



# Universidad de Guanajuato

*"La verdad os hará libres"*

División de Ciencias Naturales y Exactas

Departamento de Biología

TESIS

**"Efecto del bacteriófago ØK08-48 sobre el desarrollo de biopelículas formadas por *Klebsiella pneumoniae*"**

Que para obtener el título de licenciado en Biología Experimental

Presenta:

**Mayela Martínez Cano**

Directora de Tesis

**Dra. Ruth Reyes Cortés**

Guanajuato, Guanajuato 2020

*“A las personas más importantes de mi vida,  
Mis padres, Francisca Cano y José Martínez  
Y mis hermanas, Betsie y Mariazel, por todo el  
Apoyo que me han brindado y por estar a mi lado siempre.  
Gracias por tanto esfuerzo y por ese amor incondicional”.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la universidad de Guanajuato por el apoyo a lo largo de mi carrera profesional y en la elaboración de este proyecto.

Al laboratorio de Biología del Parasitismo.

A mi directora de tesis Dra. Ruth Reyes Cortés por guiarme, acompañarme en este proceso y por confiar en mi para formar parte de su equipo de trabajo.

A Crucita por haberme enseñado con paciencia y dedicación.

A mis compañeros de laboratorio y a todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron o estuvieron presentes en la culminación de este proyecto.

A mi hermana Mariazel y amigos que siempre iban conmigo en la madrugada al laboratorio.

A mis padres, por enseñarme el valor de la perseverancia, fortaleza y constancia.

## INDICE

1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	7
<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	7
<b>Biopelículas</b> .....	100
<b>Bacteriófagos</b> .....	122
3. ANTECEDENTES	188
4. JUSTIFICACIÓN	200
5. HIPÓTESIS	211
6. OBJETIVOS	211
7. MATERIALES Y METODOS	222
<b>Medios de cultivo</b> .....	222
<b>Bacterias y condiciones de cultivo</b> .....	233
<b>Bacteriófago ØK08-48</b> .....	24
<b>Análisis de la morfología de placa</b> .....	244
<b>Ensayo de doble placa por el método de goteo</b> .....	244
<b>Propagación de bacteriófagos a alta multiplicidad</b> .....	255
<b>Precipitación de partículas virales</b> .....	255
<b>Determinación de biopelículas bacterianas</b> .....	266
<b>Análisis de la biopelícula bacteriana en interacción con el bacteriófago ØK08-48</b> ....	277
<b>Análisis del efecto del bacteriófago ØK08-48 sobre las biopelículas bacterianas ya formadas</b> .....	288
8. RESULTADOS	30
<b>Antibiograma</b> .....	30
<b>Título de fagos a alta multiplicidad de infección</b> .....	300
<b>Morfología de Placa</b> .....	31
<b>Formación de Biopelículas de distintas cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i></b> .....	32
<b>Análisis de la formación de biopelícula de la cepa KL-147-14-III en interacción con el bacteriófago ØK08-48</b> .....	33

<b>Análisis de la degradación de biopelícula de la cepa KL-147-14-III por el bacteriófago ØK08-48 .....</b>	<b>35</b>
9. DISCUSIÓN	37
10. CONCLUSIONES	43
11. PERSPECTIVAS	44
12. BIBLIOGRAFÍA	45

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Perfil de resistencia a antibióticos de bacterias Gram-negativas. ....	9
Tabla 2. Familias de bacteriófagos y sus características morfológicas.....	14
Tabla 3. Antibiograma de las cepas KL-08 y KL-147-14-III de <i>K. pneumoniae</i> .....	30

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de un bacteriófago. ....	133
Figura 2. Esquema de replicación lítico y lisogénico de los bacteriófagos.....	166
Figura 3. Esquema de microplaca para ensayo del análisis de la biopelícula bacteriana en interacción con el bacteriófago ØK08-48 .....	288
Figura 4. Morfología de la placa viral del fago ØK08-48. ....	31
Figura 5. Formación de biopelículas de las cepas de <i>K. pneumoniae</i> .....	33
Figura 6. Formación de biopelícula de la cepa KL-147-14-III en interacción con el bacteriófago ØK08-48.....	35
Figura 7. Degradación de biopelícula formada por la cepa KL-147-14-III en interacción con el bacteriófago ØK08-48.....	36

## 1. RESUMEN

La multi resistencia bacteriana es un problema de importancia relevante debido a que ocasiona una disminución de los tratamientos disponibles contra las enfermedades infecciosas.

*Klebsiella pneumoniae*, ha sido descrita como una bacteria multirresistentes, debido a que ha desarrollado múltiples mecanismos de defensa, tales como la producción de enzimas betalactamasas de amplio espectro (BLEES). Esta característica se encuentra ampliamente relacionada con su capacidad de desarrollarse en forma de biopelículas.

Ante esta problemática, se ha retomado el interés por estudiar alternativas para el tratamiento de infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae*, una de éstas es la utilización de bacteriófagos. Los bacteriófagos o fagos, son virus que infectan bacterias de una manera específica a nivel de género y especie. Los fagos, presentan dos vías de desarrollo; lítica y lisogénica. Los fagos con ciclos de reproducción lítica se multiplican dentro de la célula bacteriana y la lisan al final del ciclo, para liberar a los fagos maduros. La liberación de nuevos fagos permite la infección de nuevos hospederos de forma exponencial, inhibiendo el desarrollo bacteriano. Los fagos se han propuesto como tratamiento alternativo, pues varios estudios han evaluado y demostrado su efectividad ante bacterias patógenas, por lo que, en este trabajo, se evaluó la capacidad del bacteriófago ØK08-48, específico del género y especie de *Klebsiella pneumoniae* para inhibir las biopelículas desarrolladas por esta bacteria de importancia clínica.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las bacterias se encuentran en la naturaleza de dos maneras posibles, de forma planctónica y en forma de biopelícula (Ramadan *et al.*, 2005). Los microbiólogos coinciden en que la mayoría de las bacterias en la naturaleza se encuentran en estado de biopelícula (Ramadan *et al.*, 2005).

Para que se inicie la formación de una biopelícula, las bacterias que se encuentran en el medio se adhieren a una superficie viva o inerte y mediante señales químicas, coordinan la estructura y el desarrollo de una cubierta de polisacáridos, la cuál va a conferir a estas bacterias de ventajas significativas y protección hacia fluctuaciones ambientales desfavorables de humedad, temperatura y pH. Además de proporcionarles una concentración de nutrientes adecuada y facilitar la eliminación de desechos (Manning, 2003).

### *Klebsiella pneumoniae*

*K. pneumoniae*, es una bacteria Gram negativa, anaeróbica facultativa, inmóvil, con formación de capsula, que se encuentra presente como comensal en las mucosas de la nasofaringe y el tracto gastrointestinal de animales y humanos (Echeverri & Cataño, 2010).

En las últimas décadas, *K. pneumoniae* se ha convertido en un patógeno asociado al cuidado de la salud ya que se reporta como el agente causal de infecciones adquiridas en hospitales relacionadas al tracto respiratorio, conducto biliar inferior, heridas por cirugías y al tracto urinario (De Rosa *et al.*, 2015), infectando principalmente a pacientes inmunocomprometidos, neonatos, niños y adultos mayores (Montgomerie, 1979).

Las infecciones causadas por estas bacterias se han convertido en un serio problema de salud pública (Snitkin *et al.*, 2012). Las cepas de *K. pneumoniae* han desarrollado

resistencia a los antibióticos carbapenémicos y betalactámicos por la producción de carbapenemasas, b-lactamasas y modificación de porinas, resistencia que ha sido asociada a la formación de biopelículas bacterianas (Høiby *et al.*, 2010; Kvist *et al.*, 2008).

La capacidad de *K. pneumoniae* para formar biopelículas resulta en una ventaja, ya que protege al patógeno de las respuestas inmunes del huésped, así como de la acción de los antibióticos, haciendo más eficiente su persistencia en los tejidos (Jagnow & Clegg, 2003).

La resistencia bacteriana es un problema serio y de importancia creciente, especialmente en los ambientes hospitalarios. Los microorganismos mencionados por la secretaría de salud desde el 2011 como más frecuentes en México muestran a *Enterobacter spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Enterococcus spp.* y *Cándida spp.* (López-herrera *et al.*, 2012), sin embargo, *K. pneumoniae* ha cobrado gran importancia debido a la aparición de infecciones recurrentes y de difícil tratamiento debido a que tiene una producción de betalactamasas de espectro extendido y de carbapenemasas, y es preocupante ya que dicha resistencia puede adquirirse a través de plásmidos entre especies (Sirijan Santajit & Nitaya Indrawattana, 2016).

*K. pneumoniae* ha desarrollado mecanismos para prevalecer en ambientes intrahospitalarios de manera muy eficiente. Entre estos mecanismos de resistencia se destacan la presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEES) sumada a la pérdida o modificación de porinas, lo que hace la membrana externa de las células menos permeable a los antibióticos de elección (Hyle *et al.*, 2005). La vigilancia epidemiológica de las infecciones intrahospitalarias en 2015 ha identificado a los microorganismos Gram-negativos con perfiles de resistencia a antibióticos más altos y señaló a *K. pneumoniae* como el tercer patógeno más frecuente (Secretaría de Salud, 2015).

Entre los medicamentos a los que *K. pneumoniae* presenta resistencia, se encuentran las cefalosporinas y los carbapenémicos (**Tabla 1**) que son antibióticos que presentan un mayor espectro bactericida disponibles en la actualidad (Vuotto et al., 2014).

Tabla 1. Perfil de resistencia a antibióticos de bacterias Gram-negativas (Secretaría de Salud, 2015)

MO Antibiótico		<i>E.coli</i> n= 5,561	<i>K. pneumoniae</i> n= 2,813	<i>E. cloacae</i> n= 944	<i>A. baumanii</i> n= 1,923	<i>P. aeruginosa</i> n= 3,673	<i>S. marcescens</i> n= 321
Ampicilina	n	2,092	<b>1,299</b>	167	576	862	55
	%	37.6	<b>46.9</b>	17.7	30.0	23.5	17.1
Amikacina	n	335	<b>193</b>	120	466	848	27
	%	6.0	<b>6.9</b>	12.7	24.2	23.1	8.4
Ampicilina-Sulbactam	n	1,162	<b>636</b>	136	191	502	55
	%	20.9	<b>22.6</b>	14.4	9.9	13.7	17.1
Piperacilina-Tazobactam	n	213	<b>116</b>	103	95	240	7
	%	3.8	<b>4.1</b>	10.9	4.9	6.5	2.2
Cefuroxima	n	339	<b>169</b>	53	40	86	22
	%	6.1	<b>6.0</b>	5.6	2.1	2.3	6.9
Cefepime	n	1,694	<b>829</b>	151	593	633	36
	%	30.5	<b>29.5</b>	16.0	30.8	17.2	11.2
Ceftazidima	n	540	<b>240</b>	120	268	423	21
	%	9.7	<b>8.5</b>	12.7	13.9	11.5	6.5
Cefotaxima	n	623	<b>252</b>	107	172	341	16
	%	11.2	<b>9.0</b>	11.3	8.9	9.3	5.0
Ertapenem	n	35	<b>23</b>	24	-	-	3
	%	0.6	<b>0.8</b>	2.5	-	-	0.9
Imipenem	n	85	<b>41</b>	17	162	387	5
	%	1.5	<b>1.5</b>	1.8	8.4	10.5	1.6
Meropenem	n	95	<b>105</b>	66	172	558	13
	%	1.7	<b>3.7</b>	7.0	8.9	15.2	4.0
Ciprofloxacino	n	1,895	<b>521</b>	132	689	667	27
	%	34.1	<b>18.5</b>	14.0	35.8	18.2	8.4

*K. pneumoniae*, con el paso del tiempo ha evolucionado produciendo nuevas betalactamasas (BLEES), además de la producción de carbapenemasas que son más frecuentes en bacterias formadoras de biopelículas (Morejón García, 2013). Estas enzimas inactivan penicilinas y cefalosporinas, rompiendo el anillo penicilánico o cefalosporánico acabando con su actividad bactericida (Rahal *et al.*, 1998).

