

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJACALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS E INGENIERIA

Maestría y Doctorado en Ciencias de la Salud



“Aislamiento y caracterización de bacteriófagos con actividad lítica específica contra cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (SARM)”.

TESIS

Que para obtener el grado de:
Maestro en Ciencias de la Salud

PRESENTA

Q.F.B. Efraín Armenta Rojas

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Mirna del Carmen Brito Perea

CODIRECTORA DE TESIS

Dra. Lilia Angélica Hurtado Ayala

Tijuana, B.C.

Diciembre, 2017.

Tijuana, B. C., 11 de diciembre de 2017.

DR. PAUL ADOLFO TABOADA GONZÁLEZ
COORDINADOR DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN FACULTAD DE
CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA PRESENTE:

A través de este medio, me dirijo a usted para informarle que la primera etapa (correspondiente a la escritura del documento de tesis) del proceso de obtención de grado de la estudiante de Maestría en Ciencias de la Salud, QFB Efraín Armenta Rojas, ha concluido.

El documento titulado: "Aislamiento y caracterización de bacteriófagos con actividad lítica específica contra cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM)" ha sido revisado por mi persona en calidad de director de tesis, y cumple con los requisitos normativos para la obtención del grado de Maestro en Ciencias de la Salud, dentro del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería.

Por tal motivo, y en cumplimiento de las normas operativas del programa, me permito sugerirle al siguiente Jurado de Tesis:

Dra. Mima del Carmen Brito Perea
Presidente

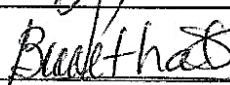
Dra. Lilia Angélica Hurtado Ayala
Secretario

Dra. Bertha Landeros Sánchez
Sinodal

Dr. Horacio Eusebio Almanza Reyes
Sinodal

M.C. María del Carmen Jauregui Romo
Suplente









Esperando una respuesta favorable, quedo de Usted.

Atentamente



Dra. Mirna del Carmen Brito Perea
Director de Tesis



Dra. Lilia Angélica Hurtado Ayala
Co-director de Tesis



Q.F.B. Efraín Armenta Rojas
Alumno

DEDICATORIA

A Dios, por otorgarme la capacidad de alcanzar mis sueños y estar siempre a mi lado, pero sobre todo por la gente que ha puesto en mi camino para ayudarme y acompañarme.

A mis padres Efraín y Rebeca por traerme a este mundo y siempre apoyarme en mis proyectos, no tengo con que agradecer todo lo que han hecho por mí, por ustedes soy el hombre en el que me he convertido, los amo.

A mi hermana, Keyly te seguí en esta profesión y ahora comparto contigo los logros, te quiero hermanita.

A mi sobrina, Kenny, por enseñarme lo que es ser un Súper Héroe y recordarme que lo más simple de la vida es maravilloso.

A mis abuelos Patricio, Casimira, Esteban y Felicitas, por ser el pilar de esta familia por tantos años, por más alto que vuele no olvidaré mis raíces, los amo, abuelita Casi, no pude conocerte, pero nos veremos en el cielo.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

A mi comité de entrevista para ingreso a la maestría, *Dr. José Luis Sánchez Palacio, Dr. Samuel Guillermo Meléndez López, Dra. Bertha Landeros Sánchez, Dra. Rosa Elena Mares Alejandre*, por confiar en mí para continuar con mis estudios y poner en alto el nombre de mi Alma Mater, pero sobre todo de mi Facultad.

De manera muy particular a mi Directora de tesis, *Dra. Mirna del Carmen Brito Perea* por adoptarme y compartir conmigo el amor por los fagos, por su paciencia, conocimientos y cariño en estos dos años que hicieron posible este trabajo, mil gracias.

A mi Co-Directora de tesis, la *Dra. Lilia Angélica Hurtado Ayala* por todo su apoyo durante el desarrollo de este proyecto, usted fue quien sembró en mí el amor por la microbiología, por su ayuda desde cátedras, asesoría en su laboratorio hasta palabras de ánimo, gracias maestra.

A la *Dra. Bertha Landeros Sánchez* por toda su paciencia su apoyo y colaboración para la realización de este proyecto, por siempre estar ahí, por las clases impartidas y salidas a comer, por sus críticas y correcciones que me ayudaron a mejorar, muchas gracias maestra.

A la *M.C. María del Carmen Jáuregui Romo* por todo su apoyo y sus atinadas observaciones durante mis evaluaciones, las cuales contribuyeron ampliamente en mi formación durante la maestría.

Al *Dr. Horacio Eusebio Almanza Reyes*, docente investigador de la Facultad de Medicina y Psicología, por trabajar en conjunto de manera entusiasta y desinteresada en este proyecto.

Al *Dr. Ignacio Alfredo Rivero Espejel*, docente investigador del Instituto Tecnológico de Tijuana, por compartir sus conocimientos y dedicar su valioso tiempo a este trabajo, sus aportaciones fueron indispensables, Doctor, gracias por adentrarse en el maravilloso mundo de los fagos.

Al *Dr. Luis Enrique Palafox Maestre*, por depositar su confianza en mí desde el día en que le pedí mi cambio de turno en la licenciatura, por todo el apoyo que tuvo para conmigo, le dije que no se iba a arrepentir, muchísimas gracias.

Al *Dr. Iván Córdoba Guerrero*, por despertar el interés en mí de entrar en el mundo de la investigación, maestro, nunca olvidaré el día que me propuso que me convirtiera en investigador.

A la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, por el apoyo económico para la realización de mis estancias de investigación y el desarrollo de este trabajo, al personal docente que me transmitió sus conocimientos con paciencia y cariño.

A Diana, Francis, Paty, Rosy, Martha, Laura, Andrea, Domini y Jehieli, personal administrativo que me orientó en los diversos trámites requeridos y siempre me apoyó con palabras de ánimo, chicas, ustedes saben todo lo que han hecho por mí desde que era un simple estudiante de licenciatura (eterno becario) no tengo como pagarles tanto, mil gracias.

Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) en especial al *Dr. Sergio Francisco Martínez Díaz*, por compartir generosamente sus conocimientos y adoptarme en su laboratorio y al *Dr. César Salvador Cardona Félix*, por todo su apoyo, muchas gracias.

A mis compañeros y amigos de CICIMAR, Eugenio, Carlos, Karla, Diana, Erika y Román, gracias por aceptarme y animarme en mi paso por su laboratorio.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), en especial al *M.C. Rodrigo Hernández Santiago* por aceptar el convenio de colaboración y transmitirme sus conocimientos, al *Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño* por su apoyo incansable y por abrirme las puertas de su hogar, mil gracias.

A mis amigos del laboratorio de microbiología de la FMVZ, Mauricio, Eduardo, José, Lia, Jaime, Donald y Judith, gracias por su ayuda en el laboratorio, por adoptarme, abrirme las puertas de sus casas y animarme todos los días, sin ustedes no hubiera podido lograr esto.

A Don Mario, Rosalva y su familia, mil gracias por aceptarme en su hogar, por animarme y confiar en mí durante mi estancia en La Paz, se convirtieron en mi familia.

A mi amigo Samuel, mil gracias por abrirme las puertas de tu casa en mi estancia en Monterrey, por las pláticas de madrugada y las palabras de ánimo.

Al pastor Daniel Álvarez y su familia, por adoptarme, por confiar en mí y permitirme vivir en su hogar el tiempo de mi estancia en Monterrey, no tengo como pagarles todo lo que hicieron por mí, mil gracias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por su apoyo y patrocinio para la realización de este proyecto de tesis.

ÍNDICE

Índice	6
Índice de Tablas	8
Índice de Figuras	9
Índice de Abreviaturas	10
Resumen	12
I.- INTRODUCCIÓN.....	13
II.- ANTECEDENTES.....	14
III.- JUSTIFICACIÓN.....	18
IV.- GENERALIDADES	19
4.1 Virus	19
4.1.1 Estructura y Función.....	19
4.1.2 Clasificación	21
4.2 Bacteriófagos.....	21
4.2.1 Clasificación taxonómica	22
4.2.2 Ciclo replicativo	24
4.3 La bacteria huésped: <i>Staphylococcus aureus</i>	27
4.3.1 Bacteriófagos de <i>Staphylococcus aureus</i>	29
4.3.2 Contribución a la evolución y patogénesis de <i>S. aureus</i>	29
4.4 Familias de bacteriófagos para <i>Staphylococcus</i>	30
4.4.1 Familias Morfológicas.....	30
4.4.2 Características Genómicas.....	30
V.- OBJETIVO GENERAL	35
5.1 Objetivos Específicos	35
VI.- METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN	36
6.1 Sitios donde se llevó a cabo el protocolo experimental.....	37
6.1.1 Sitios de muestreo.....	37
6.1.2 Temporalidad	37
6.2 Criterios.....	38
6.2.1 Criterio de Inclusión.....	38
6.2.2 Criterio de Exclusión.....	38
6.3 Variables	38

6.3.1 Variables independientes	38
6.3.2 Variables dependientes	38
6.4 Muestra	39
6.4.1 Tamaño de muestra	39
6.5 Materiales y métodos	39
6.5.1 Método para colección de muestras de agua	39
6.5.2 Método para colección de muestras de cultivos bacterianos	40
6.5.3 Método para el aislamiento de cepas de SARM	40
6.5.4 Metodología para la preparación de un tapiz bacteriano.....	41
6.5.5 Método para el aislamiento y propagación de bacteriófagos.....	41
6.5.6 Método para la determinación del rango de hospederos	43
6.5.7 Método para la concentración de fagos	43
6.5.8 Método para la estandarización del método de tinción negativa para microscopia electrónica.....	43
6.5.9 Método para la extracción de ADN fágico.....	44
6.6 Actividades	45
VII.- RESULTADOS.....	48
7.1 Aislamiento de fagos	48
7.2 Microscopia Electrónica.....	51
7.3 Rango de Hospederos.....	56
7.4 Extracción de ADN	57
7.5 Discusión.....	58
7.6 Conclusiones.....	60
7.7 Recomendaciones.....	61
7.8 Perspectivas.....	61
VIII.- BIBLIOGRAFIA	62
APÉNDICE	75

Índice de Tablas

Tabla 1.- Factores de virulencia codificados por bacteriófagos.

Tabla 2.- Relación de muestras de aguas y fagos aislados

Tabla 3. Cepas de *Staphylococcus aureus* utilizadas en este trabajo.

Tabla 4. Fagos aislados y cepas huésped utilizadas para su propagación.

Tabla 5. Rangos de hospederos de los fagos aislados.

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura de un virus.

Figura 2. Morfotipos básicos de los Bacteriófagos.

Figura 3. Morfologías de las tres familias de los Caudovirales.

Figura 4. Ciclo lítico y lisogénico de los bacteriófagos.

Figura 5. Micrografía electrónica de *Staphylococcus aureus*.

Figura 6. Organización modular de los genomas de fagos de *Staphylococcus*.

Figura 7. Placas líticas correspondientes a los fagos aislados.

Figura 8. Micrografía de Fago F-88.

Figura 9. Micrografía de Fago F-83.

Figura 10. Micrografía de Fago F-36.

Figura 11. Micrografía de Fago F-53.

Figura12. Prueba de puntos para determinar rango de hospederos.

Índice de Abreviaturas

®: Marca Registrada

°C: Grados Celsius

μL: Micro litros

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

CaCl₂: Cloruro de Calcio

CESPT: Comisión Estatal de Servicios Públicos Tijuana

CICIMAR: Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas

FCQI: Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

FMVZ: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

FMyP: Facultad de Medicina y Psicología

H.G.O. y U.M.F. No. 7: Hospital General Obstétrico y Unidad de Medicina Familiar
Número 7.

H.G.R. No. 1: Hospital General Regional Número 1.

H.G.R. No. 20: Hospital General Regional Número 20.

Kb: Kilobase

MgCl₂: Cloruro de Magnesio

mL: Mililitro

mM: Miliomolar

rpm: Revoluciones por minuto

SARM: *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina

TRIS: Tris(hidroximetil)aminometano

TSA: Trypticase Soy Agar

™: Trademark

UABC: Universidad Autónoma de Baja California

UANL: Universidad Autónoma de Nuevo León

UFP: Unidades Formadoras de Placa

Resumen

Aislamiento y caracterización de bacteriófagos con actividad lítica específica contra cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM)

Objetivo. Aislar bacteriófagos de muestras de aguas contaminadas, para establecer su efecto lítico sobre cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. **Métodos.** Estudio experimental de acuerdo a los principios del Método Científico, se inició con la recolección de muestras de fuentes de agua contaminada de drenaje profundo para el aislamiento de los bacteriofagos, adicionalmente se obtuvieron muestras de cultivos bacterianos para el aislamiento de cepas de SARM. Se realizaron pruebas de resistencia a Meticilina de las cepas aisladas mediante el uso de sensidiscos de cefinace. Se estandarizó el método para el aislamiento de bacteriófagos de *Staphylococcus aureus* a partir de muestras de agua y con base en este método se llevó a cabo el aislamiento y propagación de Bacteriófagos líticos para las cepas de SARM. Se llevaron a cabo pruebas para determinar el Rango de Hospederos de los Bacteriófagos aislados por la técnica de puntos. Se estandarizó el método para la microscopía electrónica de los Bacteriófagos, se obtuvieron imágenes de los fagos aislados y finalmente se extrajo el ADN de los fagos aislados por el método de Fenol-Cloroformo para su posterior análisis. **Resultados.** Se aislaron 4 bacteriófagos líticos a partir de las muestras de agua recolectadas (F-88, F-83, F-53 y F-36), se determinó su rango de hospederos siendo el fago F-53 el que infectó el mayor número de cepas (95%), mediante microscopía electrónica se obtuvieron imágenes de todos los fagos con las que se clasificaron de acuerdo a su morfología. Por el método de Fenol-Cloroformo se obtuvo el ADN de los bacteriófagos aislados. **Conclusiones.** Todos los fagos aislados fueron identificados como miembros del orden Caudovirales y familia Siphoviridae, fueron clasificados en 4 especies que pudieron ser diferenciadas por su rango de hospederos. Por su amplio rango de hospederos los fagos aislados podrían ser candidatos a ser utilizados en la identificación de bacterias (fagotipificación) o el control de infecciones clínicas (fagoterapia).

I.- INTRODUCCIÓN

Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan únicamente bacterias, la fagoterapia involucra el uso de fagos líticos para eliminar específicamente bacterias patógenas como complemento o alternativa a las terapias convencionales con antibióticos. El uso de esta terapia surgió 10 años antes del descubrimiento de la penicilina (1919) y se volvió una práctica común en países como Georgia, Rusia y Polonia, entre la década de 1930 y 1940 (Häusler, 2006).

A pesar de que el interés en la fagoterapia se redujo en occidente después de la introducción de los antibióticos, recientemente se ha retomado, sobre todo debido a investigaciones que indican que la terapia de fagos puede ser eficaz en el tratamiento de infecciones graves causadas por enterococos resistentes a vancomicina y *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM) (Johnson et al., 2008).

Actualmente la base de datos GeneBank cuenta con las secuencias completas de 500 bacteriófagos. En el caso del género *Staphylococcus* se han secuenciado aproximadamente 68, cabe mencionar que solo una pequeña fracción de estos son líticos y por lo tanto candidatos a ser utilizados con fines terapéuticos. Las cepas bacterianas pueden ser resistentes o generar resistencia a los fagos, de ahí que, se requiere realizar un aislamiento constante de fagos líticos con la finalidad de mantener la suficiente cantidad de virus que puedan destruir a la cepa de interés (Hatful, 2008; Deghorain, 2012).

II.- ANTECEDENTES

En 1896, Ernest Hanbury Hankin, un bacteriólogo británico demostró que el agua de los ríos Ganges y Yamuna en la India poseían actividad antimicrobiana contra la bacteria causante del cólera, dos años después el científico ruso Nikolay Gamaleya observó un fenómeno similar mientras trabajaba con *Bacillus subtilis*. En 1915 Frederick Twort en Inglaterra, retomó la investigación de Hankin reportando la misma actividad bactericida, sugiriendo otras hipótesis para explicarlo, entre las cuales mencionaba la posibilidad de que se tratara de un virus, sin embargo por varias razones, incluyendo falta de recursos económicos Twort no continuó esta investigación, a su vez diversos científicos alrededor del mundo documentaron la actividad de los bacteriófagos sin poder reconocer o identificar a los agentes responsables (Sulakvelidze, 2001; Elbreki et al., 2014; Wittebole, 2014).

