 1 L

Extracto de levadura	3g
Mezcla de peptonas	10g
Cloruro de sodio	5g
Lactosa	10g
Sacarosa	10g
Agar	20g
Rojo de fenol	0.08g
Verde brillante	0.0125g

Microorganismos	Colonias
<i>Salmonella spp.</i>	Rosa, blancas o transparentes sobre fondo rojo
Organismos lactosa (-)	
<i>E. coli</i> , <i>Enterobacter spp.</i>	Verde amarillento
<i>Klebsiella spp.</i>	sobre fondo amarillento

Agar Hektoen para cajas Petri 1L

Peptona de carne	12g,
Levadura,	3g
Sales biliares,	9g
Lactosa	12g
Sacarosa	12g
Salicina	2g
Cloruro de sodio	5g
Citrato de hierro y amonio	1.5g

Microorganismos	Colonias
<i>Shigella spp.</i> , <i>Providencia</i> <i>p</i>	Verdes, elevadas, húmedas
<i>Salmonella spp.</i> , <i>Proteus</i> <i>spp.</i>	Verde-azuladas, con o sin centro negro
<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> <i>spp.</i>	Rosa salmón rodeadas en algunas ocasiones por un precipitado biliar
<i>Enterobacter spp.</i>	

Agar	14g
Azul de bromotimol	0.065g
Fucsina ácida	0.1g

Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media)

Sales inorgánicas

CaCl ₂	200mg/L
Fe(NO ₃) ₃	0.10mg/L
KCl	400mg/L
MgSO ₄	97.67mg/L
NaCl	750mg/L
NaHCO ₃	700 mg/L
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	125mg/L

Otros componentes

D-Glucosa	4500 mg/L
Rojo de Fenol	15 mg/L
HEPES	4958 mg/L

Aminoácidos

L-Arginina H ₂ O	84 mg/L
L-Cisteina H ₂ O	63 mg/L
L-Alanyl-L-Glutamina	862 mg/L
Glicina	30 mg/L
L-Histidina HCl 2H ₂ O	42 mg/L
L-Isoleucina	105 mg/L
L-Leucina	105 mg/L
L-Lisina H	146 mg/L
L-Metionina	30 mg/L
L-Fenilalanina	66 mg/L
L-Serina	42 mg/L

L-Treonina	95 mg/L
L-Triptofano	16 mg/L
L-Tirosina 2Na 2H ₂ O	104 mg/L
L-Valina	94 mg/L

Vitaminas

D-Ca pantotenato	4 mg/L
Colina Chlorida	4 mg/L
Acido Folico	4 mg/L
i-Inositol	7.20 mg/L
Niacinamida	4 mg/L
Riboflavina	0.40 mg/L
Thiamina HCl	4 mg/L
Pyridoxina HCl	4 mg/L

Soluciones

a- dil (TMG-buffer)

Tris base	1.2g
Sulfato de magnesio (MgSO ₄) 1M	5g
Gelatin	10g

Ajustar el pH a 7.4 con HCl.