El interés en el estudio de esta bacteria es debido a que presentan resistencia a estos potentes antibacterianos que, son más a menudo prescritos en el mundo constituyendo el 50% del consumo global (Hirsch & Tam, 2010).

Debido a la aparición de las cepas de *K. pneumoniae* resistentes a antibióticos, se han explorado nuevas opciones de tratamiento con antibióticos de tercera, cuarta y quinta generación (Branda *et al.*, 2005; Livermore *et al.*, 2011). Desafortunadamente, los antibióticos presentan ciertas limitaciones para tratar a las bacterias formadoras de biopelículas, por lo que, es evidente la necesidad de buscar nuevas estrategias para combatir las infecciones que no pueden ser controladas con los medios disponibles actualmente, por ello, se ha retomado el interés en la investigación de los bacteriófagos (Costerton *et al.*, 1987).

## Biopelículas

Las biopelículas son comunidades microbianas que se encuentran embebidas dentro de una matriz polimérica. Esta matriz está constituida por sustancias poliméricas extracelulares características de cada microorganismo. Generalmente, son compuestas por agua, exopolisacáridos, fimbrias, proteínas de adherencia, ADN exógeno, pilus y productos procedentes de la lisis bacteriana (Fletcher, 1991), que se adhieren a una superficie inerte o a un tejido vivo permitiéndoles sobrevivir a ambientes hostiles y les proporciona ventajas de protección contra fluctuaciones medioambientales como el pH, temperatura y humedad. Las biopelículas también

proporcionan facilidad para eliminar desechos y concentrar nutrientes (Van Loosdrecht et al., 1990).

Las biopelículas constituyen un tipo de crecimiento diferente al que presentan las bacterias planctónicas, debido a que, en el proceso de adhesión a una superficie, las bacterias modifican sus fenotipos en respuesta a la proximidad que van teniendo (Davey et al., 2000). En las primeras etapas de formación de las biopelículas, las bacterias sésiles se encuentran en una posición estable con células de la misma o de distinta especie, formando micro colonias individuales o mixtas, éstas producirán grandes cantidades de polisacárido que se concentrará dentro de la biopelícula en desarrollo, esto le proporcionará el microambiente particular a cada biopelícula bacteriana (Fletcher, 1991).

Las bacterias formadoras de biopelículas tienen tal cooperatividad fisiológica que responden a condiciones micro ambientales específicas con diferentes patrones de crecimiento en donde se encuentran ambientes en los que la concentración de nutrientes, pH y disponibilidad de oxígeno son diferentes (Costerton *et al.*, 1987; Fletcher, 1991), armando una biopelícula madura estructuralmente compleja, y muy eficiente, conteniendo canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno hasta las partes más profundas de la biopelícula (de Beer et al., 1994).

Las bacterias forman biopelículas cuando detectan parámetros ambientales no aptos para su desarrollo (O'Toole & Kolter, 1998). Se ha documentado ampliamente que los flagelos y los pili de las bacterias son utilizados para la adhesión (C, 2007), además de la síntesis de celulosa que ayuda a la unión a superficies de plantas, modulación de su densidad, formación de vesículas de gas en ambientes acuáticos, síntesis de carbohidratos y producción de adhesinas que les permite adherirse a superficies e interactuar con otras bacterias (Sarduy Bermúdez & González Díaz, 2016).

Las bacterias que se encuentran en biopelículas son de gran interés en el sector salud debido a su relación con las infecciones recurrentes y de difícil tratamiento, lo que resulta en largas estadías hospitalarias y elevados costos de tratamiento. El efecto de las biopelículas involucra la inactivación de antibióticos por polímeros extracelulares, por modificaciones enzimáticas, por la ineficacia para alcanzar a las células bacterianas metabólicamente activas, y por la baja disponibilidad de nutrientes, que contribuye a una baja tasa de crecimiento y a los cambios fenotípicos que adquieren las bacterias al estar dentro de la biopelícula.

## Bacteriófagos

Los fagos, fueron descubiertos por Ernest Hankin y Gamaleva en 1896, quienes los describieron como una sustancia con posible actividad antimicrobiana. En 1915 fueron descritos por Frederick Twort y por Felix d' Herelle quienes más tarde reportaron su capacidad lítica (Abedon et al., 2011). La palabra bacteriófago, propuesta por Felix d' Herelle, proviene de bacteria y fagein, que significa comer o devorar (Sulakvelidze et al., 2001). Los bacteriófagos o fagos, son virus que infectan bacterias y utilizan su maquinaria para multiplicarse en su célula huésped (Monk et al., 2010).

La estructura de los bacteriófagos consiste en la presencia de un solo ácido nucleico como su genoma viral, éste puede ser ADN o ARN de cadena sencilla o doble (Clark & March, 2006). El material genético está protegido por la cápside que es una estructura proteica que puede estar envuelta por lípidos o carbohidratos. Además, puede presentar estructuras accesorias como, cuello, cola o cauda y fibras o espículas caudales que son utilizadas para el reconocimiento de receptores bacterianos, y en

la base o en las espículas caudales se pueden presentar proteínas con actividad enzimática (**Figura 1**) (Domínguez Navarrete, 2020).

La composición de las proteínas que rodean la estructura de los bacteriófagos define su forma y su complejidad, por esta razón pueden ser icosaédricos, helicoidales o filamentosos (Nallelyt et al., 2010).

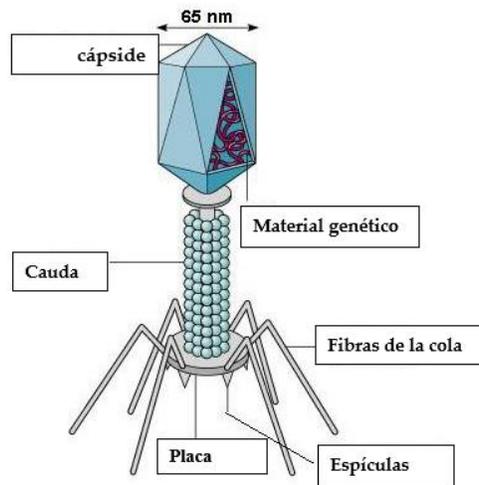
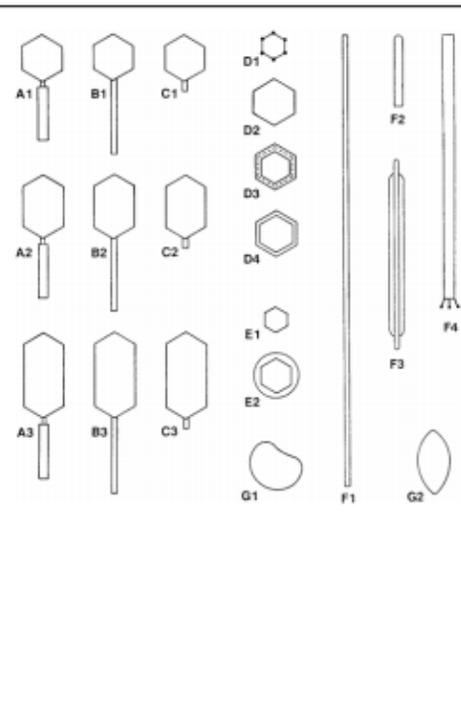


Figura 1. Estructura general de un bacteriófago. Imagen tomada y modificada de: <https://imagenes.google.com>

Los bacteriófagos están clasificados en 13 familias según la naturaleza de su genoma y características morfológicas que presentan (**Tabla 2**). De los bacteriófagos que han sido aislados, cerca del 96% pertenecen al orden Caudovirales. En este orden se pueden encontrar tres familias principalmente: Myoviridae, Siphoviridae y Podoviridae (Ackermann, 2001). Los fagos de la familia Siphoviridae se caracterizan por presentar una cadena doble de ADN y poseen una cola larga, flexible y no contráctil. La familia Podoviridae tienen ADN de cadena doble, además presentan una cauda corta y no flexible, que les ayuda a introducir su material genético en las células huésped. Los fagos Myoviridae, presentan ADN de cadena doble, y una cola contráctil (Ackermann, 2001).

Tabla 2. Familias de bacteriófagos y sus características morfológicas. (tomado y modificado de: (Ackermann, 2001))

Morfotipo	Forma	Ácido nucleico	Familia	Particularidades
A1 a A3	Fagos con cola	ADN dc, L	<i>Myoviridae</i>	Cola contráctil
B1 a B3			<i>Siphoviridae</i>	Cola larga, no contráctil
C1 a C3			<i>Podoviridae</i>	Cola corta
D1	Fagos poliédricos	ADN sc, C	<i>Microviridae</i>	Capsómeros sobresalientes
D3		ADN dc, C, S	<i>Corticoviridae</i>	Cápside compleja, lípidos
D4		ADN dc, L	<i>Tectiviridae</i>	Vesícula lipídica, pseudocola
E1		ARN sc, L	<i>Leviviridae</i>	
E2		ARN dc, L, seg.	<i>Cystoviridae</i>	Cubierta lipídica
F1	Fagos filamentosos	ADN sc, C	<i>Inoviridae</i>	a- filamentos largos
F2				b- bastones cortos
F3		ADN dc, L	<i>Lipothrixviridae</i>	Cubierta lipídica
F4		ADN dc, L	<i>Rudiviridae</i>	Similar al virus del mosaico del tabaco
G1	Fagos pleomórficos	ADN dc, C, S	<i>Plasmaviridae</i>	Cubierta lipídica, sin cápside
G2		ADN dc, C, S	<i>Fuselloviridae</i>	Cubierta lipídica, sin cápside, en forma de limón



Los fagos pueden clasificarse también por la forma de replicación que presentan, dependiendo de su naturaleza pueden ser líticos o lisogénicos (**Figura 2**).

