



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO, División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Formato SS-T

SOLICITUD DE TÉRMINO DE SERVICIO SOCIAL

Mtra. María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
PRESENTE



Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
--------------------	-----	-----	-----	---------------------	-----	-----	-----

Datos del Alumno

Nombre : Elvira Valeria Bahena Galnares	
Matrícula : 2153026578	Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica <input type="checkbox"/>
Domicilio : Allende 300, Col. Centro, CP 56100, Texcoco de Mora, Estado de México.	
Teléfono : 5959557485	Celular : 5951136534
Correo Electrónico : valegalnares@outlook.com	CURP : BAGE970125MMCHLL09

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto : Aislamiento de bacteriófagos líticos para su utilización como agente bactericida contra infecciones de superficie ocular farmacorresistentes.							
Lugar donde se realizó el Servicio Social : Asociación para Evitar la Ceguera en México (APEC), I.A.P. Hospital Luis Sánchez Bulnes.							
Dependencia : I.A.P. Hospital Luis Sánchez Bulnes.							
Entidad Federativa : Distrito Federal							
Municipio : Ciudad de México	Localidad : Coyoacán						
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	25	7	2019		31	7	2020

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: 2.- Privado <input type="checkbox"/>	Tipo: 1.- Externo <input type="checkbox"/>
Orientación: 8.- Salud, Alimentación Y Nutrición <input type="checkbox"/>	

FIRMAS

Dra. Laura Estela Castrillón Rivera, No. Económico:8140

Asesor Interno
Nombre, firma y No. Económico

Elvira Valeria Bahena Galnares

Alumno
Nombre, firma

Dr. Rubén Zamora Alvarado

Asesor Externo
Nombre, firma y No. Económico

M. en C. Alma Ibarra Cázeres

Vo. Bo. de la Comisión
Nombre y firma de la persona que autoriza

Ciudad de México a 09 de marzo de 2021

DR. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO
JEFE DEL DEPARTAMENTO SISTEMAS BIOLÓGICOS
P R E S E N T E

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que la alumna **Elvira Valeria Bahena Galnares** con matrícula **2153026578** de la licenciatura en Química Farmacéutica Biológica cumplió su Servicio Social del **25 de Julio de 2019** al **31 de Julio del 2020**, trabajando en el proyecto **"Aislamiento de bacteriófagos líticos para su utilización como agente bactericida contra infecciones de superficie ocular farmacorresistentes"**, cubriendo un total de **480** horas.

Por lo cual solicito amablemente se realicen las gestiones necesarias para apoyar en los trámites que a la interesada convenga.

A T E N T A M E N T E



Dr. Rubén Zamora Alvarado
Investigador Titular
Laboratorio Inmunobiología Molecular
Unidad Periférica Facultad de Medicina UNAM-APEC



Casa abierta al tiempo

Ciudad de México a 09 de Marzo del 2021

Dr. Juan Esteban Barranco Florido

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

P R E S E N T E

Por medio de la presente quiero hacer constar que la alumna **Elvira Valeria Bahena Galnares** con número de matrícula **2153026578** de la licenciatura en Química Farmacéutica Biológica ha concluido la actividad de servicio social con el proyecto titulado Aislamiento de bacteriófagos líticos para su utilización como agente bactericida contra infecciones de superficie ocular farmacorresistentes.

Por lo cual solicito amablemente se realicen las gestiones necesarias para apoyar en los trámites que a la interesada convenga.

Atentamente

Dra. Laura Estela Castrillón Rivera

Asesor Interno

No. Económico 8140



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Ciudad de México a 09 de marzo de 2021

DR. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO
JEFE DEL DEPARTAMENTO SISTEMAS BIOLÓGICOS
P R E S E N T E

Por medio de la presente solicitamos se brinde el apoyo a la alumna **Elvira Valeria Bahena Galnares** con matrícula **2153026578** para realizar los trámites correspondientes de cambio de título y objetivos de su proyecto de servicio social, el cual ha realizado en nuestro laboratorio.

El motivo de esta solicitud es que dado los acontecimientos generados por la pandemia las instalaciones del laboratorio han permanecido cerradas por instrucciones de las instituciones gubernamentales desde el 20 de marzo de 2020 a la fecha, por lo que ha sido imposible continuar con la última etapa de experimentación programada inicialmente, por lo que solo podremos reportar resultados obtenidos de las primeras fases.

Sin embargo, los resultados obtenidos por la alumna **Elvira Valeria Bahena Galnares** son avances importantes, por lo cual no queremos retrasar más sus trámites de titulación.

El título propuesto para el cambio es:

Aislamiento de bacteriófagos líticos para su utilización como agente bactericida contra infecciones de superficie ocular farmacorresistentes.

Hipótesis:

Se logrará el aislamiento de bacteriófagos con posible capacidad lítica obtenidos a partir de aguas residuales para retarlos contra las cepas bacterianas *Pseudomonas spp.* y *Staphylococcus spp.* conseguidas mediante aislamientos clínicos de muestras oculares.

Objetivo general:

Aislamiento y purificación de bacteriófagos con posible capacidad lítica.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Objetivos específicos

Aislamiento y purificación de bacteriófagos a partir de muestras de aguas residuales recolectadas del río de la Hacienda Molino de Flores perteneciente al municipio de Texcoco, Estado de México.

Obtención y caracterización bioquímica de bacterias provenientes de aislados clínicos de secreciones corneales para su futura evaluación lítica con los bacteriófagos purificados.

Sin más por el momento y agradeciendo las atenciones recibidas para el trámite quedamos a sus apreciables órdenes.

ATENTAMENTE

Dra. Laura Estela Castrillón Rivera

No. Económico 8140

Dr. Rubén Zamora Alvarado

Investigador Titular

Laboratorio Inmunobiología Molecular

Unidad Periférica Facultad de Medicina UNAM-APEC



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Unidad de Química Farmacéutica Biológica
UNIDAD XOCHIMILCO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas Biológicos

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Informe de actividades del Servicio Social: *Aislamiento de bacteriófagos líticos para su utilización como agente bactericida contra infecciones de superficie ocular farmacorresistentes.*

Proyecto genérico correspondiente a: *Evaluación de productos relacionados con la salud.*

Presenta: Elvira Valeria Bahena Galnares

Matrícula: 2153026578

Asesores: Dra. Laura Estela Castrillón Rivera

Dr. Rubén Zamora Alvarado

Laura E. Castrillón R.
R. Zamora A.

Fecha de inicio del proyecto: 25 de Julio de 2019

Fecha de término del proyecto: 31 de Julio de 2020

Ciudad de México, México.

Marzo 2021

El presente trabajo se realizó en la Institución de asistencia privada Asociación para Evitar la Ceguera en México (APEC), I.A.P. Hospital Luis Sánchez Bulnes en la Unidad Periférica de Medicina UNAM-APEC, con la supervisión del Dr. Rubén Zamora Alvarado. El cual tuvo colaboración con el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), dentro del Laboratorio C-040 del Departamento de Inmunología a cargo del Dr. Karen Manoutcharian y con la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UAM-X) en el Laboratorio de Inmunología N-014 a cargo de la Dra. Laura Estela Castrillón Rivera y del M. en C. Alejandro Palma Ramos.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
Índice de figuras	9
Índice de tablas	10
Índice de anexos	11
Abreviaturas y Simbología	12
Introducción	13
1. Antecedentes	14
1.1 Bacteriófagos: Breve historia	14
1.2 Clasificación y estructura	15
1.3 Ciclo replicativo	17
1.4 Bacterias de referencia	19
1.4.1 <i>Pseudomonas spp.</i>	19
1.4.2 <i>Staphylococcus spp.</i>	19
1.5 Infecciones de superficie ocular	20
1.5.1 Queratitis	21
1.5.2 Endoftalmitis	22
1.6 Farmacorresistencia en infecciones de superficie ocular	22
1.7 Fagoterapia	23
2. Justificación	25
3. Hipótesis	26
4. Objetivos de trabajo	27
4.1 Objetivo general	27
4.2 Objetivos particulares	27
5. Materiales y métodos	28
5.1 Sitio de estudio y toma de la muestra.	28
5.2 Aislamiento de bacteriófagos.	28
5.2.1 Protocolo A	28
5.2.2 Protocolo B	29
5.3 Activación de cepas ATCC®	29
5.4 Propagación de muestras clínicas.	30

5.5 Tinción de Gram.	31
5.6 Resiembra de cepas ATCC® y muestras clínicas.	31
5.7 Pruebas bioquímicas.	32
5.7.1 Prueba coagulasa	33
5.7.2 Prueba catalasa	33
5.8 Acondicionamiento de las cepas en agar TCA.	34
6. Resultados	35
6.1 Aislamiento y purificación de bacteriófagos.	35
6.2 Activación de cepas ATCC® y muestras clínicas.	35
6.2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027™	36
6.2.2 <i>Staphylococcus aureus subs. aureus</i> ATCC 6538™	36
6.3 Tinción de Gram	37
6.4 Resiembra de cepas ATCC® y muestras clínicas.	38
6.5 Pruebas bioquímicas.	39
7. Discusión	40
8. Conclusiones	42
9. Perspectivas	43
10. Bibliografía	44
11. Anexos	49
12. Resumen	57
12.1 Introducción	57
12.2 Objetivos de trabajo	58
12.2.1 Objetivo general	58
12.2.2 Objetivos particulares	58
12.3 Conclusiones	59
12.4 Referencias bibliográficas	60

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Figura 1. Estructuras proteicas que componen un bacteriófago.	15
Figura 2. Tipos de fagos 3 PFP.	16
Figura 3. Ciclo lítico y lisogénico de los bacteriófagos.	17
Figura 4. Fases del ciclo lítico de los bacteriófagos.	18
Figura 5. Bulbo ocular derecho, en sección horizontal, con los ejes óptico y visual.	21
Figura 6. Pellet protocolo B.	35
Figura 7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 TM	36
Figura 8. <i>Staphylococcus aureus subs. aureus</i> ATCC 6538 TM	36
Figura 9. <i>Staphylococcus aureus subs. aureus</i> ATCC 6538 TM . Morfología macroscópica.	38
Figura 10. <i>Staphylococcus aureus</i> correspondiente a la muestra del Paciente 1.	38
Figura 11. <i>Staphylococcus epidermidis</i> correspondiente a la muestra del Paciente 2.	38
Figura 12. Prueba bioquímica coagulasa.	39
Figura 13. Prueba bioquímica catalasa.	39

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
Tabla 1.	Cepas ATCC® empleadas en la investigación.	29
Tabla 2.	Datos de las muestras clínicas.	30
Tabla 3.	Resiembra de las ATCC®.	31
Tabla 4.	Resiembra de las muestras clínicas.	32
Tabla 5.	Tinción de Gram de las diferentes muestras.	37
Tabla 6.	Pruebas bioquímicas ATCC 6538™ y Pacientes 1 y 2.	39

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXOS		PÁGINA
11.1. Preparación de reactivos.	49
11.1.1 PEG 800 al 20%	49
11.1.2 Buffer TBS (Tris-HCl 50 mM y NaCl 150 mM pH=7.5)	49
11.2 Fundamento de los medios de cultivo.	49
11.2.1 Agar sangre	49
11.2.2 Agar S-110	50
11.2.3 Agar Sal-Manitol	51
11.2.4 Agar Vogel-Johnson	51
11.2.5 Agar Baird Parker	52
11.2.6 Agar <i>Pseudomonas</i>	53
11.2.7 Agar TCA	53
11.2.8 Caldo BHI	54

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

- °C: Grados Celsius
- %: Porcentaje/porciento
- **ADN**: Ácido Desoxirribonucleico
- **ARN**: Ácido Ribonucleico
- **ATCC**: American Type Culture Collection
- **BHI**: Medio de cultivo infusión cerebro corazón
- **FDA**: Food Drugs Administration (por sus siglas en inglés)
- **g**: Gramos
- **HCl**: Ácido clorhídrico
- **H₂O₂**: Peróxido de hidrógeno
- **ICTV**: Comité Internacional de Taxonomía de Virus (por sus siglas en inglés)
- **L**: Litros
- **M**: Molar (Molaridad)
- **mL**: Mililitros
- **mM**: Milimolar
- **NaCl**: Cloruro de sodio
- **NaOH**: Hidróxido de sodio
- **Na₂TeO₃**: Telurito de potasio
- **rpm**: Revoluciones por minuto
- **PEG**: Polietilenglicol
- **pH**: potencial de Hidrógeno
- **S-110**: Agar Staphylococcus 110
- **TBS**: Tris Buffer Salino
- **TCA**: Agar Soya Trypticaseína
- **UFC**: Unidad Formadora de Colonias
- **VIH**: Virus de la Inmunodeficiencia Humana
- **x g**: Por gravedad

INTRODUCCIÓN

Los bacteriófagos son virus que infectan y lisan bacterias, en la actualidad se han aplicado en diferentes ciencias como lo es la Biología Molecular e Investigación Clínica, esto con el fin de encontrar un tratamiento alternativo para tratar principalmente infecciones farmacorresistentes (Fagoterapia); se han utilizado principalmente contra *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Escherichia* y *Mycobacterium*.

