

Estudio de la biología de bacteriófagos líticos que infectan a *Klebsiella pneumoniae* resistente

Acosta Olvera Dulce Bibiana, Hernández Villanueva Hugo Abraham, Martínez Pacheco José Leonardo, Reyes Cortés Ruth

Departamento de Biología. División de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Guanajuato. reyes.ruth@ugto.mx

Resumen

La creciente selección de bacterias resistentes a los antibióticos es un problema de salud pública a nivel mundial. Ante esta problemática se ha intensificado el estudio de terapias alternativas. Un ejemplo, es el estudio de la interacción bacteriófago y bacteria. Los bacteriófagos o fagos líticos son virus que infectan y lisan a su bacteria huésped. Por lo cual, esta interacción ha sido considerada una opción de tratamiento para contrarrestar a las bacterias multirresistentes como *Klebsiella pneumoniae*. Este género bacteriano presenta capsula y es capaz de formar biopelículas. Ambas características son importantes factores de virulencia debido a que favorecen la resistencia a antimicrobianos, lo que provoca infecciones recurrentes que representan un serio problema para su control en el área hospitalaria. Además, *K. pneumoniae* está considerada como un género de estudio de prioridad alta según la Organización Mundial de la Salud. El estudio del bacteriófago completo o de algunos de sus componentes como las enzimas que degradan las capsulas de polisacáridos bacterianos (depolimerasas), son de gran interés para su utilización como agentes terapéuticos. Por lo que, nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en el estudio de dos fagos que infectan a *K. pneumoniae* nombrados K08-48 y K06-11 para analizar la producción de depolimerasas y aportar conocimiento nuevo de la biología de estos fagos para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento.

Palabras clave: bacteriófagos, resistencia bacteriana, *K. pneumoniae*, biopelículas.

Introducción

Uno de los problemas más alarmantes actualmente es la multirresistencia adquirida por los microorganismos patógenos. La multirresistencia es causada por factores como la automedicación, el exceso de prescripciones de antibióticos, el incumplimiento de la medicación, entre otros (Organización Mundial de la Salud, 2017). Una de las bacterias multirresistentes es *Klebsiella pneumoniae*, debido a la producción de beta lactamasas de espectro amplio y carbapenemasas (Peña, *et al.*, 2001). En los últimos años, este patógeno ha incrementado su incidencia en aislados clínicos causantes de enfermedades de vías respiratorias, vías urinarias, septicemias, entre otras, con altas tasas de mortalidad, afectando principalmente a pacientes inmunosuprimidos, neonatos y adultos mayores (Secretaría de Salud, 2016).

Klebsiella pneumoniae pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es un bacilo Gramnegativo, anaerobio facultativo, inmóvil que presenta capsula. Usualmente se encuentra en las mucosas de los mamíferos y coloniza la nasofaringe y el tracto gastrointestinal en los seres humanos (Echeverri *et al.*, 2010).

En México, los reportes muestran a *K. pneumoniae* como uno de los principales microorganismos causales de infecciones intrahospitalarias, con niveles significativos de morbilidad y mortalidad (Fuentes *et al.*, 2020). La característica de mayor relevancia es su alta capacidad de resistencia a antibióticos como las cefalosporinas de tercera generación (76.4%), a las de cuarta generación (25.5%) y a los carbapenémicos (12.7%) (Fuentes *et al.*, 2020). En la resistencia de *K. pneumoniae* también participa su cápsula hidrófila formada por repeticiones de oligosacáridos de 4 a 6 subunidades de azúcares neutros como: manosa, ramnosa, galactosa, piruvato y residuos de fucosa, además de ácidos urónicos en distintas combinaciones, lo que al mismo tiempo favorece la capacidad de producir biopelícula (Romero *et al.*, 2020).

La biopelícula de microorganismos se define como una comunidad microbiana, ya sea mono microbiana o poli microbiana, embebida en una matriz extracelular producida por los microorganismos, que se encuentra adherida a una superficie o a un tejido. La biopelícula provoca dificultad para el acceso del antimicrobiano a la célula, haciendo que la cantidad del microbicida que en realidad alcanza a las bacterias sean demasiado bajas para ejercer un efecto. (Lasa *et al.*, 2005).

