

TÍTULO DEL PROYECTO

Aislamiento y Caracterización Molecular de Bacteriofagos Líticos, para el control de Staphylococcus aureus Meticilino Resistentes (MRSA) y otros tipos de Resistencia

SIGLAS

FAGOS

TIPO DE PROYECTO

Basica

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

Microbiología molecular y biotecnología

DURACIÓN ESTIMADA

Fecha de inicio: 01/03/2016 Fecha de término: 01/03/2017

PARTICIPANTES

- REYNA LOPEZ LENNIS ANTONIO (INVESTIGADOR) — 000070550
- TERAN ROJAS YONY ALEXANDER (INVESTIGADOR) — 000070981
- GOMEZ CASTRO KELLYN MYLUSKA (INVESTIGADOR) — 000076554
- AVILA VEREAU ELIO FERNANDO (INVESTIGADOR) — 000064893
- ARAUJO JIMENEZ ARMANDO (INVESTIGADOR) — 000042098
- ABANTO DIAZ CARLOS EDUARDO (INVESTIGADOR) — 000142091
- GONZALEZ CABEZA JOSE GUILLERMO (COORDINADOR(INV. PRINCIPAL)) — 000048718

INSTITUCIÓN O LUGAR A EJECUCARSE

- UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO - UPAO (MICROBIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA)

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1. 1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.

Las enfermedades infecto-contagiosas están clasificadas entre las primeras causas de muerte en el mundo y, por lo tanto, consideradas un problema de salud pública. Entre ellas, los procesos infecciosos de etiología bacteriana causan gran preocupación, dado que estos microorganismos 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 (Prada 2008).

La diseminación de la resistencia podría llegar a generar problemas de gran envergadura, como incrementos en la mortalidad, la morbilidad y los costos de atención médica. El reporte de riesgos globales emitido por el Foro Económico Mundial resaltó el problema de la resistencia bacteriana en el 2013 (World Economic Forum 2013) y la Organización Mundial de la Salud lo enfatizó en

uno de sus últimos reportes (WHO 2014). Sólo en Estados Unidos se presentan 99,000 muertes al año por infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos adquiridas en hospitales y el costo de cuidados médicos asociados a ellas, oscila entre 21 y 34 billones de dólares americanos anualmente. El problema se extiende alrededor del mundo; en Rusia el 86.3% de los hogares utilizan indiscriminadamente antibióticos; en Tanzania, África Sub-Sahariana, el número de muertes por bacterias resistentes a antibióticos duplica al número de muertes por malaria (World Economic Forum 2013). En países cercanos al nuestro, como Colombia, se ha observado un incremento en el aislamiento de cepas multi resistentes, tanto en Unidades de Cuidado Intensivo (UCI) pediátricas como en UCI de adultos; el riesgo de infecciones observado es 2 a 20 veces mayor en recién nacidos que requieren dispositivos intravasculares. Entre los incrementos más dramáticos se cuenta el caso de *Escherichia coli* productora de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), con un aumento del 3% entre el 2012 y el 2013 (GREBO 2013).

Se ha postulado que el incremento en la resistencia bacteriana se debe al uso inapropiado de los antibióticos (Karunasagar 2012); situaciones comunes como no completar las dosis prescritas o prescripciones médicas innecesarias han hecho que hoy en día existan infecciones bacterianas para las cuales ya no existe un antibiótico eficaz. Este panorama ha llevado a que, recientemente, gobiernos y agencias de salud, manifiesten la necesidad de un uso más apropiado de los antimicrobianos, y la importancia de desarrollar nuevos agentes antibacterianos (Prada 2008, Editorial 2013).

Sin embargo, una realidad del mundo farmacéutico, es la falta de investigación y desarrollo de nuevas moléculas con actividad antibiótica. Desde 1987 no hay resultados exitosos en este campo (WHO 2014), situación posiblemente asociada a que la industria farmacéutica ha enfocado sus esfuerzos hacia el desarrollo de tratamientos para enfermedades crónicas como la diabetes y la hipertensión, que aseguran el retorno de las inversiones y que son requeridos por los pacientes por largos periodos de tiempo. Además, las barreras regulatorias, hacen que las pequeñas y medianas compañías farmacéuticas no puedan realizar todas las pruebas ni logren cumplir los requisitos exigidos para obtener licencias para sus productos (Davies & Davies 2010, World Economic Forum 2013, Yonath 2013). En este sentido, el Foro Mundial hizo un fuerte llamado a la sociedad, los gobiernos y las entidades de salud para adelantar esfuerzos que permitan entender la resistencia bacteriana a múltiples antibióticos y para desarrollar tratamientos alternativos.

El origen de la resistencia a los antibióticos se extiende más allá del uso inadecuado en humanos, ya que existe también un manejo indiscriminado de estas sustancias por parte de las industrias alimenticias. En los sectores industriales de producción animal para consumo humano, los antibióticos permitidos son escasos y en ocasiones no se encuentra un tratamiento eficiente para el control y prevención de las bacterias patógenas (Philips et al. 2004, Editorial 2013). No obstante, hay estudios que indican que más del 80% de los antibióticos vendidos en los Estados Unidos y por lo menos el 50% de aquellos producidos en China van dirigidos como promotores de crecimiento a animales de consumo humano tales como cerdos, pollos y vacas; la inclusión de dichos promotores reduce la cantidad de alimento que se suministra e induce un aumento en el

peso del animal y, en consecuencia, mayor rendimiento económico para los productores (Levin Institute 2014). Lo anterior representa una situación bastante delicada y peligrosa, dado que al ser utilizados estos antibióticos en productos destinados al consumo humano, las bacterias que viven en los animales adquieren resistencia a los antibióticos y esta resistencia puede ser transferida a las bacterias patógenas humanas (Donado-Godoy 2010).

A nivel mundial se han incrementado las restricciones al uso de antibióticos en los alimentos, y se han diseñado normas y sistemas para el control de las mismas. En Estados Unidos, la Food and Drug Administration (FDA) ha realizado esfuerzos desde hace alrededor de 40 años para regular el uso de antibióticos en los animales (Levin Institute 2014). En Sudamérica, Colombia desde 1984 a través del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), permite el uso de sustancias antimicrobianas como promotores de crecimiento o mejoradores de la eficiencia alimentaria siempre y cuando estos no coincidan con los utilizados con fines terapéuticos en medicina humana. El problema radica en que los llamados promotores de crecimiento son o tienen entre sus componentes antibióticos de amplio espectro, que pueden llegar a generar resistencia cruzada frente a antibióticos usados en medicina; el continuo incremento del uso indiscriminado de estas sustancias puede tener serios impactos en la salud humana y animal (Gómez 1984, Ríos 2004). En ese país se importa anualmente antibióticos por un monto aproximado de USD %2427.432.000 (DNP 2014), aunque no es posible discriminar en esta cifra cuánto se destina para uso en medicina humana, medicina animal o promoción del crecimiento.

Colombia empezó a prestar atención a esta problemática recientemente; el país acogió los Límites de Residuos Máximos (LMRs) de la lista de fármacos regulados por el Codex Alimentarius (Lozano 2008, Márquez 2008) como una de las medidas necesarias para que los sectores gubernamental, académico y de investigación puedan conocer y controlar la residualidad de fármacos y otras sustancias en los alimentos de origen animal.

