

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS, BIOQUÍMICAS
Y BIOTECNOLÓGICAS.**

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIOFAGOS
PARA CEPAS NOSOCOMIALES DE *Acinetobacter
baumannii* DE LIMA E IQUITOS, PERÚ 2014 - 2015”**

Tesis presentada por:

ADRIANA PAULA MEZA PACHECO

Para obtener el Título Profesional de
Ingeniero en Biotecnología

AREQUIPA – PERU

2016

*“Mientras mayor es la lucha, más
grande es el triunfo” –El circo de las mariposas*

*“Cuando todo parezca estar en tu contra, recuerda que
los aviones despegan con el aire en contra, no a favor”*

– Henry Ford

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme dado esta gran oportunidad, dejarme tener tantas lecciones de vida tanto en lo profesional como en lo personal.

A mi abuelo Gerardo Meza sé que siempre está y estará conmigo en cada paso doy. A mis padres Ronal Meza Alvarez y Marilú Pacheco Díaz, por el amor infinito, confianza, aliento y paciencia que me brindan. A mis tíos Silvana Hermoza y Ricardo Corrales; primos y sobrinos, por hacerme sentir parte de su familia en todo este tiempo. A mi familia, porque cada triunfo que tenga también será suyo.

Al departamento de bacteriología del Centro de Investigación en enfermedades infecciosas y tropicales de la Marina de los Estados Unidos en Perú, NAMRU-6. Al Doctor Nathanael Reynolds, por brindarme la confianza y soporte necesario para la realización de este proyecto. A la Dra. Rina Meza; por los consejos, alentarme en este trayecto. A Paúl Ríos, la Sra. Yocelinda Meza, Jesús Rojas por apoyarme tanto con las curvas de crecimiento, tener siempre un consejo y pasar tantas horas juntos en el laboratorio. A Enrique Canal, por todas las enseñanzas y trucos en las técnicas de biología molecular.

A todas las personas que durante este tiempo me brindaron su amistad, ayuda para culminar con esta investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
RESUMEN	xiii
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 HIPÓTESIS.....	2
1.2 OBJETIVO	2
1.2.1 GENERAL	2
1.2.2 ESPECÍFICOS	2
CAPITULO II.....	4
MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 PROBLEMA DE LAS INFECCIONES NOSOCOMIALES.....	4
2.2 IDENTIFICACIÓN Y TAXONOMÍA DE <i>Acinetobacter</i>	4
2.3 IMPORTANCIA CLÍNICA DE <i>Acinetobacter baumannii</i>	5
2.4 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE <i>A. baumannii</i>	6
2.5 VISTA GLOBAL DE <i>A. baumannii</i>	7
2.6 <i>A. baumannii</i> EN EL PERÚ	8
2.7 FAGOTERAPIA.....	10
2.8 TAXONOMÍA DE LOS BACTERIOFAGOS	12
Figura 1: Morfotipos básicos de los bacteriofagos	14
2.8.1 FAGOS CON COLA	14
2.9 CICLO DE VIDA DE LOS BACTERIOFAGOS.....	18
2.9.1 CICLO LÍTICO DE LOS BACTERIOFAGOS.....	19
2.9.1.1 ADSORCIÓN.....	20
2.9.1.2 INYECCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO	21
2.9.1.3 REPLICACIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO VIRAL (PERIODO DE ECLIPSE).....	22
2.9.1.4 ENSAMBLAJE	22
2.9.1.5 LISIS Y LIBERACIÓN.....	23

2.9.2 CICLO LISOGÉNICO DE LOS BACTERIOFAGOS.	24
2.10 AISLAMIENTO DE BACTERIOFAGOS A PARTIR DE MUESTRAS AMBIENTALES.	26
2.10.1 AISLAMIENTO DE BACTERIOFAGOS DE FUENTES AMBIENTALES POR SELECCIÓN DIRECTA DE PLACA.	26
2.11 CURVA DE CRECIMIENTO DE BACTERIOFAGOS LÍTICOS	29
2.12 AMPLIFICACIÓN DE BACTERIOFAGOS POR PCR.....	30
2.13 TIPIFICACIÓN DE LOS BACTERIOFAGOS AISLADOS POR RAPD-PCR.....	32
CAPÍTULO 3.....	33
3.1 MATERIALES	33
3.2 MÉTODOS	35
3.2.1 AISLADOS BACTERIANOS.....	35
3.2.2 MUESTREO	37
3.2.3 AISLAMIENTO.....	39
3.2.3.1 REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS	39
3.2.3.2 AISLAMIENTO POR EL MÉTODO DE ENRIQUECIMIENTO DE BACTERIOFAGOS .	39
3.2.4 CARACTERIZACIÓN	42
3.2.4.1 DESCRIPCIÓN DE CALVAS.....	43
3.2.4.2 EFICIENCIA DE CALVAS (TITULACIÓN).....	43
3.2.4.3 REPLICACIÓN DE BACTERIOFAGOS	45
3.2.4.4 CURVA DE CRECIMIENTO DE UN SOLO PASO	46
3.2.5 CARACTERIZACIÓN A NIVEL MOLECULAR	49
3.2.5.1 EXTRACCIÓN DE ADN	49
3.2.5.2 IDENTIFICACIÓN DE LAS FAMILIAS MYOVIRIDAE Y PODOVIRIDAE	50
3.2.5.2.1 IDENTIFICACIÓN DE MYOVIRIDAE.....	50
3.2.5.2.2 IDENTIFICACIÓN DE PODOVIRIDAE.....	51
3.2.5.2.3 TIPIFICACIÓN POR AMPLIFICACIÓN POLIMÓRFICA ALEATORIA DE DNA (RAPD)-PCR CON PRIMERS DEGENERADOS.	52
CAPÍTULO 4.....	53
4.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
4.1.1 AISLAMIENTO DE BACTERIOFAGOS EN LAS DISTINTAS CIUDADES.....	53
4.1.2 DESCRIPCIÓN DE LAS CALVAS	59
4.1.3 CONTEO DE CALVAS EN PLACA	61

4.1.4	CURVA DE CRECIMIENTO EN UN PASO	62
4.1.5	IDENTIFICACIÓN DE FAGOS MYOVIRIDAE.....	68
4.1.6	IDENTIFICACIÓN DE FAGOS PODOVIRIDAE.....	70
4.1.6	TIPIFICACIÓN DE BACTERIOFAGOS POR A (RAPD)-PCR	71
CAPÍTULO V		72
5.1	CONCLUSIONES	72
5.2	RECOMENDACIONES.....	74
BIBLIOGRAFÍA		76
CAPÍTULO VI ANEXOS		87



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Morfotipos básicos de los bacteriófagos.....	14
Figura 2. Morfología básica de un bacteriófago.....	15
Figura 3. Familias de Fagos.....	16
Figura 4. Microscopia Electrónica de Transferencia, Bacteriofago T4 familia <i>Myoviridae</i>	17
Figura 5. Microscopia Electrónica de Transferencia, Bacteriofago T7 de la familia <i>Podoviridae</i>	17
Figura 6. Microscopia Electrónica de Transferencia, Bacteriofago λ de la familia <i>Siphoviridae</i>	18
Figura 7. Esquema Fago y bacteria.....	20
Figura 8. Etapa de Adsorción sistema Fago – Hospedero.....	21
Figura 9. Esquema de inyección del material genético del fago a la bacteria.....	21
Figura 10. Interrupción del Virus en el mecanismo bacteriano.....	22
Figura 11. Formación de los nuevos viriones.....	23
Figura 12. Lisis bacteriana, liberación de los Viriones.....	23
Figura 13. Diagrama del Ciclo Lítico de los Bacteriofagos.....	24
Figura 14. Diagrama del Ciclo lisogénico de los Bacteriofagos.....	25
Figura 15. Aislamiento de bacteriófagos por método de inóculo de gota. Formación de calvas aisladas.....	28
Figura 16. Vista en Estereoscopio de calvas aisladas.....	28
Figura 17. Curva de Crecimiento de un Solo Paso.....	30
Figura 18. Toma de muestra con balde desagüe del Hospital FAP, LIM.....	38
Figura 19. Llenado de 1Lt. de muestra en frascos estériles.....	38
Figura 20. Frascos sellados y almacenados a temperatura ambiente.....	39
Figura 21. Esquema del método de enriquecimiento de la muestra.....	40

Figura 22. Esquema de inóculo de las muestras aisladas.....	41
Figura 23. Extracción de las calvas aisladas.....	42
Figura 24. Método de titulación de calvas.....	45
Figura 25. Método para la elaboración de la Curva de crecimiento.....	48
Figura 26. Ciclajes del PCR para la detección de Myoviridae.....	50
Figura 27. Ciclajes del PCR para la detección de Podoviridae.....	51
Figura 28. Ciclajes del RAPD- PCR	52
Figura 29. Resultados generales del Aislamiento de bacteriofagos para <i>A. baumannii</i>	58
Figura 30. Presencia de calvas aisladas.....	58
Figura 31. Vista al estereoscopio de la calva NSI0925 ϕ SWI004.....	60
Figura 32. Vista al estereoscopio de la calva NSI0683 ϕ SWL006.....	60
Figura 33. Vista al estereoscopio de la calva NSC0950 ϕ SWL009.....	60
Figura 34. Vista al estereoscopio de la calva NSC0742 ϕ SWL003.....	60
Figura 35. Vista al estereoscopio de la calva NSC0702 ϕ SWL007.....	61
Figura 36. Vista al estereoscopio de la calva NSI0925 ϕ SWI004.....	61
Figura 37. Vista al estereoscopio de la calva NSC0742 ϕ SWI002.....	61
Figura 38. Curva de crecimiento NSC0739 ϕ SWL001.....	63
Figura 39. Curva de crecimiento NSC0742 ϕ SWL003.....	64
Figura 40. Curva de crecimiento NSC0702 ϕ SWL007.....	64
Figura 41. Curva de crecimiento NSC0060 ϕ SWL008.....	65
Figura 42. Curva de crecimiento NSC0950 ϕ SWL009.....	65
Figura 43. Curva de crecimiento NSI0814 ϕ SWI001.....	66
Figura 44 Curva de crecimiento NSC0742 ϕ SWI002.....	66

Figura 45. Curva de crecimiento NSI0796 ϕ SWI003.....67

Figura 46. Curva de crecimiento NSI0925 ϕ SWI004.....67

Figura 47. Curva de crecimiento NSI0683 ϕ SWI006.....68

Figura 48. Gel de agarosa al 1 %, Productos de PCR que detectan gp23 de los bacteriofagos de la familia Myoviridae.....69

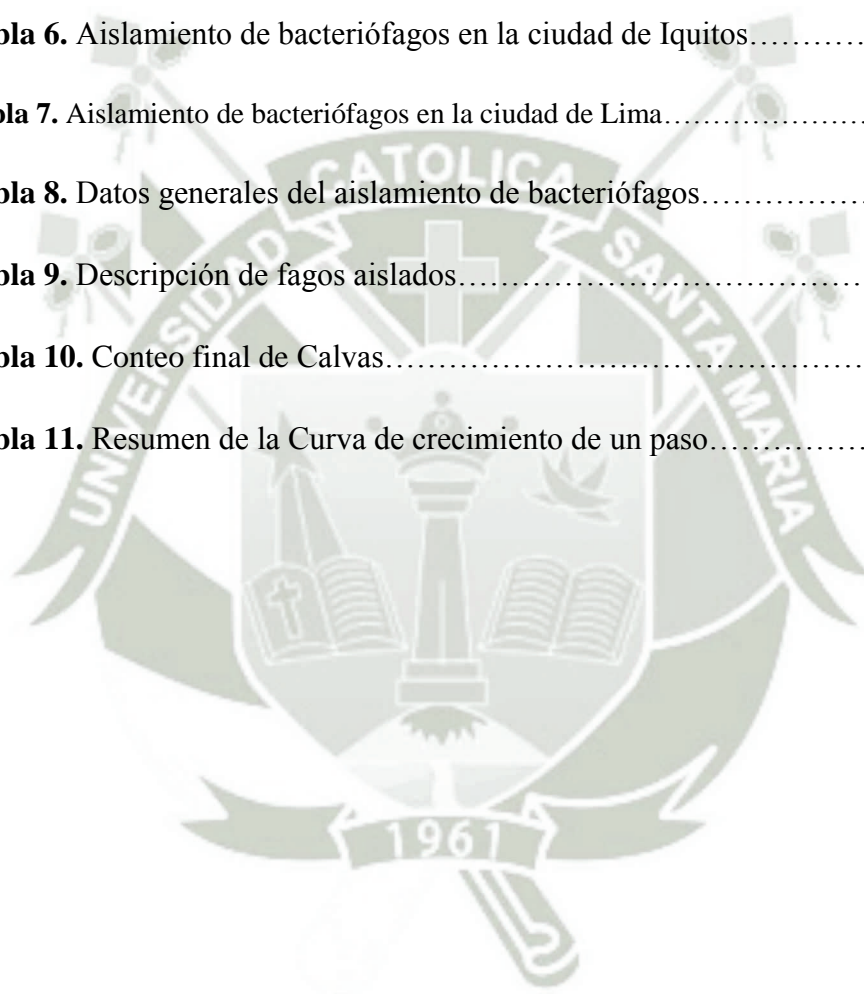
Figura 49. Gel de agarosa al 1.5 %, Productos de PCR que detectan bacteriofagos de la familia Podoviridae.....70

Figura 50. Dendograma de los aislamientos de bacteriófagos para *A.baumannii*.....71



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Bacterias aisladas de pacientes de la UCI periodo 2004 – 2006.....	9
Tabla 2: Familia de fagos, clasificación y propiedades básicas.....	13
Tabla 3: Cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> del NAMRU-6.....	36
Tabla 4: Lugares muestreo de agua.....	37
Tabla 5. Aislamiento de bacteriófagos en la ciudad de Lima.....	54
Tabla 6. Aislamiento de bacteriófagos en la ciudad de Iquitos.....	55
Tabla 7. Aislamiento de bacteriófagos en la ciudad de Lima.....	56
Tabla 8. Datos generales del aislamiento de bacteriófagos.....	57
Tabla 9. Descripción de fagos aislados.....	59
Tabla 10. Conteo final de Calvas.....	62
Tabla 11. Resumen de la Curva de crecimiento de un paso.....	63



ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 1: PUNTOS DE MUESTREO LIMA.....	87
ANEXO N° 2: PUNTOS DE MUESTREO IQUITOS.....	91
ANEXO N° 3: PUNTOS DE MUESTREO AREQUIPA.....	93
ANEXO N° 4: TABLAS CURVA DE CRECIMIENTO NSC0739 φ SWL001.....	94
ANEXO N° 5: TABLAS CURVA DE CRECIMIENTO NSC0742 φ SWL003.....	95
ANEXO N° 6: TABLAS CURVA DE CRECIMIENTO NSC0702 φ SWL007.....	96
ANEXO N° 7: TABLAS CURVA DE CRECIMIENTO NSC0060 φ SWL008.....	97
ANEXO N° 8: TABLAS CURVA DE CRECIMIENTO NSC0950 φ SWL009.....	98
ANEXO N° 9: TABLAS CURVA DE CRECIMIENTO NSI0814 φ SWL001.....	99
ANEXO N° 10: TABLAS CURVA DE CRECIMIENTO NSC0742 φ SWI002...100	
ANEXO N° 11: TABLAS CURVA DE CRECIMIENTO NSI0796 φ SWI003....101	
ANEXO N° 12: TABLAS CURVA DE CRECIMIENTO NSI0925 φ SWI004....102	
ANEXO N° 13: TABLAS CURVA DE CRECIMIENTO NSI0683 φ SWL006...103	

RESUMEN

Acinetobacter baumannii es un patógeno que está adquiriendo importancia en los ambientes interhospitalarios, normalmente se encuentra en las UCI ; aunque esta bacteria adquiere mayor relevancia clínica en los pacientes inmunosuprimidos, además de tener la capacidad evadir el efecto de los agentes desinfectantes y tolerar ambientes en condiciones poco favorables, estos no son todos los aspectos importantes de este patógeno, sino también la facilidad que tiene para adquirir resistencia a muchos antibióticos, por lo que en los últimos años se ha reportado el incremento de casos *Acinetobacter baumannii* multidrogo resistente (MDR) alrededor del mundo.

En este trabajo de investigación se buscó encontrar bacteriófagos líticos específicos para cepas nosocomiales de *Acinetobacter baumannii* como una terapia alternativa al de uso de antibióticos (Fagoterapia). Con este objetivo se logró aislar 48 bacteriofagos en las ciudades de Lima e Iquitos, seguido a ello se seleccionó un aislamiento de bacteriófagos por cada punto de muestreo y se procedió a realizar su caracterización, se describió la calva formada producida por la respuesta a la infección del fago a la bacteria propio de cada complejo, las calvas que se encontraron tuvieron un diámetro mayor a 1mm con la formación de un halo máximo de 5.2mm de diámetro; luego se empleó la técnica de Curva de Crecimiento de un paso para conocer el periodo de eclipse, periodo de latencia y el Burst Size específico de cada bacteriófago siendo parámetros importantes para la selección de los bacteriófagos, se observó que el periodo de eclipse esta en un rango de 15 a 25min; por otro lado el periodo de latencia se encuentra en un rango de 20 a 35 min; por último el Burst Size obtenido tuvo un mínimo de 3 y alcanzó un máximo de 281. Se encontró que 8 de los 10 bacteriofagos pertenecen a la familia Myoviridae con el uso de primers que codifican el gen gp23 específico de esta familia; finalmente se aplicó el método del RAPD-PCR para tipificar los bacteriófagos encontrados.

Palabras Claves: *Acinetobacter baumannii*, Bacteriofagos, Fagoterapia, Calvas, Periodo de Eclipse, Periodo de Latencia, Burst Size, Myoviridae, Podoviridae, RAPD-PCR

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is a pathogen that is acquiring importance in the interhospital environments, usually located in the ICU although this bacterium acquires greater clinical relevance in immunosuppressed patients, as well as having the ability to evade the effect of disinfectants and tolerate environments in unfavorable conditions. These are not all the important aspects of this pathogen, but also the ease with which it acquires resistance to many antibiotics, so in recent years has been reported an increase of *Acinetobacter baumannii* MDR cases.

This investigation seek specific lytic bacteriophages for nosocomial strains of *Acinetobacter baumannii* as an alternative therapy to antibiotic use (phage therapy). It was isolated 48 bacteriophages in Lima and Iquitos; one bacteriophage was selected per sample point and proceeded to perform characterization. , plaques described formed produced by the response to infection phage to bacteria of each complex itself, the plaques were found had a larger diameter 1mm with the formation of a maximum of 5.2mm diameter halo; then the One Step Growth Curve to know the eclipse period, latent period and Burst Size specific to each bacteriophage; it was observed that the period of eclipse is in a range 15 to 25min; on the other hand the latency period is in a range of 20 to 35 min; finally the obtained Burst Size had a minimum of three and a maximum of 281 reached. In addition, tests were performed with PCR and it is found that 8 of the 10 belong to the Myoviridae bacteriophages family using specific primers encoding gp23 gene of this family; finally the RAPD-PCR method was applied for typing the bacteriophages found.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, bacteriophages, phage therapy, Plaques, Eclipse period, latent period, Burst Size, Myoviridae, Podoviridae, RAPD-PCR.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Acinetobacter es uno de los patógenos nosocomiales más significativos entre el grupo de los gram negativos, no fermentadores. Es considerada como una de las bacterias con mayor incidencia en las infecciones nosocomiales en pacientes que se encuentran en las Unidades de Cuidados Intensivos o en el área de quemados, además de aquellos que son inmunosuprimidos, generando infecciones en tracto urinario, agente causal de neumonía en pacientes con ventilador mecánico. Otra importancia clínica que tiene *Acinetobacter baumannii* es su resistencia a desinfectantes, a la radiación UV y a la tolerancia de detergentes; es así que esta bacteria tiene un alto grado de supervivencia por largos periodos en ambientes hospitalarios, facilitando de esta forma su propagación.

Asimismo, esta bacteria tiene la capacidad de adquirir fácilmente resistencia a diversas familias de antibióticos como carbapenémicos, quinolonas, aminoglicosidos, etc., por esta razón se está investigando diversas técnicas para tratar estas bacterias multidrogo resistente (MDR). Existen ya muchos casos reportados en todo el mundo sobre todo en Europa y en U.S.A, la incidencia en países latinoamericanos es menos; sin embargo no hay que restarle importancia a este patógeno, países como Colombia y México muestran datos de vigilancia epidemiológica. En el caso de nuestro país, se muestra un incremento significativo desde el año 2002, en el 2015 se ha reportado un brote hospitalario de esta bacteria en Chiclayo dejando 176 muertos.

Por lo anteriormente mencionado, se necesita de nuevas técnica alternativas al uso de antibióticos, siendo la fagoterapia una solución bastante prometedora; esta técnica se basa en encontrar al fago capaz de lisar y por lo tanto eliminar la bacteria hospedera. Esta clase de virus son específicos a una sola bacteria; ya que para que ocurra la infección el bacteriófago primero necesita reconocer complejos moleculares de tipo proteico, lipoproteico o glucoproteico que se encuentran en la membrana celular bacteriana; como resultado el bacteriófago es inocuo al portador del patógeno.

Cabe resaltar que la fagoterapia no es algo totalmente nuevo, en realidad los primeros reportes datan desde finales de 1890 y se realizan estudios de su aplicación a patógenos desde 1917, hay institutos como Pasteur en Francia en el que se vienen estudiando a estas entidades por varias décadas. Otro punto resaltante de la fagoterapia es que su aplicación no es exclusiva a humanos sino que es aplicable en la agricultura para erradicar bacterias que causan daños en los cultivos, o su aplicación en animales en la industria acuícola o avícola.

Por todo lo anteriormente mencionado es que el presente trabajo de investigación busca aislar bacteriófagos líticos específicos para cepas nosocomiales de *Acinetobacter baumannii* a partir de muestras ambientales y de aguas residuales de Lima, Arequipa e Iquitos; luego de obtener los aislamientos se pasará a hacer la caracterización en los que se evaluará los parámetros más importantes como el tipo de calva que se obtiene, la curva de crecimiento en la que se evalúa el periodo de latencia, eclipse y el Burst Size. Se identificará a que familia pertenecen con el uso de PCR convencional y se tipificarán los aislamientos por la técnica del RAPD-PCR, para conocer la diversidad que existe entre los aislamientos encontrados.

1.1 HIPÓTESIS

Existirán diferencias entre la diversidad de los bacteriófagos aislados a partir de muestras de agua de fuentes naturales contaminadas y muestras residuales en las distintas regiones de Perú.

1.2 OBJETIVO

1.2.1 GENERAL

- Aislar, identificar y caracterizar bacteriófagos específicos para *Acinetobacter baumannii* a partir de muestras contaminadas y naturales de agua.

1.2.2 ESPECÍFICOS

1. Aislar bacteriófagos específicos para cepas nosocomiales de *Acinetobacter baumannii*
2. Probar la actividad lítica de los distintos bacteriófagos aislados.

3. Describir las características de las calvas obtenidas.
4. Realizar la titulación de los bacteriófagos.
5. Identificar el periodo de eclipse, en las curvas de crecimiento de un solo paso.
6. Estudiar la capacidad de replicación de los bacteriófagos aislados (Burst Size)
7. Identificar a nivel molecular si los bacteriófagos aislados pertenecen a la familia Myoviridae con el uso de PCR convencional y corrida electroforética.
8. Identificar a nivel molecular si los bacteriófagos aislados pertenecen a la familia Podoviridae con el uso de PCR convencional y corrida electroforética.
9. Tipificar por medio de RAPD-PCR por el uso del primer degenerado los bacteriófagos seleccionados.
10. Elaborar un dendograma con el uso de un Software específico para evidenciar la tipificación de los bacteriófagos seleccionados.



CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 PROBLEMA DE LAS INFECCIONES NOSOCOMIALES

Se define como infección nosocomiales o interhospitalarias a aquellas infecciones que se adquieren dentro de un hospital presentando sintomatología durante el periodo de internamiento o puede presentarse luego de él. Este no es el único problema ya que este puede convertirse en un problema de salud pública, esto se debe a que no solo el paciente es el afectado sino también su familia, el personal de salud e incluso la infraestructura hospitalaria con la que se está expuesto.

Desde el 2005 nuestro país viene realizando la vigilancia epidemiológica de las infecciones intrahospitalarias, la cual tiene como característica de ser activa, selectiva y focalizada; situación que limita el conocimiento de la magnitud del problema en nuestro país. Actualmente se vigila trece tipos de infecciones intrahospitalarias los cuales están focalizados en cinco servicios de hospitalización.¹

Existen diversas bacterias que son consideradas como agentes nosocomiales, los más comunes son *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* algunas especies de los géneros *Enterobacter*, *Enterococcus*,² *Acinetobacter baumannii* que en los últimos años esta bacteria va adquiriendo importancia a nivel clínico, en especial en las unidades de cuidados intensivos.

2.2 IDENTIFICACIÓN Y TAXONOMÍA DE *Acinetobacter*

Las bacterias del género *Acinetobacter* son bacilos o cocobacilos gram negativos, muchas veces dispuestos en parejas. No fermentan la glucosa y son aerobios estrictos, inmóviles, catalasa positivos y oxidasa negativos. Crecen bien en todos los medios de cultivo de rutina, siendo su temperatura óptima de crecimiento de 33 a 35°C. Actualmente se pueden distinguir 17 genoespecies, sin embargo *A. baumannii* es la más frecuentemente aislada y

a la vez la que tiene mayor importancia clínica, de acuerdo a la utilización de 6 tipos de fuentes de carbono (levulinato, citraconato, L-fenilacetato, L-fenilalanina, 4-hidroxibenzoato y L-tartrato), se pueden definir 19 biotipos de *A.baumannii* de aquí que los grupos de *A. calcoaceticus* y *A. baumannii* tienen la capacidad de crecer a 44°C además de poseer las mismas características bioquímicas³ por lo que resulta muy difícil discernir entre este complejo.

2.3 IMPORTANCIA CLÍNICA DE *Acinetobacter baumannii*

La mayoría de las especies del género *Acinetobacter* son microorganismos que se encuentran en el ambiente (agua, plantas, vegetales, suelo) e incluso en la microbiota normal de la piel humana. Sin embargo, *A. baumannii* no es un microorganismo ubicuo y no se observa con frecuencia en la naturaleza, ni como colonizador en la comunidad. Por el contrario, esta bacteria coloniza e infecta pacientes hospitalizados en estado crítico o francamente debilitados siendo así una bacteria común en unidades de cuidado intensivo (UCI) y unidades de quemados, siendo el microorganismo más frecuente en muchos hospitales, aislándose principalmente de muestras respiratorias y durante epidemias; la incidencia de colonización fecal es de más del 40%.^{4,5}

Existen distintos factores que predisponen a los pacientes a sufrir de una infección severa por *A.baumannii*, como es el caso de factores de riesgo del paciente (inmunosupresión, cirugías mayores, quemaduras, edad avanzada) y la de factores externos como exposición a equipamiento médico contaminado, uso de dispositivos intravasculares, catéter arterial, catéter urinarios, sonda vesical, presencia de sonda gástrica o endotraqueal y tipo de equipo respiratorio pueden aumentar el riesgo de neumonía o colonización del tracto respiratorio inferior.⁶

Un estudio realizado en unidades de cuidado intensivo reveló que después de 199 interacciones entre personal de la salud y pacientes colonizados o infectados con *A. baumannii* multirresistente, 38,7 % de los guantes o batas

del personal de la salud resultaron contaminados y 4,5 % de ellos presentaron contaminación en sus manos después de la remoción de los guantes desechables.⁷

En el caso de aislamientos de infraestructura hospitalaria se puede encontrar con mayor frecuencia en ventiladores hospitalarios, equipos de aspiración, colchones, almohadas, humidificadores, contenedores de agua destilada, dispensadores de jabón, y nebulizadores siendo un principal reservorio ocasionando así las infecciones intrahospitalarias.⁸

2.4 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE *A. baumannii*

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente que se ve reflejado por el uso indiscriminado e irresponsable de los antibióticos, desde el principio de la era antibiótica los fenómenos de resistencia a estas sustancias han sido descritos. Cabe destacar la importancia inicial de cepas de *Staphylococcus aureus* capaces de degradar la penicilina y la posterior aparición de esta misma bacteria con resistencia a la meticilina. Inicialmente el problema fue resuelto con el descubrimiento o síntesis de nuevas sustancias que eran capaces de controlar las bacterias con este fenómeno, y aparecen medicamentos como los aminoglucósidos, macrólidos, glicopéptidos, entre otros. Sin embargo, esto no es suficiente y cada vez aparecen nuevos mecanismos que son difíciles de controlar por estos medicamentos. Se ha encontrado que la prevalencia de organismos patógenos humanos resistentes a los antibióticos es cada vez mayor, pero el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos que controlen éstos es mucho más lento.⁹ Es así que se pueden clasificar entre bacterias Multidrogo resistentes (MDR), Extremodrogo resistentes (XDR), Pandrogo resistentes (PDR) al realizar la susceptibilidad antimicrobiana.

Las bacterias multidrogo resistentes (MDR) pueden definirse como aquellas que presentan resistencia a más de un grupo de antibióticos, estas cepas

bacterianas son de importancia para la salud pública debido a la resistencia a más de un agente antimicrobiano.¹⁰

Las bacterias extremadamente resistente (XDR) son epidemiológicamente importante debido no sólo a su resistencia a múltiples agentes antimicrobianos, sino también a su sombría probabilidad de ser resistente a todos, o casi todos, a los principales agentes antimicrobianos.^{11,}

Las bacterias Pandrogo resistente (PDR) se definen como aquellas que presentan resistencia a todos los agentes antimicrobianos.

Un tipo más específico de clasificación de rangos de resistencias es el que se puede considerar un microorganismo MDR cuando este presenta resistencia a 3 familias o más, es decir todas las penicilinas, cefalosporinas, quinolonas y aminoglucósidos. Si además presentan resistencia a los carbapenémicos se consideran como XDR, y si llegase a tener resistencia al grupo de colistina y tigeciclina se denominan PDR.¹²

En general se han encontrado varios casos de aislamiento de *A. baumannii* en el que este microorganismo tiende a presentar rápidamente resistencia a múltiples antibióticos, generando así la dificultad de tratar de forma adecuada y eficaz a los pacientes. Los mecanismos de resistencia contemplan alteraciones de las proteínas ligadoras de penicilina (PBP), disminución de la permeabilidad de la membrana externa, mutaciones de los sitios blanco e inactivación por enzimas modificantes.¹³

2.5 VISTA GLOBAL DE *A. baumannii*

Colocando en el buscador del *National Center for Biotechnology Information* “NCBI” las palabras MDR *Acinetobacter baumannii* se puede obtener 576 resultados de búsqueda,¹⁴ sobre el estudio de estas cepas, mecanismos de resistencia, tratamientos con medicamentos y en su mayoría sobre brotes nosocomiales, al realizar una búsqueda más precisa con el término MDR *Acinetobacter baumannii* South America se obtienen 6 publicaciones.¹⁵

A. baumannii se perfila como una de las causas de numerosos brotes globales, que muestra cada vez mayores tasas de resistencia. Hay informes de cepas *A. baumannii* MDR en los hospitales de Europa, América del Norte, Argentina, Chile, Colombia, Brasil, China, Taiwán, Hong Kong, Japón, Corea y de zonas remotas, como Tahití, en el Pacífico Sur. Estas cepas resistentes a múltiples fármacos, a menudo, se propagan para causar brotes a lo largo de ciudades enteras, países, y continentes. De acuerdo a reportes se encontró que la resistencia de este germen presenta resistencia a carbapenémicos, ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina, siendo una de las más elevadas en todo el mundo, incluso mayor que lo reportado en Europa o Estados Unidos.¹⁷

En el caso de Colombia, se realizó un estudio donde evaluaban la mortalidad que existe entre pacientes portadores de *A.baumannii* sensible frente a otro grupo de *A.baumannii* MDR en la UCI de ese hospital. La evaluación se realizó a 165 pacientes entre abril del 2006 y abril del 2010, de este número se determinó que los aislamientos encontrados corresponden a 62 sensibles mientras que 103 son MDR, determinaron que la tasa de mortalidad era más alta de los aislamientos MDR.²⁰

2.6 A. baumannii EN EL PERÚ

De acuerdo a un estudio realizado en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen en Lima entre los años 2004 y 2006, se obtuvo como resultado que la bacteria *Acinetobacter spp.* adquirió resistencia al grupo de antibióticos carbapenem de un 40 % entre este periodo de tiempo, es decir incremento un 50% entre el 2004 con 13.2% a 20.2% al 2006.