Ante esta problemática se ha intensificado el estudio de las terapias alternativas de tratamiento, como el estudio de los bacteriófagos. Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan de manera exclusiva a las bacterias. Su tamaño se encuentra entre 20 y 200 nm, están ampliamente distribuidos y se ha estimado que existen 10^{10} fagos/litro de agua de mar, lo que representa un excelente mecanismo de regulación de las poblaciones bacterianas marinas, además de un excelente repositorio de fagos (Castaño *et al.*, 2019). Estructuralmente, los fagos complejos como los de la serie T, poseen una cabeza de simetría icosaédrica que contiene el genoma (DNA o RNA). Unido a la cápside se encuentra una estructura helicoidal denominada cauda o cola, la cual es importante para la inyección del genoma viral en la bacteria huésped. Además, presentan un disco en parte distal de la cola, a la cual se encuentran unidas fibras flexibles de tipo proteico que permiten su fijación a la superficie de la bacteria (Castaño *et al.*, 2019).

Los bacteriófagos líticos una vez que infectan a la bacteria se apoderan de su maquinaria replicativa para generar múltiples copias y finalmente lisan a la bacteria. Por el contrario, los fagos temperados insertan su material genético en el cromosoma bacteriano para que éste sea copiado y transmitido junto con el propio DNA de la célula huésped (Castaño *et al.*, 2019).

El proceso de infección fago-bacteria, sobre todo en aquellas bacterias que producen capsula es mediado por las enzimas denominadas depolimerasas, las cuales son enzimas capaces de degradar la capsula de polisacáridos para acceder a la célula blanco. Las depolimerasas pueden ser proteínas solubles o proteínas unidas a las proteínas estructurales del fago. Son enzimas muy específicas, ya que en muchos casos determinan la unión fago-receptor, como ocurre en *K. pneumoniae*, donde las depolimerasas son dependientes del tipo capsular. Además, pueden ser útiles para la eliminación de biopelículas debido a la naturaleza polisacárida de la matriz extracelular (Castaño *et al.*, 2019).

Por lo que, el objetivo de este estudio fue generar información nueva de los fagos de *K. pneumoniae* como su rango de huésped y si producen depolimerasas, con la finalidad de que este conocimiento sea utilizado para el desarrollo de estrategias que permitan contrarrestar las infecciones ocasionadas por *K. pneumoniae* multirresistentes.

Metodología experimental

Material biológico y condiciones de cultivo.

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio son aislados clínicos de *K. pneumoniae* provenientes de hemocultivos del Instituto Nacional de Pediatría durante el 2002. Las bacterias se cultivaron en medio Luria Bertani (LB) sólido y líquido suplementado con Sulfato de Magnesio 1M, a 37°C en agitación constante (150 rpm).

Los bacteriófagos K08-48 y K06-11 fueron aislados previamente a partir de aguas residuales de la Ciudad de México. Para observar la replicación del fago se realizaron tapices de las cepas bacterianas receptoras en medio T ϕ sólido y T ϕ semisólido. También se utilizó buffer SM pH 7.5 (el cual mantiene la integridad de las partículas virales) como diluyente para la preparación de diluciones seriadas.

Expansión de fagos

En un matraz de 250 mL estéril se colocaron de 4-6 placas de fagos y 300 μ L de un cultivo bacteriano de toda se permitió la interacción durante 10 minutos. Posteriormente, se agregaron 10 mL de LB líquido y se incubó a 37°C con agitación constante (150 rpm) durante 4 a 6 horas o hasta observar la lisis del cultivo. Una vez observada la lisis celular se añadió 1 mL de cloroformo y se agitó durante 5 min. La mezcla se centrifugó a 7741 xg durante 10 min a 4°C (rotor JA20). Finalmente se tomó el sobrenadante o lisado que contiene a los fagos (Sambrook *et al.*, 1989).

