

CARACTERIZACIÓN DE UN CÓCTEL DE BACTERIOFAGOS CAPACES DE RESCATAR DE LA MUERTE A RATONES INFECTADOS CON *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Hernández Paredes María Concepción (1), Reyes Cortés Ruth (2)

1 Licenciatura Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato | maarhp_27@hotmail.com

2 Departamento de biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato | reyes.ruth@ugto.mx

Resumen

Klebsiella pneumoniae es una bacteria resistente a una gran variedad de antibióticos. La multi resistencia es un problema severo, por el cual mueren miles de personas al año. Una alternativa de tratamiento es la utilización de los bacteriófagos o fagos. Los fagos, son virus que infectan específicamente a las bacterias y están constituidos por DNA o RNA y proteínas. Los fagos líticos infectan y destruyen la integridad de la membrana bacteriana para liberar los viriones maduros. La utilización de fagos líticos caracterizados es considerada una opción viable en el tratamiento de infecciones ocasionadas por bacterias multi-resistentes. En este trabajo se estudiaron 4 fagos (ϕ K06-04, ϕ K08-48, ϕ K10-37 y ϕ K11-42) que infectan a *K. pneumoniae*. Para la caracterización genómica se determinó si están constituidos por DNA o RNA. Se realizó una digestión con enzimas de restricción y se analizó el patrón de fragmentos producidos por la endonucleasa *EcoRI*. Y se obtuvo el perfil de proteínas de cada fago. Los resultados sugieren que el genoma viral de los 4 fagos líticos es DNA y que los 4 fagos son diferentes entre sí, debido a que sus patrones de restricción y su perfil de proteínas presentan componentes únicos en cada fago. Los fagos caracterizados son potenciales candidatos para el control de infecciones producidas por *K. pneumoniae*.

Abstract

Klebsiella pneumoniae is a drug-resistant strain to a variety of antibiotics available. The multidrug-resistant strains is a severe problem, for which, thousands of people die each year. An alternative antibacterial therapy is the use of bacteriophages or phages. Phages are viruses able to infect bacteria and more interesting feature is its species-specific. Bacterial viruses are simple particles composed by DNA or RNA and proteins. Lytic phages disrupt the bacterial membrane (killing bacteria) and liberate new viruses produced by the bacteria. The use of lytic phages characterized are a viable option to treatment infections caused by multidrug-resistant bacteria. In this work, we analysed 4 lytic phages (ϕ K06-04, ϕ K08-48, ϕ K10-37 and ϕ K11-42) that infect *K. pneumoniae*. For genomic characterization, we determine if they were constituted of DNA or RNA. Using a restriction enzyme digestion with the endonuclease *EcoRI*, we obtain a restriction pattern that allowed us to see differences between these DNA phages. A protein profile showed other differences among them. We considered that, individually or as a cocktail, the characterized phages could function as potential treatment to control infections caused by *K. pneumoniae*.

Palabras Clave

Bacteriofago; *Klebsiella pneumoniae*; enzimas de restricción; DNA; proteínas

INTRODUCCIÓN

“*Klebsiella pneumoniae*”

Klebsiella pneumoniae es un bacilo Gram negativo, el cual está implicada principalmente en infecciones nosocomiales [1]. Esta bacteria infecta el tracto respiratorio, intestinal y urogenital. Las enfermedades causadas por *K. pneumoniae* incluyen: neumonía, infecciones del tracto urinario (ITU), artritis inflamatoria degenerativa y septicemia. *K. pneumoniae* se encuentra de forma natural en el suelo, el agua y las verduras [2] [3].

Actualmente, se estima que aproximadamente el 70 % de las bacterias que causan infecciones en hospitales son resistentes, al menos a uno de los antibióticos de primera línea [4]. En América Latina, las cepas bacterianas más multi resistentes han sido denominadas ESKAPE: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* [4].