En el presente trabajo se aislaron fagos de aguas residuales siguiendo dos metodologías, se utilizaron *Pseudomonas spp.* y *Staphylococcus spp.* obtenidas por secreción corneal de diferentes pacientes de la Institución de asistencia privada Asociación para Evitar la Ceguera en México (APEC), I.A.P. Hospital Luis Sánchez Bulnes, los cuales fueron diagnosticados con queratitis y endoftalmitis, para su identificación de las muestras se realizó una Tinción de Gram, seguida de pruebas bioquímicas para su confirmación. De acuerdo a esto, la prueba de la gota o del spot test, nos ayudaría a evaluar la actividad lítica de los bacteriófagos, rescatarlos e identificarlos para que de esta manera pudiéramos emplearlos para la formulación de agentes antimicrobianos de cepas específicas y posterior a ello evaluarlos en modelos preclínicos de queratitis o endoftalmitis.

Por último, se pretende resaltar la importancia de los fagos y sus grandes ventajas para emplearse contra enfermedades causadas por diferentes microorganismos multirresistentes, ya que al final de la Segunda Guerra Mundial el éxito de los antibióticos de amplio espectro, la comprensión inadecuada de la biología de los fagos y las imperfecciones en las técnicas de diagnóstico bacteriológico de la época hizo que la fagoterapia quedara abandonada.

1. ANTECEDENTES

1.1 Bacteriófagos: Breve historia

Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan y lisan bacterias de manera especie-específica, consisten fundamentalmente de material genético y proteínas. Su genoma puede componerse de ADN o de ARN el cual puede ser de cadena doble o de una sola cadena (Segundo, A., et. al, 2010). Los fagos son los entes más abundantes en la naturaleza, se han aislado de todos los ambientes explorados y se estima que en nuestro planeta debe haber del orden de 10^{31} individuos. Su ubicuidad se debe a que proliferan en los ambientes que colonizan sus huéspedes bacterianos, ya que necesitan de su maquinaria celular para multiplicarse; hasta la fecha se han identificado bacteriófagos que infectan a más de 144 géneros del dominio *Bacteria* y a 10 géneros del dominio *Archea* (Spreco, A., 2001).

Fueron observados por primera vez en 1896, cuando Ernest Hankin, un bacteriólogo británico reportó haber observado una marcada actividad antibacteriana contra *Vibrio cholerae*, en aguas tomadas de los ríos Ganges y Junna en la India y sugirió la existencia de una sustancia no identificada que pasaba a través de poros finos y lábil al calor responsable de este fenómeno (Segundo, A., et. al, 2010). Dos años después Gamaley a un bacteriólogo ruso observó un fenómeno similar; sin embargo fue hasta 1915, cuando Frederick Twort, un médico bacteriólogo británico, reportó haber observado la presencia de agentes filtrables y fue él quien aventajó la hipótesis de que podrían ser virus, no obstante debido a diversas circunstancias –algunas de ellas financieras- Twort no continuó con sus experimentos, y fue hasta dos años después cuando se consideró a los fagos oficialmente descubiertos cuando el Francocanadiense Félix d'Herelle les dio nombre por primera vez en 1917 (Vispo, N., 2016), el cual se desarrolló cuando éste buscaba una vacuna que pudiera combatir la crisis de disentería hemorrágica que se presentó en 1915 en las afueras de Francia. Sobre estos estudios d'Herelle observó que tras aislar lisados libres de bacterias de la materia fecal de los enfermos las bacterias eran destruidas por un agente desconocido, invisible capaz de destruir cultivos de bacterias o producir pequeñas áreas de color más claro cuando las bacterias eran crecidas en confluencia en placas de medio sólido (Segundo, A., et. al, 2010).

Mientras que muchos de los primeros ensayos de fagoterapia fueron exitosos y muchas de las principales compañías farmacéuticas vendieron preparaciones de fagos con este fin, también hubo fracasos que disminuyeron su uso en Occidente como: 1) el éxito de los antibióticos de amplio espectro,

2) una comprensión inadecuada de la biología de los fagos y 3) imperfecciones en las técnicas de diagnóstico bacteriológico de la época (Deresinski, S., 2009); por lo que la investigación en fagoterapia en Europa occidental y América fue abandonada. En los últimos años, con el incremento en la frecuencia de aparición de cepas multirresistentes a antibióticos, los investigadores han retomado el interés en el desarrollo de fagoterapia (Prada, C. et. al, 2015); así como el uso de proteínas derivadas de fagos como agentes de diagnóstico (Smith, D., et. al, 2001), agentes terapéuticos (Loeffler, J., 2001) (Schuch, R., Nelson, D. & Fischetti, V., 2002) y para el desarrollo de nuevos fármacos (Liu, J., et. al, 2004).

1.2 Clasificación y estructura

Los genomas de los fagos, como los plásmidos, codifican las funciones requeridas para la replicación en bacterias, pero a diferencia de los plásmidos, también codifican proteínas de la cápside y proteínas no estructurales requeridas para el ensamblaje de fagos (Holmes, R. & Jobling, M., 1996). Por consiguiente, el tamaño de sus genomas varía enormemente, desde unas pocas miles de pares de bases hasta más de 670 kilobases (Hutson, M., 1995). Aunque el tamaño de este genoma supera el de la arquea y eubacteria más pequeña (Peterson, S. & Fraser, C., 2001). El ácido nucleico está protegido por una cubierta de proteínas denominada cápside. La estructura de los fagos está determinada por sus proteínas de envoltura (o proteínas estructurales) cuya función principal es la de proteger al material genético fágico; estas proteínas pueden, además, proveer al fago de: cuello, cola, fibras caudales, lamina basales y/o espículas (Figura 1.) (Leiman, P., et. al, 2010).

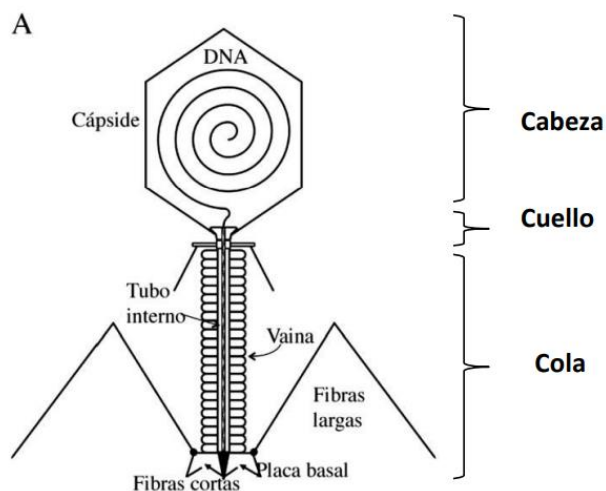


Figura 1. Estructuras proteicas que componen un bacteriófago. Tomado de (Leiman, P., et. al, 2010).

El material genético contiene información específica y tiene el potencial operacional para modificar la maquinaria de la célula infectada, utilizándola a su favor para llevar a cabo la producción de los componentes de las nuevas partículas virales (Flores, V., 2017).

Una partícula fágica o virión, está constituida por una molécula de ADN o ARN de cadena sencilla o doble, encapsulada dentro de una cubierta de proteínas o lipoproteínas. Tradicionalmente, el ICTV (Comité Internacional de Taxonomía de Virus, por sus siglas en inglés) considera la morfología de los fagos y la composición de sus ácidos nucleicos como base para su clasificación en 13 familias. Más del 95% de los fagos descritos en la literatura, pertenecen al orden de los *Caudovirales* o fagos con cola y ADN de doble cadena. Las tres familias principales que comprenden este orden se distinguen por la morfología tan distinta de sus colas: 60% de ellos son *Siphoviridae*, con colas largas y flexibles; 25% son *Myoviridae*, con colas contráctiles; y 15% *Podoviridae*, con colas cortas (Sepúlveda, A., 2012). Los fagos poliédricos, filamentosos y polimórficos (conocidos como los fagos 3 PFP) (Figura 2.) representan solo el 3-4% de los fagos conocidos y pertenecen a 10 familias pequeñas (Holmes, R. & Jobling, M., 1996).

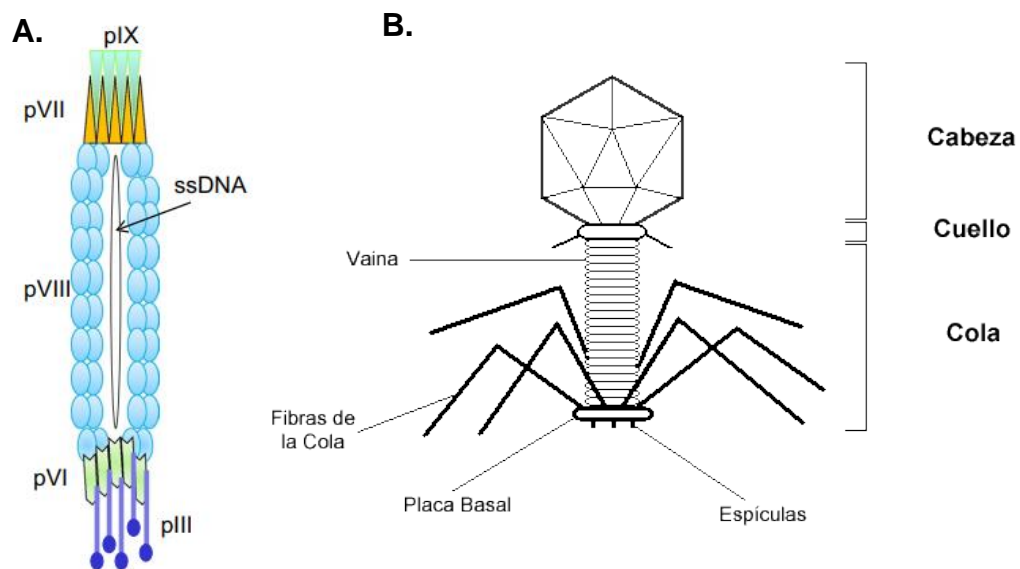


Figura 2. Tipos de fagos 3 PFP. A. Bacteriófago con simetría filamentososa, se muestran las diferentes proteínas que conforman su cápside; tomado de (Sioud, M., 2019). B. Bacteriófago complejo con simetría icosaédrica; tomado de (Segundo, A., et. al, 2010).

1.3 Ciclo replicativo

Los ciclos replicativos de los fagos se clasifican en dos grupos principales: Líticos obligados (Ciclo Lítico) y Atemperados (Ciclo Lisogénico) (Holmes, R. & Jobling, M., 1996).

El primer ciclo replicativo es el denominado *lítico*, en donde se da un reconocimiento de los receptores de la bacteria por los contra receptores del fago, una adsorción del fago a la célula huésped, seguido de la penetración del ácido nucleico fágico a la bacteria, el desarrollo intracelular de los componentes fágicos y la liberación de progenie viral. El segundo es el denominado ciclo *lisogénico*, que comprende prácticamente los mismos pasos que el lítico, pero después de la penetración, el ácido nucleico del fago se inserta en el cromosoma bacteriano y se replica como si fuera un gen más de la bacteria (Figura 3.) (Segundo, A., et. al, 2010).

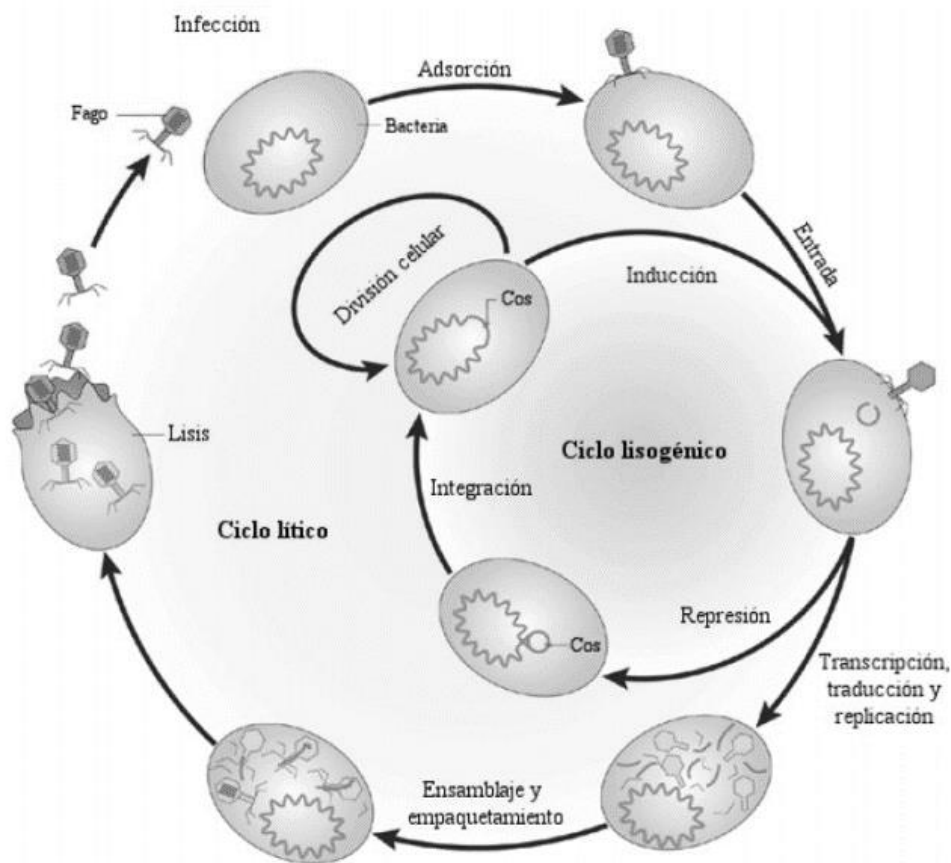


Figura 3. Ciclo lítico y lisogénico de los bacteriófagos. Tomado y modificado de (Sepúlveda, A., 2012).