Para explicar el proceso infeccioso, se toma como referencia al fago lambda ( $\lambda$ ) de *Escherichia coli* debido a que es un modelo estudiado ampliamente. La infección se realiza en dos etapas: 1. La adsorción y 2. La inyección del material genético. La adsorción es un proceso reversible, y la inyección un proceso irreversible. Los componentes que actúan como receptores para la infección pueden ser del tipo proteico; proteínas transmembranales, porinas y el pili. Además, pueden utilizar receptores no proteicos como el lipopolisacárido o los componentes de la cápsula.

Después de la adsorción, la proteína J, presente en la parte del extremo distal del tallo de  $\lambda$  reconoce al receptor de maltosa (LamB) de la membrana externa bacteriana, además requiere de una proteína que se encuentra en la membrana

interna del huésped (pstM) para que se lleve a cabo la inyección del ADN de manera exitosa hasta el citoplasma bacteriano (Kameyama & Oviedo, 2001).

El fago  $\lambda$  puede desarrollar el ciclo lisogénico o el ciclo lítico (**Figura 2**). Una vez que el material genético del fago  $\lambda$  alcanza el citoplasma de forma lineal se circulariza por la unión de sus extremos cohesivos utilizando una ligasa del huésped (Kameyama & Oviedo, 2001). Posteriormente por recombinación homóloga se realiza la inserción del material genético viral en el genoma bacteriano. En este ciclo de desarrollo (pasos 1,2, 7,8,9, **Figura 2**) la replicación viral se realiza conjuntamente con el material genético de la bacteria, generando clones de células infectadas que pueden multiplicarse por varias generaciones. Cuando un fago integra su genoma al de una célula, se le llama profago (Skurnik & Strauch, 2006). Posteriormente, debido a algunas condiciones celulares, tales como el estrés provocan que el genoma del fago se escinda y se expresen los genes tardíos. En este momento del ciclo, empieza la replicación, traducción de ARN y síntesis de proteínas estructurales del fago (Kameyama & Oviedo, 2001). Las proteínas se clasifican en 3 tipos: i. estructurales, cuya función es formar la cabeza, cauda, fimbrias o espículas; ii. proteínas no estructurales (regulación del ciclo y las involucradas en el ensamblaje del virión; iii. proteínas encargadas de la lisis celular y liberación de fagos (Desiere *et al.*, 2000).

Finalmente, ocurre la lisis celular y liberación de los viriones maduros. En este proceso, son requeridas dos proteínas principales, primero las holinas que generan poros en la membrana de las células y las lisinas que penetran por los poros generados por las holinas degradando el peptidoglicano causando la lisis celular (Brüssow & Desiere, 2001).

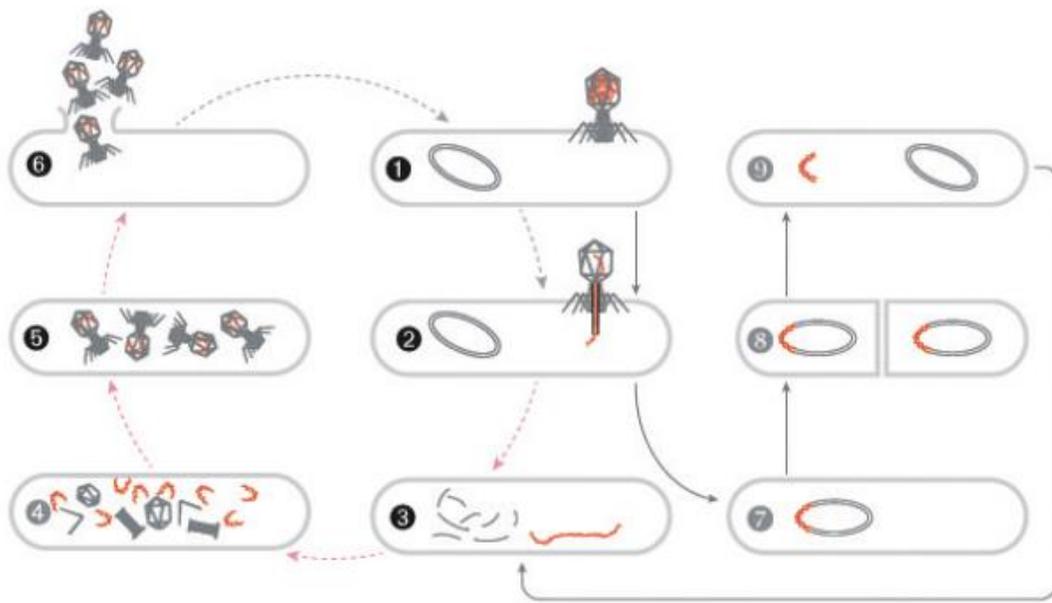


Figura 2. Esquema de replicación lítico y lisogénico de los bacteriófagos tomada y modificada de (Catalina, 2015)

Los bacteriófagos que presentan un ciclo de replicación lítico son utilizados para la terapia bacteriofágica debido a que tienen un efecto bactericida (Hughes *et al.*, 1996). Otra razón por la que los fagos son utilizados para tratar infecciones bacterianas es que presentan especificidad hacia un género y especie determinado (Hanlon, 2007).

Al mismo tiempo, al evaluar la morfología de placa se observa una evidencia indirecta de que los fagos secretan depolimerasas (enzimas que degradan polisacáridos bacterianos) al observar halos o placas dobles de inhibición del crecimiento bacteriano. Usualmente el primer halo es claro, representa la lisis bacteriana mediada por la acción de las holinas y/o lisinas y el halo turbio representan la degradación de los polímeros bacterianos producido por las depolimerasas (Sutherland *et al.*, 2004).

Los bacteriófagos que inducen depolimerasas son capaces de degradar la cápsula y las sustancias poliméricas extracelulares presentes en la biopelícula para acceder a la superficie bacteriana y detectar los receptores requeridos para el proceso infectivo.

Sutherland y colaboradores, reportan en 2004 la eliminación completa de las biopelículas formadas por *Enterobacter cloace* utilizando un coctel de tres fagos que producen depolimerasas. Estos estudios proponen la aplicación de fagos para erradicar la biopelícula de la bacteria patógena *Enterobacter cloace* (Sutherland et al., 2004).

Pires y colaboradores realizaron un estudio en 2016 para recopilar información de las depolimerasas codificadas por fagos completamente secuenciados, en donde reportan 160 diferentes enzimas de 143 fagos. Entre las enzimas identificadas destacan sialidasas, levanasas, xilosidasas, dextranasas, hialuronidasas, peptidasas y pectinliasas (Pires et al., 2016).

### 3. ANTECEDENTES

La fagoterapia consiste en la utilización de bacteriófagos con ciclos de replicación lítica que al encontrarse con su bacteria huésped producen lisis bacteriana (Kutter et al., 2010; Ramirez, 2016).

El uso de bacteriófagos como alternativa terapéutica es considerada como alternativa viable para contrarrestar las infecciones causadas por bacterias ya que el tratamiento con bacteriófagos no genera efectos secundarios significativos para humanos, animales ni plantas (Carlton, 1999; Sulakvelidze et al., 2001), por lo que pueden presentar ventajas de tratamiento.

Gracias a los nuevos avances en el conocimiento de las características biológicas de los bacteriófagos, se ha descrito que poseen actividades microbidas y, por lo tanto, pueden aplicarse para el control de infecciones bacterianas. Además de su capacidad bactericida, su crecimiento exponencial y su especificidad selectiva, presentan mínimos efectos en la microbiota normal (Xie *et al.*, 2005). Asimismo, los bacteriófagos son reductores potenciales de bacterias resistentes o multirresistentes, incluso sobre bacterias productoras de biopelículas (Kropinski *et al.*, 2009), no tienen efectos tóxicos significativos (Sulakvelidze *et al.*, 2001), tienen bajo impacto ambiental y un costo relativamente bajo (Xie *et al.*, 2005).

El uso de bacteriófagos con fines terapéuticos comenzó hace 100 años, cuando Félix d' Herelle empleó bacteriófagos para tratar eficazmente la disentería de un niño, algunos otros investigadores utilizaban suspensiones de fagos para tratar infecciones de la piel producidas por *Staphylococcus spp* (Krylov *et al.*, 2016). El uso de los bacteriófagos siguió creciendo en los últimos años en Polonia, Unión Soviética y Georgia, en occidente recientemente se han retomado los estudios en fagoterapia

por la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos, ya que la multirresistencia bacteriana ha generado millones de muertes en el último siglo.

Tomando como referencia las experiencias previas, indican que los bacteriófagos son inocuos, éstos han sido utilizados en concentraciones desde  $10^5$  hasta  $10^{11}$  UFP/ml (Unidades formadoras de placa por mililitro) a través de diferentes vías de administración: vía oral, aplicaciones tópicas, rectal e intravenosa (Loc-Carrillo & Abedon, 2011).

En este trabajo, se analizó al bacteriófago ØK08-48. Este fago presenta un ciclo de replicación predominantemente lítico, con ADN de cadena doble con un tamaño aproximado de 23, 000 pb, tiene una morfología icosaédrica y una cauda larga, flexible y no contráctil; lo cual, lo sitúa dentro de la familia Siphoviridae. De acuerdo con el análisis del rango de huésped realizado por María Hernández en 2018, presenta un amplio rango de huésped entre diferentes cepas de *K. pneumoniae* pero altamente específico a nivel de género y especie. En el análisis del perfil proteico para este bacteriófago se observa la presencia de aproximadamente 9 proteínas, lo cual representa una característica importante para posteriores estudios (Hernandez, 2018).

El fago ØK08-48 presenta una estabilidad infectiva en amplios rangos de pH (3-11) por lo que puede ser considerado para probar su eficacia contra bacterias formadoras de biopelículas (Hernandez, 2018).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Debido a la alta incidencia de las infecciones intrahospitalarias causadas por *Klebsiella pneumoniae* formadora de biopelícula y al incremento de cepas resistentes a los antibióticos, se ha retomado el interés en los bacteriófagos como terapia alternativa para el control de las infecciones causadas por este patógeno. Por esta razón, se plantea la pregunta de si esta terapia representa una vía factible para combatir las infecciones causadas por bacterias que se encuentran en forma de biopelícula. Una de las características más singulares de los fagos es su capacidad para producir enzimas que degradan los exopolisacáridos bacterianos, además se ha observado que estas enzimas tienen alta especificidad (Park, 1956), por lo que, en este estudio, se evalúa la capacidad del bacteriófago ØK08-48 sobre la acción de la biopelícula desarrollada por cepas de *K. pneumoniae*. Se ha tomado un interés particular en estas cepas debido a que presentan alta resistencia a los antibióticos de primera generación.

