

Título en español:

Aislamiento de bacteriófagos líticos de *Enterococcus faecalis* en muestras de aguas residuales

Título en inglés:

Isolation of lytic bacteriophages of *Enterococcus faecalis* in wastewater samples

Titulillo:

Fagos líticos de *Enterococcus faecalis*

Autores:

- Nicole Blum García
 - Odontóloga, Universidad Católica Santiago de Guayaquil
 - Residente segundo año posgrado endodoncia, Pontificia Universidad Javeriana
 - nicole-blum@javeriana.edu.co
- María Bernarda Sánchez Ávila
 - Odontóloga, Universidad de Cuenca
 - Residente segundo año posgrado endodoncia, Pontificia Universidad Javeriana
 - mbernardasanchez@javeriana.edu.co
- Hugo Díez Ortega
 - Bacteriólogo, Magister en Microbiología, Doctorado en Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana
 - hugo.diez@javeriana.edu.co
- Adriana Rodríguez
 - Bacterióloga, Magister en Microbiología
 - Profesora Asociada, Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
 - aciodaro@gmail.com
- Catalina Méndez de la Espriella
 - Odontóloga Colegio Odontológico Colombiano.
 - Especialista en Endodoncia, Pontificia Universidad Javeriana
 - Coordinador Posgrado de Endodoncia, Pontificia Universidad Javeriana.
 - catalina.mendez@javeriana.edu.co

Resumen

Antecedentes: *Enterococcus faecalis* está asociado al fracaso del tratamiento de endodoncia por su rol y capacidad de desarrollar una biopelícula en dentina, presentando resistencia al hipoclorito de sodio en diferentes concentraciones, sustancia utilizada en el proceso de irrigación, y al hidróxido de calcio utilizado como medicamento intraconducto; esta resistencia aumenta a medida que la biopelícula madura, contribuyendo al papel predominante *Enterococcus faecalis* en las infecciones periapicales persistentes. La dificultad en el tratamiento contra *Enterococcus faecalis* se ha atribuido a la falta de estrategias para evitar la formación de biopelícula y erradicarla. En la búsqueda de otras estrategias de tratamiento, se han probado fagos tipo bacteriófagos capaces de incapacitar a las bacterias formadoras de biopelícula, o a la prevención de la proliferación bacteriana por medio de su lisis. **Objetivo:** Detectar fagos líticos contra *Enterococcus faecalis* en muestras de aguas del río Bogotá. **Métodos:** Se realizó un estudio descriptivo experimental de corte transversal y de carácter cualitativo, aplicando un muestreo por conveniencia para buscar fagos con capacidad lítica. Se utilizó el método de doble capa de agar, y se ensayaron 10 cepas de *Enterococcus faecalis* de origen endodóntico provenientes de un estudio previo (cada una por triplicado), con 5 muestras de agua provenientes de la Cuenca baja fuente el Muña, y 5 muestras de agua provenientes de la cuenca media fuente el Cortijo. Además, se realizaron ensayos para evaluar la capacidad lítica frente a cepas control de la especie en estudio como: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Enterococcus faecalis* ATCC 700802, y de otras especies que se encuentran en boca como: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Leptotrichia bucalis* ATCC 14201. **Resultados:** En la cuenca media, no se encontraron fagos líticos contra las muestras de *Enterococcus faecalis* ni contra las cepas ATCC de control utilizadas. En la cuenca baja los ensayos permitieron observar fagos líticos contra dos de las cepas de *Enterococcus faecalis* evaluadas, fagos que lisaron cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, y *Streptococcus mutans* ATCC 25175. **Conclusión:** Los fagos encontrados no son específicos, se considera que son de amplio espectro, pero dado que solo lisaron bacterias Gram positivas, probablemente es un fago que actúa sobre ácido teicoico que es la molécula normal de adherencia de fagos contra bacterias Gram positivas.

Palabras clave: *Enterococcus faecalis*; fagos; fagoterapia.

Abstract

Background: *Enterococcus faecalis* is associated with treatment failure due to its ability to develop a biofilm in dentin, presenting resistance to sodium hypochlorite in different concentrations as a substance used in the irrigation process and to calcium hydroxide used as an intracanal medication, this resistance increases as the biofilm matures, contributing to the predominant role of *Enterococcus faecalis* in persistent periapical infections. The difficulty in treatment against *Enterococcus faecalis* has been attributed to the lack of strategies to prevent biofilm formation and eradicate it. In the search for other treatment strategies, bacteriophages have been tested capable of incapacitating biofilm-forming bacteria, or the

prevention of bacterial proliferation through its lysis. **Purpose:** Detect lytic phages against *Enterococcus faecalis* in water samples from the Bogotá river. **Methods:** An experimental descriptive cross-sectional study was carried out, and of a qualitative nature, applying convenience sampling to search for phages with lytic capacity. The double agar layer²⁸ method was used, and 10 strains of *Enterococcus faecalis* of endodontic origin from a previous study were tested (each in triplicate), with 5 water samples from the lower Muña source Basin, and 5 water samples from the El Cortijo half source basin. In addition, trials were conducted to evaluate the lytic capacity against control strains of the species under study, such as *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Enterococcus faecalis* ATCC 700802, and other species found in the mouth such as *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Leptotrichia bucalis* (ATCC 14201). **Results:** In the middle basin the tests carried out were negative for all strains tested and no lytic phage were found against the *Enterococcus faecalis* samples or against the control ATCC strains used. In the lower basin the tests allowed to observe that in two of the samples of *Enterococcus faecalis* evaluated lytic phages were found. *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), y *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). Phage lysed ATCC strains *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), y *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). **Conclusion:** The phages found are not specific, they are considered to be broad spectrum, but since they only lysed Gram positive bacteria, it is probably a phage that acts on teichoic acid that is the normal molecule of phage-positive phage adhesion.

Keywords: *Enterococcus faecalis*; phages; phage therapy.

Introducción

El principal factor asociado con el fracaso en endodoncia es la persistencia de microorganismos en el sistema de conductos radiculares, los cuales sobreviven a los procedimientos biomecánicos o debido a la invasión por medio de filtración coronal¹. *Enterococcus faecalis* está asociado a lesiones secundarias persistentes como fracaso del tratamiento de endodoncia por su capacidad de desarrollar una biopelícula en dentina, presentando resistencia al hipoclorito de sodio en diferentes concentraciones, sustancia utilizada en el proceso de irrigación y al hidróxido de calcio utilizado como medicamento intraconducto e incluso resistente a la defensa del huésped³², la cual aumenta a medida que la biopelícula madura. Su presencia es más común en lesiones secundarias junto a otros microorganismos, en donde los conductos radiculares que muestran una obturación deficiente proporcionan espacio y nutrición, creando un ambiente anaerobio facultativo ideal para el crecimiento de *Enterococcus faecalis*, bacteria anaerobia facultativa, mientras que una obturación totalmente hermética crea un ambiente anaerobio estricto que no favorece la supervivencia y el crecimiento del *Enterococcus faecalis*^{1,2}, el tratamiento de endodoncia debería crear un sistema de conducto estéril lo que indudablemente es imposible¹⁹.