Staphylococcus aureus es uno de los patógenos humanos más importantes, se encuentra involucrado en una gran diversidad de infecciones e intoxicaciones (Doebbeling 1993, Archer 1998). En la actualidad *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), constituye un serio problema que se ha incrementado en el tiempo (Tenover 2006, Doebbeling 1993, Cosgrove 2003). Las infecciones por MRSA, dieron un dramático cambio con la aparición de los *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, no solo asociado a ambientes intrahospitalarios, sino además asociado a la comunidad (MRSA-CA), con cepas de elevada virulencia implicadas en infecciones severas de piel y partes blandas, neumonías necrotizantes graves y fulminantes (Tenover 2006, Boubaker 2004). La prevalencia de MRSA en Perú es particularmente elevada (Echevarría 2003, Tamariz 2010).

Lo anterior permite concluir que la solución no es la generación de nuevos antibióticos que a corto plazo se tornarían ineficaces. Es necesario ensayar otras posibilidades terapéuticas para el control efectivo del problema. Los bacteriófagos, virus que infectan exclusivamente bacterias, fueron

usados a inicios del siglo pasado en el tratamiento de infecciones bacterianas. Algunos resultados controversiales provocaron que en 1934 el Council on Pharmacy and Chemistry of the American Medical Association revisara el tema y recomendara no continuar los estudios en seres humanos, ello influyó negativamente en los investigadores y las fundaciones financiadoras. En la década de los 40, el uso masivo de los antimicrobianos eliminó el interés por el tema en el mundo occidental (Hankin 1896, Abedon 2011).

Los avances científicos actuales han mejorado el conocimiento de los fagos y dada la creciente necesidad de evaluar nuevas alternativas, distintas a los antimicrobianos convencionales, se ha renovado el interés en el estudio de sus propiedades terapéuticas (Loc-Carrillo 2011, Ahmed 2012). Por ello, el objetivo del presente estudio es evaluar la actividad de bacteriófagos silvestres de nuestro medio, frente a *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistentes, así como frente a otros *Staphylococcus* que presenten resistencia frente a otros antimicrobianos.

1.1. Problema

¿ El aislamiento y caracterización molecular de Bacteriofagos Líticos, pueden servir para el control de Staphylococcus aureus Meticilino Resistentes (MRSA) y otros tipos de resistencia ?

II. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

1. 1. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA.

La fagoterapia es la aplicación de bacteriófagos para el control de bacterias patógenas (Kutter & Sulakvelidze 2005). Los primeros ensayos utilizando este tratamiento como terapia para combatir infecciones bacterianas fueron realizados en 1,919 en el Hospital Enfants-Malades de París, por d'Herelle, quien experimentó con éxito la actividad antibacteriana de los fagos para el tratamiento de la disentería de un niño de 12 años. D'Herelle utilizó un preparado de fagos contra cepas de *Shigella* seleccionados específicamente para tratar al niño, quien presentaba disentería severa (10-12 deposiciones diarias con sangre). Previamente, el mismo d'Herelle y varios médicos voluntarios del hospital ingirieron una dosis 100 veces mayor del preparado de fagos, con el fin de descartar cualquier efecto secundario. Se le suministraron al niño 2 ml del preparado; horas después, el niño presentó solo tres deposiciones con sangrado y en la noche de ese mismo día ya habían desaparecido. A los pocos días, el niño estaba completamente recuperado. La eficiencia de este preparado fue corroborada al ser suministrado a tres niños más entre 3 y 10 años que presentaban disentería, y quienes también con una sola dosis se recuperaron en 24 h

(Sulakvelidze et al. 2001, Yan-Yu 2008, Goldman & Green 2009). Otros estudios de la época, fueron realizados en 1921 por Richard Bruynoghe y Joseph Maisin, quienes utilizaron bacteriófagos para tratar infecciones estafilocócicas de piel (Sulakvelidze et al. 2001).

D'Herelle y otros investigadores continuaron sus trabajos en fagoterapia y, hacia 1930, diversas compañías iniciaron la comercialización de fagos contra bacterias patógenas; mientras tanto d'Herelle estableció centros de fagoterapia en diferentes países, entre los que se encontraban Estados Unidos (Eli Lilly), Francia y Georgia. Las preparaciones usadas consistían en fagos libres de bacterias, procedentes directamente de lisados en caldos de cultivo bacteriológicos de la cepa hospedera o en una base de gelatina soluble en agua (Sulakvelidze et al. 2001). Los bacteriofagos empleados como agentes terapéuticos entre los años 1920-1930, es considerada una época histórica de la fagoterapia; asimismo durante la Segunda Guerra Mundial para combatir la disentería.

En Rusia, Polonia y Georgia las investigaciones sobre fagoterapia han continuado durante 90 años. Los fagos en esos países se han administrado de forma oral, tópica, rectal, inyectada o intravenosa (Sulakvelidze et al. 2001) sin reportes de efectos colaterales (Potera 2013).

Sin embargo, por diferentes razones, la fagoterapia fue abandonada en el mundo occidental entre 1945-1950, cuando aparecieron los antibióticos (Potera 2013), que llegaron a considerarse la terapia más eficaz contra las infecciones bacterianas. Las publicaciones sobre fagoterapia entre 1950 y 1980 fueron muy pocas, ya que las investigaciones relacionadas con el tema despertaban muy poco interés.

La situación cambió radicalmente cuando la terapia con antibióticos comenzó a fallar a causa de la resistencia bacteriana (Watanabe et al. 2007); a partir de este momento renace el interés en la fagoterapia en Occidente (Hermoso et al. 2007).

La fagoterapia tiene diversas ventajas al compararla con la terapia con antibióticos: 1) El número de fagos crece exponencialmente, permitiendo que esta terapia tenga su mayor efecto en el sitio de infección. Los antibióticos, en cambio, van perdiendo su efecto, puesto que a medida que actúan hay destrucción metabólica de la molécula. Un solo fago puede llegar a ser suficiente para destruir una bacteria determinada, mientras que para causar el mismo efecto utilizando antibióticos se requieren numerosas moléculas de éstos. 2) Gracias a que los fagos tienen la capacidad de mutar, se puede combatir la resistencia que podrían llegar a generar las bacterias hacia ellos; en cambio, los antibióticos siempre tienen el mismo principio activo, de manera que cuando las bacterias desarrollan resistencia, éstos quedan inservibles (Carlson 1999). 3) El

tratamiento con bacteriófagos no genera efectos secundarios nocivos para humanos, animales ni plantas (Kutter & Sulakvelidze 2005; Meipariani 2013, Kutter et al. 2010, Abedon et al. 2011), mientras que los antibióticos pueden causar alergias, desórdenes intestinales, infecciones secundarias y otros múltiples efectos adversos. Incluso se considera que los fagos tienen un efecto benéfico al estimular el sistema inmune (Kutter et al. 2010). 4) Seleccionar y producir un nuevo fago es un procedimiento relativamente rápido y económico, cuyas fases a escala laboratorio se pueden completar en términos de meses; en cambio, el desarrollo de un antibiótico toma años (Sulakvelidze et al. 2001). 5) La alta especificidad que caracteriza a los fagos hace posible que lleguen a ser incluso cepa-específicos; la especificidad de los fagos es un aspecto ventajoso, pues con ella se limita el tratamiento a la bacteria problema, causante de la infección, sin afectar la microbiota normal (Carlson 1999). 6) Los bacteriófagos que realizan ciclo lítico son agentes bactericidas, por lo tanto las bacterias infectadas no vuelven a ser viables, mientras que algunos antibióticos son bacteriostáticos y permiten con mayor facilidad la adquisición de resistencia (Loc-Carrillo & Abedon 2011).