Este germen ocupa la tercera posición de los gérmenes aislados (10,3%) en la UCI, por otro lado también ocupó el tercer lugar de ser uno de los patógenos más frecuentemente aislados en vías respiratorias (16,4%) y uno de los más importantes al tener una resistencia creciente tanto a los antibióticos tradicionales como los de nueva generación. Convirtiéndose en una bacteria de gran importancia en cuestión a su impacto clínico y económico en este nosocomio.¹⁶

En el mismo Hospital se hizo nuevamente una evaluación para ver la prevalencia y susceptibilidad entre los años 2009 y 2010, registrando un 73% de aislamientos MDR, y un 55% de aislamientos PDR.¹⁸

Tabla 1. Bacterias aisladas de pacientes de la UCI periodo 2004 - 2006

Frecuencia Total (%) por especie	Total N	2004 n	2005 n	2006 n
S.aureus	24,2	23,7	23,5	25,4
P. aeruginosa	14,8	15,9	15,0	13,5
Acinetobacter spp	10,3	6,7	10,8	13,5
S. epidermidis	9,9	10,6	11,0	8,1
K pneumoniae	8,3	8,6	9,4	7,1
E. faecalis	2,6	2,2	2,8	2,9
E. faecium	3,0	2,7	3,9	2,5
E. coli	9,2	10,8	7,3	9,6
Otros	19,1	18,8	21,2	17,4

Fuente: “Resistencia bacteriana en cuidados intensivos y tendencia actual: Departamento de Cuidados Críticos, Servicio de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, Essalud, Lima, Perú, 2004-2006. Paz E, et all”

De acuerdo a un informe realizado por el Instituto Nacional de Salud sobre la resistencia antimicrobiana en Hospitales de Perú en el 2006 se determinó que *Acinetobacter spp* fue el tercer microorganismos aislado en las UCI, además de ser parte de las enterobacterias aisladas a mayores de 10 años representando un 31% junto a *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter*, todas estas relacionadas a infecciones urinarias o infecciones de torrente sanguíneo.²²

Así mismo se realizó un estudio en el Hospital Nacional Cayetano Heredia entre enero del 2010 y octubre del 2012, este es un hospital público que cuenta con 423 camas y aproximadamente con 17673 egresos hospitalarios anuales en promedio. Aquí se reportaron 222 casos de Infecciones interhospitalarias donde el 37.4% ocurrió en la UCI, encontrando que *Acinetobacter spp*. fue el agente más aislado con

el 29.3% en el área de UCI de medicina y quirúrgicos, mientras que ocupó el segundo lugar como agente asociado a casos de neumonía asociada a respirador mecánico con 29.2% y en infecciones de tracto urinario asociado a catéter permanente en la UCI de emergencia se presentó con 7.7%.¹⁹

En Julio del 2015 se presentó un brote en la ciudad de Chiclayo dejando como consecuencia 176 muertos por esta bacteria, esto sucedió en el hospital Almanzor Aguinaga Asenjo que entre los meses de enero y junio en 112 pacientes que se encontraban internados en la UCI de este hospital, 59 pacientes perdieron la vida en el Hospital Regional de Lambayeque y 2 personas en el Hospital de las Mercedes.²¹

2.7 FAGOTERAPIA

Los bacteriófagos o también conocidos como fagos son virus específicos para las células bacterianas en el caso que estos fagos sean de tipo lítico de replicación terminan por lisar a su hospedero; de esta forma se puede tratar a estas bacterias que son resistentes o no a las drogas convencionales.^{23, 24}

Durante los últimos años se ha ido estudiando con mayor intensidad este tema, ya que como se vio anteriormente las bacterias están adquiriendo rápidamente resistencia a los fármacos. En la actualidad existen institutos donde se utiliza esta técnica en muchas bacterias, como es el caso del Instituto Pasteur (Francia), Eliava Institute (Georgia) y Eli Lilly and Company sin embargo no es un tema nuevo, ya que los primeros reportes como fagoterapia propiamente dicho son aproximadamente desde 1930 donde fue desarrollado en el Instituto Pasteur, y se difundió por Europa y la Unión Soviética hasta la aparición de la Penicilina por Alexander Fleming (1928) que realizaba su investigación en aquellos años, de tal manera que la industria farmacéutica decidió quedarse con este método.²⁵

Los primeros hallazgos de este tipo de virus fueron en 1896 por el bacteriólogo Inglés Ernest Hankin reportó la actividad de un marcador antibacterial cuando trabajó con *Vibrio cholerae* que él observó en el agua de unos ríos en la India llamándolo como una sustancia indefinida, dos años más tarde en 1898 el bacteriólogo ruso Gamaleya observó un fenómeno similar al trabajar con *Bacillus*

subtilis, 20 años más tarde en 1915 el biólogo inglés Fedrick Twort publicó su primera observación sobre un agente bacterial lisogénico transmisible para *Staphylococcus* por distintas razones incluido temas de financiamiento no pudo continuar con su investigación.²⁶

En 1917 el microbiólogo franco-canadiense Felix d'Herelle descubrió un antagonista invisible para un patógeno que causaba disentería, la historia comienza con un brote de disentería hemorrágica en unas tropas militares en la periferia de París siendo el encargado del estudio, aquí tomaba muestras fecales de los pacientes y las mezclaba con aislamientos de *Shigella*; una parte de esta mezcla la colocó en agar para poder observar el crecimiento de la bacteria, en estas placas d'Herelle observó la presencia de zonas limpias llamándolas “manchas” (Taches), para luego nombrarlas como en la actualidad se denominan a estas zonas “calvas”(Plaques). A diferencia de Hankin y Twort, d'Herelle tuvo la duda sobre la aparición de estas áreas proponiendo que esto se debía por la presencia de unos virus capaces de parasitar a las bacterias, luego de un tiempo llamó a estos virus como BACTERIOFAGOS que significa “devorador de bacteria”, continuando con su investigación propuso que se trataban de virus vivos y no de simples enzimas además de utilizarlos como fagoterapia en su estudio de la disentería.^{24,26.}

Para el año de 1921 Bruynoghe y Maisin usaron los bacteriófagos para poder eliminar *Staphylococcus*; entre los años de 1920 y 1940 se realizaron estudios sobre fagoterapia, sin embargo con la aparición de la penicilina y otros medicamentos que de amplio espectro se discontinuaron las investigaciones sobre este tema menos en Rusia y Polonia.²⁴

La fagoterapia tiene muchas aplicaciones como por ejemplo en el área de la acuicultura se utilizaron bacteriófagos como reguladores de septicemia por *Aeromonas*, *Streptococcus*, *Vibrio*, en diversas especies marinas.²⁷ En el caso de la industria alimentaria se llegan a usar los fagos como tratamiento de variedades entéricas de *Salmonella* o el caso de infecciones respiratorias en el ganado y aves de corral.²⁸ Se ha utilizado bacteriófagos en forma de coctel que podían reducir la incidencia de *Salmonella* en productos a base de carne de pollos (canal y piel).²⁹

En el caso de la agricultura existe una empresa llamada AGRIPHAGE, que se encarga de controlar eficazmente bacterias que son dañinas en las plantas como por ejemplo manchas en los tomates y chiles, esta empresa se encarga de que este producto sea completamente seguro y no toxico para las plantas, animales, seres humanos.³⁰ Algunas investigaciones han obtenido resultados interesantes en el análisis de los fagos como medio de control biológico de enfermedades vegetales. Por ejemplo, se encontró en el tratamiento de la *Xanthomonas campestris* en tomate y pimiento, y también son abundantes los estudios relacionados con el “Canker of Kiwifruit” causadas por la bacteria *Pseudomonas syringae actinidiae*. Estos estudios son de especial relevancia por las grandes pérdidas económicas que las enfermedades indicadas producen en estos cultivos.³¹

Como anteriormente se mencionó, la fagoterapia para el uso humano, se viene desarrollando ya desde hace muchas décadas para tratar distintos microorganismos, en el Instituto Pasteur hasta 1974 se produjo preparaciones de fagos contra *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *E. coli* y *Serratia* causantes de infecciones en la piel, septicemia, osteomielitis, infecciones por heridas, de tracto urinario, oído medio y senon nasales.^{32,33} En la actualidad en Rusia, se preparan muestras polivalentes de fagos anti-disenteria, anti-*Salmonella*, anti-*coli-proteus*, anti-*Staphylococcus*, anti-*Pseudomonas aeruginosa*, anti-*Klebsiella pneumoniae* y anti-*Streptococcus*.³⁴

2.8 TAXONOMÍA DE LOS BACTERIOFAGOS

Para que un bacteriófago sea caracterizado primero se basa en su rango hospedero, en sus propiedades físicas como es el tamaño de capsida, forma, resistencia a solventes orgánicos, estructura, tamaño del genoma, si es cadena simple o doble de (ADN o ARN). De acuerdo con el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), requiere que los bacteriófagos sean visualizados por un microscopio electrónico y la morfología de la capsida.³⁵ El tamaño del genoma varía entre 4kb y 600kb. Generalmente las familias virales son descritas de acuerdo a la naturaleza del ácido nucleico y su morfología.

En el 2014 según el sistema del ICTV se establecieron 7 ordenes: *Caudovirales* (3 familias), *Herpesvirales* (3familias), *Legamenvirales* (3familias), *Mononegavirales* (3familias), *Nidovirales* (3familias), *Picornavirales* (3familias) y *Tymovirales*

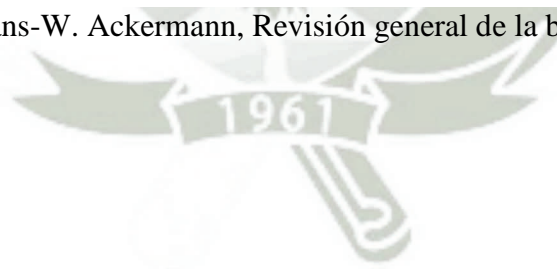
(3familias) Los fagos con cola constituyen en gran grupo que pertenece al orden de los *Caudovirales*, que consiste en tres familias filogenéticamente relacionadas, es decir que de acuerdo a su tamaño y la contractibilidad de la cola ; estas familias son: *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*.³⁷ Ackermann pudo clasificar a los bacteriófagos del orden de los *Caudovirales* de acuerdo a la siguiente tabla³⁶:

Tabla 2: Familia de fagos, clasificación y propiedades básicas

Shape	Nucleic acid	Virus group	Particulars	Example
Tailed	DNA, 2, L	<i>Myoviridae</i>	tail contractile	T4
		<i>Siphoviridae</i>	tail long, noncontractile	λ
		<i>Podoviridae</i>	tail short	T7
Polyhedral	DNA, 1, C	<i>Microviridae</i>	conspicuous capsomers	ϕ X174
		<i>Corticoviridae</i>	complex capsid, lipids	PM2
	2, C, S	<i>Tectiviridae</i>	inner lipid vesicle, pseudotail	PRD1
		2, L	SH1, group*	inner lipid vesicle
	2, L	STV1 group*	turret-shaped protrusions	STIV
		2, C	<i>Leviviridae</i>	poliovirus-like
	RNA, 1, L	2, L, seg	<i>Cystoviridae</i>	envelope, lipids
Filamentous		DNA, 1, C	<i>Inoviridae</i>	a. long filaments
	2, L	<i>Lipothrixviridae</i>	b. short rods	MVL1
		<i>Rudiviridae</i>	envelope, lipids	TTV1
Pleomorphic	DNA, 2, C, S	<i>Plasmaviridae</i>	envelope, lipids, no capsid	L2
		<i>Fuselloviridae</i>	same, lemon-shaped	SSV1
	2, C, S	<i>Salterprovirus</i>	same, lemon-shaped	His1
		2, L, S	<i>Guttaviridae</i>	droplet-shaped
	2, C, S	<i>Ampullaviridae</i> *	bottle-shaped	ABV
		2, L	<i>Bicaudaviridae</i> *	two-tailed, growth cycle
	2, L	<i>Globuloviridae</i> *	paramyxovirus-like	PSV

C Circular; L linear; S superhelical; seg segmented; 1 single-stranded; 2 double-stranded
*Awaiting classification

Fuente: Hans-W. Ackermann, Revisión general de la biología de los fagos.



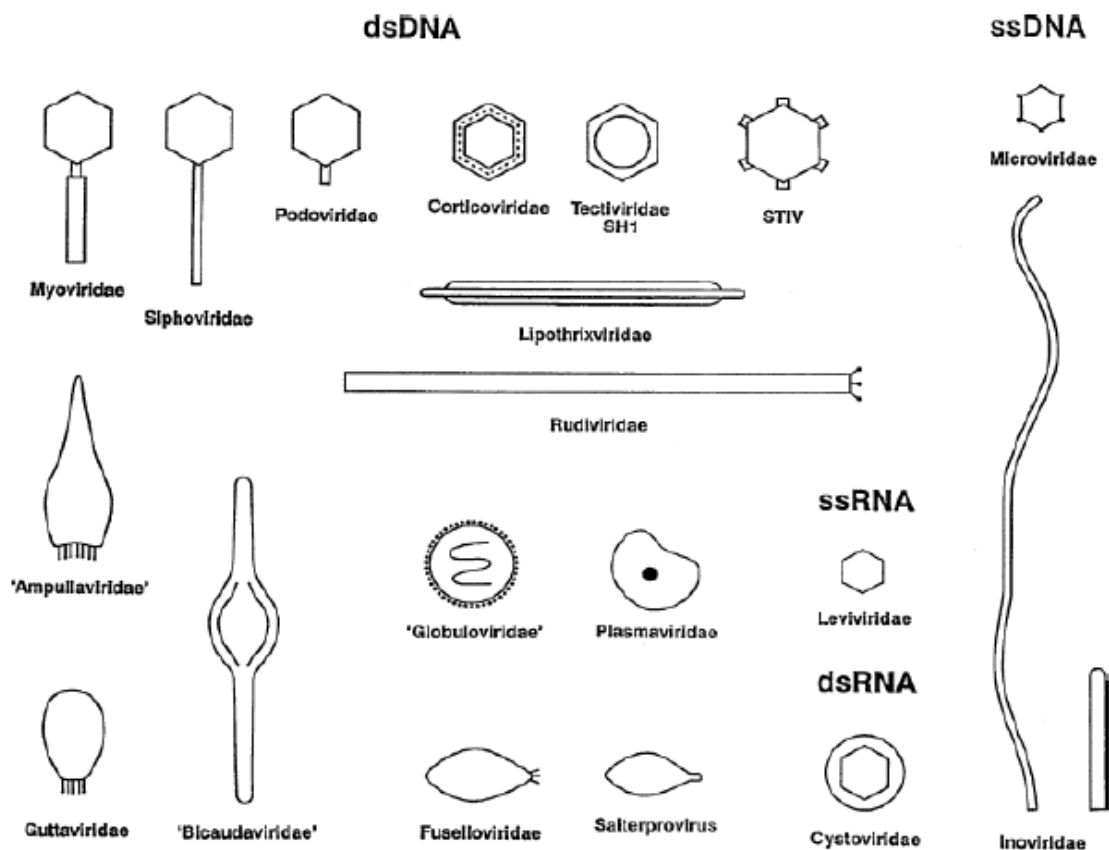


Figura 1: Morfotipos básicos de los bacteriofagos

Fuente: Hans-W. Ackermann, Revisión general de la biología de los fagos.

En la actualidad se puede estimar que la biosfera está compuesta por aproximadamente 10^{31} bacteriofagos, siendo los principales entes de regulación biológico en todo nuestro planeta, desafortunadamente menos del 1% de la interacción bacteriófago – hospedero ha podido ser identificado, haciéndolo un gran desafío.³⁸

2.8.1 FAGOS CON COLA

Los fagos con cola pertenecen a un gran grupo de virus bacteriales, estos poseen una cabeza llamada capsida con una simetría cubica y una cola helicoidal. Las cabezas son icosaédricas o alargadas, las proteínas de las capsides son organizadas en capsómeros de 5 o 6 unidades proteicas con la finalidad de proteger el genoma. El genoma son los códigos de ácidos nucleicos para las enzimas y proteínas necesarias

para replicarse por sí mismos, pueden ser ADN o ARN, lineal o circular, de cadena simple o doble. Las colas de los bacteriófagos son helicoidales o contienen discos apilados que a menudo tienen estructuras terminales tales como placa basal cuya principal función es penetrar en la pared bacteriana permitiendo así inyectar el genoma, fibras proteicas, puntos de anclaje o espículas hacen que el bacteriófago se fije en la superficie de la bacteria hospedera.^{39,43} Las colas tienen dimensiones fijas, son proteínas en la naturaleza y están compuestas de subunidades que forman estrías transversales.³⁶

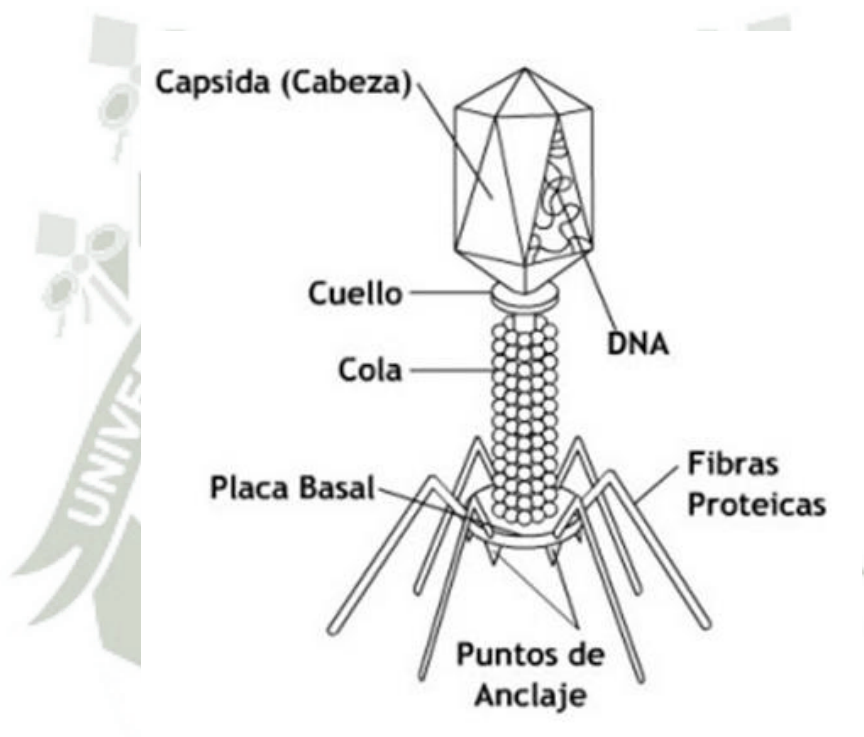


Figura 2. Morfología básica de un bacteriófago.⁴¹

La composición de ADN de doble cadena de los fagos de cola es por lo general un reflejo de su huésped bacteriano aunque algunos ADN, tales como los de colífago T4, contienen bases inusuales, por ejemplo, 5-hidroximetilcitosina.⁴⁰

Los fagos con cola son considerados como los más diversos y extensos dentro de todos los grupos virales porque sus propiedades son altamente de alto alcance. Algunas de estas diferencias incluyen el contenido de ADN y la composición, el rango hospedero, la fisiología, la serología y la naturaleza de las proteínas constitutivas.³⁹ A pesar de estas diferencias, las propiedades morfológicas,

fisiológicas y fisicoquímicas revelan que esta clase de fagos forman un grupo evolutivo monofilético.

Las tres familias, *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae* conforman los fagos de cola. Esta distribución se basa en las diferencias en la estructura de la cola. *Myoviridae* poseen colas contráctiles que consisten en una funda y el tubo central de simetría helicoidal entre 16 y 20nm, poseen capsides más grandes entre 50 y 110 nm, que además la utilizan para inyectar el ADN en la célula huésped; contienen más ADN lineal en comparación con sus homólogos entre 33.6 y 170 kb de longitud. *Siphoviridae* representan alrededor del 61% de los fagos de cola, se caracterizan por sus cabezas sin envoltura de la capside y colas largas no contráctiles, las cabezas por lo general tienen un diámetro de 60nm es de doble cadena y de ADN lineal que esta aproximadamente entre los 50kb. Por último los *Podoviridae* son fagos con una cabeza de aproximadamente 60kb y colas no contráctiles y cortas con una longitud máxima de 17nm; su genoma es de doble cadena lineal de aproximadamente 40 a 42kb de longitud.^{39, 42}

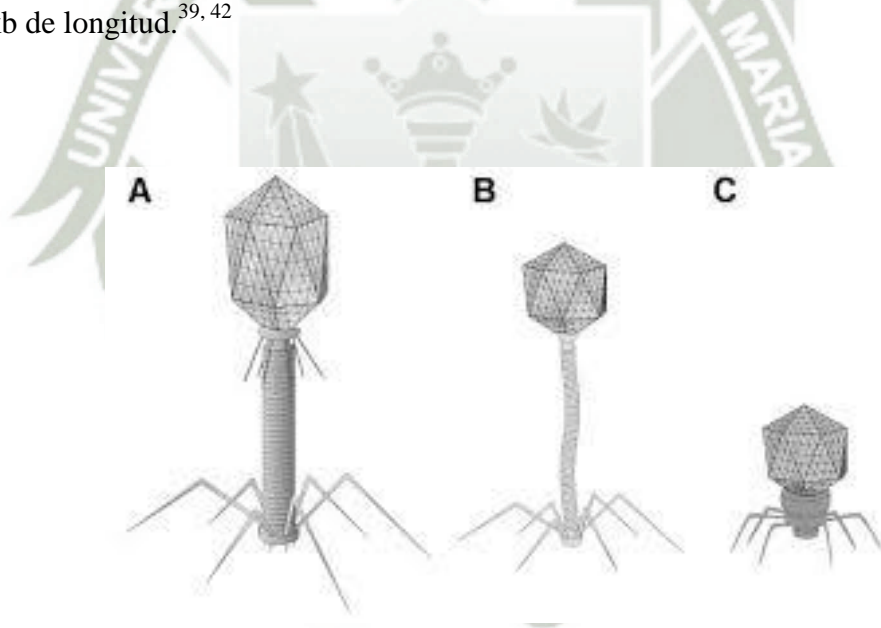


Figura 3. A) Familia *Myoviridae*, B) Familia *Siphoviridae*
C) Familia *Podoviridae*.

Fuente: Bacterial viruses targeting multiresistant *Klebsiella pneumoniae*
and *Escherichia coli*. Harold Eriksson – Stockholm University.

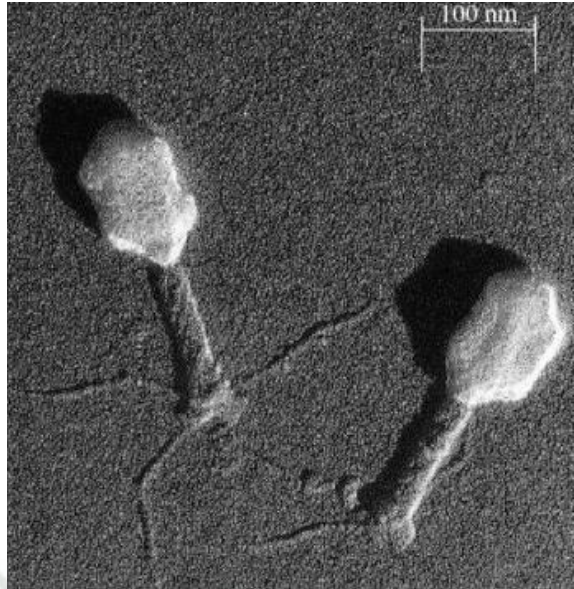


Figura 4. Microscopia Electrónica de Transferencia,
Bacteriofago T4 familia *Myoviridae*.

Fuente: Travaux académiques mutualisés (TraAM) : la microscopie électronique

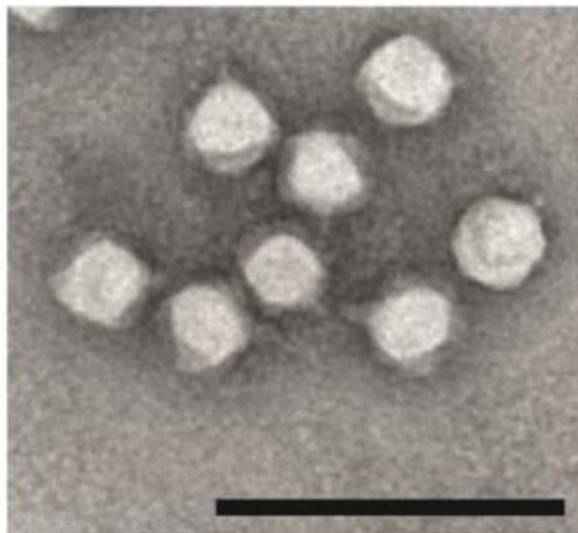


Figura 5. Microscopia Electrónica de Transferencia,
Bacteriofago T7 de la familia *Podoviridae*.

Fuente: Genome, Proteome and Structure of a T7-Like Bacteriophage of the Kiwifruit
Canker Phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae*

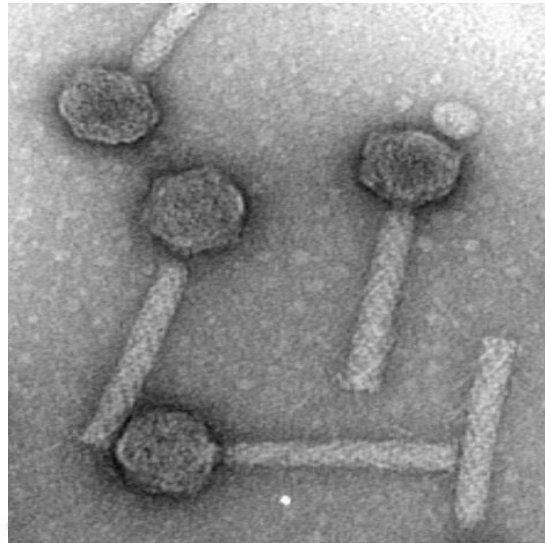


Figura 6. Microscopia Electrónica de Transferencia,
Bacteriofago λ de la familia *Siphoviridae*.

Fuente: <https://www.tes.com/lessons/pjEq1lvb94vtWg/classificazione-dei-viventi>

2.9 CICLO DE VIDA DE LOS BACTERIOFAGOS.

La capacidad más fascinante y útil de los fagos es poder replicarse a sí mismos con la ayuda de la bacteria hospedera. El fago inicial no necesita ser repuesto, como en la terapia antibiótica, por presentar un efecto bactericida que persiste.

Al igual que otros virus, los fagos son parásitos celulares. Ellos llevan el ADN necesario para replicarse a sí mismos, pero no lo puede hacer sin un huésped.

Lo primero que debe realizar el fago, es reconocer a la bacteria que será capaz de infectar. Los bacteriófagos muestran en su superficie ligandos (proteínas de superficie, lípidos y carbohidratos) que son específicos a receptores ubicados en la superficie de sus objetivos, esto varía entre bacterias gram-positivas y gram negativas. Posteriormente, tienen 2 métodos de reproducción dentro de estas células huésped; ciclo lisogénico también conocido como templado o el ciclo virulento también llamado como ciclo lítico ya que su progenie termina por romper la

membrana de la célula hospedera, siendo estos los más utilizados para realizar la fagoterapia.⁴⁴

Por otro lado los fagos de ciclo lisogénico poseen los dos ciclos, ellos tiene la habilidad de someterse a lisis en su célula huésped, por lo que su progenie es liberada en el ambiente, sin embargo sus genes líticos son suprimidos mientras que los lisogénicos son replicados en el ADN del hospedero.⁴⁵

Las bacterias han desarrollado mecanismos para evitar o sobrevivir al ataque de los bacteriófagos en las distintas etapas del ciclo de vida de los fagos. La interacción entra la bacteria y el fago puede ser prevenida por mutaciones en los receptores del fago o secreciones de la capsula o de la membrana celular. Si es posible la adsorción del fago, la transferencia de los ácidos nucleicos es bloqueada.⁴⁶ Además emplean mecanismos de sobrevivencia cuando la transferencia de los ácidos nucleicos de los fagos ocurre, diferentes fases del desarrollo intracelular pueden ser eliminados si es que el hospedero reconoce el material genético que es transferido por el fago por medio de enzimas de restricción.⁴⁷

Al igual que las bacterias los bacteriofagos también han desarrollado técnicas para poder superar los mecanismos de resistencia bacteriana, una de ellas es la mutación en la que puede cambiar la especificidad de adsorción y las modificaciones del control del hospedero que le permite mejorar la propagación en las células específicas.⁴⁸

2.9.1 CICLO LÍTICO DE LOS BACTERIOFAGOS

El reproducirse o generar copias de sí mismo es la única función que comparten los bacteriófagos con los seres vivos, necesitando utilizar la materia, energía y la maquinaria de la célula hospedera, por lo que se les considera como parásitos obligados. El ciclo lítico está conformado por cinco etapas.

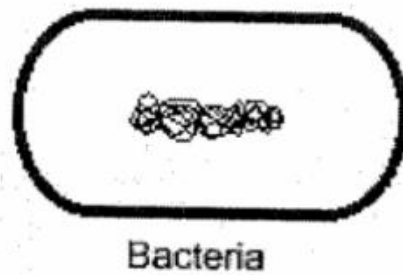


Figura 7. Esquema Fago y bacteria

Fuente: <http://www.microbiologybook.org/Spanish/chapter7.html>

2.9.1.1 ADSORCIÓN

El ciclo de replicación de los bacteriófagos depende de este primer paso, en el que los viriones encuentran el punto de anclaje en la membrana celular de su hospedero utilizando la placa basal que posee algunas enzimas que ayudan a debilitar la membrana celular y sus fibras proteicas seguido al anclaje ocurre la transferencia del ADN.⁴⁹ Algunos de estos fagos son capaces de infectar a más de una sola especie de bacterias.⁵⁰

La infección dentro de la célula bacteriana es iniciada por la unión de moléculas específicas de la superficie o el uso de las fibras que forman la estructura de adsorción. Los sitios de unión varían de acuerdo al tipo de bacteria específica, es decir si estas son gram positivas o gram negativas, en el caso de las últimas mencionadas los oligosacáridos, lipopolisacáridos y casi cualquier clase de proteína puede servir como receptores. El rango y la eficiencia de adsorción varía entre cada sistema fago – hospedero. Estos parámetros son influenciados por factores externos y las condiciones fisiológicas del hospedero. Cofactores como Ca^{+2} , Mg^{+2} , cationes divalentes o azúcares pueden ser requeridos para que ocurra exitosamente la unión.

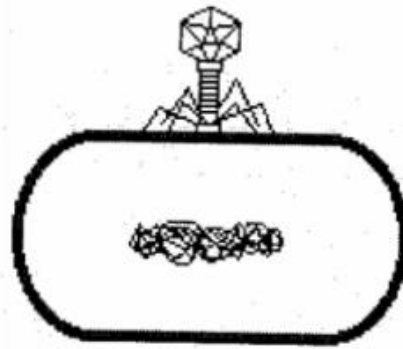


Figura 8. Etapa de Adsorción sistema Fago – Hospedero.

