

AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DE BACTERIÓFAGOS DESTINADOS AL USO EN MEDICINA PERSONALIZADA

Rosso, Victoria

Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-CONCET)

Director/a: Pujato, Silvina

Codirector/a: Briggiler Marcó, Mariángeles

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Fagoterapia, resistencia antimicrobiana, patógenos

INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana es una problemática mundial que amenaza la eficacia de los tratamientos médicos convencionales. La Organización Mundial de la Salud (OMS) advierte que, si no se toman medidas adecuadas, la resistencia antimicrobiana podría resultar en 10 millones de muertes anuales para 2050, superando incluso a las causadas por el cáncer. En Argentina la situación es alarmante. La fagoterapia, basada en el uso de bacteriófagos, se presenta como una alternativa prometedora. Los bacteriófagos, o fagos, son virus que infectan y eliminan bacterias. A diferencia de los antibióticos, los fagos tienen la capacidad de evolucionar y adaptarse a los mecanismos de defensa bacterianos, reduciendo el riesgo de desarrollo de resistencia. Además, su especificidad permite atacar solo las cepas bacterianas problemáticas, sin afectar la microbiota natural del organismo.

OBJETIVOS

Aislar y caracterizar bacteriófagos capaces de lisar cepas de *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*.

Título del proyecto: AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DE BACTERIÓFAGOS DESTINADOS AL USO EN MEDICINA PERSONALIZADA

Instrumento: Capital Semilla

Año convocatoria: 2023

Organismo financiador: Universidad Nacional del Litoral

Director/a: Briggiler Marcó, Mariángeles



METODOLOGÍA

Aislamiento de bacteriófagos

Se tomaron muestras de aguas residuales de las siguientes fuentes: frigorífico de pollos, frigorífico bovino, lagunas y efluentes cloacales. Las cepas hospedadoras utilizadas fueron *Salmonella enterica* subsp. *enterica* OMS-ca (*Salmonella* OMS-ca), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* salmo (*Salmonella* salmo) y *Escherichia coli* DH5α.

Las muestras fueron centrifugadas (5000 rpm, 15 min) y filtradas (0,45 µm, GVS Filtration Inc., Findlay, Estados Unidos) para eliminar restos celulares. La búsqueda de bacteriófagos se realizó mediante dos metodologías: una metodología directa, el método de la doble capa agarizada (Svensson y Christiansson, 1991), y una metodología en medio líquido (test de turbidez) para aumentar la concentración de fagos, seguida del método de la doble capa agarizada. Para el método de la doble capa agarizada, se prepararon placas de agar LB suplementado con calcio y magnesio (10 mM cada uno), y se les añadió una mezcla del cultivo celular, muestra y LB soft agar. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C. Se seleccionaron placas de lisis aisladas que se propagaron en caldo LB-Ca-Mg, y se incubaron hasta lisis completa del cultivo. Estas dos últimas etapas se repitieron dos veces más a fin de asegurar la purificación de los fagos.

Para el test de turbidez, las cepas hospedadoras se inocularon en tubos con medio de cultivo LB y se les añadieron las muestras. Los tubos se incubaron a 37°C, monitoreando la turbidez y comparándola con la de un cultivo control (tubo con cepa pero sin muestra). Se realizaron tres repiques sucesivos en medio fresco para aumentar la concentración de partículas fágicas. La lisis celular se comprobó de manera visual y se confirmó mediante el método de la doble capa agarizada. Se levantaron placas de lisis y se siguió igual metodología que la descripta.

Los fagos purificados se propagaron sobre sus cepas sensibles a los fines de elevar su concentración.