Durante la generación de la progenie fágica, pueden distinguirse los periodos denominados eclipse y latencia. El primero comprendido desde la inyección del ADN fágico hasta la formación de los viriones maduros en el citoplasma bacteriano; y el segundo comprendido desde la inyección del ADN fágico hasta la liberación al medio de las nuevas partículas fágicas. La progenie fágica desarrollada en el interior de la bacteria infectada se conoce como tamaño de explosión (Figura 4.). Todos estos parámetros son específicos de cada fago y dependen del huésped y del medio ambiente (Flores, V., 2017).

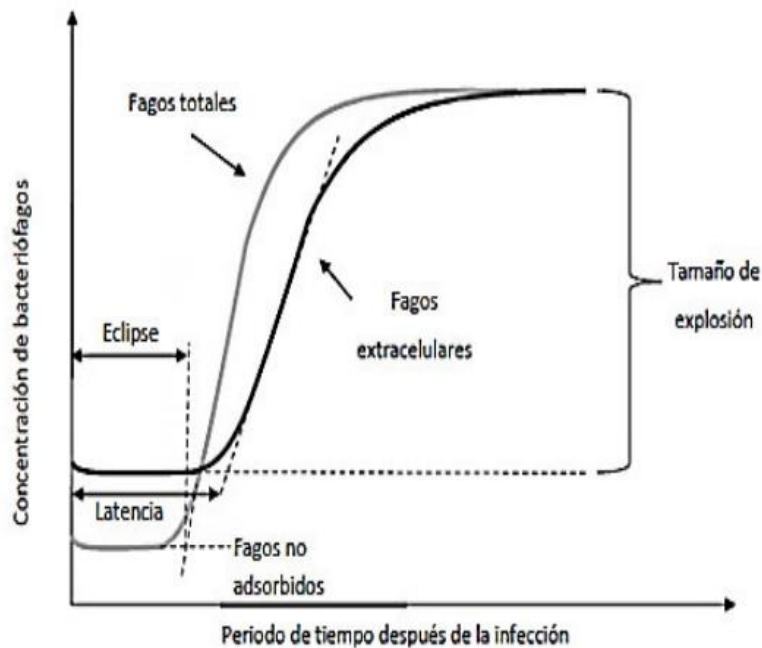


Figura 4. Fases del ciclo lítico de los bacteriófagos. Tomado de (Flores, V., 2017).

Para su aislamiento, caracterización y modificación de los bacteriófagos es necesario tomar en cuenta la cepa bacteriana huésped y su cinética de crecimiento, el aislamiento de los bacteriófagos que realiza mediante la metodología de Phumkhachorn (Fernández, C., Flores, V. & Morillo, M., 2017) y la purificación del bacteriófago, mediante la técnica de la doble capa. En la caracterización, se tiene que tomar en cuenta termoestabilidad, estabilidad a diferentes pH y su evaluación del espectro del hospedero para poder observar la reducción del crecimiento bacteriano y así llevar a cabo la fagoterapia (Fernández, C., Flores, V. & Morillo, M., 2017).

1.4 Bacterias de referencia

1.4.1 *Pseudomonas spp.*

Es un patógeno ubicuo, oportunista y bastante persistente en el medio ambiente. Esta bacteria tiene forma de bastón aproximadamente de 0,5-1 μm in diámetro y de 1,5-5 μm de largo (Paz, V., 2019). Es un bacilo Gramnegativo y cuenta con un flagelo polar que le confiere la motilidad necesaria (Cortés, P., 2000). Se considera a esta especie como bacteria aerobia facultativa debido a la capacidad que tiene para crecer en medios anaerobios tomando el nitrógeno o arginina como terminal de aceptación de protones. Este patógeno ubicuo en el medio ambiente puede llegar a persistir de manera eficaz en el agua y en el suelo viviendo con un requerimiento nutricional mínimo y tolerando diversos medios físicos (Paz, V., 2019). Pueden crecer entre 20 y 43°C, y al crecer en altas temperaturas se diferencia en *Pseudomonas aeruginosa* del resto de las otras especies de *Pseudomonas*. Se caracterizan por ser parte del grupo de no fermentadores que tienen en común la incapacidad de fermentar lactosa, con la capacidad de utilizar fuentes de carbono y nitrógeno como acetato y amoníaco, obteniendo energía de la oxidación de azúcares (Paz, V., 2019).

La capacidad que tienen las *Pseudomonas* para causar un amplio margen de infecciones radica en la gran variedad de factores de patogenicidad que posee (Paz, V., 2019), sin embargo raramente causa enfermedades en individuos sanos, pero es altamente patógena cuando se producen alteraciones en las defensas del huésped como la rotura de la integridad de la piel o mucosas, el uso de dispositivos médicos en el momento de una cirugía o bien la alteración de mecanismos de defensa específicos (Cortés, P., 2000).

1.4.2 *Staphylococcus spp.*

Se trata de un patógeno en forma de cocos, catalogado como Grampositivo (de acuerdo con su pared celular) que poseen tendencia a agruparse en racimos. Tienen una forma esférica y un diámetro de alrededor de 1 μm . Se destaca como un importante patógeno humano, que produce infecciones tanto en la comunidad como a nivel hospitalario. Dependiendo de la especie de este género de bacteria, puede ser integrante de la flora normal de piel, pero puede producir infecciones crecientes de piel y anexos, colonizando cuerpos extraños y también es causa de infecciones profundas en huéspedes

inmunocomprometidos. En cuanto a su forma de obtener energía es tanto a través de la fermentación como de la respiración. En cuanto a los requerimientos de cultivo, son no exigentes desde el punto de vista nutricional, creciendo en medios pobres y simples. En su relación con el oxígeno son aerobios-anaerobios facultativos (Seija, V., 2008).

Las especies más frecuentemente involucradas en patología humana son: *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *S. haemolyticus* y *S. saprophyticus* que, en conjunto, alcanzan hasta 80% de los casos; el resto se debe a *S. lugdunensis*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. auricularis*, *S. cohnii* entre otras.

Su virulencia está fundamentalmente relacionada con la capacidad de ciertas cepas de expresar adhesinas y formar biopelículas (slime o biofilms) en dispositivos médicos, así como en los lentes de contacto, etc., en cuya intimidad los microorganismos se agregan y forman macro colonias que crecen protegidas de la acción de antimicrobianos, anticuerpos, y de otros mecanismos de defensa del hospedero (Fariña, N., et. al, 2013).

1.5 Infecciones de superficie ocular

Las enfermedades infecciosas están catalogadas entre las primeras causas de muerte en el mundo y, por lo tanto, son consideradas un problema de salud pública (Prada, C. et. al, 2015).

El ojo es el órgano de la visión (Figura 5.) y, en ocasiones, presenta trastornos leves o enfermedades de entidad (Estilita Esteva Farmacéutica, 2006). La infección ocular es una de las principales causas de ceguera en los países en vías de desarrollo, así mismo, es una de las causas por intervenciones quirúrgicas y las complicaciones postcirugía. Para el manejo de estas infecciones es fundamental establecer el diagnóstico microbiológico puesto que las manifestaciones clínicas a menudo son inespecíficas. Por otro lado, el diagnóstico debe obtenerse lo más pronto posible porque los tejidos oculares son muy vulnerables a la respuesta inflamatoria y su lesión conduce a la pérdida irreversible de agudeza visual. Algunas infecciones oculares que frecuentemente se presentan son: conjuntivitis, uveítis/coriorretinitis, blefaritis, orzuelo, dacriocistitis y dacrioadenitis, canaliculitis, queratitis y endoftalmitis (Etxebarría, J., López-Cerero, L., & Mensa, J., 2008).

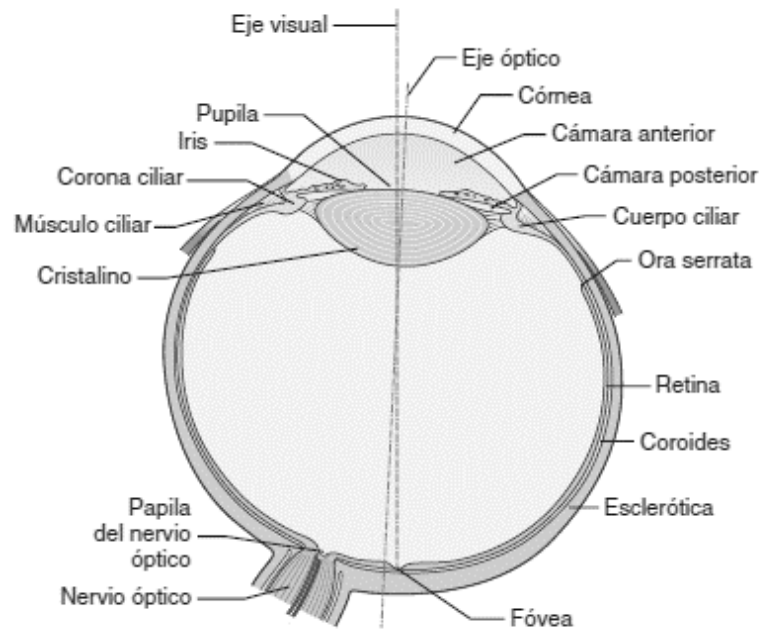


Figura 5. Bulbo ocular derecho, en sección horizontal, con los ejes óptico y visual. Tomado de (Silverthorn, 2014).

Las infecciones más comunes en la práctica oftalmológica farmacorresistentes son la queratitis y la endoftalmitis, que pueden causar pérdida visual importante (Galvis, V., et. al, 2014).

1.5.1 Queratitis

Es una infección del epitelio corneal y con cierta frecuencia, pero no siempre, de otras capas de la córnea (Etxebarría, J., López-Cerero, L., & Mensa, J., 2008). Es de extrema gravedad conduciendo en ocasiones a la afectación de toda la córnea a incluso perforación y pérdida del ojo. Precisan pues, una confirmación clínica correcta, un tratamiento antibiótico que puede ser múltiple y por diferentes vías de administración y, siempre que sea posible, determinar el agente etiológico.

Los microorganismos más frecuentemente aislados son: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella*, enterobacterias y estreptococo β -hemolítico. La rotura de epitelio de la córnea facilita la adherencia bacteriana y la invasión del estroma corneal (García, B., et. al, 2015).

1.5.2 Endoftalmitis

La endoftalmitis es la inflamación de los fluidos (Etxebarría, J., López-Cerero, L., & Mensa, J., 2008) y tejidos intraoculares (retina, coroides, humor acuoso, humor vítreo) y de las cavidades contiguas. Es una patología que reviste extrema gravedad en cuanto a pérdida funcional y anatómica del ojo y que aparece como respuesta a infección, traumatismo, alteraciones físicas y químicas, inmunidad, vasculitis y neoplasia (García, B., et. al, 2015), puede producir apoptosis de fotorreceptores, células ganglionares y bipolares, o desprendimiento de retina. Todo esto puede tener como consecuencia la pérdida de visión, incluso la pérdida del globo ocular (Achurra, A., et. al, 2014). La más frecuente es la endoftalmitis postoperatoria aguda, que tiene mayor incidencia en pacientes diabéticos y en inmunodeprimidos (García, B., et. al, 2015).

Los patógenos más comunes involucrados son *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Pseudomonas spp* y *Clostridium spp* (Etxebarría, J., López-Cerero, L., & Mensa, J., 2008) (García, B., et. al, 2015).

1.6 Farmacorresistencia en infecciones de superficie ocular

Las infecciones bacterianas causan gran preocupación, dado que las bacterias adquieren día a día mayor resistencia a los antibióticos; esto ocurre por medio de diversos mecanismos fisiológicos y moleculares (Prada, C. et. al, 2015), por ejemplo: la variabilidad genética, la modificación de la permeabilidad de la membrana interna, la extracción del compuesto y la inhibición enzimática, así como modificando el blanco ribosomal, bombas de eflujo o alterando la composición y el contenido de glicoproteínas de la pared bacteriana que les permiten a estos microorganismos adaptarse rápidamente a condiciones adversas. La resistencia a los antimicrobianos está teniendo un impacto negativo en la lucha contra las infecciones oculares (Sotero, J., 2011).