K. pneumoniae es una bacteria catalogada como resistente a una gran variedad de antibióticos. Hasta el 60% de la población mexicana presenta resistencia a los tratamientos con antibióticos debido a la automedicación, la cual ocurre principalmente por enfermedades respiratorias e intestinales [5].

Una interesante alternativa para combatir a las bacterias patógenas resistentes a antibióticos se centra en la utilización de fagos (fago terapia).

“Bacteriófagos”

Los bacteriófagos o fagos están compuestos únicamente de un ácido nucleico y proteína. Dependiendo del fago, el ácido nucleico puede ser DNA o RNA pero no ambos y puede existir en cadena doble o sencilla. Los ácidos nucleicos de los fagos a menudo contienen bases raras o modificadas. Estas bases modificadas protegen a los ácidos nucleicos del fago de las endonucleasas que cortan los ácidos nucleicos del huésped durante la infección [6].

Las proteínas del fago conforman principalmente la cápside, cuya función es proteger al ácido nucleico de su ambiente. El número de proteínas y peso molecular es característico de cada partícula de fago [6].

Los fagos son parásitos intracelulares obligados que se multiplican al interior de las bacterias. Los fagos pueden multiplicarse a través de 2 vías: La vía lítica y la vía lisogénico [6]. Los fagos temperados se multiplican por la vía lisogénica, en estado quiescente, el material genético se inserta en el cromosoma de la bacteria multiplicándose al mismo tiempo que el cromosoma bacteriano [6]. Los fagos líticos o virulentos inyectan su material genético y se apoderan de la maquinaria replicativa de la bacteria para producir sus componentes estructurales que dan lugar a un fago completo, y producen la lisis bacteriana para su liberación. [6]

“Fagoterapia”

La utilización de fagos líticos presenta evidentes ventajas frente a la antibiótico-terapia por ejemplo:

1. Los fagos no destruyen la microbiota comensal.
2. Los fagos no presentan efectos secundarios.
3. Los fagos eficaces sobre bacterias sensibles o multi resistentes.
- 4.- La producción de fagos acarrea unos costes reducidos.
- 5.- La naturaleza constituye una fuente virtualmente inagotable de fagos. [7]

En este trabajo el objetivo es determinar la naturaleza del genoma viral de 4 fagos de *K. pneumoniae* y establecer si contamos con fagos diferentes al analizar su patrón de restricción y su perfil de proteínas para considerarlos candidatos para su utilización como una alternativa de tratamiento a los antibióticos convencionales.

MATERIALES Y METODOS

Cepa bacteriana: *Klebsiella pneumoniae* K06 proveniente de un aislado clínico de hemocultivo de un paciente del Instituto Nacional de Pediatría (Ciudad de México) colectado durante el año 1994.

Bacteriófagos: Los 4 fagos estudiados (ϕ K06-04, ϕ K08-48, ϕ K10-37 y ϕ K11-42) fueron aislados previamente de aguas residuales provenientes de la Ciudad de México, Tlaxcala e Iguala Gro.

Expansión de fagos

La expansión de fagos se realizó a partir de placas aisladas de cada uno de los fagos. Las placas aisladas se obtuvieron goteando 10 μ L del lisado (ϕ K06-04, ϕ K08-48, ϕ K10-37 y ϕ K11-42) sobre una caja con medio T Φ (Tryptona 10 gr/L, agar 11 g/L, NaCl 5 gr/L + MgSO₄ 1M 10 mL/L). Enseguida se vertió una mezcla de 500 μ L de cultivo bacteriano de toda la noche y 3 mL de T Φ suave (Tryptona 10 gr/L, agar 7 g/L, NaCl 5 gr/L + MgSO₄ 1M 10 mL/L) y se incubó toda la noche a 37°C.