El descubrimiento de los bacteriófagos se atribuye a los trabajos de Felix d'Herelle Químico Franco-canadiense quien, en el Instituto Pasteur de París, fue el primero en aislar un agente capaz de destruir a la bacteria causante de la disentería en 1917 durante una epidemia entre los soldados franceses, al cual llamó "*un microbio invisible con propiedades antagonistas contra el bacilo patogénico*" (Orlova, 2012)

Sin embargo, existe evidencia de la observación del efecto de los bacteriófagos tiempo antes de su descubrimiento. Donna H. Duckworth en su publicación "Who Discovered Bacteriophage?" cita uno de los diarios de d'Herelle donde este último hace referencia a un estudio realizado durante su estancia en México en el año de 1910 y en el que observó que algunas langostas morían a causa de una enfermedad similar a la disentería. En los cultivos de la bacteria (*Enterobacter aerogenes*) causante de esta enfermedad, encontró que existían lugares sin crecimiento y al analizar una muestra en el microscopio, pudo observar que se encontraba completamente vacía; hoy en día, se atribuye este fenómeno a la actividad de los bacteriófagos sobre la bacteria causal (Duckworth, 1976).

Una vez descubiertos los bacteriófagos, su primera aplicación en humanos se remonta a 1919, cuando Felix d'Hérelle trató a algunos niños que sufrían de disentería severa en el Hospital des Enfants Malades de París, utilizando el bacteriófago que aisló en el Instituto Pasteur, sin embargo, los primeros en documentar su uso fueron Bruynoghe y Joseph Maisin en 1921 utilizándolos para tratar infecciones de la piel causadas por *Staphylococcus sp.* (Sulakvelidze A, 2001).

Al mismo tiempo continuaron surgiendo centros de investigación encaminados a esta terapia y el propio Felix D'herelle se aseguraba que en estas instituciones se utilizaran los fagos y el tratamiento que él mismo había desarrollado, ya que consideraba que de esta forma se garantizaba la calidad y efectividad de los fagos producidos. Otros investigadores como George Eliava exploraron nuevos usos terapéuticos de los fagos en infecciones por *Staphylococcus sp.* y *Streptococcus sp.* que posteriormente fueron probados por el cirujano Raiga (Dublanchet, 2011).

Debido a los descubrimientos de esa época el ministro de salud de la Unión Soviética aprobó las preparaciones de fagos para su uso en humanos y fue así que en tiempos de guerra los soldados soviéticos y alemanes llevaban consigo viales de bacteriófagos como parte de su equipo. Al mismo tiempo en los Estados Unidos de América se aprobaron para su venta algunos productos a base de bacteriófagos por parte de la compañía Eli Lilly quien obtuvo el permiso para comercializar siete preparaciones de fagos diferentes contra *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.* y *E. coli.*, no obstante, la calidad de estos productos era pobre debido a la falta de tecnología y los métodos no estandarizados de purificación que se utilizaban (Sandeep, 2006).

En 1940 los antibióticos fueron introducidos como “la cura para todas las infecciones bacterianas” y debido a esto gran parte de la investigación sobre bacteriófagos fue abandonada y no fue retomada sino hasta 1980. En la Unión Soviética y el Este de Europa se continuó con la investigación sobre bacteriófagos debido a su limitado acceso a los antibióticos, sobre todo en el Instituto Eliava en Tbsilisi, Georgia que

es considerado el centro de investigación más importante en cuanto a producción e investigación de fagos terapéuticos se refiere (Clark et al., 2006; Done, 2007).

A principios de la década de 1940 en Alemania Helmuth Ruska obtuvo la primera imagen de un bacteriófago, después de los esfuerzos de un grupo de científicos que lograron construir el primer microscopio electrónico y los definieron como "partículas ultramicroscópicas constituidas de nucleoproteína y dotadas de una estructura geométrica; que muestran capacidad infectiva y antigénica que puede demostrarse en ensayos biológicos; pueden mutar y ocasionalmente integrarse en los cromosomas de las células hospederas" (Ackermann, 2011).

A mediados de la década de 1980 una serie de artículos fueron publicados donde se registran 550 casos de infecciones bacterianas supurativas (empiemas, peritonitis, osteomielitis, entre otras.) causadas por patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli*. La mayoría eran infecciones crónicas por cepas resistentes a todos los antibióticos disponibles; y no fueron considerados los bacteriófagos como tratamiento hasta que se comprobó la poca efectividad de los antibióticos utilizados. Se ha informado que los fagos utilizados por estos investigadores han tratado con éxito aproximadamente al 90% de los casos, lo que llevó a que la fagoterapia se utilice hoy en día en Polonia, aunque en pequeña escala (Carlton, 1999).

Médicos franceses también han continuado con el uso de fagos terapéuticos en humanos, incluso después de que el Instituto Pasteur dejó de fabricar cócteles de fagos a mediados de los 90, actualmente los fagos utilizados por estos investigadores provienen en un alto porcentaje de Rusia o Georgia. Las infecciones por *Staphylococcus aureus* parecen ser el blanco más común de estos esfuerzos. Dublanchet y sus colegas han reportado recientemente su eficacia en dos pacientes de franceses y uno australiano donde otros tratamientos no habían sido efectivos, incluyendo todos los antibióticos disponibles (Dublanchet, 2011).

Se han examinado al menos 5568 fagos en el microscopio electrónico desde la introducción de la tinción negativa en 1959, cada año se descubren alrededor de 100 bacteriófagos nuevos (Ackerman et al., 2007; Gandham, 2015).

Las características propias de los bacteriófagos, no solo de lisar bacterias específicas, sino también de replicarse de manera exponencial, han demostrado su potencial en el tratamiento de enfermedades infecciosas, además cuentan con otras ventajas sobre los antibióticos: son inofensivos para humanos, plantas y animales; las preparaciones de fagos son fácilmente reproducibles, sencillas de aplicar y no han mostrado efectos adversos aparentes aún en preparaciones de más de un bacteriófago (llamados en algunas ocasiones “cocteles”). El aumento de la incidencia de bacterias resistentes a antibióticos ha hecho que se evalúe la posibilidad de desarrollar la fagoterapia como un tratamiento alternativo confiable (Kutateladze et al., 2010).

III.- JUSTIFICACIÓN

Las bacterias poseen una gran capacidad para resistir la acción antibacteriana y de igual manera existen numerosas posibilidades de que surjan mutaciones, nuevos mecanismos de resistencia o bien, transferencia de resistencia y por lo tanto la industria farmacéutica ha visto prácticamente agotada su capacidad para producir nuevos fármacos antibacterianos debido al extendido periodo de tiempo y altos costos del desarrollo de nuevas moléculas (Davies, 2010; Casellas 2011).

Desde hace más de cien años se ha reconocido a *Staphylococcus aureus* como un microorganismo de gran importancia médica, por ser uno de los principales agentes patógenos para el humano, ocasionando desde lesiones superficiales en la piel y abscesos localizados hasta infecciones del sistema nervioso central, cardiovascular, respiratorio, entre otros. El principal impacto de este microorganismo se debe a las cepas resistentes a meticilina (SARM) que son causantes de un alto índice de las infecciones nosocomiales a nivel mundial (Bustos-Martínez et al., 2006).

Debido a la alta prevalencia de infecciones por SARM aunado a la incapacidad de producir nuevos principios activos eficaces que cumplan con la demanda a corto plazo, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de estas infecciones, lo cual ha llevado a un renovado interés en la terapia con fagos (Maura, 2012).

A pesar de que existen estudios sobre SARM como agente causal de diversas patologías, no se tiene registro de estudios de aislamiento o caracterización de bacteriófagos contra esta bacteria en nuestro país. Abordar este tipo de trabajos en México, enriquecerá el conocimiento actual y promoverá el inicio de estudios de fagotipificación o terapia fágica contra este patógeno oportunista.

IV.- GENERALIDADES

4.1 Virus

Etimológicamente la palabra virus proviene del latín <<*virus*>> que significa “veneno” o “ponzoña”, los virus son partículas infecciosas conformadas por un solo tipo de ácido nucleico y una envoltura de proteínas, con un tamaño de 20 a 250 nanómetros (nm), son parásitos intracelulares obligados ya que carecen de los sistemas productores de energía, síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (como los que poseen las células, los cuales son indispensables para el crecimiento y reproducción. Por lo tanto, dependen de los sistemas de las células que parasitan y se pueden definir como “*parásitos genéticos intracelulares obligados*” (Carballal, 2014).

4.1.1 Estructura y Función

Los virus poseen habitualmente un solo tipo de ácido nucleico ya sea ADN o ARN el cual es el responsable de la infectividad. Los ácidos nucleicos constituyen el nucleoide y asociado a proteínas se designa como core viral donde se encuentra toda la información genética. El core está protegido por una cubierta proteica denominada cápside formada por subunidades llamadas capsómeros que pueden ser de forma esférica o en forma de prisma. Los virus se dividen en envueltos o desnudos dependiendo si poseen o no otra estructura, de composición lipoproteica, llamada envoltura. La partícula viral completa con su capacidad infectante intacta se denomina virión (Carballal, 2014).

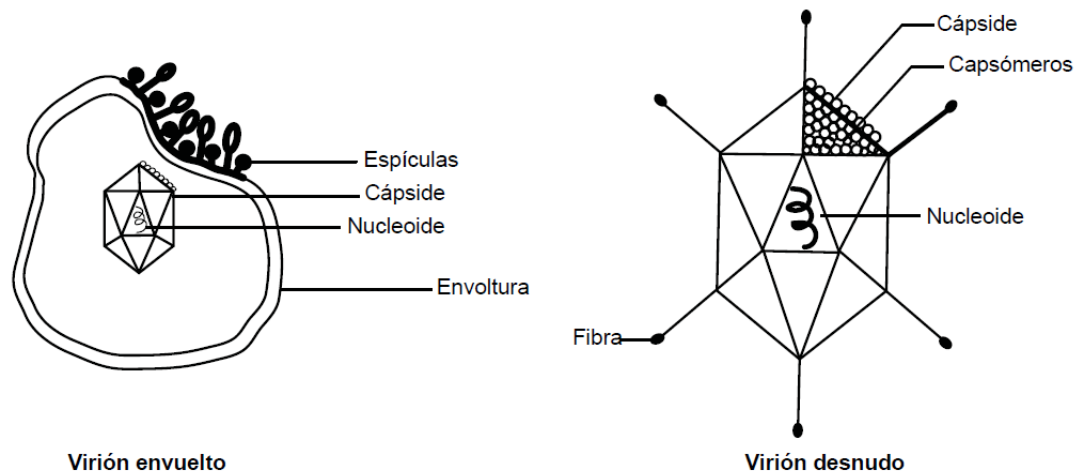


Figura 1.- Estructura de un virus. Recuperada de Carballal 2014.

Entre las principales funciones de la cápside se encuentran la protección del ácido nucleico del medio externo de la desecación y de las enzimas tisulares, la presentación de estructuras que permiten la unión del virus a los receptores de membrana de la célula hospedera, actuar como antígenos que estimulan la respuesta inmune del hospedero, reprimir la expresión de genes virales tempranos y proveer interacciones espaciales con las polimerasas virales en ciertos casos.

La envoltura es lipoproteica, de composición similar a la de la membrana de la célula infectada, ya que los virus la adquieren de ésta. La presencia o no de esta envoltura determina la resistencia de los virus al medio externo y esto es de fundamental importancia en la forma de transmisión de las enfermedades virales. La mayoría de los virus desnudos son resistentes al medio externo. a la desecación y a solventes de lípidos como éter, cloroformo, sales biliares, detergentes, entre otros (Collier, 2006).

4.1.2 Clasificación

Todos los seres vivos pueden ser parasitados por virus y estos pueden clasificarse de acuerdo a sus hospederos, formas de transmisión, estructura, presencia o no de envoltura, simetría, propiedades fisicoquímicas, lugar de replicación, tipo y características de sus genomas; de acuerdo a sus hospederos, los virus pueden ser clasificados como virus de vertebrados, de insectos, de plantas, de bacterias, etc. Inicialmente, los virus se clasificaron por la especificidad del hospedador, las enfermedades producidas o bien a su tropismo tisular (Carballal, 2014).

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV por sus siglas en inglés) clasifica a los virus en siete ordenes que incluyen a 40 familias y otras 85 que no han sido asignadas (ICTV, 2011).

4.2 Bacteriófagos

Los virus que infectan y utilizan los recursos de las bacterias para reproducirse se denominan bacteriófagos. A menudo nos referimos a ellos como "fagos". La palabra "bacteriófagos" significa "comer bacterias" y son llamados así ya que aquellos que son virulentos pueden causar la lisis completa de una bacteria susceptible. Debido a que las bacterias se encuentran en todos los ambientes naturales y la cantidad de bacteriófagos está directamente relacionada con el número de bacterias presentes, estos virus representan la forma de "vida" más abundante en la tierra, con un estimado de 10^{32} en el planeta (Wommack y Colwell, 2000).

Los fagos pueden ser fácilmente aislados de heces, aguas residuales y muestras de suelo. La secuenciación de genomas bacterianos ha revelado que pueden influir potencialmente en la patogenicidad y la evolución de las bacterias. El número de fagos que se han aislado y caracterizado hasta ahora corresponde a sólo una pequeña fracción de la población total (McNerney, 2005).

Puesto que los bacteriófagos y virus de células animales tienen grandes similitudes, los fagos se utilizan como sistemas modelo para el estudio de los virus de células animales con el objetivo de estudiar los pasos del ciclo de vida viral (Turgeon Et al., 2014).

4.2.1 Clasificación taxonómica

La clasificación de los bacteriófagos se basa en factores como su morfología, tipo de genoma y estructuras auxiliares como colas o cubiertas. La clasificación morfológica más reciente fue propuesta por Ackermann en 2006, donde consideró factores clave como la estructura y las propiedades de sus ácidos nucleicos. La gran mayoría de bacteriófagos contienen ADN de cadena doble, aunque existen pequeños grupos de bacteriófagos que contienen ADN de cadena sencilla o ARN de cadena doble o sencilla. De acuerdo a su morfología son clasificados en filamentosos, icosoédricos sin cola, bacteriófagos con cola y pleomórficos donde el 96% de los viriones son de cola y sólo 208 fagos es decir el 3,7% corresponde al resto de los grupos (Figura 2) (Ackermann, 2007).

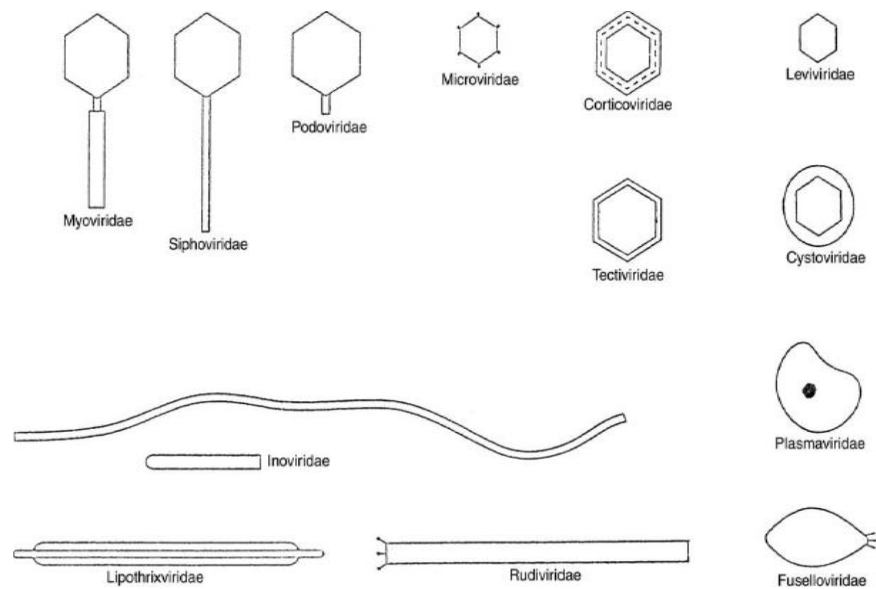


Figura 2. Morfotipos básicos de los Bacteriófagos. Modificada de Ackermann, H.-W. and DuBow, M.S., in *Viruses of Prokaryotes*, Vol. 1, CRC Press, Boca Raton, 1987, 16.

La clasificación actual de bacteriófagos desarrollada por la ICTV incluye un orden, 14 familias y 37 géneros. La diversidad genética de los bacteriófagos es extremadamente alta. La similitud entre las secuencias de nucleótidos de fagos aislados de diferentes bacterias hospederas o de hospederos en común, es pequeña o no identificable (Zanetti et al., 2013).

Los bacteriófagos poliédricos, filamentosos y pleomórficos se encuentran agrupados en siete familias que están separadas por grandes diferencias en contenido de ácidos nucleicos y estructura. A su vez los del orden Caudovirales se dividen en tres familias, caracterizadas por poseer cola que varía en tamaño desde 130 a 400 nm divididas en contráctiles para la familia Myoviridae, largas para la familia Siphoviridae y no contráctiles para la familia Podoviridae todos con cabezas de forma icosaédrica donde las cápsides pueden adoptar formas isométricas o elongadas (Figura 3).

