

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE BACTERIÓFAGOS RECUPERADOS DE AGUA RESIDUAL HOSPITALARIA CONTRA AISLAMIENTOS DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS RESISTENTES A CARBAPENÉMICOS.

Medina Juan¹, Molina Tomas¹, Rada Ana M²

1. Programa de Biotecnología. Facultad de ciencias de la salud. Institución Universitaria Colegio mayor de Antioquia.
2. Grupo de investigación Biociencias. Facultad de ciencias de la salud. Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia.

RESUMEN

Introducción: En 2017, la OMS, publicó un listado de las bacterias patógenas de importancia a nivel clínico, en las que se encontraban las enterobacterias resistentes a carbapenémicos como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Debido a las pocas opciones para el tratamiento de las infecciones producidas por estas bacterias, se han estado desarrollando nuevas estrategias como es el uso de bacteriófagos, los cuales son virus capaces de lisar bacterias de una manera muy específica. **Objetivo:** Evaluar el efecto inhibitorio de bacteriófagos obtenidos en aguas residuales frente a aislamientos clínicos de bacterias Gram negativas resistentes a carbapenémicos. **Materiales y Métodos:** Se proceso un agua residual hospitalaria proveniente de Antioquia, mediante filtración y posterior precipitación con polietilenglicol para la obtención y el enriquecimiento de bacteriófagos que se probaron contra la cepa *E. coli* ATCC 25922, mediante un método de sembrado de doble capa, para ser evaluados contra aislamientos clínicos. **Conclusión:** En esta primera fase del proyecto se recuperaron bacteriófagos a partir de un agua residual hospitalaria proveniente de Antioquia, Colombia, con actividad antimicrobiana contra *E. coli* ATCC 25922, los cuales podrán ser probados contra bacterias Gram negativas resistentes a carbapenémicos.

Palabras clave: bacteriófagos, bacterias Gram negativas resistente a carbapenémicos, aguas residuales.

INTRODUCCIÓN

El fenómeno de la resistencia en bacterias Gram negativas del orden *Enterobacterales* es un problema de salud pública a nivel mundial, por la amplia diseminación de estos microorganismos y elevada frecuencia en infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), que repercute de manera importante en la salud de los pacientes, prolongación en la estancia hospitalaria, mayores tasas de fracaso terapéutico, aumento en la mortalidad y mayores costos derivados de la atención hospitalaria (1).

En el año 2017, la OMS publicó un listado de patógenos de importancia clínica, situándose en los de prioridad crítica las bacterias Gram negativas resistentes a los antibióticos carbapenémicos (Ertapenem, Imipenem, Meropenem y Doripenem) como son *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter* spp (1). Estas bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia a este grupo de antibióticos, siendo en los últimos años la producción de carbapenemasas el mecanismo protagonista por su frecuencia y eficacia. En Colombia, los *Enterobacterales* productores de carbapenemasas ocupan los primeros lugares en la epidemiología de las IAAS y de las adquiridas en la comunidad (2).

Las opciones terapéuticas frente a las infecciones producidas por este grupo de microorganismos son escasas, debido a que los elementos genéticos móviles que transportan los genes que codifican para carbapenemasas, llevan además determinantes de resistencia a otras familias de antimicrobianos (2). Este panorama ha llevado a que se planteen nuevas alternativas terapéuticas como es el uso de bacteriófagos. Los bacteriófagos habitan en diversos lugares terrestres y acuáticos (incluyendo las aguas residuales) y se caracterizan por infectar las bacterias sin necesidad de ingresar a su interior, utilizando un mecanismo de inyección por el cual transmite el material genético (3). Las características morfológicas de cada fago les permiten infectar y lisar únicamente una especie bacteriana, lo cual es muy beneficioso al momento de implementar una estrategia terapéutica para enfrentar infecciones generadas por este grupo de bacterias en el sector de salud (4).

