

# **EFFECTO DE BACTERIÓFAGOS SOBRE BIOPELÍCULAS DE *Pseudomonas aeruginosa* RESISTENTES A MÚLTIPLES DROGAS (MDR)**

Viviana Clavijo L<sup>a</sup>, Martha J. Vives Florez <sup>a</sup>

a. Centro de investigaciones microbiológicas CIMIC. Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad de los Andes, Carrera 1E N° 18<sup>a</sup> 10, Bloque J, Bogotá, Colombia.

## **Resumen**

Las infecciones bacterianas resistentes a múltiples medicamentos (MDR) se han convertido en un problema de salud pública mundial. La formación de biopelículas ha incrementado la resistencia a antibióticos hasta en 1000 veces. El uso de bacteriófagos (fagoterapia) es una opción promisoría para el tratamiento de estas infecciones. El presente estudio evaluó la efectividad de tres bacteriófagos nativos colombianos y la combinación de los tres (coctel), sobre la biopelícula de tres cepas clínicas multiresistentes de *P.aeruginosa*. Los resultados obtenidos evidenciaron que la remoción de biopelículas por los fagos individuales y por el coctel varía entre 15 y 70%, y entre 55 y 93%, respectivamente, dependiendo del fago, de la cepa de *P. aeruginosa* evaluada y del momento de adición del fago. El análisis estadístico mostró que el coctel de fagos es el mejor tratamiento para evitar la formación de biopelículas y remover biopelículas ya formadas.

Palabras claves: Bacteriófagos, Biopelículas, Fagoterapia, *Pseudomonas aeruginosa*.

## **1. Introducción**

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria capaz de formar biopelículas sobre diferentes superficies abióticas y bióticas. Una biopelícula se define como una comunidad microbiana que crece adherida a un sustrato o a una interfase; dicha comunidad se encuentra embebida en una matriz de polímeros extracelulares que

las bacterias producen [Donlan & Costerton, 2002]. Entre las superficies abióticas de interés sobre las que *P. aeruginosa* forma biopelículas se cuentan catéteres, implantes ortopédicos, lentes de contacto y válvulas cardíacas entre otros [Costerton *et al.*, 1999; Branda *et al.*, 2005]. Las superficies bióticas incluyen diferentes tejidos, por lo que las biopelículas se asocian con la persistencia del proceso infeccioso y con el deterioro del paciente, causando inflamación, daño a tejido celular, necrosis en la interfase tejido-implante, y alterando los mecanismos de defensa del hospedero. Entre las infecciones asociadas a formación de biopelícula en tejido y causadas por este patógeno oportunista se encuentran periodontitis, prostatitis e infecciones en pulmón en pacientes con fibrosis quística [Hanlon *et al.*, 2001; Branda *et al.*, 2005]. La biopelícula formada por *P. aeruginosa* está compuesta por grandes cantidades de alginato, exopolisacárido (EPS) que juega un papel muy importante en la formación de microcolonias que darán inicio a la formación de la biopelícula [Linker & Johns, 1966].

La formación de biopelículas incrementa en las bacterias la resistencia a antibióticos hasta en 1000 veces como resultado de cambios celulares y del perfil de expresión, y a la barrera impermeable de exopolisacáridos que se forma en la superficie bacteriana [Gilbert, Das, & Foley, 1997; Donlan & Costerton, 2002], dificultando el tratamiento con los medicamentos convencionales y dejando en muchas circunstancias a pacientes sin tratamiento. Las infecciones bacterianas resistentes a múltiples medicamentos (MDR) se han convertido en un problema de salud pública mundial. Dichas infecciones se encuentran entre las principales causas de mortalidad y son responsables del aumento en la morbilidad de los pacientes internados [Organización Mundial de la Salud, 2002].

Teniendo en cuenta lo anterior, ha surgido la necesidad de plantear alternativas para el control de biopelículas formadas por *P. aeruginosa* MDR. El uso de bacteriófagos (fagos) es una de ellas, se le conoce como fagoterapia y es una opción promisoriosa [Hanlon, 2007; Kutter *et al.*, 2010]. Una de las ventajas de esta alternativa terapéutica es la habilidad de los fagos de degradar el EPS de la biopelícula empleando polisacárido depolimerasas y liasas que se encuentran en

la estructura proteica del fago y son altamente específicas [Hughes *et al*, 1998a; Sutherland *et al*, 2004].

El presente estudio evaluó la efectividad de tres bacteriófagos nativos colombianos previamente aislados y la combinación de los tres, sobre la formación de biopelículas de tres cepas clínicas multiresistentes de *P. aeruginosa* MDR, con el objetivo de obtener fagos promisorios para su uso futuro en fagoterapia contra infecciones causadas por *P. aeruginosa*. Se evaluó la eficiencia de los fagos y del coctel ya sea como tratamiento profiláctico o terapéutico para biopelículas, empleando diferentes tiempos de inoculación de los fagos.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Microorganismos

Se emplearon tres fagos (F1, F2 y F3), estos fueron aislados en estudios previos a partir de muestras ricas en materia orgánica [Gomez, 2008]. Los fagos se mantienen a 4°C y a -80°C en buffer SM (mM): NaCl (100), MgSO<sub>4</sub> (8), Tris-HCl pH 7.5 (50), y 0,05% w/v de gelatina [Carlson, 2005].

Para hacer una diferenciación inicial de los fagos se evaluó el rango de hospedero de cada uno de ellos, para esto se emplearon siete cepas clínicas (M1C1, M4C1, M5C1, M8C1, P.1.1, P3 y P4) y 2 cepas ambientales (M6A1, M19A1) de *P. aeruginosa*. Además, se probaron como posibles células hospederas una cepa de *Escherichia coli* y una de *Salmonella enteritidis* (Tabla 1). Cada uno de estos aislamientos bacterianos se identificó por medio de secuenciación de la subunidad pequeña del ribosoma SSU rDNA.

En los ensayos de biopelícula se utilizaron las cepas de *P. aeruginosa* MDR P1, P3 y P4, en la Tabla 2 se presenta en detalle sus antibiogramas. Se verificó que estos aislamientos bacterianos corresponden a una población policlonal por medio de electroforesis en campo pulsado (PFGE) (datos no mostrados).