La microbiota de los conductos radiculares tratados endodónticamente difiere de la microflora de conductos no tratados. La prevalencia reportada de *Enterococcus faecalis* en conductos radiculares obturados con periodontitis apical persistente es del 70%, en donde pueden sobrevivir durante al menos 6-12 meses en un ambiente donde los nutrientes son

escasos.² *Enterococcus faecalis* es una bacteria anaerobia facultativa Gram positiva comensal, capaz de desarrollar monoinfecciones sin el apoyo de otras especies; habitante normal en cavidad oral, del tracto gastrointestinal y genitourinario.⁵ Es reportado un 65-80% de infecciones de *Enterococcus* que son atribuidas a diferentes factores como resistencia antibiótica o al rápido desarrollo de resistencia, por medio de mutación o por la adquisición de plásmidos o transposones que contienen codificación genética, también por su capacidad de formar una biopelícula, presencia de proteínas de superficie y enzimas sintetizadas.^{4,6,7,8}

Por medio de métodos de detección microbiana se ha observado que el *Enterococcus faecalis* constituye un pequeño porcentaje de la microflora en dientes con lesión periapical sin tratamiento previo o lesión primaria, por otro lado, es la especie bacteriana que se aísla con mayor frecuencia en infecciones secundarias o persistentes con presencia de lesión periapical.^{1,9}

La virulencia de un microorganismo está regulada por genes codificadores de virulencia presentes en su genoma en regiones especiales, que se denominan islas de patogenicidad (PAI, siglas en inglés pathogenicity islands). El PAI de *Enterococcus* se identificó por primera vez en el genoma de la cepa resistente a múltiples fármacos de *Enterococcus faecalis* [MMH594] que había provocado un brote de infección nosocomial en la década de 1980.¹⁰ Los factores de virulencia codificados dentro del PAI de *Enterococcus faecalis* son antígeno A (efaA), enzimas proteolíticas como la hemolisina (cylA), gelatinasa, serina, adhesinas como la proteína extracelular de superficie (esp), sustancias de agregación (asa), y componente superficial de la matriz del colágeno (ace), cápsula, polisacárido de la pared celular y superóxido.^{8,10,11} La hemolisina es una proteína citolítica con acción β hemolítica capaz de lisar eritrocitos humanos y presenta acción bactericida contra otras bacterias gram positivas.^{7,8,10} La gelatinasa es una metaloproteasa hidrofóbica capaz de hidrolizar colágeno, caseína, hemoglobina y otros péptidos, además favorece a la formación de biopelícula. Se ha demostrado que las cepas productoras de gelatinasa de *Enterococcus faecalis* contribuyen a la virulencia de la endocarditis.^{4,8,9,10} La hialuronidasa es una enzima degradativa que está asociada a la destrucción de tejido y facilita que *Enterococcus faecalis* y sus toxinas se distribuyan por el tejido del huésped.¹¹ La proteína de superficie enterocócica (esp) es una proteína asociada a la pared celular en aislados de *Enterococcus faecalis* que favorece la adhesión, colonización y a la formación de biopelícula, aunque estudios mencionan que la formación de ella resulta independiente de esta proteína.^{7,9,10} La sustancia de agregación (asa) es una proteína de superficie que promueve la formación de agregados durante la conjugación bacteriana y promueve el contacto celular con las células del hospedero, incluyendo la adhesión a proteínas de matriz extracelular, la presencia de estas sustancias de agregación impide su fagocitosis. El componente superficial de la matriz adhesiva del colágeno (ace) se relaciona estructural y funcionalmente con la adhesión. Los aislados de *Enterococcus faecalis* del torrente sanguíneo son únicos en su capacidad para producir superóxido cuya producción aumenta la supervivencia de *Enterococcus faecalis*.¹⁰

Los bacteriófagos fueron descubiertos en 1896 por Ernest Hankin como por Gamaleyá en 1898, ya en 1917 Frederick Twort fue el primero en reportar su capacidad lítica. Por otro lado, los bacteriófagos fueron oficialmente nombrados en 1917 por Felix d'Herelle. Estos son virus que infectan y lisan bacterias de manera específica, provienen de la palabra "bacteria" y "fagein" que significa comer o devorar.¹² Los bacteriófagos del género *Enterococcus*

pertenecen a tres familias del orden Caudovirales, las cuales son: Myoviridae con cola rígida, larga y contráctil; Podoviridae con cola no contráctil y corta, y Siphoviridae con cola no contráctil, larga y flexible.^{13,14} Son parásitos obligados que utilizan a su hospedero bacteriano para replicarse, influyendo directamente en las redes ecológicas de las comunidades polimicrobianas, reconocen con alta especificidad la superficie de la célula bacteriana, inyectan su DNA o RNA, se multiplican y se ensamblan dentro de la bacteria, con el fin de romper la célula bacteriana y liberar su progenie, la cual infectará nuevas células bacterianas.^{5,12} El contacto inicial entre un bacteriófago y la bacteria se da por difusión, colisión o adhesión. Se replican mediante dos ciclos, el ciclo lítico y el ciclo lisogénico.^{5,15} En el ciclo lítico, los bacteriófagos se unen a receptores específicos en la superficie bacteriana, estos receptores son los lipopolisacáridos, ácidos teicoicos, proteínas o incluso flagelos. Una vez unido al receptor de la bacteria, la cola del bacteriófago se contrae, esto se da con la ayuda del ATP presente en la cola, el material genético se introduce dentro del citoplasma de la bacteria. La pared bacteriana es destruida mediante un dominio lisosomal. El ingreso a la bacteria de más partículas líticas, se da a través de enzimas líticas producidas por los bacteriófagos, mediante un sistema llamada holina-endolisina, la holina forma agujeros en la membrana bacteriana, lo cual permite que las endolisinas lisen al peptidoglicano de la pared celular de la bacteria.⁵ Estas enzimas líticas pueden ser N-acetilmuramidasa, endo-beta-N-acetilglucosaminidasa, N-acetilmuramoyl-L-alanina amidasa, endopeptidasa o transglucosidasa lítica.^{16,17} Mientras se da el ciclo lítico, se acumulan proteínas estructurales de la partícula viral y generan nuevas copias del genoma, todo esto resulta en el ensamblaje de partículas fágicas que lisan la bacteria y se liberan al medio.⁵ En el ciclo lisogénico, el ácido nucleico del fago se inserta en el cromosoma bacteriano y se replica como si fuera un gen más de la bacteria, el fago integrado recibe el nombre de profago y se mantiene en estado lisogénico, multiplicándose junto con el DNA bacteriano.¹⁵

La fagoterapia es la aplicación de bacteriófagos para el control y eliminación de bacterias patógenas. Presenta múltiples ventajas, entre las cuales: el número de fagos crece exponencialmente en contacto con la bacteria específica, esto proporciona un efecto positivo en el sitio de infección; un sólo fago puede llegar a ser suficiente para destruir una bacteria determinada; los bacteriófagos tienen la capacidad de mutar, combatiendo así la resistencia que podrían presentar las bacterias ante ellos; el tratamiento con bacteriófagos no genera efectos secundarios ni nocivos, ya que los fagos presentan alta especificidad a los receptores de la superficie bacteriana, afectando únicamente a la bacteria blanco, además, no afectan a las células eucariotas y presenta una capacidad de replicación tan larga como el tiempo que esté la bacteria en el hospedero;¹⁸ la fagoterapia es un procedimiento relativamente rápido; presentan alta especificidad, llegando a ser cepa-específicos; los bacteriófagos que realizan ciclo lítico son agentes bactericidas;⁵ los bacteriófagos son fáciles de aislar, al ser bacterio-dependientes, pueden ser encontrados en cualquier sitio donde se encuentren bacterias, y cada bacteria puede tener hasta cien fagos; poseen capacidad de destrucción de biopelícula, infectan bacterias presentes en la superficie de la biopelícula y pueden replicarse formando nuevos fagos.¹⁸ Existen varias formas de administración de los bacteriófagos: la vía oral en forma de suspensión, consiste en administrar fagos tres veces al día después de cada comida, la neutralización del ácido gástrico se hace mediante la administración de agentes como bicarbonato de sodio o mediante agua mineral bicarbonatada; vía local, consiste en aplicar bacteriófagos localmente en las áreas infectadas como en la mucosa nasal, ocular y en la oreja y por último, por vía intravenosa. Además, los bacteriófagos se encuentran en cremas,

tapones, aerosol y enjuagues.¹⁶

Existen pocos estudios del uso de fagoterapia contra *Enterococcus faecalis*. Entre los bacteriófagos estudiados en odontología tenemos: El **fago EFDG1** aislado de aguas residuales, tiene la capacidad de eliminar el biopelícula causada por la bacteria, se ha observado que este fago elimina la biopelícula después de 7 días.¹⁹ Otro fago aislado con capacidad lítica es el **fago EFLK1**, aislado igualmente de aguas residuales, eliminando cepas resistentes. EFLK1 contiene un genoma circular, DNA con una alta capacidad de replicación y presenta componentes importantes como DNA polimerasa, dos DNA helicasas, DNA maturase A, tres DNA exonucleasas, resolvasa, primasa, RNA polimerasa. El **fago ϕ Ef11** muestra eficacia en la eliminación de *Enterococcus faecalis*; mediante estudios se ha creado un fago secuenciando el genoma de ϕ Ef11, dando lugar al **fago ϕ Ef11/ ϕ FL1C(Δ 36)PnisA**, el cual resulta ser más agresivo y viable en la fagoterapia.²¹ Lo que indica que la fagoterapia es una alternativa eficaz para la eliminación de *Enterococcus faecalis* presentes en los conductos radiculares. Existen otros fagos como IME-EFI y phiEF24C.¹⁹