Para la obtención de los cultivos de los fagos (lisados), se expandieron los virus en medio líquido. La expansión se realizó en matraces de 250 mL, se colocaron 2 placas de los fagos obtenidas de las cajas preparadas previamente y se agregó 300 μ L del cultivo bacteriano de toda la noche y se permitió la infección durante 10 minutos. Después se agregaron 10 mL de medio de cultivo LB (Tryptona 10 gr/L, levadura 5 g/L, NaCl 5 gr/L, MgSO₄ 1M 10 mL/L) y se incubó a 37°C durante 6-8 horas en agitación constante o hasta la observación de la lisis celular bacteriana. Al cultivo se le agregó 1 mL de cloroformo y se centrifugó a 8,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante o lisado que contiene a los fagos se tituló mediante diluciones seriadas para determinar las UFP/mL (Unidades Formadoras de placas mililitro).

Aislamiento de DNA de los fagos

Al lisado de fagos se le agregó un volumen igual de DEAE celulosa durante 30 min y se recuperó el sobrenadante por centrifugación a 8,000 rpm durante 15 min. Al sobrenadante se le añadió NaCl (1 M) y polietilenglicol 8,000 (PEG) al 10% y se dejó 1 hora en hielo. Después, la mezcla se centrifugó a 8,000 rpm durante 15 min y la pastilla que contenía los fagos se resuspendió en 500 μ L de medio SM (NaCl 100mM, 10 mM MgSO₄, 50 mM Tris 1 M, 0.1% gelatina), se trató con un volumen igual de cloroformo y se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos para extraer el PEG

8,000. La extracción de DNA se realizó con un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1), posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min. Se recuperó la fase acuosa y se adicionó una mezcla de cloroformo:alcohol isoamilico (24:1), y se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm durante 5 min. La fase acuosa se recuperó y se le agregó 100 μ L de NaCl 5M y 540 μ L de etanol absoluto frío para precipitar el material genético. La pastilla se lavó 2 veces con etanol al 70%, se dejó secar y se resuspendió en 50 μ L de agua inyectable.

Caracterización del genoma viral

El material genético obtenido se trató con DNasa (2 μ L buffer 10X + 10 U enzima DNasa + 10 μ L material genético de cada fago + 7.6 μ L agua inyectable) y se incubó a 37°C durante 2 horas para corroborar la naturaleza del ácido nucleico.

Para la obtención de los patrones de restricción se utilizó la enzima *EcoR*1. Se mezcló 2 μ L de buffer 10X de *EcoR*1 + 10 U de enzima *EcoR*1 + 10 μ L del material genético de fago + 7.6 μ L de agua inyectable y se incubó a 37°C durante 2 horas.

La visualización se realizó mediante el corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1% con buffer TAE (Tris HCl + Ácido acético + EDTA 5 mM) teñidos con bromuro de etidio al 0.01%. Como marcador de referencia se utilizó el marcador 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen).

Perfil de proteínas

Para observar el perfil de proteínas se utilizó 60 μ L del lisado previamente tratado con DEAE celulosa y precipitado con PEG 8000. Se realizó el corrimiento electroforético en un gel de poliácridamida SDS PAGE al 12%. El perfil de proteínas se visualizó con una tinción de plata.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Expansión de fagos

Para la expansión de fagos primeramente se obtuvieron las placas en medio sólido. En la imagen 1 se muestran las placas claras aisladas sobre el tapiz bacteriano de *K. pneumoniae* como indicativo del desarrollo lítico del fago. Con las placas aisladas se produjeron los lisados y se obtuvieron títulos de 10^8 UFP/mL.

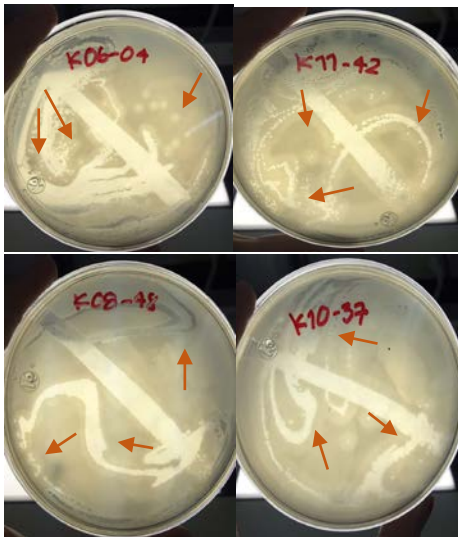


Imagen 1. Placas claras de los fagos ϕ K06-04, ϕ K11-42, ϕ K08-48, y ϕ K10-37

Análisis del material genómico viral.