Titulación de los fagos

Para la titulación del fago se realizó un ensayo de doble placa por goteo, el cual consiste en formar un tapiz bacteriano con 500ul de un cultivo de toda la noche y 3mL de medio suave. Por otro lado, se realizaron diluciones seriadas del lisado de fago 1:100. Posteriormente se gotearon 10 µL de cada dilución sobre el tapiz de la respectiva cepa receptora. Las gotas se dejaron secar durante 10 minutos y la caja se incubó a 37°C durante 12 horas para observar la formación de los halos de inhibición o Unidades Formadoras de Placas (UFP). Finalmente se contaron las placas obtenidas en cada dilución, calculado las UFP/mL de acuerdo con la siguiente ecuación (Sambrook, et al 1989).

$$UFP/mL = \left(\frac{\# \text{ placas}}{\text{volumen plaquedo en mL}} \right) \text{ inverso de la dilución } 10^{-x}$$

Determinación de la producción de depolimerasas

Para determinar si los fagos son productores de depolimerasas se analizó la morfología de placa de cada fago y se realizó mediciones de los halos de inhibición a través del tiempo (Dunstan, *et al.*, 2021). Para esto, se llevaron a cabo ensayos de doble placa utilizando 3 mL de T ϕ suave más 500 uL de la cepa bacteriana, y 10 uL del fago (1.7×10^4 UFP/mL para el fago Φ K08-48 y 6×10^4 UFP/mL para Φ K06-11), la mezcla se esparció en una caja de T ϕ sólido y se incubó a 37 °C durante 24, 48, 72 y 120 horas. También se tomaron fotografía con el fotodocumentador ChemiDoc-BioRad®.

Rango de Huésped

Para determinar el rango de huésped se utilizó el ensayo de doble placa por goteo, como se describe previamente, el cual consistió en realizar tapices bacterianos de 9 aislados clínicos de *K. pneumoniae*: ATCC700603, K01, K08, K07, K06, K10, K11, K147 y K172 y gotear las diluciones seriadas de las partículas infectivas. Las observaciones de la infección se determinaron después de 12 horas de incubación a 37°C.

Ensayo de hidrolisis de carbohidratos

Para determinar la especificidad de la enzima que produce la hidrolisis de carbohidratos se realizaron ensayos de degradación de polisacáridos (Huang, et al., 2015). Se utilizaron carbohidratos que han sido modificados con grupos que absorben o emiten luz a diferentes longitudes. La hidrolisis de O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (OPNG) se observará como un cambio en la coloración detectado por espectrometría. Para realizar este ensayo, se incubarán una solución de fago (10uL a 1×10^9 UFP/mL) con 50 uL de los azúcares en una solución que contenga fosfato de sodio (1mM a un pH de 7) y en un volumen final de 150 uL, se incubará la mezcla de reacción y se determinará a absorbancia de la muestra a 405 y a 600 mn a las 2, 4 y 12 h utilizando un espectrofotómetro Epoch, BioTek. Los substratos utilizados se muestran en la siguiente tabla 1.

Tabla 1. Carbohidratos utilizados en el ensayo de degradación

No. de tubo	CARBOHIDRATO
1	X-Gal
2	4-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside
3	Gal-FITC
4	2,3-X-Gal-NANA
5	Fuc-FITC
6	4-Nitrophenyl- β -D-manopynoside
7	Glu-FITC
8	AGUA

Resultados

Obtención de los lisados de fagos puros

Los lisados de los fago se obtuvieron despues de 4 horas de incubación. Para el fago K08-48 se obtuvo un lisado con un título de 1.7×10^{10} UFP/mL, para el fago K06-11 el título es de 6×10^9 UFP/mL. En la figura 1 se muestran las placas aisladas y con morfología de placa uniforme de las expansiones realizadas.

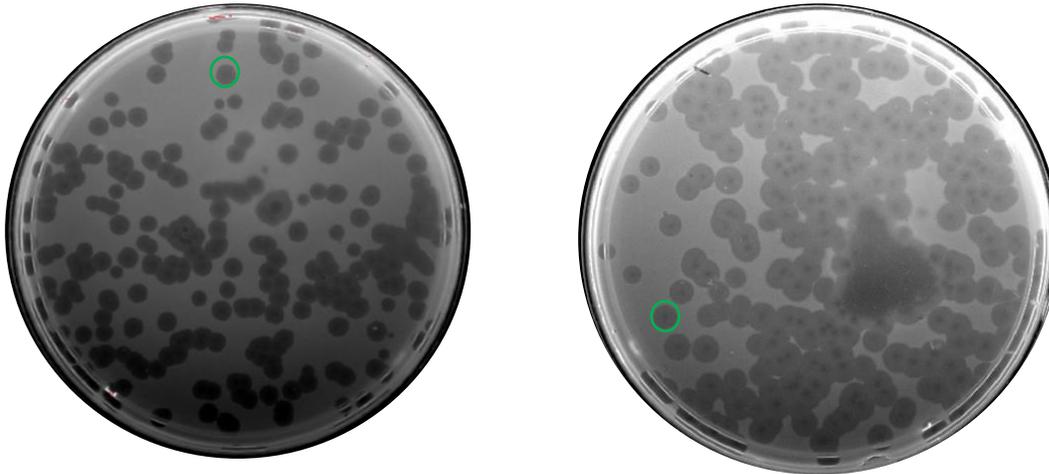


Figura 1. Morfología de placa de los fagos K08-48 (izquierda) y K06-11 (derecha)

