



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
E.A.P. DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA



TESIS

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIOFAGOS LÍTICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* MDR AISLADOS DE AGUA RESIDUAL DEL HOSPITAL REGIONAL DOCENTE DE CAJAMARCA, 2024

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL
DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTADO POR:

BACH. CADENA CACHI, JENNIFER KATHERINE

ASESOR:

Dr. RIVERA JACINTO, MARCO ANTONIO

CO-ASESOR:

Mtro. PAIRAZAMÁN QUIROZ, OMAR DANIEL

CAJAMARCA – PERÚ

2025

CONSTANCIA DE INFORME DE ORIGINALIDAD

1. Investigador: **Jennifer Katherine Cadena Cachi**
DNI: **70611900**
Escuela Profesional/Unidad UNC: **ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA**
2. Asesor:
Dr. MARCO ANTONIO RIVERA JACINTO
Facultad/Unidad UNC: **FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**
3. Grado académico o título profesional al que accede:
☐ Bachiller ☒ Título profesional ☐ Segunda especialidad
☐ Maestro ☐ Doctor
4. Tipo de Investigación:
☒ Tesis ☐ Trabajo de investigación ☐ Trabajo de suficiencia profesional
☐ Trabajo académico
5. Título de Trabajo de Investigación:
CARACTERIZACIÓN DE BACTERIOFAGOS LÍTICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* MDR AISLADOS DE AGUA RESIDUAL DEL HOSPITAL REGIONAL DOCENTE DE CAJAMARCA, 2024
6. Fecha de evaluación del antiplagio: **30/10/2025**
7. Software antiplagio: ☒ **TURNITIN** ☐ **URKUND (OURIGINAL) (*)**
8. Porcentaje de Informe de Similitud: **15 %**
9. Código Documento: **oid:3117:520604796**
10. Resultado de la Evaluación de Similitud:
☒ **APROBADO** ☐ **PARA LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES O DESAPROBADO**

Cajamarca, 31 de octubre del 2025



* En caso se realizó la evaluación hasta setiembre de 2023

Copyright©

Jennifer Katherine Cadena Cachi

Todos los derechos reservados

FICHA CATALOGRÁFICA

Cadena, J. 2025. **Caracterización de bacteriófagos líticos de *Pseudomonas aeruginosa* MDR aislados de agua residual del Hospital Regional Docente de Cajamarca, 2024/** Cadena Cachi Jennifer Katherine.

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesor: Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto

Co-asesor: Mtro. Omar Daniel Pairazamán Quiroz

Disertación Académica para optar el Título Profesional de Biólogo Biotecnólogo UNC
– 2025.

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* MDR AISLADOS DE AGUA RESIDUAL DEL HOSPITAL REGIONAL DOCENTE DE CAJAMARCA, 2024

AUTOR: Bach. Jennifer Katherine Cadena Cachi

ASESOR: Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto

CO-ASESOR: Mtro. Omar Daniel Pairazaman Quiroz

Tesis evaluada y aprobada para la obtención del Título Profesional de Biólogo – Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados.

JURADO EVALUADOR


PRESIDENTE

Dra. Consuelo Belania Plasencia Alvarado


SECRETARIO

M.Cs. Arturo Ulises Díaz Aliaga


VOCAL

M.Cs. Nestor Estuardo Carbajal Caballero

Cajamarca, 2025 - Perú



Universidad Nacional de Cajamarca

"Norte de la Universidad Peruana"

Fundada por Ley 14015 del 13 de Febrero de 1962

Facultad de Ciencias de la Salud

Av. Atahualpa 1050

Teléfono/ Fax 36-5845



MODALIDAD "A"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

En Cajamarca, siendo las 8:30 am del 30 de octubre del 2025, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente 11-304 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada:

Caracterización de bacteriófagos líticos de *Pseudomonas aeruginosa* MDR aislados de agua residual del Hospital Regional Docente de Cajamarca, 2024

del (a) Bachiller en Ciencias Biológicas:

Jennifer Katherine Cadena Cachi

Siendo las 9:40 am del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: muy bueno, con el calificativo de: 18, con lo cual el (la) Bachiller en Ciencias Biológicas se encuentra apta para la obtención del Título Profesional de: **BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**.

Miembros Jurado Evaluador Nombres y Apellidos		Firma
Presidente:	Dra. Consuelo Belania Plasencia Alvarado	
Secretario(a):	M.Cs. Arturo Ulises Díaz Aliaga	
Vocal:	M.Cs. Nestor Estuardo Carbajal Caballero	
Accesitaria:		
Asesor (a):	Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto	
Co-Asesor (a):	Mto. Omar Daniel Pairazaman Quiroz	

Términos de Calificación:

EXCELENTE (19-20)

MUY BUENO (17-18)

BUENO (14-16)

REGULAR (12-13)

REGULAR BAJO (11)

DESAPROBADO (10 a menos)

A:

Mi madre, Jesús Cachi Ramírez, por su apoyo y amor incondicional que ha sido mi fuente de fortaleza e inspiración a lo largo de mi formación personal y académica. Gracias por sus sabios consejos por su paciencia infinita, por enseñarme con su ejemplo a perseverar y ser valiente, cada uno de mis logros le pertenecen también

AGRADECIMIENTOS:

A Dios, por brindarme la sabiduría y fortaleza necesaria para seguir progresando en mis objetivos.

A mi madre y hermana, por ser mi refugio, por su aliento, alegría y paciencia constante; a mis abuelitos Andrés y María; a mi padre Francisco, por su cuidado y amor durante todos estos años.

A mi co-asesor Mtro. Omar Daniel Pairazamán Quiroz, por su confianza, compromiso y dedicación en cada paso de esta investigación; por sus valiosos consejos, las palabras me quedan cortas para expresarle toda mi gratitud. A mi asesor Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto, por su minuciosidad y guía para la mejora de esta tesis, por su apoyo en cada consulta realizada y por sus valiosas sugerencias que ayudaron a fortalecer esta tesis.

A Joey, quien me apoyó durante este proceso, por tomarse el tiempo de fotografiar parte de los resultados, sobre todo por escuchar cada idea para el desarrollo de esta tesis.

Al Laboratorio de Referencia Regional de Salud Pública de Cajamarca, en especial al área de bacteriología por facilitarme materiales y equipos necesarios para la realización de esta investigación. Gracias a la Técnico Soledad, por la alegría y palabras de apoyo. Al Hospital Regional Docente de Cajamarca, por su disposición y apoyo en la toma de muestras.

Finalmente, a mis amigos y a las personas que contribuyeron de diferentes formas en los detalles de esta tesis.

CONTENIDO

CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II	3
MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Antecedentes de la investigación.....	3
2.2. Bases teóricas	8
2.2.1. Epidemiología	8
2.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
2.2.2.1. Factores de patogenicidad de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
2.2.2.2. Mecanismos de resistencia a antimicrobianos en <i>P. aeruginosa</i>	14
2.2.2.3. Niveles de resistencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
2.2.3. Bacteriófagos.....	20
2.2.3.1. Naturaleza del genoma de los bacteriófagos	20
2.2.3.2. Genoma de los bacteriófagos.....	22
2.2.3.3. Taxonomía y estructura de los bacteriófagos	23
2.2.3.4. Mecanismos de replicación	25
2.2.4. Caracterización de bacteriófagos.....	27
2.2.4.1. Técnicas de enumeración e identificación de bacteriófagos	27
2.2.4.2. Caracterización biológica de bacteriófagos.....	28
2.2.4.3. Caracterización microbiológica	29
2.2.5. Terapia con bacteriófagos	31
2.2.6. Especificidad de bacteriófagos en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33

3.5.12.2. Efecto de la temperatura de incubación en la concentración de bacteriófagos	43
3.6. Técnicas de procesamiento y análisis de datos	44
CAPÍTULO IV	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
4.1. Resultados	45
4.1.1. Reactivación e identificación microbiológica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45
4.1.2. Perfil de resistencia de las <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en estudio.....	45
4.1.3. Determinación de infección previa por profagos en <i>P. aeruginosa</i>	46
4.1.4. Determinación de la presencia de bacteriófagos por la formación de placas líticas	47
4.1.5. Aislamiento y purificación de bacteriófagos.....	48
4.1.6. Titulación de los bacteriófagos purificados	50
4.1.7. Caracterización biológica de bacteriófagos purificados	51
4.1.7.1. Determinación de rango de hospederos.....	51
4.1.7.2. Curva de crecimiento de un solo paso.....	54
4.1.8. Caracterización fisicoquímica de bacteriófagos.....	55
4.1.8.1. Efecto del pH sobre la concentración de los bacteriófagos	55
4.1.8.2. Efecto de la temperatura sobre la concentración de los bacteriófagos.....	55
4.2. Discusión.....	58
CAPÍTULO V	73
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	73
5.1. Conclusiones	73
5.2. Recomendaciones	74
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