Fuente: <http://www.microbiologybook.org/Spanish/chapter7.html>

2.9.1.2 INYECCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO

Luego de la adsorción, es turno de la transferencia del genoma del fago. El mecanismo es específico para los diferentes fagos, sin embargo, un rasgo común de casi todos los fagos es que sus capsides y las colas se mantienen fuera de la célula, mientras que sólo el genoma se transfiere al citoplasma. Esto está en contraste a lo que ocurre en la mayoría de los virus de eucariotas, donde el virus se fusiona con la membrana plasmática de hospedero cuando se entrega el genoma.⁵⁰

En general, la punta de la cola penetra en la capa de peptidoglicano y la membrana interna para liberar el ADN en la célula. El genoma viral típico es de aproximadamente 10 micras de largo y su transferencia desde el exterior al interior de la célula toma una cantidad de tiempo variable, desde segundos a minutos.⁴⁹

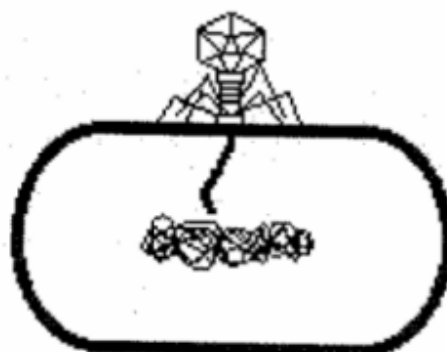


Figura 9. Esquema de inyección del material genético del fago a la bacteria.

Fuente: <http://www.microbiologybook.org/Spanish/chapter7.html>

2.9.1.3 REPLICACIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO VIRAL (PERIODO DE ECLIPSE)

Este paso en el ciclo lítico implica la producción de componentes virales. Esto se logra utilizando las enzimas de la célula huésped tales como ADN polimerasa y ARN polimerasa, los aminoácidos, los ribosomas, y los nucleótidos para sintetizar ácido nucleico viral y proteínas.⁴⁴

La ARN polimerasa del huésped reconoce promotores fuertes de fagos que resulta en la transcripción de genes tempranos inmediatos. Un grupo de genes medio es entonces por lo general transcrito, y los productos de este son responsables de la síntesis de ADN de fago. Posteriormente, se producen los genes tardíos que codifican las diferentes partes de la partícula de fago.

Para reprogramar la célula huésped y poder sintetizar fagos progenie, se emplean ciertos mecanismos. Estos incluyen la degradación del ADN del huésped y la inhibición de la traducción de mRNA de acogida, algunos fagos producen proteínas de unión al ADN para reprogramar el ARN polimerasa del anfitrión, mientras que otros codifican sus propios ARN polimerasas, que son mucho más pequeños y de movimiento más rápido que los que pertenecen a las bacterias.⁵¹

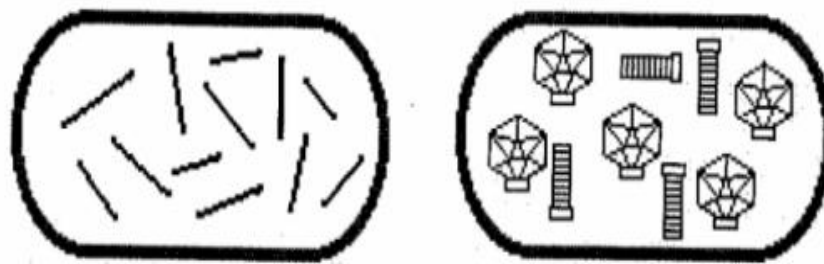


Figura 10. Interrupción del Virus en el mecanismo bacteriano

Fuente: <http://www.microbiologybook.org/Spanish/chapter7.html>

2.9.1.4 ENSAMBLAJE

Diversos componentes de fagos se ensamblan para producir viriones completos. El ácido nucleico se empaqueta en procapsides que son envolturas proteicas icosaédricas. El ADN es empaquetado en la cabeza después de lo cual está ligado a

estructuras de cola premontadas para formar entidades infecciosas. La cabeza se expande y se gana estabilidad antes de o durante el empaquetado de ADN, para dar cabida a la molécula de ADN de longitud. La estabilidad también permite la rápida salida de ADN cuando se inicia la infección.⁵¹

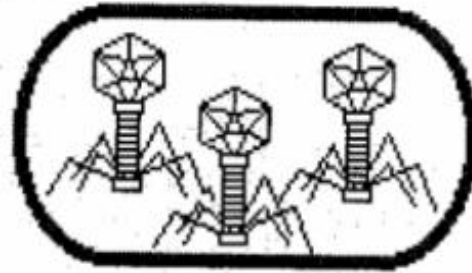


Figura 11. Formación de los nuevos viriones.

Fuente: <http://www.microbiologybook.org/Spanish/chapter7.html>

2.9.1.5 LISIS Y LIBERACIÓN

La lisis bacteriana es la última etapa en el ciclo de vida lítico. La liberación de la progenie en el medio ambiente para la mayoría de los fagos sólo puede lograrse una vez cuando la envoltura células es interrumpida. Los fagos líticos codifican y contienen una enzima, conocida como una endolisina que degrada el peptidoglicano bacteriano.⁵² Esta enzima no es el único contribuyente a la lisis, las endolisinas necesitan un segundo factor de lisis, una proteína de la membrana del fago codificada llamado holina. El sistema holina-endolisina es esencial para la lisis del anfitrión.⁵³

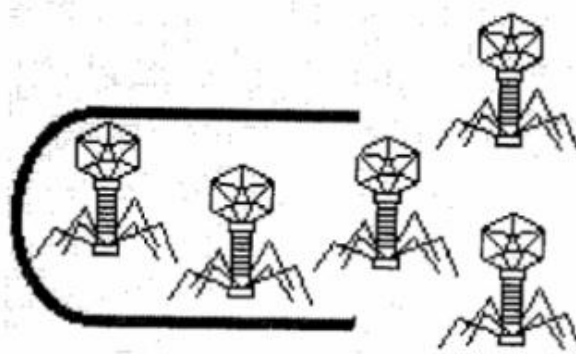


Figura 12. Lisis bacteriana, liberación de los Viriones.

Fuente: <http://www.microbiologybook.org/Spanish/chapter7.html>

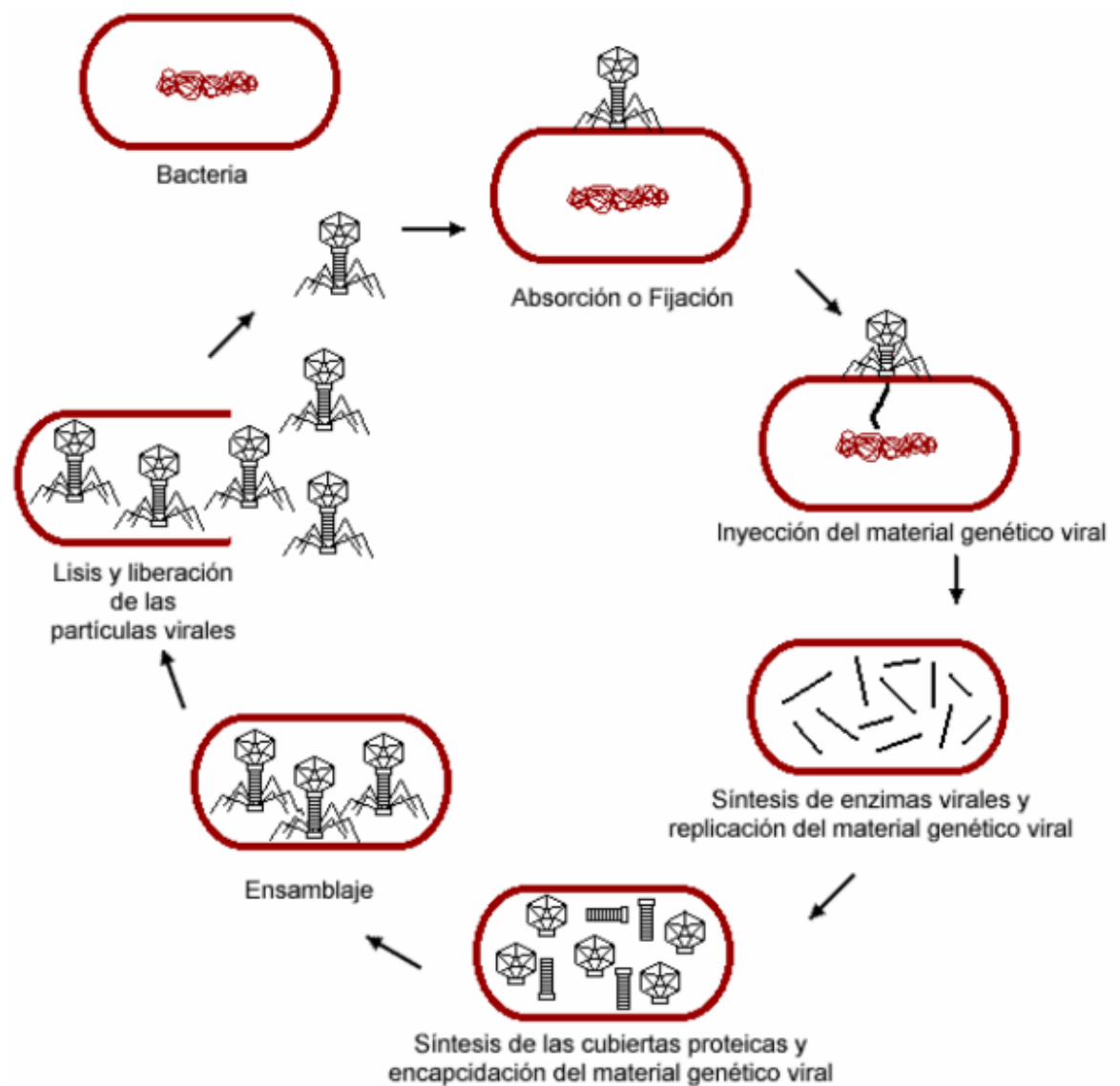


Figura 13.Diagrama del Ciclo Lítico de los Bacteriofagos

Fuente: Biología Médica, Seminarios de Biología celular y Molecular - USMP

2.9.2 CICLO LISOGÉNICO DE LOS BACTERIOFAGOS.

En el ciclo de vida lisogénico, el material genético viral se incorpora en el ADN bacteriano. Esto se conoce como el profago o estado proviral siendo un precursor no infeccioso. Un virus puede permanecer en este estado latente y se replica con el ADN del huésped. Las bacterias que albergan profagos se conocen como lisógenos.⁵⁴

La mayor parte de la progenie de una bacteria lisogénica puede ser inducida a producir el fago por medio de la irradiación con U.V. o tratamiento con otros

factores inductores. Se denomina *temperados* a los bacteriófagos capaces de existir en forma de profago en el interior de una bacteria hospedera. Después de que el profago ha sido inducido por irradiación, ocurre un breve periodo de eclipse en el cual no se puede detectar la presencia del fago dentro de la bacteria. Sin embargo, es posible detectar la aparición de proteínas y ácido nucleico específicos del fago; estos elementos serán ensamblados para formar los nuevos fagos maduros poco antes de que ocurra la lisis de la bacteria hospedera. Las bacterias infectadas por fagos temperados continúan dividiéndose por varias generaciones y son inmunes o resistentes a ser superinfectadas por el mismo tipo de fago que albergan o por otros fagos pertenecientes a clases emparentadas con el fago temperado original. Estas bacterias contienen cuando menos una copia íntegra del genoma del fago. Las bacterias infectadas por fagos temperados portan la información genética correspondiente al fago, a través de múltiples divisiones bacterianas, o sea, el genoma del fago es replicado al mismo tiempo que ocurre la replicación del genoma bacteriano; este hecho hace posible que la bacteria original pueda heredar el fago temperado a la subsecuente progenie bacteriana.⁵⁵

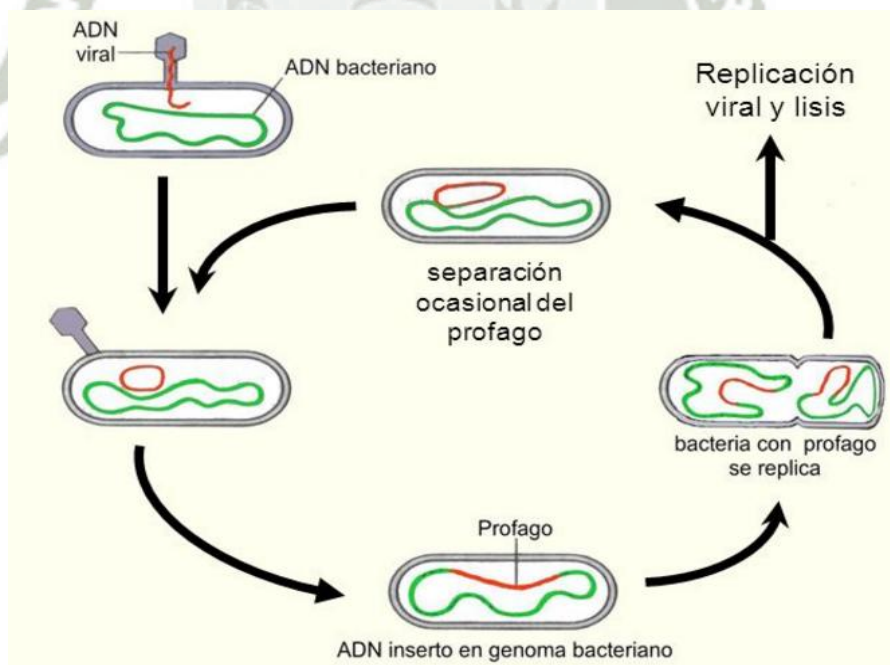


Figura 14.Diagrama del Ciclo lisogénico de los Bacteriofagos.

Fuente: Biología Médica, Seminarios de Biología celular y Molecular - USMP

2.10 AISLAMIENTO DE BACTERIOFAGOS A PARTIR DE MUESTRAS AMBIENTALES.

Los bacteriófagos son el tipo de entidad más abundante en la tierra, ellos pueden ser encontrados en una gran variedad en el medio ambiente, plantas y animales. La mejor fuente para encontrar un fago, es el buscar el lugar en el que su hospedero específico se encuentre en cantidades abundantes. Es decir que aquellos fagos que infectan la flora intestinal de los humanos, las aguas residuales municipales son una excelente fuente; o para los cianófagos el agua de mar. Los fagos pueden ser fácilmente aislados a partir de varias fuentes. Antes de iniciar el aislamiento de un fago, su huésped bacteriano necesita estar aislado y crecido en cultivo puro. Durante el aislamiento de fagos, es mejor utilizar bacterias huésped en la fase de crecimiento exponencial, aunque también aparecen algunos fagos capaces de propagarse en bacterias en la fase de crecimiento estacionario.⁵⁶ Además para favorecer a la replicación de los bacteriófagos se deben tener en cuenta las condiciones óptimas (medio, nivel de oxígeno, temperatura, tiempo de incubación, etc.) para el crecimiento del hospedero.

2.10.1 AISLAMIENTO DE BACTERIOFAGOS DE FUENTES AMBIENTALES POR SELECCIÓN DIRECTA DE PLACA.

En el caso de fuentes líquidas, se realizan diluciones seriadas de la muestra estas son plaqueadas o inoculadas en césped bacteriano del huésped deseado. En el caso de muestras sólidas, primero se necesita mezclar la muestra con medio de crecimiento o una solución tampón, se deja reposar por unas horas a temperatura ambiente antes de realizar las diluciones seriadas para luego ser plaqueadas o inoculadas en el césped bacteriano, en el caso que la muestra contenga mucha cantidad de bacterias o residuos estas pueden ser purificadas antes del plaqueo.

En el caso que la muestra contenga suficiente cantidad de bacteriófagos líticos para su hospedero específico se formaran halos transparentes en las placas o también conocidas como “CALVAS”.⁵⁷

Como se sabe, cuando una partícula de fago se encuentra con una bacteria permisiva, infectará y después lisa con la liberación de partículas de bacteriófagos recién formados. Cuando unos 100-500 fagos se mezclan con aproximadamente 10^8 células

bacterianas apoyarán la propagación del fago y se vierte en una capa de agar blando en la superficie de un medio sólido para apoyar el crecimiento bacteriano, las bacterias no infectadas reanudarán su crecimiento hasta finalmente llegar a la fase estacionaria, formando una suave capa opaca o el césped en la superposición. Las partículas de fago pronto entran en contacto con las bacterias que infectaran. El fago progenie de cada bacteria infectada, infectara a las bacterias vecinas, y el ciclo lítico se repetirá varias veces resultando en una zona de crecimiento de la lisis, lleno de fago liberados, que finalmente se hace visible para el ojo humano como un halo o "Calva".

El crecimiento de la calva está limitada por la difusión lenta del fago en el medio semisólido y agar blando, esto se debe a que en la mayoría de los casos las células hospederas soportan al fago en su crecimiento sólo en la medida en que metabolizan de forma activa, por lo que cuando el crecimiento celular se detiene, También el crecimiento del fago terminará.

El tamaño de la calva se determina principalmente por la naturaleza y el tamaño del fago, el grosor de las capas de agar inferior y superior, la concentración de agar en la parte superior de la capa (y velocidad de difusión resultante), tipo de medio, placas, densidad celular, distribución de veces de adsorción, y el Burst Size. Una producción de alrededor de 10-15 de fagos por célula infectada es generalmente suficiente para la formación de calva.⁵⁸

Cada partícula de fago que da lugar a una calva se denomina una unidad formadora de calva (Plaque Form Unit PFU). El número de PFU en un volumen dado de la muestra da la concentración de fago viable o título. Sin embargo, esto no es necesariamente una estimación precisa de la cantidad absoluta de partículas de fagos presentes. La capacidad de formación de placas de fagos pueden diferir drásticamente en diversas condiciones ambientales.

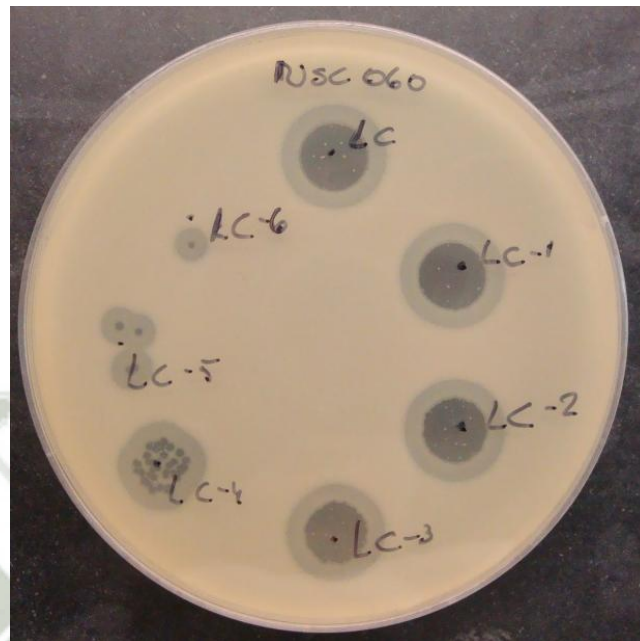


Figura 15. Aislamiento de bacteriófagos por método de inóculo de gota. Formación de calvas aisladas.

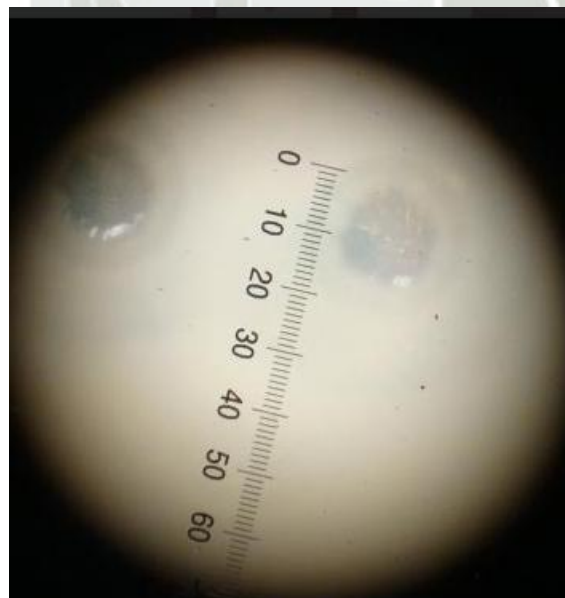


Figura 16. Vista en Estereoscopio de calvas aisladas.

2.11 CURVA DE CRECIMIENTO DE BACTERIOFAGOS LÍTICOS

Los fagos se mezclan con bacterias huésped apropiadas a una baja multiplicidad de infección (MOI). Después de unos pocos minutos para la adsorción, se diluyen las células infectadas y las muestras se colocan en placas varias veces para determinar los centros infecciosos.

El número de calvas generalmente se mantiene constante en el número de células infectadas durante un tiempo característico, el período de latencia, y entonces se eleva bruscamente, estabilizándose en muchas veces su valor inicial, ya que cada célula se lisa y libera el fago completado.

Los periodos de eclipse y la latencia de fagos son parámetros importantes que caracterizan interacciones fago-huésped. El periodo de eclipse es el tiempo desde la infección hasta la formación de los nuevos viriones, las partículas infecciosas de los fagos se han formado dentro de las bacterias infectadas, mientras el periodo de latencia es el tiempo desde la infección hasta que las primeras partículas de fago se liberan de las células hospederas. Los periodos de eclipse y latencia deben ser determinados a partir de las células infectadas por separado, en condiciones que impidan la reinfección por el recién liberado de los fagos progenie. La relación entre el número de calvas obtenidas antes y después de la lisis se llama Burst Size. Tanto el Burst Size como el periodo de latencia son características de cada cepa de fago en condiciones determinadas, pero se ven afectados por el huésped utilizado, el medio, y la temperatura. Si las células infectadas se rompen en diversos momentos después de la infección, el fago parece estar desaparecido durante un determinado período. Se utiliza cloroformo para inducir la lisis seguido del plaqueo, tanto el período de eclipse y la posterior tasa de intracelular síntesis de partículas de fago viables ahora se miden de forma rutinaria. La adición de cloroformo hará que las células se lisen, y los fagos se liberen los cuales pueden hacer una placa individual y ser contados. Las células no infectadas mueren pero no son lisadas por cloroformo, y las células que todavía no produjeron mucho lisozoma se lisarán lentamente, pero ninguna de las células realmente infectadas por un fago virulento podrán realmente deshacerse del fago y ser capaz de hacer una colonia al plaquear. También permite medir también la eficiencia de matar a su hospedero.⁵⁹

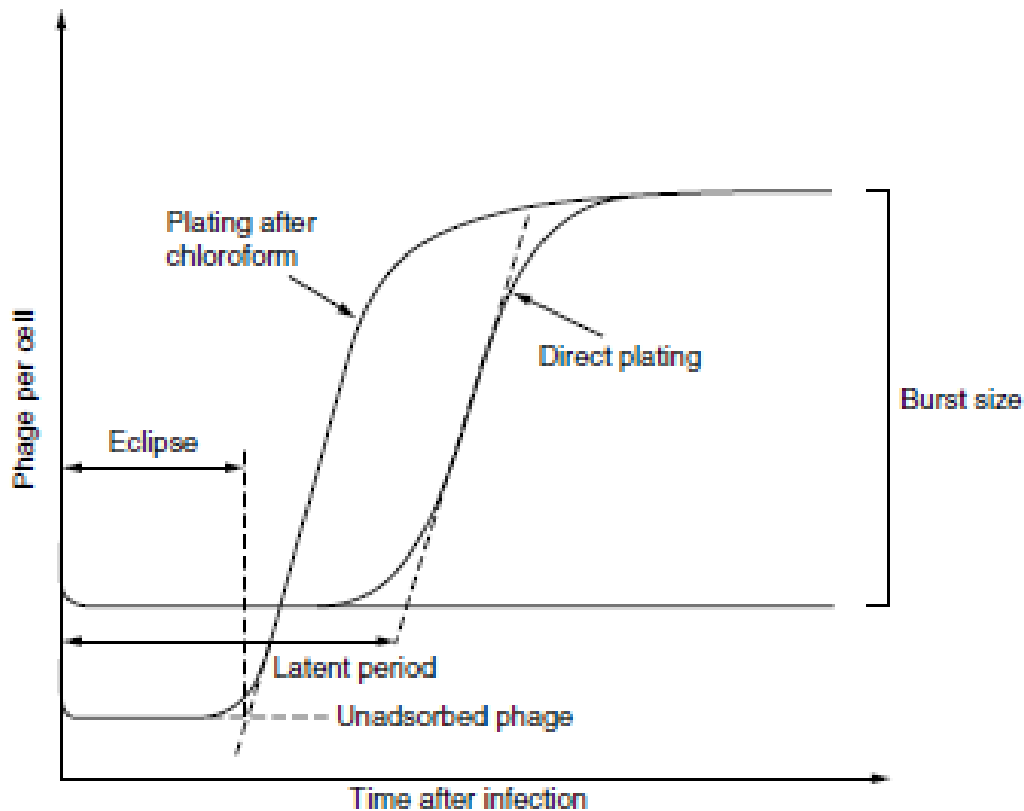


Figura 17. Curva de Crecimiento de un Solo Paso.

Fuente: BACTERIOPHAGES: Biology and Applications, Kutter E.

2.12 AMPLIFICACIÓN DE BACTERIOFAGOS POR PCR

Para poder continuar con la caracterización de los bacteriófagos, lo más recomendable es el uso de microscopía electrónica de transmisión. Sin embargo el PCR es un método rápido, eficaz y económico para poder identificar la presencia de bacteriófagos, o genes específicos de fagos codificados a partir de muestras ambientales, células bacterianas o virus purificados. Las limitaciones son que se debe saber específicamente lo que está buscando con el fin de encontrarlo. Aunque los bacteriófagos no tienen la ventaja de tener un gen conservado, presente en todos los miembros, hay muchos genes de fagos que muestran la conservación de nucleótidos. A medida que se disponga de más datos de la secuencia a través de ambos enfoques de metagenómica y la secuenciación de genomas completos de bacteriófago, los primers de PCR puede afinar aún más y por lo tanto deben ser una herramienta cada vez más útil para la biología del bacteriófago.

Por ejemplo, para caracterizar una nueva cepa bacteriana aislada, una de las primeras herramientas utilizadas es el polimorfismo de un marcador universal, típicamente la secuencia del ADN ribosomal 16S. Esto le da a la información de la posición filogenética de la cepa bacteriana. Todas las bacterias tienen ribosomas y por lo tanto genes ribosomales que afortunadamente son buenos marcadores debido a tener regiones altamente conservadas, por lo tanto primers "universales" se pueden utilizar para ellos y ampliamente regiones altamente variables que se pueden utilizar para distinguir entre cepas bacterianas. Por desgracia, los bacteriófagos no tienen ese gen que es común a todos los representantes. Incluso cuando un gen puede ser común a las tres familias de fagos, por ejemplo, los principales genes estructurales, la secuencias son tan variadas en una alineación y en consecuencia un análisis filogenético no es posible.

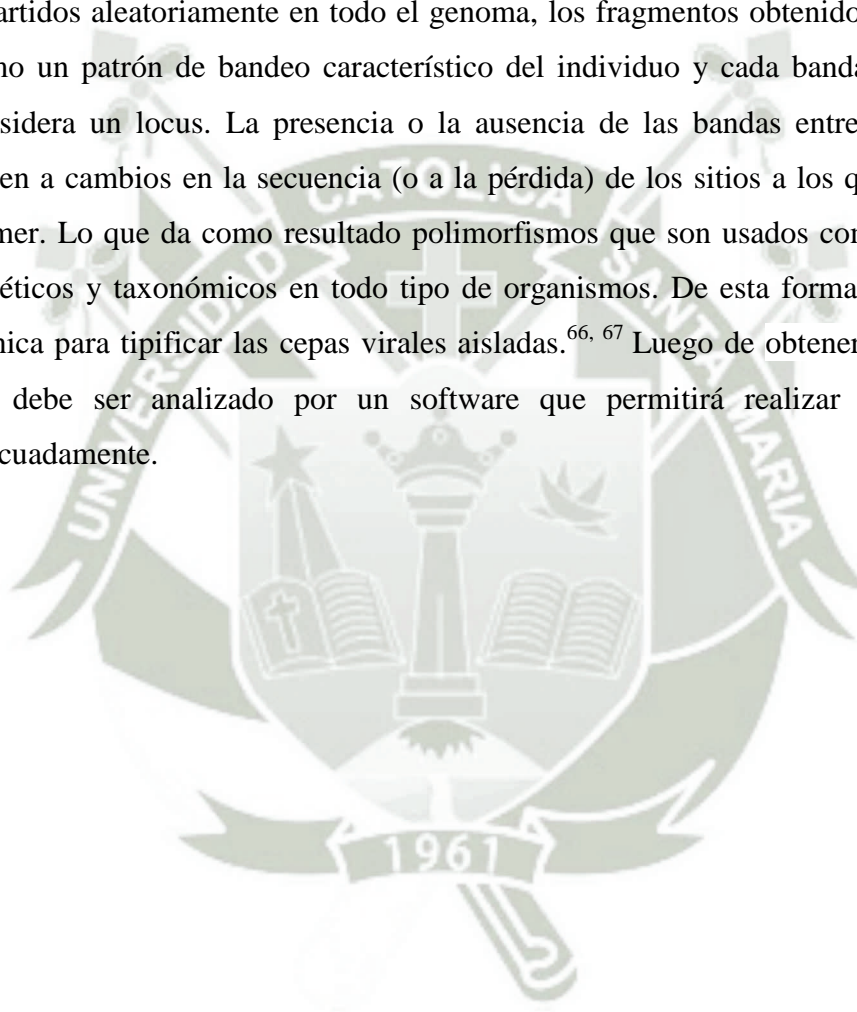
El primer paso para hacer la PCR de los bacteriófagos es obtener una alta calidad de producto de PCR de la amplificación de los genes. Afortunadamente, en muchos casos, en PCR requiere tan solo de 1ng a 10ng de ADN de fago por reacción, este ADN debe ser extraído de las muestras ambientales.⁶¹

El verdadero desafío de la PCR en bacteriófagos es el de escoger correctamente el gen que será amplificado y por consiguiente el diseño del primer. El gen que se escoge dependerá obviamente para lo que se desea encontrar. En la actualidad, se conoce bastante bien el bacteriófago "T4" que pertenece a la familia *Myoviridae*, donde los primers fueron diseñados teniendo en cuenta la mayor cantidad de proteinas de la capsida como los genes gp23 y el gp20 o gen que codifica la polimerasa de ADN, el gen gp43.^{61, 62, 63} Estos genes se han venido estudiando para evaluar la diversidad de los cianófagos, siempre se debe tener en cuenta que no existen primers universales para el caso de los bacteriófagos, incluso en el caso de genes comunes entre esta familia.⁶⁴

Lamentablemente para el reconocimiento las familias *Podoviridae* o *Siphoviridae* no se les puede reconocer fácilmente por este tipo de pruebas por escasas de conocimiento de las secuencias de estos fagos.

2.13 TIPIFICACIÓN DE LOS BACTERIOFAGOS AISLADOS POR RAPD-PCR

La técnica RAPD-PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA / Amplificación Aleatoria de Regiones Polimórficas de ADN) consiste en la amplificación enzimática con el uso de primers (generalmente de 10 nucleótidos de longitud) de secuencias aleatorias no-palindrómicas, con un contenido de G + C entre 50 y 80%,⁶⁵ de secuencia arbitraria utilizando un solo primer por reacción, que actuará al mismo tiempo como iniciador sentido y antisentido que hibridan loci repartidos aleatoriamente en todo el genoma, los fragmentos obtenidos se visualizan como un patrón de bandeo característico del individuo y cada banda observada se considera un locus. La presencia o la ausencia de las bandas entre individuos se deben a cambios en la secuencia (o a la pérdida) de los sitios a los que se alinea el primer. Lo que da como resultado polimorfismos que son usados como marcadores genéticos y taxonómicos en todo tipo de organismos. De esta forma se utiliza esta técnica para tipificar las cepas virales aisladas.^{66, 67} Luego de obtener las bandas, el gel debe ser analizado por un software que permitirá realizar la tipificación adecuadamente.