## 2.2. Propagación y purificación de los fagos.

Los fagos se llevaron a una concentración de  $10^{12}$  UFP  $\text{ml}^{-1}$ , realizando lisados seriados en medio Luria Broth (LB) empleando un volumen de 100ml. Se tomó 500  $\mu\text{l}$  de un cultivo crecido de la bacteria en fase exponencial, se inoculó con el fago con una multiplicidad de infección (MOI) de 1 y se llevó a incubar por 17h, posteriormente se centrifugó el cultivo a 5000g por 15 min y se filtró el sobrenadante con filtros de nitrocelulosa de 0,2  $\mu\text{m}$  [Carlson, 2005].

## 2.3. Extracción de ADN.

Se tomó 50 ml del filtrado de un lisado con  $10^{12}$  UFP  $\text{ml}^{-1}$  y se llevó a ultracentrifugar a 28000 rpm por 1h, luego se descartó el sobrenadante y se resuspendió *overnight* el pellet en 500  $\mu\text{l}$  de buffer TE pH 8.0 (mM): Tris-HCl (10), EDTA (1). El material genético del fago fue extraído dos veces con un volumen igual de fenol saturado (pH 8.0), se separó la fase orgánica por centrifugación a 5000 rpm por 15min, luego la fase orgánica superior fue re-extraída dos veces con un volumen igual de cloroformo: isoamilalcohol (24:1). El DNA fue precipitado *overnight* a  $-20^{\circ}\text{C}$  luego de la adición de 2 volúmenes de etanol frío al 95%, finalmente se centrifugó a 10000 rpm por 15 min y el pellet de DNA se resuspendió en 50 $\mu\text{l}$  de agua milli-Q [Malek *et al.*, 2005].

## 2.5 Determinación del tamaño del genoma del fago.

1  $\mu\text{g}$   $\mu\text{l}^{-1}$  de DNA del fago fue digerido con la enzima de restricción PstI (Fermentas) en 20  $\mu\text{l}$  de mezcla de reacción por 4 horas. Los fragmentos generados se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% en TE 10X, el gel se tiñó con Bromuro de etidio (0,5  $\mu\text{g}$   $\text{ml}^{-1}$ ). El tamaño del genoma dado en Kilobases (Kb) se calculó sumando la longitud de los fragmentos generados en la restricción. El tamaño de los fragmentos se calculó con base en la curva de regresión elaborada con los valores de migración y tamaño conocido de los

fragmentos resultantes de la restricción de lambda ( $\lambda$ ) con PstI y el marcador de peso molecular de 10Kb.

#### 2.4. Rango de hospedero

Se determinó el rango de hospedero de cada uno de los fagos por el método de *spot* [Clokier & Kropinski, 2009] empleando cultivos exponenciales de los aislamientos bacterianos. Luego de incubar a 37°C por 24h, se examinó la presencia de zonas claras alrededor de donde se adicionó la suspensión de fago. Teniendo en cuenta el tamaño de halo formado se clasificó la lisis en: Lisis mayor para halos mayores de 0.5 cm, lisis menor para halos menores de 0,5 cm y ausencia de lisis.

#### 2.5. Citometría de Flujo.

Se empleó la metodología propuesta por Brussaard *et al* [2000] para enumeración de partículas virales con el fin de diferenciar los fagos empleados. En resumen, los lisados concentrados y purificados se diluyeron hasta  $10^{11}$  UFP ml<sup>-1</sup> en buffer TE. Esta dilución se tiñó con 1X de SYBR Green (concentración final), por 10 min a 80°C en oscuridad.

Las muestras fueron examinadas empleando el citómetro de flujo FACSCanto II Marca Becton Dickinson del laboratorio de Ciencias Básicas Médicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de los Andes. El equipo cuenta con laser azul y rojo, y las muestras fueron leídas con el laser azul en FL-1, se contaron como mínimo 1000 eventos por cada muestra. Los resultados obtenidos se muestran en un histograma de conteo celular versus fluorescencia.

#### 2.6. Ensayos de biopelícula.

Los ensayos de biopelículas se realizaron independientemente para cada fago contra cada una de las bacterias y además se evaluó la mezcla (coctel) de los tres fagos contra cada bacteria. Para realizar estos ensayos se inoculó 300µl de un cultivo *Overnight* (ON) de la bacteria en erlenmeyers de 125ml con 30 ml de medio mínimo salino (MMS) (g l<sup>-1</sup>): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3,5), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1), Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,2),

Glucosa (5). Se llevó a incubar a 37°C, 200 rpm hasta alcanzar fase logarítmica ( $10^6$ UFC/ml) la cual se verificaba por DO a 600nm.

La cantidad de biopelícula formada en los diferentes tratamientos se evaluó por el método de micro-titulación en placas de ELISA [Burton *et al*, 2006; Knezevic & Petrovic, 2008]. Se evaluaron los siguientes tratamientos: adición de cada uno de los fagos independientemente y del coctel (empleando un MOI de 0,001) a las 0, 24 y 48h posteriores a la inoculación de la bacteria, para cada una de las tres cepas de *P. aeruginosa* seleccionadas. La cuantificación de biopelículas se realizó 24 y 48 h después de la inoculación del fago. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado, se calculó la desviación estándar y los datos fueron graficados. Se calculó el porcentaje de biopelícula remanente con respecto a un tratamiento control de bacteria sin fago.

## 2.7. Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con una significancia de 0.05 para comparar las lecturas realizadas a las 0, 24 y 48 h de incubación. También se calculó una ANOVA seguida de una prueba de Tukey para evaluar diferencias entre los fagos individuales y el coctel en cada uno de los tratamientos (p 0.05). Para todos los análisis se empleó el software Statistix 8.

## 3. Resultados

### 3.2. Caracterización de bacteriófagos

Se emplearon cuatro criterios para la caracterización y diferenciación de los bacteriófagos estudiados: morfología de placa, rango de hospedero, tamaño de genoma por restricción enzimática y diferenciación por citometría de flujo.

Inicialmente los fagos se diferenciaron por su morfología de placa observada contra la cepa P4 de *P. aeruginosa*, la cual difiere bastante entre cada uno de los

fagos. F1 tiene una placa clara de un tamaño de 1,5 mm, F2 muestra una placa turbia de 1mm y F3 muestra una placa clara con halo de 2,5mm.