APÉNDICES	94
Apéndice 1. Toma de muestras de agua residual del HRDC.....	94
Apéndice 2. Identificación de aislamientos de <i>P. aeruginosa</i>	94
Apéndice 3. Método de difusión en disco para evaluar susceptibilidad a antimicrobianos en <i>P. aeruginosa</i>	95
Apéndice 4. Placas líticas formadas por la actividad de los bacteriófagos empleando la técnica de <i>spot test</i>	96
Apéndice 5. Morfología de las placas líticas de los 22 bacteriófagos purificados.	97
Apéndice 6. Rango de hospederos de seis bacteriófagos sobre los aislados de <i>P. aeruginosa</i> en estudio.....	98
Apéndice 7. Valores de las repeticiones de las curvas de crecimiento de los bacteriófagos seleccionados.	99
Apéndice 8. Efecto de pH sobre la concentración de los bacteriófagos.....	100
Apéndice 9. Efecto de la temperatura de incubación sobre la concentración de los bacteriófagos.	100
ANEXOS.....	101
Anexo 1. Procedimiento de la coloración Gram.....	101
Anexo 2. Características diferenciales para la identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	101
Anexo 3. Lista de antimicrobianos que se utilizaron y criterios de susceptibilidad según CLSI, 2025.....	102

LISTA DE ILUSTRACIONES

Índice de figuras

Figura 1. Evaluación fenotípica de profagos en las once cepas de <i>P. aeruginosa</i> MDR.	47
Figura 2. Placas líticas representativas de las tres morfologías observadas en los bacteriófagos.	49
Figura 3. Capacidad lítica de los bacteriófagos sobre <i>P. aeruginosa</i> MDR, según el número y/o porcentaje de cepas lisadas.....	53
Figura 4. Susceptibilidad bacteriana frente a los 22 bacteriófagos obtenidos en este estudio.....	53
Figura 5. Curvas de crecimiento un solo paso para los bacteriófagos seleccionados.	54
Figura 6. Efecto del pH sobre la titulación de los bacteriófagos.	56
Figura 7. Efecto de las temperaturas de incubación sobre la titulación de los bacteriófagos.	57

Índice de tablas

Tabla 1. Perfil de resistencia antimicrobiano de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDR del LRRSP, Cajamarca.	46
Tabla 2. Detección de placas líticas por bacteriófagos aislados de las muestras de agua residual frente a cepas de <i>P. aeruginosa</i> MDR.....	48
Tabla 3. Titulación de los bacteriófagos purificados.....	50
Tabla 4. Rango de hospederos de cada bacteriófago.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

CaCl₂: Cloruro de calcio.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

HCl: ácido clorhídrico.

HRDC: Hospital Regional Docente de Cajamarca.

LB: Luria Bertani.

LRRSP: Laboratorio Referencial Regional de Salud Pública.

MDR: Multidrogorresistencia o multirresistente.

NaCl: Cloruro de sodio.

NaOH: Hidróxido de sodio.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

pH: Potencial de hidrógeno.

RAM: Resistencia antimicrobiana.

RPM: Revoluciones por minuto.

UFP: Unidades Formadoras de Placa.

μL: Microlitros.

GLOSARIO

Halo de lisis: Denominado también calva, es un área clara producida por la acción lítica de los bacteriófagos en las bacterias, permite detectar bacteriófagos respecto a la lectura o titulación de placas (1).

Cultivo overnight: Cultivo bacteriano incubado a 37 °C durante una noche (2).

Título de fago: Referido al número de partículas de bacteriófagos presentes en una suspensión o muestra. Permite cuantificar la concentración de bacteriófagos (3).

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS DE *Pseudomonas*
aeruginosa MDR AISLADOS DE AGUA RESIDUAL DEL HOSPITAL
REGIONAL DOCENTE DE CAJAMARCA, 2024**

RESUMEN

Frente a las graves infecciones provocadas por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente (MDR), los fagos emergen como alternativa prometedora. La presente investigación tuvo como objetivo general caracterizar bacteriófagos con capacidad lítica contra *P. aeruginosa* MDR aislados de aguas residuales del Hospital Regional Docente de Cajamarca durante el 2024, para lo cual se procesaron diez muestras, de las que se obtuvieron lisados fágicos que permitieron aislar y purificar 22 fagos mediante las técnicas de agar doble capa (DLA) y *spot test*. La titulación varió desde $1,2 \times 10^7$ (P15AR1) hasta $8,5 \times 10^{15}$ UFP/mL (P07AR8). El fago P07AR8 mostró el espectro más amplio, dado que infectó a todas las cepas de *P. aeruginosa*, incluida la cepa ATCC 27853. El fago P15AR1 infectó solo a su cepa hospedero inicial. Algunos fagos mostraron actividad lítica sobre *E.coli* ATCC25922 (P19AR2), *S. aureus* ATCC25923 (P14AR1), *Salmonella* sp. (P15AR2), *Klebsiella pneumoniae* (P07AR2), y *K. aerogenes* (P14AR1 y P07AR2). El periodo de latencia de los fagos seleccionados osciló entre 5 y 10 minutos, con tamaños de explosión de 19,8 a 52 UFP/célula. Todos los bacteriófagos toleraron un rango de pH entre 3 y 9 durante una hora. La temperatura de 60 °C redujo significativamente su concentración. Las cepas bacterianas utilizadas y la totalidad de los procedimientos experimentales se realizaron en el Laboratorio Referencial Regional de Salud Pública de Cajamarca. Los resultados posicionan a los bacteriófagos aislados como potenciales agentes biotecnológicos para combatir las infecciones causadas por *P. aeruginosa* MDR, destacando el fago P07AR8 por su amplio espectro y mayor estabilidad a diferentes condiciones.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, resistencia antimicrobiana, bacteriófagos, placas líticas.

ABSTRACT

In response to the severe infections caused by multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa*, bacteriophages are emerging as a promising alternative. The objective of this study was to characterize bacteriophages with lytic activity against *P. aeruginosa* MDR strains isolated from wastewater samples of *Hospital Regional Docente de Cajamarca* during 2024. A total of ten samples were processed, from which phage lysates were obtained, allowing the isolation and purification of twenty-two phages using the double-layer agar (DLA) and spot test techniques. The phage titres ranged from $1,2 \times 10^7$ (P15AR1) to $8,5 \times 10^{15}$ PFU/mL (P07AR8). Phage P07AR8 exhibited the broadest host range, infecting all *P. aeruginosa* strains, including the reference strain ATCC 27853. In contrast, phage P15AR1 infected only its original host strain. Some phages also showed lytic activity against *Escherichia coli* ATCC 25922 (P19AR2), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (P14AR1), *Salmonella* sp. (P15AR2), *Klebsiella pneumoniae* (P07AR2), and *K. aerogenes* (P14AR1 and P07AR2). The latent period of the selected phages ranged from 5 to 10 minutes, with burst sizes between 19,8 and 52 PFU per cell. All bacteriophages tolerated a pH range from 3 to 9 for one hour, while exposure to 60 °C significantly reduced their concentrations. The bacterial strains used, and all experimental procedures were conducted at the *Laboratorio Referencial Regional de Salud Pública de Cajamarca*. These findings position the isolated bacteriophages as potential biotechnological agents to combat infections caused by *P. aeruginosa* MDR strains, highlighting phage P07AR8 for its broad host range and greater stability under different conditions.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, antimicrobial resistance, bacteriophages, lytic plaques.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Las infecciones causadas por bacterias multirresistentes (MDR) son un importante problema de salud pública; en los últimos años, la incidencia de estos microorganismos ha incrementado de forma acelerada, al igual que su nivel de resistencia frente a múltiples antimicrobianos (4). Entre las bacterias frecuentemente aisladas destaca *Pseudomonas aeruginosa*, la cual, desde el 2017, se encuentra entre los patógenos con prioridad crítica debido a las serias complicaciones que genera y a su alta prevalencia entre pacientes inmunocomprometidos, con fibrosis quística y quemaduras (5,6).

P. aeruginosa puede causar infecciones graves del trato urinario y de tejidos blandos, incluyendo bacteriemias (7). Es la principal responsable de infecciones respiratorias en pacientes de unidad de cuidados intensivos (UCI) debido a la formación de biofilms sobre los instrumentos utilizados (8). Es así como, el incremento de la resistencia y la fácil diseminación de la bacteria ha dificultado su tratamiento y erradicación (9,10). Por esto, *P. aeruginosa* se asocia a una elevada morbilidad y mortalidad y costes económicos; ocasionando más de 300 000 muertes al año a nivel global (11).

La ineficacia de los fármacos contra *P. aeruginosa* debido a su resistencia intrínseca y a la MDR de algunas cepas dejan pocas opciones para enfrentar las infecciones ocasionadas por esta bacteria, entre estas alternativas destacan los bacteriófagos, los que constituyen una posibilidad eficaz debido a su potencial bactericida, además poseen un comportamiento farmacocinético similar al de los fármacos convencionales debido a la forma en que se distribuyen, absorben y eliminan del cuerpo, esto facilita su formulación

y administración en tratamientos (12,13). Asimismo, los bacteriófagos realizan sinergismo con algunos antimicrobianos reduciendo el número de bacterias *in vivo* a un nivel donde el sistema inmune las enfrente de manera exitosa (14).

En la actualidad, en el departamento de Cajamarca se carece hasta la fecha de investigaciones relacionadas al aislamiento y caracterización de bacteriófagos a partir de aguas residuales o de cualquier otra fuente. Esta ausencia constituye una oportunidad de desarrollo de una línea investigativa base para proyecciones futuras orientadas a la investigación y desarrollo de la fagoterapia como alternativa antimicrobiana para el tratamiento de patógenos peligrosos como *P. aeruginosa* MDR, generando así un beneficio a la comunidad en general.