Se han descrito también algunas desventajas de la fagoterapia; sin embargo, con las herramientas tecnológicas disponibles hoy en día, además del conocimiento acumulado en las últimas décadas sobre la biología básica de estos virus, pueden ser vistas como retos superables. Entre estos se cuenta la facultad que tienen algunos bacteriófagos de llevar a cabo tanto el ciclo lítico como el lisogénico; por esto es fundamental la selección estricta de fagos de ciclo lítico para propósitos terapéuticos. Por otro lado, las bacterias pueden adquirir resistencia a los fagos (Hermoso et al. 2007), el mismo problema observado con los antibióticos (Carlson 1999); sin embargo, ésta se puede minimizar con el uso de una suspensión de tres o más fagos (cocteles de fagos), dado que es poco probable que aparezca la resistencia contra diferentes fagos simultáneamente (Watanabe et al. 2007, Barbosa et al. 2013). La especificidad de los fagos también puede llegar a ser una desventaja en la medida en que su espectro de acción es limitado; este aspecto también se puede solucionar utilizando cocteles de fagos para atacar el patógeno en cuestión. Los cocteles deben ser diseñados con fagos que infecten el mayor número posible de cepas de la especie que se busca controlar, y los fagos de un coctel deberían ser diferentes entre sí para que este ofrezcan mayores posibilidades de efectividad contra nuevas cepas no conocidas. Si bien, como fue mencionado anteriormente, la capacidad de mutación se considera una ventaja, también es una desventaja ya que los fagos pueden perder infectividad (Barbosa et al. 2013); sin embargo, la gran diversidad de fagos en la naturaleza permite siempre seleccionar nuevos virus capaces de infectar. Uno de los puntos críticos que debe ser analizado con suma rigurosidad es la posibilidad de que ocurra conversión lisogénica, proceso que pueden realizar los fagos temperados al integrarse al genoma de la bacteria hospedera y por el cual le confieren nuevas propiedades. Por ejemplo, la conversión lisogénica mediada por el fago CTX de *Vibrio cholerae*, permite la producción de la toxina colérica, la principal causa de diarrea en esta infección (Kutter & Sulakvelidze 2005). Por lo anterior, para el uso correcto de la fagoterapia, es indispensable el conocimiento científico riguroso de los fagos, así como una serie de ensayos in vitro e in vivo que verifiquen su eficiencia. También es importante tener en cuenta que, aunque la

fagoterapia ha sido usada en varios países por décadas y existen reportes sobre sus efectos benéficos, hacen falta ensayos que demuestren de forma reproducible su inocuidad.

III. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO (IMPORTANCIA, BENEFICIARIOS, RESULTADOS ESPERADOS)

1. 1. JUSTIFICACIÓN (IMPORTANCIA, BENEFICIARIOS, RESULTADOS ESPERADOS).

La fagoterapia es un tratamiento antimicrobiano con gran potencial para el control de infecciones y contaminación bacteriana en personas, animales, productos de consumo humano y productos agrícolas, entre otros. Desde su descubrimiento, los fagos se han utilizado con fines terapéuticos, y han demostrado su efectividad tanto *in vivo* como *in vitro*, sin producir efectos adversos ni toxicidad. Aunque el estudio de fagoterapia lleva casi un siglo, aún hace falta soporte científico para posicionarla como terapia a nivel mundial. Se requieren, por ejemplo, datos confiables sobre la estabilidad de los fagos bajo diferentes condiciones, sobre la interacción del fago con su hospedero, y sobre los mecanismos de respuesta de los fagos frente a la resistencia bacteriana. Además, se requiere de la interacción entre diversos sectores para la definición de las regulaciones que permitan la comercialización y uso seguro de preparados de fagos con fines terapéuticos, así como un gran esfuerzo de comunicación a la sociedad sobre sus beneficios.

Está claro que nos encontramos ante una terapia prometedora que, usada junto con los antibióticos, puede proporcionar un medio muy eficaz para combatir el preocupante problema de las resistencias bacterianas. Podría ser, por lo tanto, una alternativa al uso generalizado de antibióticos, frente a los graves problemas actuales de estafilococias. No obstante, no deja de presentar inconvenientes técnicos, como sanitarios.

Nuestro grupo de trabajo, es consciente de que los actuales avances científicos han mejorado el conocimiento de los fagos, y dada la creciente necesidad de evaluar nuevas alternativas distintas a los antimicrobianos convencionales, renueva su interés en el estudio de estos microorganismos con propiedades terapéuticas. Tenemos la expectativa de aislar y caracterizar, a todo un conjunto de bacteriófagos que puedan potencialmente controlar a distintos tipos de estafilococos que presenten diversos patrones de resistencia frente a fármacos empleados hoy en la actualidad; con la perspectiva de lograr a futuro, el poder formular “cocteles” de fagos capaces de poder controlar procesos infecciosos generados por este germen, o a la vez poder ser utilizados como desinfectantes naturales en la industria.

IV. OBJETIVOS

1. 1. OBJETIVOS.

4.1. OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar bacteriófagos líticos que puedan servir en el control de *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistentes (MRSA) y otros tipos de resistencias.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

4.2.1. Evaluar la susceptibilidad frente a antimicrobianos, de la colección de *Staphylococcus* aislados del personal médico y paramédico del centro hospitalario “Hospital Regional Docente de Trujillo”.

4.2.2. Obtener técnicas optimizadas para el aislamiento y detección específica de bacteriófagos líticos de *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistentes (MRSA) y otros tipos de resistencia.

4.2.3. Estudiar la diversidad de los bacteriófagos líticos para *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistentes (MRSA) y otros tipos de resistencia.

4.2.4. Establecimiento de un cepario (Clasificación y almacenamiento) y una base de datos de bacteriófagos líticos autóctonos para *Staphylococcus aureus* Meticilino resistentes y otras resistencias.

4.2.5. Caracterización biológica y molecular por RFLP a los bacteriófagos líticos de *Staphylococcus aureus* Meticilino resistentes y otras resistencias.

4.2.6. Analizar a los bacteriófagos líticos como una alternativa para eliminar cepas de *Staphylococcus aureus* Meticilino resistentes (MRSA) y otros tipos de resistencia.

4.2.7. Evaluar la posible presencia de *Staphylococcus* resistentes a bacteriófagos líticos.

4.2.8. Determinar las condiciones óptimas de conservación de los bacteriófagos líticos aislados para el control de *Staphylococcus aureus* Metacilino Resistentes y otros tipos de resistencia.

4.2.9. Evaluar la estabilidad fagica frente a diversas condiciones ambientales como son la temperatura y pH.

4.2.10. Evaluar la estabilidad fagica a la temperatura de conservación de los fagos (4°C) durante un periodo de medio año, determinándose el título de los mismos a los 2, 4 y 6 meses.

V. MARCO TEÓRICO

1. 1. MARCO TEÓRICO.

En 1921 Richard Bruynoghe y Joseph Maisin usaron un tratamiento a base de bacteriófagos para tratar infecciones cutáneas causadas por *Staphylococcus*; el laboratorio comercial de d'Herelle, produjo en París al menos cinco productos a base de fagos, contra varias infecciones bacterianas, las preparaciones llevaron los nombres de: Bacto-coli-phage, Bacto-rhino-phage, Bacto-intestini-phage, Bacto-pyo-phage y Bacto-staphy-phage, los cuales fueron comercializados por la que posteriormente se convirtió en la compañía francesa L'Oreál. Así para 1940 en Estados Unidos Ely Lilly, produjo al menos siete productos de fagos para uso humano. Estas preparaciones consistían de lisados fágicos estériles procedentes directamente de caldos de cultivo bacteriológicos en donde se propagaban los fagos o en gelatina soluble en agua. De hecho durante la Segunda Guerra Mundial los ejércitos de Alemania y la Unión Soviética usaron fagos contra la disentería y el ejército Estadounidense dirigió una investigación sobre fagos, así, la época de 1920 a 1950 se considera cómo la era histórica de la fagoterapia.