La tabla 1 muestra la capacidad de infección de los tres fagos contra aislamientos clínicos y ambientales de diferentes bacterias. Los resultados muestran que los fagos fueron capaces de infectar de seis a siete de las nueve cepas probadas de *P.aeruginosa*, lo que corresponde del 66% al 77% de las cepas ensayadas. Se probaron tres cepas adicionales pertenecientes a otros dos géneros y una especie diferente de *P. aeruginosa* y no se observó formación de placas de lisis, por lo que al parecer los fagos podrían ser específicos para *P. aeruginosa*.

Por otro lado, a partir del DNA extraído de los tres fagos, se realizó la digestión de este con la endonucleasa PstI. El perfil de restricción de los fagos se muestra en la Fig. 1, este resultado permitió confirmar la naturaleza del ácido nucleico que contenían los fagos: DNA de doble cadena (dsDNA), además, empleando como marcador de peso molecular el DNA del fago lambda digerido con PstI (Fig. 1A. B y C) fue posible estimar el tamaño del genoma de los fagos el cual corresponde a 35Kb, 12Kb y 15Kb aproximadamente, para F1, F2 y F3 respectivamente.

Además, se intento diferenciar las tres poblaciones de fago, por medio de citometría de flujo, la Fig. 2 muestra la diferencia en intensidad de fluorescencia para los tres fagos. El histograma obtenido es consistente con los tamaños calculados por medio de restricción enzimática, ya que se observa una mayor fluorescencia de F1, la cual es diferente a la obtenida por F2 y F3 entre los cuales no se observa mucha discriminación, debido a que sus pesos son similares.

### 3.3. Evaluación de remoción de biopelícula

Previamente a la evaluación de los fagos en biopelículas, se comprobó la actividad lítica de los fagos contra las bacterias P1, P3 y P4 por medio del método de placa en *spot*, y se verifico la efectividad de los fagos en células plantónicas, para esto se realizaron curvas de infección para cada una de las cepas con cada uno de los tres bacteriófagos (Datos no mostrados).

Se obtuvieron datos de formación de biopelícula a las 24, 48 y 72h en términos de absorbancia ( $A_{560nm}$ ) para las tres cepas empleadas (Fig. 3), mostrando que *P. aeruginosa* P4 forma mayor cantidad de biopelícula, la cual tiende a aumentar a lo largo del tiempo (Fig. 3) en comparación con *P. aeruginosa* P1 y P3 quienes forman una biopelícula menor y al parecer no es estable con respecto al tiempo, ya que se observa una disminución de biopelícula a las 72 horas para ambas cepas (Fig. 3).

Por otro lado, se obtuvieron datos de cantidad de biopelícula remanente luego de los diferentes tratamientos: adición de cada uno de los fagos independientemente y del coctel a las 0, 24 y 48 h posteriores a la inoculación de la bacteria, para cada una de las tres cepas de *P. aeruginosa*. No hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las lecturas realizadas a las 24 h y a las 48 h después de la inoculación del fago, por lo tanto solo se muestran los datos a las 24 h de incubación (Fig.4).

Luego del análisis estadístico de los datos se observó que en algunos tratamientos no había efecto del fago sobre la biopelícula, datos que se muestran como una barra en blanco, estos datos no fueron tomados en cuenta para el resto del análisis. Es importante resaltar que el coctel siempre tuvo efecto significativo sobre la biopelícula de los diferentes tratamientos (Fig. 4).

En general a partir de los resultados obtenidos se puede inferir que se obtuvieron buenos porcentajes de remoción de biopelícula por los fagos individuales y por el coctel que varían entre 15 y 70%, y entre 55 y 90% respectivamente, sin embargo, no se evidenció un patrón de efectividad en remoción de biopelícula, ya que no hay un fago que se comporte mejor en general, ni una cepa que sea más fácil de remover su biopelícula, ni un fago que se comporte siempre mejor evitando la formación de biopelícula o removiéndola cuando ya está formada. Esto demuestra que existe una alta especificidad en los fagos seleccionados y en los procesos de degradación de biopelícula e indica la necesidad de emplear cocteles para obtener un tratamiento efectivo (Fig.4).



Los resultados muestran que en algunos casos el fago se comporta mejor cuando ya se encuentra formada la biopelícula; es el caso de F1 contra *P. aeruginosa* P1 y F2 contra *P. aeruginosa* P4 (Fig 4). Pero en la mayoría de los tratamientos el fago es más efectivo evitando la formación de la biopelícula (dato a las 0h), que removiéndola (dato a las 24 y 48h). El análisis estadístico de Tukey demostró que el coctel de fagos se comporta ya sea como el mejor tratamiento ó como el mejor de los fagos como se muestra cuando se emplea contra *P. aeruginosa* P1 a las 48 h y contra P4 a las 0 h y las 24 h (Fig 4). Se determinó igualmente un efecto aditivo de los fagos individuales en el coctel, probando que la adición del efecto de los fagos (con efecto significativo) es igual al efecto del coctel, esto se evidencio para los tratamientos contra *P. aeruginosa* P4 y P1 al agregar el coctel a las 24 y 48 horas respectivamente, datos mostrados con asterisco (\*) en la Fig. 4.

#### 4. Discusión

El presente estudio presenta tres fagos nativos Colombianos con la capacidad de infectar un amplio rango de cepas de *P. aeruginosa*, perfil de infección solo observado en Knezevic *et al* [2009] con los fagos 001 y  $\delta$  de *P. aeruginosa*, ya que los reportes anteriores presentan fagos con una alta especificad entre cepas de este género [Ceyssens *et al*, 2006]. Los fagos tuvieron la capacidad de lisar aislamientos clínicos y ambientales, sugiriendo que los fagos no diferencian entres estos dos tipos de aislamientos.

Con respecto al tamaño de los genomas encontrados de los fagos, es un resultado novedoso, ya que la literatura reporta genomas de fagos de *P. aeruginosa* desde 39 Kb (fago F10) hasta 280 Kb (fago phiKZ) [Kwan *et al*, 2006], y en el presente estudio se obtuvieron fagos líticos con genomas desde 12 Kb hasta 35 Kb. Sin embargo, estos resultados deben ser confirmados por electroforesis en campo pulsado PFGE, teniendo en cuenta que el método empleado tiene limitaciones, ya que puede haber bandas que no se diferencien o que no se logren observar en el gel de electroforesis.

