

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS ESPECÍFICOS DE
Klebsiella pneumoniae MULTIRRESISTENTE PROVENIENTES DE LAVADOS
SUPERFICIALES OBTENIDOS DE LA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS
NEONATALES DE UN HOSPITAL DE LA CIUDAD CAPITAL**

Informe Final

**Presentado por
Paola Elizabeth Maldonado Scoth**

**Para optar al título de
QUÍMICA BIOLÓGICA**

Guatemala, Abril de 2009

INDICE.

	Páginas
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	3
III. ANTECEDENTES	
1. Contexto histórico	4
2. Definición y características	7
3. Morfología	8
4. Ciclo de replicación	9
5. Aislamiento y cultivo de bacteriófagos	13
6. Cuantificación de bacteriófagos	14
7. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	13
8. Resistencia bacteriana	16
9. Utilidad de bacteriófagos en infecciones Multirresistentes	19
IV. JUSTIFICACIÓN	23
V. OBJETIVOS	24
VI. HIPÓTESIS	25
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	26
VIII. RESULTADOS	34
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	36
X. CONCLUSIONES	38
XI. RECOMENDACIONES	39
XII. REFERENCIAS	40
XIII. ANEXOS	45

I. RESUMEN

Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan específicamente células bacterianas. Esta característica fue utilizada durante algún tiempo para clasificar cepas bacterianas (fagotipificación) y posteriormente se utilizaron como agentes antibacterianos (fagoterapia).

El propósito principal de este estudio fue aislar y preservar bacteriófagos específicos para *Klebsiella pneumoniae* multirresistente de lavados superficiales del área de cuidados intensivos neonatales de un hospital de la ciudad capital.

Para ello se recolectaron las aguas de los lavados de superficies para determinar la presencia de bacteriófagos en las áreas hospitalarias en donde anteriormente se aislaron las cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente.

Por ello se activó el sistema lisogénico, el cual es un ciclo alternativo de los virus para permanecer latente dentro de su hospedero, por medio de una desrepresión génica a través de la exposición con luz ultravioleta.

En total se trabajaron 24 lavados superficiales los cuales fueron obtenidos de manos de personal, carro de curaciones, cunas de pacientes, pisos, puertas, pared, ventanas y mesas del área de cuidados intensivos neonatales con un intervalo de una semana entre cada lavado y fueron enfrentados con cepas de *K. pneumoniae* multirresistente, para verificar la presencia de bacteriófagos específicos para dicha bacteria. Como controles negativos se utilizaron cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

En este estudio no se aislaron bacteriófagos específicos para *K. pneumoniae* multirresistente en el total de las muestras analizadas, la ausencia de los mismos posiblemente se deba al cambio de microbiota hospitalaria, debido al

proceso de desinfección utilizado después de los brotes nosocomiales reportados en el servicio muestreado y que el tiempo de recolección de muestras se realizó en períodos diferentes. Por lo que se recomienda que posterior a la identificación de una cepa multirresistente, se proceda inmediatamente al aislamiento de los bacteriófagos y así obtener una muestra que nos permita aislar agentes virales para el control biológico de las cepas.

Así mismo los cultivos efectuados de las aguas de lavados superficiales evidenciaron la presencia de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y una bacteria Gram positivo, sin identificación posterior, lo que confirma el cambio de microbiota de las salas de cuidados intensivos neonatales.

II. INTRODUCCIÓN.

Los bacteriófagos son virus que infectan específicamente bacterias, se encuentran en desechos humanos y en aguas residuales. Fueron descubiertos en 1915 por el investigador inglés Frederick W. Twort y también de forma independiente, por el científico franco-canadiense Félix H. D'Hérelle en 1917. Desde la década de 1940, las investigaciones con bacteriófagos o fagos, han llevado al establecimiento de los ácidos nucleicos como el material genético de los seres vivos y han resultado fundamentales en el nuevo campo de la biología molecular (1).

La búsqueda y aislamiento de bacteriófagos para *Klebsiella pneumoniae* multirresistente en Guatemala ha sido escasa por lo que es importante para iniciar el desarrollo de nuevas investigaciones sobre fagos. Esta propiedad podría ser utilizada para fagotipificación (identificación de cepas bacterianas por medio de bacteriófagos) y fagoterapia (tratamiento de infecciones con la administración de soluciones de bacteriófagos a concentraciones conocidas) como se ha realizado en otros países (1).

El presente estudio fue dirigido a obtener bacteriófagos específicos para cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes aisladas de cultivos orotraqueales, coprocultivos, superficies y manos del personal de salud de la unidad de cuidados intensivos neonatales de un hospital de la ciudad capital, en donde se efectuaron de lavados superficiales en suelos, paredes y áreas cercanas a las cunas del lugar donde se aislaron las cepas, buscando bacteriófagos específicos para *Klebsiella pneumoniae* multirresistente.

III. ANTECEDENTES

A. Historia

El estudio de los bacteriófagos inicia en 1896 con el científico Hankin quien reportó que las aguas de los ríos Ganges y Jumna en la India tenían un marcado poder antibacteriano; el estudio se basó particularmente en los efectos que presentaba el agua de los ríos sobre *Vibrio cholerae*, llegando a la conclusión que la ingestión del agua de estos ríos podía evitar los brotes epidémicos de cólera (1).

El estudio de los bacteriófagos quedó suspendido hasta que en los años 1915 y 1917 los científicos Edward Twort y Felix D'Herelle independientemente reportaron el aislamiento de un agente filtrable, capaz de destruir los cultivos bacterianos y producir pequeñas áreas claras denominada lisis. Fue D'Herelle quien descubrió que el filtrado de las evacuaciones fecales de un paciente convaleciente de disentería bacilar lisaba los cultivos jóvenes de *Shigella dysenteriae*. Tales descubrimientos proporcionaron la evidencia de que los bacteriófagos tienen acción lítica frente a hospederos ampliamente diseminados en el reino bacteriano (2,3).

Años después en 1950, André Lwoff realizó experimentos con una cepa lisogénica pura de *Bacillus megaterium*, observando microscópicamente su división y a partir de ello removió una de las células hijas utilizando medios de cultivo. Este proceso fue repetido varias veces, hasta que la célula hija fue sembrada en agar para determinar su origen lisogénico y la presencia de un bacteriófago en el medio de cultivo (3).

Los descubrimientos realizados por Lwoff demostraron que las bacterias lisogénicas pueden crecer y dividirse sin liberar fagos al medio de cultivo. Sin embargo, por alguna razón desconocida, algunos filtrados obtenidos a partir de

extractos de bacterias lisogénicas mostraban la presencia de fagos; dedujo también que en las cepas lisogénicas el fago se encuentra en forma de un precursor no infeccioso al que denominó *profago* (3).

Lwoff y colaboradores observaron que la lisis de algunas bacterias lisogénicas ocurría cuando eran estimuladas para producir fagos. Estas observaciones los llevaron a estimular bacterias por medio de irradiación con luz ultravioleta (UV), obteniendo como resultado que las bacterias lisogénicas eran capaces de inducir la producción de fagos, las cuales eran lisadas en la medida que se incrementaba la concentración de fagos liberados al medio de cultivo. Por lo tanto, una bacteria lisogénica posee la capacidad de heredar el fago a sus descendientes, muy pocos de los cuales se lisarán en forma espontánea. Sin embargo, la mayor parte de la progenie de una bacteria lisogénica puede ser inducida a producir el fago por medio de la irradiación con UV o tratamiento con otros factores inductores. A este tipo de mecanismo que utilizan los bacteriófagos se le denominó *temperados*, que son capaces de existir en forma de profago en el interior de una bacteria hospedera sin ser reconocido como tal, ya que se encuentra formando parte de ácidos nucleicos específicos y proteínas, que darán origen a nuevos fagos al momento que la bacteria se lise (3).

Un año más tarde Esther Lederberg de forma accidental mezcló cepas de *E. coli* K12 no lisogénica con derivados lisogénicos, obteniendo cepas de *E. coli* K12 lisogénicas. El mismo año, Joshua Lederberg y Zinder mezclaron dos cepas de *Salmonella*, cada una con un juego distinto de marcadores genéticos, obteniendo como resultado cepas recombinantes. Gracias a ello descartaron que se tratara de transformación, ya que los resultados eran similares si añadían la enzima DNasa al sistema (3).

Para comprobar que su hipótesis era cierta, Lederberg y Zinder realizaron un experimento utilizando un tubo en forma de "U" con una membrana separando los dos brazos de la U, en cada uno de los cuales colocaron una de las cepas. La membrana impedía el paso de bacterias y los contactos directos entre las dos

cepas, obteniendo como resultado recombinantes. Este experimento descartó la posibilidad de conjugación. En base a su descubrimiento los científicos postularon la teoría que debía de existir un agente filtrable resistente a las nucleasas y responsable de la transferencia genética (3).

Después de las anteriores investigaciones, Rusia fue uno de los países más interesados en la investigación de bacteriófagos, pero con la desintegración de la Unión Soviética y los conflictos sociopolíticos del país, la información obtenida de sus estudios no fue publicada ni archivada adecuadamente, por lo que existe poca documentación sobre el tema (1,2).

La utilización de los bacteriófagos en base a las investigaciones de científicos como Hankin, Twort, D'Herelle, Lwoff, Lederberg y Zinder fue en primera instancia medicinal, ya que por medio de ellos se podían curar enfermedades como: disentería, tifus, paratífus, cólera e infecciones del tracto urinario. Seguidamente los bacteriófagos fueron utilizados para identificación bacteriana, cuyo proceso es llamado actualmente fagotipificación (1,4).

B. Estudios realizados en el Guatemala

El estudio de bacteriófagos en Guatemala dio sus primeros pasos en 1976, cuando Zelada Moreira realizó la fagotipificación de *Staphylococcus aureus*, aislado de pacientes recién nacidos de dos hospitales de Guatemala; dicho estudio proporcionó resultados importantes en la infección neonatal por *S. aureus*, ya que dio a conocer que en las primeras 36 horas de vida, los bacteriófagos de tipo lítico pueden llegar a evitar la infección y se encuentran principalmente en el cordón umbilical (5).

Fue hasta en el año 2003 que se continuó a nivel nacional con los estudios sobre bacteriófagos; este año Florian obtuvo tres bacteriófagos específicos para cepas de *Escherichia coli* diarreogénicas implicadas en casos infantiles del área rural de Guatemala. Los fagos fueron recuperados de filtrados de los ríos: las

Vacas (zona 16) y Villalobos (zona 12), los cuales son utilizados como vertederos de desechos orgánicos. La importancia de este estudio radicó en identificar cambios morfológicos en las colonias bacterianas debido a la integración del genoma bacteriano con el genoma del bacteriófago (6).

En el mismo año Vossberg realizó estudios sobre aislamiento de bacteriófagos específicos para *Klebsiella oxytoca* multirresistente; para el propósito utilizó filtrados de los ríos las Vacas (zona 16) y Villalobos (zona12) de la ciudad de Guatemala y también de aguas de lavado superficiales de un hospital de la ciudad capital, sin lograr aislar bacteriófagos específicos para esta bacteria (7).