La extensión de la resistencia entre las infecciones oculares comenzó a ser identificada durante el último cuarto del siglo XX. Durante 1980, los aminoglucósidos (gentamicina y tobramicina), fueron considerados como el tratamiento de elección en infecciones oculares. Sin embargo, para el lustro entre 1985 y 1990, fue evidente que las bacterias infectantes para el ojo se convirtieron en resistentes a esta familia de antibióticos: 8% de las *P. aeruginosa* aisladas de muestras de queratitis ulcerativas eran resistentes a la gentamicina. Aproximadamente al mismo tiempo la resistencia a aminoglucósidos entre

Gram positivos también fue notada. En 1990 las quinolonas fueron introducidas en oftalmología como alternativa a la resistencia de las infecciones. Estos agentes eran altamente activos contra un amplio espectro de bacterias Gram positivas y Gram negativas y fueron efectivas contra cepas resistentes a los aminoglucósidos. Sin embargo, en sólo dos años se informaron los primeros casos de resistencia bacteriana a las mismas, donde se observaron principalmente en Gram positivos (ej. *S. epidermidis* aisladas en endoftalmitis) y Gram negativos (ej. *P. aeruginosa* aislada en queratitis). Nuevas fluoroquinolonas han mejorado la actividad contra cocos Gram positivos resistentes a generaciones anteriores de quinolonas, pero desafortunadamente parecen no tener actividad contra *P. aeruginosa* resistente a generaciones anteriores de quinolonas. La resistencia a β -lactámicos también se ha hecho prevalente entre las muestras oculares aisladas. Estudios longitudinales bajo estrecha vigilancia indican un progresivo incremento en la prevalencia de resistencia por *S. aureus* y *S. pneumoniae* (Sotero, J., 2011).

Existen cuatro vías de administración para lograr concentraciones de antimicrobianos en los tejidos oculares: aplicación local, inyección subconjuntival, inyección intravítrea y administración parenteral sistémica. La vía más comúnmente usada es la aplicación local. Las gotas oftálmicas de antimicrobianos se emplean para combatir infecciones bacterianas de los ojos, así como para profilaxis en casos quirúrgicos y traumáticos (Sotero, J., 2011). Los datos confirman que las pautas cortas de antibióticos tópicos afectan los patrones de resistencia de la flora periocular. Gradualmente se están describiendo resistencias aumentadas en bacterias como estafilococos coagulasa-negativos (*S. epidermidis*), *S. aureus* y *P. aeruginosa* (Sotero, J., 2011).

1.7 Fagoterapia

Es imposible concebir una estrategia para el uso de antibióticos en la clínica oftalmológica que obvie completamente el desarrollo de resistencia a los antibióticos (Sotero, J., 2011) por lo que la fagoterapia es una alternativa para las bacterias multirresistentes a antimicrobianos, la cual es un tratamiento basado en la actividad bactericida de los bacteriófagos que consiste en que los fagos (líticos) reconocen la superficie de la célula bacteriana, inyectan su ADN o ARN, y se multiplican y ensamblan dentro de la bacteria, para finalmente romper la célula y liberar su progenie, que infectará nuevas células bacterianas.

El número de fagos crece de forma exponencial, por lo cual su mayor efecto es en el sitio de infección (Prada, C. et. al, 2015). Su eficacia ha sido probada incluso contra microorganismos resistentes a antibióticos (Vispo, N., 2016), de los cuales los ensayos clínicos más claramente documentados han sido publicados por el Instituto de Inmunología y Terapia Experimental (también conocido como “Instituto Hirszfeld”). Este instituto ha publicado numerosos artículos que abarcan, en total, datos sobre aproximadamente 2,000 pacientes infectados con una variedad de patógenos (Dini, C., 2011) (*Enterococcus*, *Mycobacterium*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*) (Fernández, J., Pchades, Y. & Vispo, N., 2019) que fueron tratados con fagos y cuyos resultados, en forma global, fueron exitosos entre del 60 al 90% de los casos (Dini, C., 2011).

Así mismo, la búsqueda de alternativas para el tratamiento de bacterias multirresistentes ha hecho resurgir el interés en la fagoterapia como estrategia de biocontrol de patógenos. Entre las potenciales ventajas del uso de fagos respecto a los antibióticos pueden citarse (Dini, C., 2011):

- La alta especificidad de infección.
- Un mecanismo de acción totalmente diferente al de los antibióticos, lo que hace a los fagos efectivos incluso frente a bacterias resistentes a múltiples antibióticos.
- Una farmacocinética tal que la dosis inicial de fagos se incrementa exponencialmente al alcanzar el foco de la infección.
- La habilidad de los fagos de mutar como respuesta ante la aparición de bacterias resistentes a la infección.
- El costo de producción.

2. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones bacterianas siempre han sido un problema de salud que aqueja a la humanidad causando enfermedades que le han llevado en muchos casos a la muerte, como es el caso de Cólera, Tuberculosis, Lepra, Lyme, etc.

De igual manera, causan gran preocupación, dado que las bacterias adquieren día a día mayor resistencia a los antibióticos; esto ocurre por medio de diversos mecanismos fisiológicos y moleculares que les permiten a estos microorganismos adaptarse rápidamente a condiciones adversas. La resistencia a los antimicrobianos está teniendo un impacto negativo en la lucha contra infecciones de muchas enfermedades.

Los Bacteriófagos (fagos) son entes biológicos clasificados como virus capaces de infectar única y exclusivamente células bacterianas, para ello existen fagos con propiedades líticas o lisogénicas y no es más que solo el mecanismo que utilizan para infectar y propagar sus viriones, los fagos al ser un parásito obligado, depende completamente de la maquinaria transcripcional del hospedero, pudiendo o no integrar su genoma en la bacteria para seguir promoviendo su progenie.

Actualmente está demostrado la inocuidad de los fagos en animales y humanos, siendo su único blanco las células bacterianas, lo cual nos lleva a un camino interesante en el uso de estos agentes como alternativa de uso ante infecciones bacterianas multirresistentes.

La FDA (Food and Drug Administration; por sus siglas en inglés), otorgó la primera licencia de uso de los bacteriófagos en el año del 2006, su uso se enfocaba en la aplicación del bacteriófago en la industria alimentaria para consumo humano, la variante del bacteriófago aprobado fue contra la bacteria *Listeria monocytogenes* y una cepa de *Escherichia coli*, causante de infecciones gastrointestinales.

En el presente proyecto, se pretende obtener aislados de bacteriófagos, caracterizarlos y emplearlos para la formulación de agentes antibacterianos de cepas específicas que afectan a distintas patologías oculares como son la queratitis y endoftalmitis probando su eficacia y seguridad en modelos preclínicos. La implementación de estas nuevas terapias en el ambiente médico será de gran ayuda para combatir infecciones bacterianas farmacorresistentes, el auge de cepas resistentes y cada vez menos efectiva la capacidad bactericida de los fármacos nos lleva nuevamente a utilizar su limitador biológico natural.

3. HIPÓTESIS

Se logrará el aislamiento de bacteriófagos con posible capacidad lítica obtenidos a partir de aguas residuales para retarlos contra las cepas bacterianas *Pseudomonas spp.* y *Staphylococcus spp.* conseguidas mediante aislamientos clínicos de muestras oculares.

4. OBJETIVOS DE TRABAJO

4.1 Objetivo general

- Aislamiento y purificación de bacteriófagos con posible capacidad lítica.

4.2 Objetivos particulares

- Aislamiento y purificación de bacteriófagos a partir de muestras de aguas residuales recolectadas del río de la Hacienda Molino de Flores perteneciente al municipio de Texcoco, Estado de México.
- Obtención y caracterización bioquímica de bacterias provenientes de aislados clínicos de secreciones corneales para su futura evaluación lítica con los bacteriófagos purificados.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

La preparación de reactivos y de medios de cultivo utilizados en esta investigación, así como la información específica del medio, se encuentran descritos en el apartado de ANEXOS de este reporte.

5.1 Sitio de estudio y toma de la muestra.

Se recolectaron 2 L de agua residual del río de la Hacienda Molino de Flores perteneciente al municipio de Texcoco, Estado de México, utilizando dos frascos de vidrio de capacidad de 1 L de la marca PIREX® previamente esterilizados en autoclave a 120°C por 30 minutos.

5.2 Aislamiento de bacteriófagos.

Se realizaron dos protocolos para el aislamiento, los cuales corresponden a:

5.2.1 Protocolo A.

La metodología seguida fue la del protocolo **Aislamiento y caracterización del fago M13** proporcionado por el Laboratorio C-040 del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Para el aislamiento de los bacteriófagos, se tomaron 200 mL del agua residual recolectada, se centrifugaron a 8,000 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 4°C; el sobrenadante se pasó a un tubo estéril, al cual se le añadió 1/6 de PEG 800 al 20% (33 mL) y se incubó por 72 horas a 4°C. Posteriormente, la muestra incubada se centrifugó a 8,000 rpm por 20 minutos a 4°C; se resuspendió el pellet con 5 mL de buffer TBS; se añadió 1/5 de PEG 800 al 20% (1 mL con respecto a lo agregado anteriormente de TBS) y se dejó incubar por 24 horas. Finalmente, se centrifugó nuevamente la muestra a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C; se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 3 mL de buffer TBS; centrifugando la resuspensión a 3,000 rpm durante 5 minutos a 4°C; se recuperó el sobrenadante y se colocó en un tubo cónico de 15 mL. La muestra se refrigeró a 4°C.

5.2.2 Protocolo B.

La metodología seguida fue tomada de la tesis **Aislamiento y caracterización de un bacteriófago con actividad lítica para *Vibrio fluviales*** elaborada por Flores, V. (2017), el cual fue modificado agregando la metodología utilizada en el protocolo “A”.

Para el aislamiento de los bacteriófagos, se tomaron 200 mL del agua residual recolectada, se centrifugaron a 3,300 x g durante 10 minutos a una temperatura de 4°C; el sobrenadante se filtró con membrana de 0.20 µm de porosidad (Merck Millipore®, Alemania); se tomó el filtrado y se centrifugó a 8,000 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 4°C; el sobrenadante se pasó a un tubo estéril, al cual se le añadió 1/6 de PEG 800 al 20% (33 mL) y se incubó por 72 horas a 4°C. Posteriormente, la muestra incubada se centrifugó a 8,000 rpm por 20 minutos a 4°C; se resuspendió el pellet con 5 mL de buffer TBS; se añadió 1/5 de PEG 800 al 20% (1 mL con respecto a lo agregado anteriormente de TBS) y se dejó incubar por 24 horas. Finalmente, se centrifugó nuevamente la muestra a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C; se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 3 mL de buffer TBS; centrifugando la resuspensión a 3,000 rpm durante 5 minutos a 4°C; se recuperó el sobrenadante y se colocó en un tubo cónico de 15 mL. La muestra se refrigeró a 4°C.

NOTA: La concentración de buffer TBS que se utilizó en ambos protocolos fue la misma, siendo esta de Tris-HCl 50 mM y NaCl 150 mM pH 7.5.

5.3 Activación de cepas ATCC®.

Las cepas de referencia fueron proporcionadas por el M. en C. Alejandro Palma Ramos de la UAM-X. Las cepas Culti-Loops™ ATCC® empleadas fueron:

Nombre científico	Número ATCC®
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC: 9027™
<i>Staphylococcus aureus subs. aureus</i>	ATCC: 6538™

Tabla 1. Cepas ATCC® empleadas en la investigación.

La metodología está basada en: **Quality matters: stock culture maintenance protocol** (Thermo Scientific, 2019).

Se prepararon 300 mL de Agar Sangre (medio diferencial); el cual se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 120°C; se dejó enfriar el medio a 50°C y se le agregaron 10 mL de sangre al medio; se le aplicó la prueba de esterilidad (dejandoló incubar a 37°C durante 24 horas para verificar que no hubiera crecimiento microbiano).

Posteriormente se realizó una inoculación directa por medio de estría en ángulo recto en el medio y finalmente se dejaron las cajas Petri en la estufa a 37°C por 24 horas.

5.4 Propagación de las muestras clínicas.

En la [tabla 2](#). se presentan los datos de las muestras clínicas utilizadas en este trabajo, las cuales fueron proporcionadas por el Laboratorio Clínico de Microbiología de la Asociación para Evitar la Ceguera en México (APEC), I.A.P. Hospital Luis Sánchez Bulnes.

El volumen de cada muestra fue de 1 mL en medio BHI al 5% de glicerina, estas fueron aisladas a partir de un hisopado directo de la córnea (secreción corneal) de pacientes que mostraron farmacorresistencia a los tratamientos convencionales (Gentamicina, Cloranfenicol, Tobramicina y Neomicina).