Para determinar la concentración de las partículas fágicas (título) se realizó el método de la doble capa agarizada. La determinación del título correspondiente (UFP/ml: Unidades Formadoras de Placa por ml), fue calculado de la siguiente manera:

Título (UFP/ml) = n° de placas de lisis × fd × 10, donde fd: factor de dilución

Caracterización molecular de los fagos aislados

A partir de suspensiones fágicas de títulos elevados ($1,0 \times 10^8$ UFP/mL), se realizó la extracción del ADN de los fagos de *Salmonella* OMS-ca, *Salmonella* salmo y *Escherichia coli* DH5α mediante fenol-cloroformo (Pujato y col., 2014). El mismo fue digerido con endonucleasas de restricción (EcoRV y EcoRI). Los patrones de restricción fueron capturados con el sistema digital (Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System 290; EDAS 290, Celbio, Milán, Italia) y las imágenes procesadas utilizando el software Bionumerics (Versión 6,0; Applied Maths BVBA, Saint-MartensLatem, Bélgica). Cada patrón distinto fue considerado un fago diferente.

Concentración y semipurificación de fagos

Esta actividad fue realizada solamente para los fagos de *Salmonella* OMS-ca y *Salmonella* salmo. En primer lugar, cada fago se propagó sobre su cepa sensible (volumen 40 mL) en caldo LB a 37°C con agitación y a una dosis infectiva tal que provoque la lisis total de cultivo. El lisado obtenido fue centrifugado (11000 rpm, 10 min) para eliminar las células bacterianas y luego, filtrado (0,22 µm, GVS Filtration Inc., Findlay, Estados Unidos) para obtener un lisado libre de restos celulares y demás

desechos. Se agregó polietilenglicol (PEG) 8000 al 10 % y NaCl 0,5 M, se incubó *overnight* a 4°C y posteriormente se centrifugó (11000 rpm, 1h). Luego, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 500 µl de caldo LB (Luong y col., 2020). Para evaluar la estabilidad/infectividad de los fagos, los mismos fueron alicuotados en el medio de cultivo LB y almacenados a 4°C. A los 60 días se cuantificaron las partículas fágicas mediante el método de la doble capa agarizada y se compararon con las obtenidas al titular los fagos recién propagados sin el método de semipurificación con PEG y NaCl.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Se lograron aislar un total de 14 fagos que infectan la cepa *Escherichia coli* DH5α, de muestras de frigorífico de pollos, frigorífico de bovinos y de efluentes cloacales, y un total de 5 fagos que infectan la cepa *Salmonella* OMS-ca y 5 que infectan la cepa *Salmonella* salmo, de muestras de frigorífico de pollos y de efluentes cloacales. Como puede observarse, no se aislaron fagos de *Salmonella* en los efluentes de frigorífico bovino. Esto tiene sentido, ya que las cepas de *Salmonella* están estrechamente vinculadas con efluentes de pollos y humanos, no así con efluentes bovinos.

Los fagos de *Escherichia coli* resultantes de la purificación fueron 1a1, 1a2, 1a3, 1b1, 1b2, 2a1, 2a2, 2a3, 2b1, 2b2, 4a, 4b, 4c y 4d. Estos demostraron tener la capacidad de lisis la cepa en medio líquido en un tiempo de 4 horas, obteniendo un título de 10^9 UFP/mL aproximadamente. Las placas de lisis de los distintos fagos mostraron diferencias en los tamaños de las placas, en su nitidez, y algunas mostraron un halo de color más claro. Cuando se realizaron los cortes con enzimas, se observaron 5 patrones diferentes: Patrón 1: 1a1, 1a2 y 1a3; patrón 2: 1b1 y 1b2; patrón 3: 2a1, 2a2 y 2a3; patrón 4: 2b1 y 2b2; y patrón 5: 4a, 4b, 4c y 4d.