Rango de huesped

En la Tabla 2 se muestran los resultados de ensayo de rango de huesped, en donde se puede analizar la susceptibilidad de los fagos K08-48 y K06-11 sobre 9 cepas bacterianas de *K. pneumoniae* (ATCC700603, K01, K08, K07, K06, K10, K11, K147 y K172). Las cepas presentan diferente susceptibilidad a los antibioticos convencionales (datos no mostrados). Los resultados muestran que el fago K08-48 infecta eficientemente a la cepa K08 y a la K147 y solamente es capaz de infectar a la cepa K07 cuando el título es alto. Por otra parte, el fago Φ K06-11 infecta eficientemente a las cepas K06, K10, K11 y K147.

Tabla 2. Rango de huésped de los fagos K08-48 y K06-11.

	K06-11				K08-48			
	10^{-2}	10^{-4}	10^{-6}	10^{-8}	10^{-2}	10^{-4}	10^{-6}	10^{-8}
ATCC600	-	-	-	-	-	-	-	-
K01	-	-	-	-	-	-	-	-
K06	+	+	1			-	-	-
K07	-	-	-	-	+	-	-	-
K08	-	-	-	-	+	+	+	-
K10	+	+	1		-	-	-	-
K11	+	3	-	-	-	-	-	-
K147	+	3			+	+	4	
K172	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) indica el desarrollo del fago; (-) indica la ausencia del desarrollo del fago y (#) el número de placas o halos de lisis

Determinación de la producción de depolimerasas.

En la Tabla 3 se muestran los resultados del análisis de morfología de placa de los fagos. El fago K06-11 a las 24 horas de incubación presento dos halos de inhibición, uno claro de 2 mm de diametro, y un halo turbio el cual fue aumentando de diametro respecto al tiempo hasta los 17.5 mm despues de 120 horas de incubación. Para el fago K08-48 tambien se observaron dos halos de inhibición. El halo turbio fue de 3.5 mm a las 2 horas y alcanzo un tamaño maximo de 13.48 a las 72 horas. De acuerdo con la literatura la presencia del halo claro representa la lisis mediada por la acción del fago sobre la celula y el halo turbio la acción de las depolimerasas degradando los polisacaridos capsulares

Tabla 3. Análisis de morfología de placa de los fagos K08-48 y K06-11.

	24 HRS		48 HRS		72 HRS		96 HRS		120 HRS	
	Halo claro	Halo turbio	Halo claro	Halo turbio	Halo claro	Halo turbio	Halo claro	Halo turbio	Halo claro	Halo turbio
	2 mm	4.5 mm	2 mm	9 mm	2 mm	11.5 mm	2 mm	15.5 mm	2 mm	17.5 mm
ΦK06-11										
	5 mm	3.5 mm	5 mm	6.75 mm	5 mm	13.48 mm				
ΦK08-48										

Ensayo de hidrolisis de carbohidratos.

Este ensayo permite caracterizar a la(s) depolimerasa(s) por el tipo de azucar(es) que degradan. Los resultados colorimetricos se muestran en la tabla 4. El Ensayo de hidrolisis del fago K06-11 sugiere la posible hidrolisis de los azucares: 2,3-X-Gal-NANA; Fuc-FITC; 4-Nitrophenyl-β-manopynoside y Glu-FITC. El ensayo de hidrolisis del fago K08-48 sugiere la posible degradación de los azucares de Gal-FITC; 2,3-X-Gal-NANA; Fuc-FITC; 4-Nitrophenyl-β-manopynoside y Glu-FITC. Sin embargo este ensayo no fue concluyente y es necesario la realizacion de otros ensayos para corroborar los resultados sugeridos.