Estas familias representan más del 96% de los bacteriófagos con 17 géneros de acuerdo al reporte VIII de ICTV. En general las familias de bacteriófagos son pequeñas, en algunos casos contienen únicamente un miembro (Fauquet et al., 2005).

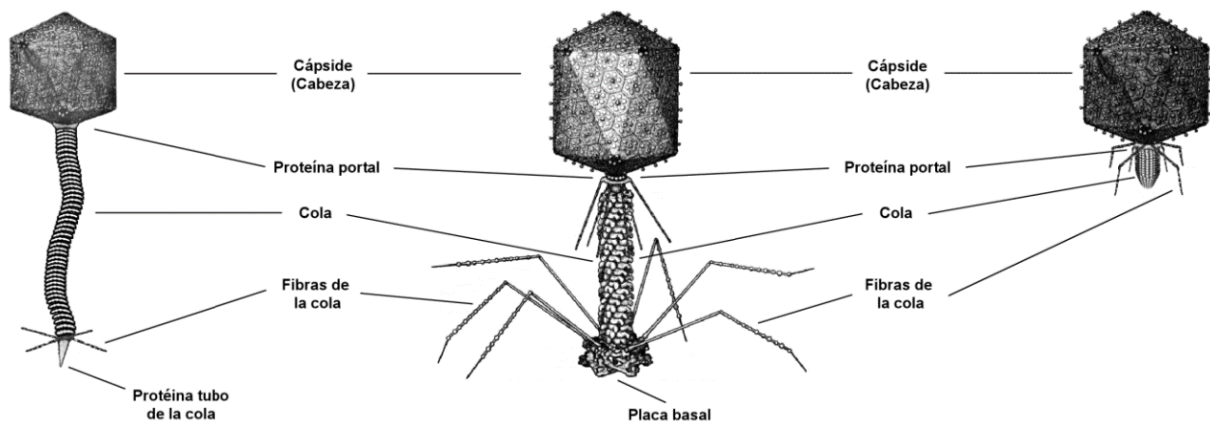


Figura 3. Morfologías de las tres familias de los Caudovirales. De izquierda a derecha, se muestran las representaciones esquemáticas de Siphoviridae (cola flexible y no contráctil), Myoviridae (cola contráctil) y Podoviridae (cola corta). Tomado y modificado de (Leiman et al., 2003).

4.2.2 Ciclo replicativo

Adicionalmente a esta clasificación, los bacteriófagos también pueden clasificarse como líticos o lisogénicos de acuerdo a su ciclo replicativo. Los líticos se replican en la bacteria hospedera y la destruyen en el proceso mientras que los lisogénicos incorporan su material genético en el genoma de la bacteria hospedera, establecen una posición estable en la bacteria infectada y pueden transferir genes que expresen toxinas o factores de virulencia (Sabouri et al., 2012).

Los fagos encuentran a su bacteria huésped y se adsorben a la pared celular a través del reconocimiento de receptores específicos, inyectan el material genético que portan dejando afuera de la bacteria una cápside vacía. Enseguida, los extremos del ADN se unen para formar una molécula lineal, este punto de unión se denomina sitios cohesivos (cos). En algunas células infectadas, el ADN se transcribe, traduce y replica para formar nuevas partículas fágicas por empaquetamiento de su ADN y ensamble de sus cápsides. En otras ocasiones, la formación de nuevos fagos se reprime por integración del ADN en el cromosoma de la bacteria que en ese momento recibe el nombre de lisogénica y el fago integrado en el genoma es denominado profago. La célula lisogénica resultante se divide indefinidamente acarreado el profago, hasta que este es inducido, se separa del genoma bacteriano y comienza el ciclo lítico para su desarrollo (Figura 4) (Campbell, 2003).

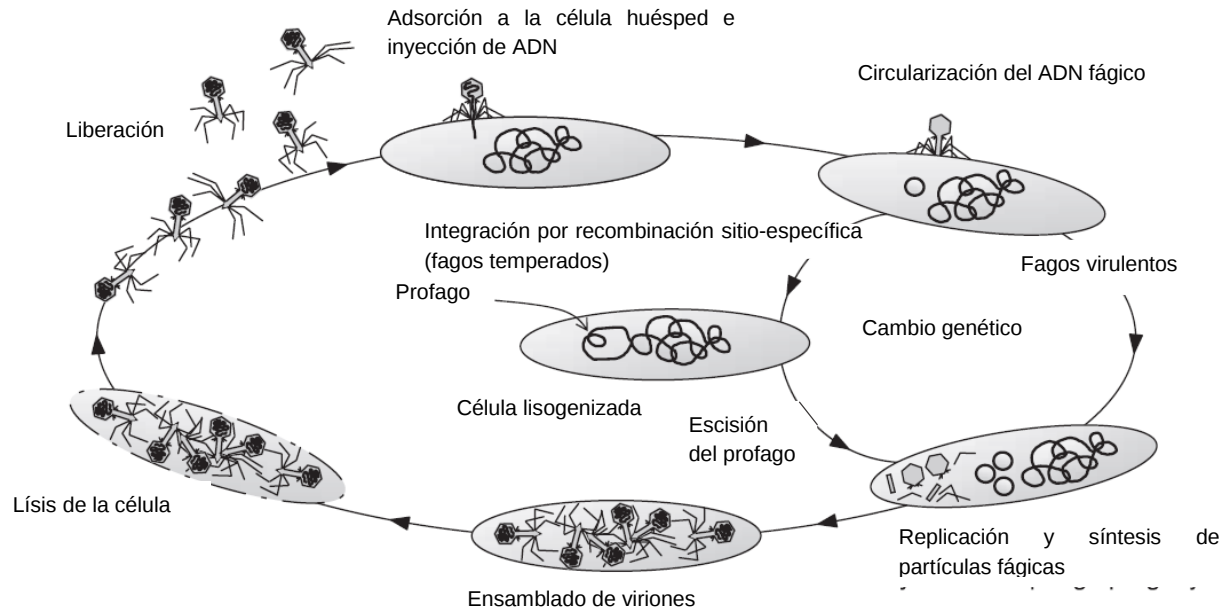


Figura 4. Ciclo lítico y lisogénico de los bacteriófagos (recuperado y modificado de Lacroix 2011).

Los profagos son altamente comunes en la naturaleza pues conforman del 10 al 20% del genoma de una bacteria, y por lo tanto constituyen una fracción significativa del “pool genético” de la tierra, a su vez contribuyen a las diferencias entre individuos de una misma especie o serotipos, estos pueden proporcionar ventajas selectivas a las bacterias que los portan, desde la resistencia a ciertos antibióticos, protección contra infecciones de otros fagos hasta el incremento de la virulencia en una cepa patógena. El ejemplo más conocido de esta “conversión lisogénica” ocurre en *Vibrio cholerae*, una bacteria que debería ser inofensiva y que se convierte en un grave problema de salud pública al incorporar en su genoma al gen fágico de la toxina colérica (CTX) (Tabla 1) (Waldor y Mekalanos, 1996; Boyd y Brussow, 2002; Casjens, 2005).

Tabla 1.- Factores de virulencia codificados por bacteriófagos.

Bacteriófago	Gen	Proteína	Patógeno
Fago β	Tox	Toxina diftérica	<i>C. diphtheriae</i>
C1	C1	Neurotoxina	<i>C. botulinum</i>
H-19B	stx1, stx2	Shiga toxina	<i>E. coli</i>
ϕ FC3208	hly2	Enterohemolisina	<i>E. coli</i>
ϕ CTX	Ctx	Citotoxina	<i>P. aeruginosa</i>
NA	see, sel	Enterotoxina	<i>S. aureus</i>
ϕ N315	Sep	Enterotoxina P	<i>S. aureus</i>
ϕ 13	entA	Enterotoxina A	<i>S. aureus</i>
ϕ Mu50A	Sea	Enterotoxina A	<i>S. aureus</i>
ϕ ETA	Eta	Toxina exfoliativa A	<i>S. aureus</i>
T12	speA	Toxina tipo A	<i>S. pyogenes</i>
CS112	speC	Toxina tipo C	<i>S. pyogenes</i>
CTX ϕ	ctxAB	Toxina colérica	<i>V. cholerae</i>
ϕ PVL	Pvl	Leucocidina	<i>S. aureus</i>
8232.1	speA1, speA3, speC, spel,	Superantígenos	<i>S. pyogenes</i>
	speH, speM, speL, speK, ssa		
Pnm1	Mu-like	Proteínas de membrana	<i>N. meningitidis</i>
δ^{34}	Rfb	Glicosilación	<i>S. enterica</i>
P22	Gtr	Glicosilación	<i>S. enterica</i>
Sf6	Oac	Acetilación del antígeno-O	<i>S. flexneri</i>
SfII, SfV,	gtrII	Glicosil-transferasa	<i>S. flexneri</i>
SopE ϕ	sopE	Efecto tipo III	<i>S. enterica</i>
GIFSY-2	ssel (gtgB)	Efecto tipo III	<i>S. enterica</i>
GIFSY-3	sspH1	Efecto tipo III	<i>S. enterica</i>
Sp4, 10	sodC	Superoxido-dismutasa	<i>E. coli</i> O157
GIFSY-2	sodC-I	Superoxido-dismutasa	<i>S. enterica</i>
Fels-1	sodC-III	Superoxido-dismutasa	<i>S. enterica</i>
Fels-1	nanH	Neuroaminidasa	<i>S. enterica</i>
H4489A	hylP	Hialuronidasa	<i>S. pyogenes</i>
ϕ PVL	Pvl	Leucocidina	<i>S. aureus</i>
ϕ 13	Sak	Stafilocinase	<i>S. aureus</i>
315.4	Sla	Fosfolipasa	<i>S. pyogenes</i>
315.6, 8232.5	sdn, sda	Streptodo DNasa/RNasa	<i>S. pyogenes</i>
Λ	Bor	OMPb	<i>E. coli</i>
λ -like	Eib	OMP	<i>E. coli</i>
MAV1	Vir	Vir	<i>M. arthritidis</i>
SM1	pblA, pblB	Proteína de cápside fágica	<i>S. mitis</i>
370.1, 370.3, 315.3	mf2, mf3, mf4	Factor mutagénico	<i>S. pyogenes</i>
phisc 1	Unnamed	Factor mutagénico	<i>S. canis</i>
GIFSY-2	gtgE	Virulencia	<i>S. enterica</i>
GIFSY-2, Fels-1	grvA	Antivirulencia	<i>S. enterica</i>

Recuperado y modificado de Brussow *et al.* 2004, OMP: Proteínas de Membrana Externa.

4.3 La bacteria huésped: *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria grampositiva ubicua causante de diversas enfermedades, por su amplia distribución, y diversos mecanismos de resistencia antimicrobiana, se confiere especial énfasis al aislamiento y estudio epidemiológico de este agente etiológico (Figura 5) (Gil, 2000).

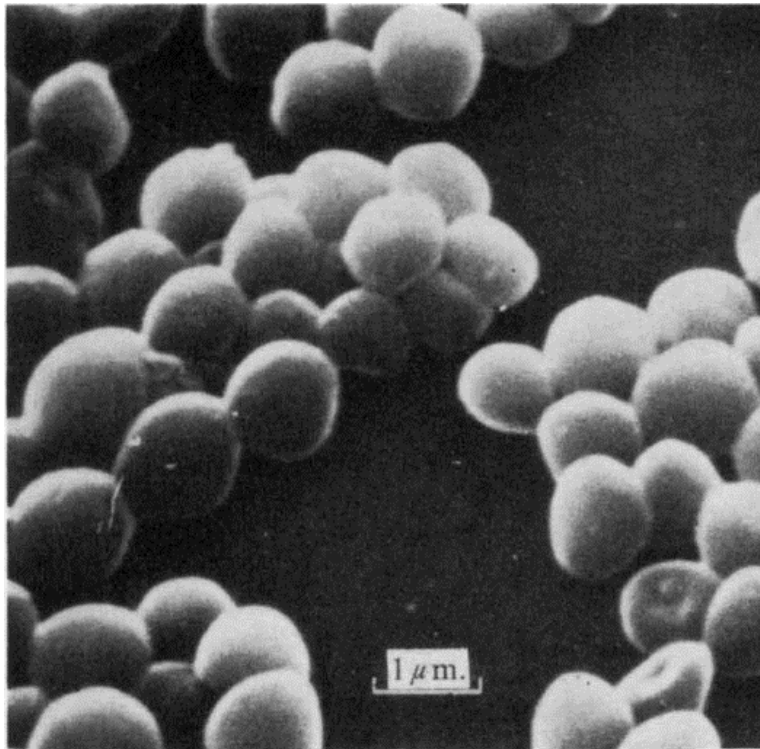


Figura 5.- Micrografía electrónica de *Staphylococcus aureus* recuperado de Greenwood 1972.

Sir Alexander Ogston fue el primero en describir entre 1880 y 1882 la enfermedad por estafilococos y su rol en la sepsis y formación de abscesos. Inicialmente el tratamiento con penicilina para estas infecciones demostró una alta eficacia, sin embargo, a mediados de la década de 1940 emergieron cepas productoras de beta lactamasas que se propagaron dramáticamente, la meticilina, una forma semi sintética de penicilina, fue introducida entre 1959 y 1960 para afrontar este problema, pero solo un año después ya se reportaban cepas resistentes. En la actualidad *Staphylococcus aureus* continúa siendo uno de los patógenos más

peligrosos que afecta a los humanos, ya que es la principal causa de infecciones bacterianas que involucra el torrente circulatorio, el tracto respiratorio, la piel y los tejidos blandos adicionalmente es una de las causas más comunes de infecciones nosocomiales y comunitarias, tiene una alta morbilidad y mortalidad (Luján, 2013).

Particularmente la resistencia a meticilina es conferida por el gen *mecA* que codifica para la proteína de unión a penicilina (PUP) adicional llamada PUP2 la cual es completamente funcional y tiene una afinidad disminuida por antibióticos betalactámicos, este gen que se encuentra localizado en un elemento genético móvil denominado Casete Cromosómico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*) puede ser transmitido de forma horizontal entre especies (Gordon, 2008).

A demás de los factores de resistencia a antibióticos, casi todas las cepas de *S. aureus* producen un grupo de enzimas y citotoxinas, dentro de estas hay cuatro hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta), nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasa y colagenasa. Algunas cepas producen proteínas adicionales como la Toxina 1 del Síndrome del Shock Tóxico (TSST-1), las Enterotoxinas Estafilocócicas (SE), las Toxinas Exfoliativas (ETA y ETB) y la leucocidina que confieren virulencia (Bustos-Martínez et al., 2006).

En los últimos 20 años el *S. aureus* meticilino resistente ha sido responsable del 27 al 45 % de los episodios de bacteriemia en la población en general por esta especie, lo cual ha generado que el manejo terapéutico sea complejo y debido a esto las instituciones de salud se han visto obligadas a implementar medidas extremas de prevención antibacteriana (Miranda et al., 2014).

4.3.1 Bacteriófagos de *Staphylococcus aureus*

Los bacteriófagos se encuentran ampliamente distribuidos en las cepas de *Staphylococcus aureus* y han sido estudiados extensamente, inicialmente fueron utilizados para la identificación de cepas clínicas de la bacteria en 1963; La evolución de la bacteria ha llevado a la integración de diversos profagos en su material genético, lo que le confiere además de factores de virulencia, una resistencia innata a las infecciones por fagos externos y por lo tanto la búsqueda de fagos capaces de infectar a esta bacteria es bastante limitada. El número de profagos presentes en el genoma de *S. aureus* generalmente es alto, todos los genomas secuenciados a la fecha contienen al menos un profago y un alto porcentaje de cepas contienen hasta cuatro o más, éstos pueden codificar para toxinas estafilocócicas responsables de su virulencia (Hood, 1963; Kwan et al., 2005; Feng et al., 2008; Lindsay, 2010).

4.3.2 Contribución a la evolución y patogénesis de *S. aureus*

Adicional a la transferencia de genes de virulencia, los bacteriófagos contribuyen a alteraciones genéticas durante su infección, y proveen a las especies de amplias variaciones genéticas (Goerke et al., 2006).

A demás de la adición o escisión de fagos, se presenta duplicación, se ha reportado integración ectópica estable extracromosomal que incrementa la diversidad dentro de la población de bacterias. Por lo tanto, generan heterogeneidad en una población que provee diferentes potenciales de virulencia y dota al patógeno de la habilidad para desarrollar una respuesta flexible a las defensas del hospedero, se ha visto que la movilización e integración genómica atípica son favorecidas en cepas patogénicas en condiciones infecciosas en comparación a cepas colonizadoras en portadores sanos (Goerke et al., 2010; McAdam et al., 2011).