A pesar de que la fagoterapia fue introducida a principios del siglo XX no es una terapia implementada en la actualidad en odontología, esto se debe al auge de los antibióticos, al temor de posibles genes dañinos y al desconocimiento de si los bacteriófagos además de lisar al *Enterococcus faecalis*, lisan bacterias de la microbiota oral normal causando un daño biológico y funcional.¹⁹

El presente estudio busca detectar fagos líticos contra *Enterococcus faecalis* en muestras de aguas del río Bogotá, con el fin de que en un futuro pueda ser utilizada esta terapia para evitar la formación de biopelícula producida por *Enterococcus faecalis* y reducir los fracasos endodónticos producidos por esta bacteria.

¿Existen bacteriófagos contra *Enterococcus faecalis* en las aguas residuales del río Bogotá?

Materiales y métodos

Se siguió la metodología propuesta por Clokie y colaboradores en el 2009²². Se recolectaron 5 muestras de agua de la cuenca media del río Bogotá en la estación de muestreo en el Cortijo (N 04°43'44.0" W 074°07'36.2"), localizada en el occidente de la ciudad de Bogotá. Las muestras se tomaron en el denominado Puente de Guadua en el sector de la calle 80 de la ciudad de Bogotá. En este punto el río ha recorrido las provincias de Almeidas y Sabana, Centro del norte del Departamento de Cundinamarca y el norte de Bogotá y ha recibido las aguas residuales de la estación, recibe el efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales (PTARD) El Salitre que trata las aguas residuales domésticas del norte de la ciudad de Bogotá, aguas con un grado de contaminación que puede contener suficientes fagos contra varios tipos de bacterias. En la cuenca baja del río Bogotá. Se recolectaron 5 muestras en la Estación de muestreo Peaje El Nuevo Salto - El Muña, localizada en el kilómetro 2.4 Vía Chusacá – El Triunfo en la vereda El Charquito del municipio de Soacha, un kilómetro adelante del peaje El Nuevo Salto y del Embalse del Muña localizado al sur de Bogotá. En este punto el río ha pasado por los municipios de las provincias de Almeidas y Sabana Centro del norte y por la ciudad de Soacha - Bogotá y ha recibido una fuerte descarga de agua fuertemente contaminada con residuos domésticos, e industriales, lo cual aumenta la

posibilidad de aislamiento de fagos bacterianos. De cada una de las cuencas se recolectaron 5 muestras y de cada una de las muestras se recolectaron 5 litros. La recolección se realizó en garrafones de propileno estériles que sólo se destaparon al momento de su uso y la recolección de agua se realizó a 2 metros de la orilla del río y a 30 cms de profundidad, se sumergió el recipiente boca abajo y posteriormente se dirigió la boca contra la corriente. Al cerrar los garrafones se dejó un espacio de al menos 2,5 centímetros para facilitar la mezcla y aireación de la muestra. Para su transporte, la muestra se conservó en frío menor a 10°C en neveras especializadas de transporte. Las aguas fueron procesadas inmediatamente se llegó al laboratorio. Es pertinente mencionar que de acuerdo al decreto 1376 de 2013 para haber realizado la recolección de muestras que contengan especímenes, el investigador principal se encuentra amparado por el permiso marco de recolección de especímenes de especies silvestres de la Diversidad Biológica con fines de investigación científica, otorgado a la Pontificia Universidad Javeriana.

Con respecto al procesamiento de las muestras de aguas contaminadas, para obtener el contenido fágico de los 5 litros de agua, se eliminó previamente cualquier sustancia o molécula que pudiera causar interferencia como son compuestos de alto peso molecular como proteínas, células eucariotas, residuos orgánicos y otros. Para cumplir con este paso, se empleó la técnica de filtración por membrana propuesta por Duran y colaboradores en el año 2002 que se contextualiza de la siguiente forma: ²³

- De cada una de las muestras de agua se tomó 1 litro, y se centrifugó en varios frascos a 5100 x g a 4°C durante 30 minutos, en una centrifuga de Marca IEC modelo B-22M. El sedimento que contiene residuos de alto peso molecular se descartó y el sobrenadante obtenido que contiene elementos de bajo peso molecular, entre ellos, posibles fagos, se transfirió a un frasco de propileno limpio, estéril y libre de contaminación química. Este sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0,22 µm (Millex-PES, Millipore, Bedford, MA, USA).
- El filtrado que corresponde a la muestra que puede contener fagos se recolectó en un solo frasco y se utilizó para realizar de manera inmediata el screening para fagos y alícuotas adicionales se guardaron en nevera a 4°C por no más de 24 horas.

Con respecto a la preparación de inóculos bacterianos, huéspedes para el fago se usaron cepas obtenidas de origen endodóntico: 10 cepas de *Enterococcus faecalis* previamente ya identificadas por MALDI-TOF en un proyecto anterior, y que presentan un elevado perfil de resistencia a antibióticos y expresan genes de virulencia para formar biopelícula fueron utilizadas para el screening contra el filtrado de agua obtenido. Las cepas utilizadas provienen de un proyecto anterior que cuenta con el aval para su uso, de los comités de ética de la facultad de Odontología y Facultad de Ciencias, así como las firmas de los respectivos consentimientos informados. Cada una de las cepas de manera individual se cultivaron en Caldo Enterococos (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA) y siguiendo la metodología de Covo y colaboradores del año 2016²⁴, se incubaron de 2 – 12 horas a 37°C en agitación continua para obtener una bacteria en fase de crecimiento logarítmico. A partir de las 2 horas se empezaron a tomar alícuotas de las bacterias en el caldo y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 600-620nm (Termo scientific), la cual estuvo entre 0,200 ± 0,020 correspondiendo a una concentración de 3x10⁸ UFC/ml.

De esta manera, en los pasos previos se obtuvo, por un lado, la fuente de fagos (agua filtrada) y la bacteria hospedera de los fagos (*Enterococcus faecalis* de origen endodóntico).