Número de paciente	Número de identificación	Sexo	Edad	Origen de aislamiento	Fecha de toma de muestra	Cepa identificada
1	32999	M	26	Secreción corneal	10-Oct-2019	<i>S. aureus</i>
2	33069	F	20	Secreción corneal	04-Nov-2019	<i>S. epidermidis</i>
3	33150	M	27	Secreción corneal	26-Nov-2019	<i>P. aeruginosa</i>

Tabla 2. Datos de las muestras clínicas. Se muestran los datos de las muestras proporcionadas por el Laboratorio Clínico; donde se entiende que la “edad” está dada en años y el “sexo” se define como M: Masculino y F: Femenino.

Para la propagación de dichas muestras, se prepararon 300 mL de Agar Sangre (medio diferencial); el medio se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 120°C; se dejó enfriar a 50°C y se le agregaron 10 mL de sangre; se le aplicó la prueba de esterilidad (dejandoló incubar a 37°C durante 24 horas para verificar que no hubiera crecimiento microbiano).

Posteriormente se realizó una inoculación por estría cruzada a partir del tubo Eppendorf que contenía la muestra clínica en medio BHI al 5% de glicerina, con el fin de obtener colonias aisladas en el medio y finalmente se dejaron las cajas Petri en la estufa a 37°C por 24 horas.

5.5 Tinción de Gram.

Después de transcurridas 24 horas de incubación, se realizó una tinción diferencial conocida como “Tinción de Gram” tanto para las cepas ATCC® 6538 y 9027 como para las muestras clínicas.

Por lo que se realizó un frotis de cada colonia bacteriana (2 correspondientes a las ATCC® 6538 y 9027 y 3 correspondientes a las muestras clínicas); cada frotis se colocó sobre el puente de tinción y se cubrió con cristal violeta por 1 minuto; se lavaron con la solución de Lugol por 1 minuto; se les colocó la solución alcohol/cetona por 30 segundos y finalmente, se les agregó colorante de safranina por 1 minuto.

Se lavaron con agua para quitar el exceso y se dejaron secar para poder llevarlas al microscopio y observarlas desde un objetivo de 5x hasta 100x.

- **Criterios de aceptación:** Grampositivo, coloración violeta-azul y Gramnegativo, coloración rosa-rojo.

5.6 Resiembra de las ATCC® y muestras clínicas.

Posteriormente, se resembraron tanto las cepas ATCC® 6538 y 9027 como las muestras clínicas que se presentan en la [tabla 3.](#) y en la [tabla 4.](#)

ATCC®	Cepa bacteriana	Medios de inoculación	Tipo de medio
6538™	<i>S. aureus subs. aureus</i>	S-110	Selectivo
		Sal-Manitol	Selectivo
		Vogel-Johnson	Selectivo
		Baird Parker	Selectivo y diferencial
9027™	<i>P. aeruginosa</i>	Agar para <i>Pseudomonas</i>	Selectivo y diferencial

Tabla 3. Resiembra de las ATCC®. Se muestran los medios de inoculación de las cepas de referencia y a qué tipo de medio corresponde.

Número de paciente	Cepa bacteriana	Medios de inoculación	Tipo de medio
1	<i>S. aureus</i>	S-110	Selectivo
		Sal-Manitol	Selectivo
		Vogel-Johnson	Selectivo
2	<i>S. epidermidis</i>	Baird Parker	Selectivo y diferencial
		Agar para <i>Pseudomonas</i>	Selectivo y diferencial
3	<i>P. aeruginosa</i>		

Tabla 4. Resiembra de las muestras clínicas. Se muestran los medios de inoculación de las muestras clínicas y a qué tipo de medio corresponde. El agar S-110, Sal-Manitol, Vogel-Johnson y Baird Parker se utilizaron para los pacientes 1 y 2.

Se prepararon 150 mL de cada agar, los medios se esterizaron en autoclave durante 15 minutos a 120°C; el medio Vogel-Johnson se dejó enfriar a 50°C y se le agregaron 10 mL de solución de telurito de potasio (Na_2TeO_3) al 1%, mientras que al medio Baird Parker también se dejó enfriar a 50°C y se le agregaron 10 mL de solución de Na_2TeO_3 al 1% y 50 mL de emulsión de yema de huevo; se les aplicó la prueba de esterilidad (dejandolós incubar a 37°C durante 24 horas para verificar que no hubiera crecimiento microbiano).

Posteriormente se realizó la inoculación por estría cruzada con el fin de obtener colonias aisladas en los medios correspondientes (de acuerdo a las tablas 3 y 4) y finalmente se dejaron las cajas Petri en la estufa a 37°C por 24 horas.

5.7 Pruebas bioquímicas.

Como resultado de la identificación microscópica provenientes de las muestras clínicas, únicamente aparecieron cocos del género *Staphylococcus*. Se realizaron pruebas bioquímicas a las muestras de *Staphylococcus* ATCC® 6538 y a las muestras clínicas.

5.7.1 Prueba Coagulasa.

Se utiliza para la diferenciación de especies del género *Staphylococcus* debido a la capacidad de coagular el plasma por la acción de la enzima coagulasa. La coagulasa es un enzima que convierte el fibrinógeno en fibrina. Existe en dos formas: clumping factor o coagulasa unida a la pared celular y coagulasa libre o enzima extracelular que solo se produce cuando la bacteria se cultiva en caldo y ambas mediante la prueba de la coagulasa en tubo (Olmos, A., et al., 2010).

Se prepararon 30 mL de caldo BHI y se colocó 1 mL en 3 tubos de vidrio; en otros dos 2 tubos se colocó aproximadamente 1 gramo de citrato; todos los tubos se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 120°C.

Posteriormente se tomó una muestra de 10 mL de sangre y se colocaron 5 mL en los cada tubo que contenía el citrato; se centrifugaron a 2,500 rpm por 20 minutos y se separó el plasma. Se tomaron 3 tubos y se les agregó 0.5 mL de plasma.

Se tomaron aproximadamente 30 colonias del Agar S-110 y se inocularon los 3 tubos de caldo BHI. Se tomó una alícuota de 0.5 mL del caldo BHI (ya inoculado) y se agregó a los tubos con 0.5 mL de plasma. Finalmente se dejaron incubar por 24 horas a una temperatura de 37°C.

- **Criterios de aceptación:** Coagulasa positivo, formación de un coagulo en el fondo del tubo y Coagulasa negativo, no hay formación de coagulo.

5.7.2 Prueba Catalasa.

Se utiliza en la caracterización inicial de la mayoría de las bacterias. La enzima catalasa está presente en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en agua y oxígeno gaseoso, y como resultado se liberan burbujas de gas (Olmos, A., et al., 2010).

Por lo que, se tomaron 3 portaobjetos y se fijó una colonia en cada uno; se añadió una gota de H₂O₂ al 30% y se observó si hubo una producción de burbujas o no.

- **Criterios de aceptación:** Catalasa positivo, producción de burbujas antes de 20 segundos y Catalasa negativo, no hay producción de burbujas o escasas tras 20 segundos.

5.8 Acondicionamiento de las cepas en agar TCA.

Se prepararon 300 mL de agar TCA (medio diferencial y de uso general); el medio se esterizó en autoclave durante 15 minutos a 120°C; se dejó enfriar el medio a 50°C; se le aplicó la prueba de esterilidad (dejándolo incubar a 37°C durante 24 horas para verificar que no hubiera crecimiento microbiano).

Posteriormente se realizó una inoculación por estría cruzada de *S. aureus subs. aureus* ATTC® 6538™, *P. aeruginosa* ATTC® 9027™ y de las colonias derivadas del paciente 1 y 2 con el fin de obtener colonias aisladas en el medio.

Finalmente se dejaron las cajas Petri en la estufa a 37°C por 24 horas.

6. RESULTADOS

De acuerdo con la metodología empleada, los resultados obtenidos fueron:

6.1 Aislamiento y purificación de bacteriófagos.

Tanto en el protocolo A como en el B, se pudo observar la formación del pellet al fondo del tubo cónico después de realizar las metodologías correspondientes, presentándose los resultados del protocolo B (figura 6). Se estima que, dentro de las centrifugaciones correspondientes, la formación del pellet confirma la presencia de bacteriófagos, que posteriormente se purifican con la última centrifugación y esto se confirma al realizar el reto con las bacterias, obtenemos halos que indican que hubo una lisis bacteriana.

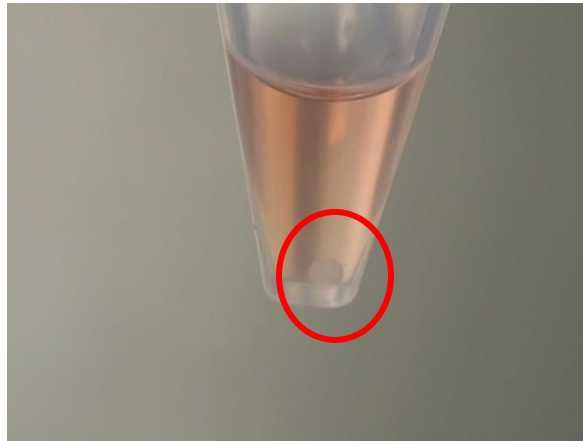


Figura 6. Pellet protocolo B. El pellet de la figura (encerrado en el círculo rojo), es de la segunda centrifugación que se realizó, el cual correspondería a los bacteriófagos obtenidos de la muestra de aguas residuales.

6.2 Recuperación de cepas ATCC® y muestras clínicas.

Ambas cepas de referencia se recuperaron en Agar Sangre, a continuación, se muestran sus características coloniales macroscópicas (figura 7. y 8.). Las muestras clínicas, también se obtuvieron mediante el crecimiento en Agar Sangre.

6.2.1 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027™

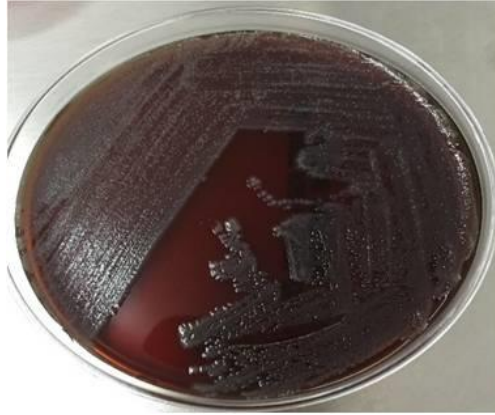


Figura 7. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027™. Morfología macroscópica.

En la [figura 7](#). se pueden observar colonias blancas opacas unidas, de 1 a 3 mm de diámetro tras las 24 horas de incubación a 37°C. A contraluz se pudo observar la presencia de β -hemólisis. Cabe mencionar, que *Pseudomonas aeruginosa* presenta motilidad por los flagelos característicos de esta especie.

6.2.2 *Staphylococcus aureus subs. aureus* ATCC 6538™



Figura 8. *Staphylococcus aureus subs. aureus* ATCC 6538™. Morfología macroscópica.

En la [figura 8](#). se pueden observar colonias blancas un poco brillantes, de 1 a 3 mm de diámetro tras las 24 horas de incubación a 37°C. A contraluz se pudo observar la presencia de β -hemólisis con la presencia de un halo alrededor de las colonias.

6.3 Tinción de Gram.

Se realizó la tinción diferencial en las cepas ATCC® y en las muestras clínicas, las cuáles, se llevaron al microscopio para poder observar su morfología microscópica (Tabla 5.)

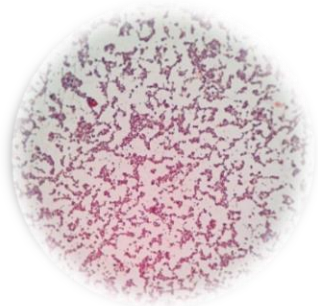
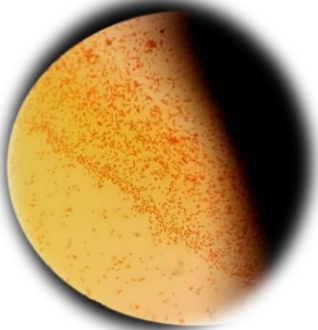

Muestra	Morfología microscópica	Tinción de Gram objetivo 40x.
<p><i>Staphylococcus aureus</i> <i>subs. aureus</i> ATCC 6538™</p> <p>Paciente 1: <i>Staphylococcus</i></p> <p>Paciente 2: <i>Staphylococcus</i></p>	<p>Son microorganismos aerobios y se observan en forma de racimos de uva, circulares y de color azul – violeta, por lo que se consideran como Gram positivos.</p>	
<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027™</p>	<p>Son microorganismos aerobios y se distinguen bacilos con forma cilíndrica o de bastones, rectos o curvos y delgados, teñidos de color rosa - rojo, por lo que se consideran como Gram negativos.</p>	
<p>Paciente 3: <i>Staphylococcus</i> y bacilos Gram negativos</p>	<p>Son microorganismos aerobios, y se observan tanto racimos de uva, circulares y de color azul – violeta como bacilos con forma cilíndrica teñidos de color rosa – rojo, por lo que se encuentran tanto Gram positivos como Gram negativos.</p>	

Tabla 5. Tinción de Gram de las diferentes muestras. En la tabla se presentan las diferentes colonias vistas en microscopio a 40x, las cuales conforman tanto las cepas ATCC® como las muestras clínicas.