C. Definición y características

1. Definición

La palabra “fago” proviene del griego *phagein* que significa comer, por lo tanto los bacteriófagos son virus que “comen” bacterias; como son virus, su material genético necesita de los cromosomas bacterianos para poder reproducirse y mantener su especie, ya sea, formando parte del genoma bacteriano o provocando lisis para liberar nuevos bacteriófagos (8).

2. Características

Poseen material genético (genoma), el cual puede ser Ácido Ribonucléico (ARN) o Ácido Ácido Desoxiribonucléico (ADN.) Los bacteriófagos al igual que los virus, se pueden identificar según la estructura de su material genético, los bacteriófagos MS2 y Q β presentan únicamente ARN de cadena simple, el bacteriófago phi 6 es ARN de doble cadena. Los bacteriófagos de ADN de cadena simple son phi X174, fd, y M13 y ADN de doble cadena presente en los bacteriófagos T3, T7, lambda, T5, Mu, T2 y T4 (9).

D. Morfología

La morfología de los bacteriófagos varía según la especie, pero al observarlos al microscopio electrónico, todos presentan una estructura básica que puede ser poliédrica o filamentosa. Los bacteriófagos están protegidos por una cubierta proteica denominada nucleocápside, la cual está formada por subunidades llamadas capsómeros, ésta cubierta principal puede poseer una envoltura lipoprotéica, todas ellas en conjunto proporcionan la especificidad y morfología de cada bacteriófago (1, 10).

Los bacteriófagos presentan seis tipos morfológicos según sus componentes estructurales:

- Grupo 1: compuesto por los bacteriófagos más complejos, ya que están formados por una cabeza poliédrica, cola rígida con vaina contráctil y fibras caudales.
- Grupo 2: carecen de vaina contráctil, su cola es flexible y pueden o no tener apéndices terminales.
- Grupo 3: se caracterizan por poseer cabeza poliédrica más larga que la cola, la cual no es contráctil y puede tener o no apéndices.
- Grupo 4: poseen una estructura poliédrica con un capsómero grande en cada vértice y algo muy característico es que no poseen cola.
- Grupo 5: lo conforman los bacteriófagos en forma de poliedro simple, sin los grandes capsómeros del grupo anterior.
- Grupo 6: son los bacteriófagos más simples que existen, ya que su estructura consiste únicamente en un filamento sencillo y largo, sin cabeza u otra estructura (Anexo 1)(2).

E. Ciclo de replicación

Los bacteriófagos poseen diferentes fases para dar origen a nuevos bacteriófagos (8).

Dichas fases en el proceso de replicación de un bacteriófago pueden ser resumidas en dos etapas:

- La primera etapa se refiere a la multiplicación dentro de una bacteria infectada, lo cual lleva como resultado la muerte de dicha bacteria, a esta etapa se le llama fase Lítica.
- En la segunda etapa el genoma del bacteriófago puede pasar de generación en generación dentro del genoma de la bacteria, a este fenómeno se le conoce como fase lisogénica, hasta que por algún estímulo el genoma del bacteriófago es activado, dando como resultado la producción de nuevos bacteriófagos que lisarán a la bacteria para poder infectar a otras bacterias de la misma especie que les dio origen (Anexo 2)(8-12).

El ciclo de replicación de los bacteriófagos puede dividirse esquemáticamente en distintas etapas tales como: fijación, penetración, replicación del material genético, síntesis de proteínas virales, ensamblaje, lisis o lisogenia y transducción. A continuación se describen los acontecimientos que suceden en cada etapa (Anexo 2)(11).

1. Fijación

Como primera etapa se encuentra la fijación, en ésta el bacteriófago se fija a componentes de la superficie celular que actúan como receptores específicos, (proteínas, carbohidratos, glicoproteínas, lípidos lipoproteínas o complejos formados por éstos), por lo tanto, un bacteriófago sólo puede fijarse a un número

limitado de cepas bacterianas que contengan un determinado receptor.(Anexo 3)(8-11)

2. Penetración

Cuando el bacteriófago ha reconocido a un receptor específico, se produce un cambio de configuración en las proteínas de la placa basal, dando como resultado un tipo de actividad enzimática que provoca un poro en la membrana citoplasmática de la célula; al estar abierto el poro la vaina del fago se contrae y el material genético ingresa en la célula. Debido a que el poro no es lo suficientemente grande y que el bacteriófago ya introdujo lo más importante, el material genético, la envoltura proteica queda en el exterior ya que no contiene elementos que puedan servir para la replicación del fago (Anexo 3) (8-12).

3. Replicación del material genético viral

Como el material genético ya ingresó en la bacteria, ésta última presenta mecanismos de defensa para evitar que el material genético se combine, para ello los bacteriófagos contienen bases modificadas por glicosilación y/o metilación que evitan la degradación por nucleasas. El bacteriófago por medio de estas modificaciones puede hacer uso del genoma bacteriano para sintetizar proteínas que puedan reparar el poro de la membrana y así evitar el ingreso de material genético de otros bacteriófagos. Las proteínas que acaban de ser sintetizadas por el bacteriófago degradan el ADN bacteriano, dando como resultado precursores que serán utilizados para la síntesis de proteínas útiles al bacteriófago. La forma de replicación del genoma del bacteriófago es dependiente del tipo de material genético, si es ARN o ADN simple o doble cadena (8-12).

4. Síntesis de las envolturas proteicas

La replicación de los bacteriófagos involucra la síntesis de sus componentes fundamentales intracelulares, aprovechando la maquinaria metabólica celular. La síntesis de ácido nucleico y proteínas virales se realiza en forma análoga a la célula. La información genética de toda célula viva está contenida en el ADN, y puede ser transferida a los descendientes mediante su duplicación; la expresión de la información genética requiere la transcripción del ADN a ARN mensajero, que luego se traduce en los ribosomas celulares, donde tiene lugar la síntesis de proteínas de la envoltura (cápside, vaina, fibras). Normalmente durante la síntesis de proteínas el mensaje es leído desde el primer codón de iniciación AUG en forma continua. Sin embargo esta continuidad puede ser interrumpida por la inserción o delección de bases lo que produce un cambio en el marco de lectura con la aparición de un codón de término. Por este mecanismo los virus aumentan el número de proteínas a partir de la misma información genética. Algunas proteínas virales, como las de la envoltura, pueden ser modificadas posteriormente por glicosilación, fosforilación o acilación antes de alcanzar el sitio de ensamblaje. Otras proteínas sintetizadas como poliproteínas deben ser procesadas por proteasas virales o celulares. La pared y membrana celular cumplen una función importante en esta parte del ciclo, ya que de ahí se forman las proteínas que darán origen a las envolturas proteicas dependiendo del tipo de virus a formar (8,9,11,12).

5. Ensamble

La célula bacteriana ha sido modificada completamente, ya se formaron las estructuras víricas necesarias para formar nuevos bacteriófagos, inicia entonces lo que se conoce como ensamblaje, esto consistió en la formación de un rompecabezas en donde el material genético de los nuevos bacteriófagos es empaquetado en la cabeza, a su vez, ésta se une a la cola y las fibras se añaden luego para dar origen a nuevos fagos completamente listos para infectar nuevas bacterias (8,9).

6. Lisis celular y liberación de las partículas virales

La secuencia continúa con la codificación de una enzima lítica (por parte de los nuevos fagos), cuya función al peptidoglicano de la célula bacteriana, para que ocurra una lisis celular que dará como resultado la salida o liberación de fagos (8,12).

7. Lisogenia

La etapa de replicación de los bacteriófagos fue descubierta a principios de los años cincuenta. Se observó en base a los experimentos mencionados con anterioridad, que los bacteriófagos son capaces de adsorberse a las bacterias lisogénicas, es decir, que el fago, únicamente se fija, penetra su material genético, toma el control de las organelas bacterianas, pero no produce síntesis de proteína ni se ensambla, por lo tanto, pasa a formar parte del genoma bacteriano, sin causar lisis. Esto provoca que la bacteria cambie algunas funciones y presente otros mecanismos que ayuden a mantener y transmitir la información genética del fago. Tales mecanismos pueden provocar que ocurra replicación del genoma bacteriano al mismo tiempo que el vírico (8,9,11,12).

8. Transducción

La transferencia del material genético del bacteriófago puede transmitirse de una generación bacteriana a otra por medio de partículas fágicas que contienen ADN genómico de la bacteria donadora, a este proceso se le conoce como transducción, el cual consta de dos etapas diferenciadas:

- Formación de la partícula fágica transductora: ésta partícula se forma de una serie de material genético de la bacteria donadora que se introduce en el interior de la cabeza de un bacteriófago, éstas partículas transductoras son en cierta manera subproductos anómalos del ciclo normal del bacteriófago (Anexo 4) (8,9,11,12)

- Inyección del material genético a la nueva célula receptora: La partícula transductora inyecta de forma habitual el ADN que porta a la bacteria receptora, donde este ADN puede eventualmente recombinarse y expresar su información (Anexo 4) (8,9,11,12).

F. Aislamiento y cultivo de bacteriófagos

Para cultivar y aislar bacteriófagos es necesario contar con un cultivo bacteriano joven, es decir, bacterias en desarrollo activo en caldo o en placas de agar. Para identificar si un bacteriófago causa lisis en un cultivo líquido, se observa desde enturbimientto hasta aclaración del cultivo, mientras que en las placas de agar, las zonas claras son visibles a simple vista (6).

Si se desea investigar bacteriófagos, la mejor manera de recolectarlos es en el hábitat de la bacteria hospedera, por ejemplo, en el presente estudio los fagos específicos de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente, se pueden aislar con mayor grado de éxito en aguas provenientes de superficies del lugar donde serán aisladas las bacterias, o bien, de aguas de ríos utilizados como vertederos de desechos orgánicos o provenientes de aguas del drenaje (6).

La técnica de los lavados superficiales se realiza limpiando el área de un metro cuadrado con una esponja que contenga agua estéril, se recolecta en un recipiente adecuado y seguidamente se filtra utilizando para ello filtros de nitrocelulosa de 0.45 micras, ya que estos filtros retienen todo tipo de bacterias y sólo dejan pasar virus (7).

La técnica para recolectar bacteriófagos de aguas de desecho se diferencia de la anterior en que, se recolecta una cantidad de agua en recipientes estériles, sin utilizar esponja; se utiliza el mismo tipo de filtro para obtener una solución que contenga únicamente virus. El agua de desecho posee un alto contenido de bacteriófagos específicos para *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. *Enterobacter* sp. y

Citrobacter sp. permitiendo su utilización como control positivo para la búsqueda de bacteriófagos en los filtrados de drenaje (12 -15).

Al obtener los lavados superficiales o los de aguas de desecho que pasan a ser las muestras donde se obtienen bacteriófagos, éstas pueden ser transportadas en cadena en frío a 4° C sin que sufran ninguna alteración (13).