Para el aislamiento de los bacteriófagos se realizó una técnica cualitativa para determinar la presencia de fagos líticos contra *Enterococcus faecalis* siguiendo la metodología recomendada por la American Public Health Association en el año 2005,²⁵ con algunas modificaciones:

- Cada filtrado se mezcló con cada una de las cepas de *Enterococcus faecalis* en crecimiento logarítmico y cada uno fue probado en 3 cajas. Esto implicó que cada filtrado fue probado con 10 cepas de *Enterococcus faecalis* y de cada mezcla se utilizaron 3 cajas para aislar fagos, lo cual dió un total de 60 cajas para cada muestra y como son 10 muestras será un gran total de 600 cajas.
- Previo al aislamiento del fago se preparó en tubos, una solución de Agar Chromocult Enterococci (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA) que se mantuvo en estado semisólido a 45-50°C.
- De esta forma para el aislamiento de los fagos se tuvieron listos 3 elementos a emplearse: Agua filtrada, de *Enterococcus faecalis* a 3×10^8 UFC/ml y Agar semisólido.
- Para la técnica de aislamiento, se vertió en un tubo de ensayo estéril 1 ml de la bacteria a 3×10^8 UFC/ml, 1 ml del filtrado de agua y 5 ml de medio semisólido. Se vertieron sobre la caja Petri estéril y se mezclaron suavemente haciendo que cubra toda la base de la caja. Se dejó solidificar, y una vez solidificado se cubrió esta mezcla con una nueva caja de agar semisolidificado (10-15ml aproximadamente). Una vez solidificada la segunda capa, la mezcla filtrado/bacteria se incubó a 37°C por 48 horas en microaerofilia, y pasado el período de incubación se observó la presencia de fagos líticos en la mezcla. Por cada muestra se sembraron 3 cajas bajo el mismo proceso.
- La lectura de la prueba se efectuó siguiendo la metodología de Azeredo y colaboradores del año 2008,²⁶ para la cual se determinó la presencia / ausencia de fagos mediante la formación de calvas. Si el fago no corresponde a *Enterococcus faecalis*, no hay lisis y se observó el crecimiento de la colonia de *Enterococcus faecalis*. Pero si el fago al corresponder a la bacteria, se replicó dentro de la bacteria, observándose un halo transparente de lisis en la caja.

Para realizar las pruebas de especificidad se tomaron las muestras de agua que dieron positivas y fueron enfrentadas a varios tipos de bacterias.

- Se realizaron ensayos para evaluar la capacidad lítica frente a cepas control de la especie en estudio como son cepas *Enterococcus faecalis* (EF) ATCC 29212 (no lítica), EF ATCC700802 (lítica) y de otras especies que se encuentran en boca como son *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Leptotrichia buccalis* (ATCC 14201). Este

paso fue necesario, pues el objetivo era encontrar un fago que solo lise a *Enterococcus faecalis*, pues si lisa otro tipo de bacteria puede afectar la microbiota oral normal, alterando las funciones que cumple.

- Para cada una de estas bacterias se efectuó el procedimiento anteriormente mencionado con *Enterococcus faecalis* con la única diferencia, que el medio de cultivo permitía el crecimiento de estas bacterias usando un TSA (Agara tripticasa soya suplementado).

Para el análisis de resultados se realizó un análisis descriptivo estableciendo presencia o ausencia de fagos en las muestras procesadas, y verificando si existió lisis específica de *Enterococcus faecalis*.

Resultados

La *Tabla 1* ilustra los resultados obtenidos en los diferentes ensayos, donde podemos observar los resultados en cada una de las cuencas, para cada una de las tres réplicas que se realizaron, observándose positivas únicamente en muestras de la Cuenca baja del río Bogotá.

Es así como en la cuenca media los ensayos realizados resultaron negativos para todas las cepas testeadas y no se encontraron fagos líticos contra las muestras de *Enterococcus faecalis* ni contra las cepas ATCC de control utilizadas, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC700802.

Tabla 1. Aislamientos de fagos obtenidos en cada una de las cuencas testeadas frente a 10 cepas de *Enterococcus faecalis* de origen oral, para una de las 5 muestras de agua tomadas.

Cepa de <i>E. faecalis</i>	Cuenca media – El cortijo					Cuenca baja - Muña				
	Agua 1	Agua 2	Agua 3	Agua 4	Agua 5	Agua 1	Agua 2	Agua 3	Agua 4	Agua 5
No 01	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0
No 02	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0
No 03	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	1-0-0
No 04	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0
No 05	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0
No 06	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0
No 07	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-1-1	0-0-0	0-0-0

<i>No 08</i>	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0
<i>No 09</i>	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0
<i>No 10</i>	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0
*En la parte superior, las cuencas. Cada columna corresponde a una muestra de agua utilizada, y en cada fila, los números indican las 3 réplicas realizadas, donde 0=negativo, 1 = positivo.										

En la cuenca media del río Bogotá no se aislaron fagos líticos. En la cuenca baja se observaron fagos líticos en 2 de las 3 cajas de la muestra de agua 3 y la cepa de *Enterococcus faecalis* 7, y en una de las tres cajas de la muestra de agua 5 con la cepa 3. (Tabla 1, Figura 1 y 2)

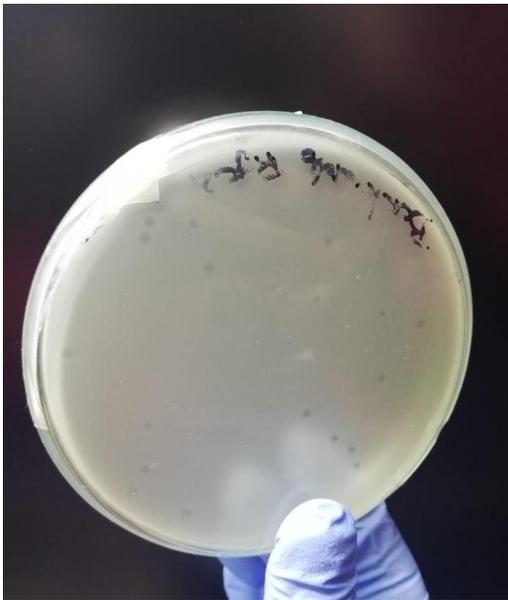


Figura1. Calvas de lisis homogéneas observadas en una de las cajas del ensayo por triplicado

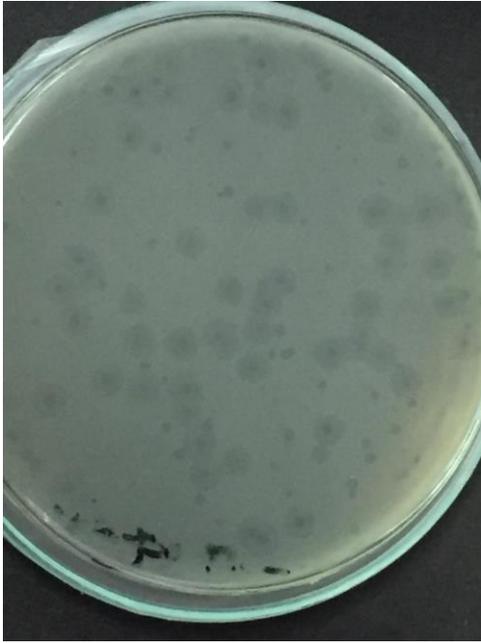


Figura 2. Calvas de lisis observadas en dos de las cajas donde se evidenció presencia de fagos líticos contra *Enterococcus faecalis*.

Como parte del control de calidad, los ensayos que resultaron negativos, fueron sometidas a tres nuevos procesos (Figura 3): El agua recolectada filtrada, tanto sedimento como sobrenadante volvieron centrifugarse y filtrarse, se repitieron los ensayos con las dos nuevas fracciones. Se usaron nuevamente 3 réplicas por 5 muestras por cada *Enterococcus faecalis* que dio negativo, tanto en sedimento como en sobrenadante.

De igual forma, se realizó un segundo tipo de ensayo consistente en el preenriquecimiento de las aguas estudiadas según la metodología de Matsusaki, 2018 ²⁷ para organismos fastidiosos, que utiliza un preenriquecimiento bacteriano, donde por cada 10ml de agua se adicionaron 3 ml de cultivo de *Enterococcus faecalis* en fase exponencial. Y a partir de esta muestra enriquecida se repiten los ensayos por la metodología ya descrita, American Public Health Association en el año 2005 ²⁵.