CAPÍTULO 3

3.1 MATERIALES

MATERIAL BIOLÓGICO

- Cepas de *Acinetobacter baumannii* provenientes de hospitales de Lima e Iquitos.
- Muestra de Agua de Arequipa, Lima e Iquitos.
- *Escherichia coli* bacteriophage T4 ATCC® 11303-B41™
- *Escherichia coli* bacteriophage T7 ATCC® BAA-1025-B2™

MATERIAL DE VIDRIO

- Tubos de vidrio 10ml, 15ml.
- Matraz 250 ml, 500ml.

MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Tripticasa de Soja (ATS).
- Caldo Tripticasa de Soja (CTS)
- Agar –Agar

MATERIAL QUÍMICO – BIOLOGÍA MOLECULAR

- Kit QIamp MinElute Virus-QIAGEN
- Alcohol Grado molecular
- Buffer fosfato Salino (PBS 1X) - SIGMA
- Cloroformo.
- DMSO
- Agua de PCR. -Applied Biosystems
- PCR buffer --Applied Biosystems
- Amplitaq Gold Polimerasa.-Applied Biosystems
- Platinum taq – INVITROGEN
- 10 X Buffer PCR sin Mg,

- MgCl - INVITROGEN
- dNTP Mix --Applied Biosystems
- dATP- INVITROGEN
- dTTP – INVITROGEN
- dGTP- INVITROGEN
- dCTP- INVITROGEN
- Primer MZIA 1
- Primer MZIA 2
- Primer HECTOR29
- Primer HECTOR500
- Primer R10D
- Agarosa –INVITROGEN.
- SYBR SAFE -INVITROGEN
- Triz Borato EDTA (TBE 1X) - INVITROGEN
- Nucleic acid Sample Loading Buffer 5X -BIO-RAD,.
- Track It ladder de 100bp

EQUIPOS

- Incubadora
- Shaker.
- Centrifuga.
- Shaker de Incubación.
- Refrigeradora
- Cabina de flujo Laminar
- Balanza analítica
- Vortex
- Expectofotometro SmartSpec Plus-BIORAD.
- Calentador de tubos de microcentrifuga.
- Baño María

- Transiluminador GelDoc – BIORAD.
- Termociclador Veriti – APPLIED BIOSYSTEMS
- Termociclador GeneAmp PCR System 9700- APPLIED BIOSYSTEMS
- Fuente de Poder – BIORAD
- Camara de Electroforesis.

OTROS

- Contenedores de 1 lt.
- Tubos eppendorf de 1.5ml
- Tubos eppendorf de 200µl.
- Micropipetas (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)
- Tips con filtro (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl).
- Placas Petri de plástico (140 x150mm)
- Filtros para jeringa de 0.22µm.
- Tubos con filtro de 0.22µm.
- Pipetas Pasteur descartables
- Parafilm.
- Regla vernier.
- Pipetas serológicas de 10ml.
- Propipetas.
- Celdas de espectrofotómetro descartables.
- Software GelJ v.1.2

3.2 MÉTODOS

3.2.1 AISLADOS BACTERIANOS

Se utilizó muestras de *Acinetobacter baumannii* que pertenecen al banco de cepas del NAMRU-6, previamente fueron clasificadas por pruebas bioquímicas, API20 y calificadas como MDR y no MDR por el sistema del Phoenix de BD y/o por discos de difusión.

Estas muestras se conservan a -80°C en medio CTS con glicerol.

Tabla 3: Cepas de *Acinetobacter baumannii* del NAMRU-6

Código de <i>Acinetobacter</i>	Lugar de procedencia de la muestra	Tipo de Resistencia
NSC0564	Lima	MDR
NSC0594	Lima	MDR
NSC0702	Lima	MDR
NSC0709	Lima	MDR
NSC0711	Lima	MDR
NSC0733	Lima	MDR
NSC0738	Lima	MDR
NSC0739	Lima	MDR
NSC0742	Lima	MDR
NSC0821	Lima	MDR
NSC0060	Lima	MDR
NSC0062	Lima	MDR
NSC0366	Lima	MDR
NSC0427	Lima	MDR
NSC0438	Lima	MDR
NSC0441	Lima	MDR
NSC0474	Lima	MDR
NSC0477	Lima	MDR
NSC1064	Lima	MDR
NSC0878	Lima	MDR
NSC0911	Lima	MDR
NSC0950	Lima	MDR
NSC0977	Lima	MDR
NSI0585	Iquitos	No MDR
NSI0602	Iquitos	No MDR
NSI0668	Iquitos	No MDR
NSI0681	Iquitos	No MDR
NSI0683	Iquitos	No MDR
NSI0691	Iquitos	No MDR
NSI0699	Iquitos	No MDR
NSI0755	Iquitos	No MDR
NSI0796	Iquitos	No MDR
NSI0808	Iquitos	No MDR
NSI0814	Iquitos	No MDR
NSI0925	Iquitos	MDR

3.2.2 MUESTREO

Se tomó aproximadamente 1lt. de agua residual de los distintos puntos de muestra, y se depositó en un frasco estéril se rotuló, se cerró y selló con parafilm para evitar cualquier problema de derrame ó mezcla.

Tabla 4: Lugares muestreo de agua

Ciudad	Código	Puntos de toma de Muestra	Día de Muestreo
Lima	SWL 001	Hospital de las Fuerzas Aéreas del Perú (FAP)- agua de desagüe (zona de pacientes)	9/24/14
		FAP- Agua de desagüe	9/24/14
		FAP- Pozo séptico	9/24/14
	SWL 002	Hospital Militar Central	9/23/14
	SWL 003	Río Rímac, (Av. Faucett/ Morales Duares)	9/25/14
		Río Rímac (Agustino)	9/25/14
	SWL 004	Río Rímac, laguna de oxidación	9/25/14
	SWL 005	Mercado Magdalena, desagüe de la parte de afuera	9/29/14
	SWL 006	Mercado Magdalena, desagüe de la parte de adentro	9/29/14
	SWL 007	Hospital Rebagliatti, desagüe de los laboratorios	10/1/14
		Hospitla Rebagliatti, desagüe de la parte de afuera del hospital	10/1/14
SWL 008	Planta de tratamiento de Agua Residual Taboada, Callao (desagües de los colectores primarios Costanera, La Marina, Argentina, Morales Duárez, Colector N° 6, Bocanegra, los cuales a su vez recolectan los desagües producidos en los distritos de El Agustino, Ate, San Luis, Santa Anita, San Juan de Lurigancho, Rímac, San Martín de Porres, Carmen de la Legua, Lima Cercado, Breña, Jesús María, La Victoria, Lince, Magdalena, San Miguel, Bellavista, Pueblo Libre, Miraflores y San Isidro.	10/4/14	
SWL 009	Planta de tratamiento de Agua Residual Taboada, Callao (Colector Comas – Chillón, que recolecta los desagües producidos en los distritos de Carabayllo, Comas, Los Olivos, Independencia y parte de San Martín de Porres y el Callao).	10/4/14	
Iquitos	SWI 001	Agua del Río Amazonas	9/28/14
	SWI 002	Mercado de Belen, agua de desagüe	9/28/14
		Acequia de Belen	9/28/14

	SWI 003	Hospital Regional de Loreto (HRL)	9/29/14
	SWI 004	Punchana , agua de desagüe ambiental	9/29/14
	SWI 005	Hospital Apoyo Iquitos (HAI)	9/29/14
	SWI 006	Moronacocha, agua de desagüe ambiental	12/4/14
Arequipa	SWA 001	Congata, agua de desagüe ambiental	12/4/14
	SWA 002	Rio Chili, altura Tingo	12/4/14
	SWA 003	Tingo	12/4/14
	SWA 004	Sabandia, canal de agua	12/4/14

Estas muestras fueron conservadas a temperatura ambiente hasta su uso.



Figura 18. Toma de muestra con balde desagüe del Hospital FAP, LIM



Figura 19. Llenado de 1Lt. de muestra en frascos estériles



Figura 20. Frascos sellados y almacenados a Temperatura ambiente

3.2.3 AISLAMIENTO

3.2.3.1 REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS

Las cepas se sembraron en medio Agar Tripticasa de Soja (ATS) por agotamiento para obtener colonias separadas, se dejó en la incubadora a 37°C por 18 horas aproximadamente.

Con el asa de Kolle se tomó una colonia y se colocó en medio Caldo Triptica de Soja (CTS), una vez que se resuspendió la colonia en el medio se dejó en la incubadora con agitación de 250 rpm a 37°C por 18 horas aproximadamente.

3.2.3.2 AISLAMIENTO POR EL MÉTODO DE ENRIQUECIMIENTO DE BACTERIOFAGOS

Para favorecer el crecimiento de los bacteriófagos, se utilizó 300ml de las muestras de agua y se le adicionó 1ml de caldo con crecimiento bacteriano descritas previamente, se enriqueció con 9g. de CTS . Esta mezcla se llevó a un Shaker a 37°C por 16 horas aproximadamente.

Luego de la incubación, se tomó 1.5ml de las muestras y se colocó en un tubo nuevo de microcentrifuga. A este tubo se le centrifugó por 12000 rpm durante 2 min con la finalidad de formar un pellet, seguido a ello se tomó 750µl. del sobrenadante y se le

traspasó a un tubo de microcentrifuga con filtro de $0.22\mu\text{m}$ y se centrifugó a 8000 rpm por 2 min. Se eliminó el filtro y se conservó el filtrado.

Con la finalidad de obtener calvas más aisladas se hizo diluciones seriadas con PBS a 1X (pH 7.4) hasta obtener a una concentración de 10^{-7} , para ello se tomó $20\mu\text{l}$ del filtrado de la muestra y se resuspendió en $180\mu\text{l}$ de PBS 1X, es decir que se hizo una dilución de (1:10), se repitió este procedimiento hasta llegar a la concentración deseada.

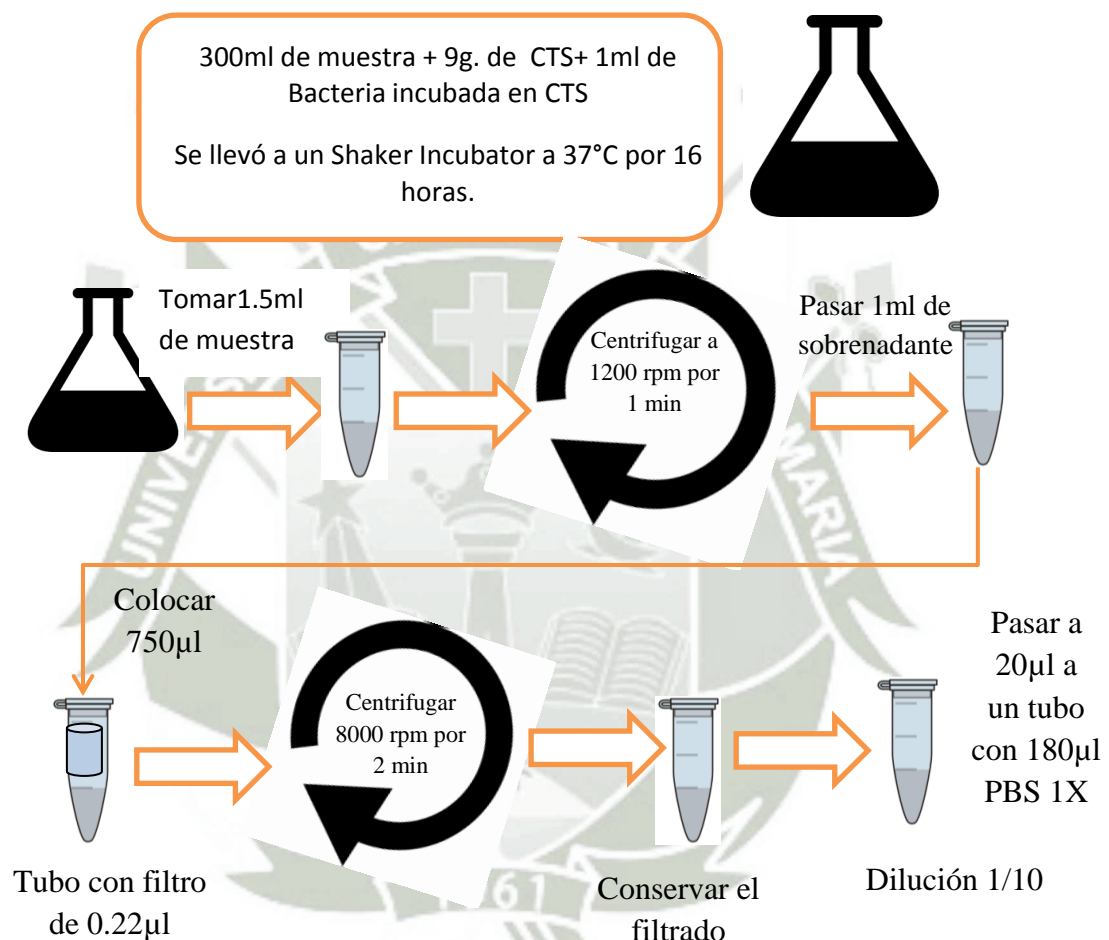


Figura 21. Esquema del método de enriquecimiento de la muestra.

En una placa de CTS al 1.5% de Bacto Agar, se le rotuló en la parte trasera el nombre de la cepa que se probó y las diluciones es decir concentrado, 10^{-1} , 10^{-2} , ..., 10^{-6} , 10^{-7} . Se inoculó 2 ml de CTS con crecimiento bacteriano de *Acinetobacter* (18 horas aproximadamente) con ayuda de una micropipeta, se tomó la placa y se

hizo pequeños movimientos con las manos para que el inóculo cubra toda la superficie del medio, esto es con la finalidad de hacer un césped bacteriano. El excedente se eliminó en un beaker que contenía Hipoclorito de Sodio al 10%, se dejó la placa abierta hasta que estuvo totalmente seca.

Con una micropipeta se inoculó 10 μ l de las diluciones que se hizo previamente, nuevamente se dejó abierta la placa hasta que termino de secar. Finalmente se llevó la placa a la incubadora de 37°C por aproximadamente 18 horas.

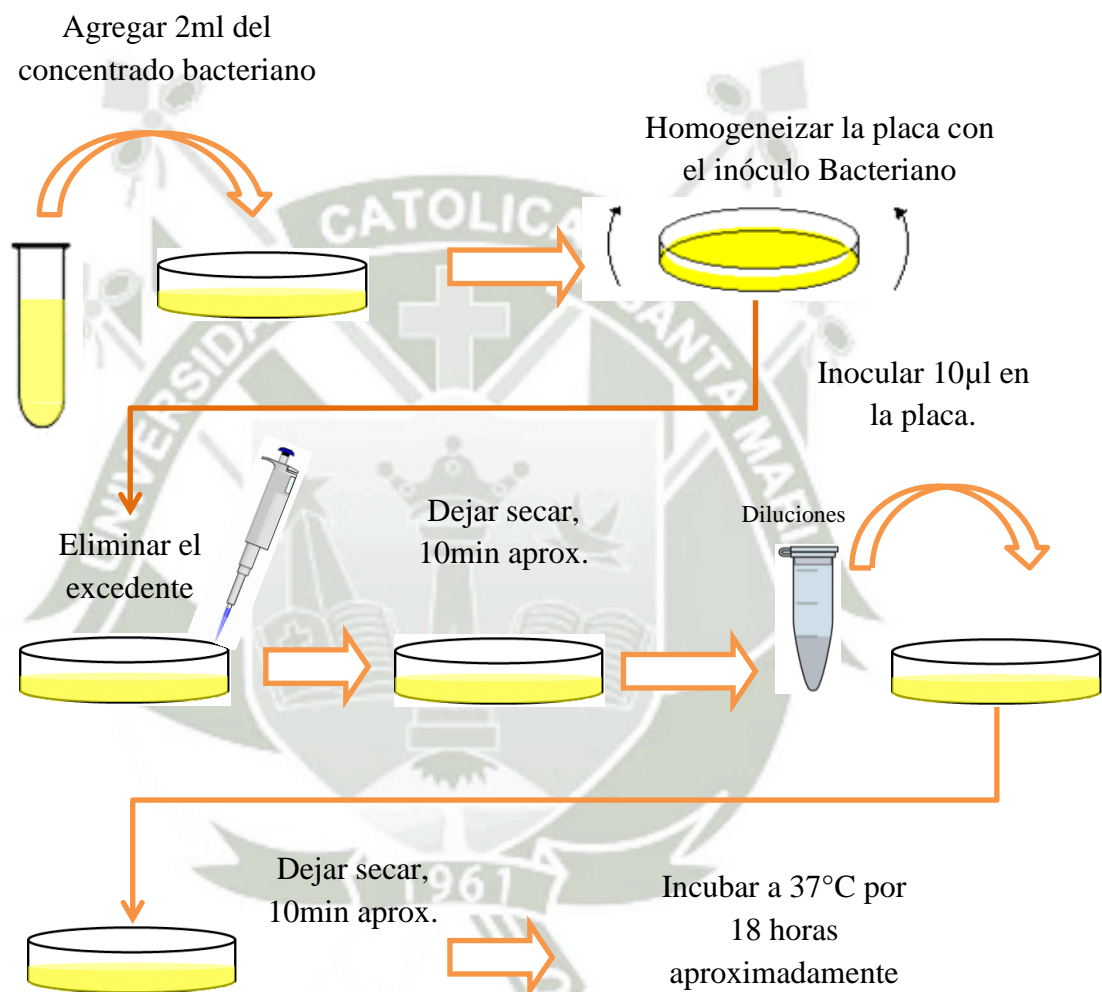


Figura 22. Esquema de inóculo de las muestras aisladas

Pasado el tiempo se observó la presencia de calvas y halos que demostró la presencia del bacteriófago específico a la cepa bacteriana que se utilizó. De aquellas calvas que se observaron aisladas y sin presencia de colonias en los halos que se formaron, se

tomó la calva con ayuda de una pipeta Pasteur descartable, que se usó para perforar el medio sólido, se depositó en un tubo de microcentrifuga que contenga 200 μ l de PBS 1X y se dejará en reposo por un par de días a 4°C para que los virus se liberen del agar al PBS.

Con una micropipeta se tomó el PBS 1X que se dejó con el trozo de agar que contenía la calva, se traspasó a un tubo con filtro de 0.22 μ m y se centrifugó a 120000 rpm por 2 min, con la finalidad de eliminar cualquier presencia bacteriana.

El concentrado final se almacenó a 4°C hasta que se utilizó en las posteriores pruebas.

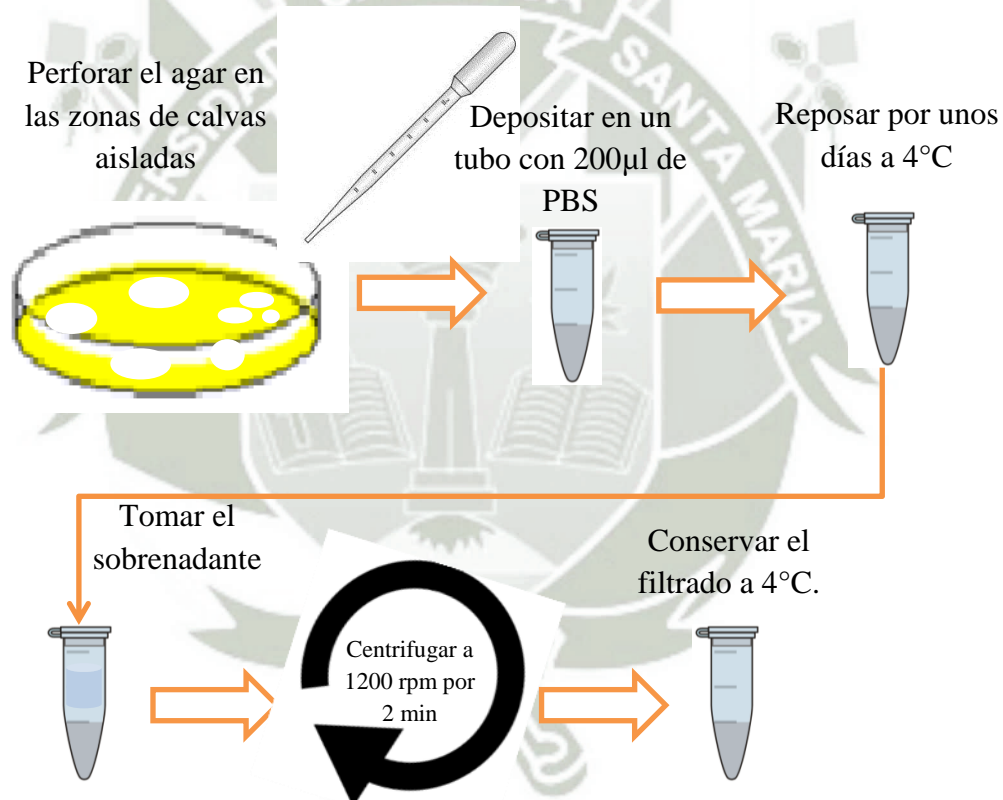


Figura 23. Extracción de las calvas aisladas.

3.2.4 CARACTERIZACIÓN

Se escogió aleatoriamente una cepa aislada por lugar de colección de muestra

3.2.4.1 DESCRIPCIÓN DE CALVAS

Con ayuda de un estereoscopio se evaluó la formación de las calvas basándose en:

- El tamaño de la calva.
- Presencia de halo.
- El diámetro del halo obtenido de las calvas más aisladas.

3.2.4.2 EFICIENCIA DE CALVAS (TITULACIÓN)

Se temperó las placas de CTS con 1.5% de agar a 37°C por 2 horas en la estufa antes del ensayo.

Se hizo diluciones del caldo con bacteriófago hasta la concentración de (10^{-8}).

Para la preparación de las diluciones seriadas.

- Se alicuotó en 8 tubos de microcentrifuga 90 μ l PBS 1 X (pH 7.4) y se le añadió 10 μ l de muestra de fagos en el primer tubo para obtener la primera concentración es de (10^{-1}).
- Se agitó en el vortex los tubos entre 3 a 5 segundos.
- Se tomó 10 μ l de la mezcla y se colocó en el siguiente tubo de dilución.
- Se repitió el mismo procedimiento de diluciones hasta que se completó la serie.

Se utilizó la técnica de (capa de Agar blando)

- Se preparó tubos de CTS al 0.6% de Agar (Agar blando) y se repartió en tubos con 3ml. Estos tubos se mantuvieron en refrigeración (4°C) hasta el momento en el que se realizó el ensayo.
- Se calentó los tubos de Agar blando hasta que se derritió y estuvo en un estado líquido, para que el medio se conserve en este estado, se colocó los tubos en baño María a una temperatura de 55°C +/- 2°C aproximadamente.
- Se alicuotó 100 μ l de CTS con crecimiento bacteriano en los tubos.
- Se inoculó los tubos alicuotados con crecimiento bacteriano con 10 μ l de muestra de fagos secuencialmente, etiquetó y se usó el vortex.
- Inmediatamente se colocó los tubos en la incubadora a 37°C por 20 minutos.

- Transcurrido el tiempo se colocó el contenido de los tubos que se encontraban en la incubadora a los 3ml de CTS al 0.6% de agar en los tubos.
- Se homogeneizó el contenido de los tubos con la ayuda del vortex por unos 5-10 seg.
- Se colocó el contenido de los tubos en las placas de ATS, asegurándose que la mezcla se extienda en toda la superficie haciendo unos pequeños movimientos a la placa.
- Se dejó secar por 10 min a temperatura ambiente.
- Se colocó las placas a 37°C durante toda la noche.
- Al siguiente día se contó las calvas entre 30 a 300 UFP (unidades formadoras de calvas).

Para calcular las Unidades Formadoras de Calvas (UFP)

Se calculó la titulación de los fagos, que fueron expresados en UFP/ml mediante la siguiente ecuación:

$$\text{UFP/ml} = 100[(\sum_{i=1}^n \frac{N_i}{D_i})/n]$$

- Ni= número de las calvas
- Di=factor de dilución de la placa
- n= Número total de placas contadas

Las pruebas se realizaron por triplicado.

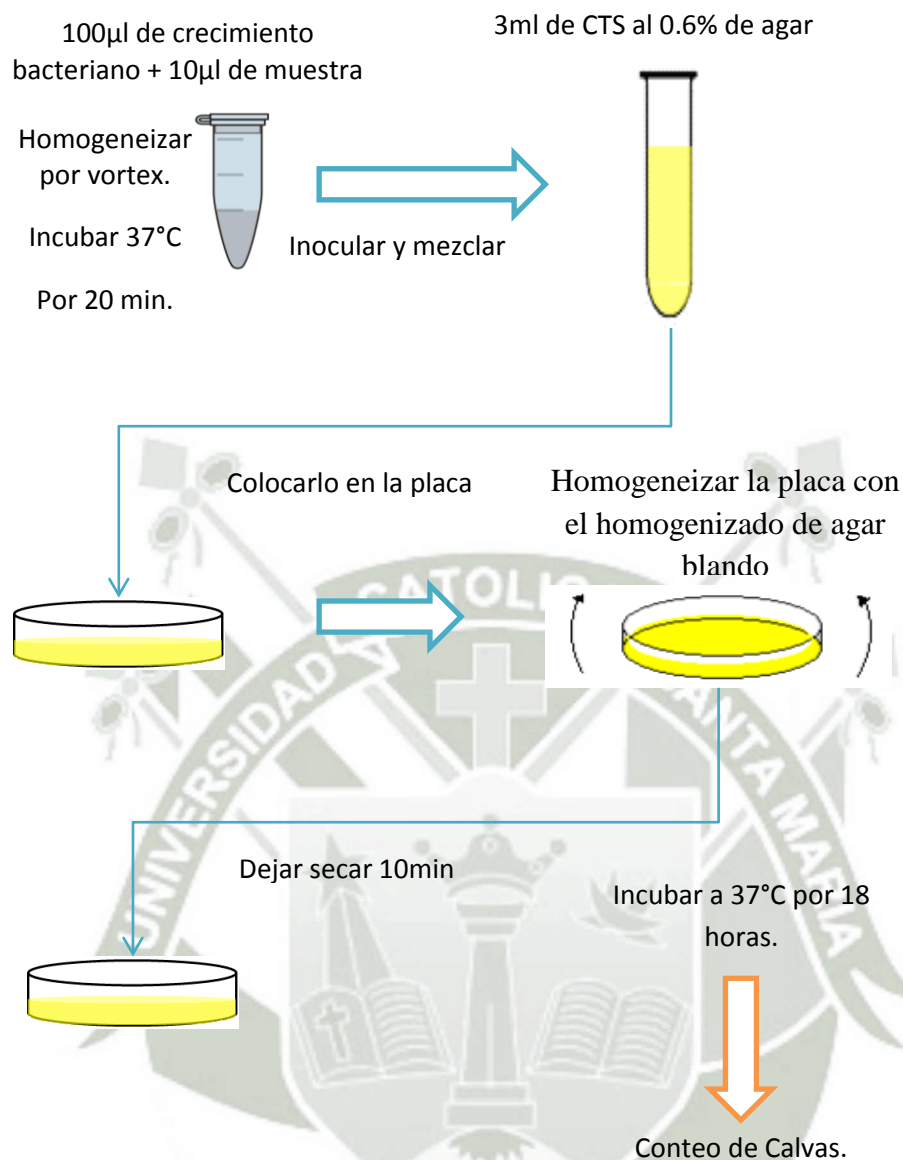


Figura 24. Método de titulación de calvas.

3.2.4.3 REPLICACIÓN DE BACTERIOFAGOS

En el caso que el título de los bacteriófagos sea inferior a 1×10^8 , se tendrá que reconcentrar el título de los fagos obtenidos, para ello se tomó 100µl del stock de fagos, se mezcló en un tubo que contenía 4 ml de CTS junto con 1ml de caldo con crecimiento bacteriano, luego se llevó a la incubadora shaker a 37°C a 150rpm por más de 6 horas. Luego se filtró con los tubos que contienen filtro de 0.22µm. Nuevamente se hizo el procedimiento de la titulación para verificar la concentración final que se obtuvo de la replicación.

3.2.4.4 CURVA DE CRECIMIENTO DE UN SOLO PASO

El día anterior se dejó incubando en tubos de CTS la bacteria con la que se trabajó.

En 4 matraces, 3 réplicas y 1 como control; cada uno con 30ml de CTS se les inoculó con 30 μ l (0.1%) de caldo con crecimiento bacteriano, se llevó a la incubadora con agitación a 37°C y 150rpm por el tiempo de 2.5h a 3h, hasta que la bacteria alcanzó un OD₆₀₀= 0.2 ó 1 x 10⁸ UFC en el espectrofotómetro, este es el periodo en el que la bacteria se encuentra en la etapa temprana del periodo exponencial.

Luego que la bacteria alcanzó la concentración deseada se le inoculó su bacteriófago específico a un MOI= 0.01, para ello se calculó la cantidad de inóculo con una fórmula de $V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$

Por ejemplo, si se tiene en cuenta que se tiene una concentración inicial de 1x10¹⁰ UFP/ml y se quiere llegar a obtener un MOI = 0.01 para 30ml de muestra bacteriana con una concentración de 1 x 10⁸ UFC/ml

$$MOI = 0.01 = \frac{x}{10^8}$$

$$x = 10^6$$

Aplicando:

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$v_1 x (1 \times 10^{10} \text{UFP/ml}) = 30\text{ml} x (1 \times 10^6)$$

$$v_1 = \frac{30\text{ml} x (1 \times 10^6)}{1 \times 10^{10} \text{UFP/ml}}$$

$$v_1 = 0.003\text{ml}$$

$$v_1 = 3\mu\text{l}$$

Inmediatamente después de hacer el inóculo del fago se tomó dos alícuotas de 100 μ l por cada replica, esta se depositó en un tubo de microcentrifuga que contenía 900 μ l

de PBS 1X (tubo A) la otra alícuota de 100 µl se dejó en otro tubo de microcentrifuga que contenía 900 µl de PBS 1X y 75 µl de Cloroformo (tubo B), este último se mezcló en vortex por 1 min aproximadamente y se dejó a 4°C hasta que se utilizó.

En el caso del tubo A, se centrifugó a 1000 rpm por 1 min, con mucho cuidado se tomó 100 µl de sobrenadante y se pasó a un tubo que contenía 900 µl, se mezcló en vortex por unos 5 seg, de esta forma se hizo diluciones seriadas. De las alícuotas que se decidió plaquear se tomó un tubo de Agar blando y se le inoculó 100 µl de caldo con crecimiento bacteriano y se le agregó 100 µl de la muestra, se mezcló en vortex por unos 5 a 10 seg. la mezcla se colocó en placas de CTS al 1.5% de agar, se dejó enfriar a temperatura ambiente por último se llevó a la incubadora a 37°C por 16 horas.

En el caso del tubo B, se realizaron las diluciones correspondientes y se trabajó con el mismo procedimiento descrito párrafo anterior, las alícuotas fueron tomadas cada 5 minutos hasta los 60min.

Luego de ese tiempo se hizo conteo de las calvas y se elaboró la curva de crecimiento con ayuda del programa Microsoft Excel.