## 5. HIPÓTESIS

El bacteriófago ØK08-48 es capaz de inhibir el desarrollo de *Klebsiella pneumoniae* formadora biopelícula

## 6. OBJETIVOS

### Objetivo general

- Evaluar la capacidad del bacteriófago ØK08-48 para inhibir la biopelícula desarrollada por las cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

### Objetivos particulares

- Determinar la capacidad de formación de biopelículas de distintas cepas de *Klebsiella pneumoniae*
- Examinar el efecto del bacteriófago ØK08-48 sobre la formación de la biopelícula de *Klebsiella pneumoniae*
- Examinar el efecto del bacteriófago ØK08-48 sobre la estructura de la biopelícula ya formada de *Klebsiella pneumoniae*

## 7. MATERIALES Y METODOS

### Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de las cepas bacterianas y la expansión de los bacteriófagos fueron los siguientes:

<b>Medio Luria Bertani líquido (LB)</b>	
REACTIVOS	CANTIDAD PARA PREPARAR 1L
Triptona/Peptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de Sodio (NaCl)	5 g
Sulfato de Magnesio (MgSO <sub>4</sub> ) 1M	5 mL

<b>Medio Luria Bertani sólido (LB) 1L</b>	
REACTIVOS	CANTIDAD PARA PREPARAR 1L
Triptona/Peptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
Agar bacteriológico	15 g
MgSO <sub>4</sub> 1M	5 mL

<b>Medio Tφ suave</b>	
REACTIVOS	CANTIDAD PARA PREPARAR 1L
Triptona/Peptona	10 g
NaCl	5 g
Agar bacteriológico	7 g
MgSO <sub>4</sub> 1M	5 mL

<b>Medio Tφ sólido</b>	
REACTIVOS	CANTIDAD PARA PREPARAR 1L
Triptona/Peptona	10 g
NaCl	5 g
Agar bacteriológico	11g
MgSO <sub>4</sub> 1M	5 mL

<b>Medio SM pH 7.5</b>	
REACTIVOS	CANTIDAD PARA 500 mL
NaCl 3M	16.6 mL
Tris 1M pH 7.5	25 mL
Gelatina 10%	2.5 mL
MgSO <sub>4</sub> 1M	5 mL

## Bacterias y condiciones de cultivo

En el laboratorio de biología del parasitismo, en el departamento de Biología de la División de Ciencias Naturales y Exactas, se cuenta con una colección de cepas de *K. pneumoniae* con un perfil de multirresistencia, provenientes de aislados clínicos de hemocultivo de pacientes del Instituto Nacional de Pediatría obtenidas durante el año 2001-2003 identificadas mediante el sistema VITEK 2,

Las cepas utilizadas de *K. pneumoniae* se identifican como: KL-147-14-III, KL-08 y KL-10. También, se contó con una cepa de referencia *K. pneumoniae* ATCC 700603. Los cultivos bacterianos se realizaron a 37°C en agitación constante (150 rpm) en el medio Luria Bertani (LB).

## Bacteriófago ØK08-48

Así mismo, se cuenta con una colección de bacteriófagos parcialmente caracterizados, uno de ellos es el bacteriófago ØK08-48, potencial candidato para estudios de terapia alternativa contra infecciones por *K. pneumoniae*.

El bacteriófago ØK08-48 fue recolectado de muestras de aguas residuales en la planta de bombeo Moctezuma en la ciudad de México, obtenida por el grupo de trabajo en (Reyes, 2005).

## Análisis de la morfología de placa

El ensayo de doble placa se utilizó para analizar la morfología de la placa viral o halo de lisis. Este ensayo se basó en el protocolo descrito por Kropinski *et al* (2009) con ciertas modificaciones (Kropinski *et al.*, 2009). Se elaboró un tapiz uniforme mezclando 500 µL de cultivo bacteriano de 12 horas de incubación previa más 10 µL del fago ( $1 \times 10^7$  UFP/mL) y 3 mL de medio Tφ semisólido, posteriormente con ayuda del vórtex se homogenizó la mezcla para verterla sobre una caja Petri con medio Tφ sólido. Una vez gelificado el medio se incubó a 37°C durante 12 horas o hasta observar la formación de las placas aisladas.

## Ensayo de doble placa por el método de goteo

La técnica utilizada para cuantificar las partículas infectivas de un bacteriófago fue el ensayo de doble placa por goteo. Para ello, se realizó un tapiz bacteriano utilizando 500 µL de cultivo bacteriano de 12 horas de incubación previa con 3 mL de medio Tφ semisólido, una vez homogenizada la mezcla se colocó en la caja de Tφ sólido y se dejó gelificar el medio semisólido durante 10 min. Después, se prepararon diluciones seriadas del fago (1:100) y se gotearon 10 µL de cada dilución

preparada en buffer SM. Las gotas se dejaron secar y la caja Petri se incubó a 37°C durante toda la noche (16 h ) o hasta observar la formación de las placas (Peeters *et al.*, 2008). Las placas se cuantificaron utilizando la fórmula que se muestra a continuación para determinar las Unidades Formadoras de Placa por mL (UFP/mL).

$$\text{UFP/mL} = (\text{Número de placas/Volumen goteado en mL}) \times \text{inv Dilución}$$

### Propagación de bacteriófagos a alta multiplicidad

La técnica de propagación de bacteriófagos a alta multiplicidad se utilizó para obtener un alto título de fagos. Este protocolo se llevó a cabo con ciertas modificaciones con base a lo propuesto por Sambrook *et al* (1989) (31). Una vez realizada la propagación de fagos a pequeña escala (10 mL), se pre-incubaron 35 mL de medio LB en un matraz de 250 mL a 37°C durante 12 h, para poder asegurar la esterilidad del medio. Posteriormente se inoculó el medio con 500 µL de un cultivo bacteriano de toda la noche, se incubó a 37°C con agitación vigorosa (150 rpm) hasta llegar a una densidad óptica DO<sub>600</sub> de 0.5 (durante 1 hora y media). Después, se agregó 1 mL de lisado de fago con un título de 10<sup>8</sup> o 10<sup>9</sup> UFP/mL y se incubó a 37°C en agitación constante (150 rpm) de 3 a 5 h o hasta que la lisis bacteriana ocurriera. Una vez que fueron visibles los restos celulares bacterianos se agregaron 5 mL de cloroformo y se continuó con la agitación del medio a 37°C durante 10 min. Luego se procedió con la separación de los restos celulares del lisado de fagos mediante centrifugación (como se describió previamente) y el lisado se transfirió a tubos limpios y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

### Precipitación de partículas virales

La precipitación de las partículas del bacteriófago ØK-0848 se realizó con la finalidad de concentrar y purificar el fago. La técnica utilizada fue la propuesta por

Sambrook et al (1989), con algunas modificaciones Para esto, se utilizó el stock de fagos obtenido con la técnica de propagación de bacteriófagos con alta multiplicidad. En un matraz se disolvieron 29.2 g de NaCl por cada 500 mL de lisado y se dejó en agitación suave durante 1 h a temperatura ambiente, esto promueve la disociación de las partículas virales de los restos bacterianos, permitiendo la precipitación del bacteriófago. Una vez transcurrida la hora, se adicionó 10% de Polietilenglicol (PEG 8000) en agitación suave a 4°C durante 2 h. Estando disuelto el PEG se pasó el contenido del matraz a un tubo de centrifuga NalgeneR Oak Ridge, TeflonR FEP y se almacenó a 4°C durante 48 h, para permitir la precipitación del bacteriófago. Posteriormente, se centrifugó a 7,155 xg a 4°C durante 45 min y se decantó el sobrenadante, recuperando la pastilla obtenida que contiene a los fagos. Se agregó 1 mL de buffer SM para resuspender los fagos, se adicionó un volumen igual de cloroformo y se homogenizó en el vortex. La muestra se centrifugó a 16, 099 xg durante 10 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante, se transfirió a un tubo cónico de 1 mL nuevo y se almacenó a 4°C para la obtención del título.

## Determinación de biopelículas bacterianas

La determinación de la formación de las biopelículas de las diferentes cepas analizadas se realizó en microplaca de 96 pozos utilizando la técnica de tinción con cristal violeta como se describe a continuación:

Se utilizó un cultivo bacteriano de las cepas de *K. pneumoniae* (KL-147-14-III, KL-10, KL-08, ATCC 700603) a una densidad óptica  $DO_{620}$  nm de 0.5 ( $2 \times 10^8$  Unidades formadoras de colonia). El cultivo se colocó en placas de 96 pozos y se mantuvieron en incubación sin agitación a 37°C, posteriormente, se analizó la comunidad bacteriana adherida a la caja plástica a diferentes tiempos (24, 48 y 72 h). La placa de

96 pozos contenía un volumen máximo de 250  $\mu$ L con las diferentes condiciones control y experimentales colocadas por triplicado en 3 ensayos independientes.

La determinación de la biopelícula consistió en retirar el sobrenadante que contenía las bacterias planctónicas con una pipeta Pasteur, posteriormente, se hizo un lavado con solución salina 0.85 %, enseguida se realizó la fijación de la muestra que contiene la biopelícula con metanol al 99% durante 15 min, una vez transcurrido el tiempo, se retira el metanol con micropipeta y se dejó secar en la campana de extracción durante 5 min. Posteriormente, se tiñó con cristal violeta al 0.1 % durante 10 min y se realizaron tres lavados con agua destilada. Se dejó secar en la campana de extracción durante 5 min. Después, se utilizó ácido acético al 33% para solubilizar y homogeneizar con ayuda de la micropipeta. Finalmente, se determinó la densidad óptica  $DO_{620}$  nm, lo cual corresponde a una medición indirecta de la biopelícula formada (Peeters *et al.*, 2008).

## Análisis de la biopelícula bacteriana en interacción con el bacteriófago

### ØK08-48

Para determinar la inhibición de formación de la biopelícula de *K. pneumoniae* por el bacteriófago ØK08-48, se utilizó la técnica de microtitulación en una placa de 96 pozos como se mencionó previamente con las siguientes condiciones control y experimentales:

A: control negativo de formación de biopelícula medio LB. B: control de formación de la biopelícula bacteriana de la cepa KL-147-14-III, en las líneas C, D, E, se colocó bacteria y fago en proporciones de 1:1000, 1:100 y 1:10 (**Figura 3**). Después de los diferentes periodos de incubación, se realizó la tinción con cristal violeta y se

determinó la DO 620 nm para su análisis en tres ensayos independientes por triplicado.