Basado en lo descrito anteriormente, la presente investigación tuvo como objetivo general caracterizar bacteriófagos con capacidad lítica sobre *P. aeruginosa* MDR, aislados de agua residual del Hospital Regional Docente de Cajamarca, 2024. Para ello, se emplearon procedimientos microbiológicos enfocados en aislar y purificar bacteriófagos para su posterior caracterización según parámetros biológicos y fisicoquímicos.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Nour El-Din *et al.* (15) en el 2025, caracterizaron 4 bacteriófagos a partir de agua residual en Ottawa utilizando cepas de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes con fibrosis quística. Se empleó la técnica DLA (agar doble capa). Los resultados evidenciaron que el fago AA20 logró lisar el 58,9% de las bacterias, mientras que U17 solo el 16,1%. Este último mostró sensibilidad a pH menores de 7,5 e inactivación a temperaturas superiores de 70 °C, además, presentó un periodo de latencia de 90 minutos y tamaño de explosión de 185 UFP / célula. Genotípicamente, todos los fagos fueron estrictamente líticos, sin genes de resistencia a antibióticos, virulencia o represión. Concluyeron que sus características fenotípicas y genómicas hacen que estos fagos sean candidatos prometedores para fines terapéuticos, ya sea individualmente o en combinación.

Rieper *et al.* (16) en el 2025, aislaron 25 bacteriófagos de aguas residuales de Alemania para probar su susceptibilidad en 141 cepas de *P. aeruginosa* para determinar qué fago es el más adecuado para terapia. Compararon dos métodos de aislamiento: la técnica DLA y el ensayo de muerte planctónica (PKA), cuya correlación fue del 70%, siendo PKA más eficaz para predecir la susceptibilidad de los fagos, por ser más rápido y menos propenso a la interpretación individual. A través de microscopía electrónica de transmisión (TEM) los fagos se clasificaron en miovirus, podovirus, sifovirus y fagos jumbo. Se concluyó que el 72% de los fagos eran estrictamente líticos, esto además de rangos de hospederos adecuados y factores como la estabilidad a diferentes pH y temperaturas permite determinar si un fago puede usarse con fines terapéuticos.

Zhang *et al.* (17), en el 2024, caracterizaron dos bacteriófagos (YL1 y YL2) de *P. aeruginosa* a partir de aguas residuales de una granja en China con el objetivo de sentar bases para el desarrollo de terapias fágicas para *P. aeruginosa* en animales silvestres. Usaron la técnica DLA para su aislamiento. El TEM reveló que los fagos tenían la morfología típica de un podovirus. YL1 mostró un rango de hospederos del 40,6% (67 de 165 bacterias) y YL2 del 32,1%. Ambos fagos mantuvieron su actividad a pH de 4 a 10 pero fueron sensibles a irradiación UV. YL1 y YL2 presentaron periodos de latencia cortos, de 10 y 15 minutos respectivamente. Evaluaron su eficacia en un modelo murino con neumonía hemorrágica, observando una reducción significativa de la carga bacteriana pulmonar. Concluyeron que, YL1 e YL2 tienen el potencial terapéutico contra *P. aeruginosa* MDR siendo más efectiva la terapia con cóctel de fagos que con un solo fago.

Akreml *et al.* (18) en el 2022, tuvieron como objetivo caracterizar fagos líticos de *P. aeruginosa* en aguas residuales de Túnez identificaron 4 fagos mediante DLA cuyo análisis genómico con VirulenceFinder reveló la ausencia de fagos asociados a toxinas o RAM. El rango máximo de hospederos fue del 30%. Los cuatro fagos mostraron una formación óptima de placas líticas a 37 °C y pH 7. Además, mostraron estabilidad a temperaturas de 4 a 50 °C y pH entre 5 y 9. El fago Ps12onD, tuvo un periodo de latencia 10 minutos y un tamaño de explosión de 115 UFP / célula. El análisis del genoma reveló que los fagos pertenecieron al género Pakpunavirus. Determinaron que estos fagos debido a su amplio rango de hospederos, estabilidad térmica y de pH son excelentes candidatos para aplicarlos como respuesta a la resistencia bacteriana, recomendando estudios para confirmar su eficacia *in vivo*.

González *et al.* (19) en el 2018, caracterizaron fagos líticos de *P. aeruginosa* con el fin de poner a prueba su potencial como alternativa antimicrobiana. El aislamiento se realizó a partir de 50 muestras de aguas residuales domésticas en Venezuela, mediante la técnica de DLA. Evaluaron el rango de hospederos empleando cepas de *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Micrococcus luteus*. Como resultado, en el 60% de las muestras obtuvieron fagos antipseudomónicos, dentro de los cuales el 85% infectaron a todas las cepas de *P. aeruginosa* con un promedio de 0,5 – 3 mm de la placa de lisis, además dos fagos lisaron a *S. aureus*. El mayor conteo de calvas fue obtenido entre las temperaturas de incubación de -20 °C a 25 °C. Concluyeron que los bacteriófagos aislados son específicos para *P. aeruginosa*, presentando placas de lisis de tamaño considerable, haciéndolos candidatos adecuados para en el desarrollo de agentes con interés biomédico para el control de *P. aeruginosa* MDR.

Sánchez (2) en el 2020, con la finalidad de caracterizar fenotípicamente bacteriófagos de *P. aeruginosa* multirresistente (PAMR) aislados de agua de albañal en Trujillo - Perú, empleó la prueba *spot test* y DLA. En los resultados, los fagos mostraron una alta sensibilidad a la luz UV perdiendo incluso el 100% de su infectividad. Por otro lado, 6 fagos lisaron entre 5 y 8 de las 10 bacterias de PAMR, mientras que, algunos mantuvieron su infectividad a pH 9 y la perdieron a pH 3. La mayoría fueron estables a temperaturas a 42 °C y 47 °C. Concluyeron que algunos fagos a pesar de haber presentado un amplio rango de hospederos no serían ideales para ser empleados en un coctel de uso terapéutico ya que su infectividad se vio reducida por las diferentes condiciones, mientras que otros fagos a pesar de tener su rango de hospederos estrecho mantuvieron su infectividad.

Llanos (20) en el 2019, con el fin de aislar bacteriófagos de efluentes hospitalarios y agua del río Lurín, Lima – Perú, utilizó como hospederos aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* MDR. La detección y preparación de suspensiones la realizó por la técnica de DLA. Determinó la especificidad lítica frente a *P. aeruginosa* y otras bacterias ATCC; realizó la curva de crecimiento de un solo paso por el método de “bacteriophage agar”. Aisló 9 fagos, la mayoría presentó un halo de 4 mm con centro claro. El fago nativo ΦMARC-GA presentó un periodo de latencia de 40 minutos y un tamaño ráfaga de 100 UFP/célula; el periodo de ensamblaje y liberación inició a los 40 minutos y duró 15 minutos. La TEM indicó que el fago perteneció los podovirus. El bacteriófago infectó a un 14% de la población total de aislados. Concluyó que, liberar un número alto de progenie aumenta las probabilidades de que el fago alcance a más bacterias blanco, incrementando así sus concentraciones en presencia del hospedero.

Alegre (21) en el 2019, tuvo como objetivo caracterizar un bacteriófago lítico de *Listeria monocytogenes* a partir de aguas servidas de camales en Lima - Perú, empleando DLA. Las placas lítica del fago ASCF1 formaron un diámetro promedio de 0,0446 mm con un título de $4,07 \times 10^{11}$ UFP/mL. El fago tuvo estabilidad a 4 °C, 25 °C y 45 °C y tolerancia a pH ácido y alcalino, teniendo a pH 9 una mayor concentración. El fago lisó aislados de *L. monocytogenes* y en menor medida de *Vibrio cholerae* y *Salmonella Typhimurium*. Tuvo una multiplicidad de infección (MOI) óptima de 10 con periodo de latencia de 120 minutos y un tamaño de explosión de 9,72 UFP / célula. Afirmó que los fagos al estar adaptados a sus hospederos son estables a temperaturas y pH cercanos a la de estos. El fago, además, puede ser aplicado para descontaminar superficies y alimentos.

García y Porras (3) en el 2018, con el fin de aislar y caracterizar bacteriófagos de *P. aeruginosa* MDR a partir de muestras de agua de tres ríos de la provincia de Lima, Perú, emplearon la prueba *spot test* para el aislamiento y DLA para la cuantificación. Obtuvieron 10 lisados activos contra *P. aeruginosa* MDR, teniendo periodos de latencia en su mayoría entre 0 y 10 minutos con tamaños de explosión de 15 a 3 688 UFP/célula y tasas de adsorción entre $1,91 \times 10^{-9}$ y $1,32 \times 10^{-8}$ mL/minutos. Determinaron que tener cortos periodos de latencia y grandes tamaños de explosión pueden contribuir a que los fagos sean potenciales agentes terapéuticos, ya que, aumentan las posibilidades de controlar mejor las poblaciones bacterianas.