Adicionalmente, se realizó un screening rápido de bacteriófagos activos mediante la prueba de Spot y la prueba de Streak (Figura 3). En este caso, sobre pruebas en las cuales ya se ha realizado el método de doble capa de agar, se siembran sobre la capa, 3,0ul (Spot) o 10ul (Streak), y en el primer método se dejan libres sobre el medio y en el segundo caso se esparcen con un asa realizando siembra en estría, y se reincuban las cajas por 3 días a 37°C en microaerofilia (Fernandez y col, 2017; Gaviria y col, 2012) ²⁸ (Figura 3)

La prueba de Spot se lee como positiva, por la presencia de manchas en el sitio de siembra, en tanto que en la de Streak se ven líneas de lisis alrededor de las estrías.

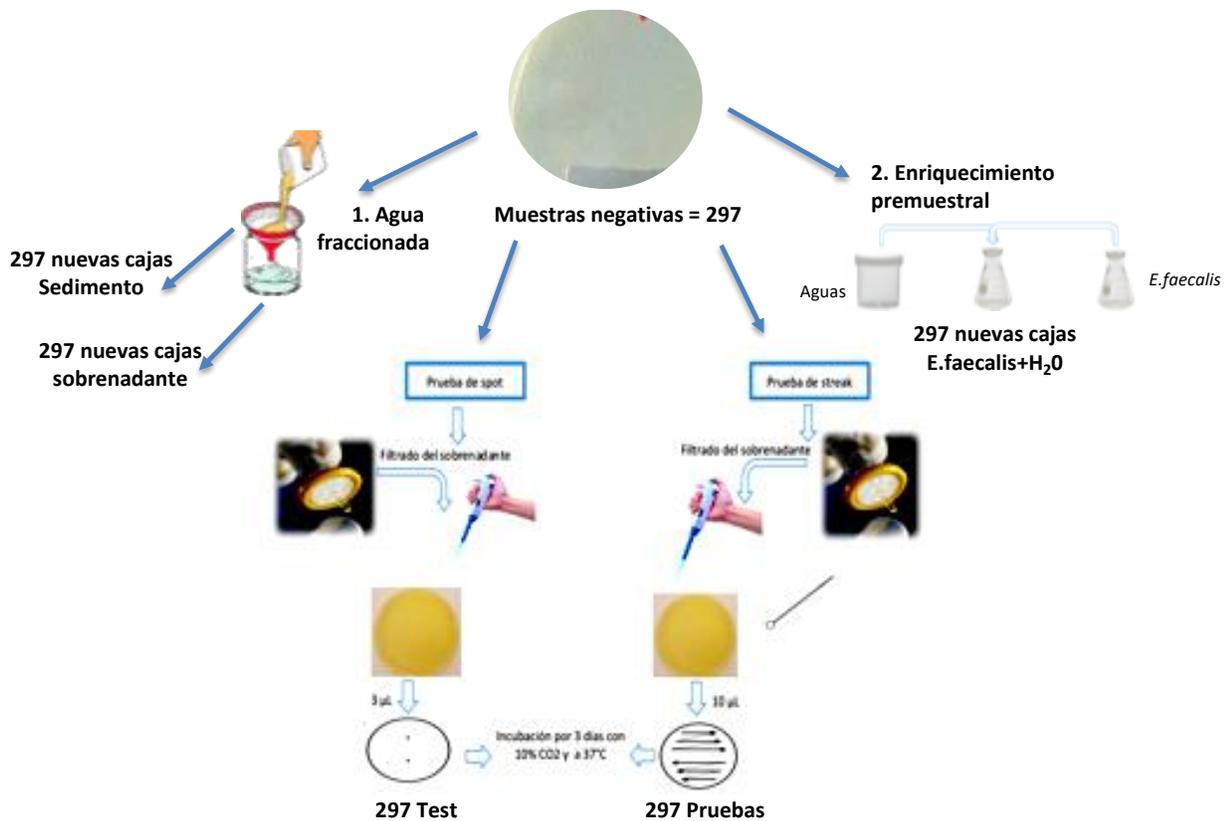


Figura 3. Ensayos confirmatorios realizados para verificar la negatividad de fagos líticos contra *Enterococcus faecalis*

Verificada la negatividad de las muestras, se siguió trabajando con las muestras que resultaron positivas, con el fin de verificar la especificidad de los fagos. Para tal fin, se tomaron alícuotas de las muestras de aguas que dieron positivas contra las dos cepas de *Enterococcus faecalis* y se hicieron dos tipos de ensayos; un ensayo cualitativo indirecto, y uno cualitativo directo. En el primer ensayo, las muestras de aguas que mostraran fagos con actividad lítica, fueron testeadas contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* ATCC700802, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Leptotrichia bucalis* ATCC 14201. En el ensayo cualitativo directo, a diferencia del anterior, las bacterias no eran enfrentadas a las muestras de aguas que dieron positivas, sino fueron enfrentadas directamente al fago aislado. Técnicas que corresponden a un protocolo que nos permite inferir que tan específico es el fago o no.

Bajo la metodología indirecta propuesta, Apha, 2005, ²⁵ en el cual se seleccionaron únicamente las dos muestras de la cuenca baja que resultaron positivas ante *Enterococcus faecalis*, en este caso la muestra de agua 5 que dio positiva contra la cepa 3, y la muestra 3 que dio positiva contra la cepa 7 (Tabla 1), se probaron ante otras cepas bacterianas ATCC diferentes a *Enterococcus faecalis*, con el fin de verificar si estas agua contenían fagos que eran específicos para *Enterococcus faecalis*, actuaban contra otras cepas, para la cual se enfrentaron a cepas bacterianas que pueden estar en cavidad bucal como *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Leptotrichia bucalis*, *Staphylococcus aureus* entre otros (Tabla 2).

Los resultados mostraron que las alícuotas de agua de la Cuenca baja donde se aislaron los fagos contra *Enterococcus faecalis*, presentaban actividad lítica contra otros microorganismos, pero los resultados no eran uniformes ni reproducibles, los controles no funcionaban adecuadamente, las réplicas fueron realizadas en una sola alícuota y arrojaba resultados diferentes, el agua utilizada correspondía a una alícuota que llevaba más de 1 semana en nevera, aspecto que probablemente disminuyó la vida media del fago en agua, o hizo que el agua perdiera sus condiciones óptimas de pH, descongelamiento, solubilidad y precipitación, e isotonicidad mostraban cambios una vez se refrigeraba, cambios que pueden influir en la sobrevivencia del fago y la bacteria (Tabla 2).

Tabla 2. Ensayos de especificidad indirecto, utilizando las muestras de aguas que contenían fagos líticos de *Enterococcus faecalis* contra las cepas ATCC.

<i>Cepa ATCC</i>	<i>Agua 3 Cuenca baja</i>	<i>Agua 5 Cuenca Baja</i>
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0-0-0	0-0-0
<i>E. faecalis</i> ATCC700802	0-0-0	0-0-0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	0-1-0	1-1-0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0-0-0	0-0-0
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	0-0-0	0-1-0
<i>Leptotrichia bucalis</i> ATCC 14201	0-0-0	0-0-0

La tabla muestra en las columnas, las cepas ATCC utilizadas para probar especificidad, contra la muestra de agua positiva para los ensayos cualitativos, en las filas los resultados de las tres réplicas donde 0 = no lítico, 1= lítico.

Debido a lo anterior se incluyó una nueva metodología, una detección directa según la metodología de lisis confluyente, consistente en enfrentar las cepas diferentes a *Enterococcus faecalis* contra el fago directo y no contra el agua donde este fue aislado. Para tal fin, debía extraerse el fago del agar positivo original, y enfrentarlo directamente con cada microorganismo, a través de dos métodos: el de capa doble ya probado y hacer un nuevo ensayo en medio líquido, debido a que teníamos calvas que eran compatibles con fagos lisogénicos y no líticos, y esto se podía apreciar mejor en el medio líquido. La lectura se efectuó de acuerdo a la metodología de Ramírez y Leopardo 2016¹³, mirando calvas en el medio sólido como por turbidez/claridad del medio líquido.