Los resultados anteriores demuestran una vez más la gran diversidad y el potencial de los recursos naturales en Colombia, país considerado como la cuarta nación en biodiversidad mundial [Instituto Humboldt Colombia, 2009]. Además, permite evidenciar el potencial de posteriores estudios en bioprospección de bacteriófagos para el empleo de estos en el control de infecciones bacterianas.

Los fagos empleados mostraron actividad lítica en células plantónicas y demostraron igualmente tener la capacidad de inhibir y remover película formada de *P. aeruginosa* MDR. En la actualidad es poco el conocimiento sobre el comportamiento de los bacteriófagos dentro de la biopelícula, sin embargo, está bien documentada la presencia de depolimerasas en la placa basal del fago, las cuales degradan la matriz polimérica de la biopelícula. La acción de estas enzimas sobre determinado polímero es establecida principalmente por el reconocimiento de receptores específicos que al interactuar, permiten su función [Bayer *et al*, 1979; Hughes *et al*, 1998b; Hanlon *et al*, 2001].

En el presente estudio, los resultados obtenidos sobre biopelículas en los tratamientos con fagos individuales no mostraron un patrón característico. Se observó que determinado fago puede ser mejor con una bacteria específica inhibiendo su biopelícula y no degradándola, mientras ese mismo fago con otra bacteria puede llevar a cabo un proceso completamente diferente, este resultado puede ser debido a la alta especificidad de los receptores de las depolimerasas y los receptores de infección [Hughes *et al*, 1998a].

Entre los comportamientos de los bacteriófagos en los tratamientos, se observó que en algunos casos el fago logra inhibir la formación de la biopelícula, sin embargo cuando ya se encuentra formada no tiene mucho efecto en la degradación de ésta. Este tipo de comportamiento también ha sido reportado en estudios de bacteriófagos con biopelículas de *P. aeruginosa* [Knezevic & Petrovic, 2008] y podrían ser fagos que se formulen en un futuro como tratamiento profiláctico.

El resultado anterior, observado cuando se trata *P. aeruginosa* P4 con F1, sugiere que la maquinaria lítica del fago es empleada para evitar la colonización

de las bacterias a la superficie, la formación de microcolonias y de esta forma se impide la formación de la biopelícula [Costerton *et al*, 1999]; pero cuando ya se ha formado la matriz polimérica, se le dificulta al fago llegar a su receptor de infección, lo cual puede ser porque no posee las enzimas necesarias para degradar el polímero ó que la enzima no encuentre su respectivo receptor para llevar a cabo su función.

En otros resultados se observó que el efecto del fago es mayor cuando hay biopelícula formada, como es el caso de F2 contra *P. aeruginosa* P4, resultado que es importante ya que en clínica, en la mayoría de los casos se requiere un tratamiento terapéutico de biopelícula formada. Este resultado ya había sido reportado por Webb *et al* [2004] donde un profago de *P. aeruginosa* tiene una activación 83.5 veces mayor durante la formación de la biopelícula comparada con el efecto en células plantónicas, igualmente se plantea en Sutherland *et al* [2004] que las células inmovilizadas pueden ser un factor que beneficie a la infección del fago y al encuentro con su respectivo receptor.

En la literatura se han evaluado cocteles de bacteriófagos para controlar el crecimiento plantónico de diferentes cepas multiresistentes [O'Flynn *et al*, 2004; Tanji *et al*, 2005], mostrando que la actividad del coctel potencia el efecto negativo del fago sobre la población bacteriana, comparado con los tratamientos con fagos individuales. En biopelículas se han evaluado fagos individuales para el control de estas estructuras formadas por diferentes bacterias [Weeb *et al*, 2004; Curtin & Donlan, 2006; Sillankorva, 2008; Carson *et al*, 2010] sin embargo existe un solo reporte [Fu *et al*, 2010] que evalúa el efecto de una mezcla de bacteriófagos. Los resultados obtenidos a partir del presente estudio evidenciaron que al igual que en células plantónicas el efecto del coctel es mayor comparado con los tratamientos individuales (Fig. 4).

Si tenemos en cuenta que en la biopelícula ocurren diferentes fases de infección al mismo tiempo, generadas tanto por el reconocimiento del receptor de la depolimerasa en la matriz polimérica y el reconocimiento del fago del receptor primario en la superficie bacteriana; por lo tanto el resultado obtenido sugiere que

la actividad de un fago puede estar dejando receptores libres para ser reconocidos por los otros fagos ó generando nuevos canales de acceso, explicando porque son mejores cuando se agregan mezclados, comparado cuando se agregan individualmente, de la misma forma como es propuesto por Donlan [2009].

Con los resultados obtenidos no se pudo concluir si alguno de los tratamientos (fago individual ó coctel) se comporta mejor de forma terapéutica o profiláctica, ya que se observa que esto depende de la cepa. Sin embargo, el coctel se comportó en la mayoría de los casos, como el mejor tratamiento, mostrando buenos porcentajes de remoción tanto antes de formarse la biopelícula como después (Fig. 4), por lo tanto se puede sugerir que esta es una alternativa útil tanto como tratamiento terapéutico o profiláctico de biopelículas de *P. aeruginosa* MDR.

Finalmente, se puede concluir que a partir de este estudio se logró obtener un coctel de fagos eficiente inhibiendo y removiendo biopelículas formadas por *P. aeruginosa* MDR, el cual logró inhibir la formación de la biopelícula hasta en un 87% y remover biopelícula formada hasta un 93%, valores que son similares y mejores que las reportadas en la literatura para fagos individuales y mezclas de fagos: Fu *et al* [2010] empleando un coctel de cinco fagos de *P. aeruginosa* lograron reducir en un 99.9% un biofilm de 48 horas formado en un catéter en un sistema *invitro*, empleando un inóculo de  $10^8$  UFC/ml y una concentración de fagos de  $10^9$  UFP/ml. Por otro lado, Knezevic y Petrovic (2008) lograron inhibir un 85% y remover un 40% de biopelícula formada por una población de *P. aeruginosa* PA-4u de  $10^6$  UFC/ml empleando el fago  $\pi$ -4 con una concentración de  $10^7$  UFP/ml y Lu *et al* (2007) alcanzaron un reducción del 99% de biopelícula formada por *E.coli* utilizando  $10^5$  UFP /ml del fago T7 modificado.