Los factores que causan inducción de fagos in situ son condiciones ambientales que llevan a daño del material genético bacteriano como tratamiento con antibióticos o especies reactivas de oxígeno liberadas por macrófagos. La diversificación fenotípica mediada por fagos actúa en conjunto con otros mecanismos de variación genética como la recombinación y mutaciones, y es influenciada por factores externos como la presencia de especies co-infectantes (Goerke et al., 2004, 2006 2009).

4.4 Familias de bacteriófagos para *Staphylococcus*

4.4.1 Familias Morfológicas

Los fagos de *S. aureus* conocidos hasta el momento están conformados por ADN de doble cadena y pertenecen a la familia Siphoviridae en el Orden Caudovirales como la mayoría de los bacteriófagos de otras especies (Brussow, 2002; Canchaya, 2003; Feng et al., 2008).

En general se encuentran insertados en el cromosoma principal de la bacteria como profagos, algunos de ellos pudiendo llegar a ser líticos al presentarse mutaciones en sus funciones lisogénicas como la *phlPLA35* y *88* o la *SA11*, que son casos documentados de este fenómeno (García et al., 2009; Kim, 2012).

4.4.2 Características Genómicas

El tamaño del genoma se encuentra entre los 20kb hasta más de 125kb, en contraste con los genomas de los fagos de *Mycobacterium* o de *Pseudomonas aeruginosa* no se encuentran uniformemente distribuidos y se establecieron tres categorías para la clasificación de los fagos de *Staphylococcus* por tamaño de genoma (clase I: < 20 kb; clase II: $\approx$ 40 kb, clase III: >125 kb), el tamaño del genoma se correlaciona con la clasificación morfológica donde los fagos de la familia Podoviridae contienen los genomas más pequeños (clase I), los Siphoviridae genomas de tamaño intermedio (clase II) y los Myoviridae los genomas de mayor tamaño (clase III) (Pedulla et al., 2003).

Las regiones codificantes se encuentran empaquetadas en pocas y pequeñas regiones intergénicas y por lo tanto tienen una densidad génica muy alta, (promedio 1.67 genes /kb) su contenido de Guanina-Citocina es similar al de la célula hospedera y estos fagos proveen una fuente de diversidad genética muy amplia que aún no ha sido estudiada. Mediante el uso de BLAST se ha asignado una función teórica al 35% de las proteínas predichas mediante el análisis de marco abierto de lectura (ORF por sus siglas en inglés) (Kwan et al., 2005, 2006).

Los genomas de los fagos Siphoviridae de *S. aureus* muestran la estructura típica de la familia morfológica. Cinco módulos funcionales se ordenan de la siguiente manera: lisogenia, metabolismo del ADN, ADN empaquetado y morfogénesis de la cápside, morfogénesis de la cola y lisis celular del hospedero. El módulo de metabolismo de ADN puede dividirse en funciones de replicación y regulación, además cuando están presentes los factores de virulencia se encuentran codificados río abajo del módulo de lisis, en algunos casos, se insertan entre el módulo lisogénico y los módulos de metabolismo del ADN como phiNM1 encontrado en cuatro profagos de la cepa Newman de *S. aureus* (Bae et al., 2006; Hatful, 2008).

Los genes se transcriben generalmente en la misma hebra, salvo pequeños grupos, tales como aquellos implicados en la integración del genoma del hospedero. Mientras que, como una estructura modular, la organización de los genomas Podoviridae es diferente. Una de las características importantes es que cuenta con un número menor de ORFs, tal como se espera por un tamaño más pequeño (20 a 32 ORFs). Se han identificado módulos funcionales, codificación del ADN y su empaquetado, así como la morfogénesis de la cápside, morfogénesis de cola y lisis de la célula hospedera, además de genes de función desconocida (Vybiral et al., 2003; Kwan et al., 2005; Son et al., 2010).

En contraste, en el caso de Siphoviridae, los módulos no están bien definidos y los genes de la cola y lisis se solapan. Además, el módulo lisogénico está ausente como se espera para fagos líticos. La organización del genoma de los Myoviridae de *Staphylococcus* es similar al fago T4 de *E. coli*. Los genomas están organizados en módulos funcionales de genes altamente conservados (replicación, elementos

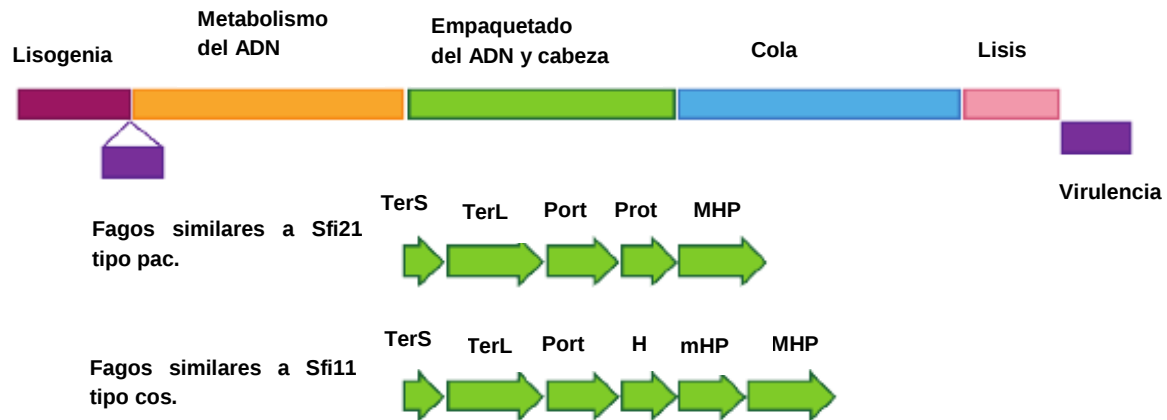
estructurales entre otros), interrumpidos por grandes regiones que incluyen principalmente genes de función desconocida. Los módulos estructurales encontrados en fagos Myoviridae de *Staphylococcus* están más estrechamente relacionados con módulos encontrados en fagos Siphoviridae que con los módulos de Myoviridae en diferentes especies bacterianas refiriéndose en términos de organización y contenido del gene (O'Flaherty et al., 2004; Lobocka et al., 2012).

En la Figura 6 se puede observar la organización de los genomas de las familias morfológicas de bacteriófagos de *S. aureus* donde “(a)” corresponde a los Genomas Siphoviridae, las cajas de colores representan los cinco módulos funcionales encontrados en genomas de Siphoviridae, el Rojo corresponde a la sección de Lisogenia, el amarillo al metabolismo del ADN, en verde el empaquetado de ADN y morfogénesis de la cápside, el azul la morfogénesis de la cola, y en color rosa la lisis de célula hospedera. Los genes de virulencia en púrpura generalmente son encontrados río abajo el módulo de lisis, o insertados entre el módulo lisogénico y el módulo de metabolismo del ADN (Vybiral et al., 2003; Kirsh et al., 2008; Son et al., 2010).

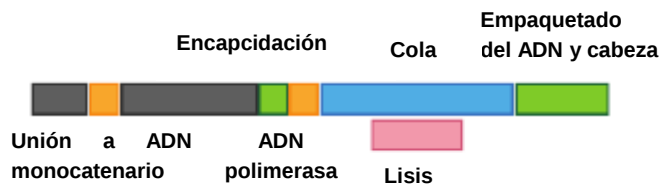
En los genomas Podoviridae “(b)”, los módulos de lisis en rosa y los módulos de morfogénesis de cola en azul se solapan. Los genes del metabolismo de ADN, es decir, proteína de unión a ADN monocatenario y polimerasa de la DNA; se observan en verde y se encuentran en una región de genes de función desconocida marcada en gris, río arriba, en el módulo de cola se encuentra codificada una proteína de encapsulación al lado de la polimerasa de ADN.

Por último, podemos observar en los Genomas Myoviridae “(c)”, una gran región que codifica para genes de función desconocida en gris. Los genes del metabolismo de ADN en amarillo están distribuidos en dos módulos separados conocidos como de replicación, así como genes de lisis (rosa) que se encuentran río arriba y río abajo del empaquetamiento de ADN, cápside (verde) y módulos de cola (azul).

a) Siphoviridae
tamaño de genoma: 40kb



b) Podoviridae
tamaño de genoma: <20kb



c) Myoviridae
tamaño de genoma: >125kb



Figura 6. Organización modular de los genomas de fagos de Staphylococcus. TerS: Terminasa de la subunidad pequeña, TerL: Terminasa de la subunidad grande, Port: proteína portal, Prot: proteasa, MHP: Proteína mayor de la cápside, mHP: proteína menor de la cápside, SS-DNA binding: proteína de unión a ADN monocatenario. Tomado y Modificado de Deghorian 2012.

Aunque actualmente existen fagos caracterizados para *S. aureus* únicamente se encuentran dos productos en fase de desarrollo, uno relacionado con la desinfección de alimentos y otro para el tratamiento de padecimientos asociados a esta bacteria, asimismo, existen escasas instituciones que se dedican a la investigación de fagos en el mundo, sin embargo ninguna se encuentra en nuestro País y los organismos reguladores sanitarios no cuentan con una normativa específica para el trabajo o la investigación en esta área (Segundo et al., 2010).

V.- OBJETIVO GENERAL

Aislar bacteriófagos de muestras de aguas contaminadas, para establecer su efecto lítico sobre cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

5.1 Objetivos Específicos

- Identificar y clasificar los fagos líticos aislados mediante microscopía electrónica.
- Determinar el rango de hospederos de los fagos líticos caracterizados a través de la técnica de tapices bacterianos.
- Realizar extracción de ADN de los fagos aislados por la técnica de Fenol-Cloroformo.

VI.- METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

Estudio experimental de acuerdo a los principios del Método Científico, se inició con la recolección de muestras de fuentes de agua contaminada de drenaje profundo para el aislamiento de los bacteriofagos, adicionalmente se obtuvieron muestras de cultivos bacterianos para el aislamiento de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina. Se realizaron pruebas de resistencia a Meticilina de las cepas aisladas mediante el uso de sensidiscos de cefinace (Nitrocef Disks™ BD BBL). Se estandarizó el método para el aislamiento de bacteriófagos de *Staphylococcus aureus* a partir de muestras de agua, con base en este método se llevó a cabo el aislamiento y propagación de Bacteriófagos líticos para las cepas de SARM. Se llevaron a cabo pruebas para determinar el Rango de Hospederos de los Bacteriofagos aislados por la técnica de puntos. Se estandarizó el método para la microscopía electrónica de los Bacteriofagos, se obtuvieron imágenes de los fagos aislados y finalmente se extrajo el ADN de los fagos aislados por el método de Fenol-Cloroformo para su posterior análisis.

6.1 Sitios donde se llevó a cabo el protocolo experimental

- Laboratorio de Análisis Microbiológico de la FCQI UABC.
- Laboratorio de Microbiología de la FMVZ UANL.
- Laboratorio de Biología Molecular de la FMyP UABC.
- Laboratorio de Microscopía electrónica ITT.

6.1.1 Sitios de muestreo

- Hospital Gineco-Obstetricia y Unidad Médica Familiar No. 7 del IMSS (H.G.O. y U.M.F. No. 7), Tijuana, B.C.
- Hospital General Regional No. 1 del IMSS (H.G.R. No. 1), Tijuana, B.C.
- Hospital General Regional No. 20 del IMSS (H.G.R. No. 20), Tijuana, B.C.
- Planta Tratadora de Aguas de la CESPT Urbi Quinta del Cedro, Tijuana, B.C.

6.1.2 Temporalidad

De marzo de 2016 a marzo de 2017.

6.2 Criterios

6.2.1 Criterio de Inclusión

Agua de drenaje profundo en hospitales públicos y plantas tratadoras de agua.

6.2.2 Criterio de Exclusión

Agua que haya sufrido cualquier tratamiento físico, químico o biológico.

6.3 Variables

6.3.1 Variables independientes

- Especificidad de los bacteriófagos
- Actividad lítica de los bacteriófagos
- Concentración de bacteriófagos en las muestras
- Diversidad de bacteriófagos en las muestras
- Morfología de los bacteriófagos
- Condiciones de reacción: CaCl_2 2mM, MgCl_2 2mM, 30°C, Filtros de Polietilsulfona.

6.3.2 Variables dependientes

- Rango de huésped de los bacteriófagos

6.4 Muestra

Muestras de agua contaminada de drenaje profundo de hospitales públicos y plantas tratadoras para el aislamiento de bacteriófagos.

Muestras de cultivos bacterianos de exudados faríngeos, hisopados de heridas y urocultivos para el aislamiento de las cepas de SARM.

6.4.1 Tamaño de muestra

30 muestras de agua contaminada.

12 muestras de cultivos bacterianos.

6.5 Materiales y métodos

Los materiales, preparación de reactivos y medios de cultivo utilizados para las metodologías utilizadas, están descritos en el apéndice de esta tesis.

6.5.1 Método para colección de muestras de agua

Posterior a la obtención del permiso correspondiente para la recolección de las muestras, se identificaron los sitios de muestreo ubicando la alcantarilla de descarga principal del sistema de drenaje de las instituciones hospitalarias seleccionadas y se procedió a la recolección de especímenes con técnica de barrera. Se le asignó un código de identificación a cada tubo cónico. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio de Análisis Microbiológico en un contenedor térmico de poliestireno para su almacenamiento en refrigeración a 4°C.

6.5.2 Método para colección de muestras de cultivos bacterianos

Una vez realizado el trámite correspondiente para la autorización de donación de cultivos bacterianos, se obtuvieron las muestras procedentes del laboratorio de análisis clínicos del H.G.O. y U.M.F. No. 7, dichas muestras se encontraban en el medio de cultivo MSA. Se asignó un código a cada cultivo para su identificación. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio de Análisis Microbiológico en un contenedor térmico de poliestireno para su posterior procesamiento.

6.5.3 Método para el aislamiento de cepas de SARM

De los cultivos bacterianos se seleccionaron las colonias que produjeron viraje del medio MSA y se les realizó una tinción de Gram además de una prueba de catalasa, en aquellas que el resultado de esta prueba fue positivo y que además al ser observadas a través del microscopio presentaron formación de racimos, se sembraron nuevamente en medio TSA. Posteriormente estas mismas cepas fueron sometidas a una prueba de Coagulasa y DNAasa para confirmar su especie como *Staphylococcus aureus*. Por último, para la determinación de resistencia a Meticilina se realizó una prueba con el uso de sensidiscos Nitrocef Disks™ BD BBL (Azeez et al., 2012).

6.5.4 Metodología para la preparación de un tapiz bacteriano

Para la preparación de tapices bacterianos se tomaron las cepas de los cultivos originales, se estriaron en cajas con TSA agar y se incubaron a 37 °C durante toda la noche para permitir el desarrollo de colonias aisladas. Pasado el periodo de incubación se tomó una colonia, se inoculó en 5 ml de caldo TSA adicionado con 4mM cloruro de calcio (CaCl_2) y cloruro de magnesio (MgCl_2) y se incubó a 37 °C durante toda la noche en agitación continua (180 rpm).

Finalmente, en un tubo de ensayo con 5 ml de medio T ϕ suave previamente derretido y templado a aproximadamente 45 °C se agregaron 100 μl de este cultivo bacteriano, se mezcla a mano sin llegar a generar burbujas y se vertió sobre una caja de Petri preparada con medio T ϕ sólido inclinándolo y girando la caja para cubrir toda la superficie del medio, se dejó solidificar a temperatura ambiente y se incubó a 37 °C durante toda la noche.

6.5.5 Método para el aislamiento y propagación de bacteriófagos

Para el aislamiento de los bacteriófagos las muestras de agua se colocaron en tubos cónicos y se centrifugaron a 6,000 r.p.m. por diez minutos para eliminar cualquier resto sólido. Se recuperó el sobrenadante y se filtró a través de membranas de Polietilsulfona de tamaño de poro de 0.22 μm .

Se prepararon tapices bacterianos con las cepas de SARM añadiendo 200 μl del sobrenadante filtrado de las muestras de agua y 100 μl de la cepa bacteriana a 5mL de medio T ϕ suave derretido, se dejaron solidificar y se incubaron a 30°C durante toda la noche para la formación de placas líticas, evidenciando la presencia de bacteriófagos en las muestras de agua. Se recuperaron las placas líticas con un palillo de madera estéril y se estriaron sobre tapices frescos de la misma cepa huésped para la obtención de fagos puros.

La zona de lisis generada por el estriado de los fagos en el tapiz se recuperó tomando el agar suave con ayuda de una hoja de bisturí estéril y suspendiéndolo en 1mL de medio de cultivo estéril, se homogenizó mediante el uso de vórtex a máxima velocidad durante 1 min, se centrifugaron a 6000 rpm por 5 min y se recuperó el sobrenadante.

Se prepararon diluciones de los fagos en buffer de Fagos pH 7 hasta una concentración de 1×10^{-12} en tubos para microcentrifuga de 500µL para el conteo de fagos, se prepararon nuevos tapices bacterianos añadiendo 100µL de la dilución del fago y se incubaron a 30°C durante toda la noche, posterior a la incubación se realizó un conteo de placas líticas en los tapices bacterianos 10^{-9} , 10^{-10} y 10^{-11} multiplicándolas por el factor de dilución y promediando los tres conteos.