Para que el método de aislamiento de bacteriófagos sea estandarizado, se ha sugerido un volumen de 20 microlitros del material filtrado, el cual se deposita en una capa de agar nutritivo enriquecido con cloruro de sodio o cloruro de magnesio con el objetivo de evitar la repulsión electrostática entre el bacteriófago y sus receptores en la célula hospedera. Como se describe con anterioridad, para el aislamiento e identificación de bacteriófagos el medio debe estar previamente inoculado con una población de bacterias en división activa. Es necesario incubar durante 24 horas antes de observar los resultados. Los resultados positivos se observarán como zonas de lisis sobre el crecimiento bacteriano; dicha zona de lisis recibe el nombre de placa lítica. Por medio del recuento de éstas placas se puede determinar el número de unidades formadoras de placas por mililitro de suspensión (UFP/ml), puesto que las placas son resultado de la infección de una partícula fágica (13).

1. Cuantificación de bacteriófagos

a. Ensayo en placa

El ensayo en placa también permite el aislamiento de cepas puras de bacteriófagos, ya que si una placa ha surgido de un bacteriófago único, todos los bacteriófagos de las placas son probablemente idénticos desde el punto de vista genético. Algunos de los bacteriófagos de esta placa pueden ser recogidos e inoculados en un cultivo bacteriano fresco para establecer una línea pura del virus. El desarrollo de la técnica del ensayo en placa fue tan importante para el avance

de la virología, como el desarrollo de los medios sólidos por Koch para el de la bacteriología (Anexo 5) (8).

G. Características de *Klebsiella pneumoniae*.

Las características de esta bacteria son muy interesantes para su estudio utilizando bacteriófagos, ya que es la bacteria oportunista más importante en el humano. Fue conocida inicialmente en los laboratorios clínicos como *Bacillus mucosus capsulatus* o bacilo de Friedländer. Es un microorganismo anaerobio facultativo, característica que le permite crecer en cualquier órgano o cavidad dentro del ser humano (16).

1. Morfología

Al observarla al microscopio, *Klebsiella pneumoniae* tiene forma de cocabacilo con un tamaño de 0.5 a 1.5 micras por 1 a 2 micras. Puede presentarse en pares, es gram negativo y al mismo tiempo tiende a confundirse con otros microorganismos tales como los diplococos del neumococo (16-18).

2. Serotipos

Realmente *K. pneumoniae* ha ido transformándose paulatinamente para adaptarse a las condiciones externas, por lo que se han identificado un total de 5 antígenos "O" y 72 antígenos polisacáridos capsulares K. La combinación de los antígenos "O" con los antígenos polisacáridos capsulares proveen de diferente patogenicidad a la bacteria, por lo que los antisueros específicos del tipo K han sido utilizados para determinar la epidemiología de las infecciones causadas por esta bacteria adquirida de manera nosocomial. Este tipo de infecciones representan más de dos tercios de las infecciones a nivel hospitalario (18).

3. Cultivo

Esta bacteria se desarrolla fácilmente en todos los medios de cultivo usuales de laboratorio, produciendo después de veinticuatro horas de incubación, colonias blancogrisáceas de tamaño mediano, con aspecto mucoso, semilíquido característico. Una de las formas empíricas de identificarla es tocar una colonia con un asa, separándola cuidadosamente se puede observar un filamento delgado de material mucoide de varios milímetros de largo, que van desde la colonia hasta el asa (16,17, 20,21).

4. Patología

K. pneumoniae es una bacteria que se encuentra en la nasofaringe en el 5 % de los individuos sanos, a pesar de ello se ha encontrado como microorganismo asociado en enfermedades de los pulmones, bronquios, aparato genitourinario, conducto gastrointestinal, hígado, vías biliares, piel, vagina y útero entre otros órganos. La patología más común causada por dicha bacteria es la neumonía, que se caracteriza por un esputo espeso, gelatinoso y, una elevada densidad de población bacteriana; ésta última característica patológica causa frecuentemente abscesos de pulmón que requieren resección quirúrgica (8).

Según el documento Memoria de Informática y vigilancia epidemiológica publicado por el Ministerio de Salud y Asistencia Social, el área de pediatría ocupa el primer lugar en cuanto a infecciones nosocomiales, por lo que es de suma importancia estudiar cuáles son los microorganismos causantes de estas enfermedades y si existe en su entorno y mecanismo natural para disminuirlas o evitarlas. (Anexo 6) (22).

H. Resistencia bacteriana

Resistencia a antimicrobianos se puede definir como la capacidad adquirida de un organismo de resistir los efectos de un agente quimioterapéutico al que es susceptible habitualmente (8, 20-21,23).

La utilización de antibióticos o drogas antimicrobianas fue un gran avance en la medicina, ya que a través de ellos fue posible controlar las infecciones bacterianas. Sin embargo, las bacterias han modificado cierto tipo de estructuras, y creado mecanismos para evitar que los antibióticos terminen con su especie, es así como aparece lo que se conoce como resistencia bacteriana. Estas modificaciones han provocado que las infecciones bacterianas se hicieran mas fuertes día a día (20,21).

Esta resistencia antimicrobiana se debe especialmente a genes que se transfieren por intercambio genético, así mismo este mecanismo de resistencia ocasionalmente puede transferirse a otros microorganismos de otros géneros y especies (8).

El tema de la resistencia antimicrobiana en nuestro país, es cada día más importante, por el apareamiento de cepas bacterianas multirresistentes debido a la prescripción arbitraria de los antibióticos, incluyendo su uso innecesario y automedicación, lo cual causa un problema de salud muy severo, ya que se aumenta el número de días de estancia de pacientes en hospitales, lo que favorece en cierta medida el apareamiento de infecciones nosocomiales. Se hace necesario que se fomente y fortalezca la vigilancia de la resistencia antimicrobiana y de esta manera tomar acciones que permitan un manejo más adecuado de este problema (16-18,23-24).

1. Mecanismos de resistencia

La evolución bacteriana ha provocado que estos microorganismos adquieran mecanismos de resistencia, la mayoría de ellos dependiendo de su género y especie, a continuación se describen tales mecanismos:

- Impermeabilidad del microorganismo al antibiótico, por ejemplo, la mayoría de las bacterias gram negativo son impermeables a la penicilina G.
- Alteración del antibiótico inactivándolo, por ejemplo, la producción de β -lactamasas que rompen el anillo β -lactámico de la mayoría de las penicilinas.
- Modificación del receptor del antibiótico.
- Cambio genético, el cual provoca que una ruta metabólica bloquee al antimicrobiano
- Reflujo a través del bombeo del antibiótico hacia fuera
- Codificación genética, por medio de cromosomas y/o plásmidos (Anexo 7) (18-20, 24).

2. Resistencia antibiótica de *Klebsiella pneumoniae*

Actualmente no es raro aislar bacterias resistentes a varios antibióticos, la resistencia de estos aislamientos se debe en gran medida a mutaciones en genes cromosómicos. Para el caso específico de *K. pneumoniae* la resistencia adquirida hacia los antibióticos, en su mayoría es de carácter genético, ya que, posee un tipo de estructuras llamadas Plásmidos R, que simple y sencillamente son genes de resistencia hacia antibióticos (8).

Estos genes de resistencia llamados Plásmidos R poseen dos formas de actuar contra los antibióticos; la primera de ellas se debe a la codificación de nuevas enzimas que inactivan antibióticos; la segunda es la codificación de enzimas que impiden la incorporación del antibiótico a la membrana celular

bacteriana, de esta manera el antibiótico es bombeado fuera de la célula (8,19,20,24).

Las enzimas recientemente codificadas son capaces de modificar antibióticos por medio de reacciones químicas como: fosforilación, acetilación o adenilación. Este tipo de reacciones depende del antibiótico que ataque a la bacteria, por ejemplo, en el caso del cloranfenicol, la enzima provoca reacciones de acetilación hacia el antibiótico, de esta manera lo inactiva completamente (8,19,20,24).

Para el caso específico de las penicilinas, los plásmidos R forman penicilinasas (β -lactamasa), que rompe el anillo β -lactámico, inactivando al antibiótico (8,19,20,24).

La presencia de plásmidos R en *K. pneumoniae* está provocando que dicha bacteria sea resistente a más de tres antibióticos (multirresistencia), como penicilina, cefalotina, ampicilina y carbenicilina (25, 26-30).

I. Utilidad de los bacteriófagos en las infecciones multirresistentes

1. Fagotipificación

Por definición fatipificación es la clasificación de una bacteria determinada con base a la presencia de receptores bacterianos específicos en la superficie de la pared celular, los cuales permiten que un bacteriófago específico se fije a la bacteria, penetre y multiplique dentro de ella destruyéndola eventualmente. Estos receptores de superficie no están relacionados con la respuesta inmune (7,8,25,31-33).

La fagotipificación es justamente un marcador utilizado como un método de clasificación epidemiológica que permite reconocer algunas características de bacterias específicas. La clasificación epidemiológica por medio de fagotipificación

es una herramienta utilizada para la descripción de la distribución de un determinado agente infeccioso dentro de una población (33).

2. Fagoterapia

Fagoterapia se define como el uso de bacteriófagos como agentes terapéuticos en enfermedades causadas por bacterias (34,35).

El uso de bacteriófagos, como agentes terapéuticos se remota a su descubrimiento a principios del siglo pasado. La aparición generalizada de resistencias bacterianas frente a los antibióticos unidos a los avances tecnológicos que permiten la preparación de bacteriófagos purificados y un mejor conocimiento molecular de los mismos ha llevado a reconsiderar los trabajos realizados en la antigua Unión Soviética y a proponer el uso de los bacteriófagos, como una auténtica alternativa terapéutica (1,4,34).

El organismo humano, está acostumbrado al contacto con los bacteriófagos ya que son consumidos regularmente en los alimentos, son colonizadores habituales del intestino humano y son muy abundantes en el medio ambiente. De aquí que no resulte extraño que los bacteriófagos no produzcan graves efectos inmunológicos sobre los animales (35).

Desde el descubrimiento de los bacteriófagos, hasta los años cuarenta del siglo pasado, estos organismos se usaron, en muchas ocasiones con éxito, para combatir diversas enfermedades infecciosas (35).

Varios investigadores polacos del Instituto Hirszfield, fundado en 1923, han proporcionado datos convincentes sobre el tratamiento de 550 casos de infecciones bacterianas supurativas (enfisemas, peritonitis, osteomielitis y otras) en humanos. Se trataba en su mayor parte de casos crónicos en los que estaban implicadas bacterias resistentes a casi todo el arsenal de antibióticos que se

disponía. Entre estos microorganismos se encuentran: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *E. coli*. Sulakvelizde y colaboradores han documentado curaciones en un 90% de los casos puesta de manifiesto por el cese de las supuraciones y en la cicatrización de heridas y fístulas (35).