Punil (22) en el 2017, tuvo como objetivo caracterizar un bacteriófago específico de *Escherichia coli* proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales en Lima, Perú. El aislamiento lo realizó por *spot test* y los demás ensayos por la técnica de DLA. El fago ΦGF1 fue estable a un rango de pH 5 a 8 y temperaturas de 40 °C y 50 °C hasta por 1 hora; sin embargo, a pH 3 y 4 se degradaron en mayor medida. Posterior a 4 meses de almacén a 25 °C, 4 °C y -20 °C la temperatura óptima fue de -20 °C en la cual redujo solo 49% su concentración. El fago infectó 3 aislados en estudio, además de cepas ATCC de *E. coli* y *Shigella sonnei*. El tiempo de latencia fue de 15 minutos y su tamaño de explosión de 85 UFP/célula. La estructura del fago fue de un podovirus. Concluyó que el fago ΦGF1 al presentar un amplio rango de hospedero y otras características lo convierte en un buen candidato para reducir la contaminación por *E. coli*.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Epidemiología

La incidencia de infecciones asociadas a la atención de salud (IAAS), en países de bajos y medianos ingresos son de 3 a 4 veces mayor en comparación a los países más desarrollados, además conducen al incremento de las estancias hospitalarias, resistencia a los antimicrobianos y tasas de mortalidad más altas (23). Uno de los tipo más frecuente de IAAS, es la asociada al ventilador mecánico que afecta al sistema respiratorio, siendo causadas con mayor frecuencia por bacterias gramnegativas, en particular de los géneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Escherichia* y *Klebsiella* (24).

En Estados Unidos, las infecciones provocadas por microorganismos resistentes generan alrededor de 35 mil muertes anuales (25). Las bacteriemias en pacientes con cáncer, causadas por *P. aeruginosa* MDR representa un tercio de los casos (26). En 2017, el 60% de las bacteriemias en pacientes con leucemia en China fueron a causa de bacterias gramnegativas incluido *P. aeruginosa* la cual representó el 65% de los casos (27). Por otro lado, en un hospital público de Argelia, se analizaron 85 muestras clínicas de diferentes pacientes de las cuales 57 resultaron positivas para infección bacteriana, la mayoría de los casos correspondieron al área de pediatría y cirugía teniendo como patógeno predominante *E.coli* seguido por *S.aureus*, *K.pneumoniae* y *P.aeruginosa* (28).

P. aeruginosa causan infecciones con una mortalidad a nivel mundial que varía de 35% a 70% (29). Es la segunda causa más común de neumonía adquirida y asociada al respirador, en unidad en cuidados intensivos (UCI) pediátrico es la causa más frecuente de neumonía intrahospitalaria (30). Produce bacteriemias de 4% a 6% de los casos llegando hasta 20% en pacientes quemados internados en UCI (31). En Casanare –

Colombia, fue el microorganismo aislado más prevalente siendo causante de infecciones del torrente sanguíneo, neumonía asociada al ventilador mecánico e infección sintomática del tracto urinario en pacientes UCI pediátrico y adulto (32).

En el Hospital Universitario de Heraklion, Grecia, en el 2023 el aislamiento más común y con mayor resistencia fue *P. aeruginosa* con una mortalidad del 44,2% del cual un 29,6% de defunciones fue a los 30 días de generada la sepsis, esto en pacientes con alta probabilidad de ser hospitalizados en UCI (33). En España, en los años 2016 - 2020, del total de bacteriemias, *P. aeruginosa* tuvo una frecuencia del 32,5%, causando un 35% de mortalidad (34). Existe una tendencia creciente de infección por *P. aeruginosa* susceptible a los carbapenémicos, pudiendo estar asociado con un mayor consumo de cefalosporinas de tercera generación durante la pandemia de COVID-19 (35).

En doce regiones del Perú, a partir de aislamientos de instituciones prestadoras de servicios (IPRESS), se encontró una prevalencia de 42,2% del orden Enterobacterales, 32,9% de *P. aeruginosa* y 24,9% de *Acinetobacter* spp. (36). Asimismo, los mayores porcentajes de bacterias gramnegativas aisladas en UCI del Hospital Víctor Lazarte Echegaray en Trujillo entre el 2021 y 2022 fueron *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (37).

El Ministerio de Salud (MINSA), en el 2022 notificó una alerta epidemiológica, debido a brotes de IAAS generados por Enterobacterales, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. indicando que los establecimientos con pacientes COVID-19 y UCI deben fortalecer vigilancias epidemiológicas y realizar screening de la presencia de carbapenemasas con confirmación fenotípica (36). Como parte de la vigilancia epidemiológica en Perú, en el

2020 se detectó carbapenemasas de tipo KPC en *P. aeruginosa*, esta enzima puede diseminarse a través de elementos móviles genéticos hacia otras bacterias intrahospitalarias, aumentando la morbimortalidad de los pacientes (38). La frecuencia de *P. aeruginosa* en ese mismo año en muestras de secreciones endotraqueales de pacientes hospitalizados en una clínica privada de Lima fue del 29,3% (39).

En pacientes del servicio UCI de dos hospitales de Cajamarca, en el 2020 se determinó que el 60% de aislados correspondieron a *P. aeruginosa* productoras de BLEE (β -lactamasas de espectro extendido), conteniendo un gran reservorio de genes de resistencia (40). En el HRDC, la bacteria gramnegativa aislada con mayor frecuencia en cultivos de servicio de UCI del 2016 al 2018 fue *P. aeruginosa* (41,3%), que fue resistente a todos los antibióticos probados en los que se incluye ciprofloxacina, imipenem, gentamicina, ceftazidima, levofloxacino y tobramicina (41). En el 2018 se determinó que, de las cepas gramnegativas no fermentadoras aisladas de pacientes en unidades críticas del HRDC, el 10,8% son *P. aeruginosa* productoras de carbapenemasas (42).

2.2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es una bacteria patógena oportunista considerada como aerobia facultativa, es gramnegativa, tiene forma abastionada con 0,5 a 1 μm de diámetro y 1,5 a 5 μm de largo; no forma esporas y posee un flagelo polar por lo que es móvil, aunque se han observado cepas con dos o más flagelo; su temperatura óptima de crecimiento es de 25 °C a 37 °C, pudiendo crecer a temperaturas superiores de los 42 °C lo que permite diferenciarla de otras especies del género *Pseudomonas* (43). Forma parte del grupo de los no fermentadores obteniendo energía de la oxidación de azúcares, es catalasa y oxidasa positivo e hidroliza la arginina (44,45).

Las colonias formadas producto del crecimiento de esta bacteria a menudo se observan con un brillo metálico y olor a frutas, aquellas cepas que no forman pigmentos presentan un color gris pálido y cuando son cultivadas en agar sangre normalmente producen hemólisis (46). La mayoría de las cepas producen pigmentos que se tornan fluorescentes bajo luz ultravioleta de onda baja sobre todo cuando crecen en un medio de cultivo con hierro limitado; estos pigmentos son la pioverdina (amarillo verdoso), la piorrubina (rojo pardo) y la piocianina (azul verdoso) la cual se evidencia cuando la bacteria se cultiva en medio King A (45,47).

La piocianina promueve la persistencia de *P. aeruginosa* en los pulmones de pacientes con fibrosis quística e interfiere con funciones celulares como la respiración, el crecimiento, la homeostasis del calcio y la liberación de prostaciclina de las células endoteliales pulmonares, además, induce a la persistencia de otras especies, como *A. baumannii*, en entornos polimicrobianos (48,49). La pioverdina permite que las bacterias se multipliquen en ausencia de iones ferrosos (50).

P. aeruginosa presenta un cromosoma con un alto contenido de G y C (65-67%), que le permite codificar una gran variedad de enzimas asociadas a diversas vías metabólicas, lo que le confiere una notable versatilidad nutricional y metabólica, permitiéndole sobrevivir en entornos acuosos con nutrientes mínimos, como fluidos de irrigación y diálisis e incluso desinfectantes (46,49). Puede colonizar regiones húmedas del cuerpo como la faringe, mucosa nasal, las axilas o el perineo; además, puede persistir en superficies secas durante un largo periodo debido a la formación de biopelícula, contaminando a menudo equipos de atención médica (51,52).

P. aeruginosa genera infecciones que son prevalentes en pacientes inmunocomprometidos, con fibrosis quística, quemaduras, leucemia aguda y trasplantes de órganos (53). Las infecciones ocurren en cualquier sitio donde exista humedad como las vías urinarias y respiratorias, provoca además, infecciones como queratitis, endocarditis, meningitis, dermatitis y otitis; la mayoría de pacientes con endocarditis por *P. aeruginosa* requiere el reemplazo de válvula ya que es difícil de erradicar (46,54).

2.2.2.1. Factores de patogenicidad de *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa debe su virulencia a una variedad de factores que son importantes en la patogénesis, estos factores incluyen adhesinas, exotoxinas, proteasas, hemolisinas, entre otros, que mejoran la capacidad de la bacteria para colonizar, invadir y persistir dentro de los tejidos del hospedero (51,52).

Posee seis tipos de sistemas de secreción, que incluye el pili tipo IV (T4SS) que le confiere la capacidad de realizar “swarming” y “twitching motility” un movimiento de relajación contracción, independiente del flagelo; los T4SS permiten la adhesión al hospedero, diseminación y agregación de microcolonias (44,55). El sistema de secreción tipo III (T3SS), es el más común en patógenos gramnegativos, transporta toxinas, facilita la colonización del hospedero y la señalización quimiotáctica, e inyecta proteínas efectoras que alteran la respuesta inmune, generando daño y muerte celular; además, se asocia a un incremento del riesgo de mortalidad de hasta seis veces (45,56).