La propagación de los fagos se realizó utilizando la técnica de doble capa de agar suave, adicionando en un tubo de ensayo con 5mL de medio Tϕ suave estéril $\sim 10^5$ fagos y 300 µl de la bacteria huésped, se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la adsorción del fago a la bacteria, posteriormente se agregaron a una caja con medio Tϕ para formar un tapiz bacteriano. Después se incubó a 30 °C durante toda la noche hasta la lisis confluyente de la bacteria. Finalmente, se raspó el agar del tapiz y se disolvió en 5 ml de buffer para fagos dejando incubar a 4°C por 24 horas, se centrifugó a 6000rpm durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante o lisado fágico.

6.5.6 Método para la determinación del rango de hospederos

La determinación de rango de hospederos se llevó a cabo a través del método de puntos; se prepararon tapices bacterianos de las cepas de SARM, una vez solidificados se gotearon 5µL de las diluciones de fagos con una concentración de 1×10^7 UFP y se incubaron sin voltear las cajas a 30°C durante toda la noche. Pasado el periodo de incubación se revisaron los tapices bacterianos buscando actividad lítica en los puntos de goteo, aquellas cepas con puntos de actividad lítica se reportaron como sensibles al fago mientras que aquellos puntos sin actividad lítica se reportaron como no sensibles.

6.5.7 Método para la concentración de fagos

Se agregó a los lisados fágicos una concentración final de NaCl al 1.4M y se incubó en hielo durante 8 horas para precipitar los fagos. Se centrifugó a 20,000 rpm durante 60 minutos en un rotor Beckman JA-20, se descartó el sobrenadante y se añadió otro volumen de lisado fágico, repitiendo estos pasos 3 veces, la pastilla obtenida se resuspendió en 1 ml de buffer para fagos en un tubo eppendorf estéril.

6.5.8 Método para la estandarización del método de tinción negativa para microscopia electrónica

Para la estandarización del método de microscopia electrónica se prepararon soluciones al 4% de Nitrato de Uranilo y Molibdato de amonio en agua bidestilada libre de carbonatos pH 7 de acuerdo a lo señalado por Zhang et al. y Ohi et al., y se realizó el procedimiento de preparación de muestras para microscopia electrónica.

Utilizado las pinzas de precisión se tomó una rejilla 400mesh Ted Pella, con ayuda de una micropipeta se colocan 10µL de la muestra sobre la rejilla y se deja fijar por 1 minuto a temperatura ambiente, posteriormente se retira el exceso de líquido con

ayuda de un paño para tareas delicadas o un papel filtro; en una caja de Petri desechable de plástico se cubre por dentro con un cuadro de papel parafilm y se coloca una gota de 10µL de tinción de Nitrato de Uranilo o de Molibdato de Amonio sobre el papel parafilm, se coloca la rejilla sobre la gota de tinción y se deja teñir por 1 minuto, se retira la rejilla con ayuda de las pinzas de precisión y se lava con 5 a 6 gotas de agua bidestilada, se retira el exceso de agua con ayuda de un paño para tareas delicadas o un papel filtro y se deja secar dentro de otra caja de petri con un cuadro de papel parafilm por 24hrs.

Las imágenes fueron tomadas mediante el microscópio electrónico JEOL JSM-7800F PRIME Extreme-resolution Analytical Field Emission SEM del Centro de Graduados e Investigación en Química del Instituto Tecnológico de Tijuana clasificando a los fagos en grupos con base a su morfotipo de acuerdo a lo establecido por Ackermann et al., 1992 y Fauquet et al., 2005.

6.5.9 Método para la extracción de ADN fágico

El ADN de los fagos se extrajo mediante la técnica de Fenol-Cloroformo y se precipitó con etanol absoluto. A 500 µl de concentrado fágico se agregó un volumen equivalente de Fenol-Cloroformo, se agitó en vórtex y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos para eliminar las proteínas fágicas que se depositan entre la fase acuosa y orgánica (Sambrook et al., 1989).

Posteriormente, se tomó únicamente la fase acuosa y se repitió el tratamiento con Fenol-Cloroformo hasta eliminar todas las proteínas fágicas. Se tomó la fase acuosa y se le agregó un volumen de Cloroformo, se agitó en vórtex y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos para eliminar cualquier remanente de proteínas. Nuevamente se tomó la fase acuosa, se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto y se mezcló hasta precipitar el ADN fágico. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y la pastilla de ADN se lavó dos veces con 1 ml de etanol al 70%. centrifugando a 10,000 rpm durante 5 minutos entre cada lavado. Finalmente, el ADN se secó y se resuspendió en 200µl de agua estéril.

6.5 Actividades

Actividad 1

- Obtención de Convenio de colaboración con las siguientes instituciones:
- Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional.
- Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Facultad de Medicina y Psicología de la Universidad Autónoma de Baja California.
- Centro de Graduados e Investigación en Química del Instituto Tecnológico de Tijuana.

Actividad 2

- Recolección de muestra de agua contaminada de los sitios de muestreo seleccionados.
- Recolección de cultivos bacterianos Cepas de *Staphylococcus aureus* en el Laboratorio de análisis clínicos del H.G.O. y U.M.F. No. 7.
- Pruebas de resistencia a antibióticos mediante sensidiscos de cefinase (Nitrocef Disks™ BD BBL) en el Laboratorio de Análisis Microbiológico de la FCQI UABC Tijuana.

Actividad 3

- Capacitación en técnicas de aislamiento para bacteriófagos en modelo bacteriano de *Vibrio parahaemolyticus* y en técnica de doble capa de agar suave en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del CICIMAR

Actividad 4

- Estandarización del método para el aislamiento de bacteriófagos de *Staphylococcus aureus* a partir de muestras de aguas contaminadas en el laboratorio de Análisis Microbiológico de la FCQI, UABC, Tijuana, B.C.

Actividad 5

- Aislamiento de bacteriófagos mediante el método estandarizado y determinación de su rango de hospederos por la técnica de puntos en el laboratorio de Microbiología de la FMVZ, UANL, Monterrey, N.L.

Actividad 6

- Estandarización del método y obtención de imágenes por microscopía electrónica para la clasificación morfológica de los fagos en el Centro de Graduados e Investigación en Química del Instituto Tecnológico de Tijuana.

Actividad 7

- Extracción de ADN de los fagos aislados por el método de Fenol-Cloroformo en el Laboratorio de Biología Molecular de la FMyP UABC, Tijuana, B.C.

Actividad 8

- Informe de Resultados
- Se aislaron cuatro bacteriófagos líticos específicos para SARM.
- Se determinó su rango de hospederos.
- Se obtuvieron imágenes por microscopía electrónica de tres de los fagos aislados.
- Se realizó la extracción de ADN de los fagos aislados.
- Se determinaron los Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción

VII.- RESULTADOS

7.1 Aislamiento de fagos

Se obtuvieron 23 muestras de aguas residuales y ambientales procedentes de dos estados de la República Mexicana (Tabla 2).

Tabla 2.- Relación de muestras de aguas y fagos aislados

Identificación	Tipo	Lugar	Estado	Número	Fagos
A-1	Ambiental	Rio Tijuana	Baja California	2	-
A-2	Drenaje	Clínica 7 IMSS	Baja California	3	-
A-3	Agua Residual	Santa Fe	Baja California	2	-
A-4	Drenaje pluvial	Zona Rio Tijuana	Baja California	1	-
A-5	Agua Residual	Planta tratadora Cedros	Baja California	2	EA-88
A-6	Drenaje Pluvial	Santa Fe	Baja California	4	-
A-7	Drenaje	Clínica 7 IMSS	Baja California	1	-
A-8	Ambiental	Rio Tijuana	Baja California	1	-
A-9	Ambiental	Playas de Tijuana	Baja California	2	-
A-10	Ambiental	Presa el Cuchillo	Nuevo León	1	-
A-11	Ambiental	Presa el Cuchillo	Nuevo León	1	-
A-12	Ambiental	Presa el Cuchillo	Nuevo León	1	-
A-13	Ambiental	Presa el Cuchillo	Nuevo León	1	-
A-14	Ambiental	Presa el Cuchillo	Nuevo León	1	-
A-15	Ambiental	Presa el Cuchillo	Nuevo León	1	-
A-16	Agua Residual	Facultad de Agronomía Marín	Nuevo León	1	-
A-17	Agua Residual	Facultad de Agronomía Marín	Nuevo León	1	-
A-18	Agua Residual	Facultad de Agronomía Marín	Nuevo León	1	Ea-53
A-19	Agua Residual	Facultad de Agronomía Marín	Nuevo León	1	-
A-20	Agua Residual	Facultad de Agronomía Marín	Nuevo León	1	-
A-21	Agua Residual	Facultad de Agronomía Marín	Nuevo León	1	Mc-36
A-22	Agua Residual	Facultad de Agronomía Marín	Nuevo León	1	-
A-23	Agua Residual	Facultad de Agronomía Marín	Nuevo León	1	Ea-83

Se recolectaron 20 cepas de *S. aureus* del Laboratorio de microbiología del H.G.O. y U.M.F. No. 7 así como del Laboratorio de Análisis Microbiológico FCQI UABC Tijuana, a las cuales se les determinó su resistencia a la meticilina mediante el uso de sensidiscos de Nitrocef ® que fueron utilizadas para el aislamiento de los bacteriófagos (Tabla 3).

Tabla 3. Cepas de *Staphylococcus aureus* utilizadas en este trabajo.

Cepa	Procedencia	Tipo de Aislado	Resistencia
Ea-1	Laboratorio Clínica 7	Hisopado de Herida	+
Ea-2	Laboratorio Clínica 7	Hisopado Faríngeo	+
Ea-3	Laboratorio Clínica 7	Urocultivo	+
Ea-4	Laboratorio Clínica 7	Urocultivo	+
Ea-5	Laboratorio Clínica 7	Urocultivo	+
Ea-6	Laboratorio Clínica 7	Hisopado de Herida	-
Ea-7	Laboratorio Clínica 7	Urocultivo	-
Ea-8	Laboratorio Clínica 7	Hisopado Faríngeo	+
Ea-9	Laboratorio Clínica 7	Urocultivo	+
Ea-10	Laboratorio Clínica 7	Hisopado de Herida	+
Ea-11	Laboratorio Clínica 7	Hisopado de Herida	+
Ea-12	Laboratorio Clínica 7	Hisopado de Herida	+
Mc-1	Laboratorio Microbiología	Desconocido	+
Mc-2	Laboratorio Microbiología	Desconocido	+
Mc-3	Laboratorio Microbiología	Desconocido	+
Mc-4	Laboratorio Microbiología	Desconocido	+
Mc-5	Laboratorio Microbiología	Desconocido	+
Mc-6	Laboratorio Microbiología	Desconocido	+
Mc-7	Laboratorio Microbiología	Desconocido	+
Mc-8	Laboratorio Microbiología	Desconocido	+

Se aislaron cuatro fagos de *S. aureus*, a partir de las muestras de agua recolectadas y se propagaron en las cepas clínicas Ea-8, Ea-5 y Mc-6 hasta un título de 1×10^{12} para su posterior caracterización parcial (Tabla 4).

Tabla 4. Fagos aislados y cepas huésped utilizadas para su propagación.

Cepas huésped	Fagos aislados
Ea-8	F-88, F-83
Ea-5	F-53
Mc-6	F-36

Durante el aislamiento de los fagos antes mencionados, se determinó que la adición de CaCl_2 y MgCl_2 2mM al medio de cultivo, aumenta el porcentaje de efectividad en el aislamiento de estos virus. A pesar de que no todos los bacteriófagos dependen de los iones bivalentes para su infección, el añadirlos permite aislar tanto fagos dependientes de estos iones como los que no requieren la presencia de los mismos para infectar células (Figura 7).

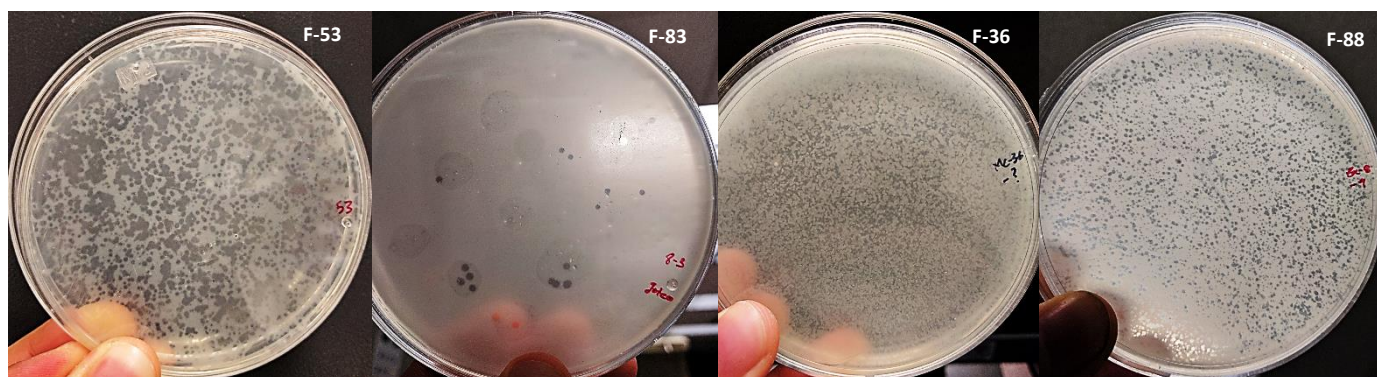


Figura 7. Placas líticas correspondientes a los fagos aislados, donde se puede observar la actividad de estos sobre sus cepas huésped.

7.2 Microscopia Electrónica

Se analizó la morfología de los fagos por microscopía electrónica para la identificación de familias morfológicas y morfotipos. De los cuatro fagos examinados todos presentaron una cola, identificándolos como miembros del orden Caudovirales o fagos con cola. Todos los bacteriófagos observados, presentaron la morfología correspondiente a la familia Siphoviridae (cápside con cola larga flexible). Se encontraron fagos con cabezas elongadas o morfotipo B2, con un tamaño de 63-91 nm de largo por 49-64 nm de ancho y colas de 110-170 nm de largo, estos presentaron cabezas isométricas o morfotipos B1, A1 y C1 respectivamente, el diámetro de sus cabezas osciló entre 54-88 nm y el tamaño de sus colas osciló entre 100 a 300 nm de largo (Figuras 8-11).

Fago F-88

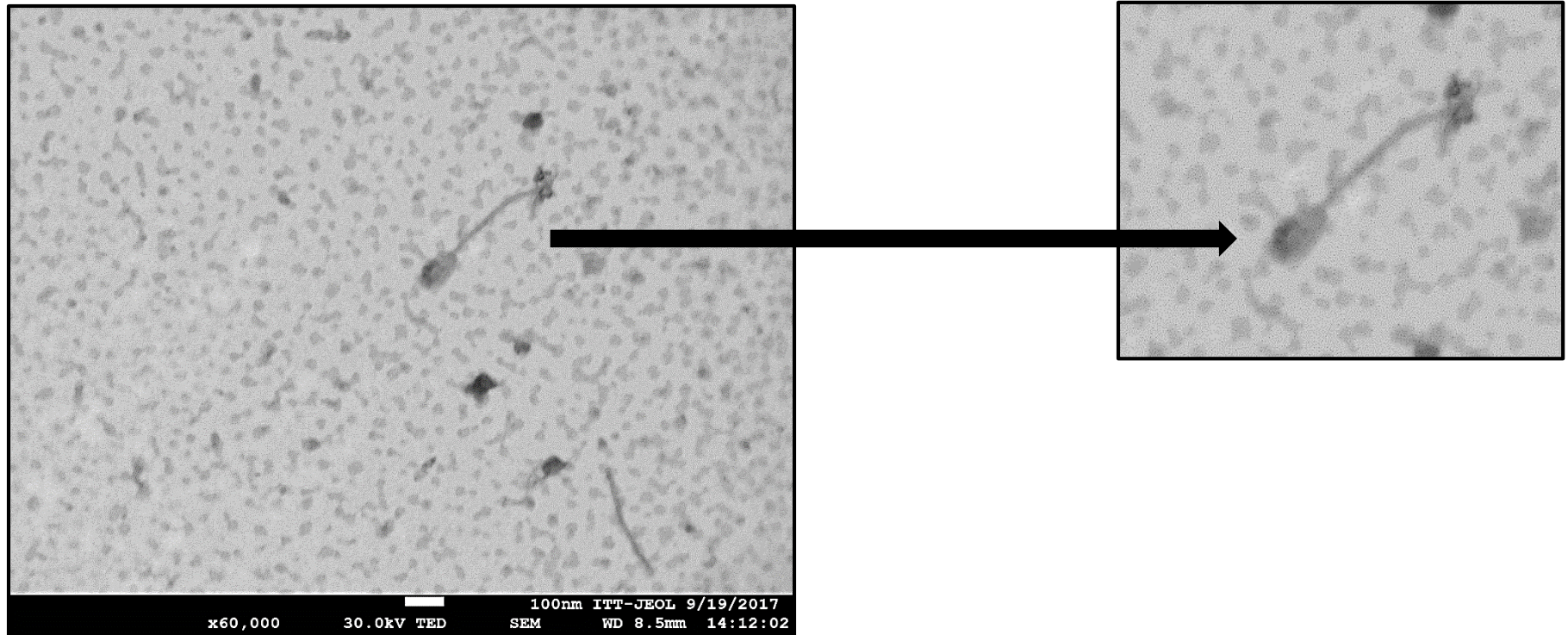


Figura 8. Micrografía de Fago F-88 donde se puede apreciar su morfología perteneciente a la familia Siphoviridae.