Los fagos pueden estar presentes en aguas residuales, lo que les permite convivir estrechamente con diferentes poblaciones bacterianas. Las plantas en las cuales se podría aislar este tipo de microorganismos con un posible potencial para inhibir patógenos son las aguas hospitalarias. Por lo anterior en el presente proyecto se plantea aislar e identificar bacteriófagos en agua residual hospitalaria del departamento de Antioquia y evaluar si tienen efecto inhibitorio frente aislamientos clínicos de bacterias Gram negativas resistentes a carbapenémicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomó una muestra de agua residual hospitalaria proveniente de Antioquia. Esta muestra se procesó mediante centrifugación y a partir del sobrenadante se filtró al vacío utilizando una membrana de 0,45µm con la finalidad de obtener una suspensión inicial de bacteriófagos sin una posible interferencia por bacterias (5).

Al tener esta solución se agregaron 10ml de polietilenglicol (PEG) 6000 para disminuir la solubilidad del agua y así precipitar la mayor cantidad de bacteriófagos, a continuación, se realizó un centrifugado y se tomó el pellet para realizar un enriquecimiento de los bacteriófagos específicos para la cepa a estudiar. Para este enriquecimiento se utilizó la cepa de *E. coli* ATCC 25922, la cual se incubó con agitación junto a la solución de bacteriófagos anteriormente obtenida (5).

Este enriquecimiento se filtró nuevamente al vacío utilizando una membrana de 0,45µm para así tener una solución enriquecida de bacteriófagos y ser probada su actividad directamente en la bacteria de interés. Para esta fase de actividad antimicrobiana se realizó contra la cepa de *E. coli* ATCC 25922, mediante el método de sembrado de doble capa, en el que se utilizó un agar sólido en la parte inferior de la caja de Petri y un agar semisólido en la parte superior al cual se le agregó un mililitro del inóculo de la cepa y un mililitro de la solución enriquecida de bacteriófagos para posteriormente llevar a incubación y observar la generación de calvas (evidencia de actividad antimicrobiana) (6).

RESULTADOS PRELIMINARES Y DISCUSIÓN

Se identificó una disminución en el crecimiento bacteriano al utilizar la solución pura de los bacteriófagos enriquecidos, por lo que se realizaron diluciones hasta llegar a una concentración de 10^{-11} para poder visualizar de una manera más clara las calvas generadas por los bacteriófagos, como se reporta en estudios previos (6). Estos se aislaron para ser probados posteriormente en diferentes aislamientos clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Igualmente, se realizó una aplicación de los bacteriófagos por medio de goteo sobre el agar donde se observaron las calvas más amplias y claras en el agar.

CONCLUSIONES PRELIMINARES

La metodología que se estandarizó para el aislamiento de bacteriófagos a partir de agua residual fue efectiva. Se detectaron bacteriófagos recuperados de un agua residual hospitalaria con actividad antimicrobiana contra una cepa de *E. coli*, que podrían tener actividad contra aislamientos clínicos de bacterias Gram negativas resistentes a carbapenémicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. [internet]. [WHO] 2017, 27 feb. [Citado 2019 feb 22] La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Organización mundial de la salud. [aprox. 5 p.] Disponible en:
<https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
2. Esparza, G. Bacterias Gram negativas resistentes a carbapenemicos en Colombia: un desafío continuo al sistema de salud. *Infectio* 2020; 24(2):55-56.
3. Sharp Richard. Bacteriophages: biology and history. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2001; 76 (7): 667-672.
4. Jorquera D, Galarce N, & Borie C. El desafío de controlar las enfermedades transmitidas por alimentos: bacteriófagos como una nueva herramienta biotecnológica. *Revista chilena de infectología*. 2015; 32(6), 678-688.
5. Gaviria, G. A., González de, M. S., & Castaño, J. O. Técnica para aislamiento de bacteriófagos específicos para *E.coli* DH5 α a partir de aguas residuales. In *Rev.MVZ Córdoba*. 2012; 17, Issue 1.
6. Samir S, El-Far A, Okasha H, Mahdy R, Samir F, Nasr S. Isolation and characterization of lytic bacteriophages from sewage at an egyptian tertiary care hospital against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Saudi J. Biol. Sci.* 2022, 29(5): 3097-3106.