Frente a lo anterior, es importante resaltar que la concentración empleada de los fagos en el presente estudio es baja ( $10^3$ UFP/ml) comparada con otros reportes [Fu *et al*, 2010; Knezevic & Petrovic, 2008; Lu *et al*, 2007], lo cual demuestra el gran potencial de estos fagos y sugiere que la futura formulación de estos no

requiere de dosis muy altas, además que si se evalúan concentraciones mayores de los fagos se podría lograr un efecto aún mayor.

A pesar que en las últimas décadas el empleo de bacteriófagos como alternativa a la antibioticoterapia solo se había limitado a la antigua Unión Soviética, en los últimos años el incremento de resistencias bacterianas en los hospitales, ha hecho que se incremente el interés en esta línea de investigación en Occidente [Hanlon, 2007]. Sin embargo, en América la investigación con bacteriófagos es muy escasa. El presente estudio se convierte en un primer acercamiento al comportamiento de los fagos cuando se enfrentan a una población bacteriana multiresistente en Colombia.

Los resultados evidenciaron el gran potencial de tres bacteriófagos nativos Colombianos para ser empleados en fagoterapia, en el control de infecciones de *P. aeruginosa* MDR causadas por células plantónicas y por biopelículas. Sin embargo el empleo de estos en fagoterapia requiere de mayores estudios, principalmente en la caracterización de los bacteriófagos, con el fin de garantizar la seguridad de su futura formulación.

### **Agradecimientos**

Este trabajo no se hubiera podido llevar a cabo sin la colaboración de muchos centros de investigación y personas a quienes quiero agradecerles: Al Centro Internacional de Investigaciones Médicas (CIDEIM) en especial al grupo de Resistencia Bacteriana por permitirnos realizar en sus laboratorios el PFGE de nuestras cepas, A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia FIDIC en especial al Dr Manuel Alfonso Patarroyo y a Javier Álvarez por permitirnos usar su ultracentrífuga, Al Dr Jhon Mario Gonzáles y a Natalia Bolaños por analizar nuestra muestras en el citómetro de flujo del laboratorio de Ciencias Básicas Médicas de la Facultad de Medicina de la universidad de los Andes y al estudiante de pregrado Martín Ramírez por su asesoría en este procedimiento. A Adolfo Amezcua por su apoyo en la estadística de los datos. A Andrés Gonzáles del grupo de de diseño de productos y procesos de la Universidad de los Andes por facilitarnos en muchas ocasiones material y reactivos necesarios para la

investigación y por su acompañamiento. Aunque no se hayan podido obtener microscopias quiero agradecer a Dery Corredor del Laboratorio de Microscopia de Barrido de la Universidad de Los Andes por el montaje de nuestras muestras y a Adriana Antolinez del Laboratorio de Microscopia de transmisión de la Universidad Nacional por el tiempo de observación. Por último quiero dar mis más fuertes agradecimientos a la profesora Martha Vives por su dirección, acompañamiento y consejos durante todo el estudio igualmente a la practicante de la Universidad Industrial de Santander Marcela Mantilla y a los estudiantes de pregrado Camilo Barbosa, Jonathan Byfield por toda su colaboración en esta investigación

## 5. Referencias.

- Bayer, M.F., Thurow, H. & Bayer, M.H. (1979). Penetration of the polysaccharide capsule of *Escherichia coli* (Bil 62/42) by bacteriophage K29. *Virology* 94:95-118.
- Branda, S. S., Vik, A., Friedman, L., & Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*,13: 20-26.
- Brussaard, C., Marie, D . & Bratbak, G. (2000). Flow cytometric detection of viruses. *Journal of Virological Methods* 85: 175-182.
- Burton, E., Yakandawala, N. & LoVetri, K. (2006). A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology*. 34:1-4.
- Carlson K. en Kutter E & Sulakvelidze A. (2005). *Bacteriophages Biology and Applications*. CRC Press. Boca Raton FLA. 437-465.
- Carson, L., Gorman, S.P., & Gilmore, B.F. (2010). The use of lytic bacteriophages in the prevention and eradication of biofilms of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 4: 1–9.
- Ceyssens P, Lavigne R. & Matteus W. (2006). Genomic Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* phages LDK16 and LKA1 establishment of the AKMV subgroup within the T7 supergroup. *Journal of Bacteriology* .188:692–693.

Clokie, M & Kropinski, A.M.(2009). Bacteriophages: methods and protocols. Humana Press, London.

Costerton, J., Stewart, P. S., & Greenberg, E. (1999). Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284: 1318-1322.

Curtin, J.J. & Donlan, R.M. (2006). Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated Biofilms by *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 50:1268–1275.

Donlan, R. (2009). Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends in Microbiology*. 17: 66-72.

Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 5: 167-193.

Fu, W., Forster, T., Mayer, O., Curtin, J., Lehman, S. & Donlan, R. (2010). Bacteriophage Cocktail for the Prevention of Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* on Catheters in an In Vitro Model System. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 54: 397–404.

Gilbert, P., Das, J., & Foley, I. (1997). Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Advanced in Dental Research*, 11: 160-167.

Gómez, M.C., Vives, M.J., Gonzáles, A. (2008). Bioprospección de bacteriófagos activos contra *Pseudomonas aeruginosa*. XIX Congreso Latinoamericano de Microbiología. Ecuador. 15-18 Octubre.

Hanlon, G. W. (2007). Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* , 30: 118-128.

Hanlon, G. W., Denyer, S. P., Olliff, C. J., & Ibrahim, L. J. (2001). Reduction in exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and environmental microbiology* , 67: 2746-2753.

Hughes<sup>a</sup>, K.A., Sutherland, & Jones, M. V. (1998). Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Journal of Microbiology*, 144: 3039-3047.

Hughes<sup>b</sup>, K. A., Sutherland, J., Clark, J., & Jones, M. V. (1998). Bacteriophage and associated polysaccharide depolymerases – novel tools for study of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 583-590.