La exotoxina A es secretada por el sistema de secreción tipo II (T2SS), inhibe el factor de elongación (eEF-2) y la síntesis de proteínas, su expresión está inducida por las condiciones limitantes de oxígeno en el hospedero, esta toxina posee además actividad

inmunodepresora (56). La proteasa alcalina, una metaloproteasa secretada por el T1SS, activa el canal de sodio epitelial en la fibrosis quística, degrada el interferón gamma e inhibe el consumo de oxígeno de los neutrófilos (51,52). La destrucción tisular generada por *P. aeruginosa* también se debe a la acción de las elastasas que hidrolizan la elastina, el fibrinógeno, el colágeno y las inmunoglobulinas (56). Las exoenzimas S y T, toxinas extracelulares, por su parte, producen daños en las células epiteliales facilitando la diseminación bacteriana e invasión tisular (44,51).

El flagelo de *P. aeruginosa* posee las proteínas FliD y FliC, la primera permite la adhesión a la mucosa de las vías respiratorias, mientras que la segunda desencadena la secreción de péptidos antimicrobianos y la acción de los neutrófilos induciendo una respuesta inflamatoria, para evitar esta inducción *P. aeruginosa* suprime la regulación del gen que codifica para la flagelina y así cambia su fenotipo a una cepa mucoide, a través de la producción de grandes cantidades de alginato, el responsable del mal pronóstico y la mortalidad de pacientes con fibrosis quística (44,46).

La biopelícula o cápsula extracelular producida por *P. aeruginosa* está compuesta principalmente por alginato, aunque también contiene ADN extracelular, fimbrias y proteínas en la matriz extracelular las que se unen a antimicrobianos (6). La biopelícula incrementa la tolerancia a los antibióticos hasta en 100 veces (57). Algunas cepas de *P. aeruginosa* no producen alginato por lo que su biopelícula se compone por una matriz de polisacáridos codificada por los loci *psl* y *pel*, el locus *psl* codifica un polisacárido rico en manosa que contribuye a la interacción con la superficie celular y a la formación de biopelículas, mientras que el locus *pel* contiene genes para la síntesis del componente rico en glucosa de la matriz de la biopelícula de *P. aeruginosa* no mucoides (58).

El proceso de regulación de biofilms implica varios sistemas de señalización, el C – di-GMP permite el cambio móvil a sésil de la bacteria y está involucrado en la producción de alginato, brindándole la capacidad de retención de agua, nutrientes y estabilidad (59). Por otro lado, en condiciones de estrés o condiciones ambientales desfavorables como pH extremo y reducción de osmolaridad, se inhibe la transcripción de genes que contribuyen a superar dichas condiciones (58,59).

2.2.2.2. Mecanismos de resistencia a antimicrobianos en *P. aeruginosa*

Los mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa* incluyen resistencia natural, debido a la presencia de una membrana poco permeable, enzimas β -lactamasas, AmpC inducible y sistema de bombas de expulsión de antimicrobianos que son dependientes de energía, teniendo, además, una resistencia adquirida mediante diversos mecanismos como plásmidos y resistencia adaptativa a través de la formación de biofilm (51).

A. Resistencia intrínseca

Las bombas de eflujo bacteriano se clasifican en cinco familias, entre estas, las que más contribuyen a la resistencia antimicrobiana en *P. aeruginosa* son las pertenecientes a familia de División de Nodulación por Resistencia (RND), que presentan proteínas enlazadoras periplásmicas, proteínas de canal de porina de membrana y un transportador de membrana citoplásmica (47). La familia RND consta de eflujo de múltiples fármacos y porinas de membrana externa (Opr), estos dos componentes facilitan el eflujo de compuestos tóxicos (60).

La bomba de eflujo MexAB-OprM fue la primera descubierta, esta exporta antimicrobianos β -lactámicos como cefalosporinas, aminoglucósidos, tetraciclinas,

trimetoprima y eritromicina (48). Los sistemas de eflujo MexAb-OprM, MexCD-OprJ y MexXY-OprM también contribuyen a la resistencia a carbapenémicos (61). Las cepas silvestres de *P. aeruginosa* poseen resistencia a clases específicas de drogas, anteriormente mencionadas, sin embargo, la bomba de eflujo MexXY amplía esta resistencia a macrólidos, fluoroquinolonas, cloranfenicol y novobiocina (61).

La membrana externa de las bacterias gramnegativas actúa como una barrera de selección lo que complica que el antimicrobiano penetre (44). Las porinas forman canales de proteína que permiten el eflujo de drogas como los β -lactámicos, aminoglucósidos y tetraciclinas, a través de la modulación del tamaño del poro y perturbando la difusión normal del antimicrobiano (10). La resistencia a carbapenémicos se debe a la ausencia de permeabilidad en la porina OprD, al aumento de la expresión de las bombas de expulsión activa y a la producción de metaloenzimas (51,60).

P. aeruginosa posee enzimas inactivadoras de antimicrobianos, tales como las β -lactamasas que se clasifican en cuatro clases: A, C y D, que utilizan una serina en el sitio activo para hidrolizar a los β -lactámicos, y los de la clase B que requieren iones de zinc para este proceso (62). *P. aeruginosa* produce β -lactamasas de clase C que inhiben cefalosporinas antipseudomonales, algunas cepas incluso generan β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) como las de tipo OXA que hidrolizan la oxacilina y en un inicio se identificaron en *P. aeruginosa* (63,64). Las metalo β -lactamasas (MBL), enzimas de clase B de Ambler, poseen zinc en su sitio activo, siendo de relevancia las codificadas por el integrón Verona (VIM) y las de tipo activo en imipenem (IMP) (47,48,52).

B. Resistencia adquirida

La resistencia adquirida puede ser impulsada por mutaciones y transferencia horizontal, esto involucra varios mecanismos en los que se incluyen el incremento en la producción de β -lactamasas, mutación de porina, reducción de permeabilidad de membrana, sobreexpresión de bombas de eflujo e incluso modificación en los objetivos de los antimicrobianos (48). La sobreproducción de β -lactamasas implica la mayor producción de la cefalosporinasa cromosómica ampC generada a menudo por la inactivación de dacB que codifica la proteína de unión a penicilina (PBP) y ampD (52).

Por otro lado, las mutaciones de porinas que provocan la deficiencia de OprD confieren resistencia al imipenem; así también, las mutaciones en genes reguladores como mexR, nalB o nalC pueden alterar el control normal de la expresión de la bomba de eflujo generando una sobreexpresión de la bomba de eflujo MexXY-OprM aumentando la resistencia a fluoroquinolonas y β -lactámicos (52,60,62). A través de mutaciones, *P. aeruginosa* puede modificar el blanco de los antimicrobianos, mutaciones en genes que codifican ADN girasa y topoisomerasa IV pueden alterar la afinidad de unión de estas proteínas a las quinolonas reduciendo su susceptibilidad (65).

P. aeruginosa, además, adquiere por transferencia horizontal genes que confieren resistencia a los aminoglucósidos, β -lactámicos y MBL del tipo IMP, VIM, NDM, SPM, GIM y FIM, estos a menudo se asocian con elementos genéticos como interferones, plásmidos, transposones y profagos; los principales mecanismos de transferencia de genes involucran conjugación y transducción (62,66).

C. Resistencia adaptativa

Un importante factor de patogenicidad y de supervivencia que emplea *P. aeruginosa* es la formación de biopelícula, donde comunidades de esta bacteria se encapsulan en una matriz de sustancia polimérica extracelular (EPS), esta matriz brinda protección física contribuyendo a la evasión del sistema inmune y la resistencia a los antimicrobianos (47), además, le brinda tolerancia a la desecación y permite el almacenamiento de nutrientes, debido a esto posee una elevada actividad enzimática (67,68).

La formación de la biopelícula es regulada por factores como el sistema de detección de quórum y sistemas reguladores GacS/GacA y RetS/LadS, siendo GacA el responsable de regular la formación de biopelículas y RetS de su inhibición, por otro lado, la estructura de la biopelícula es estabilizada por los exopolisacáridos, alginato, Pel y Psl (55). El ADN extracelular (eDNA) contribuye a la adhesión inicial entre las células, influye en la resistencia a los aminoglucósidos y protege a la biopelícula de los detergentes (69). Niveles altos de Di-GMP cíclico (c-di-GMP) están asociados con la formación de biopelícula, mientras que niveles bajos generan un crecimiento planctónico (69,70).

El quórum sensing (QS) depende de la liberación de autoinductores, moléculas de señalización que permiten la comunicación con otras bacterias, *P. aeruginosa* posee los sistemas LasR/I y RhlR/I que están estrechamente conectados e influenciados por un sistema de señalización de quinolonas de *Pseudomonas* (PQS), estos sistemas regulan la producción de factores de virulencia como la elastasa, proteasa alcalina, exotoxina A, piocianina y superóxido dismutasas, además, la molécula de homoserina lactona acilada (AHL) de QS, molécula de señalización, es un sistema de regulación general que controla la expresión de factores de virulencia y procesos metabólicos primarios, el entendimiento

de esta red de detección de quórum en *P. aeruginosa* permite obtener información sobre la forma en cómo esta bacteria provoca enfermedades e incrementa su resistencia a los antimicrobianos (71,72).