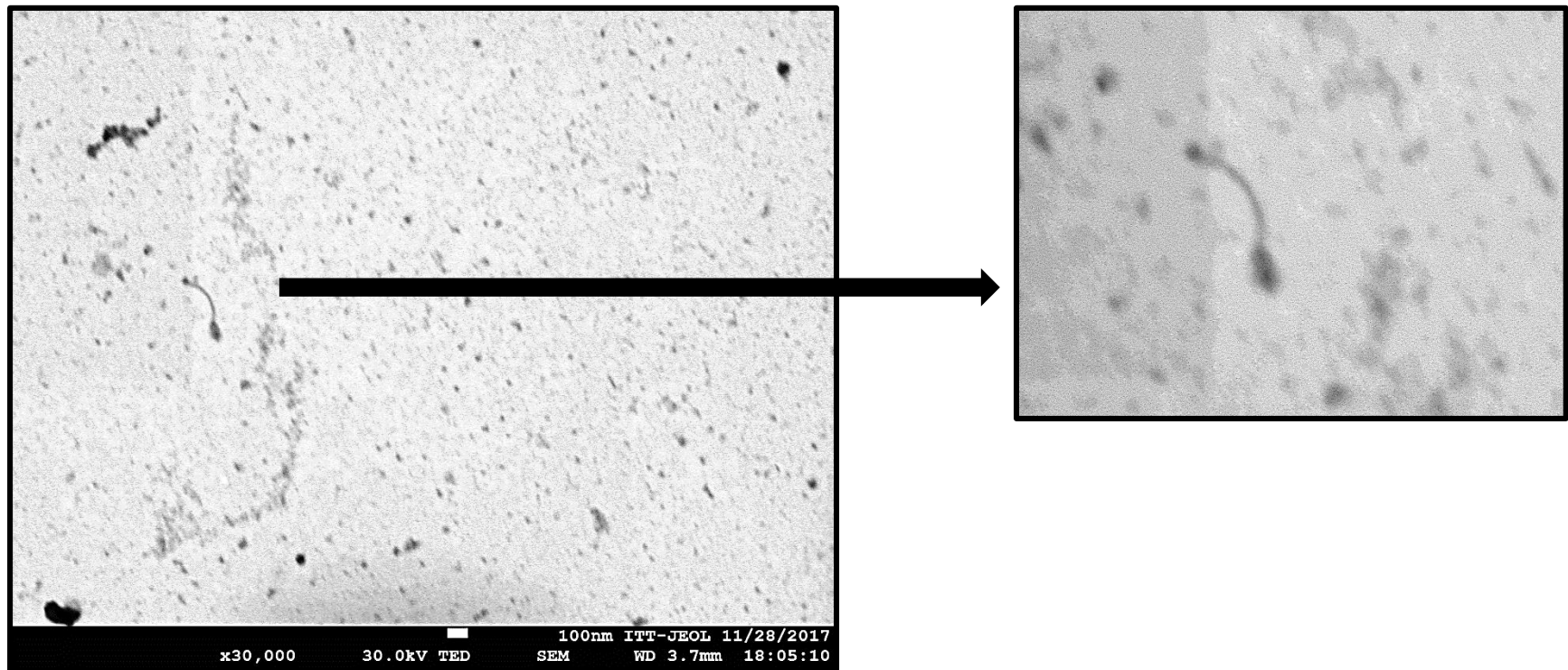


Figura 9. Micrografía de Fago F-83 donde se puede apreciar su morfología perteneciente a la familia Siphoviridae.

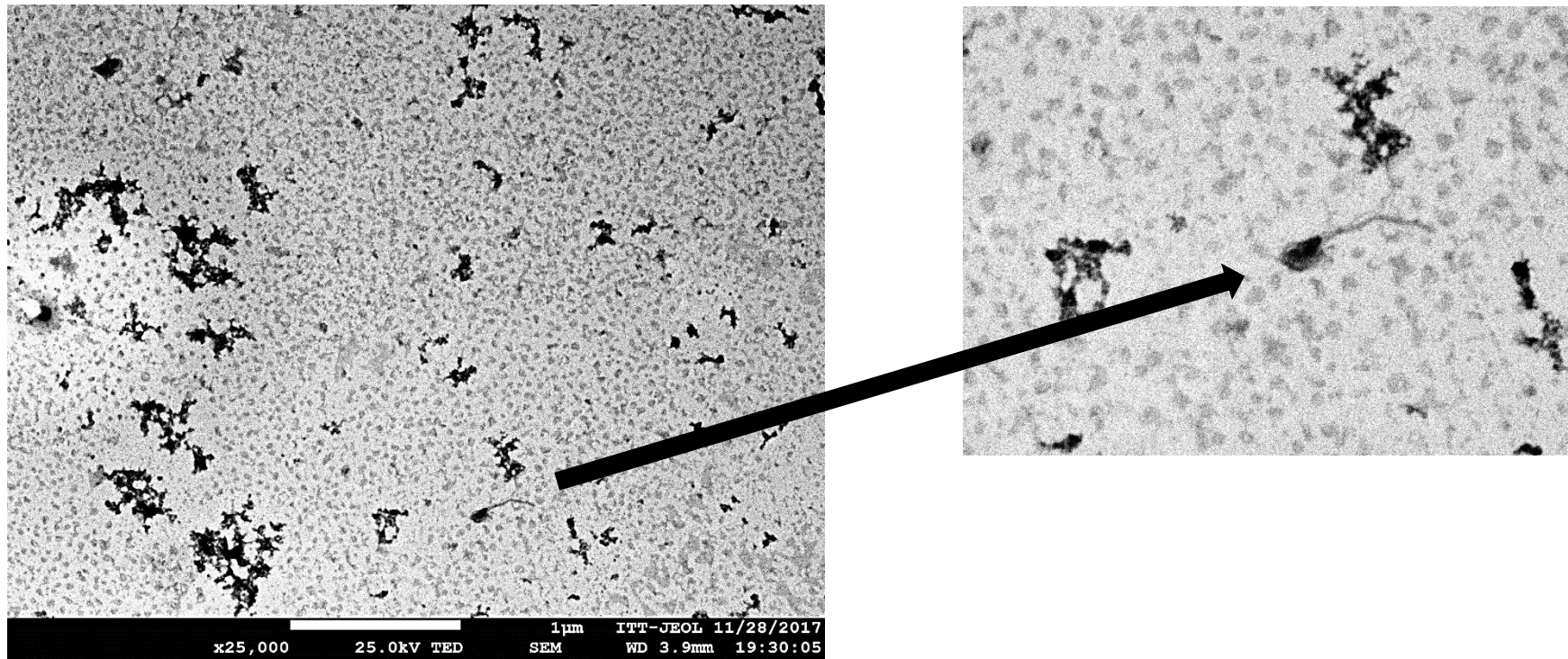


Figura 10. Micrografía de Fago F-36 donde se puede apreciar su morfología perteneciente a la familia Siphoviridae.

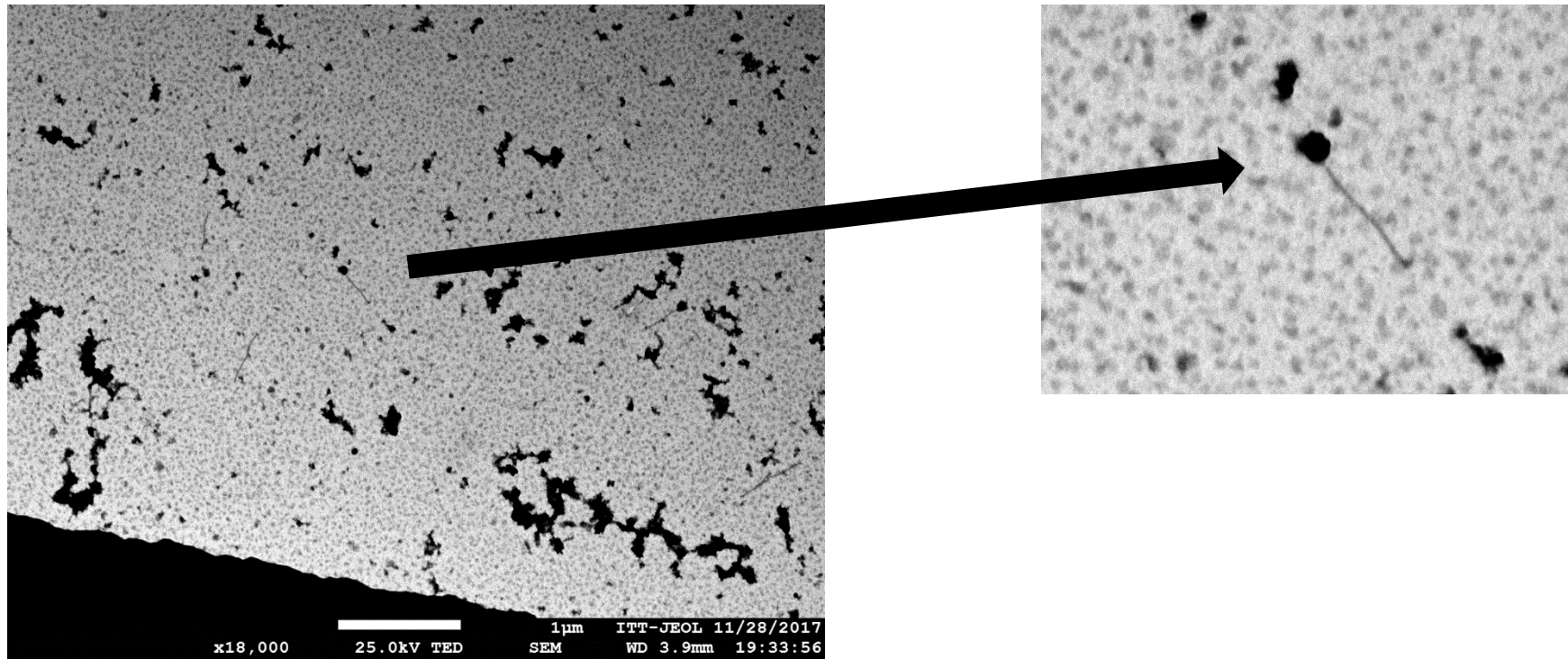


Figura 11. Micrografía de Fago F-53 donde se puede apreciar su morfología perteneciente a la familia Siphoviridae.

7.3 Rango de Hospederos

Una vez que se identificaron las especies de fagos que conforman la colección, se investigó su capacidad lítica utilizando 20 cepas clínicas de SARM procedentes del H.G.O. y U.M.F. No. 7 y del Laboratorio de Análisis Microbiológico de la FCQI UABC Tijuana. Se gotearon diluciones de cada fago sobre un tapiz bacteriano de las cepas y se incubaron durante toda la noche a 30 °C (ver materiales y métodos). Los patrones de lisis se registraron y analizaron para agrupar a los fagos con base a su rango de hospederos.

Los resultados mostraron una alta correlación entre las especies de fagos y el rango de huésped donde todos los fagos desarrollaron placas líticas con un tamaño de 0.5 a 5 mm de diámetro y una apariencia clara, sin embargo, cada fago mostró un patrón de infección diferente. Esto favorece el uso de esta colección de fagos en la identificación de bacterias (fagotipificación) o el control de infecciones clínicas (fagoterapia).

Se pudieron observar los patrones de lisis de los fagos aislados mediante la prueba de puntos en tapices bacterianos, donde el fago F-53 fue el que infectó al 95% de las cepas y el fago F-88 únicamente al 55% de ellas (Figura 12; Tabla 5).

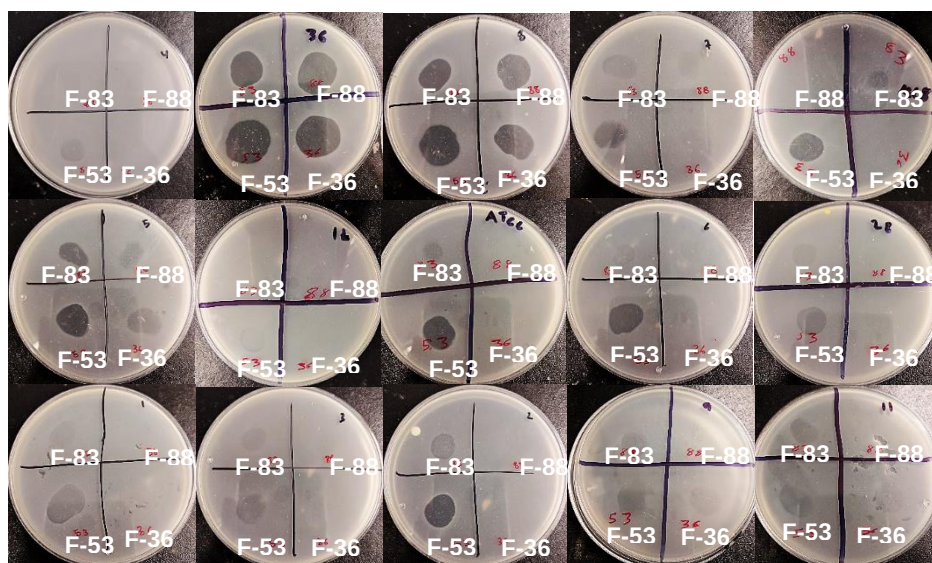


Figura 12. Prueba de puntos para determinar rango de hospederos.

Tabla 5. Rangos de hospederos de los fagos aislados.

Fagos	F-53	F-36	F-88	F-83
Cepa				
EA-1	X	X		X
EA-2	X			X
EA-3	X	X	X	X
EA-4	X	X	X	X
EA-5	X	X	X	X
EA-6	X	X	X	
EA-7	X	X	X	X
EA-8	X	X	X	X
EA-9	X	X	X	X
EA-10	X			X
EA-11	X		X	X
EA-12				
MC-1	X	X		X
MC-2	X		X	X
MC-3	X	X		
MC-4	X			X
MC-5	X	X	X	X
MC-6	X	X		X
MC-7	X			X
MC-8	X			X

7.4 Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo a partir de 500µl de concentrado de lisado fágico mediante el método de Fenol-Cloroformo y el ADN se resuspendió en 200 µl de agua estéril.

7.6 Discusión

De acuerdo a la procedencia de los fagos, todos fueron aislados de muestras de aguas residuales, resultados similares a los observados por otros autores como Grabow et al. en 1984 y 1993 así como por Tartera y colaboradores en 1989 y Wicki et al. en 2011.

Se observó que el uso de membranas de ésteres mixtos de celulosa para el aislamiento de bacteriófagos genera una disminución significativa o total del número de unidades formadoras de placa en los filtrados de fagos, esto debido a que tiene una alta afinidad a las proteínas, por lo tanto, los fagos se adhieren a la superficie de la membrana y no pueden ser recuperados en el sobrenadante filtrado como lo descrito por Anany et al., 2011.

Se encontró que la formación de placas líticas se ve ampliamente favorecida por la adición de CaCl_2 y MgCl_2 en una concentración aproximada de 2mM, similar a lo mencionado por Jensen y colaboradores en 2015. Esto es atribuido al efecto “estabilizador” que ejercen los iones bivalentes en la unión del receptor fágico a la superficie bacteriana en especial el calcio, según los hallazgos encontrados por Chhibber et al. en 2013, siendo este un punto fundamental de la metodología para el aislamiento de los bacteriófagos.

De las cepas analizadas solamente la EA-12 fue resistente a la infección de todos los fagos. Estudios sugieren que esta resistencia está asociada a la presencia de profagos, ya que su prevalencia en estas cepas es 70% mayor en comparación a las cepas sensibles. Adicionalmente, cepas sensibles a la infección, se vuelven resistentes a ellos cuando portan a alguno de estos profagos (Reyes-Cortés, 2016).