Para el género *Staphylococcus spp.* podemos observar que se cumple con lo establecido en la literatura; sin embargo, con el género *Pseudomonas spp.* no, ya que la muestra correspondiente al

Paciente 3, estaba contaminada, teniendo presencia de Bacilos gram negativos y Cocos gram positivos (marcados con un círculo rojo en la imagen correspondiente).

6.4 Resiembra de cepas ATCC® y muestras clínicas.

Se resembraron en los medios anteriormente mencionados (Tabla 4.), de los cuales el agar que presento un mejor crecimiento microbiano fue el S-110 para el género *Staphylococcus spp.* (figuras 9, 10. y 11.) (ATCC® y muestras clínicas); mientras que para *Pseudomonas spp.*, únicamente hubo crecimiento con la cepa 9027™ en su medio selectivo Agar para *Pseudomonas*.



Figura 9. *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC 6538™. Morfología macroscópica en agar S-110.



Figura 10. *Staphylococcus* correspondiente a la muestra del Paciente 1. Morfología macroscópica en agar S-110.



Figura 11. *Staphylococcus* correspondiente a la muestra del Paciente 2. Morfología macroscópica en agar S-110.

En las [figura 9, 10 y 11](#), se pueden observar colonias aisladas, pequeñas, blanquecinas, de forma circular, bordes redondeados, superficie lisa y convexa; miden alrededor de una micra que corresponden al género *Staphylococcus*.

6.5 Pruebas bioquímicas.

Debido a que la muestra del Paciente 3 estaba contaminada y no creció nada en el medio selectivo para *Pseudomonas*, se optó por únicamente trabajar con las muestras clínicas de los Pacientes 1 y 2 y con la ATCC 6538™; de las cuales se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas ([tabla 6](#)):

Muestra	Bioquímica	Resultado
<i>Staphylococcus aureus subs. aureus</i> ATCC 6538™	Coagulasa	Positivo
	Catalasa	Positivo
Paciente 1	Coagulasa	Positivo
	Catalasa	Positivo
Paciente 2	Coagulasa	Negativo
	Catalasa	Positivo

Tabla 6. Pruebas bioquímicas ATCC 6538™ y Pacientes 1 y 2.

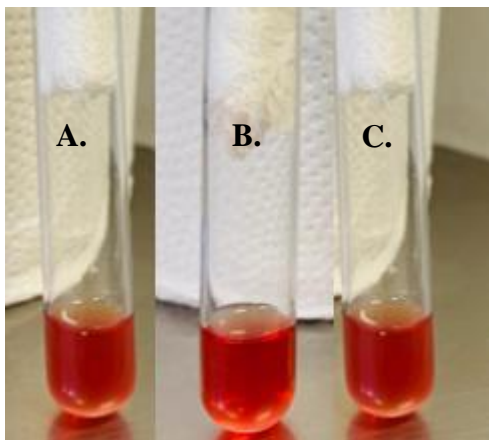


Figura 12. Prueba bioquímica coagulasa. A. *Staphylococcus aureus subs. aureus* ATCC 6538™, B. *S. epidermidis* (Paciente 2) y C. *S. aureus* (Paciente 1). Las colonias para esta prueba se obtuvieron del agar S-110.

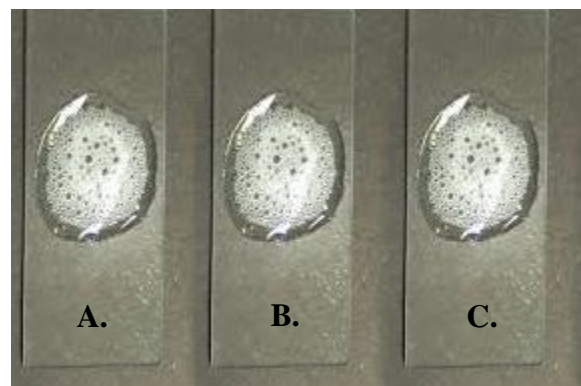


Figura 13. Prueba bioquímica catalasa. A. *Staphylococcus aureus subs. aureus* ATCC 6538™, B. *S. epidermidis* (Paciente 2) y C. *S. aureus* (Paciente 1). Las colonias para esta prueba se obtuvieron del agar S-110.

En base a los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las muestras clínicas de los pacientes 1 y 2 se logró determinar cómo *S. aureus* para el paciente 1 y *S. epidermidis* para el paciente 2.

7. DISCUSIÓN

En los últimos años, se han obtenido resultados que demuestran que el uso de bacteriófagos en el tratamiento de diferentes enfermedades es mucho más eficaz en comparación con los antibióticos (Ionel, A., 2013), por lo que en este trabajo se aislaron y purificaron bacteriófagos de aguas residuales, los cuales, por empezar de una muestra silvestre, tendríamos que evaluar su actividad lítica específica contra nuestras bacterias de referencia. Para esto se realizaría la prueba de la gota o spot test, que básicamente determina la presencia y la elevada actividad lítica de los bacteriófagos específicos de cada cepa (Flores, V., 2017), en este caso se seguirían utilizando *Staphylococcus aureus subs. aureus* ATCC 6538™, *S. epidermidis* y *S. aureus*, donde se evaluarían las zonas de aclaramiento en placas con Agar TCA.

Por otra parte, se ha reportado que tanto las *Pseudomonas spp.* como los *Staphylococcus spp.* tienen un amplio margen de infecciones (Paz, V., 2019) (Fariña, N., et. al, 2013).especialmente en pacientes internados, por ejemplo, los que tienen neutropenia o están debilitados o inmunocomprometidos; los pacientes infectados por VIH, especialmente los que están en etapas avanzadas, y los pacientes con fibrosis quística que tienen riesgo de adquirir infecciones por gramnegativos; estas afecciones pueden aparecer en muchos sitios anatómicos, entre ellos, la piel, los tejidos subcutáneos, el hueso, los oídos, los ojos, las vías urinarias, los pulmones y las válvulas cardíacas. El sitio afectado varía según la puerta de entrada y la susceptibilidad del paciente, el primer signo puede ser una septicemia abrumadora (Bush, L. & Vázquez-Pertejo, M., 2020) (Cáncer, R. & Torres, L., s.f.) por lo que, estos patógenos oportunistas son responsables de infecciones intrahospitalarias y, por lo tanto, son los causantes de la queratitis y la endoftalmitis.

De acuerdo a lo anteriormente obtenido, la *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027™ tuvo un excelente crecimiento en Agar Sangre, ya que este medio al tener una infusión de músculo de corazón y peptona, otorgan al medio un alto valor nutritivo (Laboratorios Britania, 2015), que permitió el crecimiento satisfactorio y como se mencionó, se presentó una β -hemólisis, esto quiere decir que hubo una lisis total de los glóbulos rojos y se determinó por la formación del halo brillante alrededor de las colonias (figura 6.). Cabe mencionar que, a pesar de su excelente crecimiento, ya no se continuó trabajando con esta bacteria gramnegativa, ya que la muestra clínica correspondiente al Paciente 3, se encontraba contaminada, por lo tanto, se tendrían que haber realizado diferentes pruebas bioquímicas para determinar que patógeno era.

Sin embargo, con los *Staphylococcus* (tanto cepa de referencia como las muestras clínicas) se obtuvieron mejores resultados (figuras 7.). Al igual que con las *Pseudomonas*, tuvieron un buen crecimiento en Agar Sangre, después fueron resembrados en diferentes agares y el que tuvo mayor éxito fue el Agar S-110 (figuras 8. 9. y 10.), esto debido a que es un medio selectivo y está basado en la fermentación de manitol y la formación de pigmento y la actividad gelatinasa donde forman colonias amarillas y doradas (Condalab, 2019).

Con la cepa ATCC 6538™ y con las muestras de los Pacientes 1 y 2, se llevaron a cabo las pruebas bioquímicas coagulasa (figura 11.), esta se realiza para la determinación de cocos grampositivos, que permite determinar la capacidad de coagular el plasma por la acción de la enzima coagulasa y principalmente se utiliza para diferenciar *S. aureus* (coagulasa positiva, figura 11. marcada con la letra A. y C.) de otras especies de *Staphylococcus* (coagulasa negativa, figura 12. marcada con la letra B.) (Zendejas, G., Avalos, H. & Soto, M., 2014); y la prueba catalasa (figura 12.) que se utilizó para probar la capacidad de los microorganismos de estudio para producir la enzima catalasa, la cual facilita la conversión de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Zendejas, G., Avalos, H. & Soto, M., 2014), las tres pruebas fueron positivas porque las bacterias reaccionaron produciendo la liberación de burbujas, que es la característica dada por la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Núñez, J., 2007).

Seguido de lo anterior, las bacterias resistentes a antibióticos se propagan por el mundo, esta resistencia se disemina principalmente a través de plásmidos, elementos de inserción, entre otras más. El tratamiento con antibióticos para eliminar microorganismos resistentes a múltiples medicamentos, generalmente, es inefectivo y el crecimiento de las bacterias patógenas resistentes es un problema de gran importancia para la práctica médica asistencial (Fernández, J., Pchades, Y. & Vispo, N., 2019).

8. CONCLUSIONES

- Los aislados y purificación de bacteriófagos obtenidos de aguas residuales, se consideran como resultados favorables, esto dado por las metodologías empleadas que fueron satisfactorias en el momento de realizar las diversas centrifugaciones, así obteniendo el pellet correspondiente a nuestra muestra de interés (fagos), por lo tanto, nuestro primer objetivo particular se cumple de acuerdo a los datos anteriormente mencionados.
- Se logro el aislamiento e identificación de las bacterias provenientes de pacientes farmacorresistentes a la terapia convencional de infecciones de superficie ocular, quedando nuestro segundo y último objetivo particular aprobado.

9. PERSPECTIVAS

Para mayor desarrollo de este trabajo sería necesario:

- Realizar ensayos que podrían robustecer el proyecto, un ejemplo de ello sería la prueba de la gota o del spot test, para la evaluación de la actividad lítica y específica de los bacteriófagos previamente aislados de aguas residuales.
- Rescatar los bacteriófagos de las placas de lisis, identificarlos y titularlos, para que de esta manera pudiéramos saber cuántos necesitaríamos por cada UFC de nuestras bacterias y evaluarlos en modelos animales de queratitis o endoftalmitis.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Becton Dickinson and Company. (2013). BD Mannitol Salt Agar. Obtenido de INSTRUCCIONES DE USO –: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8771>
2. Achurra, A., Aragón, J., Catalá, J., Cordovés, L., López, M., Martínez, J., Nadal, J. & Sararols, L. (2014). Endoftalmitis Infecciosa., Guías de Práctica Clínica de la SERV (págs. 8-62). España: SERV.
3. Sprecigo, A. (2001). La desinfección basada en bacteriófagos como herramienta de biocontrol de Salmonella en alimentos. Obtenido de <https://core.ac.uk/download/pdf/13323656.pdf>
4. Bush, L. & Vázquez-Pertejo, M. (2020). Manual MSD - Versión para profesionales. Obtenido de <https://www.msmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/bacilos-gramnegativos/infecciones-por-pseudomonas-y-pat%C3%B3genos-relacionados>
5. Cáncer, R. & Torres, L. (s.f.). Problemas que se plantean en el tratamiento de infecciones graves por *S. aureus*. Obtenido de <http://esteve.org/wp-content/uploads/2018/01/136593.pdf>
6. Condalab. (21 de mayo de 2019). Agar Staphylococcus N.º 110. Obtenido de Medio selectivo para el aislamiento de estafilococos patógenos.: www.condalab.com
7. Condalab. (03 de mayo de 2019). Agar Vogel-Johnson. Obtenido de Para el aislamiento selectivo de Staphylococcus aureus a partir de muestras clínicas y alimentos.: www.condalab.com
8. Condalab. (25 de Julio de 2019). Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI). Obtenido de Para el crecimiento de cocos patógenos y otros microorganismos, incluidas las bacterias aeróbicas y anaeróbicas de gran variedad de materiales clínicos y no clínicos: www.condalab.com
9. Cortés, P. (2000). Colonización por *Pseudomonas aeruginosa* en los enfermos sometidos a ventilación mecánica. Barcelona, España.
10. Deresinski, S. (2009). Bacteriophage therapy: exploiting sumiller fleas. Clin Infect Dis 48, 1096-1101.
11. Dini, C. (2011). Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Argentina. Obtenido de

http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2686/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y

12. Estilita Esteva Farmacéutica. (abril de 2006). Infecciones oculares: Tipos, tratamiento y consejo farmacéutico. Obtenido de <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13086777>

13. Etxebarria, J., López-Cerero, L., & Mensa, J. (2008). Diagnóstico microbiológico de las infecciones oculares. Obtenido de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia31.pdf>

14. Fariña, N., Carpinelli, L., Samudio, M., Guillén, R., Laspina, F., Sanabria, R., Abante, S., Rodas, L., González, P. & Kaspar, H. (2013). Staphylococcus coagulasa-negativa clínicamente significativos. Especies más frecuentes y factores de virulencia. Chilena Infectol, 480-488.