	1	2	3	
A				Medio LB
B				Cultivo bacteriano
C				Bacteria: Fago 1:1000
D				Bacteria: Fago 1:100
E				Bacteria: Fago 1:10

Figura 3. Esquema de microplaca para ensayo del análisis de la biopelícula bacteriana en interacción con el bacteriófago ØK08-48

### Análisis del efecto del bacteriófago ØK08-48 sobre las biopelículas bacterianas ya formadas.

Para determinar la destrucción de la biopelícula formada de *K. pneumoniae*, se utilizó la estrategia propuesta por Yuyu Yuan en 2019 (Yuan *et al.*, 2019), con algunas modificaciones. En una placa de 96 pozos se colocaron A: medio LB como control negativo, B, C, D, F: cultivo bacteriano de la cepa de *K. pneumoniae* y se incubó a 36°C durante 72 h para permitir la formación de la biopelícula. Posterior al periodo de incubación se retiró el cultivo y se adicionó medio nuevo al control y una suspensión de fagos en concentración Bacteria: Fago 1: 100 para observar la inhibición de la biopelícula ya formada a las 4, 8, 12 y 24 h post inoculación del fago. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se lavó con PBS en cada tiempo de incubación y se

realizó la determinación de la biopelícula DO 620 nm con cristal violeta como se mencionó previamente (Peeters et al., 2008).

## 8. RESULTADOS

### Antibiograma

Se realizó un análisis del antibiograma de dos de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* (KL-08 y KL-147-14-III) utilizadas en este trabajo

Tabla 3. Antibiograma de las cepas KL-08 y KL-147-14-III de *K. pneumoniae*

Antibiótico	Cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	KL-08	KL-147-14-III
Amikacina	S	R
Gentamicina	S	R
Tobramicina	S	R
Ampicilina	R	R
Ampicilina / Sulbactam	I	R
Aztronam	S	R
BLEE	-	+
Cefazolina	S	R
Cefepima	S	R
Ceftriaxona	S	R
Eritapenem	S	S
Meropenem	S	S
Piperacilina / Tazobactam	S	R
Nitrofurantoína	I	S
Ciprofloxacino	S	S
Tigeciclina	I	S
Trimetoprima/Sulfametoxazol	S	S

S = sensible I = intermedio R= resistente

### Título de fagos a alta multiplicidad de infección

Con la estandarización de la expansión de fagos a una alta multiplicidad de infección, se obtuvo un aumento del título de  $1.0 \times 10^9$  UFP/mL a  $1.0 \times 10^{13}$  UFP/mL, lo cual corresponde a un aumento de 4 logaritmos. Esto debido a que las bacterias, al

ser inoculadas en su fase logarítmica, están en constante replicación, proceso que es utilizado por los fagos para su propia multiplicación, este aumento en el título de fagos nos permitió contar con una gran concentración de fagos en volúmenes pequeños para el desarrollo de los experimentos en donde se analiza el efecto de los fagos sobre las biopelículas de *K. pneumoniae*.

### Morfología de Placa

Para la caracterización del fenotipo de placa viral se realizó un ensayo de doble placa ØK08-48 con su bacteria receptora KL-08 a una proporción de infección 1:100. Los resultados mostraron halos de lisis claros, rodeados por halos turbios, lo que sugiere un ciclo de replicación predominantemente lítico para el bacteriófago ØK08-48 y la posible producción de algún tipo de depolimerasa (Sutherland et al., 2004).

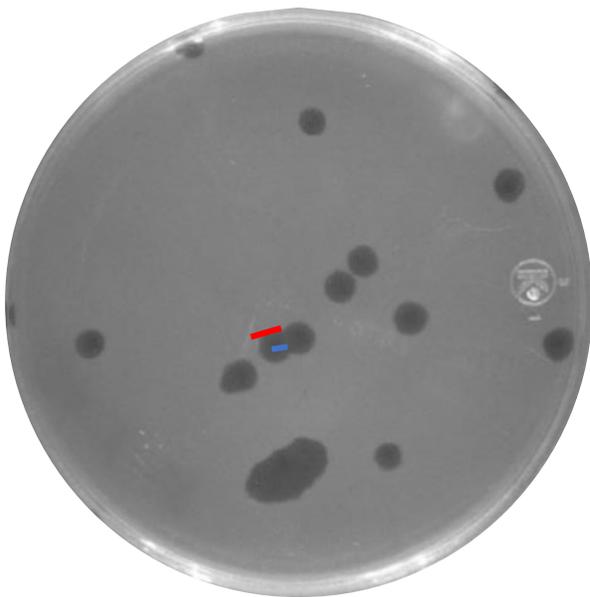


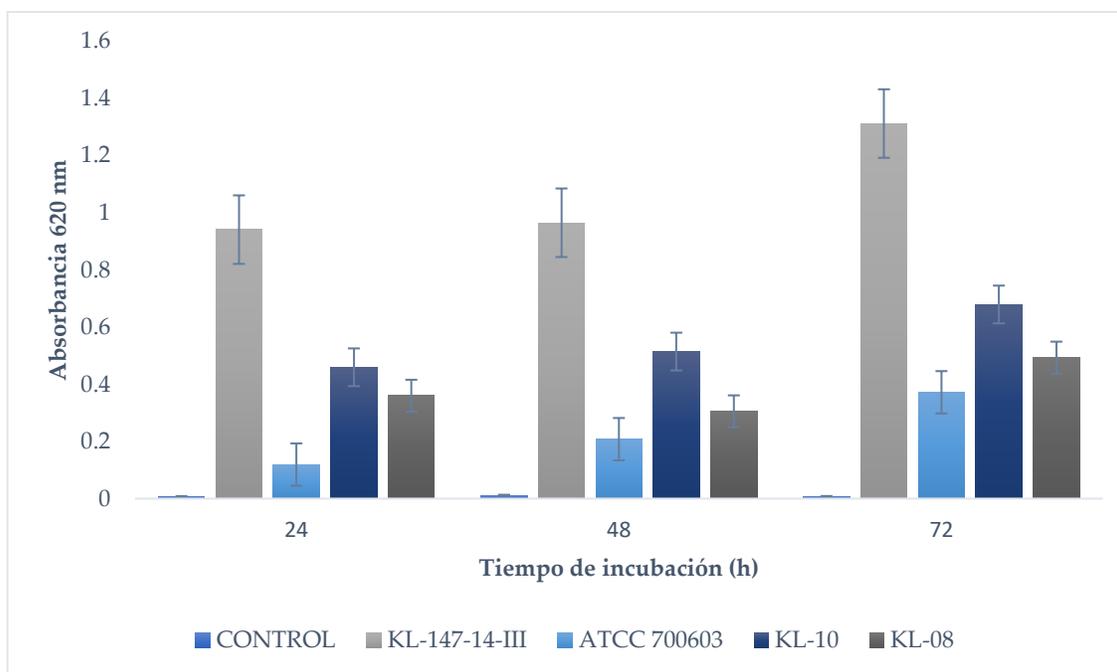
Figura 4. Morfología de la placa viral del fago ØK08-48. (---) halo claro (---) halo turbio

## Formación de Biopelículas de distintas cepas de *Klebsiella pneumoniae*

El análisis de la formación de biopelículas mostró que de las cepas de *K. pneumoniae* analizadas KL-147-14-III, KL-10, KL-08 Y ATCC 700603 solo la cepa KL-147-14-II forma biopelícula a partir de las 24 horas (**Figura 5**) mostrando un pico máximo a las 72 horas de incubación.

La cepa KL-147-14-III mostró densidades ópticas de 0.8 y 1.2 en comparación con las otras cepas analizadas, lo cual sugiere que esta cepa resalta por su capacidad para producir biopelículas desde las 24 horas de incubación. Parece que la eficiencia de formación de biopelículas de la cepa de referencia *K. pneumoniae* ATCC 700603 y el aislado KL-08 no es comparable con la cepa KL-147-14-III. Lo cual podría indicar que las cepas ATCC 700603 y KL-08 no son formadoras de biopelículas o requieren un tiempo mayor de incubación y/o otras condiciones de crecimiento para generar la biopelícula (ver figura 4).

En el caso de la bacteria KL-10 presenta apenas una pequeña biopelícula representado con una  $DO_{620nm}$  de 0.6 después de las 72 horas de incubación.



**Figura 5. Formación de biopelículas de las cepas de *K. pneumoniae*.** La DO 620nm se obtuvo en función de la captación del cristal violeta después de la incubación a 24, 48 y 72 horas de 3 ensayos independientes por triplicado y se señalan las barras de error típico.

### Análisis de la formación de biopelícula de la cepa KL-147-14-III en interacción con el bacteriófago ØK08-48

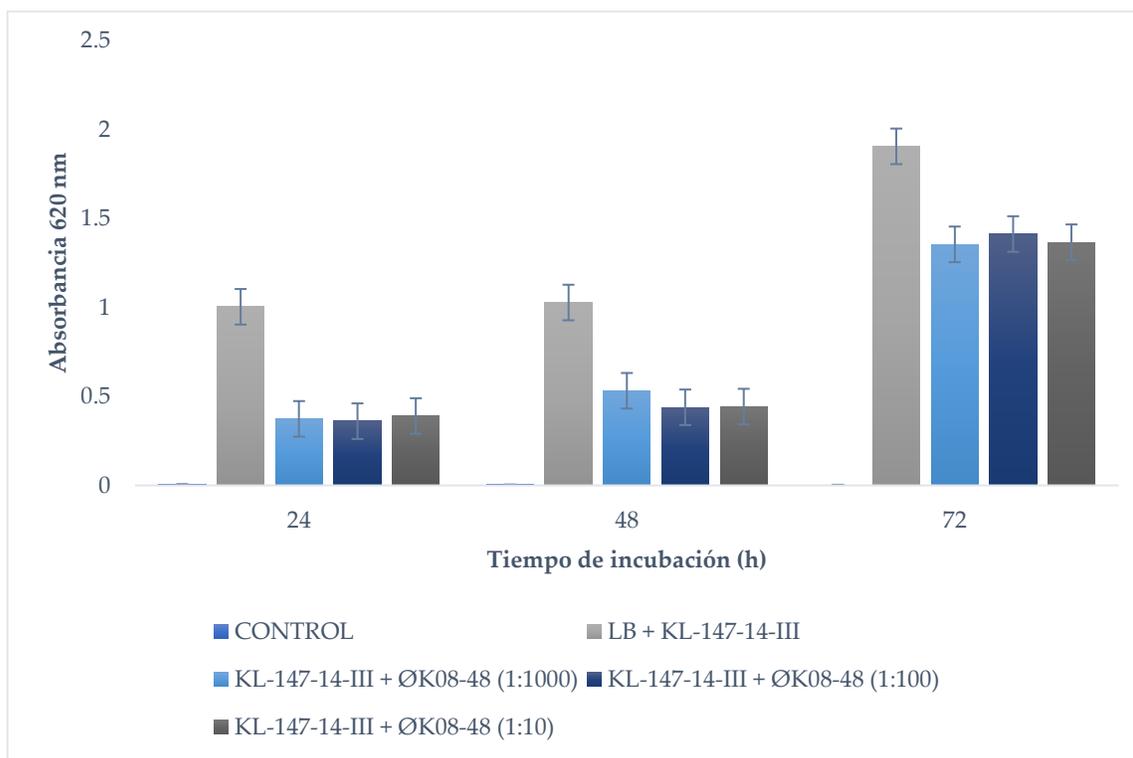
Debido a los resultados obtenidos que indican que la cepa de *K.pneumoniae* KL-147-14-III se distingue por su capacidad de formar una biopelícula y su alta resistencia a antibióticos (**Tabla 3**), se realizaron ensayos para determinar si el bacteriófago ØK08-48 tiene un efecto en el desarrollo de la biopelícula de esta cepa.