Debido a que los receptores bacterianos son específicos para cada tipo de fago, éstos pueden ser seleccionados como un antídoto de aguas negras, heces, suelo o polvo. Comparado con los antibióticos químicos, los bacteriófagos ofrecen varias ventajas (1,4,36).

- a. Impacto limitante: a diferencia de los antibióticos, los bacteriófagos se autoreplican y se autolimitan ya que se replican exponencialmente mientras que las bacterias están disponibles en abundancia, al disminuir la cantidad de bacterias, el número de fagos declina también y son gradualmente eliminados del paciente y del ambiente (1,4,36).
- b. Desarrollo de resistencia limitada: las bacterias pueden desarrollar resistencia a los fagos, sin embargo, los fagos tienen muchas mutaciones durante su replicación, ellos pueden competir con las adaptaciones de la bacteria y desarrollar por lo tanto, una limitación a la resistencia (1,4,36).
- c. Blancos específicos: el tratamiento con antibióticos químicos a menudo causa un desbalance bacteriano y puede llevar a una infección secundaria con *Pseudomonas* sp., o *Clostridium difficile*, las cuales causan una severa diarrea e infecciones del colon. Pero los bacteriófagos tienen como blanco una bacteria en particular siendo más específicos que los antibióticos químicos, por lo tanto, causan menos daño en la microbiota normal intestinal (1,4,36).

Actualmente se dispone de medios adecuados para conseguir preparaciones de bacteriófagos altamente purificados y los países occidentales han comenzado a mirar con un cierto interés el empleo de bacteriófagos en terapia clínica y en el tratamiento de alimentos (35).

Así, cabe citar su uso para el biocontrol de *E. coli* O157, asociada a la producción de colitis hemorrágica, por eliminación de la microbiota bacteriana de los vegetales frescos y se han usado bacteriófagos en ensayos sobre *Enterococcus* sp. altamente resistente a vancomicina, el antibiótico que representa el último recurso en enfermedades nosocomiales (35).

Por ahora se trata solo de una alternativa terapéutica en ciernes pero la emergencia global de resistencias en patógenos bacterianos ha llevado a reevaluar el potencial de los bacteriófagos en el tratamiento de esas infecciones (35).

IV. JUSTIFICACIÓN

La búsqueda y aislamiento de bacteriófagos para *K. pneumoniae* es importante ya que al obtenerlos se pueden utilizar para fagotipificación (identificación de cepas bacterianas por medio de bacteriófagos) y fagoterapia (tratamiento de infecciones con la administración de soluciones de bacteriófagos a concentraciones conocidas). A través de ello se puede evitar la resistencia antimicrobiana y la disminución de líneas celulares, indispensables para la inmunidad de los pacientes, ya que los bacteriófagos actúan única y exclusivamente en bacterias.

Debido a los mecanismos de resistencia de *K. pneumoniae* y al aumento de infecciones neonatales en los hospitales nacionales, es de suma importancia la búsqueda de nuevas metodologías, que en el futuro puedan ser útiles para disminuir el riesgo de infección de éste tipo de pacientes.

Este estudio permitirá demostrar la existencia de bacteriófagos específicos para *K. pneumoniae* multirresistente, relacionando a los virus como agentes capaces de destruir cepas multirresistentes autóctonas, como en el caso de *K. pneumoniae*, con lo cual se ampliará el campo del estudio de la lisis de cepas multirresistentes por medio de fagos y permitirá al hospital del cual se aíslen tener otras opciones en cuanto a limpieza y tratamientos.

V. OBJETIVOS

A. GENERAL

Obtener y aislar bacteriófagos específicos para *K. pneumoniae* multirresistente obtenidos de lavados de superficies en suelos, paredes y en áreas cercanas a las cunas, en la sala de cuidados intensivos neonatales de un hospital de la ciudad capital.

B. ESPECÍFICOS

1. Determinar la proliferación de bacteriófagos por medio del enfrentamiento de cepas de *K. pneumoniae* con los fagos aislados, mediante la observación de placas de lisis.
2. Conservar los bacteriófagos obtenidos en condiciones ideales para ser utilizados en investigaciones posteriores.
3. Determinar el tipo replicación del bacteriófago aislado por medio de luz ultravioleta.

VI. HIPÓTESIS

El presente es un estudio de tipo explorativo, con muestreo a conveniencia, no aleatorio, por lo cual no requiere hipótesis.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS.

A. Universo

Bacteriófagos específicos para *K. pneumoniae* multirresistente.

1. Muestra

Bacteriófagos aislados de lavados superficiales en suelos, paredes y áreas cercanas a las cunas del lugar donde se aísla la cepa de *K. pneumoniae* multirresistente.

B. Recursos

1. Humanos

Investigador: Br. Paola Elizabeth Maldonado Scoth

Asesor: Lic. Juan Ernesto Vossberg Ordóñez

2. Institucionales.

Hospital Nacional de la Ciudad de Guatemala, en donde se realizará el muestreo.

SUMILAB Laboratorio de análisis en Quetzaltenango

C. Materiales.

1. Material biológico

- Cepas de *K. pneumoniae* multirresistente aisladas de cultivos orotraqueales, cultivos de catéter, hemocultivos, coprocultivos, superficies y manos del personal en el área de cuidados intensivos neonatales de un hospital de la ciudad capital de octubre 2007 a marzo de 2008 utilizadas como control positivo.

- Cepas como control negativo de *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 25922

2. Equipo

- mechero
- autoclave
- cabina de bioseguridad nivel III
- lámpara ultravioleta de 340-360 nm
- Vortex
- lupa
- incubadora a 37° C
- unidad de filtración para membranas de 0.45 µm
- bomba de vacío
- soporte universal
- trípode
- rejilla de asbesto
- centrífuga de mesa (6000 rpm)
- asa de nicromo
- gradilla

3. Cristalería.

- pipetas estériles de 10 ml
- pipetas estériles de 1 ml
- cajas de petri de vidrio
- beaker de 250 ml
- beaker de 500 ml
- erlenmeyer de 250 ml
- erlenmeyer de 500 ml
- varilla de vidrio
- embudos de vidrio

- tubos de ensayo 12 x 100 mm

4. Reactivos.

- agar tripticasa soya
- caldo tripticasa soya
- cloruro de sodio PA
- etanol, 70 %
- agua destilada
- cloruro de magnesio PA
- agar tres azúcares-Hierro (TSI)
- agar lisina-hierro (LIA)
- agar movilidad indol urea (MIU)
- reactivo de Kovacs
- agar MacConkey
- agar Mueller-Hinton
- agar stock
- agar base sangre + 5% sangre (carnero/humano)
- discos para susceptibilidad de antibióticos
- aceite mineral estéril
- estándar de MacFarland 0.5

5. Otro tipo de material

- membranas de nitrocelulosa para filtración de 0.45 μm Miller [®]-GS (Millipore, Bedford, MA)
- crayón graso
- tapones de tela para erlenmeyer
- reloj cronómetro
- jeringas de 10 ml con Luer-Lock
- papel indicador de pH, rango 1-14

G. Procedimientos

1. Preparación de medios de cultivo

a. Agar tripticasa soya

- Se pesó 40 gramos de agar tripticasa soya, 0.1 gramos de cloruro de sodio y 0.1 gramos de cloruro de magnesio.
- Se disolvió en 1 litro de agua destilada a temperatura ambiente.
- Se calentó hasta ebullición y posteriormente se colocó en el autoclave por 15 minutos a 121° C, 15 psi.
- Se comprobó que no se haya quemado el medio o desemeulsificado.
- Se determinó el pH, para corroborar que se mantuviera en el rango de pH 7.0–7.1.
- Se vertió el agar en cajas de petri estériles, almacenándolas en bolsas de plástico cerradas a temperatura de 2 a 8° C.

b. Caldo tripticasa soya

- Se pesó 30 gramos de agar tripticasa soya, 0.1 gramos de cloruro de sodio y 0.1 gramos de cloruro de magnesio.
- Se disolvió en 1 litro de agua destilada a temperatura ambiente.
- Se calentó hasta ebullición y posteriormente se colocó en el autoclave por 15 minutos a 121° C, 15psi.
- Se comprobó que no se haya quemado el medio y se midió el pH, para verificar que se mantuviera en el rango de pH 7.0-7.1.
- Se vertió el caldo en matraces estériles tapados herméticamente y almacenados a temperatura de 2 a 8° C.

2. Obtención de cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente

Las cepas de *K. pneumoniae* multirresistente utilizadas en el estudio, se obtuvieron de aislamientos de cultivos de catéter, secreción orotraqueal, y hemocultivos de las salas de cuidados intensivos neonatales de un hospital de la ciudad capital. Estas cepas presentaron un patrón similar de susceptibilidad antibiótica, las cuales fueron conservadas en agar Stock a temperatura ambiente (Anexo 8).

- a. Seguidamente se resembró en agar MacConkey e incubaron a 37° C por 24 horas. Las cepas se identificaron por métodos bioquímicos para evitar contaminación.
- b. Se confirmó la susceptibilidad antibiótica de las cepas por medio del método Kirby-Bauer.
- c. Se resembró tres veces más con el objetivo de llevarlas todas a la misma fase de crecimiento celular, para su posterior utilización en la búsqueda fágica.

3. Obtención y purificación de bacteriófagos

a. Muestreo y procesamiento de lavado de superficies hospitalarias

- Se realizaron 4 lavados de superficies por mes en las salas hospitalarias de cuidado intensivo neonatal.
- Se obtuvieron muestras para el aislamiento de bacteriófagos, por medio de lavados superficiales en pisos, paredes, cunas, mesa de noche, manos de personal, puertas y ventanas del lugar donde se aísla la cepa de *K. pneumoniae* multirresistente, a través de recipientes estériles conteniendo 200 ml de agua, con un intervalo de una semana entre cada muestra.

- Se trasladaron las muestras en contenedores especiales y en cadena de frío a 4° C hacia el laboratorio de análisis en Quetzaltenango para su procesamiento.
- Cada muestra de agua se filtró en un recipiente estéril, a través de un sistema de filtración con membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm de poro (Millex-HS) con presión negativa (Anexo 9).

b. Procedimiento para detección de bacteriófagos (Método de goteo)

- Se prepararon medios de cultivo en fase de crecimiento exponencial de cada una de las cepas de *K. pneumoniae* multirresistente las cuales fueron obtenidas en el inciso 1. C y como control negativo cepas *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 25922 en caldo tripticasa soya.
- Se incubaron por 4 horas a 37° C.
- Se comparó la turbidez del medio contra el estándar de MacFarland 0.5.
- Se sembró cada cepa en una caja de agar tripticasa soya
- Se adicionaron 10 alícuotas de 25 microlitros del filtrado (Método de goteo) de las aguas en la superficie del agar.
- Se incubó por 24 horas a 37° C.
- Se realizó el mismo procedimiento para las cepas utilizadas anteriormente, pero sin agregar el filtrado como control negativo.
- Si se observan placas de lisis, como zonas claras dentro del cultivo bacteriano, tomar como indicativo de que el bacteriófago presenta ciclo lítico.

c. Purificación de fagos a partir de cultivos bacterianos.