Por otro lado, los fagos de *Salmonella* resultantes de la purificación utilizando la cepa hospedadora *Salmonella* OMS-ca fueron OMS 1a, OMS 4ac, OMS 4ag, OMS 4bc, OMS 4bg, y los de la cepa hospedadora *Salmonella* salmo fueron: salmo 1ac, salmo 1ag, salmo 1b, salmo 4a y salmo 4b. Estos lograron una lisis parcial en medio líquido de su cepa hospedadora, alcanzando títulos entre 10^7 y 10^8 UFP/mL. Debido a que los títulos de los fagos fueron menores a 10^8 UFP/mL, se realizó una concentración y semipurificación con PEG y se evaluó la infectividad de los fagos concentrados después de 60 días. El PEG permitió concentrar los fagos entre 1 y 2 órdenes, llegando a títulos entre 10^8 y 10^9 UFP/mL. Como puede observarse en la Figura 1, la disminución de los títulos de los fagos fue variable al comparar los fagos concentrados con PEG y los controles sin PEG, reduciendo entre 0,1 y 2,2 órdenes logarítmicos. El fago OMS 1a control y concentrado con PEG presentó mayor estabilidad en el tiempo, disminuyendo solamente 0,2 y 0,1 órdenes logarítmicos, respectivamente, luego de 60 días.

Estos resultados demuestran la efectividad del método de aislamiento y capacidad lítica de los diferentes fagos aislados. Los hallazgos destacan la importancia de la selección adecuada de fagos para aplicaciones específicas, así como la necesidad de optimizar los procedimientos de concentración y almacenamiento para mantener la viabilidad y efectividad de los fagos a largo plazo.

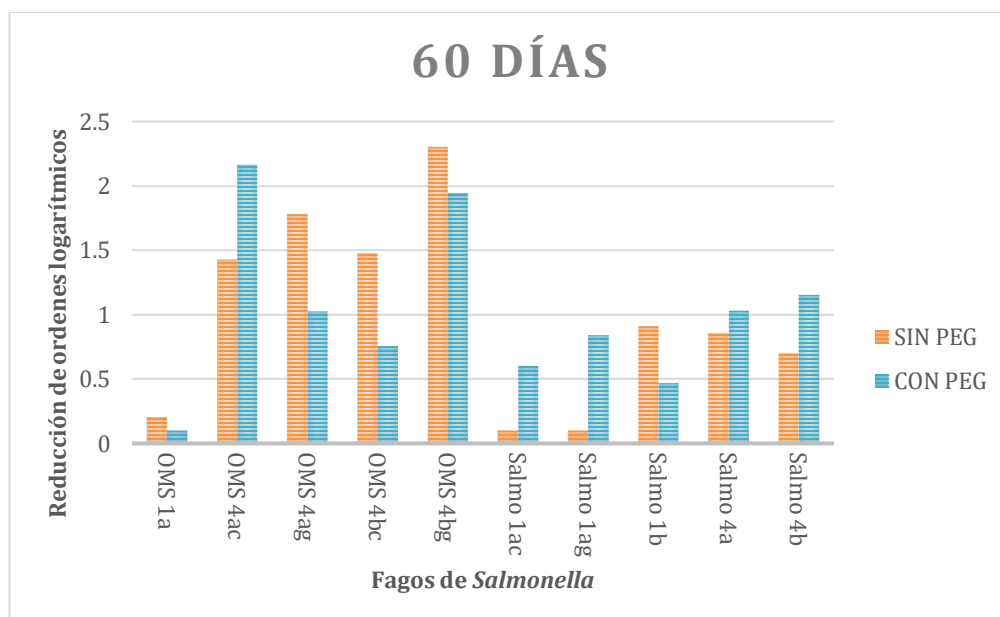


Figura 1: Estudio de infectividad de fagos concentrados con PEG.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Domingo-Calap, P. y col.**, 2020. Isolation of four lytic phages infecting *Klebsiella pneumoniae* K22 clinical isolates from Spain. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 425.
- Luong, T. y col.** 2020. Standardized bacteriophage purification for personalized phage therapy. *Nature protocols*, 15(9), 2867-2890.
- Pujato, S. y col.** 2014. *Leuconostoc* bacteriophages from blue cheese manufacture: long-term survival, resistance to thermal treatments, high pressure homogenization and chemical biocides of industrial application. *International Journal of Food Microbiology* 177, 81-88.
- Schooley, R. T. y col.** 2017. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (10): e00954.
- Svensson, U. y Christiansson, A.** 1991. Methods for phage monitoring. *Bulletin of the International Dairy Federation* 263, 29-39.