Los resultados obtenidos muestran que, a las 24 horas, la formación de la biopelícula representada en la condición control (cultivo bacteriano únicamente) mostró una  $DO_{620nm}$  de 1.004 y la condición de bacteria-fago en la proporción 1:1000 de 0.37, en la proporción 1:100 de 0.36 y en la proporción 1:10 de 0.39(**Figura 6**). Estos resultados representan una disminución del 63.14%, 64.14% y del 61.15%, respectivamente. Por

lo que el porcentaje de inhibición de la formación de la biopelícula es muy similar entre las 3 proporciones de fago y bacteria utilizadas.

A las 48 horas de incubación, los resultados observados en la condición control (sin contacto con el fago) una  $DO_{620nm}$  de 1.02 y la condición fago-bacteria en la proporción 1:1000 de 0.53, en la proporción 1:100 de 0.43 y en la proporción 1:10 se obtuvo una  $DO_{620nm}$  de 0.44, representando una disminución del 48.03%, 57.84% y 56.86% respectivamente.

En los resultados obtenidos a las 72 horas de incubación, la condición control presentó una  $DO_{620nm}$  de 1.9, mientras que en la condición fago-bacteria en la proporción 1:1000 presenta una DO de 1.35, en la proporción 1:100 de 1.41 y en la proporción 1:10 de 1.36, lo cual representa un porcentaje de disminución de la formación de biopelícula del 29.17%, 25.78% y 28.42% respectivamente.

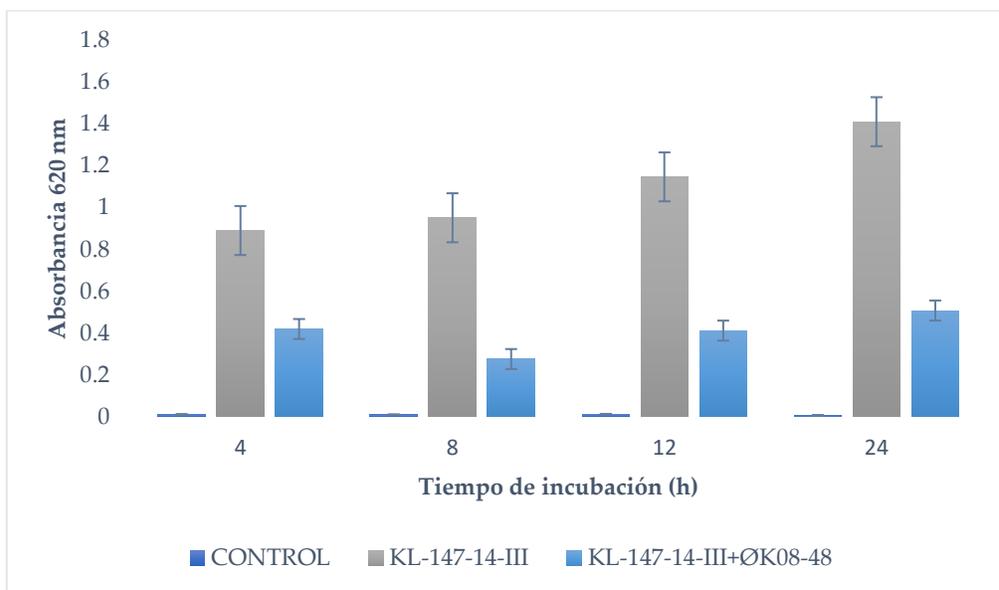


**Figura 6. Formación de biopelícula de la cepa KL-147-14-III en interacción con el bacteriófago ØK08-48.** La DO 620nm se obtuvo en función de la captación del cristal violeta después de la incubación a 24, 48 y 72 horas de tres ensayos independientes por triplicado y se señalan las barras de error típico.

## Análisis de la degradación de biopelícula de la cepa KL-147-14-III por el bacteriófago ØK08-48

Para el análisis de la degradación de biopelícula, en primera instancia, se dejó formar la biopelícula de la cepa KL-147-14-III durante 72 horas, ya que como se observó en los resultados previos, en este punto es bastante eficiente el desarrollo de la biopelícula. El desarrollo de la biopelícula en la condición control (en ausencia de fago) se observa en una línea de crecimiento exponencial durante las siguientes 24 horas de observación (**Figura 7**), mientras que, en la condición en presencia del bacteriófago, se observa una disminución importante de la biopelícula. A las 4 horas de interacción del bacteriófago ØK08-48 con la biopelícula formada por la cepa KL-

147-14-III se observa una disminución de ésta en un 52.87%. A las 8 horas de interacción se observa una disminución del 70.95%. Transcurridas las 12 horas de interacción, se registra una disminución del 64.14% y a las 24 horas de interacción, hay una disminución del 64.02%



**Figura 7.** Degradación de biopelícula formada por la cepa KL-147-14-III en interacción con el bacteriófago ØK08-48. La DO 620nm se obtuvo en función de la captación del cristal violeta después de la incubación a 4, 8, 12 y 24 horas de tres ensayos independientes por triplicado y se muestran las barras de error típico.

## 9. DISCUSIÓN

En el ambiente intrahospitalario, los pacientes y personal de la salud se encuentran susceptibles a desarrollar infecciones causadas por cepas bacterianas, las cuales, son los principales patógenos causantes de infecciones nosocomiales o infecciones asociadas a la atención de la salud. Entre éstas, se encuentra la bacteria *Klebsiella pneumoniae*. Esta bacteria, es el agente causal de infecciones en el tracto respiratorio, vejiga, hígado, torrente sanguíneo y cerebro. Además de presentar alta resistencia a los antibióticos de tercera, cuarta y quinta generación como los carbapenémicos y betalactámicos, son capaces de desarrollar biopelículas que las proveen de mecanismos de defensa eficientes para permanecer en el sitio de infección durante periodos prolongados de tiempo, convirtiéndose en infecciones crónicas y recurrentes (Cooper *et al.*, 2014).

Se cree que las biopelículas son la causa subyacente de las enfermedades crónicas causadas por bacterias, pues se ha observado que los antibióticos difícilmente penetran en la superficie interna de las biopelículas (Debarbieux *et al.*, 2010; Mah *et al.*, 2003).

Debido al incremento de la incidencia de este patógeno, se ha retomado el interés por el estudio de los bacteriófagos para ser utilizados como terapia alternativa de tratamiento, cuando los métodos convencionales no son suficientes para su control.

Los bacteriófagos han sido utilizados para desinfectar al ser rociados sobre superficies en ambientes intrahospitalarios, resultando en una menor incidencia de infecciones nosocomiales (Andrade *et al.*, 2015). Además, se ha aprobado el uso de bacteriófagos para protección de alimentos y fitosanitaria en el campo (Endersen *et al.*, 2014; Taylor *et al.*, 2012).

La terapia con bacteriófagos también se ha utilizado en el tratamiento y prevención de infecciones causadas por *E. coli*, *Salmonella* y *Campylobacter* en aves de corral (Johnson *et al.*, 2008; Tsonos *et al.*, 2013).

Cuando las terapias con antibióticos comenzaron a fallar a causa de la resistencia bacteriana, renace el interés en la fagoterapia (Hermoso, 2007; Watanabe *et al.*, 2007), debido a que el tratamiento con fagos tiene diversas ventajas al ser comparada con la terapia con antibióticos;

Gracias a que los fagos tienen la capacidad de mutar, pueden contrarrestar la resistencia que puedan generar las bacterias sobre ellos, en cambio con los antibióticos, cuando las bacterias desarrollan resistencia, usan mecanismos para que el antibiótico pierda sus propiedades y que no puedan unirse al sitio blanco (Carlton, 1999).

El tratamiento con bacteriófagos no genera efectos secundarios significativos para animales, plantas y humanos (Kutter *et al.*, 2010; Ramirez, 2016), y se ha observado que los antibióticos han causado alergias, infecciones secundarias en hígado y riñones, daño en la microbiota del hospedero, entre otros efectos (Kutter *et al.*, 2010).

La producción y selección de un nuevo fago es un proceso rápido y relativamente económico. En el laboratorio, el proceso de selección puede completarse en meses, mientras que el desarrollo de un antibiótico puede llevarse años de investigación (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Los bacteriófagos son específicos respecto al género y especie bacteriano, por lo que tratan específicamente a la bacteria causante de la infección sin afectar la microbiota normal (Watanabe *et al.*, 2007) y desaparecen en ausencia del huésped (Oliveira *et al.*, 2015).

Los bacteriófagos que tienen ciclos de replicación lítica, tienen efectos bactericidas, por lo que las bacterias no vuelven a ser viables, mientras que algunos de los antibióticos que son suministrados son bacteriostáticos y solo impiden el desarrollo y la multiplicación bacteriana permitiendo más fácilmente el desarrollo de la resistencia (Loc-Carrillo & Abedon, 2011).

El éxito de las terapias con bacteriófagos depende de la caracterización y selección de fagos con ciclos de replicación líticos y con la producción de depolimerasas.

En este estudio, fue de interés el evaluar la capacidad del bacteriófago ØK08-48 para inhibir biopelículas de distintas cepas de la bacteria *Klebsiella pneumoniae*. Este fago fue previamente aislado de aguas residuales de la ciudad de México y caracterizado por María Hernández en su tesis “Caracterización de bacteriófagos de *Klebsiella pneumoniae* ØK08-48, ØK10-12, ØK11-38 y ØK11-42”, de acuerdo con su morfología de placa, en la cual se presentan dos halos de inhibición superpuestos (Hernandez, 2018). Esta observación sugiere la producción de depolimerasas, debido a que el primer halo claro corresponde al efecto lítico del fago y el segundo halo turbio a un efecto debido a la acción de las enzimas depolimerasas como se ha observado en otras fagos de *Enterobacter agglomerans* (Sutherland *et al.*, 2004).

Para cumplir con los objetivos de este estudio, se inició con en el análisis de la formación de biopelículas de cuatro cepas de *Klebsiella pneumoniae*, (KL-147-14-III, KL-08, KL-10 y *K. pneumoniae* ATCC 700603) con la finalidad de identificar cuáles de ellas tienen la capacidad de formar biopelículas. Al emplear el protocolo para medir la formación de biopelícula, se obtuvo a KL-147-14-III como la principal cepa productora de biopelícula, ya que, en cada una de las mediciones realizadas a diferentes tiempos de incubación, presentó densidades ópticas que sobresalen significativamente del resto de las cepas. Lo cual podría sugerir que el resto de las cepas requiere de otras condiciones de cultivo para el desarrollo de biopelículas,

entre las que se incluyen cambio de temperatura y otros nutrientes como el hierro (Cooper *et al.*, 1981).