- No se realizó la purificación, ya que no se aislaron bacteriófagos específicos para *K. pneumoniae*

4. Cultivos bacteriológicos de lavados de superficie

- Se agregó 1 ml de agua recolectada en el inciso a. en 100 ml de caldo tripticasa soya.
- Se incubó a 37° C por 24 horas.
- Se observó el apareamiento de turbidez en el medio.
- Se sembró una alícuota del caldo turbio con un asa de nicromo en medio MacConkey y en agar Sangre al 5%.
- Se incubó a 37° C por 24 horas.
- Se identificaron las bacterias presentes por métodos bioquímicos.

5. Inducción de profagos al ciclo lítico –desrepresión génica por luz UV-

- Se irradió un cultivo masivo recién inoculado (células en fase logarítmica) de *K. pneumoniae* multirresistente por medio de una lámpara ultravioleta de 340-360 nm, por 10-15 segundos a una distancia de 10-15 centímetros.
- Se incubó por 24 horas a 37° C.
- Seguidamente se observaron si había o no placas de lisis o halos claros sobre el cultivo.

H. Diseño experimental.

1. Tipo de estudio.

Estudio de tipo exploratorio, con muestreo a conveniencia, no aleatorio.

2. Análisis de datos.

Los datos obtenidos fueron tabulados por medio Excel versión 2000 (Microsoft Corporation, USA). Se reportaron los resultados de manera descriptiva en presencia o ausencia de bacteriófagos específicos para *K pneumoniae*.

VIII. RESULTADOS

En el área de cuidados intensivos neonatales de un hospital nacional de la ciudad capital de Guatemala, se aislaron 158 cepas bacterianas de octubre 2007 a marzo de 2008, siendo *Klebsiella* sp una de las más frecuentes (47/158, 29.74%) las que además fueron identificadas como multirresistentes. De esta investigación se recuperaron 3 cepas (3/47, 6.4%), las cuales fueron identificadas como *K. pneumoniae* multirresistente (Anexos 8, 9, 10). Las cepas identificadas como *K. pneumoniae* originalmente fueron aisladas de cultivo de catéter (1/3), cultivo de secreción orotraqueal (1/3) y hemocultivo (1/3) de pacientes neonatales.

Con el propósito de aislar y almacenar los bacteriófagos específicos a esta especie, se realizaron 4 lavados superficiales por mes de suelos, paredes, cunas, pared, mesa de noche, manos de personal, puertas y ventanas del área de cuidados intensivos neonatales, obteniéndose 24 alicuotas de 250 ml. cada una y de los filtrados de estos lavados se recuperaron 100 ml. respectivamente.

Se agregaron 25 microlitros del filtrado de los lavados por método de goteo sobre los cultivos de las 3 cepas de *K. pneumoniae* multirresistente, en búsqueda de las placas de lisis, sin embargo no se observaron en ninguno de ellos (0/72, 0%). Las cepas utilizadas como control negativo de *E. coli* ATCC 25922 y cepas de *S. aureus* ATCC 29213 (Anexo 11), no se observaron placas de lisis sobre ninguno de los cultivos (0/24, 0%).

De los cultivos bacteriológicos efectuados en los lavados superficiales, se aisló *E. coli* y *P. aeruginosa*, identificadas por métodos bioquímicos, así como una bacteria Gram positivo con morfología de coco, éstas cepas fueron aisladas de pisos, cunas y manos de personal. No se aislaron cepas de *Klebsiella* sp.

De la desrepresión génica e inducción de bacteriófagos lisogénicos, por medio de la exposición a luz UV (390 nm) de 72 cultivos de *K. pneumoniae*

multirresistente no se evidenció la presencia de placas de lisis (Anexo 13), a las 24 horas postirradiación (0/72, 0%).

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La recuperación de únicamente 3 cepas de *K. pneumoniae* multirresistente de 158 cultivos aisladas en la investigación realizada de octubre de 2007 a marzo de 2008, se debió principalmente a la contaminación o muerte celular que presentaban la mayoría de estos cultivos que se encontraban preservados en agar stock. Estos resultados pudieron deberse a que los cultivos no se mantuvieron y preservaron adecuadamente. El patrón de susceptibilidad antibiótica de estos tres aislamientos si concordó exactamente con lo reportado en los estudios anteriores, lo que puede sugerir que la resistencia no es debida a plásmidos, los cuales hubieran sido expulsados de la bacteria durante su almacenamiento (8, 19, 20, 24-30).

Solamente de pisos, manos de personal y cunas se aislaron, identificaron y confirmaron tres tipos de bacterias causantes de infecciones nosocomiales como lo son *E. coli*, *P. aeruginosa* y cocos Gram positivo, lo cual evidencia cambios en el nicho ecológico, así como limpieza y desinfección inadecuada del área.

La ausencia de bacteriófagos en los filtrados recolectados del área de cuidados intensivos neonatales, puede relacionarse a que estas salas fueron desinfectadas después de los múltiples brotes nosocomiales reportados (22). Estos resultados concuerdan con la ausencia de las cepas de *Klebsiella* sp. en los cultivos bacteriológicos de los lavados que se realizaron de las superficies, donde únicamente se aislaron otros microorganismos catalogados como causantes de infecciones nosocomiales (6,7).

El hallazgo de *E. coli*, *P. aeruginosa* y cocos Gram positivo en los lavados de superficie y la ausencia de *Klebsiella* sp., puede deberse a un posible cambio en la microbiota hospitalaria, generándose competencia entre las bacterias. Estas bacterias fueron aisladas de pisos, cunas y manos de personal. Estos cambios dinámicos en las poblaciones bacterianas, hacen que aumente la competencia entre cepas residentes, reduciéndose la población de otros microorganismos, así

como de cepas patógenas u otras bacterias de interés nosocomial. El proceso de desinfección que fue realizado en las superficies de las salas en estudio, probablemente influyó en los cambios de la microbiota, aunque el mismo fue inadecuado, ya que se aislaron los tres tipos de bacterias causantes de infecciones nosocomiales severas.

Estudios previos han demostrado que las bacterias que causan brotes nosocomiales pueden ser transportadas por las manos del personal médico y paramédico, lo cual hace que las bacterias nosocomiales queden circulando entre la población hospitalaria (6, 7, 16-19, 23). Otro factor que pudo haber incidido en la ausencia de *Klebsiella* sp, es la declinación de su ciclo epidemiológico, lo cual influye directamente en la tasa de población bacteriana, dicha declinación pudo ser a causado por cambio de microbiota en las superficies y a la desinfección realizada (8,19).

La estimulación del ciclo lítico de los bacteriófagos por medio de desrepresión génica por irradiación ultravioleta, demostró que no existían bacterias lisogenizadas o fagos en bacterias multirresistentes estudiadas. Esto explica el hecho de que no todos los bacteriófagos pueden tener ciclo lisogénico y únicamente poseen ciclo lítico. Este procedimiento de estimulación ultravioleta, ha sido utilizado en estudios fágicos para comprobar la existencia de fagos en las células bacterianas (2,6, 7,11,13,33).

Como controles negativos se utilizaron cepas de *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213, en los cuales no se observaron placas de lisis, evidenciando a partir de ello la ausencia de bacteriófagos tanto para *K. pneumoniae* como para las cepas ATCC de *E. coli* y *S. aureus*. Los controles positivos tuvieron que haber sido los bacteriófagos específicos para *K. pneumoniae* multirresistente.

X. CONCLUSIONES.

1. No se aislaron bacteriófagos específicos para *K. pneumoniae* multirresistentes, en los filtrados de aguas provenientes de lavados superficiales en el área de cuidados intensivos neonatales de un hospital de la ciudad capital de Guatemala.
2. No se obtuvo crecimiento bacteriano de *Klebsiella* sp. en los lavados de superficies del área de cuidados intensivos neonatales de un hospital de la ciudad capital de Guatemala, debido probablemente al cambio en la microbiota hospitalaria, tipo de desinfección utilizada en las salas y tiempo de recolección de muestras.
3. Dentro de las cepas de *K. pneumoniae* multirresistente, no se identificaron bacterias lisogénicas al utilizar el método de desrepresión génica por irradiación de luz ultravioleta.

XI. RECOMENDACIONES

1. Realizar cultivos bacteriológicos en los lugares en donde se pretenden aislar bacteriófagos específicos, con el fin de comprobar la existencia de su hospedero.
2. Realizar el aislamiento de bacteriófagos para cepas específicas, en el mismo período y lugar de donde fue aislada la bacteria, para evitar cambios en el nicho ecológico.
3. Continuar con estudios para aislar bacteriófagos de cepas multirresistentes.

XII. REFERENCIAS.

1. Calendar, R. The Bacteriophages. 2 vol. Plenum Press. Nueva York. 1988 (p 890 – 987).
2. Espejo R, Bacteriófagos. Programa regional de desarrollo científico y tecnológico. Secretaría general de la Organización de los Estados Unidos. Washington, D.C. 1973. V+65p. (p 1-60).
3. Figueroa-Bossi N, Uzzau S, Maloriol D. and Bossi L eds. Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in Salmonella. Mol. Microbiol. 2001 39: 260-272.
4. Fields, B.N., *et al.*, "Virology", 2 vols., 2a. Ed., Raven Press, New York 1990.
5. Zelada F. Fagotipificación de *Staphylococcus aureus* aislados en recién nacidos de dos hospitales de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1988 IV+23p.
6. Florián H. Aislamiento de bacteriófagos específicos para *Escherichia coli* diarrogénicas. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2003. IV+46p.
7. Vossberg J. Aislamiento de bacteriófagos específicos para *Klebsiella oxytoca* multirresistente. Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2003. IV+38p.
8. Madigan M. *et al.* Brock Biología de los Microorganismos. 10ª Ed. España: Prentice Hall, 2003. XXV + 1011p. (p 232-255, 513-521, 695, 710-712, 852-853).