Se obtuvo el genoma viral de los 4 fagos el cual se puede ver en el gel de la (Imagen 2). Debido a la intensidad de las bandas en los genomas de ϕ K10-37 y ϕ K11-42, se sugiere que se obtuvo una mayor concentración que para ϕ K06-04 y ϕ K08-48. La naturaleza del genoma viral se determinó como DNA para los 4 fagos, lo cual se demostró al observar la degradación del material genómico al ser tratado con la enzima DNAsa.

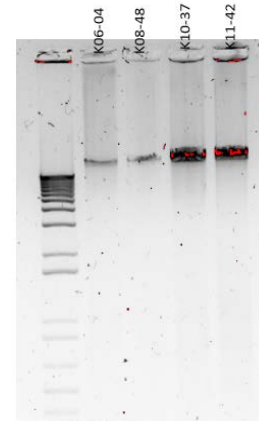


Imagen 2. Material genético de los fagos de ϕ K06-04, ϕ K08-48, ϕ K10-37 y ϕ K11-42 en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio

Al comparar el patrón de restricción producido por la enzima EcoRI, observamos que los 4 fagos presentan un patrón de bandas diferente tanto en el número como en el tamaño de las bandas (Imagen 3). La restricción del DNA del fago ϕ K08-48 produjo aproximadamente 10 bandas con un tamaño entre 3kb y 10 kb. El DNA del fago ϕ K10-37 tiene alrededor de 14 bandas con un tamaño entre 1 y 10 kb, para el fago ϕ K11-42 se logran distinguir 7 bandas entre 1 kb y 4 kb, finalmente, en el fago ϕ K06-04 se observan 6 bandas entre 1 kb y 10 kb. Estas diferencias nos sugieren que se trata de 4 fagos líticos diferentes.

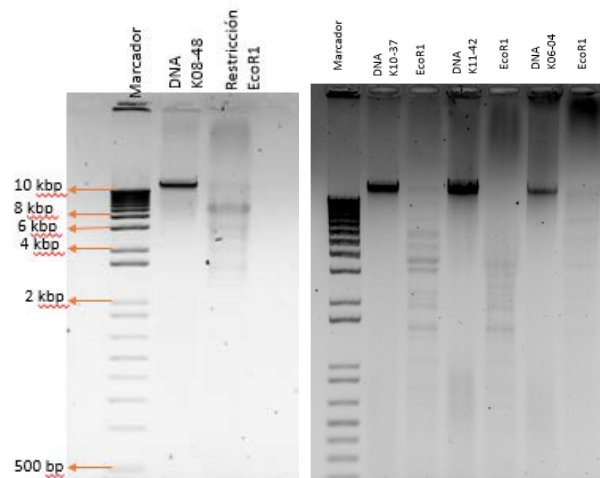


Imagen 3. Patrón de restricción del DNA de los fagos ϕ K08-48, ϕ K10-37, ϕ K11-42 y ϕ K06-04 con EcoRI, visto en gels de agarosa al 1% y visualizado con Bromuro de etidio 0.01%

Al observar el perfil de proteico de los 4 fagos notamos que también presentan diferencias tanto en el número como en el tamaño de las proteínas (Imagen 4). En el fago ϕ K08-48 se observan alrededor de 6 bandas o posibles proteínas, para el fago ϕ K06-04 y el ϕ K10-37 se distingue 8 bandas y el fago ϕ K11-42 presenta aproximadamente 9 bandas. El perfil de proteínas nos sugiere que los 4 fagos son diferentes ya que muestra bandas en distintas posiciones, tamaño e intensidad. En verde se señalan las bandas diferentes características para cada fago.