Al evaluar la relación respecto al perfil de resistencia a antibióticos y su capacidad para formar biopelículas (**Tabla 3**), se observó claramente que su capacidad para formar biopelículas si está estrechamente relacionada con su perfil de resistencia como ha sido observado en cepas patógenas de *Escherichia coli* (Neupane *et al.*, 2016). La cepa KL-147-14-III es resistente a 10 de los 16 antibióticos probados de forma rutinaria, lo que implica una sensibilidad a 6 de los antibióticos probados (eritapenem, meropenem, nitrofurantoína, ciprofloxacino, tigeciclina y trimetoprima), además de presentar BLEEs. La cepa KL-08 es sensible a la mayoría de los antibióticos probados con excepción de la ampicilina. Así mismo, puede observarse, que no es tan eficiente como la cepa KL-147-14-III en la formación de biopelículas o requiere de un mayor tiempo para formarla, por lo que los antibióticos podrían tener un efecto microbicida eficiente en esta cepa bacteriana.

Posteriormente, se evaluó el efecto del bacteriófago ØK08-48 en la formación de biopelícula de la cepa KL-147-14-III. El efecto del fago, resulto en una reducción de la formación de biopelícula mínima de 52 % y un efecto máximo del 72% en las tres concentraciones analizadas. En el último tiempo medido (72 h), se observó un aumento de biopelícula por lo que podríamos sugerir la aplicación de una segunda dosis del fago para prolongar la infección y que la formación de biopelícula siga disminuyendo. También observamos que la acción lítica del fago parece ejercer una disminución en cada concentración de forma semejante, quizás debido a que las diversas proporciones utilizadas son mayores respecto a la proporción de bacteria analizada (Oliveira *et al.*, 2015).

En tercera instancia, se analizó el efecto del fago sobre la biopelícula ya formada de KL-147-14-III, los resultados indicaron el potencial de este bacteriófago para inhibir las biopelículas formadas desde las primeras 4 horas de su aplicación, y en todos los tiempos posteriores también, aunque el porcentaje de desestabilización de las biopelículas fueron ligeramente menores.

Al observar el comportamiento de las biopelículas en los últimos tiempos de incubación, podríamos sugerir la aplicación de una segunda dosis del fago o utilizar la concentración más alta de bacteriófagos para prolongar el proceso infectivo y que la biopelícula siga disminuyendo.

El bacteriófago puede reducir en gran medida la cantidad de biopelícula presente dentro de las 12 primeras horas del experimento de infección, con una reducción aún más importante a las 8 horas de la aplicación del bacteriófago. En un estudio realizado por Yuyu Yuan y colaboradores en 2019, reportan una disminución de biopelícula de *P. aeruginosa* por la interacción con bacteriófagos mostrando un comportamiento muy similar al obtenido en este ensayo, de igual manera a las 8 horas de la aplicación del bacteriófago presenta la reducción de biopelícula más importante de todas las mediciones realizadas (Yuan *et al.*, 2019) por lo que podrían realizarse estudios del tiempo preciso que requieren los bacteriófagos para mejorar su eficiencia.

Los fagos que infectan bacterias Gram negativas reconocen los restos de polisacáridos o de proteínas de la membrana externa como las porinas como receptores (Morita *et al.*, 2002; Schwartz, 1973), posteriormente se da la inyección del material genético (González-huici *et al.*, 2004). Para penetrar en la capa de peptidoglicano de las bacterias, los fagos codifican enzimas hidrolizantes de peptidoglicano (Moak & Molineux, 2004), además contienen enzimas líticas, que

garantiza la lisis de la célula (Rydman & Bamford, 2000, 2002). Esta propiedad de producir diversas enzimas vuelve a fagos candidatos potenciales para el tratamiento de bacterias en crecimiento planctónico y en biopelícula.

El bacteriófago ØK08-48 además de presentar las características generales de un ciclo lítico de replicación y ser específico de *Klebsiella pneumoniae*, presenta una estabilidad infectiva a amplios rangos de pH (3-11) asegurando su eficacia al interaccionar con los cambios de pH y temperatura que puedan conferir los microambientes de la biopelícula (Hernandez, 2018).

En el análisis de los resultados obtenidos, sugerimos que el bacteriófago ØK08-48 es un candidato importante para continuar con su estudio, ya que en un futuro podría ser usado potencialmente en la terapia contra infecciones causadas por cepas formadoras de biopelículas de *Klebsiella pneumoniae*, debido a que puede observarse una disminución importante en la formación e inhibición de las biopelículas ya formadas.

## 10.CONCLUSIONES

- De acuerdo con los experimentos realizados, la cepa KL-147-14-III es muy eficiente formando biopelículas en las condiciones analizadas.
- En la cepa KL-147-14-III de *K. pneumoniae* se observó que su capacidad de formar biopelículas está estrechamente relacionada con su perfil de resistencia a antibióticos.
- El bacteriófago ØK08-48 es capaz de inhibir la formación de biopelículas de cepas de *Klebsiella pneumoniae* en alrededor de un 63%.
- El bacteriófago ØK08-48 es capaz de degradar la biopelícula formada de la cepa de *K. pneumoniae* KL-147-14-III con un pico máximo de 72%
- De acuerdo con el análisis realizado, se sugiere al bacteriófago ØK08-48 como un potencial candidato para continuar con su estudio y que en el futuro sea factible su aplicación en terapias contra infecciones provocadas por la bacteria *Klebsiella pneumoniae* formadora de biopelícula.

## 11.PERSPECTIVAS

- Ampliar el análisis de efectividad de inhibición de biopelículas utilizando una combinación de antibióticos y bacteriófagos específicos de *K. pneumoniae*
- Identificar la presencia de las depolimerasas presentes en el fago ØK08-48 que degradan la biopelícula de *K. pneumoniae*
- Caracterizar las depolimerasas presentes en el fago ØK08-48 que degradan la biopelícula de *K. pneumoniae*
- Evaluar la eficacia del bacteriófago ØK08-48 contra infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae* utilizando modelos animales.

## 12.BIBLIOGRAFÍA

- Abedon, S. T., Thomas-Abedon, C., Thomas, A., & Mazure, H. (2011).** Bacteriophage prehistory. *Bacteriophage*, 1(3), 174–178.  
<https://doi.org/10.4161/bact.1.3.16591>
- Ackermann, H. W. (2001).** Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Archives of Virology*, 146(5), 843–857.  
<https://doi.org/10.1007/s007050170120>
- Andrade, D. De, Rigotti, M. A., Teresa, M., & Almeida, G. De. (2015).** *Evaluación de la desinfección de superficies hospitalarias por diferentes Método Pruebas utilizadas.* 23(3), 466–474. <https://doi.org/10.1590/0104-1169.0094.2577>
- Branda, S. S., Vik, Å., Friedman, L., & Kolter, R. (2005).** Biofilms: The matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13(1), 20–26.  
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006>
- Brüssow, H., & Desiere, F. (2001).** Comparative phage genomics and the evolution of siphoviridae: Insights from dairy phages. *Molecular Microbiology*, 39(2), 213–223. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02228.x>
- C, J. N. (2007).** *Biofilms bacterianos Bacterial biofilms.* 61–72.
- Carlton, R. M. (1999).** Phage therapy: Past history and future prospects. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 47(5), 267–274.
- Catalina, P. (2015).** *Fagoterapia , alternativa para el control de las infecciones bacterianas . Perspectivas en Colombia.* 20(1), 43–59. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC20-1.faci>
- Clark, J. R., & March, J. B. (2006).** Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends in Biotechnology*, 24(5), 212–218.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.03.003>
- Cooper, D. G., Macdonald, C. R., Duff, S. J. B., & Kosaric, N. (1981).** *Enhanced Production of Surfactin from Bacillus subtilis by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions.* 42(3), 408–412.
- Cooper, R. A., Bjarnsholt, T., & Alhede, M. (2014).** Biofilms in wounds: A review of present knowledge. *Journal of Wound Care*, 23(11), 570–582.  
<https://doi.org/10.12968/jowc.2014.23.11.570>
- Costerton, 1. William, Cheng, K. -I., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, 1. Curtis, Dasgupta, M., & Marrie, T. . I. (1987).** Australian Marsupial Trichosurus. *Ann.*

*Rev. Microbiol*, 41(1), 435–464. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3318676/>

- Davey, M. E., George, A. O., Davey, M. E., & Toole, G. A. O. (2000).** *Microbial Biofilms : from Ecology to Molecular Genetics* *Microbial Biofilms : from Ecology to Molecular Genetics*. 64(4). <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000>. Updated
- De Beer, D., Stoodley, P., Roe, F., & Lewandowski, Z. (1994).** Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnology and Bioengineering*, 43(11), 1131–1138. <https://doi.org/10.1002/bit.260431118>
- De Rosa, F. G., Corcione, S., Cavallo, R., Di Perri, G., & Bassetti, M. (2015).** Critical issues for *Klebsiella pneumoniae* KPC-carbapenemase producing *K. pneumoniae* infections: A critical agenda. *Future Microbiology*, 10(2), 285–296. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.121>
- Debarbieux, L., Leduc, D., Maura, D., Morello, E., Criscuolo, A., Grossi, O., Balloy, V., & Touqui, L. (2010).** Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *Journal of Infectious Diseases*, 201(7), 1096–1104. <https://doi.org/10.1086/651135>
- Desiere, F., Pridmore, R. D., & Brussow, H. (2000).** Comparative genomics of the late gene cluster from *Lactobacillus* phages. *Virology*, 275(2), 294–305. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0498>
- Domínguez Navarrete, N. (2020).** Bacteriófagos. *Revista de La Facultad de Medicina Humana*, 20(1), 164–165. <https://doi.org/10.25176/rfmh.v20i1.2554>
- Echeverri, L., & Cataño, J. (2010).** *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia TT - *Klebsiella pneumoniae* as a nosocomial pathogen: epidemiology and drug resistance. *Iatreia*, 23(3), 240–249. <http://www.iatreia.udea.edu.co/index.php/iatreia/article/view/1356/1028>
- Endersen, L., Mahony, J. O., Hill, C., Ross, R. P., Mcauliffe, O., & Coffey, A. (2014).** *Phage Therapy in the Food Industry*. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092415>
- Fletcher, M. (1991).** The Physiological Activity of Bacteria Attached to Solid Surfaces. *Advances in Microbial Physiology*, 32(C), 53–85. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60005-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60005-3)
- González-Huici, V., Salas, M., & Hermoso, J. M. (2004).** *The push – pull mechanism of bacteriophage Ø29 DNA injection*. 52, 529–540. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.03993.x>