Para encontrar el Burst Size se debe aplicar la siguiente ecuación:

$$BS = \frac{\text{Cf. fagos en cloroformo}}{(\text{Co. fagos en cloroformo} - \text{C. fagos en latencia})}$$

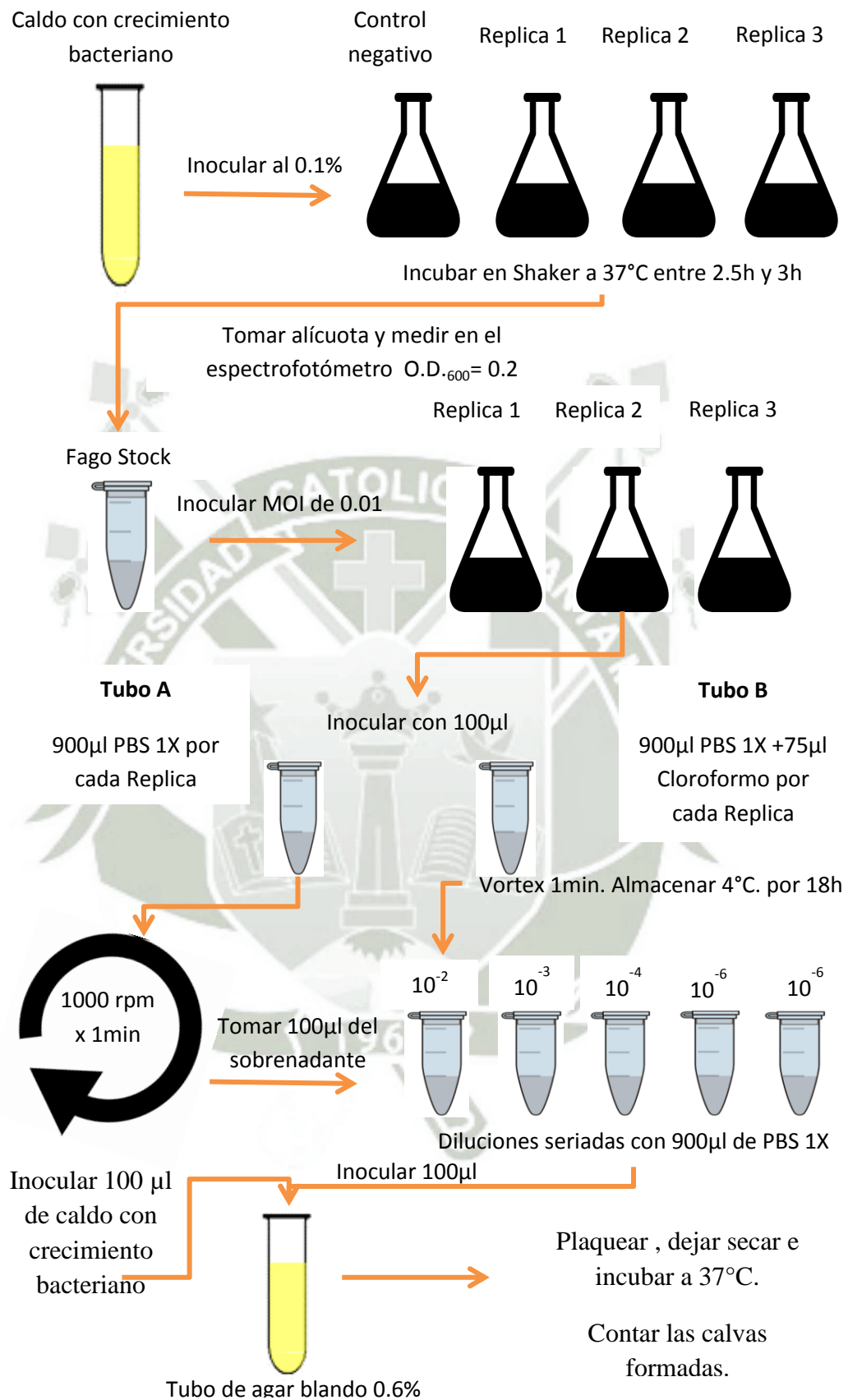


Figura 25. Método para la elaboración de la Curva de crecimiento

3.2.5 CARACTERIZACIÓN A NIVEL MOLECULAR

3.2.5.1 EXTRACCIÓN DE ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el kit QIAamp MinElute Virus Spin de QIAGEN de acuerdo al protocolo descrito.

1. Se pipeteó 25µl de la Proteasa del kit y se colocó en un tubo de microcentrifuga.
2. Se agregó 200µl de la muestra
3. Se agregó 200 µl de buffer AL (28µg/ml de RNA carrier) y se llevó al vortex por 15 segundos.
4. Se incubó a 56°C por 15 minutos en el heating block.
5. Se centrifugó fuertemente el tubo para remover las gotas de las paredes del tubo.
6. Se agregó 250 µl de etanol puro a las muestras, se mezcló fuertemente en el vortex por 15 segundos, se dejó incubar la mezcla por 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Se centrifugó el tubo para ayudar a precipitar las gotas de la pared del tubo.
8. Cuidadosamente se traspasó el lisado obtenido del paso anterior en la columna de QIAamp MinElute, tratando de no humedecer el aro de esta. Se centrifugó a 8000 rpm por 1 min y se traspasó en un recipiente de tubo limpio.
9. Cuidadosamente se abrió la columna y agregó 500 µl de buffer AW1 sin mojar el anillo. Nuevamente se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto y se colocó la columna en un nuevo tubo colector.
10. Cuidadosamente se agregó 500µl de Buffer AW2 sin mojar el anillo y centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto. la columna en un nuevo tubo colector.
11. Cuidadosamente se abrió la columna y se agregó 500 µl de etanol al 100% sin mojar el anillo, se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto y colocó la columna en un nuevo tubo colector.
12. Se centrifugó a máxima velocidad por 3 minutos.
13. Se colocó la columna en la incubara 56°C por 3 minutos para secar completamente.
14. Se colocó la columna en un tubo eppendorf y se descartó el tubo colector. Se agregó 80µl de buffer AVE o de RNasa-free en medio de la membrana. Cerrar la

tapa e incubar a temperatura ambiente por un minuto. Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto.

3.2.5.2 IDENTIFICACIÓN DE LAS FAMILIAS MYOVIRIDAE Y PODOVIRIDAE

3.2.5.2.1 IDENTIFICACIÓN DE MYOVIRIDAE.

Se utilizó los primers:

MZIA1 Forward (5'-GATATTTGIGGIGTTCAGCCATGA-3')

MZIA2 Reverse (5'-CGCGGTTGATTTCCAGCATGATTTTC-3')⁶⁸ para amplificar el gen 23 que se encuentra en la capsida de los bacteriófagos específicos de esta familia Myoviridae, este par de primer amplifica la región entre 480bp/ 600bp. La mezcla de PCR se estandarizó con 2.5µl de DNA viral, 1.0µl de Amplitaq Polymerasa(5U/ µl), 2.5µl de 10 X Buffer PCR, 0.5µl de dNTP(10mM), 0.25 µl MZIA(50nmol), 0.25 µl(50nmol), 0.75 µl de DMSO, 17.25 µl de Agua de PCR. Para el control negativo se le agregó 2.5µl de agua de PCR en lugar de agregar el DNA, para el control positivo se utilizó el ATCC del bacterifago T4. Los ciclajes de la PCR fueron estandarizados como: Desnaturalización inicial 95°C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 45seg, hibridación 42°C por 1 min, elongación a 72°C por 45 seg y una elongación final de 72°C por 10 min.

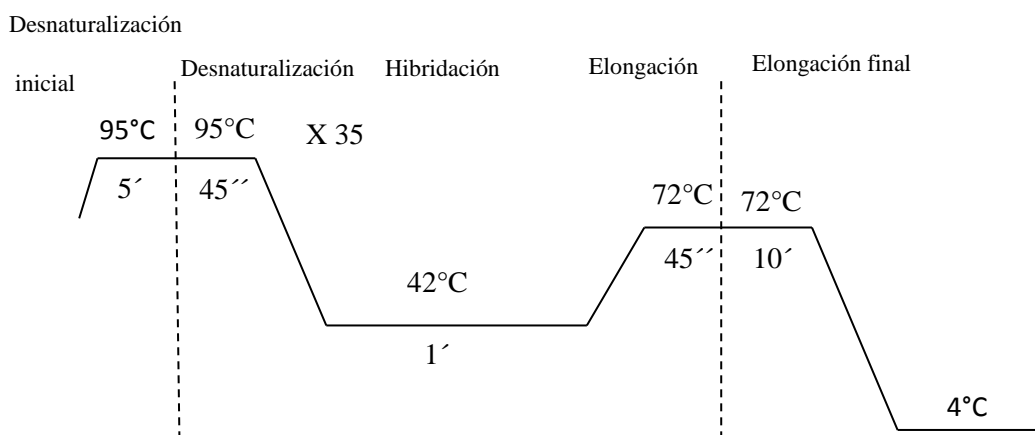


Figura 26. Ciclajes del PCR para la detección de *Myoviridae*

CORRIDA ELECTROFORÉTICA

Los productos de PCR se les realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 1% (1gr en 100ml de TBE 1x) se tiñó con 15µl de SYBR SAFE (Invitrogen) y se dejó gelificar por 45min, luego se llevó el gel a la cámara de electroforesis, se cargó 8µl de producto de PCR con 2µl de Nucleic acid Sample Loading Buffer (BIO-RAD), 5 µl de Track It ladder de 100bp y se dejó correr a 120Voltios por 1.5 horas.

El gel se leyó y editó en el transiluminador GELDOC (BIO-RAD) .

3.2.5.2.2 IDENTIFICACIÓN DE PODOVIRIDAE

Se utilizó los primers:

HECTOR29 Forward (5´- GCAAGCAACTTTACTGTGG -3´)

HECTOR500 Reverse (5´- GAATGATCTACACTCTTTGCCATACGGTG-3´)⁶⁹,

este par de primers amplifica la aproximadamente 500bp. La mezcla de PCR se estandarizó con 2.5µl de DNA viral, 0.3µl de Amplitaq Polimerasa(5U/ µl), 2.5µl de 10 X Buffer PCR, 0.5µl de dNTP(10mM), 0.25 µl HECTOR29(50nmol), 0.25µl HECTOR500(50nmol), 0.75 µl de DMSO, 17.95 µl de Agua de PCR. Para el control negativo se le agregó 2.5µl de agua de PCR en lugar de agregar el DNA. Los ciclajes de la PCR fueron estandarizados como: Desnaturalización inicial 95°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 45seg, hibridación 44°C por 1 min, elongación a 72°C por 1min y una elongación final de 72°C por 10min.

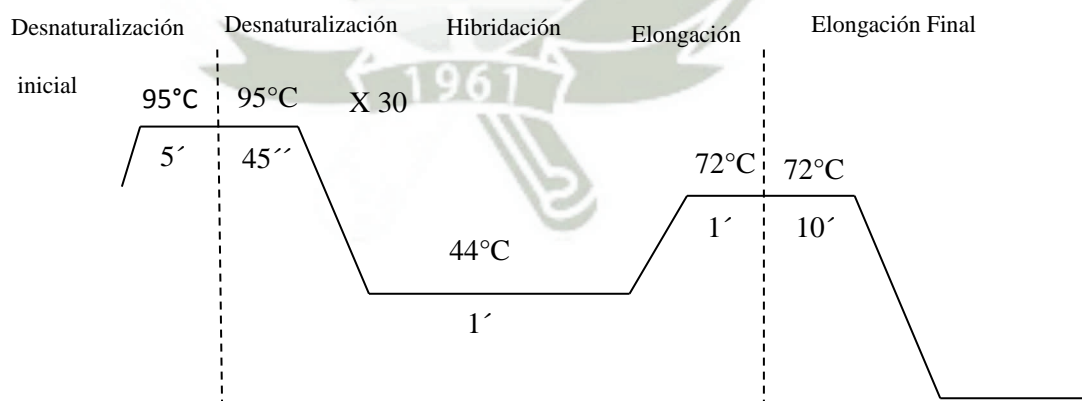


Figura 27. Ciclajes del PCR para la detección de *Podoviridae*

Los productos de PCR se les realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 1.5% (1.5gr en 100ml de TBE 1x) se tiñó con 15µl de SYBR SAFE (Invitrogen) y se dejó gelificar por 45min, luego se llevó el gel a la cámara de electroforesis, se cargó 8µl de producto de PCR con 2µl de Nucleic acid Sample Loading Buffer (BIO-RAD), 5 µl de Track It ladder de 100bp y se dejó correr a 120Voltios por 1.5 horas.

El gel se leyó y editó en el transiluminador GELDOC (BIO-RAD)

3.2.5.2.3 TIPIFICACIÓN POR AMPLIFICACIÓN POLIMÓRFICA ALEATORIA DE DNA (RAPD)-PCR CON PRIMERS DEGENERADOS.

Se utilizó el primer degenerado R10D, cuya secuencia es 5'-GTCASSWSSW-3'.⁶⁷

1. La mezcla de PCR se estandarizó con 1µl de DNA viral, 7.5µl de Platinum taq (Invitrogen), 2.5µl de 10 X Buffer PCR sin Mg, 2.25 µl MgCl, 0.15µl de cada dNTP (100mM), 0.5 µl R10D(10nmol), 10.65 µl de Agua de PCR. Para el control negativo se le agregó 2.5µl de agua de PCR en lugar de agregar el DNA. Los ciclajes de la PCR fueron estandarizados como: Desnaturalización inicial 95°C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 3min, hibridación 38°C por 3 min, elongación a 72°C por 2min y una elongación final de 72°C por 10min.

El gel será visualizado en el GelDoc, las imágenes del gel fueron procesadas en el software GelJ v.1.2.La matriz de similitud será calculada basada en el coeficiente de Pearson.

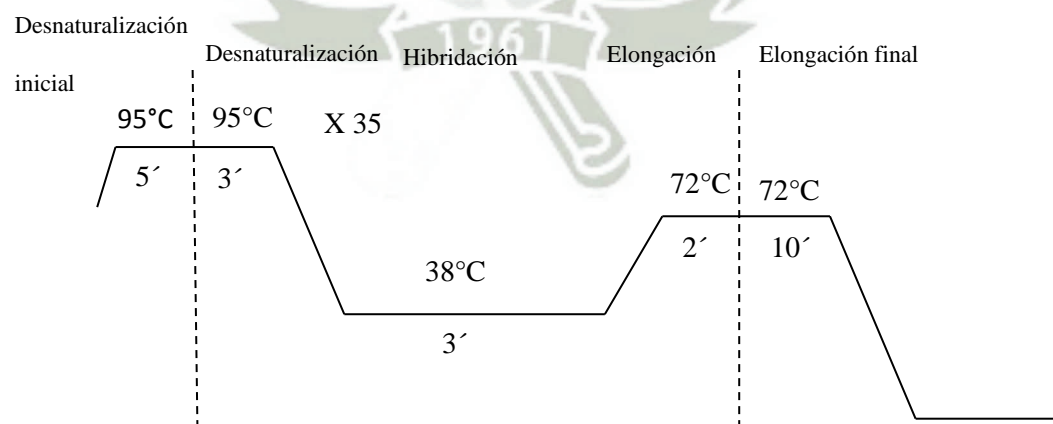


Figura 28. Ciclajes del RAPD- PCR

CAPÍTULO 4

4.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.1 AISLAMIENTO DE BACTERIOFAGOS EN LAS DISTINTAS CIUDADES

❖ Aislamiento de bacteriófagos en Lima

En la ciudad de Lima se obtuvieron 27 aislamientos de fagos específicos para las cepas nosocomiales de *A. baumannii*. de 94 muestras (fago – hospedero) que fueron probadas.

Como se observa en la **Tabla 5**. No se encontró presencia de fagos en los puntos de muestreo SWL002 (Hospital Militar Central), SWL004 (Río Rímac, laguna de oxidación), SWL005 (Exteriores del mercado de Magdalena) y en el punto SWL006 (Interior del mercado de Magdalena).

Se obtuvo 5 aislamientos de bacteriófagos en SWL001 (Hospital FAP), 2 aislamientos en SWL003 (Río Rímac), 7 aislamientos en SWL007 (Hospital Rebagliatti), 2 aislamientos en SWL008 (Planta de tratamiento de Agua Residual Taboada, Callao (desagües de los colectores primarios Costanera, La Marina, Argentina, Morales Duárez, Colector N° 6, Bocanegra, los cuales a su vez recolectan los desagües producidos en los distritos de El Agustino, Ate, San Luis, Santa Anita, San Juan de Lurigancho, Rímac, San Martín de Porres, Carmen de la Legua, Lima Cercado, Breña, Jesús María, La Victoria, Lince, Magdalena, San Miguel, Bellavista, Pueblo Libre, Miraflores y San Isidro) El lugar con mayor incidencia fue SWL009 (Planta de tratamiento de Agua Residual Taboada, Callao . Colector Comas – Chillón, que recolecta los desagües producidos en los distritos de Carabayllo, Comas, Los Olivos, Independencia y parte de San Martín de Porres y el Callao) con 11 aislamientos.

Tabla 5. Aislamiento de bacteriófagos en la ciudad de Lima.

Código de cepa <i>A.</i>	Calvas aisladas a partir de muestras ambientales								
	Lima, Perú								
<i>baumannii</i>	SWL 001	SWL 002	SWL 003	SWL 004	SWL 005	SWL 006	SWL 007	SWL 008	SWL 009
NSC0564	-	-	-	-	-	-	+		
NSC0594	+	-	-	-	-	-	+		
NSC0702	-	-	-	-	-	-	+		
NSC0709	-	-	-	-	-	-	+		
NSC0711	-	-	-	-	-	-	+		
NSC0733	+	-	-	-	-	-	-		
NSC0738	+	-	+	-	-	-	-		
NSC0739	+	-	-	-	-	-	+		
NSC0742	+	-	+	-	-	-	-		
NSC0821	-	-	-	-	-	-	+		
NSC0060								-	+
NSC0062								-	+
NSC0366								-	+
NSC0427								-	+
NSC0438								-	+
NSC0441								-	-
NSC0474								-	+
NSC0477								-	+
NSC1064								-	-
NSC0878								-	+
NSC0911								+	+
NSC0950								+	+
NSC0977								-	+

Leyenda

- : no se encontró presencia de bacteriófagos
- + : Presencia de fagos en forma de calvas

Código de puntos de muestreo **Tabla 4.**

❖ **Aislamiento de bacteriófagos en Iquitos**

En la ciudad de Iquitos se obtuvieron 21 aislamientos de fagos específicos para las cepas nosocomiales de *A. baumannii*. de 71 muestras que fueron probadas.

Como se observa en la **Tabla 6**. Se obtuvo 1 aislamiento de fago en el punto SWI001 (Río Amazonas), 5 aislamientos en el punto SWI002 (Belén), 1 aislamiento en SWI003 (Hospital Regional de Loreto), 6 aislamientos en SWI004 (Punchana), 1 aislamiento en SWI005 (Hospital Apoyo Iquitos), por lo que el lugar con mayor cantidad de fagos aislados fue SWI006 (Moronacocha) con un total de 7 aislamientos.

Tabla 6. Aislamiento de bacteriófagos en la ciudad de Iquitos.

Código de cepa de <i>A. baumannii</i>	Calvas aisladas a partir de muestras ambientales					
	Iquitos, Perú					
	SWI 001	SWI 002	SWI 003	SWI 004	SWI 005	SWI 006
NSC0742	-	+	-	+	-	+
NSI0585	-	-	-	-	-	-
NSI0602	-	-	-	-	-	-
NSI0668	-	-	-	-	-	-
NSI0681	-	+	-	+	-	+
NSI0683	-	+	-	+	-	+
NSI0691	-	-	-	-	-	-
NSI0699	-	-	-	-	-	+
NSI0755	-	+	-	+	+	+
NSI0796	-	-	+	+	-	+
NSI0808	-	-	-	-	-	-
NSI0814	+	+	-	+	-	+

Leyenda

- : no se encontró presencia de bacteriófagos
- +

Código de puntos de muestreo **Tabla 4**.

❖ **Aislamiento de bacteriófagos en Arequipa**

Como se observa en la **Tabla 7**. Se llegaron a realizar 92 pruebas entre cepas nosocomiales de *A. baumannii* y muestras ambientales, para el aislamiento de bacteriófagos, sin embargo no se obtuvo aislamientos de fagos.

Tabla 7. Aislamiento de bacteriófagos en la ciudad de Lima.

Código de cepa de <i>A.</i> <i>baumannii</i>	Calvas aisladas a partir de muestras ambientales			
	Arequipa, Perú			
	SWA 001	SWA 002	SWA 003	SWA 004
NSC0564	-	-	-	-
NSC0594	-	-	-	-
NSC0702	-	-	-	-
NSC0709	-	-	-	-
NSC0711	-	-	-	-
NSC0733	-	-	-	-
NSC0738	-	-	-	-
NSC0739	-	-	-	-
NSC0742	-	-	-	-
NSC0821	-	-	-	-
NSC0060	-	-	-	-
NSC0062	-	-	-	-
NSC0366	-	-	-	-
NSC0427	-	-	-	-
NSC0438	-	-	-	-
NSC0441	-	-	-	-
NSC0474	-	-	-	-
NSC0477	-	-	-	-
NSC1064	-	-	-	-
NSC0878	-	-	-	-
NSC0911	-	-	-	-
NSC0950	-	-	-	-

NSC0977 - - - -

Leyenda

- : no se encontró presencia de bacteriófagos
- + : Presencia de fagos en forma de calvas

Código de puntos de muestreo **Tabla 4.**

❖ Vista General de los Aislamientos

Se realizó un total de 257 pruebas de aislamiento, de las cuales se obtuvo 48 (19%) aislamientos de bacteriófagos para cepas nosocomiales de *Acinetobacter baumannii* provenientes de Lima e Iquitos, a partir de muestras ambientales en las ciudades anteriormente mencionadas con el 11% y 8% respectivamente. Por otro lado se obtuvo 209 (71%) pruebas con resultado negativo. **Tabla 8, Grafica 1.**

Es posible que el resultado en Arequipa haya sido negativo, ya que no hay mucha prevalencia de este tipo de bacteria en esta ciudad, al igual que los puntos de muestreo no mostraron la misma contaminación que el lugar de muestras (Revisar Anexo N° 3)

Tabla 8. Datos generales del aislamiento de bacteriófagos.

Etiquetas de fila	Suma de CANTIDAD
Negativo	209
Arequipa	92
Iquitos	50
Lima	67
Positivo	48
Arequipa	0
Iquitos	21
Lima	27
Total general	257

Resultado General del Aislamiento

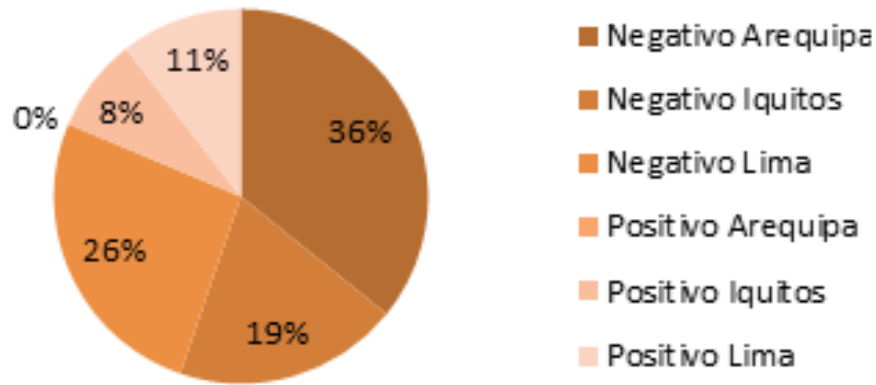


Figura 29. Resultados generales del Aislamiento de bacteriofagos para *A. baumannii*.

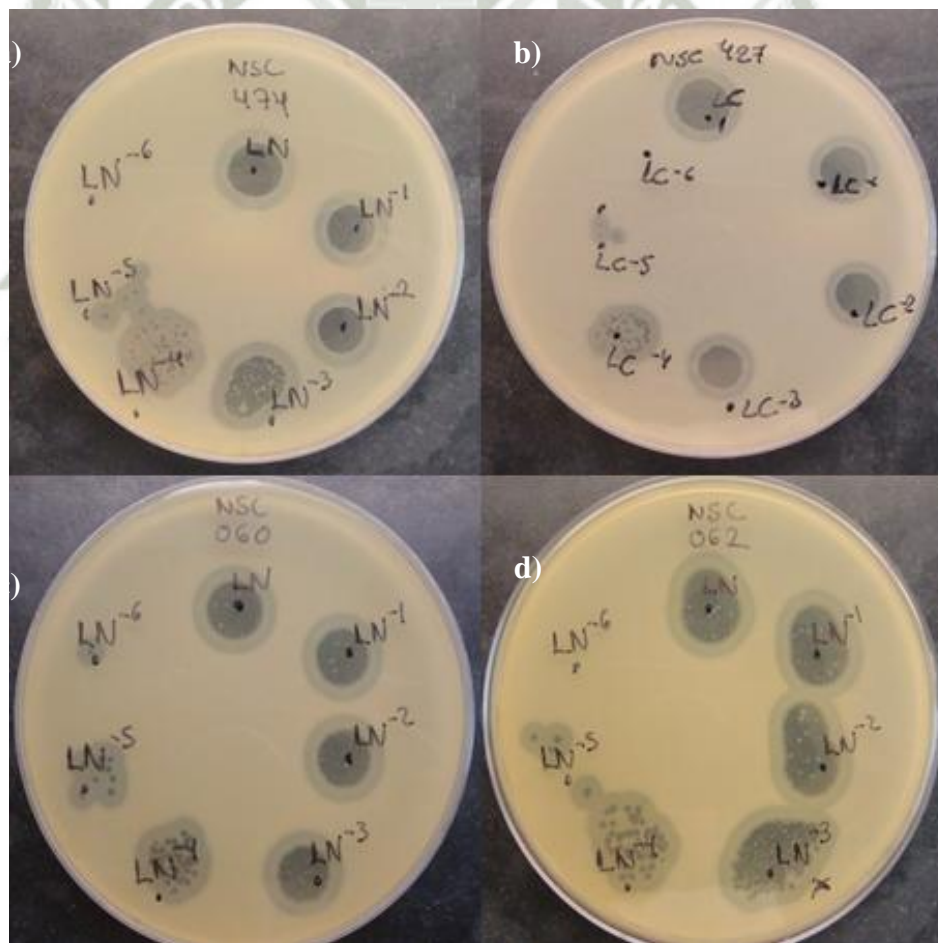


Figura 30. Presencia de calvas aisladas.

- a) Muestra NSC0474φSWL009, calvas aisladas en la disolución 10^{-5} . Método de Enriquecimiento
- b) Muestra NSC0427φSWL008, calvas aisladas en la dilución 10^{-5} . Método de Enriquecimiento
- c) Muestra NSC0060φSWL009, calvas aisladas en la disolución 10^{-6} Método de Enriquecimiento
- d) Muestra NSC0062φSWL009, calvas aisladas en la disolución 10^{-5} Método de Enriquecimiento

4.1.2 DESCRIPCIÓN DE LAS CALVAS

Se escogió una muestra de fago aislado correspondiente a cada lugar de toma de muestra.

Como se observa la **Tabla 9** las calvas y halos formados son una característica propia de cada complejo fago –hospedero, en la mayoría de calvas aisladas se encontró que su tamaño es mínimo a 1.0mm y como máximo 1.6mm; además se observa que el halo de mayor tamaño alcanza 5.2 mm, de otro lado se encontró que fagos aislados como NSC0702 φ SWL007 tiende a no formar halos. Existen reportes en los que el diámetro de calvas 1.0mm a 8.0mm por lo que las calvas encontradas se encuentran dentro del rango característico de esta interacción fago -bacteria.^{75,76}

Tabla 9. Descripción de fagos aislados

Fago aislado	Descripción del fago
NSC0739 φ SWL001	Calva de 1.0mm con halo de 5.0 mm
NSC0742 φ SWL003	Calva de 1.5mm con halo de 4.5 mm
NSC0702 φ SWL007	Calva de 1.6mm sin halo
NSC0060 φ SWL008	Calva de 1.4mm con halo de 5.2 mm
NSC0950 φ SWL009	Calva de 1.5mm con halo de 5.2 mm
NSI0814 φ SWL001	Calva de 1.0mm con halo de 3.0 mm
NSC0742 φ SWI002	Calva de 1.4mm con halo de 2.0mm
NSI0796 φ SWI003	Calva de 1.0mm con halo de 3.0 mm
NSI0925 φ SWI004	Calva de 1.2mm con halo de 5.0 mm
NSI0683 φ SWL006	Calva de 1.0mm con halo de 5.2 mm



Figura 31. Vista al estereoscopio de la calva NSI0925 φ SWI004.

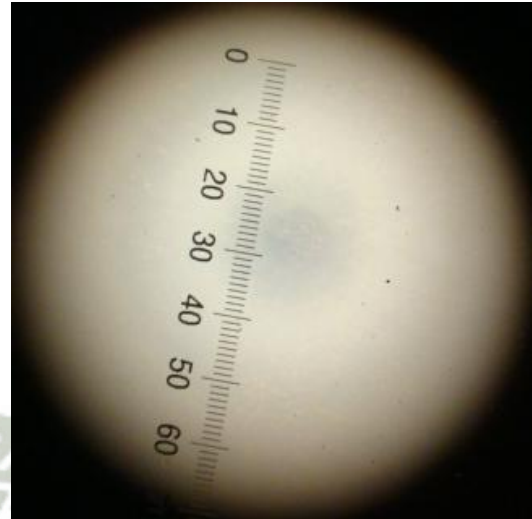


Figura 32. Vista al estereoscopio de la calva NSI0683 φ SWL006



Figura 33. Vista al estereoscopio de la calva NSC0950 φ SWL009.

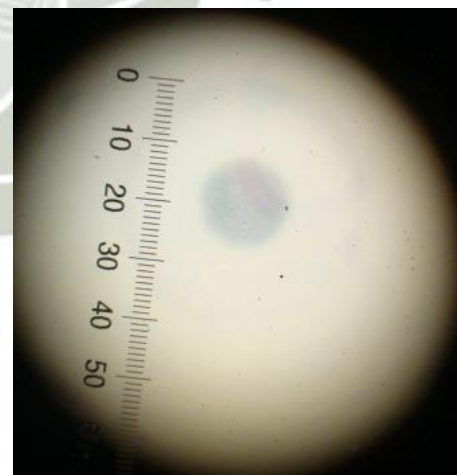


Figura 34. Vista al estereoscopio de la calva NSC0742 φ SWL003.

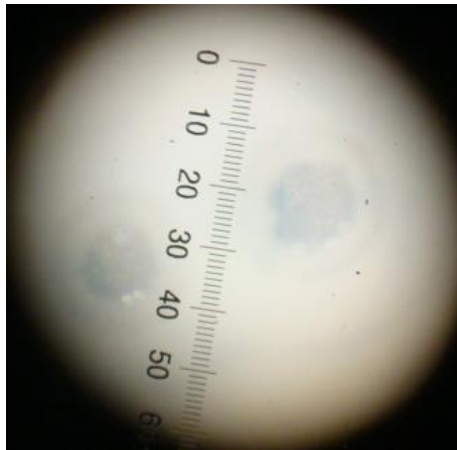


Figura 35. Vista al estereoscopio de la calva NSC0702 ϕ SWL007.

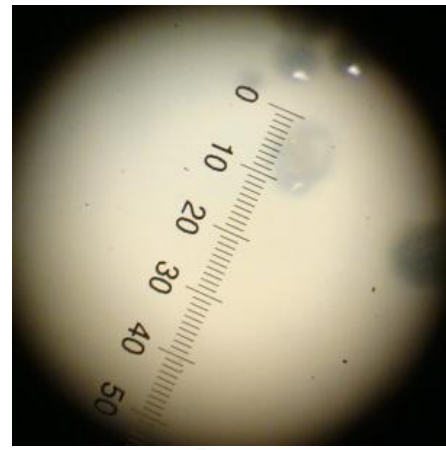


Figura 36. Vista al estereoscopio de la calva NSI0925 ϕ SWI004.