Se prepararon 10 ml de cultivo bacteriano de cada una de las dos cepas inductoras (cepas que resultaron positiva por la metodología de calvas), y de cada una de las cepas ATCC a probarse, las cuales se incubaron en caldo BHI hasta obtener la fase logarítmica de 3×10^6 UFC/ml en cada una de ellas. Simultáneamente se tomaron 3 calvas de las que eran compatibles con actividad lítica y 3 calvas de las que eran compatibles con actividad lisogénica, haciendo una mezcla de cada una de ellas. Para sacar el fago, se perforó el agar con un capilar, y la masa obtenida se trituró bajo esterilidad en caldo BHI, posteriormente se

centrifugó a 3000g por 5 min y se tomó el sobrenadante, descartándose en precipitado del agar. Posteriormente, para cada bacteria, se usó una fiola líquida y tres cajas para agar en capa doble. Para la prueba líquida, en fiola estéril, se tomaron 0,1ml de la suspensión de bacteriófagos y se enfrentaron a 0,5 ml de las bacterias en fase exponencial, y se incubaron 48-72h 37°C en microaerofilia. Simultáneamente se repitió la técnica de doble capa de agar, tomando 1 ml de concentrado de la bacteria y se mezcló con 5 ml de la suspensión de bacteriófagos y se incubado 48-72 horas 37°C microaerofilia.

Tabla 3. Ensayos de especificidad directo, utilizando concentrado de fagos líticos de *Enterococcus faecalis* contra las cepas ATCC.

<i>Cepa ATCC</i>	<i>Agua 3 Cuenca baja</i>		<i>Agua 5 Cuenca Baja</i>	
	<i>Doble capa</i>	<i>Líquido</i>	<i>Doble capa</i>	<i>Líquido</i>
<i>E.faecalis</i> ATCC 29212	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0
<i>E.faecalis</i> ATCC700802	0-1-1	0-1-1	0-1-0	0-1-0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	0-1-1	0-1-1	0-1-0	0-1-0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	0-0-0	0-1-0	0-0-0	0-0-0
<i>Leptotrichiabucalis</i> ATCC 14201	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0

La tabla muestra en las columnas, las cepas ATCC utilizadas para probar especificidad, contra la muestra de agua positiva para los ensayos cualitativos, en las filas los resultados de las tres réplicas donde 0 = no lítico, 1= lítico.

Los resultados permitieron observar, que las calvas inicialmente encontradas como lisogénicas, volvían a presentar en medio de cultivo sólido el ojo de buey con un punto central y que la muestra simultánea en líquido presenta diferentes grados de turbidez.

En las muestras de carácter lítico, se observó que las Calvas eran totalmente transparentes sin otra morfología adicional, y en el medio líquido, estos tubos, a partir de las 48 horas se empezaban a volver totalmente transparentes, confirmando así la lisis por el fago. A diferencia de los resultados anteriores se observó que los controles de *Enterococcus faecalis* positivo y negativo funcionaron correctamente.

Al comparar, los resultados entre las diferentes cepas, se pudo observar que los fagos líticos, no era específicos para *Enterococcus faecalis*, pues también causaron lisis a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* pero no lo hizo contra *Escherichia coli* ni *Leptotrichia bucalis*, lo cual permite inferir, que probablemente eran fagos de amplio espectro contra Cocos Gram positivos.

Discusión

No existe suficiente literatura acerca de la fagoterapia aplicada en endodoncia, por ello este estudio decidió aislar fagos a partir de aguas residuales basándose en el estudio de Khalifa y colaboradores del año 2015 ¹⁹, en donde el aislamiento de fagos a partir de aguas residuales contra *Enterococcus faecalis* fue positivo.

Al necesitar aguas residuales altamente contaminadas se trabajó con aguas provenientes de la cuenca media y baja del río Bogotá, no se utilizó agua de la cuenca alta, ya que de acuerdo al informe del estado de calidad hídrica de la Jurisdicción de la corporación autónoma regional del año 2008, la cuenca alta presenta un estado relativamente bueno en cuanto a sus parámetros físicos y biológicos, como el grado de oxigenación que es suficiente para originar procesos aeróbicos que ayudan a la autodepuración del agua. Por otro lado, la cuenca media y baja presentan altos niveles de materia orgánica, nutrientes, baja oxigenación, alta concentración de patógenos y recibe efluentes domésticos e industriales altamente contaminados, impidiendo su auto recuperación, generando un ambiente anaerobio disminuyendo procesos biológicos. Debido a esto, la cuenca baja del río Bogotá fue positiva al aislamiento de fagos líticos en este estudio. A diferencia del agua proveniente de la cuenca media que recibe agua altamente contaminada, pero a su vez recibe el efluente de la Planta de tratamiento de aguas residuales domésticas (PTARD) el Salitre, siendo negativa al aislamiento de fagos líticos. Confirmando lo que se buscaba al utilizar dos fuentes diferentes de agua con diferente grado de contaminación, como se menciona en el artículo del 2017 de la Revista de la Facultad Nacional de Salud Pública de Colombia ²⁹, que la presencia o aumento de bacterias, parásitos, virus y hongos en el agua surge usualmente por efecto directo o indirecto de cambios en el medio ambiente y en la población tales como urbanización no controlada, crecimiento industrial, pobreza y la disposición inadecuada de excretas humanas y animales.

En la cuenca baja los ensayos permitieron observar que en 2 de las muestras de *Enterococcus faecalis* testeadas se encontraron fagos líticos. En una muestra en solo una de las cajas del ensayo por triplicado se observó la presencia de pocas calvas que tenían por característica ser homogéneas en su lisis, presentando calvas similares en su morfología y tamaño. Este aspecto es importante porque descarta que se tratara de alguna bacteriocina o antibiótico, en cuyo caso no se hubiera observado un número discreto de placas de lisis nítidas, sino un patrón de lisis difuso. (Figura 1) En una segunda muestra se observaron calvas en 2 de las 3 cajas, en este caso, el método de la doble capa de agar permitió determinar la naturaleza del agente productor de las placas de lisis. La observación macroscópica y fotográfica nos permitió apreciar presencia de fagos líticos con las siguientes características: múltiples calvas de lisis de *Enterococcus faecalis* en toda la caja; calvas no son uniformes en tamaño y morfología. Se observaron dos tipos de morfología. Unas calvas pequeñas totalmente líticas (Figura 1) las cuales corresponden a un fago lítico, de acuerdo a lo descrito por Azeredo 2008 ²⁶. Un segundo tipo de calva fue observado, y corresponde a placas opacas o con un desarrollo bacteriano central en forma de ojo de buey, los cuales de acuerdo a la literatura corresponden a un fago lisogénico (Lopardo, 1980)³⁰ (Figura 2).

Los anteriores resultados se deben a que los fagos líticos se unen a receptores específicos de la bacteria, introduce su material genético en el citoplasma bacteriano, libera enzimas líticas, acumula proteínas de la partícula viral, genera copias del genoma, resultando en el ensamblaje de partículas fágicas que lisan a la bacteria.⁵ Mientras que los fagos lisogénicos insertan su ácido nucleico y se replican como si fueran un gen más de la bacteria, sin causar lisis.¹⁵

En este estudio con el fin de confirmar que las respuestas negativas no correspondieron a un defecto técnico se realizó un segundo ensayo consistente en el preenriquecimiento de las aguas estudiadas según la metodología de Matzusaki 2018,²⁷ y screening de bacteriófagos activos mediante la prueba de Spot y Streak²⁸ ya que se ha observado que algunos casos las muestras de aguas pueden tener fagos, pero estos no alcanzan a difundirse y propagarse en el hospedero quedando libres en el medio. A diferencia de otros estudios como los de Khalifa y colaboradores del año 2015¹⁹ en donde no realizan segundos ensayos para confirmar la verdadera negatividad de las muestras, donde probablemente hay falsos negativos, por esto Matzusaki 2015²⁷, Fernandez y colaboradores 2017²⁸ proponen que todo resultado negativo debe ser reconfirmado para poder dar validez a la investigación.