Sin embargo y pese a los éxitos que consigue d'Herelle en las aplicaciones terapéuticas de los fagos, la eficacia de los productos a base de fagos fue controversial, es decir el tiempo demostró que no se disponía, en ese momento, de medios técnicos adecuados para tratar racionalmente las muestras que contenían fagos, otros problemas con los que se enfrentó la fagoterapia en ese momento fueron: el desconocimiento de la biología de los fagos pues se llegó a afirmar en citas bibliográficas que los fagos eran proteínas de alto peso molecular que se formaban a partir de un precursor originado al interior de la bacteria, el diseño erróneo de protocolos experimentales, la falta de controles adecuados que demostraran que se empleaban fagos enteramente líticos y no lisogénicos, la presencia de restos celulares bacterianos en los lisados fágicos, la ausencia de

estudios farmacocinéticos que proporcionaran información a cerca de la eliminación de las partículas fágicas, y la aparición de los antibióticos en los 40's condujeron al abandono del uso terapéutico de los fagos en Occidente.

Bacteriófagos en la Biología Molecular: La era moderna de los estudios de Biología Molecular con fagos comenzó con los trabajos de Max Delbruck en 1938, rápidamente otros investigadores como Salvador Luria se unieron a él en el estudio de fagos, como vía para comprender las características fundamentales de la vida biológica, de éste modo, se determinó la composición química del virión, (proteínas y material genético), las primeras microfotografías electrónicas de los fagos fueron obtenidas, por Thomas Anderson en 1943. El trabajo con fagos permitió determinar los tipos de mutaciones genéticas, que los genes son segmentos de DNA, la transferencia de genes entre células, mediadas por virus, las enzimas de restricción y modificación, la colinealidad de genes y proteínas, y el DNA de cadena simple del fago X174. A partir de los 60's las investigaciones con bacteriófagos continuaron mostrando resultados asombrosos como la descripción del RNAm, la naturaleza del código genético, el carácter físico de la recombinación genética, el mecanismo de acción de los factores de transcripción, la recombinación sitio específica, la descripción de la DNA ligasa, y la antiterminación como mecanismo de regulación transcripcional, además se describieron nuevas características del mecanismo de replicación, la síntesis discontinua, los fragmentos de Okazaki, el mecanismo de replicación por circulo rodante, y el papel de los cebadores o iniciadores de RNA en la etapa de iniciación de este proceso. Otros estudios con fagos llevan a la identificación de las chaperoninas, a la caracterización de transposones, al hallazgo de genes sobrelapados, a la descripción de la retroalimentación negativa como mecanismo de la regulación transcripcional y el uso de fagos reporteros para el diagnostico medico. Por otro lado, el uso de los bacteriófagos como vectores en la entrega de material genético a bacterias y la producción de proteínas recombinantes, es una técnica que se sigue usando en nuestros días, aunque la variedad de vectores que existe en la actualidad sea mucho muy diversa.

Biología Combinatoria o "fago-pantalla": En 1982, Renato Dulbecco sugirió que péptidos inmunogénicos derivados de epítomos bien caracterizados de agentes patógenos podrían ser fusionados a las proteínas de la cápside de un fago y la partícula resultante (fago-pantalla, o Phage-Display) podría ser usada como componente principal de vacunas libres de células. En 1985, George Smith demostró que el genoma de los fagos filamentosos podía ser manipulado con facilidad para obtener partículas fágicas que presentan péptidos fusionados a proteínas de su superficie. Estas observaciones estimularon las investigaciones posteriores en este campo y favorecieron el establecimiento de la tecnología de presentación de péptidos y proteínas, este tipo de vacunas se han probado en animales y sus resultados han sido beneficiosos.(Vispo 2001, Clark 2004).

Esta vertiente de fagoterapia ha tenido sus variaciones, por ejemplo el grupo del Dr. Benhar, desarrollo, con un éxito moderado, un bacteriófago que contenía en su superficie moléculas de antibióticos, no péptidos inmunogénicos, basados en la idea de que al reconocer el fago filamentoso al patógeno (*Staphylococcus aerus*) se necesita poco antibiótico para matarlo y que al requerir tan poca cantidad de antibiótico, las reacciones adversas del cloramfenicol se verían reducidas (Yacoby 2006).

DetECCIÓN e IDENTIFICACIÓN BACTERIANA: Por muchos años, la especificidad de los fagos para con sus huéspedes bacterianos ha permitido usarlos para la tipificación de bacterias patógenas, los fagos que se unen a las bacterias pueden ser fácilmente identificados por anticuerpos marcados lo que incrementa la sensibilidad de la detección. De igual manera, los fagos se pueden adicionar sobre las muestras de bacterias aisladas de pacientes, donde se produzca una placa lítica (zona clara en una caja con crecimiento confluyente de bacterias), existe la bacteria que el fago es capaz de lisar y así es posible conocer la identidad de la bacteria que esta ocasionando la enfermedad. Otra manera de utilizar a los fagos en el diagnostico de las infecciones bacterianas, es adicionando en su genoma la información para la síntesis de la proteína verde fluorescente, la cual es expresada después de la infección de la bacteria blanco (Clark 2004).

La situación actual de la fagoterapia: A pesar de que la fagoterapia en los países Occidentales, se vio retrasada de los 50's a los 80's. En Rusia, Polonia, Georgia y la India, las investigaciones continuaron. En Georgia, el centro Tbilisi, fundado por d'Herelle y Eliava ha sido el productor de cepas de fagos, en Polonia el Instituto Hirzfield es el que ha proporcionado datos importantes sobre el tratamiento de más de 5500 casos de infecciones bacterianas supurativas (enfisemas, peritonitis, osteomielitis, y otras) en humanos. La mayor parte de las cuales fueron casos crónicos. Los fagos utilizados para el tratamiento de estas infecciones, se administraron por vía oral, previo tratamiento de los pacientes con antiácidos y gelatina, para proteger a los fagos de la acidez gástrica y posteriormente se comprobaba que los fagos llegaban a torrente sanguíneo, en este trabajo los investigadores Polacos reportaron que el 90% de los pacientes tratados, se recupero satisfactoriamente cesando la supuración y cerrándose las heridas y las fístulas.(Vispo 2001, López 2005).

En Polonia, el estudio de Slopek y colaboradores aportó nuevos datos que demostraban la efectividad de la fagoterapia, en su estudio, 372 personas con infecciones causadas por *Staphylococcus* de los que 151, además tenían alguna otra infección, tras la administración de fagos se encontró que: se obtuvo un 100% de efectividad en el tratamiento de infecciones gastrointestinales, sin embargo en el caso de úlceras varicosas se logró eliminar la infección en el 75% de los pacientes; se determinó además, que en personas mayores de 60 años la respuesta al tratamiento era menor que en gente más joven, sin embargo al combinar la fagoterapia con los antibióticos, la respuesta en estas personas se incrementó considerablemente (Vispo 2001).