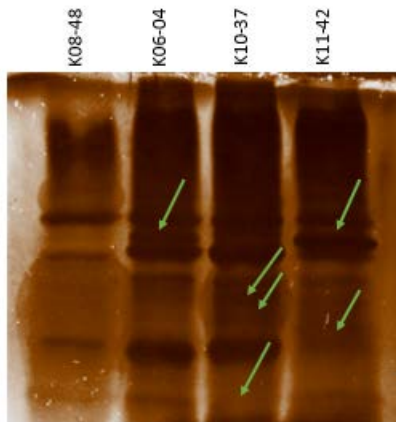


Imagen 4. Perfil de proteínas de los fagos ϕ K08-48, ϕ K06-04, ϕ K10-37 y ϕ K11-42. Gel de acrilamida al 12 % visualizada con la tinción de plata.

CONCLUSIONES

Se visualizaron placas claras de todos los fagos (ϕ K-10-37, ϕ K06-04, ϕ K11-42 y ϕ K08-48) sobre el tapiz de *K. pneumoniae*, como indicativo de que son fagos líticos y de las placas aisladas se obtuvieron lisados con títulos de 10^8 UFC/mL.

El genoma viral de los 4 fagos analizados está constituido por DNA. Sugerimos que los 4 fagos son diferentes entre sí ya que su patrón de restricción y su perfil proteico es característico para cada fago.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, gracias a la Universidad de Guanajuato y CONACYT por darnos la oportunidad para desenvolvemos en el área de la investigación, gracias a la División de Ciencias Naturales y Exactas, al Laboratorio de Inmunomicrobiología, a los docentes que laboran dentro y en especial a la Dra. Ruth Reyes Cortés, asesora de mi proyecto, por darme las herramientas para llevar a cabo cada uno de los objetivos planteados.

REFERENCIAS

- [1] Revista Opinión. 23/08/2013. "Superbacteria mata a 50 personas y crea pánico" Recuperado de (Fecha de consulta: 13/07/2016) <http://www.opinion.com.bo/opinion/articulos/2011/0823/noticias.php?id=22659>
- [2] Revista Salud y Bienestar. "Klebsiella pneumoniae". Recuperado de (Fecha de consulta: 13/07/2016) <http://lasaludi.info/klebsiella-pneumoniae.html>
- [3] Warren Levinson MD, PhD; 2008 Review of Medical Microbiology and Immunology" Recuperado de http://www.ehowenespanol.com/klebsiella-pneumoniae-infecciones-del-tracto-urinario-hechos_173450/
- [4] Elsa T. Pimienta Rodríguez (2013) Tratamiento con bacteriófagos como una alternativa antimicrobiana potencial. Revista CENIC (44). Recuperado de (Fecha de consulta: 13/07/2016) <http://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/articulos/tratamiento-con-bacteriofagos-como-una-alternativa-antimicrobiana-potencial>
- [5] Revista La Razón. 01/08/2010. Resistentes a antibióticos, 60% de los mexicanos. Recuperado de (Fecha de consulta 13/07/2016) <http://www.razon.com.mx/spip.php?article41042>
- [6] Dr Gene Mayer. Professor Emeritus University of South Carolina School of Medicine. Bacteriología (cap. 7 Bacteriófagos). Recuperado de (Fecha de consulta: 13/07/2016) <http://www.microbiologybook.org/Spanish/chapter7.htm>
- [7] Artículo de Ernesto García y Rubens López. Profesores de Investigación. Departamento de Microbiología Molecular. Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC. Rev.Esp. Quimioterapia (2002) 15: 306-312. Recuperado de (Fecha de consulta: 13/07/2016) <https://oldearth.wordpress.com/microbios-en-accion/los-bacteriofagos-y-sus-productos-genicos-como-agentes-antimicrobianos/>