2.2.2.3. Niveles de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa*

Se emplean numerosas definiciones para la caracterización de patrones de resistencia en microorganismos grampositivos y gramnegativos, la mayoría de autores define una cepa MDR como aquella que presenta resistencia a tres o más clases de antimicrobianos (73). Magiorakos *et al.*, fijaron categorías específicas para cada microorganismo o grupo bacteriano, en el caso de *P. aeruginosa* se definieron las siguientes categorías: aminoglucósidos, carbapenémicos antipseudomonales, cefalosporinas, fluoroquinolonas, penicilinas antipseudomonales en combinación de inhibidores de β – lactamasas, monobactámicos, ácidos fosfónicos y polimixinas (74).

Según esta clasificación un aislamiento de *P. aeruginosa* es MDR cuando es no susceptible a al menos un agente antimicrobiano en tres o más de estas categorías, es extremadamente resistente a los medicamentos (XDR) cuando al aislamiento muestra resistencia a una amplia gama de antimicrobianos de todas las categorías excepto a un máximo de dos y por último, *P. aeruginosa* se considera panresistente (PDR) cuando la bacteria no es sensible a ningún antimicrobiano (74). Esta clasificación es empleada por la Unión Europea como parte de los criterios para la vigilancia de la RAM (75).

En el consenso de la Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos del 2019 se categorizaron patógenos según su nivel de resistencia, se consensó tener en cuenta solo los grupos de antimicrobianos que se prueban

normalmente en los laboratorios clínicos de la región con el fin de monitorear los fenotipos de resistencia, en *P. aeruginosa* los grupos de antimicrobianos planteados fueron: piperacilina/tazobactam, ceftazidima, cefepima, aztreonam, imipenem, meropenem, amikacina, ciprofloxacino o levofloxacino y colistina (73). La separación de ciertos antimicrobianos en grupos diferentes a pesar de pertenecer a la misma familia está basada en que algunos mecanismos de resistencia son exclusivos, por ejemplo, un aislamiento clínico podría ser resistente a ceftazidima, pero sensible a cefepima; se estableció que *P. aeruginosa* es considerada como MDR si presenta resistencia al menos a tres de los 10 grupos de antimicrobianos, si la bacteria es resistente a 8 o 9 grupos se clasifica como XDR y por último, cuando la cepa es resistente a todos los grupos de antimicrobianos se considera PDR (73).

Cada antimicrobiano considerado presenta diferentes puntos de cortes los cuales están definidos por guías internacionales como el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI), el Comité Europeo sobre Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST) y Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) (76,77). Los métodos para las pruebas de susceptibilidad de *P. aeruginosa* deben ser aprobados por las guías internacionales antes mencionadas, dentro de estos se incluyen difusión por discos, microdilución y macrodilución en caldo o dilución en agar existiendo, además métodos automatizados y tiras con gradientes de antimicrobianos aprobados (73,74).

2.2.3. Bacteriófagos

Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias y arqueas, consumen sus recursos y usan su maquinaria biosintética para replicarse, en el ambiente se encuentran en concentraciones de $3,16 \times 10^6$ fagos/mL, por lo general son detectados en muestras de aguas residuales y vegetales (78). Se estima que por cada célula bacteriana hay 10 fagos, además, se ha calculado que diariamente eliminan alrededor del 40% de biomasa bacteriana (79,80).

El tamaño de los bacteriófagos oscila entre 20 y 300 nm (81). Se pueden clasificar en base a propiedades morfológicas como tamaño, forma, presencia o no de envoltura, simetría de la cápside y estructura; propiedades fisicoquímicas como masa molecular, coeficiente de sedimentación y tamaño del genoma; propiedades biológicas como rango de hospederos, modo de transmisión, distribución geográfica y patogenicidad, además, se clasifican con base en sus proteína y lípidos (46,54).

2.2.3.1. Naturaleza del genoma de los bacteriófagos

El tamaño del genoma de los bacteriófagos varía en gran medida, desde el fago L5 de *Leuconostoc mesenteroides* con 2435 pb hasta el fago G de *Bacillus megaterium*, con 498,000 pb (82). Desde una perspectiva genómica, los fagos se componen de “módulos” compuestos por uno o varios genes que se intercambian por recombinación en ubicaciones específicas, esta teoría es denominada “teoría modular” (82–84).

La teoría modular de Botstein describe que hay secuencias enlazadoras especiales entre los módulos que promueven la recombinación homóloga lo que representa una ventaja selectiva, a medida que se han obtenido secuencias de ADN de estos fagos se evidenció,

que estos mosaicos se generan entre genes no dentro de ellos, además, en muchos casos existe poco o ningún espacio entre genes que puedan albergar estas secuencias enlazadoras, incluso las comparaciones de secuencias no muestran similitud entre los límites de mosaico (85,86). Por este motivo, en lugar de suponer que la recombinación ocurre solo en sitios predeterminados entre genes se propone que ocurren aleatoriamente en cualquier parte del genoma, es decir, por recombinación ilegítima o no homóloga y cuando esta produce proteínas disfuncionales se eliminan porque proporcionan una desventaja selectiva al fago recombinante (82,84,86–88).

Los bacteriófagos lisogénicos por lo general son de naturaleza mosaico en comparación con los líticos, esto se debe a que poseen mayor frecuencia de unión y recombinación con otros virus, estos fagos pueden utilizar la transferencia horizontal de genes para la evolución de sus hospederos bacterianos promoviendo además, el intercambio genético entre bacterias contribuyendo a la aparición de nuevos patógenos bacterianos (82,89,90).

Los genes esenciales para la función adecuada del virus son denominados genes centrales o estructurales, estos presentan un alto grado de conservación de secuencia y un grado mínimo de mosaicismo a medida que el fago evoluciona, a diferencia de otras zonas más flexibles del genoma con genes no centrales, que no son comunes entre grupos de fagos y que a menudo se encuentran en regiones hiperplásicas (HPR); a pesar de que la función de la mayoría de los genes no centrales sea aún desconocida y se sugiera que no son esenciales para la supervivencia del fago, podrían representar un repositorio para generar nuevos genes a través de mutación y recombinación (81,82,85,91).

2.2.3.2. Genoma de los bacteriófagos

El genoma de los fagos se compone de regiones de ADN altamente conservadas complementadas con regiones de elevada variabilidad y aunque no existe un gen común en todos los virus una amplia gama de genomas de bacteriófagos puede compartir varios genes distintivos abarcando un determinado conjunto morfológico, estos genes son responsables de funciones esenciales, un ejemplo son los que codifican la proteína de cápside jelly-roll (JRC) y la proteína helicasa de la superfamilia 3 (S3H), ambos pueden transferirse entre virus de ADN y ARN (87,92). La proteína de medida (TMP) producto de un gen distintivo es característica en casi todos los bacteriófagos con cola, sin embargo, es altamente variable ya que su longitud determina la longitud resultante de la cola del fago (82,83,93).

La infección lisogénica requiere de proteínas integrasas virales, genes que codifican estas integrasas se consideran distintivos, sin embargo, no se encuentran en bacteriófagos estrictamente líticos, estos presentan sus propios módulos que contienen genes distintivos para la erradicación del huésped tras la infección (81). Basada en las similitudes modulares se ha desarrollado un programa informático, *Phage Classification Tool Set* (PHACTS) para predecir si un bacteriófago es lítico o lisogénico con una precisión del 99%, esta herramienta es un claro ejemplo de cómo aprovechar los genes distintivos virales para obtener información del genoma de un fago (82,94).

Un parámetro importante de evaluación de los fagos es determinar la similitud de secuencias de nucleótidos que debe abarcar más del 50% de su genoma, considerando, además la identidad de nucleótidos promedios y el contenido genético (92). Los fagos se desplazan rápidamente infectando diferentes bacterias hospederas, incluso más veloces

de lo que sus genomas se adaptan para parecerse a los de sus hospedadores, por este motivo, los perfiles genómicos de los fagos no solo reflejan las bacterias que infectan actualmente, sino también a las que han infectado en el pasado dejando rastros de su trayecto evolutivo (81,82,87).

2.2.3.3. Taxonomía y estructura de los bacteriófagos

La estructura de los fagos está determinada por proteínas estructurales que los proveen de una cola, fibras caudales, láminas basales o espículas y cuello (95,96). La organización espacial de estas proteínas determina su morfología pleomórfica, icosaédrica, filamentosa o binaria (80). Los fagos binarios presentan genomas entre 17 y 500 kb y colas que varían entre 10 - 800 nm de longitud (97). Los fagos poseen proteínas para el reconocimiento celular dependiendo de su complejidad, por ejemplo, los pertenecientes a la familia *Leviviridae* (icosaédricos) poseen una única proteína menor en la cápside para este fin, mientras que, la familia *Inoviridae* (de simetría helicoidal) y los pertenecientes a las familias *Tectiviridae*, *Corticoviridae* y *Cystoviridae* (icosaédricos) dedican múltiples proteínas a este propósito (82).