9. Mayer G,. Bacteriófagos. Microbiología e inmunología on line Escuela de Medicina Carolina del Sur. Instituto Politécnico de México. Agosto 2003.
10. Pelczar M *et al.* Microbiología. 6a. Ed. México: Prentice Hall Hispanoamericana, 1993 . XX+956p (p. 192-203).
11. Vispo N. S, Dueñas, Marta “Características Generales de los Bacteriófagos filamentosos”. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana Cuba 1999 (p. 57-67)
12. Vispo N. S, Fernández J, Puchades Y., Los bacteriófagos en la biología molecular pasada y actual. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana Cuba 2003 (p 14-56).
13. Duran A. Comportamiento de los bacteriófagos propuestos como microorganismos modelo frente a diferentes procesos naturales y artificiales en aguas. Departamento de Microbiología. Universidad de Barcelona. 1990. (p 23 - 35)
14. Metcaff E. Ingeniería de aguas residuales, tratamiento, vertido y reutilización. México: McGraw-Hill, 1996. 916p. (p. 42-43).
15. Kener F. Manual del agua. México: McGraw-Hill 1990. 430p (p. 51).
16. Balsells M. Infecciones nosocomiales en el Departamento de Pediatría del Hospital General San Juan de Dios. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1998. 56p.
17. Barrios M. Estudio de las Infecciones intrahospitalarias en el Hospital General San Juan de Dios. Guatemala. Universidad de San Carlos (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1995 IV+42p

18. Steere A. *et al.* Handwashing practices for prevention of nosocomial infection. Atlanta, Georgia, USA: 1985. 83p.
19. Juárez I. Vigilancia epidemiológica. Protocolos de Vigilancia Epidemiológica. México: 1994. 348p (p 125-130).
20. Roblero C. *et al.* Panorama de la Resistencia a los Antibióticos en Colombia Rev Pan Infectología. 1999. (sup1) s26-s31.
21. Koreman A. *et al.* Diagnóstico Microbiológico. 3a. Ed. Buenos Aires Argentina: Médica Panamericana 1992. (p 56 – 67).
22. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Dirección General del Sistema Integral de Atención en Salud. Departamento de Epidemiología. Informática Epidemiológica. Memoria de Informática y Vigilancia Epidemiológica. República de Guatemala, 2005 (p 20 – 30)
23. Cooksop B. Hand Washing. San Diego USA: Public Health Laboratory. 1999. (p. 318:686).
24. Begoglio R. Antibióticos. 5a Ed. Buenos Aires Argentina: Panamericana. 1993. 200p (p. 98-125).
25. Láñez E,. Bacteriófagos. Microbiología General on line Universidad de Granada, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias 1999. Marzo 2002.
26. García I. Bacteriología. 4a. Ed. Barcelona España: Editorial Gustavo Gili S.A. 1961p (p 467, 477-480).

27. Díaz Gamazzo. Microbiología y parasitología médica. 2a. Ed. Barcelona España: 1987. 442p.
28. Chirinos J. Los mecanismos de resistencia microbiana. 2001. Médica del C.I.E.M. Arequipa, Perú. Agosto 2001
29. Vásquez E. Plásmidos. Bioquímica y Biología Molecular en Línea. Facultad de Medicina. UNAM. México Octubre 2003.
30. Clewell D. Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. Euro. J. of Clin 1990. (p9,90-102).
31. Franke A, Clewell D. Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of "conjugal" transfer in the absence of a conjugative plasmid. J. of Bac 1981. (p145,494-502).
32. Davis B, Dulbecco R, Eisen H. Tratado de Microbiología. 4a. Ed. Editorial Masson S.A Barcelona España: 1996. (p559 -560).
33. Mancera A.; Navarrete J.; Heneidi A. Fagotipificación de aislamientos de *Salmonella enteritidis* obtenidos en aves en México. Técnica Pecuaria en México, Vol. 42. México agosto 2004. (p287-296).
34. Angel R, El retorno de la Fagoterapia alternativa para el tratamiento de algunas enfermedades infecciosas. Rev Ciencia Hoy en línea. Vol. 14. Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO), CONICET. Marzo 2004.
35. Ronda C, Vásquez M, López R. Los bacteriófagos como herramienta para combatir infecciones en Acuicultura. Rev AquaTIC España. No. 18. España: 2003. (p3-10)

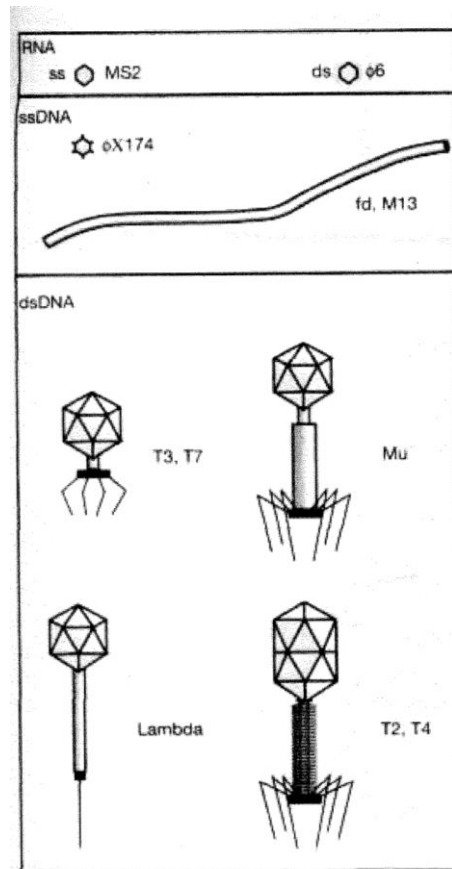
36. Lui, J. *et al.* Antimicrobial drug discovery through bacteriophage genomics.
Rev. Nature Biotechnology. Vol 22 No.2 Febrero 2004.

XIII. ANEXOS

Anexo 1

Morfología de Bacteriófagos

Representación esquemática de los principales tipos de virus. Los comentados en detalle son M13, ϕ X174, MS2, T4, lambda y Mu. Los tamaños son a escala similar. La nucleocápside del ϕ 6 es aproximada.

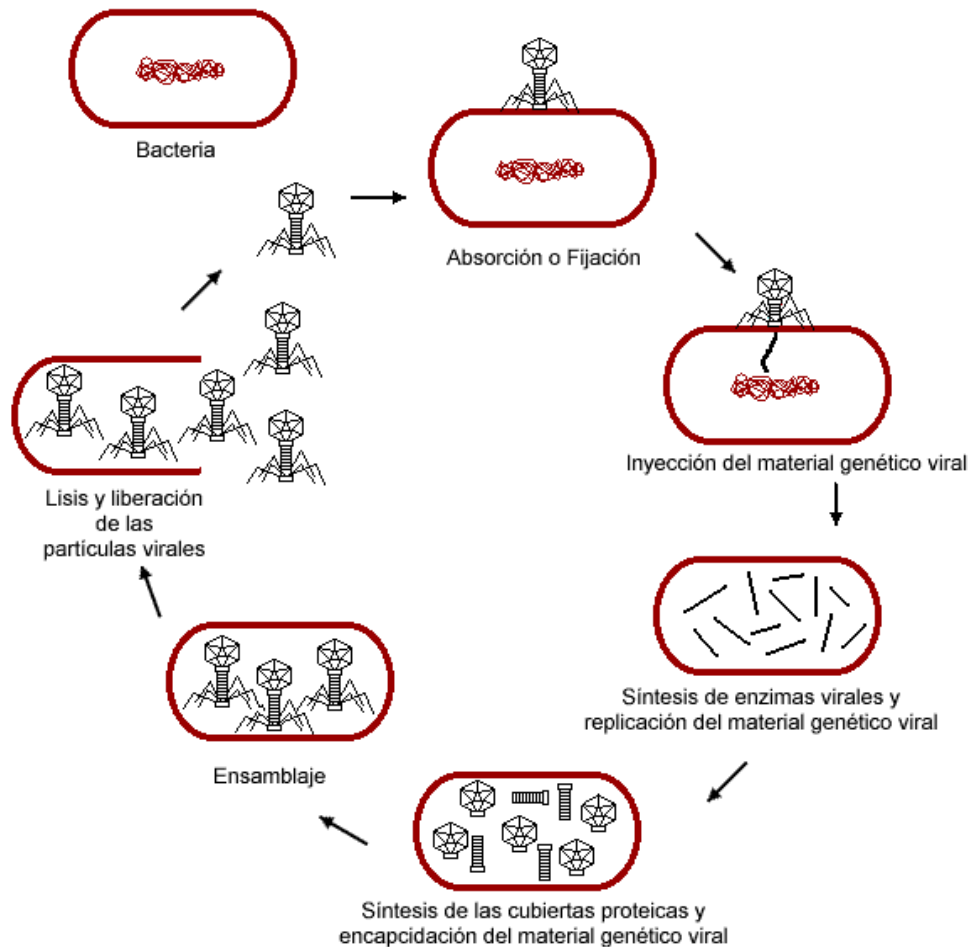


Tomado de: Madigan M. *et al.* Brock Biología de los Microorganismos. 10ª ed. España: Prentice Hall, 2003. XXV + 1011p.

Anexo 2

Esquema del ciclo reproductivo de bacteriófagos

Explicación gráfica del ciclo de reproducción de bacteriófagos y virus en sus diferentes etapas.

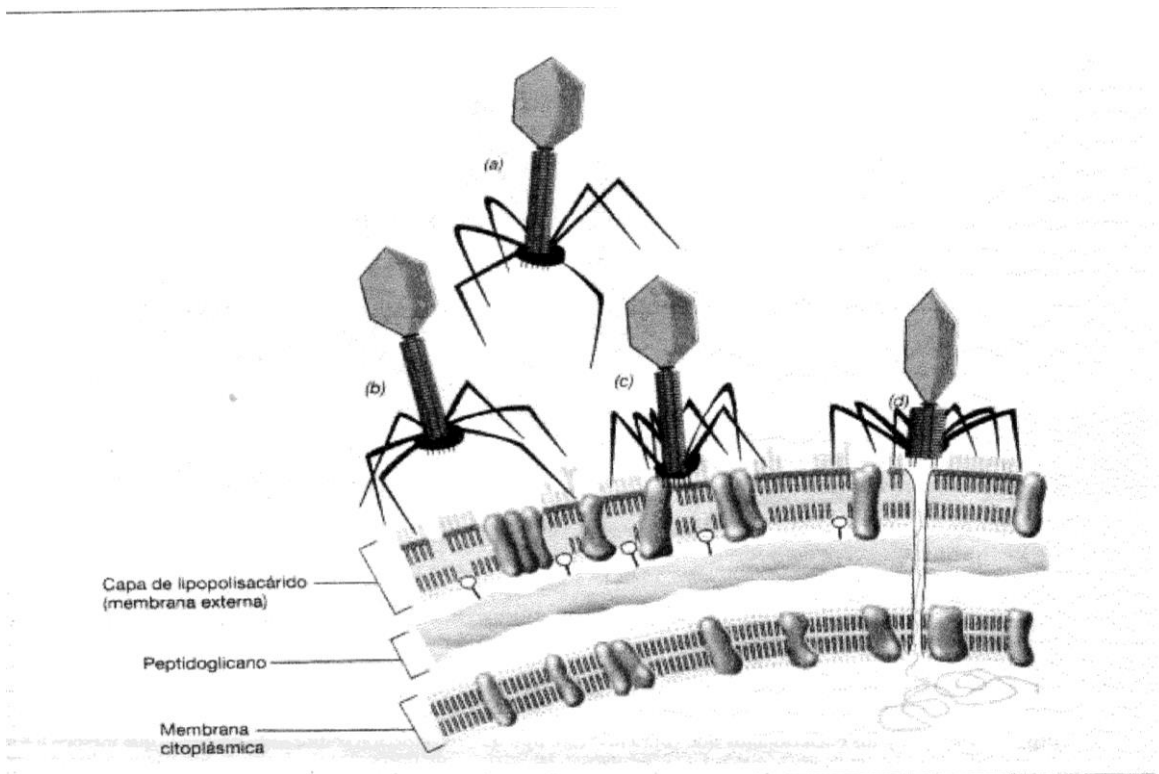


Tomado de: Gómez L. "Ciclo de replicación de bacteriófagos". 1999. Agosto 2003
<<http://www.microbiologia.com>>

Anexo 3

Fijación y Penetración de Bacteriófagos

Fijación de la partícula del bacteriófago a la pared celular bacteriana e inyección del material genético. (a) la partícula no fijada. (b) fijación de la pared por fibras de la cola interaccionando con el polisacárido. (c) contacto entre la pared celular y las espículas de la cola. (d) contracción de la vaina de la cola e inyección del material genético.