Por otro lado, mientras en Europa existen innumerables reportes de fagos y fagoterapia desde el descubrimiento de los fagos. En los países occidentales la aparición de cepas bacterianas multiresistentes fue lo que desencadenó que los investigadores retomaran su interés a esta alternativa, no sólo para el tratamiento de infecciones en aves de corral, cabras, acuicultura, plantas y tratamiento de agua contaminada sino para tratamiento en humanos (Coates 2007, Ronda 2003). De tal modo que se han usado fagos contra *Pseudomonas*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila* y *Mycobacterium tuberculosis*, entre muchas otras bacterias resistentes a uno o varios antibióticos como, ampicilina, vancomicina, etc. con diferentes grados de eficacia que van desde el 75 al 95% y en ocasiones el 100% (Gill 2006, Mitchell 1983, Watanabe 2006).

Los fagos han sido administrados por varias vías por ejemplo oral, tópica, intravenosa, intrapleural, utilizando títulos desde 10^5 hasta 10^{11} , sin reportes de complicaciones serias asociadas con su uso, probablemente porque los bacteriófagos son extremadamente comunes en el ambiente, se calcula que en agua no contaminada hay alrededor de 10^8 fagos/mL. En el caso de Occidente la investigación acerca de la fagoterapia se ha incrementado considerablemente, incluso han surgido industrias dedicadas a investigar a cerca del uso terapéutico de los bacteriófagos.

Cabe destacar que las aplicaciones de los bacteriófagos cada vez son mayores, dado que los resultados obtenidos en los experimentos realizados, han sido buenos, su uso se ha extendido a la industria alimentaria, la compañía Intralix por ejemplo tiene dos productos aprobados por la FDA para su uso en productos de consumo humano (ListShield que actúa específicamente contra *Listeria monocytogenes* y EcoShield contra *Escherichia coli*), del mismo modo, EBI Food Safety, una compañía estadounidense dedicada a la investigación y desarrollo de la fagoterapia, es dueña de la segunda marca de lisados fágicos para la prevención de infecciones causadas por *Listeria monocytogenes* que fue aprobada por la FDA para su venta y uso en peces y queso. A decir verdad, la erradicación de patógenos bacterianos mediante fagos, se ha extendido a áreas tan importantes y diversas como:

- Alimentos (Intralix, EBI Food Safety, New Horizons).
- Sanitización ambiental (Intralix, Novolytics).
- Aplicaciones veterinarias (Intralix, EBI Food Safety, Novolytics)
- Aplicaciones en humanos (Intralix, New Horizons, Exponential Biotherapies, Novolytics, Phage-biotech, Eliava Institute)

En el caso de la compañía Intralytix en Maryland Estados Unidos, cuenta ya con patentes de preparaciones fágicas veterinarias como PLSV-1™, cuyo blanco es *Salmonella* y INT-401™ contra *Clostridium perfringens*. Asimismo, se cuenta con una preparación de fagos denominada Listshield™ la cual ha sido aceptada por la Agencia de Protección Ambiental (EPA por sus siglas en inglés) y por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés) para ser usada en la descontaminación ambiental en plantas productoras de alimentos contra bacterias de los géneros, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Escherichia* y *Listeria*.²⁸ Además cuenta con los siguientes productos:

- Ecoshield contra *Escherichia coli* O157:H7
- Salmshield contra *Salmonella*
- ShigActive contra *Shigella*
- SAP 100 contra *Staphylococcus aureus*, incluyendo a los meticilina resistentes, y vancomicina resistentes.
- ABPP-100 contra *Acinetobacter baumannii*

Intralytix como parte de sus investigaciones actualmente estudia el desarrollo de un producto como el generado por el Instituto Tbilisi denominado PhagoBioDerm™, el cual es un polímero de matriz biodegradable a base de poliéster amida, impregnado con bacteriófagos para ser usado vía tópica en pacientes con infecciones dérmicas contra cinco microorganismos (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Proteus*),²⁹ y contiene también antibiótico como ciprofloxacino, un anestésico (Benzocaína), y enzimas proteolíticas (quimotripsina o tripsina).

A este respecto es importante destacar que en Europa, tanto el Instituto Tbilisi como Eliava, cuentan ya con un área especializada en la atención a humanos en el tratamiento de éstas enfermedades infecciosas. De modo tal que los fagos han sido utilizados contra una gran gama de bacterias. La investigación sobre fagos se encuentra dispersa por todo el mundo.

VI. HIPÓTESIS

1. 1. HIPÓTESIS.

Staphylococcus aureus es un patógeno por excelencia y se encuentra ampliamente distribuido en ambientes intra-hospitalarios como a nivel de comunidad, producto del amplio espectro de resistencia antibiótica que presenta; es muy probable, que en la naturaleza existan formas biológicas como los bacteriófagos de tipo líticos, que a través de su aislamiento y caracterización

puedan resultar una alternativa futura para el control de este microorganismo.

VII. METODOLOGÍA

1. 1. METODOLOGÍA.

CULTIVOS BACTERIANOS de *Staphylococcus aureus*

En este estudio observacional descriptivo de corte transversal, serán empleados aislados de estafilococos procedentes de centros hospitalarios que deseen acogerse a este estudio, y además se incluirá cepas control de *S. aureus* (ATCC 25923, ATCC 43300 y *S. aureus* portador de los genes *mecA*, donde las características fenotípicas y genotípicas de estas cepas se describen en la Tabla 1. Estos aislados serán obtenidos de personal de estos centros de hospitalización que tengan mas de 48 hrs. de permanencia en dichos centros.

Recolectadas las muestras, se sembrarán inmediatamente en Agar Nutritivo, Agar Manitol-Salado y Agar Sangre, y llevadas a incubación en atmósfera de CO₂ a 35°C por 24 horas.

PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS.

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizará un screening inicial examinarán las características de las colonias. Se realizaron la coloración de Gram y la prueba de catalasa. Como pruebas confirmatorias se utilizará la prueba de coagulasa en tubo.

Catalasa. Con una asa bacteriológica se hará transferir parte del centro de una colonia a la superficie de un portaobjetos, sobre la cual agregamos una gota de peróxido de hidrógeno al 3%, pretendiendo observar la formación de burbujas abundantes luego de 30 a 40 segundos.

Prueba de coagulasa libre (tubo). Se prepara una suspensión bacteriana a partir de la colonia del microorganismo en un tubo que contenga 0,5 mL de plasma, incubar a 35°C durante 4 horas e inclinar el tubo observando si se forma un coágulo, las cepas que no forman coágulo en ese

momento, deben ser reincubadas a temperatura ambiente, por 18 horas y nuevamente realizar la lectura.

PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN Y DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS.

La determinación de la sensibilidad antibiótica se realizará a través del método de Kirby-Bauer, de acuerdo a las recomendaciones por parte de la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Los antibióticos evaluados serán: ciprofloxacina (5 g), clindamicina (2 g), eritromicina (15 g), levofloxacina (5 g), oxacilina (1 g), trimetoprim sulfametoxazol (STX, 1,25/23,75 g) y vancomicina (30 g), entre otros. Con el objetivo de detectar el fenotipo inducible de resistencia.

Confirmación de la Resistencia a Oxacilina. Una vez establecida la resistencia a oxacilina por medio del antibiograma, se procederá a realizar (según el CLSI) el tamizaje en placa de agar Mueller-Hinton con suplemento de oxacilina (6 g/ml) y NaCl (4%). Como control positivo se utilizará la cepa de *S. aureus* ATCC 43300 y como control negativo, *S. aureus* ATCC 29213. La incubación se realizará en aerobiosis a 35°C por 24 horas.