Instituto Humboldt Colombia. (2009). Informe sobre el Estado de los Recursos Naturales Renovables y del Ambiente Componente de Biodiversidad Continental. Tomado el 1 de Julio de 2010 de: <http://www.humboldt.org.co/>.

Knezevic, P & Petrovic, O. (2008). A colorimetric microtiter plate method for assessment of phage effect on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Journal of Microbial methods*. 24: 114-118.

Knezevic, P., Kostanjsek, R, & Obreht, D. (2009). Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* specific phages with broad activity spectra. *Current microbiology*. 59: 173-180.

Kutter, E., De Vos, D., Gvasalia, G., Alavidze, Z., Kuhl, S., Abedon, S. & Gogokhia, L. (2010). Phage Therapy in Clinical Practice: Treatment of Human Infections. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 11: 69-86

Kwan, T., Liu, J., DuBow, M., Gros, P. & Pelletier, J. (2006). Comparative Genomic Analysis of 18 *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophages. *Journal of bacteriology*. 188 :1184–1187.

Linker, A., & Johns, R. S. (1966). A new polysaccharide resembling alginic acid isolated from *Pseudomonas*. *Journal of Biological Chemistry*, 241: 3845-3851.

Lu, T.K. & Collins, J.. (2007). Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104: 11197–11202.



Malek, W., Sajnaga, E., Wdowiak, S., Studzinska, B., Swiescka, I., Nosalewicz, I., Slomba, M., Tatar, A & Gawron, A. (2005). Characterization of phages virulent for *Sarothamnus scoparius* Bradyrhizobia. *Current Microbiology*. 51: 244-249.

O'Flynn, G., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F & Coffey, A. (2004). Evaluation of a cocktail of Three Bacteriophages for Biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and environmental microbiology*. 70: 3417–3424.

Organización mundial de la salud. (2002). Informe sobre la salud en el mundo 2002 carpeta de prensa. Tomado el 21 de Julio de 2010 de <http://www.who.int/whr/2002/es/>.

Sillankorva, S., Neubauer, P. & Azeredo, J. (2008). *Pseudomonas fluorescens* biofilms subjected to phage philBB-PF7A. *BMC Biotechnology*. 8:79-80.

Sutherland, I. W., Hughes, K. A., Skillman, L. C., & Tait, K. (2004). The interaction of phage and biofilms. *Fems Microbiology Letters*, 232: 1-6.

Tanji, Y., Shimada, T., Fukudomi, H. & Kazuhiko, M. (2005). Therapeutic use of phage cocktail for controlling *Escherichia coli* O157: H7 in gastrointestinal tract of mice. *Journal of bioscience and bioengineering*. 100: 280-287.

Webb, J., Lau, M. & Kjelleberg, S. (2004). Bacteriophage and phenotypic variation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Journal of bacteriology*, 186: 8066–8073.

**Tabla 1.** Rango de hospedero de los fagos F1, F2 y F3

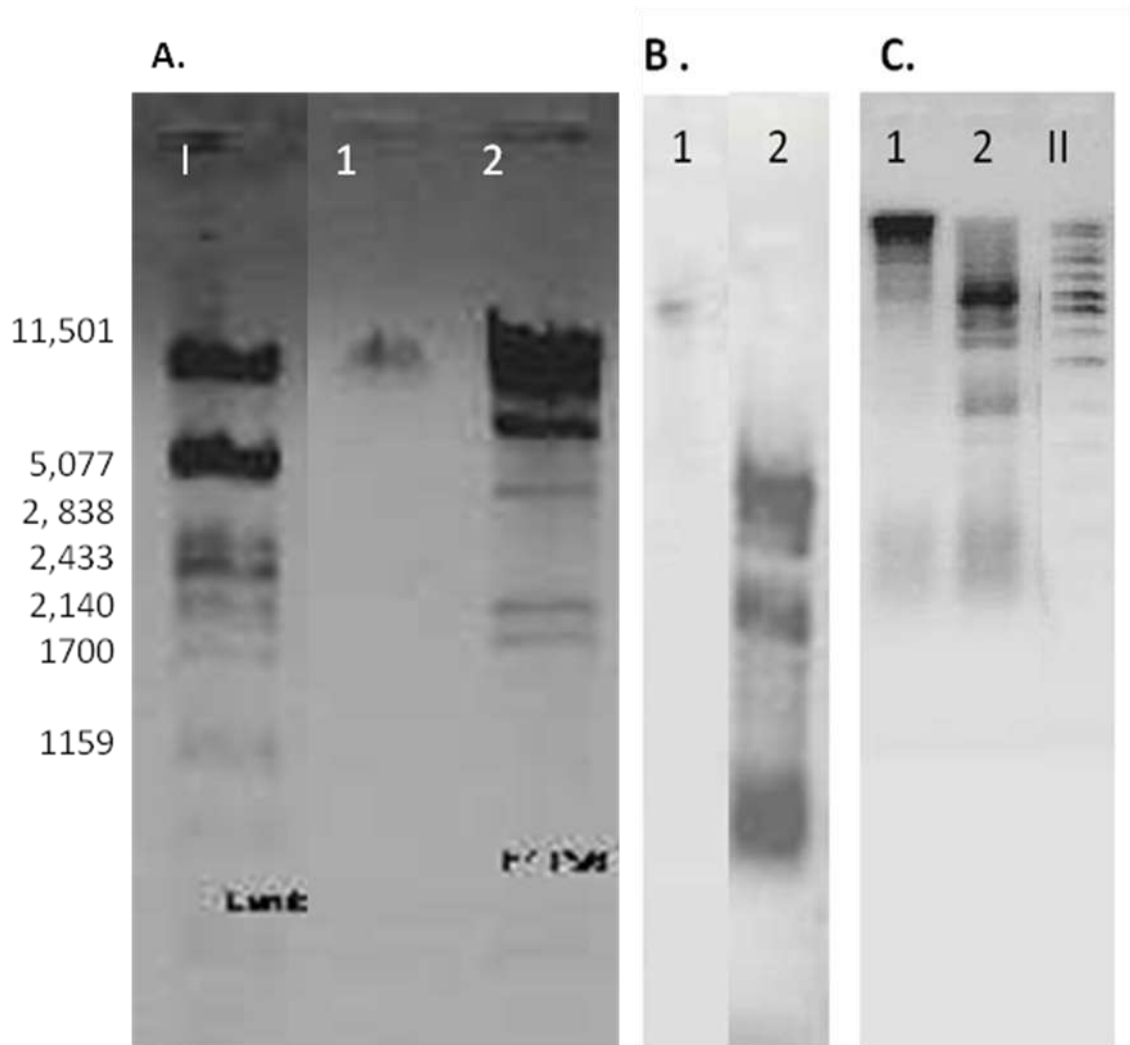
Bacteria	cepa	Origen	Muestra	Fago		
				F1	F2	F3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	M1C1	Clínica del Prado. Santa Marta	Infección post-operatoria	-	+	+
	M4C1	Clínica Palermo Bogotá	Orina	+	+	-
	M5C1	Clínica Palermo Bogotá	Orina	+	+	++
	M8C1	Hospital Federico Lleras de Ibague	Hemocultivo	+	++	+
	P.1.1	Hospital Federico Lleras de Ibague	Aspirado traqueal	++	-	-
	P3	Hospital Federico Lleras de Ibague	Orina	++	++	++
	P4	Hospital Federico Lleras de Ibague	Orina	++	++	++
	M6A1	Villeta (Cundinamarca)	Tierra	-	+	+
	M19A1	Caño Garzas (Casanare)	Lodos aceitosos	+	+	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	M37A1	Samacá (Boyaca)	Tierra de Semillero	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>				-	-	-
<i>Salmonella enteritides</i>				-	-	-