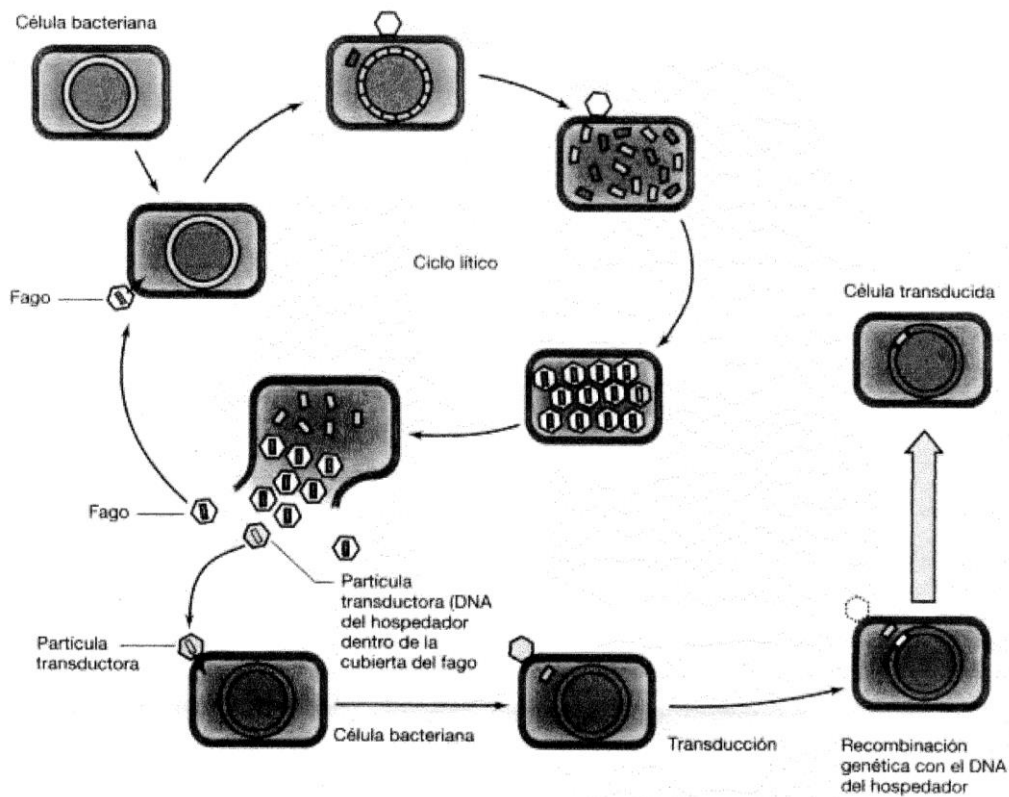


Tomado de: Madigan M. *et al.* Brock Biología de los Microorganismos. 10ª ed. España: Prentice Hall, 2003. XXV + 1011p.

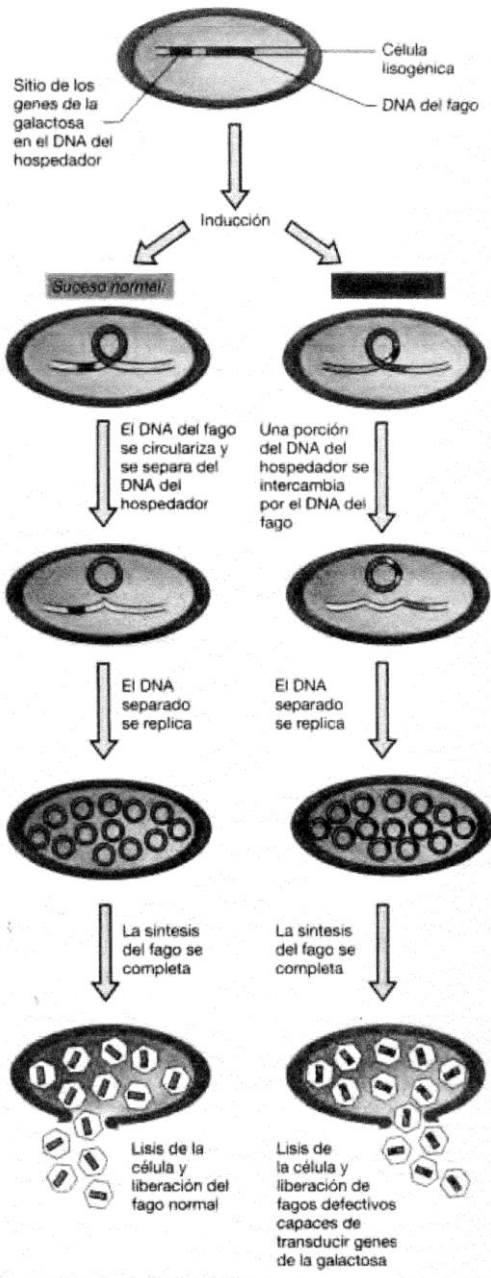
Anexo 4

Transducción

- (a) Transducción generalizada: un posible mecanismo por el que pueden formarse partículas del bacteriófago conteniendo ADN del hospedador.
- (b) Etapas líticas y producción de partículas transductoras de genes de galactosa en una célula de *Escherichia coli* conteniendo lambda como bacteriófago.



Tomado de: Madigan M. *et al.* Brock Biología de los Microorganismos. 10ª ed. España: Prentice Hall, 2003. XXV + 1011p.

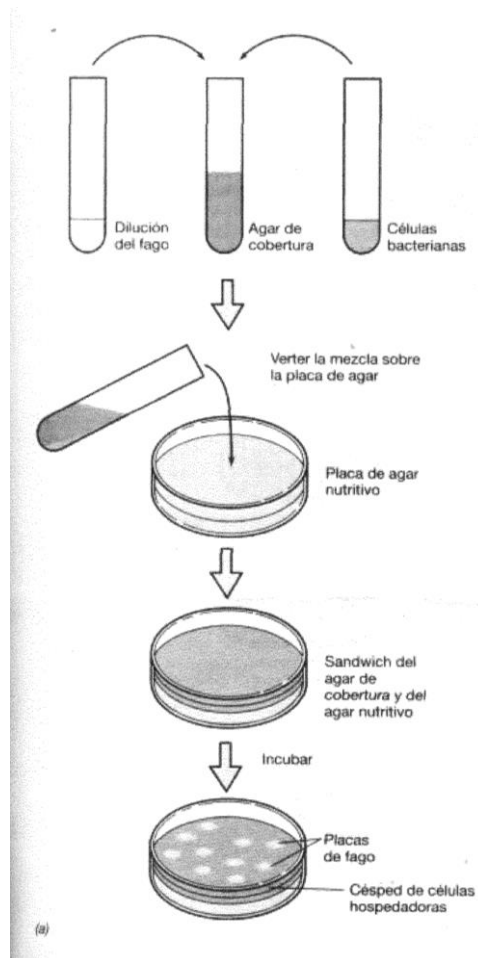


Tomado de: Madigan M. *et al.* Brock Biología de los Microorganismos. 10ª ed. España: Prentice Hall, 2003. XXV + 1011p.

Anexo 5

Cuantificación de bacteriófagos

Empleando el ensayo en placa con la técnica de agar de cobertura. Se mezcla una dilución de la suspensión del material que contiene al bacteriófago con una pequeña cantidad de agar fundido y con la bacteria hospedadora.



Tomado de: Madigan M. *et al.* Brock Biología de los Microorganismos. 10ª ed. España: Prentice Hall, 2003. XXV + 1011p.

Anexo 6

Tablas de estadísticas según el Instituto Nacional de Estadística

Tablas de estadísticas de enfermedades nosocomiales, causas de morbilidad y mortalidad en el área de pediatría de los hospitales de la ciudad capital en el año 2005.

Producción	Medicina interna	Cirugía	Pediatría	Gineco Obstetricia	Trauma-Tología	Total
Egresos vivos	7,795	13,925	14,195	25,018	7,795	68,755
Egresos muertos	373	198	244	7	40	862
No. De camas	426	452	447	229	177	1,731
Día cama ocupada	118,750	121,183	106,459	54,103	50,052	450,547
Infecciones Nosocomiales	65	30	401	8	7	511
Exámenes de laboratorio	368,232	173,462	181,719	102,315	15,765	841,493
Cirugías	0	10,285	0	0	0	10,285

Morbilidad y Mortalidad Hospitalaria en Pediatría

No.	Diez primeras Causas de Morbilidad	Frecuencia	%
1	Neumonía	2,058	8.95
2	Infección respiratoria Superior	1,369	5.95
3	Pie Plano	1,116	4.85
4	Insuficiencia respiratoria superior	1,010	4.39
5	Diarrea Líquida Aguada	914	3.97
6	Luxación congénita de caderas	650	2.83
7	Apendicitis aguda	564	2.45
8	Trauma craneo encefálico	532	2.31
9	Hiperactividad Bronquial	521	2.27
10	Pie equino varo	512	2.23
	Resto de Causas	13,751	59.79
	Total de Causas	22,997	

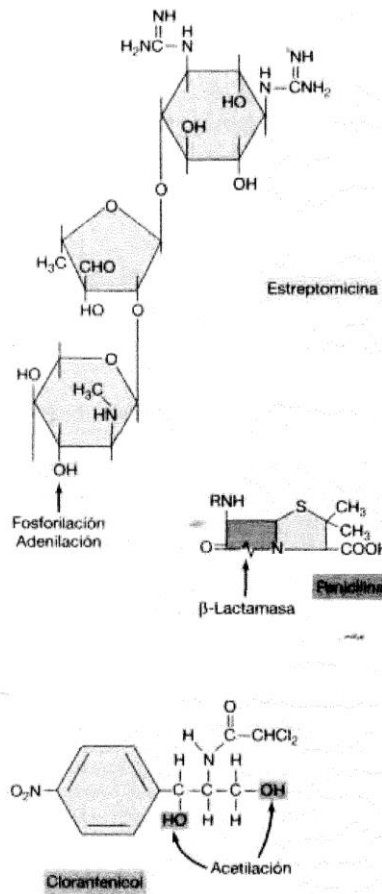
No.	Diez primeras Causas de Mortalidad	Frecuencia	%
1	Shock Séptico	163	9.66
2	Neumonía	86	5.09
3	Prematurez	83	4.92
4	Síndrome de Sepsis	71	4.21
5	Enfermedad Membrana hialina	49	2.90
6	Asfixia Perinatal	26	1.54
7	Multiorganico	26	1.54
8	Hemorragia intra ventricular	25	1.48
9	Trauma cráneo encefálico	25	1.48
10	Paro cardíaco respiratorio	26	1.54
	Resto de causas	1,108	65.64
	Total de causas	1,688	

Tomado de: Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Dirección General del Sistema Integral de Atención en Salud. Departamento de Epidemiología. Informática Epidemiológica. Memoria de Informática y Vigilancia Epidemiológica. República de Guatemala 2005.