El material genético de los fagos puede estar compuesto de ADN o ARN de cadena doble o sencilla, cerca del 96% tienen doble cadena de ADN (dsADN), sus ácidos nucleicos suelen poseer bases modificadas que los protegen de endonucleasas y a su vez cortan los ácidos nucleicos del hospedero durante la infección (54). Según el Subcomité de Virus Bacterianos y Arqueas (BAVS) que forma parte del Comité Internacional de Taxonomía de virus (ICTV), en el 2014 afirmó que más del 96% de los fagos pertenecían al orden *Caudovirales*, fagos con cola y dsADN, conformado por las familias *Myoviridae*, poseen

cola contráctil compuesta por una vaina y un tubo central; *Shipoviridae*, presentan colas largas no contráctiles y la familia *Podoviridae* con cola corta (82).

En la base del ICTV en el 2016 existían 735 géneros, mientras que, para el 2022 aumentó a 2224 (98). El estándar taxonómico es cambiado por el ICTV a medida que se descubren fagos, en el 2022 se actualizó la clasificación de los fagos, aboliéndose varias familias basadas en morfología como la *Shipoviridae*, *Podoviridae* y *Myoviridae*, además de la eliminación del orden *Caudovirales*, el cual fue reemplazado por la clase *Caudoviricetes* que agrupa a todos los virus de bacterias y arqueas con cola, cápsides icosaédricas y dsADN (92,99).

La clase *Caudoviricetes* contiene 22 familias asignadas a cuatro órdenes, tres de ellos abarcan virus que infectan arqueas, además se han establecido 33 familias a las que aún no se asignan un orden entre ellas se encuentran los *Corticoviridae*, que posee una multicapa de proteínas como cápside y un genoma circular, *Tectiviridae* con una cápside proteica rodeando a una vesícula con lípidos y dsADN, la familia *Microviridae* con ADN de cadena sencilla (ssADN) y una cápside icosaédrica sin envoltura, *Leviviridae* con ARN de cadena sencilla (ssRNA) y sin envoltura viral y *Cystoviridae* con tres segmentos de dsRNA con una envoltura flexible con lípidos rodeando a la cápside (92,99,100).

Las familias actualizadas son más conservadas debido al aumento de la similitud promedio generando que la clasificación sea más factible, por otro lado, el ICTV, recomendó que los términos de podovirus, miovirus o sifovirus pueden aún ser usados para reflejar las características morfológicas, sin embargo, no presentan significado taxonómico formal (92,99).

2.2.3.4. Mecanismos de replicación

Los bacteriófagos no se adhieren a su hospedero al azar el primer contacto con la bacteria surge por difusión, colisión o adherencia a receptores específicos, los receptores involucran proteínas, lipopolisacáridos de la pared celular, ácidos teicoicos, flagelo y pili (101). La unión se puede dar por interacciones electrostáticas o de iones (102). Los fagos de bacterias gramnegativas por lo general se unen a proteínas de la membrana externa y al exopolisacárido, mientras que los fagos específicos de bacterias grampositivas se unen a los ácidos teicoicos o carbohidratos del peptidoglicano (102,103).

Posterior a la adhesión del fago a la superficie celular surgen cambios conformacionales en las proteínas de la placa basal produciendo poros en la membrana del citoplasma de la bacteria, la vaina del fago (estructura proteica que forma parte de la cola) se contrae gracias al ATP, el material genético ingresa al citoplasma celular, la envoltura proteica queda en el exterior y la pared celular es digerida por una lisozima (13). Luego, los fagos pueden realizar ciclos líticos y lisogénicos (104).

A. Ciclo lítico

El ciclo de replicación inicia con el reconocimiento de receptores bacterianos, luego de la adhesión del fago, la punta de la cola penetra la capa de peptidoglucano y la membrana interna para poder liberar su genoma (82,87). Los bacteriófagos que no poseen cola penetran la bacteria hospedera a través de enzimas degradadoras de polisacáridos que digieren los componentes de la pared celular bacteriana (105). Cuando el ADN entra, la ARN polimerasa del hospedero reconoce a los promotores virales y el fago inicia la

transcripción de genes que codifican proteínas desactivadoras de proteasas y bloqueadoras de nucleasas (13,81,82).

Genes tardíos producen lisozima y proteínas estructurales de la cubierta viral y cola, la lisozima se empaqueta para iniciar una nueva infección y después de que todas las partes del fago se han generado se ensamblan nuevas partículas fágicas (104). La lisozima, lisina, endolisina, muramidasa o virolisina permiten que el fago lise a la bacteria ya que hidrolizan uniones en la mureína o capa de peptidoglucano de la pared celular, además, la enzima holina crea poros en la membrana interna celular y facilita la lisis bacteriana (82). El número de fagos liberados se denomina tamaño de explosión o *burst size* y el tiempo transcurrido desde la adsorción del fago hasta el ensamblaje de las partículas fágicas se denomina periodo de latencia, ambos parámetros fundamentales para la caracterización de bacteriófagos (105,106).

B. Ciclo lisogénico

Los bacteriófagos lisogénicos o atemperados después de penetrar en el hospedero y replicar su ADN en el interior de la célula no la destruyen ya que no existe la liberación de viriones, en su lugar se integra al genoma del hospedero replicándose como parte de este, generando un clon de células infectadas que pueden crecer y dividirse por largos periodos de tiempo, cuando se integra al genoma se le denomina profago, este produce proteínas represoras que impide la síntesis de enzimas y proteínas necesarias para el ciclo lítico, si la lisogenia se inactiva, el ADN viral es eliminado del cromosoma de la bacteria y actúa como un virus lítico (101,106,107). Los fagos lisogénicos pueden transferir genes del hospedero a otra bacteria mediante transducción (106).

2.2.4. Caracterización de bacteriófagos

2.2.4.1. Técnicas de enumeración e identificación de bacteriófagos

A. Técnica de la doble capa (DLA)

Es la más empleada para el aislamiento y cuantificación de bacteriófagos, para ello se preparan diluciones de suspensiones de las que se presume contiene fagos, estas son mezcladas con una bacteria hospedera permisiva (1). Posteriormente, se agregan a un tubo con medio semisólido y son dispersados en un medio sólido, durante la incubación la bacteria hospedero crece en el medio semisólido excepto donde las partículas fágicas lisan las células, evidenciado en una zona clara o traslucida denominada “placa lítica” (108). La unidad de fago infeccioso se denomina una unidad formadora de placa (UFP) (20,109).

B. Ensayo de muerte planctónica (PKA)

Se utiliza para determinar el rango de hospederos, es necesario un espectrofotómetro por lo general con 96 pocillos de fondo plano, en cada pocillo se inocula una suspensión bacteriana que se incuba hasta alcanzar una densidad óptica específica (DO_{600nm}). Luego, se agrega el bacteriófago a analizar ajustando la MOI, las placas de microtitulación se incuban bajo condiciones controladas realizando lecturas periódicas de la DO_{600nm} cada 5 minutos o 15 minutos durante 24 horas (110).

El ensayo incluye un control negativo (sin bacterias ni fagos), un control positivo (solo bacterias) y tres blancos con antibióticos; a partir de estos datos se generan curvas de eliminación para obtener el índice de virulencia, este se determina mediante el área normalizada bajo la curva (AUC_{norm}) clasificando como hospedador sensible cuando es <1 (110). La fórmula que se emplea es la siguiente:

$$AUC_{norm} = \frac{[AUC]_{0h}^{24h} \text{ con bacteriófago}}{[AUC]_{0h}^{24h} \text{ sin bacteriófago}}$$

2.2.4.2. Caracterización biológica de bacteriófagos

A. Rango de hospederos

El rango de hospederos se mide en base a la capacidad de un fago en infectar y replicarse en una variedad de bacterias, si el bacteriófago posee más receptores para el reconocimiento, más amplio será su rango de hospedero e infectará a un mayor número de cepas y especies, incluso de diferentes géneros; esto determina su versatilidad (111). Por lo general, un fago con un rango de hospederos amplio puede tener mayor capacidad de adaptación a cambios en las poblaciones bacterianas y en el ambiente (2,109).

El rango de hospederos se describe como estrecho o amplio, sin embargo, aún no existen estándares aceptados relacionados al número o porcentajes mínimos de cepas que deben ser probadas en el análisis (111–113). El término “amplio” es utilizado para describir fagos que pueden infectar múltiples cepas de la misma especie o de diferentes géneros bacterianos, cuando esto último ocurre a veces es denominado como polivalente (112,114). Por este motivo, Fong *et al.* (112), recomienda que se deben establecer estos rangos en base a las cepas bacterianas en estudio.

B. Multiplicidad de infección

La multiplicidad de infección o MOI, es el número de viriones agregados por cada bacteria durante la infección, es decir, la relación entre bacteriófagos y el número de bacterias en un cultivo (104,115). Determina la probabilidad de que cada bacteria sea infectada por mínimo un bacteriófago, una MOI elevada significa que existen más fagos, lo que puede generar una infección más acelerada de la población bacteriana, además, la

competencia entre los fagos por bacterias favorecería la selección de variantes con ventajas competitivas (21). Por esto, la MOI influye en la producción de fagos para aplicaciones terapéuticas maximizando su eficiencia (3,22).