++ Lisis Mayor: Diámetro de halo de lisis de 1 a 2cm + Lisis menor: Diámetro de halo de lisis menor de 1cm - Ausencia de Lisis.

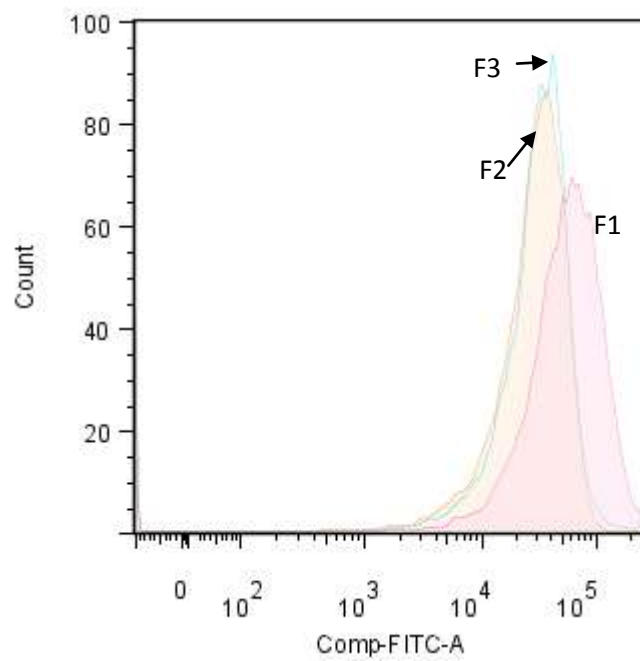
**Tabla 2.** Antibiograma de cepas clínicas de *P. aeruginosa* MDR empleadas en ensayos de biopelículas.

Cepa	Antibiograma
<i>P.aeruginosa</i> P.1.1	Amp <sup>r</sup> , Amp/sulf <sup>r</sup> , Ceft <sup>r</sup> , Ceftz <sup>i</sup> Cipr <sup>r</sup> , Gen <sup>r</sup> , Imi <sup>r</sup> , Nit <sup>r</sup> , Mer <sup>r</sup> .
<i>P.aeruginosa</i> P3	Amp <sup>r</sup> , Amp/sulf <sup>r</sup> , Azt <sup>r</sup> , Cef <sup>r</sup> , Cef <sup>r</sup> , Ceftz <sup>i</sup> , Ceph <sup>r</sup> , Cipr <sup>r</sup> , Gen <sup>r</sup> , Imi <sup>r</sup> , Nit <sup>r</sup> , Mer <sup>r</sup> , Pip <sup>r</sup> , Ami <sup>r</sup> .
<i>P.aeruginosa</i> P4	Amp <sup>r</sup> , Amp/sulf <sup>r</sup> , Cef <sup>i</sup> , Cef <sup>r</sup> , Ceftz <sup>i</sup> , Ceph <sup>r</sup> , Cipr <sup>r</sup> , Gen <sup>r</sup> , Imi <sup>r</sup> , Nit <sup>r</sup> , Mer <sup>r</sup> , Pip <sup>r</sup> , Ami <sup>i</sup> .