Tabla 4. Ensayo de hidrolisis de carbohidratos de los fagos K06-11 y K08-48

No.	1	2	3	4	5	6	7	8
CONTROL								
ΦK06-11								
No.	1	2	3	4	5	6	7	8
CONTROL								
ΦK08-48								

Conclusiones

El trabajo realizado permitió tener un stock de fagos puros con títulos de 1.7×10^{10} UFP/mL para el fago K08-48 y de 6×10^9 UFP/mL para el fago K06-11. El rango de huésped de los fagos fue del 44% para el fago K08-48 y del 33% fago el K06-11 respecto a los 9 aislados clínicos retados. Ambos fagos presentan una morfología de placa con un doble halo de inhibición del crecimiento bacteriano, lo que sugiere fuertemente que son fagos productores de depolimerasas. Respecto a la especificidad de los carbohidratos, los resultados preliminares sugieren que las depolimerasas producidas por ambos fagos podrían ser principalmente dirigida a los polímeros de galactosa, fucosa y/o manosa.

Bibliografía

1. Castaño Osorio, J. C. (2019). Bacteriófagos: aspectos generales y aplicaciones clínicas. *Hechos Microbiológicos*, 6(1-2), 36–51. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/hm/article/view/335348>
2. Contreras, J., Flores, T. G., Talavera, T. D. R. A., Martínez, Z. E., & López, N. A. P. (1994). ¿Qué es? *Cuadernos de pedagogía*, 224, 8-12.
3. Domínguez Navarrete, N. (2020). Bacteriófagos. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*, 20(1), 164–165. <https://doi.org/10.25176/rfmh.v20i1.2554>

4. Dunstan, R. A., Bamert, R. S., Belousoff, M. J., Short, F. L., Barlow, C. K., Pickard, D. J., . . . Dougan, G. (2021). Mechanistic Insights into the Capsule-Targeting Depolymerase from a *Klebsiella pneumoniae* Bacteriophage. *Microbiology spectrum*, 9(1), e01023-01021.
5. Echeverri Toro, L. M., & Cataño Correa, J. C. (2010). *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia. *Scielo*, 23(3), 240–249. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932010000300006&lng=en&tlng=es
6. Fuentes González, M., & Ahumada Topete, V. (2020). Incremento de resistencias antimicrobianas en bacteriemias. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 58(3), 284–291.
7. Huang K, Wang M. M, Kulinich A, Yao H. L, Ma H. Y, Martinez J. E, Duan X. C, Chen H, Cai Z. P, Flitsch S. L, Liu L, Voglmeir J. (2015). Biochemical characterisation of the neuraminidase pool of the human gut symbiont *Akkermansia muciniphila*. *Carbohydr Res* 415: 60-5.
8. Lasa, I., Pozo, J. L. del, Penadés, J. R., & Leiva, J.. (2005). Biofilms bacterianos e infección. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28(2), 163-175. Recuperado en 06 de julio de 2022, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000300002&lng=es&tlng=es
9. Peña, C., Pujol, M., Ardanuy, C., Ricart, A., Pallares, R., Linares, J., ... & Gudiol, F. (2001). An outbreak of hospital-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia, including strains producing extended-spectrum β -lactamase. *Journal of Hospital Infection* 47(1), 53-59.
10. *Resistencia a los antimicrobianos*. (2021, 17 noviembre). Organización Mundial de la Salud. Recuperado 6 de julio de 2022, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance#:~:text=Klebsiella%20pneumoniae%20es%20una%20bacteria,K>.
11. Romero González, A. T. Biofilm y resistencia antimicrobiana. (2020). *Revista Archivo Médico de Camagüey*, 24(4). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552020000400001&lng=es&tlng=es
12. Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*: Cold spring harbor laboratory press.
13. Secretaría de Salud. (2015). *Informe anual de la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica*. Primera edición, México
14. Segundo Arizmendi, N., Hernández-Baltazar, E., Villegas, O., & Torres-Angeles, O. (2015). Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia).
15. Suescún, A. V. (2006). *Genes involucrados en la biogénesis de fimbrias afectan la formación de biopelículas por parte de Klebsiella pneumoniae*. *Scielo*. Recuperado 6 de julio de 2022, de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572006000400007#:~:text=Klebsiella%20pneumoniae%20es%20un%20pat%C3%B3geno,su%20capacidad%20para%20formar%20biopel%C3%ADculas. .