Los bacteriofagos encontrados deben presentar ciertos requisitos para ser utilizados a nivel endodóntico, entre ellos: replicación exponencial en contacto con la bacteria patógena, mutar para combatir la resistencia de la bacteria, no generar efectos novicios ni secundarios, que no se difunda a tejidos vecinos, efecto local no sistémico, alta especificidad a receptores de la superficie del *Enterococcus faecalis*, y baja o nula actividad sobre bacterias de la microbiota oral, esto es importante ya que la mayoría de estos microorganismos exhiben en la cavidad oral una capacidad simbiótica y una relación con el hospedero basada en beneficios mutuos, como es el no causar daño a nivel oral y permitir que bacterias comensales eviten que especies patógenas se adhieran a las superficies mucosas.³¹ Con base a esto, se evaluó la especificidad de las muestras que resultaron positivas, se realizaron dos tipos de ensayos un cualitativo indirecto y directo para determinar si eran positivas únicamente para *Enterococcus faecalis* o también lisaban a la microbiota de la cavidad oral.

El ensayo indirecto propuesto por APHA 2005,²⁵ se considera el primer paso para valorar muestras que dieron positivas, aunque los resultados dependan de factores como la calidad del agua y las características del fago. Las muestras positivas ante *Enterococcus faecalis* fueron probada con las cepas control ATCC de *Enterococcus faecalis* y con las otras cepas de la cavidad oral, donde se observó que los fagos fueron positivos para los dos controles pero los resultados no eran uniformes ni reproducibles, los controles no funcionaban adecuadamente, ya que el agua utilizada correspondía a una alícuota que llevaba más de 1 semana en nevera, aspecto que probablemente disminuyó la vida media del fago en agua, o hizo que el agua perdiera sus condiciones óptimas de pH, descongelamiento, solubilidad y precipitación, e isotonicidad mostraban cambios una vez se refrigeraba, cambios que pueden influir en la sobrevivencia del fago y la bacteria. Y el ensayo cualitativo directo según la metodología de lisis confluyente²⁷, enfrentando las cepas de *Enterococcus faecalis* contra el fago directo y no contra el agua del que fue aislado, a través del método de doble capa de

agar y un método en medio líquido. Los resultados mostraron que los fagos no eran específicos para *Enterococcus faecalis*, pues también causaron lisis a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, confirmando que un fago para cumplir su ciclo lítico se une a receptores específicos como el ácido teicoico característica de bacterias gram positivas ⁵ lo cual es un dato muy importante, pues si bien no muestra especificidad hacia una bacteria, lo hace hacia un grupo bacteriano determinado como son los Cocos gram positivos, pudiéndose inferir que se encontró un fago de amplio espectro, y existen muchos protocolos de clonación celular para manejar esta información y poder usar posteriormente en fagoterapia.

Y el ensayo cualitativo directo según la metodología de lisis confluyente ²⁷, enfrentando las cepas de *Enterococcus faecalis* contra el fago directo y no contra el agua del que fue aislado, a través del método de doble capa de agar y un método en medio líquido. Los resultados mostraron que los fagos no eran específicos para *Enterococcus faecalis*, pues también causaron lisis a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, confirmando que un fago para cumplir su ciclo lítico se une a receptores específicos como el ácido teicoico característica de bacterias gram positivas ⁵ lo cual es un dato muy importante, pues si bien no muestra especificidad hacia una bacteria, lo hace hacia un grupo bacteriano determinado como son los Cocos gram positivos, pudiéndose inferir que se encontró un fago de amplio espectro.

El estudio mostró una baja frecuencia de fagos en las aguas estudiadas, coincidiendo con lo que se encontró en los estudios de Khalifa 2015 en donde se aisló un solo tipo de fago lítico EFDG1 con capacidad de eliminación biofilm a las 2 semanas, penetrando 100um en los túbulos dentinarios ¹⁹; se observó que cepas bacterianas evolucionaron volviéndose resistentes al fago EFDG1, por ello en otro estudio el mismo autor aisló un nuevo fago EFLK1 proveniente de aguas residuales, el cual fue capaz de erradicar la cepa resistente ³³. Tinoco y colaboradores 2017 mencionan que el fago ϕ Ef11 muestra eficacia en la eliminación de *Enterococcus faecalis*, además, secuenciaron el genoma de ϕ Ef11, dando lugar al fago ϕ Ef11/ ϕ FL1C(Δ 36)PnisA, el cual resulta ser más agresivo y viable en la fagoterapia contra *Enterococcus faecalis*. ²¹

Este estudio a diferencia de los anteriormente mencionados, no tuvo como objetivo la caracterización de los bacteriófagos aislados, únicamente fue detectar de manera cualitativa la capacidad lítica de los fagos aislados. Corroborando presencia de fagos líticos de aguas residuales en la cuenca baja del río Bogotá. Estudios futuros podrán caracterizar molecularmente estos fagos.

Conclusiones y recomendaciones

El trabajo de investigación permitió:

1. Dejar estandarizada la técnica para aislamiento contra fagos a partir de aguas residuales, siendo la más completa el método de la doble capa de agar.
2. Se encontró que, en aguas residuales potencialmente contaminadas con alta carga bacteriana, son las que tienen una mayor probabilidad de aislamiento de fagos.
3. Se encontraron fagos lisogénicos y líticos contra *Enterococcus faecalis*.

4. Los fagos encontramos no son específicos, se considera que son de amplio espectro, pero dado que solo lisaron bacterias Gram positivas, probablemente es un fago que actúa sobre ácido teicoico que es la molécula normal de adherencia de fagos contra Gram positivos.

Sugerencias para el siguiente trabajo.

El trabajo de investigación cumplió con los objetivos propuestos al detectar la existencia de fagos líticos contra *Enterococcus faecalis* en aguas residuales de la cuenca baja del río Bogotá. Estos fagos extraídos, actualmente guardados en nitrógeno líquido, para que a futuro sean caracterizados para analizar su funcionalidad y para ello se deben realizar las siguientes técnicas:

1. El agua es un vector de diferentes tipos de bacterias y sus fagos. Debido a la poca especificidad que da el alto grado de contaminación, hay estudios recientes que sugieren rastrearlos directamente en heces humanas (con la misma alimentación a la misma hora) y material purulento de patologías orales.
2. Se debe confirmar la presencia de fagos por microscopía electrónica.
3. Realizar una caracterización molecular del mismo, para lo cual se debe extraer el material genético y realizar técnicas de secuenciación.
4. Para la caracterización molecular de los fagos purificados se sugiere extraerlos con metodologías que no lesionen el ADN como es el uso de gradiente de densidad con CsCl por ultracentrifugación
5. Realizada la secuenciación se debe mirar en programas de Bioinformática como BLASTn L-Align y otros, esa secuencia del fago con que secuencias de bacterias es homóloga, pues esto ayuda a confirmar la especificidad.
6. Una vez verificada la secuencia, deben hacerse ensayos de descolonización *In Vitro*, en el cual, los fagos son colocados en contactos con *Enterococcus* y otras bacterias, para mirar si después del cultivo de bacteriófago, disminuye el número de bacterias respecto al número inicial de bacterias solas, y realizar ensayos hasta encontrar concentraciones exactas de fagos para número de bacterias.
7. Una vez se determine la concentración *In Vitro*, debe pasarse a realizar la colonización y descolonización *In Vivo* en modelos animales.
8. A través de los programas de Bioinformática es posible conocer la secuencia de nucleótidos y predecir la proteína o enzima ligada a la fase lítica. Hoy en día se propone que en fagoterapia, debe usarse estas enzimas y no el fago completo.