Tamizaje de Sensibilidad a la Vancomicina. Ante un aislamiento de SARM sensible a la vancomicina se hace necesario confirmarla debido a la aparición de cepas con sensibilidad disminuida. A los aislamientos SARM se les realizará el tamizaje en agar BHI con suplemento de vancomicina (6 g/ml). El control positivo será *E. faecalis* ATCC 51299 y el negativo, *S. aureus* ATCC 29213. Incubándose en aerobiosis a 35°C por 24 horas.

Predicción de Resistencia Mediada por el Gen *mecA*. A los aislamientos SARM confirmados se les realizará la prueba de tamizaje de difusión por disco para la predicción de la resistencia a meticilina mediada por el gen *mecA*. Se utilizarán discos de cefoxitina (30 g). Según el NCCLS, un halo de 20 mm o mayor se da en un aislamiento sensible a meticilina y uno de 19 mm o menos indica un aislamiento con resistencia a meticilina probablemente mediada por el gen *mecA*.

CONSERVACIÓN DE CEPAS DE *Staphylococcus* EN VIALES CRIOGÉNICOS

Para la realización de las experiencias, se realizarán cultivos líquidos en medio LEM. Para ello, a partir de las placas master de *Staphylococcus aureus*, se dispondrá a partir de una sola colonia con la ayuda del asa bacteriológica, y colocada dentro del medio líquido LEM, al cual previamente se le debe de adicionar ampicilina de un stock de 100 mg/ml, en una proporción de 1:1000.

Estas suspensiones bacterianas serán cultivadas por 16 horas, la cual se considerará el overnight (ON). Al término de ello, será trasvasado a tubos estériles conteniendo glicerol hasta lograr una concentración del 30%. Posteriormente se agitarán en vórtex y se alicuotarán en 05 viales criogénicos estériles debidamente rotulados y almacenados a una temperatura de -30°C en un congelador.

OBTENCIÓN CULTIVO EN FASE EXPONENCIAL

Los cultivos en fase exponencial, se obtendrán tomando 4 mL. del ON y resuspendido en 16 mL de caldo LEM nuevo, e incubado a 37°C durante 02 horas y con agitación continua a 150 rpm.

SIEMBRA EN DOBLE CAPA

La siembra en doble capa, se realizará preparando previamente placas con bottom agar y conservándolas a 4°C en una refrigeradora. Al momento del ensayo las placas de bottom agar serán temperadas a 37°C en una incubadora y se colocará top agar que deberá encontrarse a una temperatura entre $45-50^{\circ}\text{C}$.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE AGUA PARA EL AISLAMIENTO DE BACTERIOFAGOS

Las muestras de agua de albañal serán obtenidas de los recolectores propios del Hospital Regional Docente de Trujillo, aunque alternativamente también procederán de recolectores cercanos al centro hospitalario y en cuerpos de agua próximo al ingreso a las pozas de oxidación de la Ciudad de Trujillo. En total se pretende recoger aproximadamente 5 Lt. de aguas.

Se deberán utilizar botellas de plástico de 1 Lt. de capacidad, y las muestras serán tomadas a un metro de profundidad para evitar los efectos de la luz en las muestras de agua. Las muestras serán transportadas al laboratorio en contenedores que mantengan la temperatura. Además, se tomarán mediciones de pH y temperatura de cada una de las muestras obtenidas.

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE AGUA

Las muestras de agua de albañal, deberán ser procesadas previo al aislamiento de los

bacteriófagos. Este proceso se realizará sedimentando la muestra de agua durante 24 horas mínimo. Después de este tiempo, en 2 tubos Falcon de 50 ml se colocará 2 ml de caldo TB modificado junto con 2 ml de cultivo en fase exponencial y 18 ml de agua en cada uno. En uno de ellos se añadirá agua destilada, el cual representaría el grupo control, y en el otro el agua de albañal sin filtrar.

Se determinará la densidad óptica inicial de ambas muestras a 600 nm mediante espectrofotómetro y se tomará una medición después de una hora, y a partir de allí se realizarán mediciones en intervalos de 30 minutos. Aquellas muestras que presenten una disminución en la curva de crecimiento, se considerará que contienen bacteriófagos, por lo que se priorizará el uso de dicha muestra de agua para el aislamiento de bacteriófagos.

Las muestras se dejarán en ON, y posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm por 20 minutos, el sobrenadante (SN) se trasvasará a un nuevo tubo Falcon de 50 mL y se centrifugará nuevamente a 5000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se pasará por un filtro de nylon de 0,45 m de diámetro solamente en uno de los ensayos.

AISLAMIENTO DE FAGOS DE LA MUESTRA DE AGUA POR ENRIQUECIMIENTO

Para el aislamiento de los bacteriofagos será necesario preparar diluciones seriadas de la muestra de agua procesada. Para ello se colocarán 5 tubos de ensayo estériles en una gradilla, a cada uno de los tubos se le añadieron 9 mL de caldo TB modificado. Al primer tubo se le adicionará 1 mL de la muestra de agua procesada y se agitará en vortex, se tomará 1 mL del tubo uno y se añadirá al tubo 2 el cual se agitará también en vortex y se procederá de la misma manera con el resto de tubos.

Por otro lado, se preparará un cultivo ON de cada cepa en medio LEM líquido, se colocarán 2 mL del cultivo ON en un tubo de ensayo estéril junto con 1 mL de la muestra de agua procesada y se incubará a 37°C durante 10 minutos. Después de este tiempo, se añadieron 10 mL de top agar (Medio LEM 0,7) al tubo.

Previamente a ello se deberán colocar las placas de bottom agar (LEM 1,5%) en la incubadora a 37°C para evitar colocar el top agar en placas frías. Se dispondrá la mezcla previa de top agar junto con el cultivo sobre las placas templadas y se incubará ON a 37°C.

Transcurrido este tiempo, se evaluarán las placas y se buscará la presencia de calvas (placas de

lisis). Cada calva será extraída (tanto el top agar como el bottom agar) mediante una punta de micro pipeta estéril previamente cortada al tamaño aproximado de una calva. Ambas capas de medio extraídas serán colocadas en un tubo Eppendorf que contendrá 1 mL de buffer SM junto con 10 L de cloroformo. El medio se mezclará completamente en el buffer con la ayuda de una micropipeta y será almacenado a una temperatura de 4°C.

Se realizaran ensayos probando diferentes medios de conservación de bacteriófagos, entre ellos TB, SM y LEM con concentraciones de cloroformo de 0 L, 10 L y 20 L.

LISADOS EN MEDIO LÍQUIDO

Para pretender obtener una mayor concentración de bacteriófagos, se tomará 2 mL de un cultivo en fase exponencial y se agregará 200 L del aislado fágico. Se incubará a 37°C durante 16 horas, y se centrifugará el cultivo a 10,000 rpm durante 10 minutos. Se recuperará el sobrenadante, añadiéndose 10 L de cloroformo y conservándose las muestras a 4°C.

PRUEBA DE LA GOTA

Para la realización de esta prueba se preparará un cultivo en fase exponencial, y se colocarán 2 mL de este cultivo en un tubo de ensayo estéril al cual se le adicionará 10 mL de top agar, el cual se colocará sobre una placa Petri con bottom agar previamente temperada a 37°C. Se dejara enfriar las placas en una cabina de bioseguridad o en una zona estéril alrededor de un mechero durante 10 minutos.

Después de este tiempo, el agar deberá estar completamente solidificado por lo que se procederá a realizar la prueba de la gota. Para ello se colocarán 10 L de cada fago conservado, en los distintos medios en una distribución que permitiera su identificación posterior.

Se dejarán secar las gotas durante 10 minutos en una cabina de bioseguridad o alrededor de un mechero y se incubara las placas boca abajo a 37°C durante 16–20 horas. Después de este tiempo se deberá observar si existen zonas de lisis.