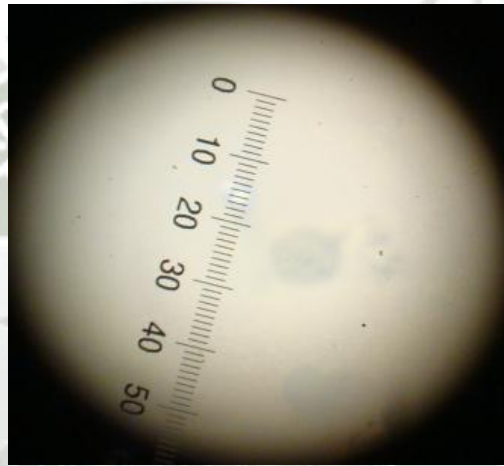


Figura 37. Vista al estereoscopio de la calva NSC0742 ϕ SWI002

4.1.3 CONTEO DE CALVAS EN PLACA

Se realizó la prueba de Eficiencia de calva, con la finalidad de conocer el título de cada bacteriófago aislado. Este es un paso importante ya que a partir de aquí se podrá conocer las cantidades para manejar los MOI para posteriores pruebas.

Algunas de ellas inicialmente llegaron a una alta concentración $\times 10^9$, en el caso de las que no llegaron se necesitó reconcentrarlas por el método descrito en el punto 3.2.4.3.

Tabla 10. Conteo final de Calvas.

Fago Aislado	Conteo de Calvas(UFP)
NSC739φSWL001	8.14 x 10 ⁹
NSC742φSWL003	4.49 x 10 ⁹
NSC702φSWL007	9.2 x 10 ⁹
NSC060φSWL008	1x 10 ⁹
NSC950φSWL009	6.4 x 10 ⁹
NSI814φSWI001	9.5x 10 ⁹
NSC742φSWI002	2.295 x 10 ⁹
NSI796φSWI003	9X 10 ⁹
NSI925φSWI004	1.165 x 10 ⁹
NSI683φSWI006	3.665 x 10 ⁹

4.1.4 CURVA DE CRECIMIENTO EN UN PASO

Cuando se busca aislar bacteriófagos con el fin de aplicarlos en fagoterapia se requiere que cumplan una serie de estándares, entre ellos es importante el tiempo de latencia y sobre todo su Burst Size, para ello no hay una escala en específico en la que se deban basar; sin embargo es preferible que su periodo de latencia sea bajo ya que esto hará que en el menor tiempo posible se puedan comenzar a replicar estos viriones. Mientras que el Burst size se requiere que sea alto, porque esta es la razón que se tiene a partir de un solo fago infecta una sola bacteria se obtendrá esta proporción de un único complejo.

En la **Tabla 11.** Se observa que los periodos de latencia terminan entre los 20 a 35 minutos, como se sabe esto no depende únicamente del bacteriófago, sino también de la cinética de crecimiento de la bacteria hospedera. En cuanto al Burst Size el rango encontrado varia entre 3 del fago NSI0683 φ SWI006 siendo el más bajo y 281 del fago NSI0814 φ SWI001 siendo el más alto valor encontrado mostrando así una gran capacidad y efectividad lítica. Reportes previos indican que se encontraron periodos

de latencia desde los 9 a los 25 min; mientras que el Burst Size va desde 22 hasta 409 UFP/ célula Infectada.⁷⁶

Tabla 11. Resumen de la Curva de crecimiento de un paso.

Fago	Periodo de Latencia(min)	Periodo de Eclipse(min)	Burst Size
NSC0739 φ SWL001	20 min	15min	9.2
NSC0742 φ SWL003	25 min	25min	105
NSC0702 φ SWL007	20 min	15min	133
NSC0060 φ SWL008	35 min	25min	60
NSC0950 φ SWL009	20 min	15min	191
NSI0814 φ SWI001	20 min	15min	281
NSC0742 φ SWI002	20 min	20 min	12
NSI0796 φ SWI003	25min	20min	14
NSI0925 φ SWI004	35 min	20min	174
NSI0683 φ SWI006	20 min	15 min	3

❖ NSC0739 φ SWL001

El fago presentó un periodo de latencia aproximadamente a los 20 min, su periodo de eclipse fue aproximadamente hasta los 15min. Finalmente su Burst size fue de 9.2.

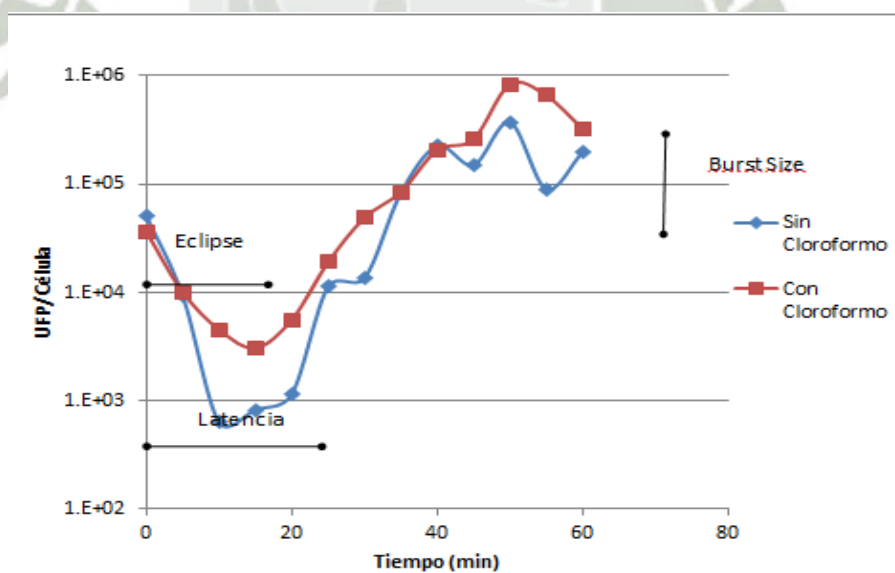


Figura 38. Curva de crecimiento NSC0739 φ SWL001

❖ NSC0742 φ SWL003

El fago presentó un periodo de latencia aproximadamente a los 25 min, su periodo de eclipse fue aproximadamente hasta los 25min. Finalmente su Burst size fue de 105.

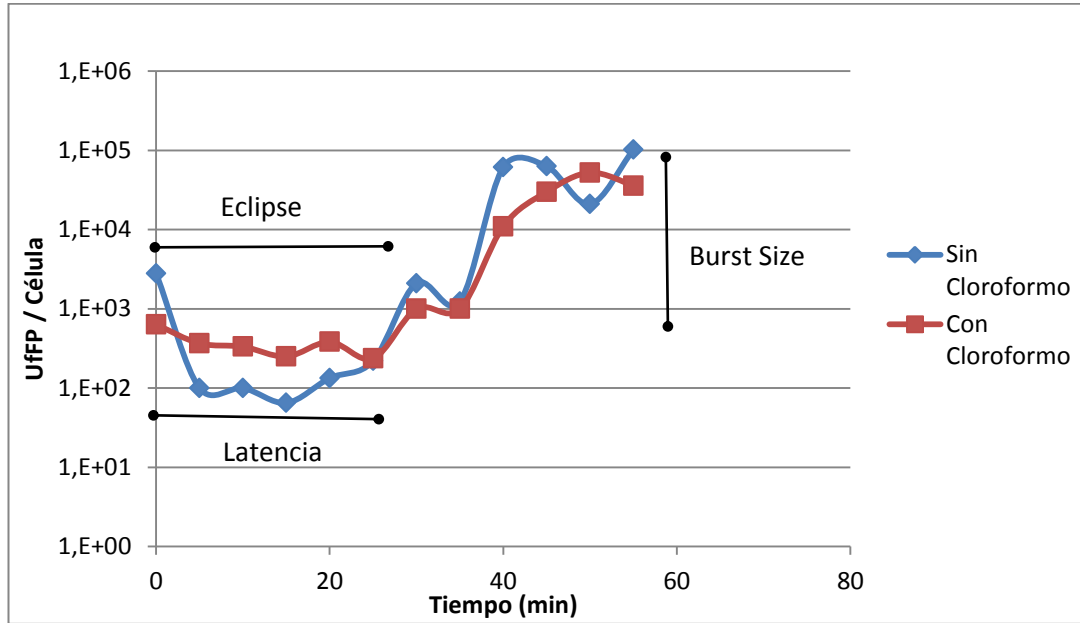


Figura 39. Curva de crecimiento NSC0742 φ SWL003.

❖ NSC0702 φ SWL007

El fago presentó un periodo de latencia aproximadamente a los 20 min, su periodo de eclipse fue aproximadamente hasta los 15min. Finalmente su Burst size fue de 133.

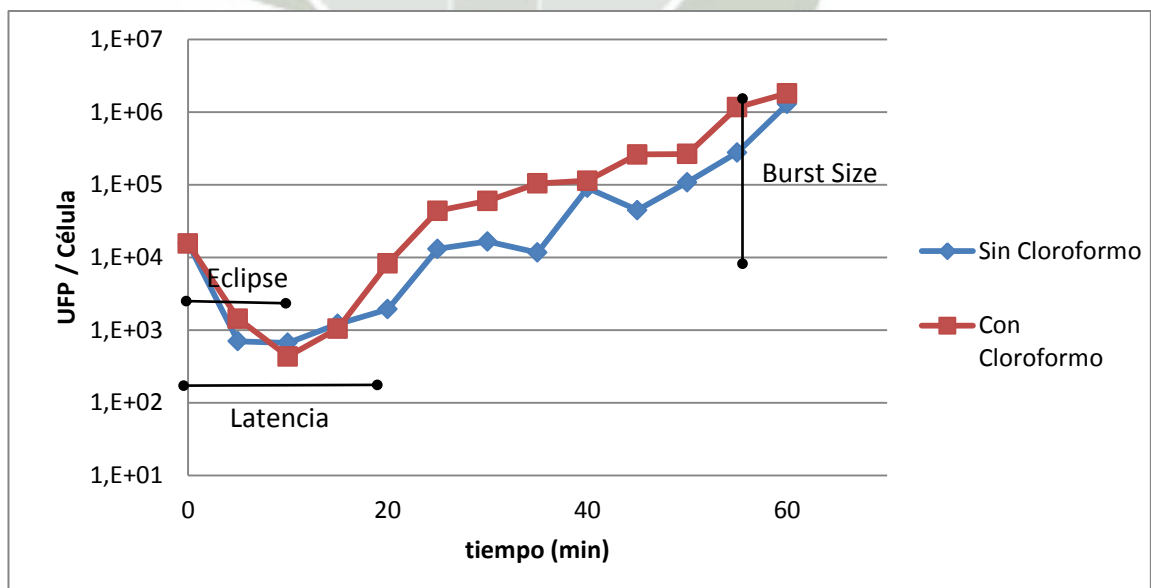


Figura 40. Curva de crecimiento NSC0702 φ SWL007

❖ NSC0060 φ SWL008

El fago presentó un periodo de latencia aproximadamente a los 35 min, su periodo de eclipse fue aproximadamente hasta los 25min. Finalmente su Burst size fue de 60.

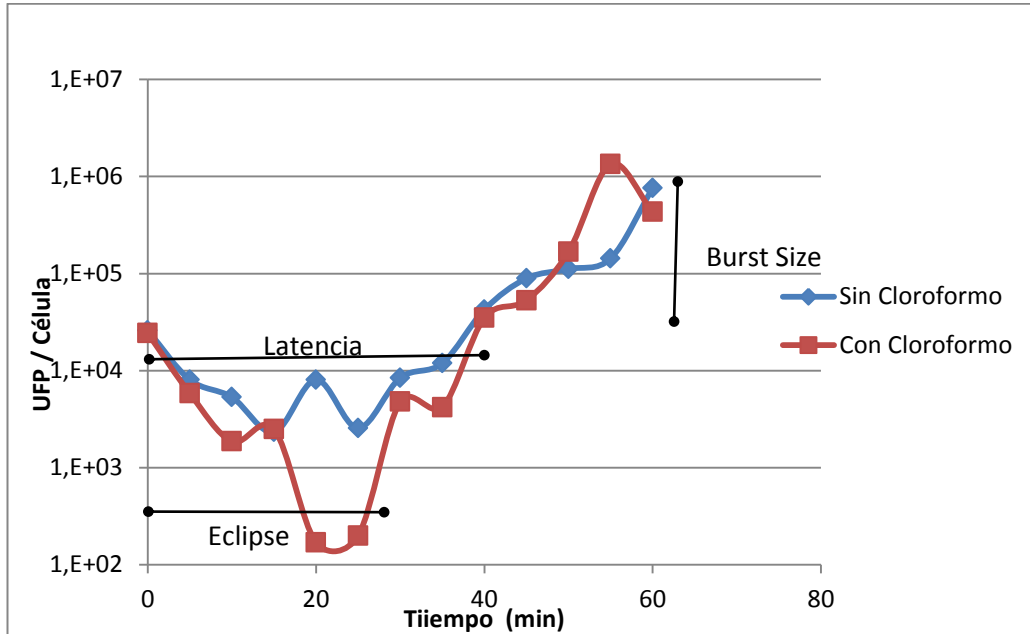


Figura 41. Curva de crecimiento NSC0060 φ SWL008.

❖ NSC0950 φ SWL009

El fago presentó un periodo de latencia aproximadamente a los 20 min, su periodo de eclipse fue aproximadamente hasta los 15min. Finalmente su Burst size fue de 191.

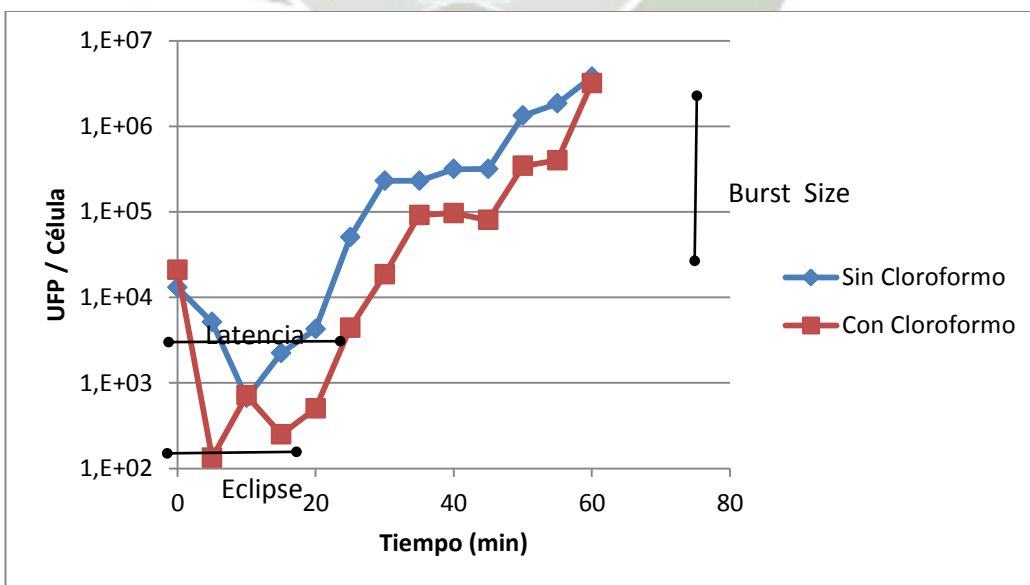


Figura 42. Curva de crecimiento NSC0950 φ SWL009.

❖ NSI0814 ϕ SWI001

El fago presentó un periodo de latencia aproximadamente a los 20 min, su periodo de eclipse fue aproximadamente hasta los 15min. Finalmente su Burst size fue de 281.

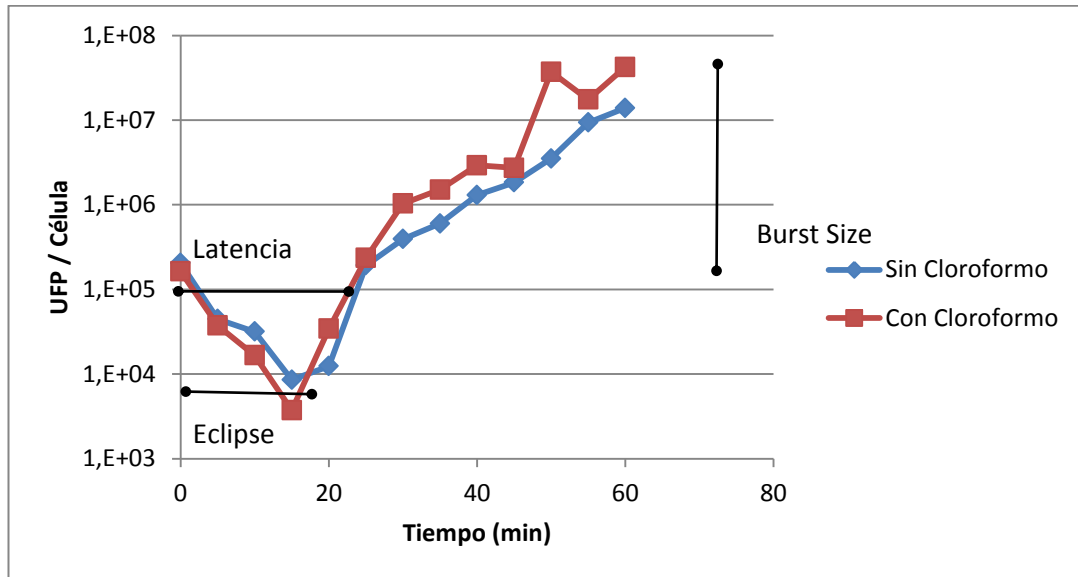


Figura 43. Curva de crecimiento NSI0814 ϕ SWI001

❖ NSC0742 ϕ SWI002

El fago presentó un periodo de latencia aproximadamente a los 20 min, al igual que el periodo de eclipse. Finalmente su Burst size fue de 12.

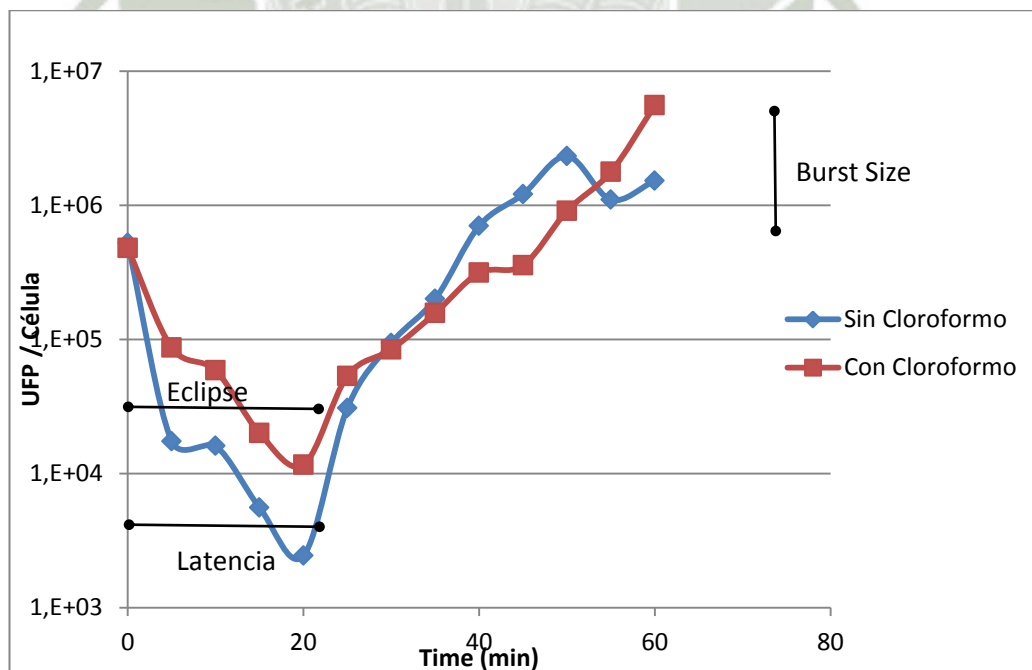


Figura 44 Curva de crecimiento NSC0742 ϕ SWI002

❖ NSI0796 ϕ SWI003

El fago presentó un periodo de latencia aproximadamente a los 25min, su periodo de eclipse fue aproximadamente hasta los 20min. Finalmente su Burst size fue de 14.

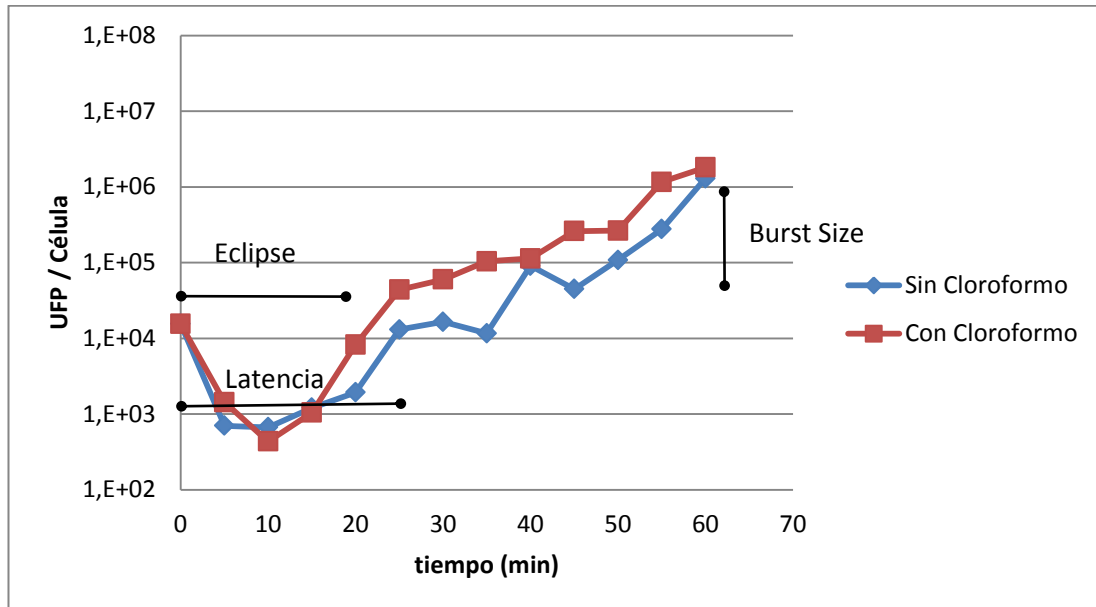


Figura 45. Curva de crecimiento NSI0796 ϕ SWI003.

❖ NSI0925 ϕ SWI004

El fago presentó un periodo de latencia aproximadamente a los 35 min, su periodo de eclipse fue aproximadamente hasta los 20min. Finalmente su Burst size fue de 174.

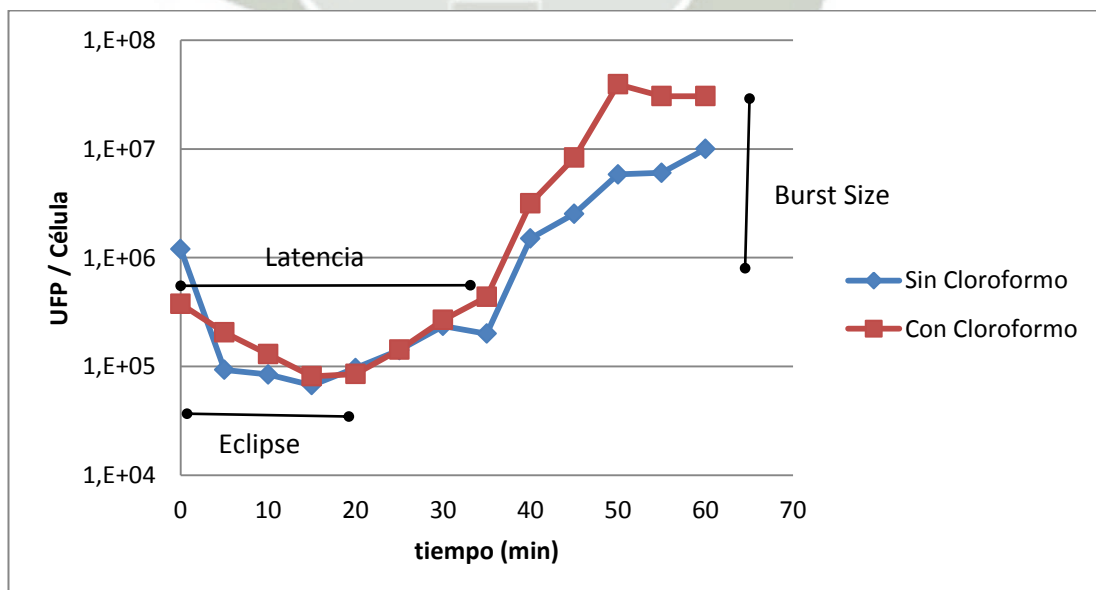


Figura 46. Curva de crecimiento NSI0925 ϕ SWI004

❖ NSI0683 ϕ SWI006

El fago presentó un periodo de latencia aproximadamente a los 20 min, su periodo de eclipse fue aproximadamente hasta los 15min. Finalmente su Burst size fue de 3.

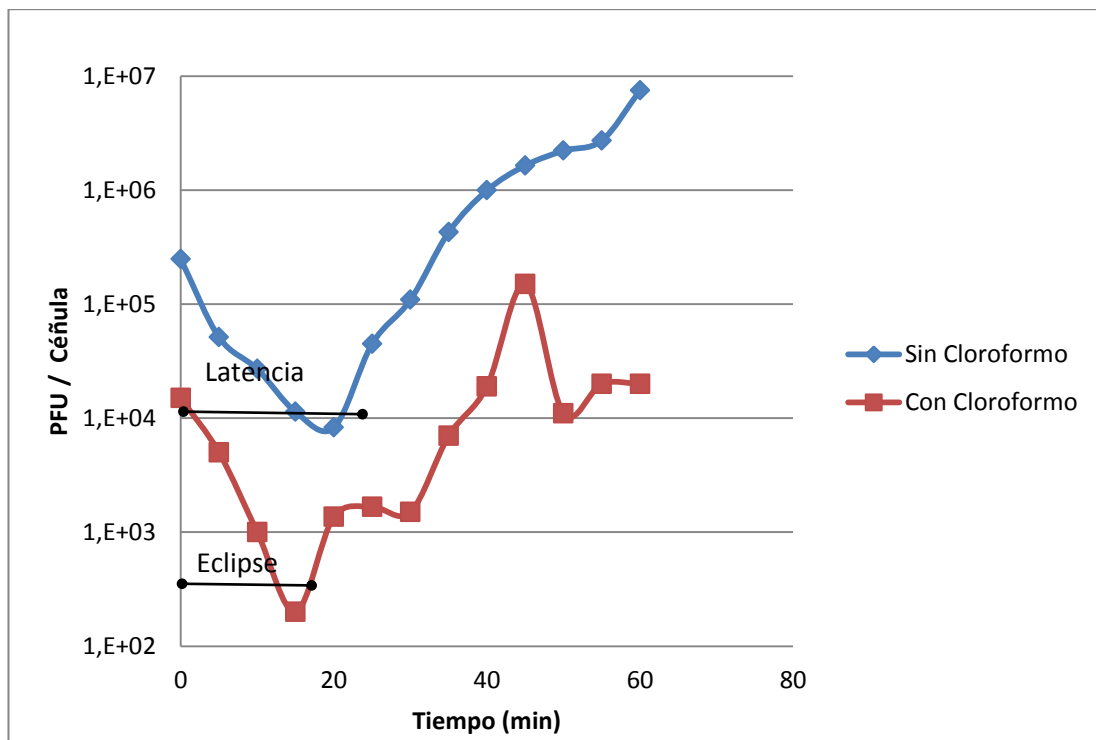


Figura 47. Curva de crecimiento NSI0683 ϕ SWI006

4.1.5 IDENTIFICACIÓN DE FAGOS MYOVIRIDAE

Se ha reportado que la mayoría de fagos tienen doble cadena de ADN, por lo que los primeros intentos fueron el de la extracción de material genético se enfocaron en el ADN, en adelante se puede utilizar las bandas obtenidas de la corrida electroforética en gel para realizar otras pruebas como es el caso de la secuenciación.

En el caso que no se llegasen a presentar bandas en la corrida electroforética, es que no se traten fagos de ADN sino que sean fagos de ARN o que la extracción del ADN viral no fue correcta.

El producto de PCR que se desea encontrar, codifica el gp23 de la capsida de los bacteriofagos que pertenecen a la familia Myoviridae, este producto se encontró

aproximadamente en los 600pb al realizar la corrida electroforética.^{68,70} Se utilizó como control positivo el bacteriofago T4 ATCC® 11303-B41™ y como control negativo se utilizó agua de PCR para verificar que no exista algún contaminante en la reacción de PCR.

De acuerdo a la **Fig. 49** se determinó que los bacteriófagos NSC739ΦSWL001, NSC702ΦSWL007, NSC060ΦSWL008, NSC950ΦSWL009, NSC742ΦSWI002 NSI796ΦSWI003, NSI925ΦSWI004, NSI683ΦSWI004 pertenecen a la familia Myoviridae ya que presentan bandas aproximadamente a los 600bp. El bacteriófago NSI814φSWI001 es negativo a la familia Myoviridae presentando una banda aproximadamente a los 200pb, por otro lado el fago NSC742ΦSWL003 no se puede determinar si pertenece o no a la familia, ya que se observa la presencia de una banda leve aproximadamente a los que los a familia a la que pertenecen los 600pb.

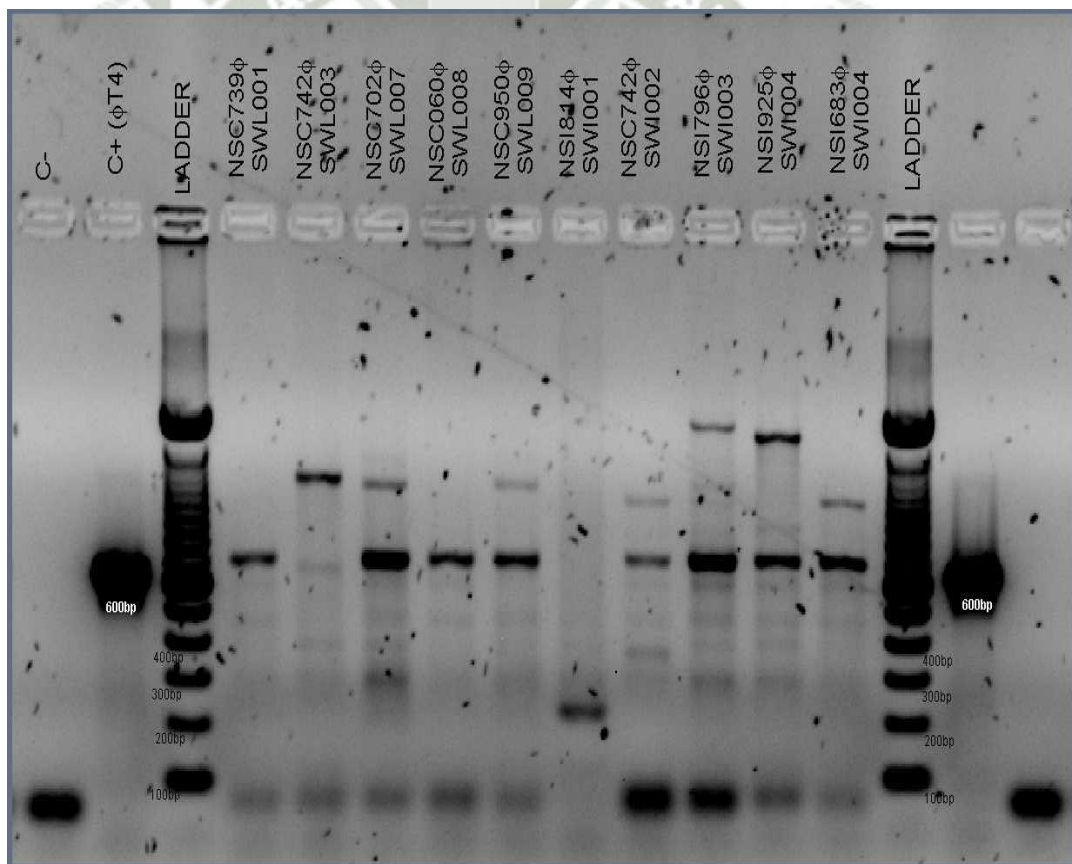


Figura 48. Gel de agarosa al 1 %, Productos de PCR que detectan gp23 de los bacteriofagos de la familia Myoviridae.