- Hanlon, G. W. (2007).** Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30(2), 118–128. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.04.006>
- Hermoso, J. A. (2007).** *Taking aim on bacterial pathogens : from phage therapy to enzybiotics* ' L Garcí ' a 2 and Pedro Garcí. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.08.002>
- Hernandez, M. (2018).** "Caracterización de bacteriófagos específicos de *Klebsiella pneumoniae*  $\phi$ K08-48,  $\phi$ K10-12,  $\phi$ K11-38 y  $\phi$ K11-42." Universidad de Guanajuato.
- Hirsch, E. B., & Tam, V. H. (2010).** Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): An emerging cause of multidrug-resistant infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(6), 1119–1125. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq108>
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofu, O. (2010).** Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(4), 322–332. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011>
- Hughes, K. A., Sutherland, I. W., Jones, M. V., & Rutherford, D. (1996).** Biofilm susceptibility to bacteriophage attack : the role of phage-borne polysaccharide degrading enzyme. *Microbiology*, 144(1998), 3039–3047.
- Hyle, E. P., Lipworth, A. D., Zaoutis, T. E., Nachamkin, I., Fishman, N. O., Bilker, W. B., Mao, X., & Lautenbach, E. (2005).** Risk factors for increasing multidrug resistance among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species. *Clinical Infectious Diseases*, 40(9), 1317–1324. <https://doi.org/10.1086/429239>
- Jagnow, J., & Clegg, S. (2003).** *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. *Microbiology*, 149(9), 2397–2405. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26434-0>
- Johnson, R. P., Gyles, C. L., Huff, W. E., Ojha, S., Huff, G. R., & Rath, N. C. (2008).** *Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle , poultry and pigs*. 9(2). <https://doi.org/10.1017/S1466252308001576>
- Kameyama, L., & Oviedo, N. (2001).** *Bacteriófago Lambda*. October.
- Kropinski, A. M., Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E., & Johnson, R. P. (2009).** Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 501, 69–76. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_7)

- Krylov, V., Shaburova, O., Pleteneva, E., Bourkaltseva, M., Krylov, S., Kaplan, A., Chesnokova, E., Kulakov, L., Magill, D., & Polygach, O. (2016).** Modular approach to select bacteriophages targeting *Pseudomonas aeruginosa* for their application to children suffering with cystic fibrosis. *Frontiers in Microbiology*, 7(OCT), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01631>
- Kutter, E., De Vos, D., Gvasalia, G., Alavidze, Z., Gogokhia, L., Kuhl, S., & Abedon, S. (2010).** Phage Therapy in Clinical Practice: Treatment of Human Infections. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(1), 69–86. <https://doi.org/10.2174/138920110790725401>
- Kvist, M., Hancock, V., & Klemm, P. (2008).** Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(23), 7376–7382. <https://doi.org/10.1128/AEM.01310-08>
- Livermore, D. M., Warner, M., Mushtaq, S., Doumith, M., Zhang, J., & Woodford, N. (2011).** What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37(5), 415–419. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.01.012>
- Loc-Carrillo, C., & Abedon, S. T. (2011).** Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 1(2), 111–114. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.14590>
- López-herrera, J. R., Méndez-cano, A. F., & Bobadilla-espinoza, R. I. (2012).** Infecciones nosocomiales, mortalidad atribuible y sobre estancia hospitalaria. *Revista de Enfermería Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 20(2), 85–90.
- Mah, T. F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G. C., Stewart, P. S., & O'Toole, G. A. (2003).** A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*, 426(6964), 306–310. <https://doi.org/10.1038/nature02122>
- Manning, S. C. (2003).** Basics of biofilm in clinical otolaryngology. *Ear, Nose and Throat Journal*, 82(SUPPL. 8), 18–20. <https://doi.org/10.1177/014556130308208s07>
- Moak, M., & Molineux, I. J. (2004).** Peptidoglycan hydrolytic activities associated with bacteriophage virions. 51, 1169–1183. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03894.x>
- Monk, A. B., Rees, C. D., Barrow, P., Hagens, S., & Harper, D. R. (2010).** Bacteriophage applications: Where are we now? *Letters in Applied Microbiology*, 51(4), 363–369. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02916.x>

- Montgomerie, J. Z. (1979).** Epidemiology of klebsiella and hospital-associated infections. *Reviews of Infectious Diseases*, 1(5), 736.  
<https://doi.org/10.1093/clinids/1.5.736>
- Morejón García, M. (2013).** Betalactamasas de espectro extendido. *Revista Cubana de Medicina*, 52(4), 272–280.
- Morita, M., Tanji, Y., Mizoguchi, K., & Akitsu, T. (2002).** Characterization of a virulent bacteriophage specific for *Escherichia coli* O157 : H7 and analysis of its cellular receptor and two tail fiber genes. 211.
- Nallelyt, S. A., Efrén, H. B., Oliver, L. V., & Oscar, T. A. (2010).** Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas (fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 41(3), 17–26.
- Neupane, S., Pant, N. D., Khatiwada, S., Chaudhary, R., & Banjara, M. R. (2016).** Correlation between biofilm formation and resistance toward different commonly used antibiotics along with extended spectrum beta lactamase production in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from the patients suspected of urinary tract infections visiting Shree Birendra. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13756-016-0104-9>
- O’Toole, G. A., & Kolter, R. (1998).** Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: A genetic analysis. *Molecular Microbiology*, 28(3), 449–461.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x>
- Oliveira, H., Sillankorva, S., Merabishvili, M., & Kluskens, L. D. (2015).** Unexploited opportunities for phage therapy. 6(September), 1–4.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00180>
- Park, B. H. (1956).** An enzyme produced by a phage-host cell system. I. The properties of a *Klebsiella* phage. *Virology*, 2(6), 711–718.  
[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(56\)90053-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(56)90053-8)
- Peeters, E., Nelis, H. J., & Coenye, T. (2008).** Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*, 72(2), 157–165.  
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.11.010>
- Pires, D. P., Oliveira, H., Melo, L. D. R., Sillankorva, S., & Azeredo, J. (2016).** Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(5), 2141–2151.

<https://doi.org/10.1007/s00253-015-7247-0>

- Rahal, J. J., Urban, C., Horn, D., Freeman, K., Segal-Maurer, S., Maurer, J., Mariano, N., Marks, S., Burns, J. M., Dominick, D., & Lim, M. (1998).** Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial *Klebsiella*. *Journal of the American Medical Association*, 280(14), 1233–1237. <https://doi.org/10.1001/jama.280.14.1233>
- Ramadan, H. H., Sanclement, J. A., & Thomas, J. G. (2005).** Chronic rhinosinusitis and biofilms. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 132(3), 414–417. <https://doi.org/10.1016/j.otohns.2004.11.011>
- Ramirez, B. (2016).** Tesis Doctoral Aislamiento, caracterización y estudios de actividad de bacteriófagos líticos sobre enterococcus spp. En modelos in vivo e in vitro. *Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata*.
- Reyes, R. (2005).** *Universidad de Guadalajara* 52(321), 1–2.
- Rydman, P. S., & Bamford, D. H. (2000).** Bacteriophage PRD1 DNA entry uses a viral membrane-associated transglycosylase activity. 37, 356–363.
- Rydman, P. S., & Bamford, D. H. (2002).** The Lytic Enzyme of Bacteriophage PRD1 Is Associated with the Viral Membrane. 184(1), 104–110. <https://doi.org/10.1128/JB.184.1.104>
- Sarduy Bermúdez, L., & González Díaz, M. (2016).** La biopelícula: una nueva concepción de la placa dentobacteriana. *Medicentro Electrónica*, 20(3), 167–175.
- Schwartz, M. (1973).** Isolation of the Bacteriophage Lambda Receptor from *Escherichia coli*. 116(3), 1436–1446.
- Secretaría de Salud. (2015).** Dirección General de Epidemiología. Informe anual 2015. *Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE)*, 1, 1–61. <https://www.gob.mx/salud/documentos/informes-rhove-2015>
- Sirijan Santajit, & Nitaya Indrawattana. (2016).** Mechanisms of antimicrobial resistance in Pasteurellaceae. *PBioMed Research International*, 2016(1155), 1–8.
- Skurnik, M., & Strauch, E. (2006).** Phage therapy: Facts and fiction. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(1), 5–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.09.002>
- Snitkin, E. S., Zelazny, A. M., Thomas, P. J., Stock, F., Henderson, D. K., Palmore, T. N., & Segre, J. A. (2012).** Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with whole-genome sequencing. *Science Translational Medicine*, 4(148). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004129>

- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris, J. (2001).** Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 649–659. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.649-659.2001>
- Sutherland, I. W., Hughes, K. A., Skillman, L. C., & Tait, K. (2004).** The interaction of phage and biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 232(1), 1–6. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(04\)00041-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(04)00041-2)
- Taylor, P., Jones, J. B., Vallad, G. E., Iriarte, F. B., Obradovi, A., Wernsing, M. H., Jackson, L. E., Balogh, B., Hong, J. C., Jones, J. B., Vallad, G. E., Iriarte, F. B., Obradović, A., Wernsing, M. H., Jackson, L. E., & Balogh, B. (2012).** *disease control Considerations for using bacteriophages for plant disease control. December 2014*, 37–41. <https://doi.org/10.4161/bact.23857>
- Tsonos, J., Vandenheuvel, D., Briers, Y., Greve, H. De, Hernalsteens, J., & Lavigne, R. (2013).** Hurdles in bacteriophage therapy : Deconstructing the parameters. *Veterinary Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.11.001>
- Van Loosdrecht, M. C. M., Lyklema, J., Norde, W., & Zehnder, A. J. B. (1990).** Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiological Reviews*, 54(1), 75–87. <https://doi.org/10.1128/membr.54.1.75-87.1990>
- Vuotto, C., Longo, F., Balice, M. P., Donelli, G., & Varaldo, P. E. (2014).** Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens*, 3(3), 743–758. <https://doi.org/10.3390/pathogens3030743>
- Watanabe, R., Matsumoto, T., Sano, G., Ishii, Y., Tateda, K., Sumiyama, Y., Uchiyama, J., Sakurai, S., Matsuzaki, S., Imai, S., & Yamaguchi, K. (2007).** *Efficacy of Bacteriophage Therapy against Gut-Derived Sepsis Caused by Pseudomonas aeruginosa in Mice* . 51(2), 446–452. <https://doi.org/10.1128/AAC.00635-06>
- Xie, H., Zhuang, X., Kong, J., Ma, G., & Zhang, H. (2005).** Bacteriophage Esc-A is an efficient therapy for *Escherichia coli* 3-1 caused diarrhea in chickens. *Journal of General and Applied Microbiology*, 51(3), 159–163. <https://doi.org/10.2323/jgam.51.159>
- Yuan, Y., Qu, K., Tan, D., Li, X., Wang, L., Cong, C., Xiu, Z., & Xu, Y. (2019).** Isolation and characterization of a bacteriophage and its potential to disrupt multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbial Pathogenesis*, 128(January), 329–336. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.032>