15. Fernández, C., Flores, V. & Morillo, M. (abril de 2017). Aislamiento y caracterización del bacteriófago Va1 específico a *Vibrio alginolyticus*. Revista Peruana de Biología, 24(1), 93-100.

16. Fernández, J., Pchades, Y. & Vispo, N. (2019). Los bacteriófagos en la biología molecular pasada y actual. La Habana, Cuba.

17. Flores, V. (2017). Aislamiento y caracterización de un bacteriófago con actividad lítica para *Vibrio fluvialis*. Lima, Perú.

18. Galvis, V., Tello, A., Guerra, A., Acuña, M. & Villareal, D. (2014). Sensibilidad antibiótica de bacterias obtenidas de queratitis e infecciones intraoculares en la Fundación Oftalmológica de Santander (FOSCAL), Floridablanca, Colombia. Biomédica, 34, 23-33.

19. García, B., De Juana, P., Hidalgo, F. & Bermejo, T. (2015). Oftalmología. Farmacia Hospitalaria, 1227-1263.

20. Holmes, R. & Jobling, M. (1996). Medical Microbiology. (B. S., Ed.) Galveston, Texas, Estados Unidos: University of Texas Medical Branch at Galveston.

21. Hutson, M., Holzwarth, G., Duke, T. & Viovy, J. (1995). Two-dimensional motion of DNA bands during 120° pulsed-field electrophoresis. I. Effect of molecular weight. Biopolymers 35, 297-306.

22. Ionel, A. (2013). Cambios estructurales implicados en la maduración de la cápside del bacteriófago T7. Madrid, España.
23. Laboratorios Britania. (noviembre de 2015). Britania. Obtenido de Baird Parker Agar Base: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2819b9bf93d.pdf
24. Laboratorios Britania. (noviembre de 2015). Britania. Obtenido de Sangre Agar Base: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5b6b262facd0e.pdf
25. Laboratorios Britania. (noviembre de 2015). Britania. Obtenido de Pseudomonas Agar P: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a296bd519987.pdf
26. Laboratorios Britania. (noviembre de 2015). Britania. Obtenido de Tripteína Soya Agar: http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a297bfd85301.pdf
27. Leiman, P., Arisaka, F., Van Raaij, M., Kostyuchenko, V., Aksyuk, A., Kanamaru, S. & Rossman, M. (2010). Morphogenesis of the T4 tail. *Virology Journal*, 355.
28. Liu, J., Dehbi, M., Moeck, G., Arhin, F., Bauda, P., Bergeron, D., Callejo, M., Ferretti, V., Ha, N., Kwan, T., McCarthy, J., Srikumar, R., Williams, D., Wu, J., Gros, P., Pelletier, J. & Dubow, M. (2004). Antimicrobial drug discovery through bacteriophage genomics. *Nat Biotechnol* 22, 185-191.
29. Loeffler, J. (2001). Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science* 294, 2170-2172.
30. Núñez, J. (2007). “Detección de *Staphylococcus aureus* y su resistencia antibacteriana en niños portadores asintomáticos de Pachuca, Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias de la Salud., Pachuca, Hidalgo. México. Obtenido de Tesina Médico Cirujano.
31. Olmos, A., De la Fuente, C., Nieto, J. & Ramos, S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. España. Obtenido de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
32. Paz, V., Mangwani, S., Martínez, A., Álvarez, D., Solano, S. & Vázquez, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Patogenia*, 180-189.

33. Peterson, S. & Fraser, C. (2001). The complexity of simplicity. *Genome Biol* 2, COMMENT 2002.
34. Prada, C., Holguín, A., González, A. & Vives, M. (2015). Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. *Perspectivas en Colombia. Universitas Scientiarum*, 20(1), 43-59.
35. Schuch, R., Nelson, D. & Fischetti, V. (2002). A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature* 418, 884-889.
36. Segundo, A., Hernández, B., López, V. & Torres, A. (julio-septiembre de 2010). Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(3), 17-26.
37. Seija, V. (2008). Género *Staphylococcus*. En *Etiopatogenia microbiológica* (págs. 257-271).
38. Sepúlveda, A. (julio de 2012). Diversidad de los bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa*: aislamiento, caracterización e identificación de nuevas especies.
39. Silverthorn. (2014). *Fisiología Humana: un enfoque integrado*. Médica Panamericana.
40. Sioud, M. (2019). Phage Display Libraries: From Binders to Targeted Drug Delivery and Human Therapeutics. *Molecular Biotechnology*, 286–303.
41. Smith, D., Tans, S., Smith, S., Grimes, S., Anderson, D. & Bustamante, C. (2001). The bacteriophage straight phi29 portal motor can package DNA against a large internal force. *Nature* 413, 748-752.
42. Sotero, J. (2011). Resistencia antimicrobiana en oftalmología. *Revista Mexicana de Oftalmología*, 85(3), 148-155.
43. Thermo Scientific. (2019). Thermo Scientific. Obtenido de Quality matters: stock culture maintenance protocol: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MBD/brochures/QC-Stock-Culture-Maintenance-Protocol-EN.pdf>
44. Vispo, N., Camacho, F., Pupo, M., Toledo, R. & Sánchez, O. (2016). Tecnología de presentación sobre fagos filamentosos en la búsqueda de agentes biológicos antiinfectivos. *Revista Bionatura*, 1(1), 22-29.

45. Zendejas, G., Avalos, H. & Soto, M. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica*, 129-143.

11. ANEXOS

11.1 Preparación de reactivos.

11.1.1 PEG 800 al 20%

- Para 1 L se necesitan pesar 200 g, por lo tanto, para lo que se preparó para este trabajo únicamente se pesaron 60 g (300 mL) y se llevó a volumen.

11.1.2 Buffer TBS (Tris-HCl 50 mM y NaCl 150 mM pH=7.5)

- Para obtener la concentración inicial de Tris-HCl (50mM), se pesaron 6.057g (cantidad necesaria para 1 L de disolución), por lo tanto, para lo que se preparó para este trabajo únicamente se pesaron 1.815 g (300 mL).
- Para obtener la concentración inicial de NaCl (150mM), se pesaron 8.766 g (cantidad necesaria para 1 L de disolución), por lo tanto, para lo que se preparó para este trabajo únicamente se pesaron 2.6298 g (300 mL).
- Ambas sales se disuelven en 100 mL aproximadamente de agua destilada, después se homogenizan una con la otra, se lleva a volumen final y se mide su pH con un potenciómetro.
- Si la solución no tiene el pH óptimo, se puede ajustar con una solución de HCl 0.5 M (si tiene un pH de 8-14) o bien con NaOH 0.5 M (si tiene un pH de 1-6).

11.2 Fundamento de los medios de cultivo.

11.2.1 Agar sangre

g/L:

Infusión de músculo de corazón	375.0
Peptona	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0
Sangre	5-10 %
pH final	7.3±0.2

- Medio de cultivo diferencial.
- La infusión de músculo de corazón y peptona, otorgan al medio un alto valor nutritivo, que permite el crecimiento de una gran variedad de microorganismo, aún de aquellos nutricionalmente exigentes. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante. El agregado de 5-10% de sangre, promueve el desarrollo de bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales y la adecuada observación de las reacciones de hemólisis (Laboratorios Britania, 2015).

11.2.2 Agar S-110

g/L:

Agar	15.0
Fosfato dipotásico	5.0
Gelatina	30.0
Cloruro de sodio	75.0
Peptona de caseína	10.0
D-manitol	10.0
Lactosa	2.0
Extracto de levadura	2.5
pH final	7.0±0.2

- Medio de cultivo selectivo.
- La peptona de caseína proporciona nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. El extracto de levadura es una fuente de vitaminas, particularmente el grupo B. La lactosa y el D-manitol son los carbohidratos fermentables como fuentes de energía; el fosfato de dipotasio actúa como buffer; mientras que el cloruro de sodio suministra electrolitos esenciales para el transporte y el equilibrio osmótico y, en altas concentraciones, inhibe la mayoría de las bacterias, excepto los estafilococos formando colonias de color amarillo dorado. La gelatina se incluye para probar la licuefacción. El agar es el agente solidificante (Condalab, 2019).

11.2.3 Agar Sal-Manitol

g/L:

Agar	15.0
Extracto de carne bovina	1.0
Digerido pancreático de caseína	5.0
Digerido péptico de tejido animal	5.0
Cloruro de sodio	75.0
D-manitol	10.0
Rojo fenol	0.025
pH final	7.4±0.2

- Medio de cultivo selectivo.
- Contiene peptonas y extractos de carne bovina, que suministran los nutrientes esenciales. Una concentración de cloruro sódico de 7.5% tiene como resultado una inhibición parcial o completa de los organismos bacterianos diferentes de los estafilococos. La fermentación de manitol, indicada por el cambio del indicador de rojo fenol, facilita la diferenciación de la especie de estafilococos. Los estafilococos positivos a la coagulasa (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*) producen colonias de color amarillo y un medio circundante de color amarillo, mientras que los estafilococos negativos a la coagulasa producen colonias de color rojo y no producen cambio de color en el indicador de rojo fenol (Becton Dickinson and Company, 2013).

11.2.4 Agar Vogel-Johnson

g/L:

Agar	15.0
D-manitol	10.0
Rojo fenol	0.025
Extracto de levadura	5.0
Fosfato dipotásico	5.0
Glicina	10.0
Triptona	10.0

Cloruro de litio	5.0
pH final	7.2±0.2

- Medio de cultivo selectivo.
- *S. aureus* reduce el telurito de potasio al metal telurio y da como resultado el crecimiento de colonias negras. La fermentación del manitol está indicada por las zonas amarillas alrededor de las colonias negras y cambia el color rojo del medio a amarillo. La triptona proporciona nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. El extracto de levadura es una fuente de vitaminas, particularmente del grupo B. El manitol es el carbohidrato fermentable que proporciona el telurito de potasio y carbono, el cloruro de litio y la alta concentración de glicina inhiben la mayoría de los microorganismos que no son estafilococos. El rojo fenol es el indicador de pH. El fosfato de dipotasio actúa como buffer. El agar es el agente solidificante (Condalab, 2019).

11.2.5 Agar Baird Parker

g/L:

Agar	17.0
Peptona de caseína	10.0
Extracto de carne	5.0
Extracto de levadura	1.0
Cloruro de litio	5.0
Glicina	12.0
Piruvato de sodio	10.0
pH final	6.8±0.2

- Medio de cultivo selectivo y diferencial.
- Medio altamente nutritivo, en el cual la peptona de caseína y el extracto de carne constituyen la fuente de carbono y nitrógeno, el extracto de levadura aporta vitaminas del complejo B, la glicina y el piruvato estimulan el crecimiento de los estafilococos. El agar es el agente solidificante. Permite el

crecimiento selectivo, ya que el telurito de potasio y el cloruro de litio inhiben el desarrollo de la flora acompañante presente en la muestra. La yema de huevo permite demostrar la actividad lecitínica de los microorganismos. Los estafilococos coagulasa positivo reducen el telurito a telurio y original colonias de color grisáceo-negro, y tienen actividad lecitínica, por eso actúan sobre la yema de huevo produciendo un halo claro alrededor de la colonia (Laboratorios Britania, 2015).

11.2.6 Agar *Pseudomonas*

g/L:

Agar	15.0
Peptona de gelatina	20.0
Sulfato de potasio	10.0
Cloruro de magnesio	1.4
pH final	7.2±0.2

- Medio de cultivo selectivo y diferencial.
- En el medio de cultivo, la peptona de gelatina aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la glicerina favorece la producción de pigmentos, las sales de magnesio y potasio estimulan la producción de piocianina y piorrubina e inhiben la producción de fluoresceína. El agar es el agente solidificante (Laboratorios Britania, 2015).

11.2.7 Agar TCA

g/L:

Agar	15.0
Peptona de soya	5.0
Tripteína	15.0
Cloruro de sodio	5.0
pH final	7.3±0.2

- Medio de cultivo diferencial y de uso general.

- En el medio de cultivo, la tripteína y la peptona de soya aportan nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, bases púricas y pirimídicas, minerales y vitaminas. La peptona de soya además es fuente de hidratos de carbono que estimulan el crecimiento de diversos microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es el agente gelificante. Puede ser utilizado como base a la cual se suplementa con nutrientes o con antimicrobianos, lográndose un medio enriquecido o selectivo de acuerdo al aditivo ([Laboratorios Britania, 2015](#)).