Es posible que el aislamiento de las nuevas especies de fagos reportadas en este trabajo, se encuentre determinado por la localización geográfica o la naturaleza de las cepas utilizadas; ya que en este trabajo se usaron solo cepas clínicas similar a lo encontrado por Sepúlveda et al. en 2012, con cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Esta colección de fagos nos permitirá iniciar estudios de fagotipificación y/o fagoterapia contra cepas clínicas locales, así como estudios genómicos específicos con las nuevas especies descritas.

Se ha documentado que menos del 1% de los bacteriófagos presentes en fuentes de aguas o suelos son cultivables y de éstos el mayor porcentaje son fagos que infectan células modelo y no propiamente clínicas debido a los factores de resistencia anteriormente mencionados, de manera que se limita el número de fagos posibles a aislar como lo establecido en los resultados del presente trabajo, se ha demostrado una gran diferencia en los fagos observados por microscopia electrónica directa de muestras de aguas y aquellos aislados mediante las técnicas de plaqueo como lo descrito por Ashfold et al., 2003; Williamson et al., 2003).

7.7 Conclusiones

1. Se obtuvo una estandarización del método de aislamiento para bacteriófagos efectiva por la combinación de las técnicas de goteo, doble capa de agar suave y estriado por palillo.
2. Se comprobó la presencia de bacteriófagos líticos para cepas clínicas de SARM en aguas de drenaje profundo de clínicas de la ciudad de Tijuana y aguas residuales.
3. Se determinó la efectividad de los fagos aislados mediante el rango de hospederos donde el fago Ea-53 presentó el rango de hospederos más amplio al infectar al 95% de las cepas contra las que se probó y el fago Ea-88 presentó el rango de hospederos más estrecho infectando únicamente el 55% de las mismas cepas.
4. Los fagos aislados presentaron genomas de ADN de doble cadena y cápsides con colas (Caudovirales).
5. La distribución morfológica de los fagos fue similar a la observada en los fagos de otras especies bacterianas ya que todos fueron identificados como miembros del orden Caudovirales y familia Siphoviridae como aproximadamente el 96% de los virus aislados en otros estudios.
6. Todos los fagos aislados fueron del tipo lítico.
7. Los fagos aislados fueron clasificados en 4 especies que a pesar de que mostraron la misma morfología pudieron ser diferenciados por su rango de hospederos.

7.3 Recomendaciones

Se sugiere el uso del medio de cultivo TΦ adicionado con Cloruro de Calcio y Cloruro de Magnesio al 2mM así como filtros de polietilsulfona de 0.22micrometros con la finalidad de favorecer la infección de los fagos y evitar su secuestro por adhesión a filtros de alta afinidad a proteínas.

Para el aislamiento de fagos, se sugiere llevar a cabo el cultivo a temperatura de 30°C para favorecer el desarrollo de placas líticas por disminución del metabolismo bacteriano y por ende sus mecanismos de resistencia a la infección.

7.4 Perspectivas

1. Realizar secuenciación de los genomas de los fagos aislados.
2. Efectuar estudios genómicos para la búsqueda de genes de interés o caracterización de las nuevas especies.
3. Identificar los receptores utilizados por las diferentes especies de fagos y caracterizar las proteínas estructurales de los fagos arquetipo.
4. Analizar la importancia de los profagos de las cepas clínicas en la inmunidad o resistencia a la infección por otros fagos.
5. Evaluar el uso de los fagos de esta colección en el control de las infecciones causadas por cepas multiresistentes a los antibióticos.
6. Aislar nuevos fagos capaces de infectar a las bacterias resistentes a la infección de los fagos de la colección para el control de infecciones.
7. Realizar estudios de diversidad con las cepas clínicas de la colección que permitan identificar a las cepas prevalentes en hospitales.

VIII.- BIBLIOGRAFIA

1. A Dublanchet, S Bourne. The epic of phage therapy. Can J Infect Dis Med Microbiol 2007;18(1):15-18. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2542892/pdf/jidmm18015.pdf> Consultado: 10 Julio 2016
2. Ackermann HW The first phage electron micrographs Bacteriophage 1:4, 225-227; July–December 2011; Landes Bioscienc. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3448108/pdf/bact-1-225.pdf> Consultado: 10 Julio 2016
3. Ackermann HW. Et al. 5500 Phages examined in the electron microscope. Arch Virol. 2007 Feb; 152(2):227-43. Epub 2006 Oct 19. Pavani Gandham. Bacteriophages: their use in the treatment of infections in the future. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences ISSN: 2319-7706 Volume 4 Number 2 (2015) pp. 867-879
4. Azeez et al., Application of Nitrocefin Test for the Direct Detection of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus from Bovine Mastitis Milk Samples. Pak. j. life soc. Sci. (2012), 11(2): 96-101
5. Bacteriophages: biology and applications edited by Elizabeth Kutter, Alexander Sulakvelidze First practical applications: veterinary and medicine Cap. 2 Pag. 9; Ed. CRC Press; 2005; Estados Unidos.
6. Bae, T.; Baba, T.; Hiramatsu, K.; Schneewind, O. Prophages of Staphylococcus aureus Newman and their contribution to virulence. Mol. Microbiol. 2006, 62, 1035–1047. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.2006.05441.x/epdf> Consultado en: 02 de noviembre de 2017
7. Brussow, H.; Canchaya, C.; Hardt, W.D. Phages and the evolution of bacterial pathogens: From genomic rearrangements to lysogenic conversion. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2004, 68, 560–602. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC515249/pdf/0004-04.pdf> Consultado en: 10 de Junio 2017

8. Bustos-Martínez Jaime A. et al. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev Biomed* 2006; 17:287-305. Disponible en: <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb061746.pdf> Consultado: 10 Junio 2016
9. Canchaya, C., Proux, C., Fournous, G., Bruttin, A., and Brussow, H. (2003) Prophage genomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 238-276, table of contents. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC156470/> Consultado en: 10 de Junio 2016
10. Carballal, Guadalupe *Virología médica / Guadalupe Carballal y José Raúl Oubiña*. 4 ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Corpus Libros Médicos y Científicos, 2014. Cap 1 Pag. 35-40.
11. Casellas J. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología (2011). *Rev Panam Salud Publica*. 2011;30(6):519–28. Disponible en: <http://www.scielosp.org/pdf/rpsp/v30n6/a04v30n6.pdf> Consultado en: 10 de Junio 2016
12. Casellas JM. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Rev Panam Salud Pública*. 2011; 30(6):519–28.
13. Casjens, S.R. (2005) Comparative genomics and evolution of the tailed-bacteriophages. *Curr Opin Microbiol* 8: 451-458. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16019256> Consultado en: 10 de Junio 2016
14. CDC report Antibiotic resistance threats in the United States, 2013 pag.13.

15. Chhibber S, Kaur T, Kaur S. Essential role of calcium in the infection process of broad-spectrum methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteriophage. *J Basic Microbiol.* 2014 Aug;54(8):775-80. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23686366> Consultado en: 10 de Junio 2016
16. Clark Jason R. et al. Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *TRENDS in Biotechnology* Vol.24 No.5 May 2006. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16567009> Consultado: 10 de Mayo 2016
17. Davies J. and Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance (2010) *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Sept. 2010, p.417–433 Vol. 74, No. 3 Disponible en: <http://pubmedcentralcanada.ca/pmcc/articles/PMC2937522/pdf/0016-10.pdf> Consultado en: 10 de Junio 2016
18. Deghorain M, Van Melderén L (2012) The *Staphylococci* phages family: an overview. *Viruses* 4: 3316–3335. doi: 10.3390/v4123316 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3528268/pdf/viruses-04-03316.pdf> Consultado en: 10 de Junio 2016
19. Deghorain Marie and Van Melderén Laurence. The *Staphylococci* Phages Family: An Overview. *Viruses* 2012, 4, 3316-3335 doi:10.3390/v4123316
20. Done Nicolae 2007 Bacteriophages the revived bacterial killers *Harvard Science Review* spring Pag. 20-23 Disponible en: <http://www.hcs.harvard.edu/~hsr/wp-content/themes/hsr/pdf/pdfspring2007/Bacteriophages.pdf> Consultado: 10 de Julio 2016
21. Duckworth D. Who Discovered Bacteriophage? *Bacteriological Reviews*, Dec. 1976, p. 793-802 1976 American Society for Microbiology Vol. 40, No. 4

Disponibile en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC413985/pdf/bactrev00054-0007.pdf> Consultado: 10 de Julio 2016

22. E.V. Orlova (2012). Bacteriophages and Their Structural Organisation, Bacteriophages, Dr. Ipek Kurtboke (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/34642. Disponible en:
<https://www.intechopen.com/books/bacteriophages/bacteriophages-and-their-structural-organisation->
23. Elbreki Mohamed Et al. Bacteriophages and Their Derivatives as Biotherapeutic Agents in Disease Prevention and Treatment. Hindawi Publishing Corporation Journal of Viruses Volume 2014, Article ID 382539, 20 pages.
24. Fauquet CM Et al., eds (2005) Virus Taxonomy. VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, pp. 7, 43–94, 279–299, 443–446, 741–749, Elsevier Academic Press.
25. Feng, Y.; Chen, C.J.; Su, L.H.; Hu, S.; Yu, J.; Chiu, C.H. Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics. FEMS Microbiol. Rev. 2008, 32, 23–37. Disponible en:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6976.2007.00086.x/epdf>
Consultado en: 10 de Junio 2017
26. Garcia, P.; Martinez, B.; Obeso, J. M.; Lavigne, R.; Lurz, R.; Rodriguez, A. Functional genomic analysis of two *Staphylococcus aureus* phages isolated from the dairy environment. Appl. Environ. Microbiol. 2009, 75, 7663–7673. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2794103/pdf/1864-09.pdf>
Consultado en: 25 de octubre de 2017

27. Gil D De M Monica., *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. *Rev Chil Infect* (2000); 17 (2): 145-152 Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v17n2/art10.pdf> Consultado en: 10 de Junio 2017
28. Goerke, C.; Koller, J.; Wolz, C. Ciprofloxacin and trimethoprim cause phage induction and virulence modulation in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, 50, 171–177. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1346766/pdf/0052-05.pdf> Consultado en: 14 noviembre 2017
29. Goerke, C.; Pantucek, R.; Holtfreter, S.; Schulte, B.; Zink, M.; Grumann, D.; Broker, B.M.; Doskar, J.; Wolz, C. Diversity of prophages in dominant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *J. Bacteriol.* 2009, 191, 3462–3468. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2681900/pdf/1804-08.pdf> Consultado en: 10 noviembre 2017
30. Goerke, C.; Wirtz, C.; Fluckiger, U.; Wolz, C. Extensive phage dynamics in *Staphylococcus aureus* contributes to adaptation to the human host during infection. *Mol. Microbiol.* 2006, 61, 1673–1685. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.2006.05354.x/epdf> Consultado en: 10 de noviembre 2017
31. Goerke, C.; Wolz, C. Adaptation of *Staphylococcus aureus* to the cystic fibrosis lung. *Int. J. Med. Microbiol.* 2010, 300, 520–525. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20843740> Consultado en: 14 noviembre 2017
32. Goerke, C.; Wolz, C. Regulatory and genomic plasticity of *Staphylococcus aureus* during persistent colonization and infection. *Int. J. Med. Microbiol.* 2004,

294, 195–202. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S143842210400044X?via%3Dihub> Consultado en: 10 noviembre 2017

33. González Alemán Mabel. Resistencia antimicrobiana, una amenaza mundial, Rev Cubana Pediatr vol.85 no.4 Ciudad de la Habana oct.-dic. 2013.
34. Gordon Rachel J. et al. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. CID 2008;46 (Suppl 5). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2474459/pdf/nihms-50736.pdf> Consultado: 10 Junio 2016
35. Grabow, W.O.K., Coubrough, P., Nupen, E.M., and Bateman, B.W. (1984) Evaluation of coliphages as indicators of the virological quality of sewage-polluted water. Water SA 10. Disponible en: http://www.wrc.org.za/Knowledge%20Hub%20Documents/Water%20SA%20Journals/Manuscripts/1984/WaterSA_1984_0309%20abstract.pdf Consultado en: 10 de Junio 2017
36. Grabow, W.O.K., Holtzhausen, C.S., and De Villiers, J.C. (1993) Research on bacteriophages as indicators of water quality. WRC Report Report No 321/1/93 Water Research Commission, Pretoria: 147.
37. Greenwood D. and O'grady F. Scanning Electron Microscopy of *Staphylococcus aureus* Exposed to Some Common Anti-staphylococcal Agents Journal of General Microbiology (1972), 70, 263-270 Printed in Great Britain.
38. H. Anany, W. Chen, R. Pelton, M. W. Griffiths Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in Meat by Using Phages Immobilized on Modified Cellulose Membranes Appl Environ Microbiol. 2011 Sep; 77(18): 6379–6387. doi: 10.1128/AEM.05493-11. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3187159/pdf/zam6379.pdf>

39. Hanlon Geoffrey William et al. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* 30 (2007) 118–128.
40. Hatfull G. (2008). Bacteriophage genomics. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 447–453.
doi: 10.1016/j.mib.2008.09.004 Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2706577/pdf/nihms-79245.pdf>
Consultado en: 10 de Junio 2016
41. Häusler 2006 *Viruses vs. Superbugs A solution to the antibiotics crisis?* Londres Macmillan Cap. 4 “the renaissance of phages during the war” pag. 120.
Disponible en:
http://lovelovelovemyphages.synthasite.com/resources/1403987645_VIRUSES%20VS%20SUPERBUGS.pdf. Consultado en: 10 de Junio 2016
42. Jensen KC, Hair BB, Wienclaw TM, Murdock MH, Hatch JB, Trent AT, et al. (2015) Isolation and Host Range of Bacteriophage with Lytic Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Potential Use as a Fomite Decontaminant. *PLoS ONE* 10(7): e0131714. doi: 10.1371/journal.pone.0131714
43. Johnson RP et al., 2008 Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle, poultry and pigs. *Anim Health Res Rev.* 2008 Dec;9(2):201-15. doi: 10.1017/S1466252308001576. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19102791>. Consultado en: 10 de Junio 2016
44. Kevin E. Ashelford, Martin J. Day, John C. Fry Elevated Abundance of Bacteriophage Infecting Bacteria in Soil. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Jan; 69(1): 285–289. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC152412/pdf/0985.pdf>

Consultado en: 10 de noviembre 2017

45. Kim, M.S.; Myung, H. Complete Genome of Staphylococcus aureus Phage SA11. *J. Virol.* 2012, 86, 10232. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3446589/pdf/zjv10232.pdf>
Consultado en: 25 de octubre de 2017
46. Krisch, H.M.; Comeau, A.M. The immense journey of bacteriophage T4--from d'Herelle to Delbruck and then to Darwin and beyond. *Res. Microbiol.* 2008, 159, 314–324. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250808000909?via%3Dihub> Consultado en: 10 de noviembre 2017
47. Kutateladze Mzia et al. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends in Biotechnology* Vol.28 No.12. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20810181> Consultado: 10 Junio de 2016
48. Kwan, T.; Liu, J.; Dubow, M.; Gros, P.; Pelletier, J. Comparative genomic analysis of 18 Pseudomonas aeruginosa bacteriophages. *J. Bacteriol.* 2006, 188, 1184–1187. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1347338/pdf/1246-05.pdf>
Consultado en: 10 de Junio 2017
49. Kwan, T.; Liu, J.; DuBow, M.; Gros, P.; Pelletier, J. The complete genomes and proteomes of 27 Staphylococcus aureus bacteriophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 5174-5179. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC556006/pdf/pnas-0501140102.pdf> Consultado en: 10 de Junio 2017
50. Lindsay, J.A. Genomic variation and evolution of Staphylococcus aureus. *Int. J. Med. Microbiol.* 2010, 300, 98–103. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19811948> Consultado en: 10 de Junio 2017

51. Lobočka, M.; Hejnowicz, M.S.; Dabrowski, K.; Gozdek, A.; Kosakowski, J.; Witkowska, M.; Ulatowska, M.I.; Weber-Dabrowska, B.; Kwiatek, M.; Parasion, S.; Gawor, J.; Kosowska, H.; Glowacka, A. Genomics of staphylococcal Twort-like phages--potential therapeutics of the post-antibiotic era. *Adv. Virus Res.* 2012, 83, 143–216. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123944382000050?via%3Dihub> Consultado en: 02 de noviembre de 2017
52. Lu Timothy K et al. The next generation of bacteriophage therapy. *Current Opinion in Microbiology* 2011, 14:524–531.
53. Luján Roca Daniel Angel. Staphylococcus aureus resistente a meticilina asociado a la comunidad: aspectos epidemiológicos y moleculares, *An. Fac. med.* v.74 n.1 Lima ene. 2013
54. Maura Damien et al. Virulent Bacteriophages Can Target O104:H4 Enteraggative *Escherichia coli* in the Mouse Intestine, December 2012 Volume 56 Number 12 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* p. 6235–6242 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3497199/pdf/zac6235.pdf> Consultado: 21 de octubre de 2017
55. McAdam, P.R.; Holmes, A.; Templeton, K.E.; Fitzgerald, J.R. Adaptive evolution of Staphylococcus aureus during chronic endobronchial infection of a cystic fibrosis patient. *PLoS One* 2011, 6, e24301. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0024301&type=printable> Consultado en: 14 noviembre 2017