4.1.6 IDENTIFICACIÓN DE FAGOS PODOVIRIDAE

Los resultados de la PCR fueron negativos utilizando primers degenerados específicos para regiones conservadas del ADN polimerasa de fagos como el T7 (Podoviridae) a partir de muestras ambientales. Se utilizó como control positivo el bacteriofago T7 ATCC® BAA-1025-B2™ y como control negativo se utilizó agua de PCR para verificar que no exista algún contaminante en la reacción de PCR.

Se esperaba que la región amplificada esté aproximadamente en los 500bp. Al observar la **Fig 50**, se pueden notar bandas en los bacteriófagos NSC702ΦSWL007, NSC950ΦSWL009 Y NSI925ΦSWI004 pero estas se encuentran por encima de los 600bp.

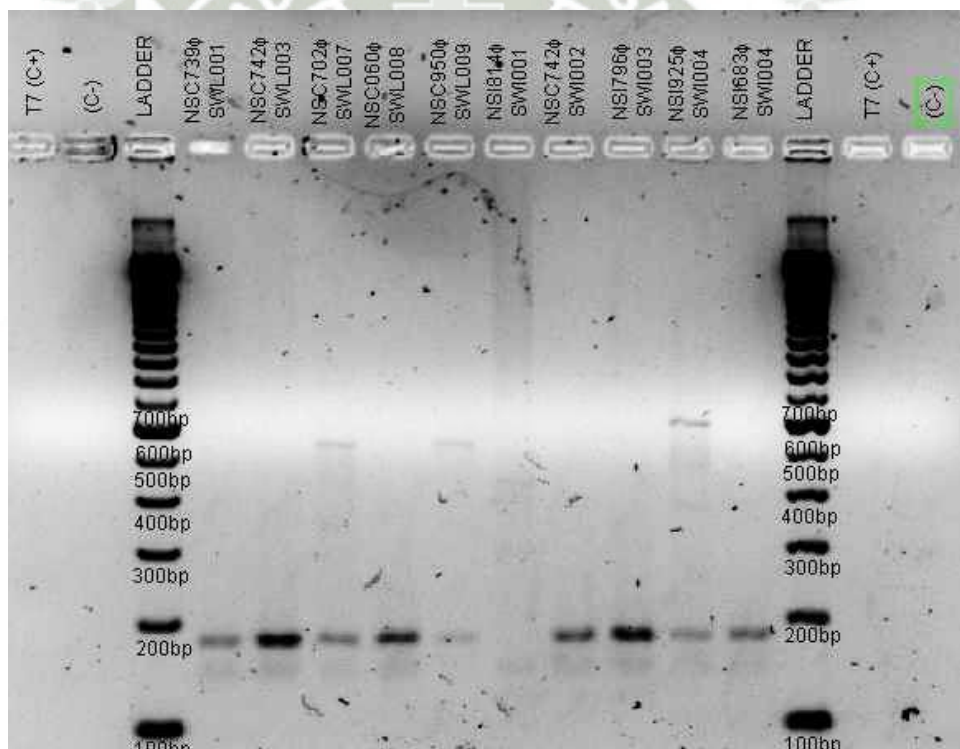


Figura 49. Gel de agarosa al 1.5 %, Productos de PCR que detectan bacteriofagos de la familia Podoviridae.

No causa sorpresa encontrar que la mayoría de los bacteriófagos estudiados pertenezcan a la familia de Myoviridae, ya que esta familia abarca un gran porcentaje en el orden de los Caudovirales.

4.1.6 TIPIFICACIÓN DE BACTERIOFAGOS POR A (RAPD)-PCR

La huella de ADN fue investigada por la técnica del RAPD – PCR, para ello se necesitó un primer corto y arbitrario, como resultado se observan distintos patrones de bandas entre las muestras analizadas. El RAPD-PCR es un procedimiento bastante simple como se indica en la bibliografía revisada, además proporciona información valiosa sobre la relación de los bacteriofagos que han sido aislados, en distintos estudios se puede notar que las bandas resultantes pueden ser distintas entre sí, sin embargo pueden estar directamente relacionadas. Es importante asegurarse de que el ADN a amplificar está libre de contaminantes debido a que el único primer usado en RAPD es arbitrario por lo tanto, el ADN de otras fuentes también se puede amplificar.⁷¹ Como se observa en la **Fig. 51** el dendograma refleja el grado de relación genética que se tiene los distintos aislamientos de bacteriófagos y notar si existe alguna diferencia de acuerdo al lugar de aislamiento. De esta forma se notan 2 grupos, el primero (arriba-abajo) está conformado por los fagos NSI683ΦSWI006, NSC950 ΦSWL009, y los más relacionados en este GRUPO NSI814 ΦSWI001, NSC702 ΦSWL007. Mientras que el segundo grupo se subdivide a la vez entre los fagos NSI742ΦSWI742, NSI796ΦSWI003, NSC060ΦSWL008 y el segundo grupo con NSI925ΦSWI004, NSC742ΦSWL003 Y NSC739ΦSWL1.

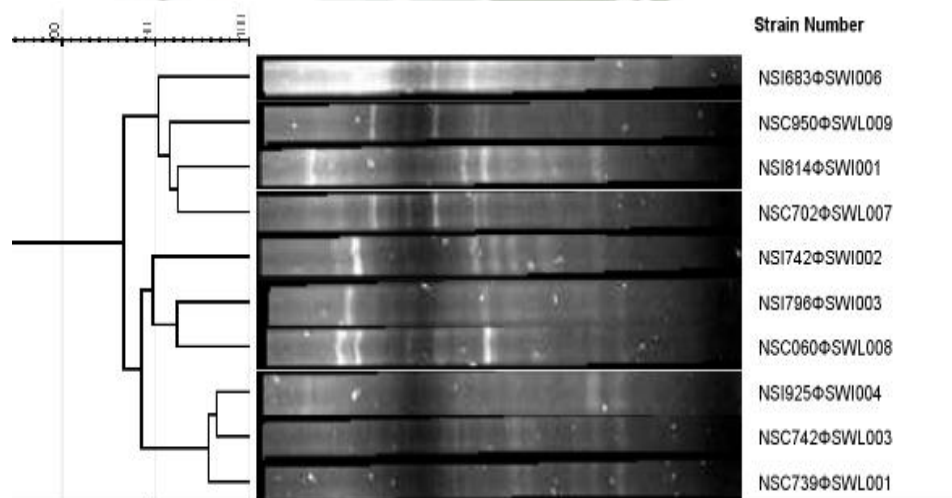


Figura 50. Dendograma de los aislamientos de bacteriófagos para *A.baumannii* .

CAPÍTULO V

5.1 CONCLUSIONES

Primero: Para el aislamiento de bacteriófagos líticos específicos para *A. baumannii* se realizaron en total 257 pruebas a partir de muestras de agua residual (ríos en zonas muy contaminadas, de los cuales solo se pudieron aislar 48 (19%) cepas, se hicieron 27 aislamientos en la ciudad de Lima (11%) y 21 aislamientos en la ciudad de Iquitos (8%). Mientras que no se pudo aislar bacteriófagos en la ciudad de Arequipa. En la ciudad de Lima se identificó que el punto de muestreo SWL009, de Planta de tratamiento de aguas residuales TABOADA en el colector de desagües de Lima-norte, se pudo aislar 8 bacteriofagos; mientras que en Iquitos se obtuvo mayor cantidad de aislamientos en el punto SWI006, Moronacocha con 7 aislamientos. Por lo que se puede corroborar que existe una mayor probabilidad de encontrar bacteriófagos en las zonas donde existe mayor concentración de contaminación

Segundo: Se evidenció la presencia de fagos líticos por la formación de zonas sin crecimiento bacteriano (calvas) en las placas que previamente fueron inoculadas con las muestras resepectivas.

Tercero: Las calvas formadas de los 10 bacteriofagos seleccionados, fueron circulares sin colonias bacterianas es decir no mostraron resistencia bacteriana, todas ellas formaron calvas mayor a 1.0mm y como máximo 1.6mm. 9 bacteriofagos presentaron halo como resultado del efecto lítico de los fagos en su bacteria hospedera alcanzando como máximo un diámetro de 5.2mm. Sin embargo el fago NSC0702 ϕ SWL007 no presento halo.

Cuarto: Se realizó la prueba de la Eficiencia de Calva, resultando ser un paso trascendente para distintas pruebas posteriores, es recomendable trabajar con títulos altos de fagos, en el caso que la concentración de los bacteriófagos aislados fue baja; se reconcentró hasta tener una concentración mínima de 10^9 . Al tratarse de entidades

parasitarias, la replicación es una técnica rápida y efectiva para tener grandes concentraciones de fagos.

Quinto: Se utilizó un MOI de 0.01 en la prueba de Curva de Crecimiento, ya que así se asegura que la razón del complejo Fago-hospedero sea de un bacteriófago por 100 bacterias, y que los resultados obtenidos sean los más exactos posibles.

Sexto: La Curva de Crecimiento es una técnica importante para la caracterización de los bacteriófagos, permitiéndonos conocer su periodo de latencia de los fagos aislados; estos periodos se encuentran entre el minuto 20 en la mayoría de casos y como máximo 35. Este resultado no es solo dependiente del bacteriófago sino de la misma cinética de la bacteria.

Séptimo: El rango del Burst Size obtenido de los bacteriófagos seleccionados va desde 3 a 281 fagos por célula bacteriana, esto es específico para cada complejo de fago-bacteria. Siendo de mayor importancia aquellos que obtengan un elevado burst size, ya que esto facilitara la efectiva y rápida eliminación de la bacteria que se desea eliminar. Basándose en criterios básicos, se determina que el fago NSI0814 ϕ SWI001 es de gran importancia ya que tiene un periodo de latencia de aproximadamente 20min y un burst size de 281 bacteriofagos a partir de una bacteria infectada. Seguido de los aislamientos NSC0950 ϕ SWL009, NSI0925 ϕ SWI004, NSC0702 ϕ SWL007 y NSC0742 ϕ SWL003.

Octavo: Se determinó mediante la técnica de PCR que ocho de los diez bacteriófagos seleccionados pertenecen a la familia Myoviridae, obteniendo una amplificación aproximadamente a los 600pb, la prueba fue validada con el uso del bacteriofago T4 ATCC® 11303-B41 que formo una banda a esta altura. El bacteriófago NSI814 ϕ SWI001 es negativo a la familia Myoviridae presentando una banda aproximadamente a los 200pb, por otro lado el fago NSC742 Φ SWL003 no se puede determinar si pertenece o no a la familia, ya que se observa la presencia de una banda leve aproximadamente en los 600pb propio de esta familia.

Noveno: No se pudo determinar ningún fago aislado que pertenezca a la familia de los Podoviridae. La prueba se determina como inválida ya que no amplificó ninguna región del bacteriofago T7 ATCC® BAA-1025-B2.

Décimo: Al realizar la tipificación mediante la técnica del RAPD-PCR con el uso de primers degenerados, y la posterior generación del dendograma se determinó que no existe diferencias genotípicas entre los bacteriófagos aislados en los distintos puntos de muestreo de agua entre las ciudades de Lima e Iquitos.

5.2 RECOMENDACIONES.

Primero: En la metodología de muestreo se recomienda el uso de material de protección personal que permita evitar el contacto directo con las fuentes de obtención de bacteriófago las cuales pueden resultar tóxicas.

Segundo: También es importante analizar a conciencia la ubicación de los sitios de muestreo para evitar la toma de muestras en aguas descontaminadas en las cuales existe poca probabilidad de encontrar material biológico de interés.

Tercero: En el manejo en laboratorio es recomendable el uso de bioseguridad como es el equipo de protección personal, cámaras de flujo, mecheros, autoclave, desinfectantes y evitar las corrientes de aire hacia el interior o exterior del laboratorio.

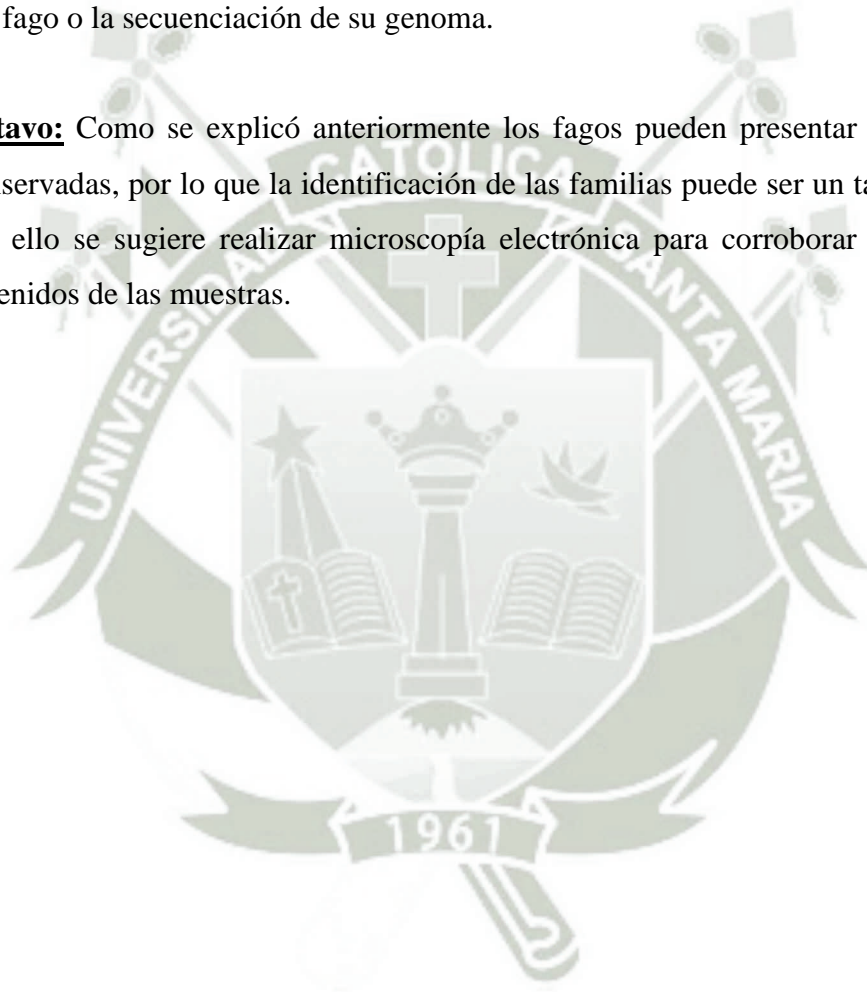
Cuarto: Para el aislamiento de los fagos se recomienda escoger calvas aisladas, estas deben ser totalmente transparentes para evitar cualquier tipo de contaminación y/o resistencia.

Quinto: La temperatura a la que deben ser almacenados debe ser a 4°C, en el caso que se deban crioconservar las cepas, se les debe añadir un 15% de Glicerol al buffer.

Sexto: En el caso de la prueba de Eficiencia de Calva, se debe realizar previamente a los estudios como por ejemplo la curva de crecimiento, ya que los fagos al ser almacenado van perdiendo su concentración con el tiempo.

Séptimo: Se deben incluir otras pruebas como el rango hospedero, que permite conocer las distintas cepas bacterianas a las que puede infectar un fago específico. Como es que altera su cinética frente el cloroformo o al UV. En la parte de biología molecular se podría usar enzimas de restricción para conocer el tamaño del genoma del fago o la secuenciación de su genoma.

Octavo: Como se explicó anteriormente los fagos pueden presentar o no regiones conservadas, por lo que la identificación de las familias puede ser un tanto arbitraria, por ello se sugiere realizar microscopía electrónica para corroborar los resultados obtenidos de las muestras.



BIBLIOGRAFÍA

1. MINSA, Dirección General de Epidemiología, Protocolo Estudio Prevalencia de Infecciones Intrahospitalarias, Perú 2014.
http://www.minsa.gob.pe/dgsp/observatorio/documentos/infecciones/Protocolo%20Estudio%20de%20Prevalencia_DGE.pdf
2. Lebeque Pérez Yamila, Morris Quevedo Humberto J., Calás Viamonte Nerys. Infecciones nosocomiales: incidencia de la Pseudomonas aeruginosa. Rev cubana med. 2006 Mar 45(1)
3. Control Calidad SEIMC, M^a Ángeles Marcos,. Universidad de Barcelona. Acinetobacter Baumanni.
4. BERGOGNE E., TOWNER K. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical, and epidemiological features. Paris, Francia. Clinical Microbiology Reviews. 1996, vol. 9, n^o 2, p. 148-165.
5. RT JournalID 261132654008T1 - Acinetobacter baumannii: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnósticoJF - CES MedicinaYR - 2014VO - 28SP - 233-246SN - 0120-8705 UL
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=261132654008SL> - RedalycLL - <http://www.redalyc.org>
6. RANIPHAL R., KLUGE R. *Acinetobacter calcoaceticus* variety *anitratu*s: an increasng nosocomial problem. The American Journal of the Medical Sciences.1979, vol. 277, p. 57-65
7. Morgan DJ, Liang SY, Smith CL, Johnson JK,Harris AD, Furuno JP, et al. Frequent multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* contamination of gloves, gowns, and hands of healthcare workers. Infect Control Hosp Epidemiol. 2010;31(7):716-21.

8. GIAMARELLOU H., ANTONIADOU A., KANELLAKOPOULOU K. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? Grecia. International Journal of Antimicrobial Agents. 2008, vol. 32, n° 2, p. 106-19.
9. Sussmann O, Mattos L, Restrepo A, Resistencia Bacteriana <http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v43n1/0026%20Resistencia.PDF>
10. Falagas, ME, Koletsi, PK, and Bliziotis, IA. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*. 2006; 55: 1619–1629
11. Park, YK, Peck, KR, Cheong, HS, Chung, DR, Song, JH, and Ko, KS. Extreme drug resistance in *Acinetobacter baumannii* infections in intensive care units, South Korea. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15:1325–1327
12. FALAGAS M., KARAGEORGOPOULOS D. Pandrug resistance (PDR), extensive drug resistance (XDR), and multidrug resistance (MDR) among Gram-negative bacilli: need for international harmonization in terminology. Grecia. *Clinical Infectious Diseases*. 2008, vol. 46, n° 7, p. 1121–2.
13. Bou G, Cervero G, Domínguez M A, Quereda C, Martínez-Beltrán J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3299-305.
14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=acinetobacter+baumannii+MDR>

15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=MDR+acinetobacter+baumannii+south+america>
16. PAZ ROJAS, Enrique Luis; DE LEON PANDOLFI, Darío Ponce y RAMIREZ PONCE, Rafael. Resistencia bacteriana en cuidados intensivos y tendencia actual: Departamento de Cuidados Críticos, Servicio de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, Essalud, Lima, Perú, 2004-2006. *Acta méd. peruana* [online]. 2008, vol.25, n.3 [citado 2016-04-26], pp. 140-147 . Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172008000300004&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1728-5917.
17. LEE N., LEE H., KO N., CHANG C., SHIH H., WU C. Clinical and economic impact of multidrug resistance in nosocomial *Acinetobacter baumannii* 108 bacteremia. Taiwan. *Infection control and hospital epidemiology: the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 2007, vol. 28, n°6, p. 713-9.
18. FLORES W., ILLESCA R., ROFRIGUEZ L., HIDAGO V., PAZ E., MENDIVIL S. Reporte de datos acumulados de susceptibilidad antimicrobiana. Lima, Perú. Essalud. 2011.
19. CHINCHA O, CORNELIO E, VALVERDE V., ACEVEDO M. Infecciones Intrahospitalarias asociadas a dispositivos invasivos en UCI de un Hospital nacional de Lima, Perú *Revista Peruana Medica Exp Salud Publica*.2013;30(4):616-20
20. Lemos EV, De la Hoz Restrepo F, Alvis N, Quevedo E, Cañon O, León Y. Mortalidad por *Acinetobacter baumannii* en unidades de cuidados intensivos en Colombia. *Rev Panam Salud Publica*. 2011;30(4): 287–94.

21. <http://elcomercio.pe/peru/lambayeque/chiclayo-176-muertos-males-intrahospitalarios-este-ano-noticia-1828812>
22. Instituto Nacional de Salud INS, Informe de la Resistencia Antimicrobiana en Hospitales en Perú.2006
http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/-/Informe_Resistencia_2006.pdf
23. <http://www.javeriana.edu.co/divulgacionmicrobiologia/los-bacteriofagos/>
24. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morriz G, Bacteriophage Therapy Minireview, Antimicrobial Agents And Chemotherapy, 0066-4804/01/\$04.0010 DOI: 10.1128/AAC.45.3.649-659.2001 Mar. 2001, p. 649-659 Vol. 45, No. 3, American Society for Microbiology.
25. Kutter, E. M., Gvasalia, G., Alavidze, Z., & Brewster, E. (2013). Phage Therapy. In M. Grassberger, R. A. Sherman, O. S. Gileva, C. M. H. Kim, & K. Y. Mumcuoglu (Eds.), *Biotherapy - History, Principles and Practice* (pp. 191-231). Springer Netherlands. Retrieved from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-6585-6_8
26. Doffkay Z, Dömötör D, Rákhely G. Bacteriophage Therapy Against, Plant , Animal and Pathogens Review. Acta Biol Szeged 59(Suppl.2):291-302 (2015)
27. <http://www.industriaacuicola.com/PDFs/7.2LaFagoterapia.pdf>
28. Bielke, L. R., Higgins, S. E., Donoghue, A. M., Donoghue, D. J., Hargis, B. M. y Tellez, G. 2007. Use of wide-host-range bacteriophages to reduce *Salmonella* on poultry products. *International Journal of Poultry Science*. 6 (10): 754-757.

29. Goode, D., V. M. Allen, A. Barrow. 2003. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Appl Environm Microbiol.* 69 (8):5032–5036
30. http://www.omnilytics.com/products/agriphage/agriphage_info/agriphage_espanol.html
31. Bacteriófagos para el control microbiológico de la agricultura 23 de marzo de 2016 en *Últimas Tecnologías AINIA*
<http://tecnoalimentalia.ainia.es/web/tecnoalimentalia/ultimas-tecnologias/-/articulos/rT64/content/bacteriofagos-para-el-control-microbiologico-de-la-agricultura>
32. Gill J, Hayman P. Phage choice, isolation and preparation for phage therapy. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012; 11:2-14.
33. Salmon GG, Symonds M. Staphage lysate therapy in chronic staphylococcal infections. *J Med Soc N J.* 1963; 60:188-193.
34. Krylov VN. Use of live phages for therapy on a background of coevolution of bacteria and phages. *International Research Journal of Microbiology.* 2011; 2 (9):315-332.
35. Rohwer, F. & Edwards, R. (2002). The phage proteomic tree: Genome-based taxonomy for phage. *J Bacterio* 184, 4529-4535.
36. Ackermann H.-W. (2007). 5500 phages examined in the electron microscope. *Arch Virol* 152, 227-243.
37. Zsolt D., Dóra D., Tamás K., Gábor R. Bacteriophage therapy against plant, animal and human pathogens. *Acta Biol Szeged* 59(Suppl.2):291-302 (2015).

<http://www.sci.u-szeged.hu/ABS>

38. Edwards, R. A., Rohwer, F. (2005). Viral metagenomics. *Nature Rev Microbiol* 3, 504–510.
39. Ackermann, H.-W. (2005). Bacteriophage classification. In *Bacteriophages: Biology and applications*. Kutter, E. & Sulakvelidze, A. (Eds) CRC Press. pp. 67-90
40. Ackermann, H.-W. (2003). Bacteriophage observations and evolution. *Res Microbiol* 154, 245-251.
41. <http://www.taringa.net/posts/ciencia-educacion/15486571/Virus-morfologia-y-caracteristicas.html>
42. <https://phagehuntz.wordpress.com/2014/06/05/the-many-different-families-of-phages/>
43. <http://medicamentoso.cl/bacteriofagos-demasiado-buenos-para-ser-verdad/>
44. Engelkirk, P. G. & Burton, G. R. (2006). *Burton's microbiology for the health sciences* (8th Edition). Lippincott Williams & Wilkins.
45. Little, J. W. (2005). Lysogeny, prophage induction, and lysogenic conversion. In *Phages: Their role in bacterial pathogenesis and biotechnology*, pp. 37-54. Edited by Waldor, K. W., Friedman, D. I. & Adhya, S. L. ASM Press.
46. Elliott, J. & Arber, W. (1978). *E. coli* K-12 λ phage mutants, which block phage lambda DNA injection, coincide with ptsM, which determines a component of a sugar transport system. *Mol Gen Genet* 161, 1-8.

47. Krüger, D. H. & Bickle, T. A. (1983). Bacteriophage survival: Multiple mechanisms for avoiding the deoxyribonucleic acid restriction systems of their hosts. *Microbiol Rev* 47, 345-360.
48. Luria, S. E. (1953). Host-induced modification of viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 18, 237-244.
49. Inamdar, M. M., Gelbart, W. M. & Philips, R. (2006). Dynamics of DNA ejection from bacteriophage. *Biophysical J* 91, 411-420.
50. Letellier, L., Boulanger, P., Plançon, L., Jacquot, P. & Santamaria, M. (2004). Main features on tailed phage, host recognition and DNA uptake. *Frontiers in Bioscience* 9, 1228-1239.
51. Guttman, B., Raya, R. & Kutter, E. (2005). Basic Phage Biology. In *Bacteriophages: Biology and applications*. Kutter, E. & Sulakvelidze, A.(Eds). CRC Press. pp. 29-66.
52. Blasi, U. & Young, R. (1996). Two beginnings for a single purpose: the dual start holins in the regulation of phage lysis. *Mol Microbiol* 21, 675-682.
53. Young, R. (2002). Bacteriophage holins: Deadly diversity. *J Mol Microbiol. Biotechnol* 4(1), 21-36.
54. Stansfield, W. D., Colomé, J. S. & Cano, R. J. (1996). *Schaum's outline of theory and problems of molecular and cell biology* (4th Edition). McGraw-Hill Professional.
55. <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioBacteriofagos.htm>
56. Schrader, H.S., Schrader, J.O., Walker, J.J., Wolf, T.A., Nickerson, K.W. and Kokjohn, T.A., (1997) Bacteriophage infection and multiplication occur in

- Pseudomonas aeruginosa* starved for 5 years. *Can J Microbiol* 43: 1157–1163.
57. Carlson, K. Appendix: Working with Bacteriophagees: Common Techniques and Methodological Approaches:448-450
58. Carlson, K. and Miller, E.S., (1994). “Experimental protocols,” pp. 421–483 in *Molecular Biology of Bacteriophage T4*, J.D. Karam (Ed.). American Society for Microbiology, Washington, DC.
59. Kutter E., Sulakvelidze, A. (2005). *BACTERIOPHAGES: Biology and Applications*pp. 488
60. Martha R. J. Clokie, Andrew M. Kropinski (eds.), *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 2: Molecular and Applied Aspects*, vol. 502, C_ 2009 Humana Press, a part of Springer Science+Business Media DOI 10.1007/978-1-60327-565-1 5 Springerprotocols.com
61. Fuller, N.J., et al., Occurrence of a sequence in marine cyanophages similar to that of T4 g20 and its application to PCR-based detection and quantification techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998. 64(6):2051–2060.
62. Marston, M.F. and J.L. Sallee, Genetic diversity and temporal variation in the cyanophage community infecting marine *Synechococcus* species in Rhode Island’s coastal waters. *Appl Environ Microbiol*, 2003. 69(8): 4639–47. 5.
63. Short, C.M. and C.A. Suttle, Nearly identical bacteriophage structural gene sequences are widely distributed in both marine and freshwater environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005. 71(1): 480–486.

64. Petrov, V.M., et al., *Plasticity of the Gene Functions for DNA Replication in the T4-like Phages*. *Journal of Molecular Biology*, 2006. 361(1): 46
65. Lynch M. y B.G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3:91-99.
66. Rocha M, Gonzáles A, Aguirre X. ADN POLIMORFICO AMPLIFICADO AL AZAR (RAPD) Y REGIONES INTERMEDIAS ENTRE SECUENCIAS SIMPLES Y REPETIDAS.
<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/adn.pdf>
67. Comeau A. et al. The use of degenerate-primed random amplification of polymorphic DNA (DP-RAPD) for strain-typing and inferring the genetic similarity among closely related viruses . *Journal of Virological Methods* Volume 118, Issue 2, 15 June 2004, Pages 95–100.
68. Filee, J., et al., *Marine T4-type bacteriophages, a ubiquitous component of the dark matter of the biosphere*. *PNAS*, 2005. 102(35): 12471–12476.
69. Breitbart, M., Miyake, J. H. & Rohwer, F. (2004). Global distribution of nearly identical phage-encoded DNA sequences. *FEMS Microbiol* 236, 249-256.
70. Vladimirovna, T., Belykh, O., (2010) Phylogenetic diveristy of T4-likje bacteriophages in Lake Baikal, East Siberia *FEMS Microbiol*11-8
71. Bardakci, F. (2001). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. *Turk J Biol* 25, 185-196.
72. Huang G., Le S.,Peng Y., Zhao Y, Yin S., Zhang L.,(2013) Characterization and Genome Sequencing of Phage Abp1, a New phiKMV-Like Virus Infenting Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Springer Science.

73. Herman N., Juni E., Isolation and Characterization of a Generalized Transducing Bacteriophage for *Acinetobacter*.
74. Merabishvili M., Vandenheuvel D., Kropinski A., Mast J., De Vos D., Verbeken G., Noben J., Lavigne R., Vaneechoutte M., Pirnay J. (2014) Characterization of Newly Isolated Lytic Bacteriophages Active against *Acinetobacter baumannii*. Plos ONE 9(8):e104853. Doi:10.1371/journal.pone.0104853.
75. Popova A., Myakinina V., Platonov M., Volozhantsev N. (2012) Molecular Genetic Characterization of Multidrug –Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains and Assessment of their Sensitivity to Phage AP22. Microbiology and Virology vol 27, No 4pp. 154-159.
76. Thawatchai K., Thummeepak R., Thanwisai A., Boonyodying K., Kunthalert D., Ritvirool P., Sitthisak S. (2014) Characterization and Detection of Endolysin Gene from Three *Acinetobacter baumannii* Bacteriophage Isolated from Sewage Water. Springer.
77. Kumari S., Harjai K., Chhibber S. (2010) Isolation and Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Specific Bacteriophage from Sewage Samples Folia Microbiol, 55 (3), 221 – 227.
78. Gutiérrez D., Martín-P. A., Rodríguez A., Martínez-B. M., Gacía P., Martínez B. (2011) Typing of bacteriophage by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR to assess genetic diversity FEMS.
79. Lu Z., Breidt F., Fleming H., Altermann E., Klaenhammer T. (2003) Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, ϕ JL-1, from cucumber fermentation. International Journal of Food Microbiology 84 (225 - 235).