11.2.8 Caldo BHI

g/L:

Dextrosa	2.0
Peptona de gelatina	10.0
Infusión de corazón	10.0
Fosfato disódico	2.5
Cloruro sódico	5.0
Infusión de cerebro	7.5
pH final	7.4±0.2

- Caldo enriquecido selectivo.
- Medio líquido rico en nutrientes, adecuado para el cultivo de una amplia variedad de bacterias exigentes, como estreptococos, meningococos y neumococos, hongos y levaduras. El caldo BHI se recomienda para métodos estándar para tests de agua y de susceptibilidad antimicrobiana. La base nutricionalmente rica de infusiones de corazón de ternera y cerebro de ternera y mezcla de peptona proporciona nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento de una variedad de microorganismos. La dextrosa es la fuente de energía de carbono y el cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico ([Condalab, 2019](#)).

Vo. Bo. de los asesores respecto a los contenidos académicos



Dra. Laura Estela Castrillón Rivera



Dr. Rubén Zamora Alvarado



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Facultad de Ciencias Biológicas y de la Salud
UNIDAD XOCHIMILCO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas Biológicos

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Informe de actividades del Servicio Social: *Aislamiento de bacteriófagos líticos para su utilización como agente bactericida contra infecciones de superficie ocular farmacorresistentes.*

Proyecto genérico correspondiente a: *Evaluación de productos relacionados con la salud.*

Presenta: Elvira Valeria Bahena Galnares

Matrícula: 2153026578

Dirección: Calle Allende #300, Colonia Centro, Texcoco de Mora, Estado de México, C.P. 56100

Teléfono: 5951136534

Asesores: Dra. Laura Estela Castrillón Rivera

Dr. Rubén Zamora Alvarado

Lugar de elaboración: Institución de asistencia privada Asociación para Evitar la Ceguera en México (APEC), I.A.P. Hospital Luis Sánchez Bulnes en la Unidad Periférica de Medicina UNAM-APEC

Fecha de inicio del proyecto: 25 de Julio de 2019

Fecha de término del proyecto: 31 de Julio de 2020

Ciudad de México, México. Marzo 2021

12. Resumen

12.1 Introducción

Los bacteriófagos son virus que infectan y lisan bacterias, en la actualidad se han aplicado en diferentes ciencias como lo es la Biología Molecular e Investigación Clínica, esto con el fin de encontrar un tratamiento alternativo para tratar principalmente infecciones farmacorresistentes (Fagoterapia); se han utilizado principalmente contra *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Escherichia* y *Mycobacterium*.

En el presente trabajo se aislaron fagos de aguas residuales siguiendo dos metodologías, se utilizaron *Pseudomonas spp.* y *Staphylococcus spp.* obtenidas por secreción corneal de diferentes pacientes de la Institución de asistencia privada Asociación para Evitar la Ceguera en México (APEC), I.A.P. Hospital Luis Sánchez Bulnes, los cuales fueron diagnosticados con queratitis y endoftalmitis, para su identificación de las muestras se realizó una Tinción de Gram, seguida de pruebas bioquímicas para su confirmación. De acuerdo a esto, la prueba de la gota o del spot test, nos ayudaría a evaluar la actividad lítica de los bacteriófagos, rescatarlos e identificarlos para que de esta manera pudiéramos emplearlos para la formulación de agentes antimicrobianos de cepas específicas y posterior a ello evaluarlos en modelos preclínicos de queratitis o endoftalmitis.

Por último, se pretende resaltar la importancia de los fagos y sus grandes ventajas para emplearse contra enfermedades causadas por diferentes microorganismos multirresistentes, ya que al final de la Segunda Guerra Mundial el éxito de los antibióticos de amplio espectro, la comprensión inadecuada de la biología de los fagos y las imperfecciones en las técnicas de diagnóstico bacteriológico de la época hizo que la fagoterapia quedara abandonada.

12.2 Objetivos de trabajo

12.2.1 Objetivo general

- Aislamiento y purificación de bacteriófagos con posible capacidad lítica.

12.2.2 Objetivos particulares

- Aislamiento y purificación de bacteriófagos a partir de muestras de aguas residuales recolectadas del río de la Hacienda Molino de Flores perteneciente al municipio de Texcoco, Estado de México.
- Obtención y caracterización bioquímica de bacterias provenientes de aislados clínicos de secreciones corneales para su futura evaluación lítica con los bacteriófagos purificados.

12.3 Conclusiones

- Los aislados y purificación de bacteriófagos obtenidos de aguas residuales, se consideran como resultados favorables, esto dado por las metodologías empleadas que fueron satisfactorias en el momento de realizar las diversas centrifugaciones, así obteniendo el pellet correspondiente a nuestra muestra de interés (fagos), por lo tanto, nuestro primer objetivo particular se cumple de acuerdo a los datos anteriormente mencionados.
- Se logro el aislamiento e identificación de las bacterias provenientes de pacientes farmacorresistentes a la terapia convencional de infecciones de superficie ocular, quedando nuestro segundo y último objetivo particular aprobado.

12.4 Referencias bibliográficas

1. Becton Dickinson and Company. (2013). BD Mannitol Salt Agar. Obtenido de INSTRUCCIONES DE USO –: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8771>
2. Achurra, A., Aragón, J., Catalá, J., Cordovés, L., López, M., Martínez, J., Nadal, J. & Sararols, L. (2014). Endoftalmitis Infecciosa., Guías de Práctica Clínica de la SERV (págs. 8-62). España: SERV.
3. Sprecigo, A. (2001). La desinfección basada en bacteriófagos como herramienta de biocontrol de Salmonella en alimentos. Obtenido de <https://core.ac.uk/download/pdf/13323656.pdf>
4. Bush, L. & Vázquez-Pertejo, M. (2020). Manual MSD - Versión para profesionales. Obtenido de <https://www.msmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/bacilos-gramnegativos/infecciones-por-pseudomonas-y-pat%C3%B3genos-relacionados>
5. Cáncer, R. & Torres, L. (s.f.). Problemas que se plantean en el tratamiento de infecciones graves por *S. aureus*. Obtenido de <http://esteve.org/wp-content/uploads/2018/01/136593.pdf>
6. Condalab. (21 de mayo de 2019). Agar Staphylococcus N.º 110. Obtenido de Medio selectivo para el aislamiento de estafilococos patógenos.: www.condalab.com
7. Condalab. (03 de mayo de 2019). Agar Vogel-Johnson. Obtenido de Para el aislamiento selectivo de Staphylococcus aureus a partir de muestras clínicas y alimentos.: www.condalab.com
8. Condalab. (25 de Julio de 2019). Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI). Obtenido de Para el crecimiento de cocos patógenos y otros microorganismos, incluidas las bacterias aeróbicas y anaeróbicas de gran variedad de materiales clínicos y no clínicos: www.condalab.com
9. Cortés, P. (2000). Colonización por *Pseudomonas aeruginosa* en los enfermos sometidos a ventilación mecánica. Barcelona, España.
10. Deresinski, S. (2009). Bacteriophage therapy: exploiting sumiller fleas. Clin Infect Dis 48, 1096-1101.
11. Dini, C. (2011). Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Argentina. Obtenido de

http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2686/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y

12. Estilita Esteva Farmacéutica. (abril de 2006). Infecciones oculares: Tipos, tratamiento y consejo farmacéutico. Obtenido de <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13086777>
13. Etxebarria, J., López-Cerero, L., & Mensa, J. (2008). Diagnóstico microbiológico de las infecciones oculares. Obtenido de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia31.pdf>
14. Fariña, N., Carpinelli, L., Samudio, M., Guillén, R., Laspina, F., Sanabria, R., Abante, S., Rodas, L., González, P. & Kaspar, H. (2013). Staphylococcus coagulasa-negativa clínicamente significativos. Especies más frecuentes y factores de virulencia. Chilena Infectol, 480-488.
15. Fernández, C., Flores, V. & Morillo, M. (abril de 2017). Aislamiento y caracterización del bacteriófago Va1 específico a *Vibrio alginolyticus*. Revista Peruana de Biología, 24(1), 93-100.
16. Fernández, J., Pchades, Y. & Vispo, N. (2019). Los bacteriófagos en la biología molecular pasada y actual. La Habana, Cuba.
17. Flores, V. (2017). Aislamiento y caracterización de un bacteriófago con actividad lítica para *Vibrio fluvialis*. Lima, Perú.
18. Galvis, V., Tello, A., Guerra, A., Acuña, M. & Villareal, D. (2014). Sensibilidad antibiótica de bacterias obtenidas de queratitis e infecciones intraoculares en la Fundación Oftalmológica de Santander (FOSCAL), Floridablanca, Colombia. Biomédica, 34, 23-33.
19. García, B., De Juana, P., Hidalgo, F. & Bermejo, T. (2015). Oftalmología. Farmacia Hospitalaria, 1227-1263.
20. Holmes, R. & Jobling, M. (1996). Medical Microbiology. (B. S., Ed.) Galveston, Texas, Estados Unidos: University of Texas Medical Branch at Galveston.
21. Hutson, M., Holzwarth, G., Duke, T. & Viovy, J. (1995). Two-dimensional motion of DNA bands during 120° pulsed-field electrophoresis. I. Effect of molecular weight. Biopolymers 35, 297-306.

22. Ionel, A. (2013). Cambios estructurales implicados en la maduración de la cápside del bacteriófago T7. Madrid, España.
23. Laboratorios Britania. (noviembre de 2015). Britania. Obtenido de Baird Parker Agar Base: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2819b9bf93d.pdf
24. Laboratorios Britania. (noviembre de 2015). Britania. Obtenido de Sangre Agar Base: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5b6b262facd0e.pdf
25. Laboratorios Britania. (noviembre de 2015). Britania. Obtenido de Pseudomonas Agar P: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a296bd519987.pdf
26. Laboratorios Britania. (noviembre de 2015). Britania. Obtenido de Tripteína Soya Agar: http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a297bfd85301.pdf
27. Leiman, P., Arisaka, F., Van Raaij, M., Kostyuchenko, V., Aksyuk, A., Kanamaru, S. & Rossman, M. (2010). Morphogenesis of the T4 tail. *Virology Journal*, 355.
28. Liu, J., Dehbi, M., Moeck, G., Arhin, F., Bauda, P., Bergeron, D., Callejo, M., Ferretti, V., Ha, N., Kwan, T., McCarthy, J., Srikumar, R., Williams, D., Wu, J., Gros, P., Pelletier., J. & Dubow, M. (2004). Antimicrobial drug discovery through bacteriophage genomics. *Nat Biotechnol* 22, 185-191.
29. Loeffler, J. (2001). Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science* 294, 2170-2172.
30. Núñez, J. (2007). “Detección de *Staphylococcus aureus* y su resistencia antibacteriana en niños portadores asintomáticos de Pachuca, Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias de la Salud., Pachuca, Hidalgo. México. Obtenido de Tesina Médico Cirujano.
31. Olmos, A., De la Fuente, C., Nieto, J. & Ramos, S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. España. Obtenido de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
32. Paz, V., Mangwani, S., Martínez, A., Álvarez, D., Solano, S. & Vázquez, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Patogenia*, 180-189.

33. Peterson, S. & Fraser, C. (2001). The complexity of simplicity. *Genome Biol* 2, COMMENT 2002.
34. Prada, C., Holguín, A., González, A. & Vives, M. (2015). Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. *Perspectivas en Colombia. Universitas Scientiarum*, 20(1), 43-59.
35. Schuch, R., Nelson, D. & Fischetti, V. (2002). A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature* 418, 884-889.
36. Segundo, A., Hernández, B., López, V. & Torres, A. (julio-septiembre de 2010). Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(3), 17-26.
37. Seija, V. (2008). Género *Staphylococcus*. En *Etiopatogenia microbiológica* (págs. 257-271).
38. Sepúlveda, A. (julio de 2012). Diversidad de los bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa*: aislamiento, caracterización e identificación de nuevas especies.
39. Silverthorn. (2014). *Fisiología Humana: un enfoque integrado*. Médica Panamericana.
40. Sioud, M. (2019). Phage Display Libraries: From Binders to Targeted Drug Delivery and Human Therapeutics. *Molecular Biotechnology*, 286–303.
41. Smith, D., Tans, S., Smith, S., Grimes, S., Anderson, D. & Bustamante, C. (2001). The bacteriophage straight phi29 portal motor can package DNA against a large internal force. *Nature* 413, 748-752.
42. Sotero, J. (2011). Resistencia antimicrobiana en oftalmología. *Revista Mexicana de Oftalmología*, 85(3), 148-155.
43. Thermo Scientific. (2019). Thermo Scientific. Obtenido de Quality matters: stock culture maintenance protocol: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MBD/brochures/QC-Stock-Culture-Maintenance-Protocol-EN.pdf>
44. Vispo, N., Camacho, F., Pupo, M., Toledo, R. & Sánchez, O. (2016). Tecnología de presentación sobre fagos filamentosos en la búsqueda de agentes biológicos antiinfectivos. *Revista Bionatura*, 1(1), 22-29.

45. Zendejas, G., Avalos, H. & Soto, M. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica*, 129-143.

Vo. Bo. de los asesores respecto a los contenidos académicos



Dra. Laura Estela Castrillón Rivera



Dr. Rubén Zamora Alvarado