56. Miranda Castañeda Marilyn et al. Bacteriemia por *Staphylococcus aureus* en el hospital México 2009. *Revista médica de costa rica y Centroamérica* lxxi (611): 573 - 580, 2014
57. O'Flaherty, S.; Coffey, A.; Edwards, R.; Meaney, W.; Fitzgerald, G.F.; Ross, R.P. Genome of Staphylococcal Phage K: a New Lineage of Myoviridae Infecting Gram-Positive Bacteria with a Low G+C Content. *J. Bacteriol.* 2004, 186, 2862–2871. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC387793/pdf/1425.pdf> Consultado en: 02 de noviembre de 2017
58. OMS Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance, 2014 pag.9,12,13, 14, 17, 18, 19, 27, 28.
59. Pedulla, M.L.; Ford, M.E.; Houtz, J.M.; Karthikeyan, T.; Wadsworth, C.; Lewis, J.A.; Jacobs-Sera, D.; Falbo, J.; Gross, J.; Pannunzio, N.R.; Brucker, W.; Kumar, V.; Kandasamy, J.; Keenan, L.; Bardarov, S.; Kriakov, J.; Lawrence, J.G.; Jacobs, W.R., Jr.; Hendrix, R.W.; Hatfull, G.F. Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes. *Cell* 2003, 113, 171–182. Disponible en: [http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(03\)00233-2.pdf](http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(03)00233-2.pdf) Consultado en: 21 de octubre de 2017
60. Ramírez Sandoval María de Lourdes Patricia. *Acinetobacter Baumannii* y resistencia a los antimicrobianos en un hospital de segundo nivel de la ciudad de México, *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría* 2013 Vol XXVI Núm 104.
61. Reyes-Cortés R, Arguijo-Hernández ES, Carballo-Ontiveros MA, Martínez-Peñafiel E, Kameyama L. (2016) Random Transposon Mutagenesis for Cell-Envelope Resistant to Phage Infection. *Methods Mol Biol.* 2016;1440:71-83. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27311665> Consultado en: 10 noviembre 2017

62. Sabouri Ghannad Masoud, Mohammadi Avid. Bacteriophage: Time to Re-Evaluate the Potential of Phage Therapy as a Promising Agent to Control Multidrug-Resistant Bacteria. Iranian Journal of Basic Medical Sciences Vol. 15, No. 2, Mar-Apr 2012, 693-701
63. Sandeep K. Bacteriophage precision drug against bacterial infections Research News Current Science, Vol. 90, No. 5, 10 March 2006 Disponible en: <http://www.iisc.ernet.in/currsci/mar102006/631.pdf> Consultado: 10 de Julio 2016
64. Son, J.S.; Lee, S.J.; Jun, S.Y.; Yoon, S.J.; Kang, S.H.; Paik, H.R.; Kang, J.O.; Choi, Y.J. Antibacterial and biofilm removal activity of a podoviridae Staphylococcus aureus bacteriophage SAP-2 and a derived recombinant cell-wall-degrading enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 86, 1439–1449. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-009-2386-9> Consultado en: 02 de noviembre de 2017
65. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG., Jr Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(3):649–659. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC90351/pdf/ac000649.pdf> Consultado en: 21 de octubre de 2017
66. Tamariz Jesús H., Lezameta Lizet, Guerra Humberto. Fagoterapia frente a infecciones por staphylococcus aureus meticilino resistente en ratones, Rev Peru Med Exp Salud Publica vol.31 n.1 Lima Jan./Mar. 2014, Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú.
67. Tartera, C., Lucena, F., and Jofre, J. (1989) Human origin of Bacteroides fragilis bacteriophages present in the environment. *Appl Environ Microbiol* 55: 2696-2701. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC203146/pdf/aem00103-0276.pdf> Consultado en: 21 de octubre de 2017

68. Vybiral, D.; Takac, M.; Loessner, M.; Witte, A.; von Ahsen, U.; Blasi, U. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of two lytic *Staphylococcus aureus* phages: 44AHJD and P68. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003, 219, 275–283. Disponible en: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/S0378-1097\(03\)00028-4/epdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/S0378-1097(03)00028-4/epdf) Consultado en: 02 de noviembre de 2017
69. Waldor, M.K., and Mekalanos, J.J. (1996) Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 272: 1910-1914. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8658163> Consultado en: 10 de Junio 2016
70. Wentworth, B.B. Bacteriophage Typing of the Staphylococci. *Bacteriol. Rev.* 1963, 27, 253–272. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2217680/pdf/jhyg00159-0009.pdf> Consultado en: 25 de octubre de 2017
71. Wicki, M., Auckenthaler, A., Felleisen, R., Tanner, M., and Baumgartner, A. (2011) Novel Bacteroides host strains for detection of human- and animal-specific bacteriophages in water. *J Water Health* 9: 159-168. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/742a/ce3e7a231feb468437694007ad14ce797b79.pdf> Consultado en: 25 de octubre de 2017
72. Williamson K. E., Wommack K. E., Radosevich M. (2003). Sampling natural viral communities from soil for culture-independent analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6628–6633. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC262263/pdf/0547.pdf> Consultado en: 10 de noviembre 2017
73. Wittebole X., De Roock S., Opal S.M. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence.* 2014; 5:226–235. doi: 10.4161/viru.25991. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3916379/pdf/viru-5-226.pdf>

Consultado en: 25 de octubre de 2017

74. Xia Guoqing, Wolz Christiane. Phages of *Staphylococcus aureus* and their impact on host evolution. *Infection, Genetics and Evolution* Volume 21, January 2014, Pages 593-601 Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134813001718>

Consultado en: 25 de octubre de 2017

75. Zanetti C.C.S., Mingrone R.C.C., Kisielius J.J., M. Ueda-Ito and A.C.C. Pignatari. Characterization of bacteriophages infecting clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* stored in a culture collection. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2013) 46: 689-695. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3854419/pdf/1414-431X-bjmb-46-08-0689.pdf> Consultado en: 25 de octubre de 2017

76. Nathalie Turgeon, Marie-Josée Toulouse, Bruno Martel, Sylvain Moineau, Caroline Duchaine. Comparison of Five Bacteriophages as Models for Viral Aerosol Studies. *Appl Environ Microbiol.* 2014 Jul; 80(14): 4242–4250. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4068686/pdf/zam4242.pdf>

Consultado en: 25 de octubre de 2017

77. McNerney R, Traore H. Mycobacteriophage and their application to disease control. *J Appl Microbiol* 2005; 99:223–233. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2005.02596.x/epdf>

Consultado en: 25 de octubre de 2017

78. Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses The Online (10th) Report of the ICTV. Hungría 2016. Disponible en: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/

Consultado en: 20 de noviembre de 2017

APÉNDICE

Preparación de medios de cultivo

Medio LB (Medio Luria-Bertani)

Por litro:

Bacto-triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g

Para cajas:

Agar	15 g
------	------

Disolver los ingredientes y calentar en agitación hasta disolver completamente. Ajustar el ajusta el pH a 7 con una solución de NaOH 5N. Esterilizar por autoclave durante 15 min a 120 °C (15 lb/in²).

Medio T ϕ (Caldo triptona o medio para fagos)

Por litro:

Bacto-triptona	10 g
NaCl	5 g
CaCl ₂	222mg
MgCl ₂	222mg

Para cajas:

Bacto-agar	11 g
------------	------

Top agar:

Bacto-agar	7 g
------------	-----

Disolver los ingredientes y calentar en agitación hasta disolver completamente. Ajustar el ajusta el pH a 7 con una solución de NaOH 5N. Esterilizar por autoclave durante 15 min a 120 °C (15 lb/in²).

Buffer para fagos

Trisma-base 50 mM

MgSO₄ 10 mM

NaCl 100 mM

Gelatina 0.01%

Disolver los ingredientes y calentar en agitación hasta disolver completamente. Ajustar el ajusta el pH a 8 con una solución de NaOH 5N. Esterilizar por autoclave durante 15 min a 120 °C (15 lb/in²).

Solución de diálisis

Trisma base 50 mM

NaCl 10 mM

MgCl₂ 10 Mm

Disolver los ingredientes y calentar en agitación hasta disolver completamente. Ajustar el ajusta el pH a 7 con una solución de NaOH 5N.

Materiales

Materiales para el muestreo de agua

- Bata de laboratorio
- Guantes de látex Ambiderm™
- Cubrebocas Protec™
- Tubos cónicos de 15 mL Falcon™
- Marcador indeleble Sharpie™
- Contenedor térmico de poliestireno
- Hilo de nylon
- Refrigerador

Materiales para colección de muestras de cultivos bacterianos

- Bata de laboratorio
- Guantes de látex Ambiderm™
- Cubrebocas Protec™
- Marcador indeleble Sharpie™
- Contenedor térmico de poliestireno
- Refrigerador

Materiales para el aislamiento de cepas de SARM

- Bata de laboratorio
- Guantes de látex Ambiderm™
- Cubrebocas Protec™
- Marcador indeleble Sharpie™
- Cajas de Petri desechables estériles 100x15mm VWR™
- Asa bacteriológica 1/100
- Matraz Erlenmeyer de 1L
- Matraz Erlenmeyer de 250mL
- Barra agitadora magnética de 35x9mm
- Parrilla eléctrica con agitación FISHER®
- Aplicadores de madera ViaMed™
- Medio MSA BD Difco™
- Medio TSA™ caldo BD Difco™
- Sensidiscos cefinase Nitrocef Disks™ BD BBL
- Pinzas de disección curva de punta fina
- Agua estéril Pisa®
- Tubos de microcentrífuga de 1.5mL Eppendorf™
- Tubos BD Vacutainer® con Citrato de Sodio
- Pipeta de transferencia de 3 mL Falcon®

Materiales para la preparación de tapices bacterianos, aislamiento y propagación de bacteriófagos

- Bata de laboratorio
- Guantes de látex Ambiderm™
- Cubrebocas Protec™
- Marcador indeleble Sharpie™
- Cajas de Petri desechables estériles 100x15mm VWR™
- Filtros para jeringa de membrana de polietilsulfona 25mm tamaño de poro 0.22µm Simsii™
- Jeringas desechables de 5mL BD™
- Asa bacteriológica 1/100
- Micropipeta 10-100µL Thermo Scientific™
- Micropipeta 100-1000µL Thermo Scientific™
- Puntillas para Micropipeta de 200µL Eppendorf™
- Puntillas para Micropipeta de 1000µL Eppendorf™
- Tubos de ensayo de 20x150 con tapón de plástico CAP-O-TEST LUDI A.G.™
- Matraz Erlenmeyer de 1L
- Matraz Erlenmeyer de 250mL
- Barra agitadora magnética de 35x9mm
- Parrilla eléctrica con agitación FISHER®
- Incubadora con agitación
- Incubadora
- Campana de flujo laminar
- Autoclave
- Aplicadores de madera ViaMed™
- Tubos de microcentrífuga de 1.5mL Eppendorf™
- Tubos de microcentrífuga de 0.5mL Eppendorf™
- Tubos de microcentrífuga de 0.2mL Eppendorf™
- Hojas de bisturí número 10 Swann Morton™
- Medio TSA™ caldo BD Difco™
- Triptona BD Difco™
- Agar granulado BD Difco™
- Cloruro de Sodio Sigma-Aldrich®
- Cloruro de Calcio Sigma-Aldrich®
- Cloruro de Magnesio Sigma-Aldrich®
- Tris
- Medio Tφ modificado Sólido
- Medio Tφ modificado Suave

Materiales para la determinación del rango de hospederos

- Bata de laboratorio
- Guantes de látex Ambiderm™
- Cubrebocas Protec™
- Marcador indeleble Sharpie™
- Cajas de Petri desechables estériles 100x15mm VWR™
- Micropipeta 10-100µL Thermo Scientific™
- Micropipeta 100-1000µL Thermo Scientific™
- Puntillas para Micropipeta de 200µL Eppendorf™
- Puntillas para Micropipeta de 1000µL Eppendorf™
- Tubos de ensayo de 20x150 con tapón de plástico CAP-O-TEST LUDI A.G.™
- Matraz Erlenmeyer de 1L
- Matraz Erlenmeyer de 250mL
- Barra agitadora magnética de 35x9mm
- Parrilla eléctrica con agitación FISHER®
- Incubadora con agitación
- Incubadora
- Campana de flujo laminar
- Autoclave
- Tubos de microcentrífuga de 1.5mL Eppendorf™
- Tubos de microcentrífuga de 0.5mL Eppendorf™
- Medio TSA™ caldo BD Difco™
- Triptona BD Difco™
- Agar granulado BD Difco™
- Cloruro de Sodio Sigma-Aldrich®
- Cloruro de Calcio Sigma-Aldrich®
- Cloruro de Magnesio Sigma-Aldrich®
- Medio Tϕ modificado Sólido
- Medio Tϕ modificado Suave

Materiales para la concentración de fagos

- Bata de laboratorio
- Guantes de látex Ambiderm™
- Cubrebocas Protec™
- Marcador indeleble Sharpie™
- Micropipeta 10-100µL Thermo Scientific™
- Micropipeta 100-1000µL Thermo Scientific™
- Puntillas para Micropipeta de 200µL Eppendorf™
- Puntillas para Micropipeta de 1000µL Eppendorf™
- Tubos para centrífuga de policarbonato Beckman Coulter® 29x104mm
- Tubos Falcon® de policarbonato de fondo cónico de 50mL
- Matraz Erlenmeyer de 1L
- Matraz Erlenmeyer de 250mL
- Barra agitadora magnética de 35x9mm
- Parrilla eléctrica con agitación FISHER®
- Incubadora con agitación
- Incubadora
- Campana de flujo laminar
- Autoclave
- Tubos de microcentrífuga de 1.5mL Eppendorf™
- Tubos de microcentrífuga de 0.5mL Eppendorf™
- Medio TSB™ caldo BD Difco™
- Triptona BD Difco™
- Agar granulado BD Difco™
- Cloruro de Sodio Sigma-Aldrich®
- Cloruro de Calcio Sigma-Aldrich®
- Cloruro de Magnesio Sigma-Aldrich®
- Medio Tϕ modificado Sólido
- Medio Tϕ modificado Suave

Materiales para la extracción de ADN fágico

- Bata de laboratorio
- Guantes de látex Ambiderm™
- Cubrebocas Protec™
- Marcador indeleble Sharpie™
- Micropipeta 10-100µL Thermo Scientific™
- Micropipeta 100-1000µL Thermo Scientific™
- Puntillas para Micropipeta de 200µL Eppendorf™
- Puntillas para Micropipeta de 1000µL Eppendorf™
- Campana de flujo laminar
- Autoclave
- Tubos de microcentrífuga de 1.5mL Eppendorf™
- Fenol
- Cloroformo
- Agua destilada estéril
- Microcentrífuga Eppendorf®

Material para ensayos de restricción del ADN genómico.

- Bata de laboratorio
- Guantes de látex Ambiderm™
- Cubrebocas Protec™
- Marcador indeleble Sharpie™
- Micropipeta 10-100µL Thermo Scientific™
- Puntillas para Micropipeta de 200µL Eppendorf™
- Puntillas para Micropipeta de 10µL Eppendorf™
- Campana de flujo laminar
- Tubos de microcentrífuga de 1.5mL Eppendorf™
- Tubos de microcentrífuga de 0.2mL Eppendorf™
- Enzima de Restricción Eco RI Biorad®
- Enzima de Restricción Hind III Biorad®
- Agarosa
- Buffer de Restricción Biorad®
- Colorante de Carga Biorad®
- Bromuro de Etidio Biorad®

Materiales para la estandarización del método de tinción negativa para microscopia electrónica

- Bata de laboratorio
- Guantes de látex Ambiderm™
- Cubrebocas Protec™
- Marcador indeleble Sharpie™
- Cajas de Petri desechables estériles 60x15mm VWR™
- Micropipeta 10-100µL Thermo Scientific™
- Puntillas para Micropipeta de 200µL Eppendorf™
- Nitrato de Uranilo Mallinckrodt®
- Molibdato de Amonio Sigma-Aldrich®
- Rejillas ultra delgadas carbono tipo-A 400mesh, cobre tamaño de pozo 42µm Ted Pella.
- Pinzas de alta precisión Dumont®
- Papel Parafilm®
- Paños para tareas delicadas Kimwipes®
- Matraz Volumétrico de 1mL
- Balanza analítica Ohaus™
- Microscópio electrónico JEOL JSM-7800F PRIME Extreme-resolution Analytical Field Emission SEM.