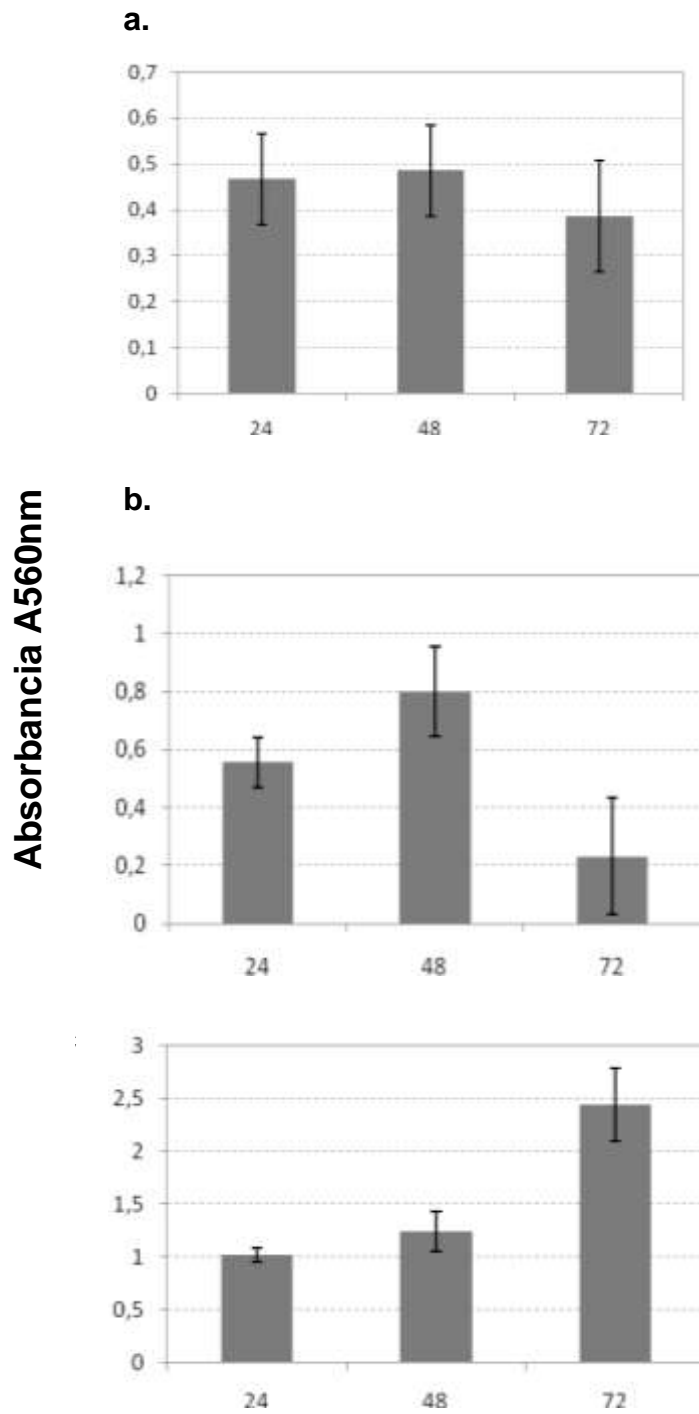
<sup>r</sup>:Resistente, <sup>i</sup>: Intermedio. Amp: Ampicilina, Amp/Sul: Ampicilina/Sulbactan, Azt: Aztreonam, Cef: Cefepime, Ceft: Cefotaxime, Ceftz: Ceftazidime, Ceph: Cephalothin, Cipr: Ciprofloxacina, Gen: Gentamicina, Imi: Imipenem, Nit: Nitrofurantoin, Mer: Meropenem, Pip: Piperacillin, Ami: Amikacin.



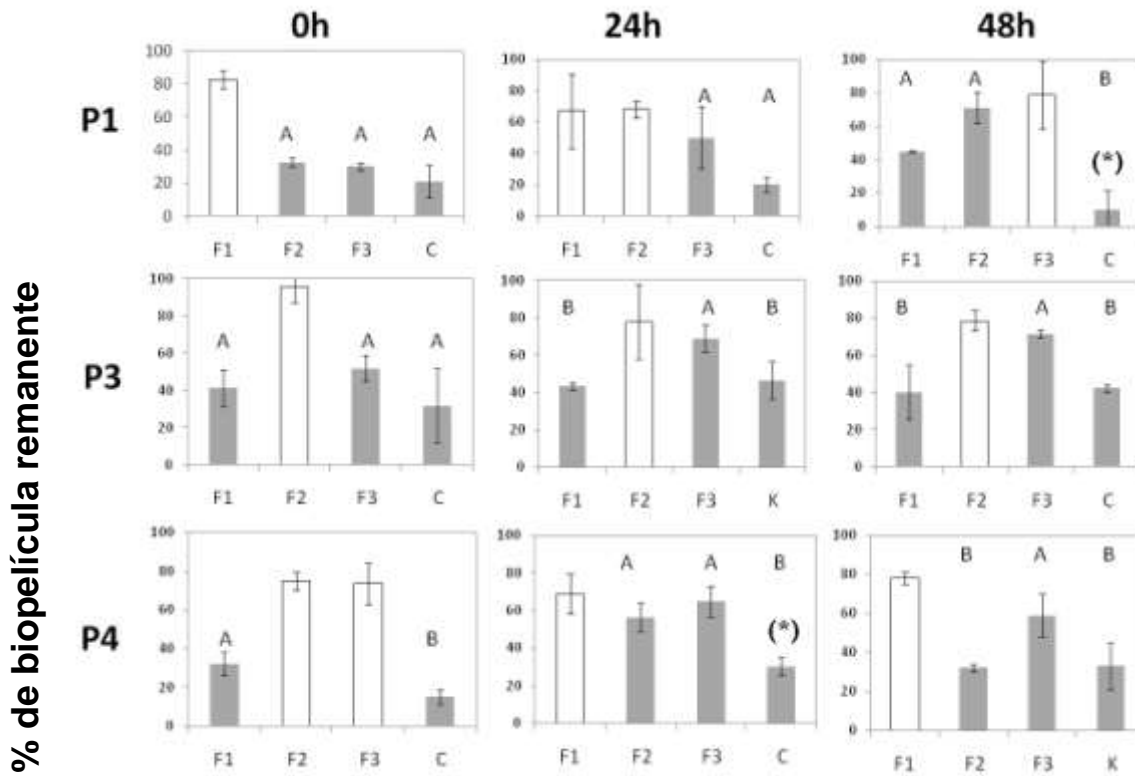
**Fig. 1.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del DNA completo (1) y digerido con la endonucleasa PstI (2) de los fagos **A)** F1, **B)** F2 y **C)** F3. **I)**  $\lambda$  digerido con PstI, **II)** Marcador de peso molecular 10Kb.



**Fig. 2.** Histogramas de fluorescencia del ácido nucleico de los fagos F1, F2 y F3, luego de ser teñidos con SYBR Green I 1X. Los histogramas contienen 10000 eventos.



**Fig.3.** Cantidad de biopelícula formada por *P. aeruginosa* a) P1, b) P3 y c) P4 a las 24, 48 y 72h



**Fig. 4.** Efecto de los fagos F1, F2, F3 y el coctel de fagos (C) sobre la biopelícula de las cepas P1, P3 y P4 de *P.aeruginosa*. Los tratamientos ensayados fueron: adición de cada uno de los fagos independientemente y del coctel a las 0, 24 y 48h posteriores a la inoculación de la bacteria, para cada una de las tres cepas de *P. aeruginosa*, lecturas realizadas a las 24h después de la inoculación del fago. (□) Tratamiento sin efecto significativo sobre la biopelícula (p 0,05). A, B y C: Grupos de asociación según prueba de tukey (p 0.05). (\*) Efecto aditivo de los fagos individuales en el coctel de fagos.