Anexo 7

Resistencia a fármacos

Sitios en los que los antibióticos son atacados por enzimas codificadas por genes en plásmidos R. En los antibióticos aminoglucosídicos relacionados con la estreptomina y que posean un grupo amino libre, la inactivación tiene lugar por N-acetilación.



Tomado de: Madigan M. *et al.* Brock Biología de los Microorganismos. 10ª ed. España: Prentice Hall, 2003. XXV + 1011p.

Anexo 8

Perfil de Resistencia.

Cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente aisladas de cultivo do catéter

K. pneumoniae multirresistente aislada de Cultivo de Catéter		
Antimicrobiano	CIM	Interps.
<i>Amicacina</i>	> 32	R
<i>Ampicilina/Sulbctam</i>	16/8	I
<i>Ampicilina</i>	> 16	R
<i>Aztreonam</i>	> 16	EBL
<i>Cefazolina</i>	> 16	R
<i>Cefepima</i>	> 16	R
<i>Cefotaxima</i>	> 32	EBL
<i>Cefotetam</i>	<= 16	S
<i>Ceftazidima</i>	> 16	EBL
<i>Ceftriaxona</i>	> 32	EBL
<i>Cefuroxima</i>	> 16	R
<i>Ciprofloxacina</i>	<=1	S
<i>ESBL-a Scrn</i>	> 4	EBL

<i>ESBL-b Scrn</i>	> 1	<i>EBL</i>
<i>Gentamicina</i>	> 8	<i>R</i>
<i>Imipenem</i>	<=4	<i>S</i>
<i>Levofloxacina</i>	<=2	<i>S</i>
<i>Meropenem</i>	<=4	<i>S</i>
<i>Moxifloxacina</i>	<=2	<i>S</i>
<i>Piperacilina/Tazo</i>	<=8	<i>S</i>
<i>Piperacilina</i>	> 64	<i>R</i>
<i>Ticarcilina/Acido clavulanico</i>	64	<i>I</i>
<i>Tobramicina</i>	> 8	<i>R</i>
<i>Trimetoprim/sulfametoxazol</i>	<=2/38	<i>S</i>

Tomado de: Informe de Microbiología por el sistema automatizado Microscan Walkaway 96® (Dade Behring/Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) de un hospital Nacional de la ciudad Capital de Guatemala, octubre 2007 a marzo 2008.

EBL: betalactamasa de espectro extendido.

Anexo 9

Perfil de Resistencia.

Cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente aisladas de secreción orotraqueal

<i>K. pneumoniae</i> multirresistente aislada de Cultivo de Secreción Orotraqueal		
<i>Antimicrobiano</i>	<i>CIM</i>	<i>Interps.</i>
<i>Amicacina</i>	<= 4	<i>S</i>
<i>Ampicilina/Sulbctam</i>	> 16/8	<i>R</i>
<i>Ampicilina</i>	> 16	<i>R</i>
<i>Aztreonam</i>	<= 8	<i>S</i>

<i>Cefazolina</i>	<= 4	S
<i>Cefepima</i>	<= 2	S
<i>Cefotaxima</i>	<= 4	S
<i>Cefotetam</i>	<= 16	S
<i>Ceftazidima</i>	<= 2	S
<i>Ceftriaxona</i>	<= 8	S
<i>Cefuroxima</i>	<= 4	S
<i>Ciprofloxacina</i>	<= 1	S
<i>Gentamicina</i>	<= 1	S
<i>Imipenem</i>	<= 4	S
<i>Levofloxacina</i>	<= 2	S
<i>Meropenem</i>	<= 4	S
<i>Moxifloxacina</i>	<= 2	S
<i>Piperacilina/Tazo</i>	<= 8	S
<i>Piperacilina</i>	> 64	R
<i>Ticarcilina/Acido clavulánico</i>	<= 16	S
<i>Tobramicina</i>	<= 1	S
<i>Trimetoprim/sulfametoxazol</i>	> 2/38	R

Tomado de: Informe de Microbiología por el sistema automatizado Microscan Walkaway 96® (Dade Behring/Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) de un hospital Nacional de la ciudad Capital de Guatemala, octubre 2007 a marzo 2008.

Anexo 10 **Perfil de Resistencia.**

Cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente aisladas de hemocultivo.

c). Hemocultivo

K. pneumoniae multirresistente aislada de Hemocultivo

Antimicrobiano	CIM	Interps.
Amicacina	> 32	R
Amoxicilina /Acido clavulanico	$\leq 8/4$	S
Ampicilina/Sulbctam	16/8	I
Ampicilina	> 16	R*
Aztreonam	> 16	ESBL
Cefalotina	> 16	R*
Cefazolina	> 16	R*
Cefepima	> 16	R*
Cefotaxima	> 32	ESBL
Cefotaxima/Acido clavulanico	≤ 0.5	
Cefotetam	≤ 16	S
Ceftazidima	> 16	ESBL
Ceftazidima/Acido clavulanico	≤ 0.25	
Ceftriaxona	> 32	ESBL
Cefuroxima	> 16	R*
Ciprofloxacina	≤ 1	S
Gatifloxacina	≤ 2	S
Gemifloxacina	≤ 0.25	S
Gentamicina	> 8	R
Imipenem	≤ 4	S
Levoflozacina	≤ 2	S
Piperacilina/Tazo	≤ 8	S

<i>Tobramicina</i>	>8	R
<i>Trimetoprim/sulfametoxazol</i>	<=2/38	S

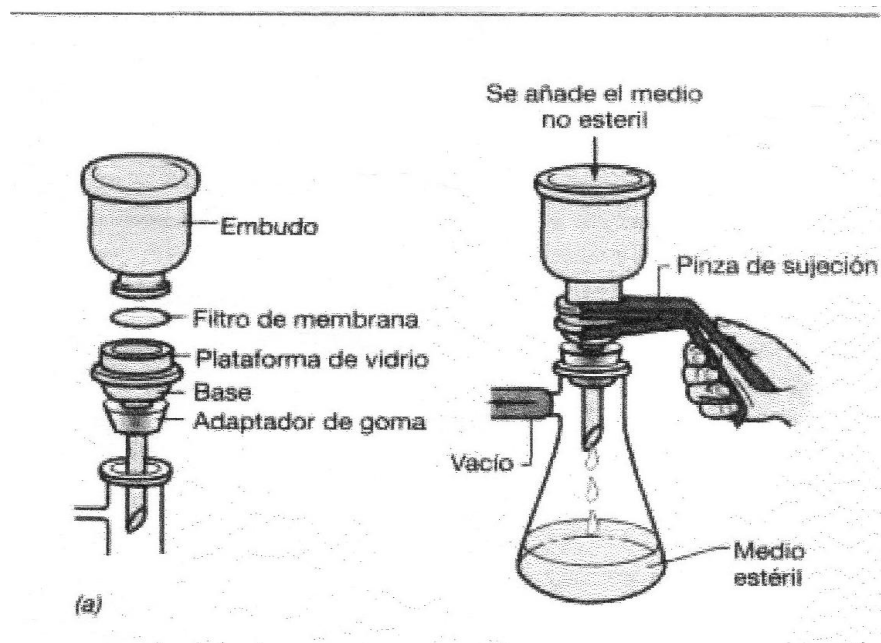
Tomado de: Informe de Microbiología por el sistema automatizado Microscan Walkaway 96® (Dade Behring/Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) de un hospital Nacional de la ciudad Capital de Guatemala, octubre 2007 a marzo 2008.

EBL: betalactamasa de espectro extendido

Anexo 11

Filtración por Membrana

Equipo y ensamblaje de un sistema reutilizable con filtros de membrana.



Tomado de: Madigan M. *et al.* Brock Biología de los Microorganismos. 10ª ed. España: Prentice Hall, 2003. XXV + 1011p.

Anexo 12

Obtención de Bacteriófagos Específicos para *Klebsiella pneumoniae* multirresistente.

Observación de placas de lisis obtenidas del enfrentamiento de *Klebsiella pneumoniae* con lavados superficiales del área de cuidados intensivos neonatales de un Hospital de la ciudad Capital de Guatemala.

No.	Área del lavado superficial	<i>K. pneumoniae</i> aislada de cultivo de catéter	<i>K. pneumoniae</i> aislada de cultivo de secreción orotraqueal	<i>K. pneumoniae</i> aislada de Hemocultivo	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (control negativo)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 (control negativo)
1	Manos de personal	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
2	Piso	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
3	Cuna No. 4	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
4	Mesa	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
5	Carrito de curaciones	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
6	Camilla	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
7	Pared	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
8	Pared	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
9	Manos de personal	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
10	Pisos	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
11	Cuna No. 1	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
12	Mesa	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
13	Carrito de curaciones	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
14	Puerta	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
15	Ventana	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
16	Piso	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

17	Cuna No. 3	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
18	Piso	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
19	Manos de personal	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
20	Manos de personal	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
21	Carrito de curaciones	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
22	Cuna No 5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
23	Cuna No 1	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
24	Ventana	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Datos obtenidos de Fase experimental realizada de octubre de 2007 a marzo de 2008

Anexo 13

Obtención de Bacteriófagos Específicos para *Klebsiella pneumoniae* multirresistente por medio de Desrepresión Génica.

Observación de placas de lisis obtenidas por desrepresión génica por medio de irradiación con luz UV.

No.	Área del lavado superficial	<i>K. pneumoniae</i> aislada de cultivo de catéter	<i>K. pneumoniae</i> aislada de cultivo de secreción orotraqueal	<i>K. pneumoniae</i> aislada de hemocultivo	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (control negativo)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 (control negativo)
1	Manos de personal	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
2	Piso	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
3	Cuna No. 4	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
4	Mesa	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
5	Carrito de curaciones	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
6	Camilla	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
7	Pared	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
8	Pared	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
9	Manos de personal	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
10	Pisos	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
11	Cuna No. 1	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
12	Mesa	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
13	Carrito de curaciones	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
14	Puerta	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
15	Ventana	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
16	Piso	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

17	Cuna No. 3	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
18	Piso	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
19	Manos de personal	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
20	Manos de personal	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
21	Carrito de curaciones	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
22	Cuna No 5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
23	Cuna No 1	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
24	Ventana	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Datos obtenidos de Fase experimental realizada de octubre de 2007 a marzo de 2008