VERIFICACIÓN DE FAGOS NO CONTAMINADOS

Se verificará que los lisados en medio líquido y los fagos conservados en SM no estarán contaminados mediante la colocación de 10 L de cada lisado fágico en una placa Petri con bottom agar. Se incubará el ON a 37°C tiempo después del cual se observará la presencia de contaminaciones bacterianas en cada marca de gota colocada.

TITULACIÓN DE LISADOS FÁGICOS

Se realizarán diluciones seriadas del lisado en medio líquido LEM, se añadirá 900 L de SM y 100 L de fago en SM + 10 L de cloroformo y se sembrará las diluciones en cultivo de doble capa añadiendo 1 mL de la dilución, 2 mL de cultivo en fase exponencial, se incubará durante 10 minutos a 37°C, se agregará 10 mL de top agar y se realizará la siembra en doble capa.

CINÉTICA DE INFECCIÓN DE BACTERIÓFAGOS

Para conocer la cinética de infección de bacteriófagos se preparará un cultivo en fase exponencial, al cual se inoculará el fago correspondiente a un lisado en medio líquido, se medirá la densidad óptica inicial a 600 nm en un espectrofotómetro y se realizarán mediciones cada 15 minutos durante 3 horas.

ESTABILIDAD FAGICA FRENTE A DIVERSAS CONDICIONES AMBIENTALES

Con el fin de determinar la estabilidad de los bacteriófagos en distintas condiciones ambientales, se incubarán los fagos en las condiciones a estudiar, tomándose muestras a diferentes tiempos para calcular la concentración fágica. Los resultados obtenidos serán transformados a unidades logarítmicas en base diez y se determinará la reducción de la infectividad en las diferentes condiciones ambientales. Para este efecto, los estudios de estabilidad serán en torno al pH y temperatura:

pH. Se determinará la capacidad infectiva de los fagos en MgSO_4 10 mM acidificado o alcalinizado, hasta obtener valores de pH de 2, 4, 6 y 9. Se determinará el título fagico durante dos horas a temperatura ambiente, tomándose muestras cada 30 min.

TEMPERATURA. La estabilidad fagica a diferentes temperaturas se determinará incubando los fagos en MgSO_4 10 mM sin agitación durante siete días a 25°C, 30°C, 37°C y 42°C, titulando una muestra cada 24 hrs. Asimismo se determinará la estabilidad fagica a la temperatura de

conservación de los fagos (4°C), durante medio año, determinándose el título de los mismos a los 2, 4 y 6 meses.

EXTRACCION DE DNA VIRAL

El objetivo de este protocolo es obtener el DNA viral para ensayos moleculares. El protocolo a utilizar permite obtener DNA fagico a partir de cultivos líquidos, sin utilizar columnas de purificación. La calidad y pureza del DNA obtenida es suficiente para realizar ensayos moleculares como PCR o RFLPs, aunque no es recomendable utilizarlo para secuenciación

El DNA obtenido puede visualizarse mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% con bromuro de etidio 0.5 ug/mL El resultado esperado, es obtener bandas en función del peso molecular de cada fragmento, tomando para ello un DNA marcador de PM.

PERFILES DE RESTRICCIÓN (RFLPs)

El objetivo de estos ensayos es generar patrones de bandas que permitan comparar distintos genomas virales, mediante el uso de enzimas de restricción. Para la construcción de los perfiles, se utilizarán las enzimas de restricción: *BstEII*, *EcoRV*, *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *XbaI*.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Se diseñara una base de datos en Microsoft Excel y, posteriormente, se analizarán en SPSS. Se efectuará un análisis univariado para conocer las frecuencias de las variables.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. 1. BIBLIOGRAFÍA.

1. Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter E (2011) Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* 1(2):66-85 doi:10.4161/bact.1.2.15845.
2. Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM. Phage treatment of human infections.

- Bacteriophage. 2011;1(2):66-85.
3. Ahmed K, Kaderbhai N, Kaderbhai M. Bacteriophage therapy revisited. *Afr J Microbiol Res*. 2012; 6(14):3366-79.
 4. Archer GL. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. *Clin Infect Dis*. 1998; 26(5):1179-81.
 5. Boubaker K, Diebold P, Blanc DS, Vandenesch F, Praz G, Dupuis G, et al. Panton-valentine leucocidin and staphylococcal skin infections in schoolchildren. *Emerg Infect Dis*, 2004; 10(1):121-4.
 6. Carlon R (1999) Phage therapy: past history and future prospects. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 47:267–274
 7. Clark, J., March, J., 2004. Bacterial viruses as human vaccines? *Expert Review of Vaccines*, 3:463-476.
 8. Coates, A., Hu, Y., 2007. Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. *British Journal of Pharmacology*, 152:1147-1154.
 9. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2003; 36(1):53-9.
 10. Davies J, Davies D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74(3):417-433.
 11. DNP Departamento Nacional de Planeación. (2014). Farmacéutica y medicamentos <https://www.dnp.gov.co/Portals/0/archivos/documentos/DDE/Farmaceuticos.pdf>. Consultado Marzo 18 2015.
 12. Doebbeling BN, Breneman DL, Neu HC, Aly R, Yangco BG, Holley HP Jr, et al. Elimination of *Staphylococcus aureus* nasal carriage in health care workers: analysis of six clinical trials with calcium mupirocin ointment. The Mupirocin collaborative study group. *Clin Infect Dis*. 1993;17(3):466-74.
 13. Donado-Godoy M. (2010). Prevalence, resistance patterns and risk factors for antimicrobial resistance in poultry farms and retail chicken meat in Colombia and molecular characterization of *Salmonella* Paratyphi B and *Salmonella* Heidelberg. Tesis Doctoral. Office of Graduate Studies, Universidad de California.
 14. Echevarría Zarate J, Iglesias Quilca D. Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. *Rev Med Hered*. 2003; 14(4):195-203.
 15. Editorial (2013). Un nuevo problema mundial. *El Tiempo*. www.eltiempo.com. Consultado Marzo 16 2015.
 16. Gill, J., Carson, M., Leslie, K., Griffiths, M., Sabour, P., 2006. Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cattle. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 9(50), 2912-2918.
 17. Goldman E, Green LH (2009). Practical handbook of microbiology. CRC Press Boca Raton FL, USA. [http:// books.google.com.co/books?id](http://books.google.com.co/books?id). Consultado Julio 1 2014.
 18. Gómez F. (1984). Resolución 1966. <http://www.rr-america.s>.