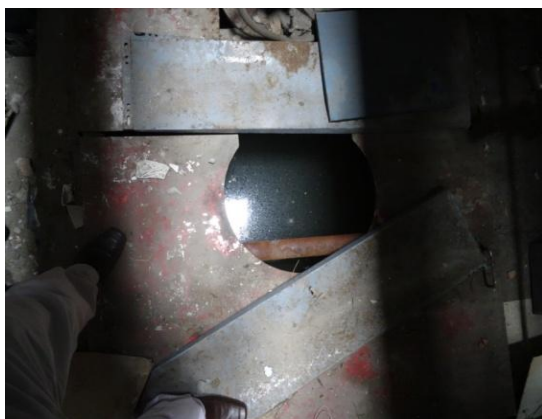
80. Lis L., Zhang Z., (2014) Isolation and characterization of a virulent bacteriophage *SPW* specific for *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis of lactating dairy cattle. –Mol Biol Rep 41:5829-5838.
81. Breitbart M., Miyake J., Rohwer F., Global distribution of nearly identical phage – encoded DNA sequences. FEMS Microbiology Letters 236 249 -256.
82. Vladimirovna T., Belykh O., Yu. Maksimenko S., Belikov M. (2010) Phylogenetic diversity of T4-like bacteriophages in Lake Baikal, East Siberia . FEMS Microbiology Letters
83. Bai Q., Zhang W., Yang Y., Tang F., Nguyen X., Liu G., Lu C. (2013) Characterization and genome sequencing of a novel bacteriophage infecting *Streptococcus agalactiae* with high similarity to a phage from *Streptococcus pyogenes*. Arch Virol 158: 1733 – 1741.
84. Biswas B., Adhya S., Washart P., Paul W.(2002) Bacteriophage Therapy Rescues Mice Bacteremic from a Clinical Isolate of Vancomycin – Resistant *Enterococcus Faecium*. Infection and Immunity, p 204 – 210.
85. Albino L., Rostagno M., Húngaro H., Mendoza R.(2014) Isolation, Characterization, and Application of Bacteriophages for *Salmonella spp.* Biocontrol in Pigs. *FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE* Volume 0, Number 0.
86. Bassiri Eby. One Step Phage Growth Curve. Microbiology BIOL 275
87. Pelzek A., Schuch R., Schmitz J, Fischetti V. (2013) Current Protocols Essential Laboratory Techniques 4.4.1-4.4.33.

CAPÍTULO VI

ANEXOS

ANEXO N° 1: PUNTOS DE MUESTREO LIMA

6.1.1 LIMA SWL001- HOSPITAL F.A.P.



Tanque que recolecta desagüe de consultorios externos y oficinas. Punto 1



Desagüe a 50 cms. de la superficie



Panorama del Tanque séptico que recolecta desagüe de Hospitalización y otros. Punto 2



Extracción en balde debido a la distancia de 2 mts. a la superficie del desagüe



Vaciado al frasco.

6.1.2 LIMA SWL002- HOSPITAL MILITAR CENTRAL



Buzón que recolecta desagües de la zona Hospitalización
y los Pabellones A y B



Vaciado al frasco

6.1.3 LIMA SWL003- RÍO RÍMAC



Río Rímac en el Callao (Faucett /Morales Duarez). Punto 1



Toma de muestra con balde



Toma de muestra en frasco # 1 de 1 Lt



Limpieza y sellado para transporte



Toma de muestra del 2do. Punto,
Puente Libertadores en el Agustino. Río
Rímac



Recolección en balde del desagüe que desemboca en el Río Rímac



Vaciado al frasco de 1Lt

6.1.4 LIMA SWL008 Y SWL009 PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES TABOADA



Dos colectores: Interceptor Norte y Colector Comas-Chillón recolecta desagues de 27 distritos.



Succión del Interceptor Norte. Punto 1



Colector Comas-Chillón. Punto 2



Toma de muestra directa con la bomba

ANEXO N° 2: PUNTOS DE MUESTREO IQUITOS

6.2.1 IQUITOS SWI 002 BELEN



Muestras tomadas del desagüe del Mercado de Belen y la acequia del mismo poblado.

6.2.2 IQUITOS SWI 006 MORONACOCHA



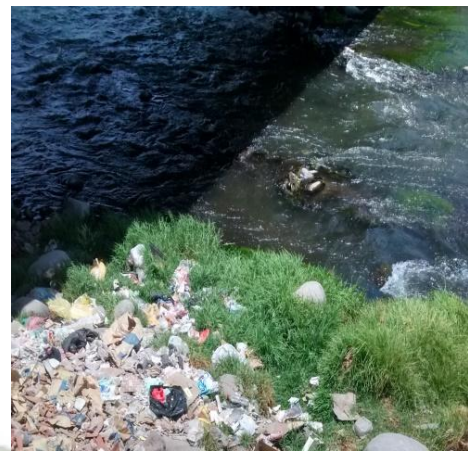
Laguna Moronacocha, época de creciente



ANEXO N° 3: PUNTOS DE MUESTREO AREQUIPA



SWA 001 Congata, agua de desagüe ambiental



SWA 002 Rio Chili, altura Tingo



SWA 003 Tingo



SWA 004 Sabandia, canal de agua

ANEXO N° 4: TABLAS CURVA DE CRECIMIENTO NSC0739 ϕ SWL001

	Tiempo min	RÉPLICA1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	PROMEDIO	DESVIACIÓN	DESV/2
Sin Cloroformo	0	1.E+05	2.E+03	3.E+04	5.E+04	6.E+04	3.E+04
	5	1.E+04	3.E+03	1.E+04	9.E+03	5.E+03	3.E+03
	10	2.E+03	1.E+02	2.E+02	6.E+02	8.E+02	4.E+02
	15	9.E+02	1.E+02	1.E+03	8.E+02	7.E+02	3.E+02
	20	7.E+02	6.E+02	2.E+03	1.E+03	9.E+02	4.E+02
	25	2.E+03	2.5E+04	6.9E+03	1.E+04	1.E+04	6.E+03
	30	6.E+03	2.E+04	1.E+04	1.E+04	8.E+03	4.E+03
	35	5.E+04	1.E+05	6.E+04	8.E+04	4.E+04	2.E+04
	40	4.E+05	1.E+05	1.E+05	2.E+05	1.E+05	7.E+04
	45	1.E+05	1.E+05	2.E+05	1.E+05	7.E+04	3.E+04
	50	6.E+05	3.E+05	3.E+05	4.E+05	2.E+05	8.E+04
	55	1.E+05	1.E+04	1.E+05	9.E+04	7.E+04	4.E+04
60	3.E+05	1.E+05	2.E+05	2.E+05	8.E+04	4.E+04	

	tiempo (min)	RÉPLIC A1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	PROMEDIO	DESVIACIÓ N	DESV/2
Con Cloroformo	0	8.E+04	1.E+04	2.E+04	4.E+04	4.E+04	2.E+04
	5	1.E+04	8.E+03	1.E+04	1.E+04	2.E+03	9.E+02
	10	4.E+03	3.E+03	7.E+03	5.E+03	2.E+03	1.E+03
	15	3.E+03	3.E+03	3.E+03	3.E+03	3.E+02	2.E+02
	20	1.E+04	4.E+03	2.E+03	6.E+03	4.E+03	2.E+03
	25	3.E+04	1.E+04	1.E+04	2.E+04	9.E+03	4.E+03
	30	8.E+04	3.E+04	4.E+04	5.E+04	3.E+04	1.E+04
	35	1.E+05	7.E+04	8.E+04	8.E+04	2.E+04	1.E+04
	40	2.E+05	4.E+05	7.E+04	2.E+05	2.E+05	8.E+04
	45	5.E+05	1.E+05	1.E+05	3.E+05	2.E+05	1.E+05
	50	1.E+06	5.E+05	5.E+05	8.E+05	6.E+05	3.E+05
	55	1.E+06	6.E+05	3.E+05	7.E+05	4.E+05	2.E+05
60	5.E+05	3.E+05	2.E+05	3.E+05	1.E+05	7.E+04	

ANEXO N° 5: TABLAS CURVA DE CRECIMIENTO NSC0742 ϕ SWL003

	Tiempo (min)	RÉPLICA1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	PROMEDIO	DESVIACIÓN	DESV/2
Sin Cloroformo	0	2.E+03		4.E+03	3.E+03	1.E+03	7.E+02
	5		1.E+02		1.E+02		
	10		1.E+02		1.E+02		
	15		1.E+01	1.E+02	7.E+01	8.E+01	4.E+01
	20	1.E+01	4.E+02	1.E+01	1.E+02	2.E+02	1.E+02
	25	3.E+02	1.E+02	3.E+02	2.E+02	7.E+01	3.E+01
	30	2.E+03			2.E+03		
	35	2.E+02	5.E+02	3.E+03	1.E+03	2.E+03	8.E+02
	40		1.E+05	2.E+04	6.E+04	5.E+04	3.E+04
	45	2.E+03	1.E+04	1.E+05	5.E+04	7.E+04	3.E+04
	50	2.E+03	4.E+04		2.E+04	3.E+04	1.E+04
	55			1.E+05	1.E+05		
60	3.E+04	1.E+05		7.E+04	6.E+04	3.E+04	

	Tiempo (min)	RÉPLICA1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	PROMEDIO	DESVIACIÓN	DESV/2
Con Cloroformo	0	2.E+02	1.E+03	6.E+02	6.E+02	5.E+02	2.E+02
	5	2.E+02	8.E+02	1.E+02	4.E+02	4.E+02	2.E+02
	10	1.E+02	7.E+02	2.E+02	3.E+02		
	15	2.E+02	2.E+02	3.E+02	3.E+02	7.E+01	4.E+01
	20	3.E+02	6.E+02	2.E+02	4.E+02		
	25	2.E+02	3.E+02	2.E+02	2.E+02		
	30	3.E+02	1.E+03	2.E+03	1.E+03	6.E+02	3.E+02
	35	4.E+02	1.E+03	1.E+03	1.E+03	5.E+02	3.E+02
	40	1.E+04		1.E+04	1.E+04	1.E+03	7.E+02
	45	3.E+04			3.E+04		
	50		1.0E+05	2.0E+03	5.E+04	7.E+04	4.E+04
	55	1.E+05	3.0E+03	4.0E+03	4.E+04	6.E+04	3.E+04
60							

ANEXO N° 6: TABLAS CURVA DE CRECIMIENTO NSC0702 ϕ SWL007

	Tiempo (min)	RÉPLICA1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	PROMEDIO	DESVIACIÓN	DESV/2
Sin Cloroformo	0	2.E+04		1.E+04	2.E+04	6.E+03	3.E+03
	5		1.E+02	1.E+03	7.E+02	8.E+02	4.E+02
	10	2.E+02	1.E+03	6.E+02	7.E+02	5.E+02	3.E+02
	15	1.E+03	1.E+03	1.E+03	1.E+03	2.E+02	1.E+02
	20	3.E+03	7.E+02	2.E+03	2.E+03	1.E+03	7.E+02
	25	3.E+03		2.E+04	1.E+04	1.E+04	7.E+03
	30	7.E+03	2.E+04	2.E+04	2.E+04	8.E+03	4.E+03
	35	1.E+04	1.E+04	1.E+04	1.E+04	2.E+03	1.E+03
	40		4.E+04	1.E+05	9.E+04	7.E+04	3.E+04
	45	4.E+04	8.E+04	2.E+04	4.E+04	3.E+04	1.E+04
	50	1.E+05	2.E+05	3.E+04	1.E+05	9.E+04	4.E+04
	55	2.E+05	5.E+05	1.E+05	3.E+05	2.E+05	1.E+05
60	1.E+06	9.E+05	2.E+06	1.E+06	4.E+05	2.E+05	

	tiempo (min)	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	PROMEDIO	DESVIACIÓN	DESV/2
Con Cloroformo	0	2.E+04		1.E+04	2.E+04	6.E+03	3.E+03
	5	4.E+02	1.E+03	3.E+03	1.E+03	1.E+03	6.E+02
	10	2.E+02	5.E+02	6.E+02	4.E+02	2.E+02	1.E+02
	15	8.E+02	1.E+03	1.E+03	1.E+03	3.E+02	1.E+02
	20	6.E+03	1.E+04	9.E+03	8.E+03	2.E+03	9.E+02
	25	2.E+04	6.E+04	4.E+04	4.E+04	2.E+04	1.E+04
	30	3.E+04	6.E+04	8.E+04	6.E+04	3.E+04	1.E+04
	35	9.E+04	1.E+05		1.E+05	3.E+04	1.E+04
	40	9.E+04	1.E+05	1.E+05	1.E+05	3.E+04	2.E+04
	45	3.E+05	3.E+05		3.E+05	1.E+04	6.E+03
	50	2.E+05	3.E+05	2.E+05	3.E+05	6.E+04	3.E+04
	55	8.E+05	2.E+06	1.E+06	1.E+06	4.E+05	2.E+05
60	2.E+06	1.E+06	2.E+06	2.E+06	3.E+05	2.E+05	

ANEXO N° 7: TABLAS CURVA DE CRECIMIENTO NSC0060 ϕ SWL008

	Tiempo (min)	RÉPLICA1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	PROMEDIO	DESVIACIÓN	DESV/2
Sin Cloroformo	0	2.E+04	2.E+04	4.E+04	3.E+04	1.E+04	5.E+03
	5	3.E+03	2.E+04	4.E+03	8.E+03	7.E+03	4.E+03
	10	9.E+02	1.E+04	3.E+03	5.E+03	6.E+03	3.E+03
	15	2.E+03	2.E+03	3.E+03	2.E+03	5.E+02	2.E+02
	20	7.E+03	5.E+03	1.E+04	8.E+03	4.E+03	2.E+03
	25	1.E+03	5.0E+03	1.6E+03	3.E+03	2.E+03	1.E+03
	30	2.E+04	4.E+03	5.E+03	8.E+03	7.E+03	4.E+03
	35	1.E+04	4.E+03	2.E+04	1.E+04	7.E+03	3.E+03
	40		6.E+03	8.E+04	4.E+04	5.E+04	3.E+04
	45	1.E+05	2.E+04	1.E+05	9.E+04	7.E+04	3.E+04
	50	2.E+05	4.E+04	1.E+05	1.E+05	6.E+04	3.E+04
	55	3.E+04	1.E+05	3.E+05	1.E+05	1.E+05	7.E+04
60	9.E+05	3.E+05	1.E+06	8.E+05	4.E+05	2.E+05	

	tiempo (min)	RÉPLIC A1	RÉPLICA 2	RÉPLIC A 3	PROMEDIO	DESVIACIÓ N	DESV/2
Con Cloroformo	0	3.E+04	2.E+04	2.E+04	2.E+04	3.E+03	1.E+03
	5	2.E+03	1.E+04	4.E+03	6.E+03	5.E+03	2.E+03
	10	2.E+02	2.E+03	3.E+03	2.E+03	2.E+03	8.E+02
	15	3.E+03	2.E+03	3.E+03	3.E+03	5.E+02	2.E+02
	20	1.E+02	2.E+02	2.E+02	2.E+02	4.E+01	2.E+01
	25			2.E+02	2.E+02		
	30	2.E+03	1.E+04	2.E+03	5.E+03	5.E+03	3.E+03
	35	1.E+04	2.E+03	7.E+02	4.E+03	5.E+03	3.E+03
	40	3.E+04	4.E+04	4.E+04	4.E+04	9.E+03	4.E+03
	45		1.0E+03	1.E+05	5.E+04	7.E+04	4.E+04
	50	1.E+05	1.4E+05	2.E+05	2.E+05	6.E+04	3.E+04
	55	1.E+06	1.2E+06	2.E+06	1.E+06	2.E+05	1.E+05
60	1.E+06	4.E+04	2.E+04	4.E+05	7.E+05	3.E+05	

ANEXO N° 8: TABLAS CURVA DE CRECIMIENTO NSC0950 ϕ SWL009

	Tiempo (min)	RÉPLICA1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	PROMEDIO	DESVIACIÓN	DESV/2
Sin Cloroformo	0	2.E+04	6.E+03	2.E+04	1.E+04	6.E+03	3.E+03
	5	3.E+03	6.E+03	7.E+03	5.E+03	2.E+03	1.E+03
	10	3.E+02	5.E+02	1.E+03	7.E+02	5.E+02	2.E+02
	15	3.E+03	9.E+02	3.E+03	2.E+03	1.E+03	6.E+02
	20	2.E+03	6.E+03		4.E+03	3.E+03	2.E+03
	25	1.E+03	3.E+04	1.E+05	5.E+04	6.E+04	3.E+04
	30	3.E+04	2.E+05	4.E+05	2.E+05	2.E+05	1.E+05
	35	3.E+05	2.E+05	3.E+05	2.E+05	7.E+04	3.E+04
	40	2.E+05	2.E+05	5.E+05	3.E+05	1.E+05	7.E+04
	45	4.E+05	2.E+05	3.E+05	3.E+05	1.E+05	5.E+04
	50	9.E+05	2.E+06	1.E+06	1.E+06	4.E+05	2.E+05
	55	1.E+06	2.E+06	3.E+06	2.E+06	8.E+05	4.E+05
60	3.E+06	2.E+06	6.E+06	4.E+06	2.E+06	1.E+06	

	Tiempo (min)	RÉPLICA1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	PROMEDIO	DESVIACIÓN	DESV/2
Con Cloroformo	0	2.E+04	2.E+04		2.E+04	1.E+03	7.E+02
	5	1.E+02	1.E+02	2.E+02	1.E+02	6.E+01	3.E+01
	10	2.E+03	1.E+01	3.E+01	7.E+02	1.E+03	6.E+02
	15	3.E+02		2.E+02	3.E+02	7.E+01	4.E+01
	20	3.E+02	1.E+02	1.E+03	5.E+02	5.E+02	3.E+02
	25	6.E+03	4.E+03	3.E+03	4.E+03	2.E+03	9.E+02
	30	8.E+03		3.E+04	2.E+04	1.E+04	7.E+03
	35	1.E+05	3.E+04	1.E+05	9.E+04	6.E+04	3.E+04
	40	2.E+05	6.E+03	1.E+05	1.E+05	8.E+04	4.E+04
	45	1.E+04		2.E+05	8.E+04	1.E+05	5.E+04
	50	5.E+05	4.E+05	1.E+05	3.E+05	2.E+05	1.E+05
	55	4.E+05	5.E+05	3.E+05	4.E+05	9.E+04	4.E+04
60	6.E+05	7.E+05	8.E+06	3.E+06	4.E+06	2.E+06	

ANEXO N° 9: TABLAS CURVA DE CRECIMIENTO NSI0814 ϕ SWL001

	Tiempo (min)	RÉPLICA1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	PROMEDIO	DESVIACIÓN	DESV/2
Sin Cloroformo	0	2.E+05	2.E+05	2.E+05	2.E+05	4.E+04	2.E+04
	5	6.E+04	5.E+04	3.E+04	4.E+04	2.E+04	8.E+03
	10	4.E+04	3.E+04	3.E+04	3.E+04	6.E+03	3.E+03
	15	9.E+03		8.E+03	9.E+03	6.E+02	3.E+02
	20	1.E+04	2.E+04	8.E+03	1.E+04	6.E+03	3.E+03
	25	2.E+05	3.E+05	1.E+05	2.E+05	6.E+04	3.E+04
	30	4.E+05	5.E+05	3.E+05	4.E+05	1.E+05	7.E+04
	35	7.E+05	7.E+05	4.E+05	6.E+05	2.E+05	8.E+04
	40	9.E+05	2.E+06	1.E+06	1.E+06	4.E+05	2.E+05
	45	2.E+06	2.E+06	1.E+06	2.E+06	5.E+05	3.E+05
	50	4.E+06	4.E+06	3.E+06	4.E+06	8.E+05	4.E+05
	55	9.E+06	1.E+07	6.E+06	9.E+06	4.E+06	2.E+06
60	2.E+07	1.E+07	7.E+06	1.E+07	7.E+06	3.E+06	

	tiempo (min)	RÉPLIC A1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	PROMEDIO	DESVIACIÓN	DESV/2
Con Cloroformo	0	2.E+05	3.E+05	6.E+04	2.E+05	1.E+05	6.E+04
	5	4.E+04	4.E+04	2.E+04	4.E+04	1.E+04	6.E+03
	10	1.E+04	2.E+04	2.E+04	2.E+04	5.E+03	3.E+03
	15	5.E+03	4.E+03	2.E+03	4.E+03	2.E+03	8.E+02
	20	9.E+03	6.E+04	3.E+04	3.E+04	3.E+04	1.E+04
	25	2.E+05	3.E+05	1.E+05	2.E+05	9.E+04	5.E+04
	30	6.E+05	1.E+06	1.E+06	1.E+06	4.E+05	2.E+05
	35	1.E+06	2.E+06	1.E+06	2.E+06	4.E+05	2.E+05
	40	2.E+06	4.E+06	3.E+06	3.E+06	1.E+06	5.E+05
	45	4.E+06	1.E+06	3.E+06	3.E+06	1.E+06	6.E+05
	50	2.E+07	8.E+07	1.E+07	4.E+07	3.E+07	2.E+07
	55	6.E+06	3.E+07	2.E+07	2.E+07	1.E+07	6.E+06
60	5.E+07	6.E+07	2.E+07	4.E+07	2.E+07	1.E+07	

ANEXO N° 10: TABLAS CURVA DE CRECIMIENTO NSC0742 φ SWI002

	Tiempo (min)	RÉPLICA1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	PROMEDIO	DESVIACIÓN	DESV/2
Sin Cloroformo	0	1.E+06	2.E+05	2.E+05	5.E+05	5.E+05	2.E+05
	5	2.E+04	2.E+04	2.E+04	2.E+04	3.E+03	2.E+03
	10	3.E+04	2.E+03	2.E+04	2.E+04	1.E+04	7.E+03
	15	4.E+03	3.E+03	1.E+04	6.E+03	3.E+03	2.E+03
	20	2.E+03	2.E+03	3.E+03	2.E+03	7.E+02	4.E+02
	25	6.E+04	3.E+04	2.E+03	3.E+04	3.E+04	2.E+04
	30	1.E+05	1.E+05	3.E+04	9.E+04	6.E+04	3.E+04
	35	2.E+05	2.E+05	2.E+05	2.E+05	3.E+04	2.E+04
	40	6.E+05	7.E+05	7.E+05	7.E+05	7.E+04	3.E+04
	45	2.E+06	1.E+06	1.E+06	1.E+06	4.E+05	2.E+05
	50	5.E+06	1.E+06	1.E+06	2.E+06	2.E+06	1.E+06
	55	4.E+05	9.E+05	2.E+06	1.E+06	8.E+05	4.E+05
60	2.E+06	1.E+06	2.E+06	2.E+06	5.E+05	2.E+05	

	tiempo (min)	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	PROMEDIO	DESVIACIÓN N	DESV/2
Con Cloroformo	0	8.E+04	5.E+05	9.E+05	5.E+05	4.E+05	2.E+05
	5	8.E+04	6.E+04	1.E+05	9.E+04	4.E+04	2.E+04
	10	6.E+04	6.E+04	6.E+04	6.E+04	5.E+03	3.E+03
	15	3.E+04	1.E+04	2.E+04	2.E+04	7.E+03	4.E+03
	20	9.E+03	1.E+04	1.E+04	1.E+04	2.E+03	1.E+03
	25	3.E+04	2.E+04	1.E+05	5.E+04	5.E+04	2.E+04
	30	6.E+04	9.E+04	1.E+05	8.E+04	3.E+04	1.E+04
	35	2.E+05	1.E+05	2.E+05	2.E+05	5.E+04	2.E+04
	40	4.E+05	4.E+05	1.E+05	3.E+05	2.E+05	8.E+04
	45	2.E+05	4.1E+05	5.E+05	4.E+05	1.E+05	7.E+04
	50	2.E+06	4.1E+05	5.E+05	9.E+05	8.E+05	4.E+05
	55	3.E+06	1.5E+06	8.E+05	2.E+06	1.E+06	6.E+05
60	2.E+06	8.E+05	1.E+07	6.E+06	7.E+06	4.E+06	

ANEXO N° 11: TABLAS CURVA DE CRECIMIENTO NSI0796 ϕ SWI003

	Tiempo (min)	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	PROMEDIO	DESVIACIÓN	DESV/2
Sin Cloroformo	0	5.E+04	2.E+05	4.E+04	8.E+04	6.E+04	3.E+04
	5	3.E+04	2.E+04	3.E+04	3.E+04	6.E+03	3.E+03
	10	3.E+04	1.E+04	2.E+04	2.E+04	7.E+03	3.E+03
	15	8.E+03	4.E+03	1.E+04	7.E+03	3.E+03	2.E+03
	20	4.E+03	5.E+03	7.E+03	5.E+03	1.E+03	7.E+02
	25	2.E+03		3.E+03	3.E+03	9.E+02	5.E+02
	30	3.E+03	1.E+04	8.E+03	7.E+03	4.E+03	2.E+03
	35	2.E+04	1.E+04	2.E+04	2.E+04	3.E+03	1.E+03
	40	1.E+04	6.E+03	1.E+05	4.E+04	6.E+04	3.E+04
	45	1.E+04	2.E+04	2.E+04	1.E+04	3.E+03	1.E+03
	50	3.E+03	8.E+03	2.E+05	5.E+04	8.E+04	4.E+04
	55	8.E+04		9.E+04	8.E+04	9.E+03	5.E+03
60	2.E+04	3.E+04	2.E+05	8.E+04	1.E+05	5.E+04	

	tiempo (min)	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	PROMEDIO	DESVIACIÓ N	DESV/2
Con Cloroformo	0	7.E+04	1.E+05	1.E+05	9.5000E+04	2.E+04	1.E+04
	5	6.E+04	8.E+04	1.E+04	5.0400E+04	3.E+04	2.E+04
	10	3.E+04	2.E+04	4.E+04	2.9500E+04	1.E+04	7.E+03
	15	1.E+04	1.E+04	1.E+04	1.1900E+04	2.E+03	1.E+03
	20	6.E+03	5.E+03	7.E+03	6.1267E+03	9.E+02	4.E+02
	25	2.E+04	2.E+04	2.E+04	1.8500E+04	4.E+03	2.E+03
	30	3.E+04	2.E+04	2.E+04	2.1167E+04	5.E+03	3.E+03
	35	1.E+05	1.E+05	7.E+04	9.4700E+04	3.E+04	1.E+04
	40	1.E+05	1.E+05	7.E+04	1.1003E+05	4.E+04	2.E+04
	45	4.E+04	4.E+04	4.E+04	3.8333E+04	4.E+03	2.E+03
	50	3.E+05	4.E+04		1.4650E+05	2.E+05	8.E+04
	55	6.E+05	7.E+05		6.4850E+05	4.E+03	2.E+03
60	1.E+06		1.E+06	1.2860E+06	1.E+05	7.E+04	

ANEXO N° 12: TABLAS CURVA DE CRECIMIENTO NSI0925 ϕ SWI004

	Tiempo (min)	RÉPLICA1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	PROMEDIO	DESVIACIÓN	DESV/2
Sin Cloroformo	0	1.E+06	1.E+06		1.E+06	2.E+05	9.E+04
	5	1.E+05	5.E+04	1.E+05	9.E+04	4.E+04	2.E+04
	10	6.E+04	1.E+05	8.E+04	8.E+04	3.E+04	2.E+04
	15	6.E+04	9.E+04	6.E+04	7.E+04	2.E+04	8.E+03
	20	5.E+04	2.E+05	8.E+04	1.E+05	6.E+04	3.E+04
	25	2.E+05	1.E+05	5.E+04	1.E+05	1.E+05	5.E+04
	30	2.E+05	2.E+05	2.E+05	2.E+05	2.E+04	8.E+03
	35	1.E+05	1.E+05	4.E+05	2.E+05	2.E+05	8.E+04
	40	2.E+06	1.E+06	8.E+05	2.E+06	8.E+05	4.E+05
	45	3.E+06	3.E+06	1.E+06	3.E+06	1.E+06	5.E+05
	50	6.E+06	5.E+06	7.E+06	6.E+06	1.E+06	5.E+05
	55	6.E+06	7.E+06	5.E+06	6.E+06	9.E+05	5.E+05
60	1.E+07	1.E+07	3.E+06	1.E+07	6.E+06	3.E+06	

	tiempo (min)	RÉPLICA1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	PROMEDIO	DESVIACIÓN	DESV/2
Con Cloroformo	0	7.E+05		1.E+05	3.7650E+05	4.E+05	2.E+05
	5	2.E+05	1.E+05	3.E+05	2.0567E+05	7.E+04	3.E+04
	10	1.E+05	2.E+05	1.E+05	1.3007E+05	4.E+04	2.E+04
	15	8.E+04			8.1500E+04		
	20	9.E+04			8.5300E+04		
	25	2.E+05	8.E+04	2.E+05	1.4300E+05	6.E+04	3.E+04
	30	1.E+05	2.E+05	5.E+05	2.6867E+05	2.E+05	9.E+04
	35	4.E+05	5.E+05	4.E+05	4.3733E+05	7.E+04	3.E+04
	40	5.E+06	4.E+06	2.E+05	3.1657E+06	3.E+06	1.E+06
	45	9.E+06		8.E+06	8.3250E+06	6.E+05	3.E+05
	50	8.E+07	2.E+07	2.E+07	3.9227E+07	4.E+07	2.E+07
	55	4.E+07	5.E+07	5.E+06	3.0537E+07	2.E+07	1.E+07
60	3.E+07	2.E+07	4.E+07	3.0567E+07	1.E+07	5.E+06	

ANEXO N° 13: TABLAS CURVA DE CRECIMIENTO NSI0683 φ SWL006

	Tiempo (min)	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	PROMEDIO	DESVIACIÓN	DESV/2
Sin Cloroformo	0	3.E+05	2.E+05	2.E+05	2.E+05	6.E+04	3.E+04
	5	5.E+04	7.E+04	3.E+04	5.E+04	2.E+04	8.E+03
	10	2.E+04	5.E+04	2.E+04	3.E+04	2.E+04	8.E+03
	15	1.E+04	1.E+04	6.E+03	1.E+04	5.E+03	3.E+03
	20	9.E+03	8.E+03	8.E+03	8.E+03	8.E+02	4.E+02
	25	4.E+04	3.E+04	6.E+04	4.E+04	2.E+04	9.E+03
	30	2.E+05	5.E+04	1.E+05	1.E+05	5.E+04	3.E+04
	35	3.E+05	5.E+05	5.E+05	4.E+05	8.E+04	4.E+04
	40	1.E+06	7.E+05	1.E+06	1.E+06	3.E+05	1.E+05
	45	2.E+06	1.E+06	2.E+06	2.E+06	5.E+05	2.E+05
	50	3.E+06	2.E+06	2.E+06	2.E+06	8.E+05	4.E+05
	55	2.E+06	4.E+06	2.E+06	3.E+06	1.E+06	6.E+05
60	5.E+06	1.E+07	4.E+06	8.E+06	5.E+06	3.E+06	

	tiempo (min)	RÉPLIC A1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	PROMEDIO	DESVIACIÓN	DESV/2
Con Cloroformo	0	3.E+04		4.E+03	1.50E+04	2.E+04	8.E+03
	5	2.E+03	1.E+04	1.E+03	5.00E+03	6.E+03	3.E+03
	10	1.E+03			1.00E+03		
	15		2.E+02	2.E+02	2.00E+02	0.E+00	0.E+00
	20	2.E+03	2.E+03	4.E+02	1.37E+03		
	25	2.E+03	7.E+02	3.E+03	1.67E+03		
	30	1.E+03		2.E+03	1.50E+03	7.E+02	4.E+02
	35	7.E+03	1.E+04	4.E+03	7.00E+03	3.E+03	2.E+03
	40	2.E+04	2.E+04		1.90E+04	3.E+03	1.E+03
	45	2.E+05			1.51E+05		
	50	2.E+04	7.0E+03	4.0E+03	1.10E+04	1.E+04	5.E+03
	55	2.E+04			2.00E+04		
60	2.E+04			2.00E+04			