Referencias bibliográficas

1. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol*. 2003 Apr; 18 (2): 100-103.
2. Wang Q, Zhang C, Chu C, Zhu X. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. *Int J Oral Sci*. 2012 Apr;4(1):19-23. doi: 10.1038/ijos.2012.17.

3. Mazaheri NF, Barton R, Heuzenroeder MM. Novel bacteriophages in enterococcus spp. *Curr Microbiol* Jun 2009; 60 (6), pp 400-406. doi: 10.1007/s00284-009-9555-z
4. Love RM. *Enterococcus faecalis* - a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001 Jul;34(5):399-405.
5. Azeredo J, Sutherland I. The Use of Phages for the Removal of Infectious Biofilms. *Curr Pharm Biotechnol* 2008 Aug; 9(4), pp.261-6.
6. Lins RX, de Oliveira Andrade A, Hirata Junior R, Wilson MJ, Lewis MA, Williams DW, Fidel RA. Antimicrobial resistance and virulence traits of *Enterococcus faecalis* from primary endodontic infections. *J Dent*. 2013 Sep;41(9):779-86. doi: 10.1016/j.jdent.
7. Saffari F, Dalfardi MS, Mansouri S, Ahmadrajabi R. Survey for Correlation between Biofilm Formation and Virulence Determinants in a Collection of Pathogenic and Fecal *Enterococcus faecalis* Isolates. *Infect Chemother* 2017 Sep;49(3):176. doi: 10.3947/ic.2017.49.3.176.
8. Upadhyaya G, Umopathy B, Ravikumar K. Comparative study for the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin and biofilm among clinical and commensal isolates of *Enterococcus faecalis*. *Journal of laboratory physicians* 2010 Jul;2(2):100-4. doi: 10.4103/0974-2727.72159.
9. Zoletti GO, Pereira EM, Schuenck RP, Teixeira LM, Siqueira JF Jr, dos Santos KR. Characterization of virulence factors and clonal diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from treated dental root canals. *Research in Microbiology*. 2011 Nov;162(2):151-158. doi: 10.1016/j.resmic.2010.09.018.
10. Upadhyaya P, Ravikumar K, Umopathy B. Review of virulence factors of enterococcus: An emerging nosocomial pathogen. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2009; 27(4):301-5. doi: 10.4103/0255-0857.55437.
11. Mobarez A, Moghadam M, Kafil H. Adhesion and virulence factor properties of *Enterococci* isolated from clinical samples in Iran. *Indian J Pathol Microbiol*. 2013 Oct;56(3):238-42.
12. Prada C., Holguín A., González A., Vives M. Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. *Perspectivas en Colombia*. *Univ Sci* 2015; 20 (1):43-59. doi: 10.11144.
13. Ramírez B., Lopardo H., Centrón D. Aislamiento, caracterización y estudios de actividad de bacteriófagos líticos sobre *Enterococcus* spp. en modelos in vivo e in vitro. *Universidad Nacional de la Plata*. 2016.
14. Monk AB, Rees C, Barrow P, Hagens S, Harper D. Bacteriophage applications: where are we now? *Letters in Applied Microbiology*. 2010 Oct; 51(4): 363-369. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02916.
15. Uchiyama J, Takemura I, Satoh M, Kato S, Ujihara T, Akechi K, Matsuzaki S, Daibata M. Improved Adsorption of an *Enterococcus faecalis* Bacteriophage WEF24C with a Spontaneous Point Mutation. *PLoS ONE* 2011 Oct; 6(10): e26648. doi: 10.1371/journal.pone.0026648.

16. Qadir MI. Phage therapy: A modern tool to control bacterial infections. *Pak J Pharm Sci.* 2015 Jan; 28 (1), pp. 265-70.
17. Scholl D, Martin DW. Antibacterial Efficacy of R-Type Pyocins towards *Pseudomonas aeruginosa* in a Murine Peritonitis Model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 May; 52(5):1647-1652. doi: 10.1128/AAC.01479-07.
18. Khalifa L, Shlezinger M, Beyth S, Hourri-Haddad Y, Copenhagen-Glazer S, Beyth N, Hazan L. Phage therapy against *Enterococcus faecalis* in dental root canals. *J Oral Microbiol.* 2016;8(1):32157. doi: 10.3402/jom.v8.32157. eCollection 2016.
19. Khalifa L, Brosh Y, Gelman D, Copenhagen-Glazer S, Beyth S, Poradosu- Cohen R, Que Y-A, Beyth N, Hazan R. Targeting *Enterococcus faecalis* biofilms with phage therapy. *Appl Environ Microbiol* 2015 Apr; 81:2696 –2705.
20. Paisano AF, Spira B, Cai S, Bombana AC, A. In vitro antimicrobial effect of bacteriophages on human dentin infected with *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. *Oral Microbiol Immunol.* 2004 Oct; 19(5):327-30.
21. Tinoco J, Liss N, Zhang H, Nissan R, Gordon W, Tinoco E et al. Antibacterial effect of genetically-engineered bacteriophage ϕ Ef11/ ϕ FL1C(Δ 36)P nisA on dentin infected with antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis*. *Archives of Oral Biology.* 2017 Oct;82:166-170. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.06.005
22. Clokie M, Kropinski A. *Bacteriophages: Methods and Protocols Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions. Volume 1.* New York. Human Press. 2009.
23. Durán AE, Muniesa M, Méndez X, Valero F, Lucena F, Jofre J. Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. *J Appl Microbiol.* 2002; 92(2):338-47.
24. Covo Morales E, Díaz Caballero A, Simancas Pallares M. Expresión del gen esp (enterococcus surface protein) de *Enterococcus faecalis* en un modelo in vitro de dientes extraídos. *Av. Odontoestomatol.* 2016; 32 (4):. 195-04. ISSN 2340-3152.
25. American Public Health Association. *Standard methods for the Examination of Water and Wastewater*, 16ava. Ed. American Public Health Association, Washington, D.C. 2005.
26. Azeredo J, Sutherland I. The Use of Phages for the Removal of Infectious Biofilms. *Current Pharmaceutical Biotechnology.* 2008 Aug; 9(4):261-6.
27. Matsuzaki S, Uchiyama J, Takemura- Uchiyama I, Ujihara T, Daibata M. Isolation of Bacteriophages for Fastidious Bacteria. *Methods Mol Biol.* 2018;1693:3-10. doi: 10.1007/978-1-4939-7395-8_1.
28. Fernández Espinel C, Flores Dominick V, Medina Morillo M. Aislamiento y caracterización del bacteriófago Va1 específico a *Vibrio alginolyticus*. *Rev. peru biol.* 2017; 24 (1). doi.org/10.15381/rpb.v24i1.13103.
29. Ríos-Tobón S, Agudelo-Cadavid RM, Gutiérrez-Builes LA. Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*, 2017; 35(2): 236-247. DOI: 10.17533/udea.rfnsp.v35n2a08.

30. Lopardo H. Aislamiento y caracterización de bacteriófagos de Rhizobium. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.1980.
31. Avila M, Ojcius DM, Yilmaz O. The Oral Microbiota: Living with a Permanent Guest. *DNA Cell Biol.* 2009 Aug;28(8):405-11. doi: 10.1089/dna.2009.0874.
32. Schaudinn C, Gorur A, Keller D, Sedghizadeh PP, Costerton JW. Periodontitis: an archetypical biofilm disease. *J Am Dent Assoc* Aug 2009; 140:978-86. doi: 10.14219/jada.archive.2009.0307
33. Khalifa L, Copenhagen-Glazer S, Shlezinger M, Kott-Gutkowski, Adini O, Beyth N, Hazan R. Complete Genome Sequence of Enterococcus Bacteriophage EFLK1. *Genome Announc* 2015 Nov; 3(6). doi: 10.1128/genomeA.01308-15