- o i e . i n t / i n / p r o y e c t o s / C a m e v e t / N o r m a s _ p a i s e s / Normativas%20Paises/Colombia/RESOL1966.htm. Consultado Julio 16, 2015.
19. GREBO Grupo para el Control de la Resistencia Antimicrobiana en Bogotá (2013) Boletín informativo . http://www.grebo.org/grebo_site/jgrebo/documentos/Boletin%20Julio%202013.pdf. Consultado Febrero 25, 2015
 20. Hankin ME. The bactericidal action of the waters of the Jamuna and Ganges rivers on Cholera microbes. *Ann Inst Pasteur.* 1896; 10:511-23.
 21. Hermoso J, García J, García P. (2007). Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzibiotics. *Current Opinion in Microbiology* 10:461-472.
 22. Karunasagar I. (2012) Public health and trade impact of antimicrobial use in aquaculture. En: Bondad-Reantaso MG., Arthur JR., Subasinghe RP. (eds) Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper, Roma, España pp 1-9.
 23. Kutter E, De Vos D, Gvasalia G, Alavidze Z, Gogokhia L, Kuhl S, Abedon ST (2010) Phage therapy in clinical practice: Treatment of human infections. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 11(1):69-86
 24. Kutter E, Sulakvelidze A. (2005). Bacteriophages: Biology and Applications. CRC Press, United States of America, 527p.
 25. Levin Institute (2014) Regulating Antibiotics in Animals <http://www.globalization101.org/regulating-antibiotics-in-animals/>. Consultado Febrero 25 2014.
 26. Loc-Carrillo C, Abedon S (2011) Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage* 1(2):111-114.
 27. Loc-Carrillo C; Abedon ST. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage.* 2011;1(2):111-4.
 28. López, G., 2005. Bacteriófagos: de la biología molecular a su uso terapéutico. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias*, VIII(13):61-102.
 29. Meipariani A (2013) The use of bacteriophage against infections. Phage Therapy Center. Bacteriophage therapy for patients across the globe http://www.phagetherapycenter.com/pii/PatientServlet?command=static_pttreatinginfections&language=0. Consultado Junio 25 2014
 30. Mitchel, S., Rouf, M., 1983. Isolation and partial characterization of two *Aeromonas hydrophila* bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 5(45):1670-1676.
 31. Philips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, et al. (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 53(1):28-52.
 32. Potera C (2013). Phage Renaissance. New hope against antibiotic resistance. *Environmental Health Perspectives* 121(2):A48-A53.
 33. Prada G. (2008) Impacto de la resistencia a los antibióticos en el desarrollo de la medicina contemporánea. *Revista Med.* 16(1):9-11
 34. Ríos R. (2004). Legislación específica sobre antibióticos. En: Organización Panamericana de

- la Salud (anexo 7). Legislación sobre antibióticos en América Latina. Washington, DC. pp 89-97.
35. Ronda, C., Vázquez, M., López, R., 2003. Los bacteriófagos como herramienta para combatir infecciones en acuicultura. *Revista AquaTIC*, 18:3-10.
 36. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris G (2001). Minireview - Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(3):649-659.
 37. Tamariz J, Agapito J, Horna J, Tapia E, Vicente W, Silva M, et al. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquirido en la comunidad aislados en tres hospitales de Lima-Perú. *Rev Med Hered.* 2010;21(1):4-10.
 38. Tenover FC, McDougal LK, Goering RV, Killgore G, Projan SJ, Patel JB, et al. Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States. *J Clin Microbiol.* 2006;44(1):108-18.
 39. Vispo N., Puchades, Y., 2001. Bacteriófagos: de la terapia con fagos a la biología combinatoria. *Biotecnología Aplicada*, 18:135-147.
 40. Watanabe R, Matsumoto T, Sano G, Ishii Y, Tateda K, et al. (2007). Efficacy of bacteriophage therapy against gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 51(2):446– 452.
 41. Watanabe, R., Matsumoto, T., Sano, G., Ishii, G., Kazuhiro, T., Summiyama, J., Sakurai, S., Matsumoto, S., Imai, S., Yamaguchi, K., 2006. Efficacy of bacteriophages therapy against gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2(51): 446-452.
 42. World Economic Forum (2013) Global Risks 2013 Eighth Edition 80p [http://www3.weforum.org/docs/WEF Global Risks Report 2013.pdf](http://www3.weforum.org/docs/WEF_Global_Risks_Report_2013.pdf). Consultado Diciembre 10, 2015.
 43. Yacoby, I., Shamis, M., Bar, H., Shabat, D., Benhar, I., 2006, Targetting antibacterial agents by using drugcarrying filamentous bacteriophages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 6(50): 2087-2097.
 44. Yan-Yu T (2008) Rotational-echo double resonance NMR characterization of DNA packaging in bacteriophage T4 and of *Saccharomyces cerevisiae* lumazine synthase-inhibitor complexes. ProQuest LLC Washington, USA <http://books.google.com.co/books?id=WwPZ-8GZhYUC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>. Consultado Agosto 1, 2015.
 45. Yonath A. (2013). A las farmacéuticas no les interesa desarrollar antibióticos porque no les resulta rentable SINC. <http://www.agenciasinc.es/Noticias/A-las-farmacéuticas-no-les-interesa-desarrollar-antibioticos-porque-no-les-resulta-rentable>. Consultado Marzo 16, 2015

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDAD	INICIO	FIN
Evaluar la susceptibilidad frente a antimicrobianos, de la colección de Staphylococcus aislados del personal médico y pa	01/03/2016	01/07/2016
Evaluar la estabilidad fagica a la temperatura de conservación de los fagos (4°C) durante un periodo de medio año, dete	01/04/2016	31/01/2017
Obtener técnicas optimizadas para el aislamiento y detección específica de bacteriófagos líticos de Staphylococcus aureu	01/05/2016	31/08/2016
Establecimiento de un cepario (Clasificación y almacenamiento) y una base de datos de bacteriófagos líticos autóctonos p	01/05/2016	31/12/2016
Estudiar la diversidad de los bacteriófagos líticos para Staphylococcus aureus Meticilino Resistentes (MRSA) y otros tip	01/07/2016	31/12/2016
Determinar las condiciones óptimas de conservación de los bacteriófagos líticos aislados para el control de Staphylococc	01/07/2016	31/01/2017
Caracterización biológica y molecular por RFLP a los bacteriófagos líticos de Staphylococcus aureus Meticilino resistant	01/07/2016	31/01/2017
Evaluar la posible presencia de Staphylococcus resistentes a bacteriófagos líticos.	01/07/2016	31/01/2017
Analizar a los bacteriófagos líticos como una alternativa para eliminar cepas de Staphylococcus aureus Meticilino resist	01/07/2016	31/01/2017
Informe Parcial del Proyecto	01/08/2016	09/08/2016
Evaluar la estabilidad fagica frente a diversas condiciones ambientales como son la temperatura y pH.	01/08/2016	31/01/2017
Informe Final del Proyecto	01/02/2017	28/02/2017

PRESUPUESTO

DESCRIPCION	CANTIDAD	PRECIO_UNITARIO	PRECIO_PARCIAL
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	254	254
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	300	300
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	300	300
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	185	370
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	445	890
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	300	300
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	120	120
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	250	250
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	400	800
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	300	300
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	300	300
REACTIVOS E INSUMOS	5 UNI	20	100
REACTIVOS E INSUMOS	5 UNI	20	100
REACTIVOS E INSUMOS	5 UNI	20	100
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	300	300
REACTIVOS E INSUMOS	3 UNI	300	900
REACTIVOS E INSUMOS	3 UNI	320	960
REACTIVOS E INSUMOS	5 UNI	20	100
REACTIVOS E INSUMOS	5 UNI	100	500
REACTIVOS E INSUMOS	5 UNI	100	500
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	300	300
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	300	300
REACTIVOS E INSUMOS	3 UNI	300	900
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	120	120
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	300	300
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	300	300
REACTIVOS E INSUMOS	5 UNI	20	100
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	200	200
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	200	400
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	400	800
REACTIVOS E INSUMOS	5 UNI	20	100
REACTIVOS E INSUMOS	3 UNI	165	495
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	200	400
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	170	170
REACTIVOS E INSUMOS	5 UNI	20	100
REACTIVOS E INSUMOS	5 UNI	20	100
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	1800	1800
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	290	580
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	300	300
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	275	275
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	4000	4000
REACTIVOS E INSUMOS	5 UNI	20	100
REACTIVOS E INSUMOS	5 UNI	20	100

Total 19984