C. Curva de crecimiento de un solo paso

El crecimiento en un solo paso fue diseñado por Ellis y Delbruck en 1939, con el que pretendía estudiar el crecimiento de los virus, analizando la interacción del bacteriófago con la bacteria de manera cuantitativa (21).

La curva de crecimiento permite dar seguimiento a través del tiempo al ciclo lítico del bacteriófago, la curva muestra el tiempo que tarda la replicación y generación de progenie del fago en el hospedero (113). El periodo de eclipse es la velocidad en la que se replica el ADN, genera sus proteínas y ensambla fagos maduros, esto se evidencia de manera experimental realizando una lisis forzada al hospedero con cloroformo (113,116). El periodo de latencia es el tiempo que tarda desde la infección hasta la liberación de los fagos a través de la lisis, siendo el tamaño de explosión el número de fagos que se liberan por bacteria infectada (95,117).

2.2.4.3. Caracterización microbiológica

La caracterización microbiológica de los bacteriófagos es esencial para determinar las propiedades estructurales y funcionales del virión, las cuales están vinculadas con su taxonomía y mecanismo de acción, permitiendo además distinguir entre partículas fágicas activas o viables de inestables o incompletas, siendo esto relevando para el ciclo lítico. En este contexto, la microscopía de epifluorescencia y la microscopía electrónica de

transmisión desempeñan un papel fundamental al ofrecer una visualización detallada de la morfología y organización del bacteriófago (118).

A. Microscopía de Epifluorescencia

La microscopía de epifluorescencia es empleada como un método rápido y preciso para determinar la abundancia de los bacteriófagos en cultivos y muestras ambientales, para esto se requiere previamente la recolección de los virus en un filtro con tamaño de poro pequeño y su tinción con un colorante fluorescente que emite luz a una mayor longitud de onda cuando se une a ácidos nucleicos (119,120). La luz genera una partícula brillante más grande que el tamaño real de las partículas del virus, lo que permite su conteo (95).

La elección del fluoróforo depende de varios factores en los que se incluye su capacidad de excitación y emisión, la afinidad por los bacteriófagos y la compatibilidad con las condiciones experimentales (96). Es frecuente el uso de SYBR Green I o SYBR-Gold como tintes ya que penetran las cápsides de los fagos y se intercalan con el ácido nucleico, sin embargo, no tiñen de forma específica el ADN bicatenario (119).

Se seleccionan y examinan al menos diez campos al azar con un aumento de 100x, cada campo en promedio debe contener de 50 a 300 UFP, los valores promedio se multiplican por factores como: volumen de la muestra depositada, dilución de la muestra, área de cada campo, entre otros (119). Al comparar el método de microscopía de epifluorescencia con el recuento en placa pueden existir diferencias significativas debido a que el primero cuantifica todas las partículas fágicas que pueden o no estar fisiológicamente activas y pueden o no ser virulentas (46,120–122). Por esto se recomienda un enfoque combinado de ambas formas de recuento (122) .

B. Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) ha proporcionado las bases para el reconocimiento y establecimiento de las familias de los bacteriófagos, permitiendo identificar la complejidad y variabilidad de su estructura, así como de sus dimensiones, presencia de orgánulos y capsómeros en fagos con cola (118). Con la TEM se visualizan las bacterias infectadas y los fagos dañados, incluso contribuye a determinar la naturaleza monofilética de las cápsides (105,118).

Se emplea la tinción negativa, su principio es embeber las partículas fágicas con una solución de electrones de una sal metálica de alto peso y pequeño tamaño molecular (78). La TEM para fagos involucra la purificación de las partículas, la tinción, el control del aumento y medición, la observación, la fotografía y la interpretación (118). Los tintes incluyen tungstatos como fosfotungstato de sodio y potasio, tungstato de litio, silico-tungstato de sodio; sales de uranilo (acetato de uranilo, formato de uranilo, acetato de magnesio, nitrato, oxalato) y molibdato de amonio o vanadio; siendo los más empleados el fosfotungstato y el acetato de uranilo (105).

2.2.5. Terapia con bacteriófagos

La fagoterapia es el uso de bacteriófagos para reducir la actividad de bacterias específicas, sobre todo en aquellas que presentan un elevado nivel de RAM (123). El primer tratamiento en humanos contra el cólera con fagos fue en 1927, en el que se logró la disminución hasta de un 90% de la enfermedad (124). En 2019 se reportó que a partir de la administración de un coctel de fagos denominado AB – PAO1 en un paciente con infección pulmonar necrotizante causada por *P. aeruginosa* MDR, se logró cuatro días

después del tratamiento, la sensibilización de la cepa permitiendo al paciente salir de UCI sin presentar signos de la infección por la bacteria (125).

Courtwright *et al.* (126) emplearon un coctel de fagos para eliminar infecciones pulmonares causadas por *P. aeruginosa* MDR en candidatos a trasplante de pulmón que sufrían fibrosis quística y neumonía dependiendo dos pacientes de ventilación mecánica. la administración la realizaron vía intravenosa e inhalada de 2 a 4 semanas, al finalizar el tratamiento se erradicó a la bacteria sin presentar signos de reinfección permitiendo el trasplante pulmonar.

Los bacteriófagos al contrario de los antimicrobianos son específicos por lo que no modifican la microbiota intestinal, además poseen una cinética de destrucción rápida y capacidad de autorreplicación en el sitio de infección siendo eficaces hasta que la bacteria diana desaparezca, por lo que no genera ninguna otra alteración ni afecta a las células eucariotas (43).

Por el contrario, se presentan ciertos inconvenientes ya que es necesaria la identificación rápida del aislado bacteriano causante de la infección, debido a la alta especificidad de los fagos (127). Las preparaciones de fagos deben estar totalmente libres de bacterias y de sus toxinas, pero la esterilización puede inactivarlos, sin embargo, se pueden usar técnicas de centrifugación y filtración estéril (123). Otra desventaja es la seguridad ya que se debe analizar previamente la habilidad innata de los fagos para transferir ADN de una bacteria a otra, la transferencia horizontal podría aportar factores de patogenicidad y virulencia, produciendo bacterias con mayor resistencia, para evitarlo se deben elegir fagos sin capacidad de transmisión genética y exclusivamente líticos (55,123).

La fagoterapia es limitada por la inducción de anticuerpos neutralizantes del sistema inmune, el desarrollo de estos anticuerpos puede ser un obstáculo si se precisan terapias prolongados, no es un problema significativo en la fase inicial del tratamiento ya que la cinética fágica es más rápida que la producción de estos anticuerpos (13,127). Con base a ello, es recomendable el uso de una mezcla de fagos diferentes o un cóctel de fagos, además de incrementar su concentración y realizar dosis más frecuentes que dificulten la respuesta del sistema inmune (55,59).

En Perú la fagoterapia se encuentra aún en una etapa temprana de desarrollo a diferencia de países desarrollados. La mayoría de investigaciones están orientadas a la identificación y caracterización de bacteriófagos líticos que infectan a microorganismos patógenos relevantes como *P. aeruginosa* MDR (2,3,20), *A. baumannii* (128), *E. coli* (22), *L. monocytogenes* (21), *V. cholerae* (57), *S. entérica* (129), entre otros. Estos estudios reflejan el creciente interés en el país sobre el uso de bacteriófagos y sus potenciales aplicaciones en las áreas de salud y alimentos.

2.2.6. Especificidad de bacteriófagos en *Pseudomonas aeruginosa*

Los bacteriófagos líticos que infectan a *P. aeruginosa* a menudo presentan genomas de dsADN y morfológicamente se asemejan a los grupos miovirus, sifovirus y podovirus (130). En el 2019 en la base de datos del NCBI existían 149 fagos de *P. aeruginosa* con secuencias de genomas disponibles y completos de los cuales 107 eran líticos, 10 géneros con más de un bacteriófago tenían a *P. aeruginosa* como hospedero nativo exclusivo (F116, KPP10, LIT1, LUZ7, NP1, P2, PAK_P1, PaP2 y YuA) (98,99). Con relación a su procedencia la gran mayoría son de muestras clínicas, aguas residuales y del medio

ambiente (131). Para el 2024 en la base de datos se NCBI existían 275 secuencias de referencia y 55 géneros diferentes (16).

En base a la especificidad de los bacteriófagos que infectan a *P. aeruginosa* se han reportado diversos estudios. Por ejemplo, el fago JJ01 perteneciente a la anterior familia *Myoviridae*, aislado del suelo, utilizó a *P. aeruginosa* PAO1 como hospedero, siendo específico para esta cepa, y no infectando a otras especies de *Pseudomonas* o géneros bacterianos (132). Por otro lado, el bacteriófago lítico PA1Ø perteneciente a los sifovirus aislado de agua residual de una granja en Corea del Sur, el cual utilizó también la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* como hospedero reveló actividad lítica contra *P. aeruginosa* y *Shigella sonnei* e incluso contra bacterias grampositivas como *S. aureus*, *Streptococcus salivarius* y *L. monocytogenes*; por lo que este fago puede facilitar su desarrollo como agente antimicrobiano aplicable al tratamiento de infecciones bacterianas mixtas con *P. aeruginosa* y *S. aureus* (107).

Los fagos ΦJHS y ΦSMK, aislados de agua residual hospitalaria en Etiopía mostraron especificidad lítica solamente contra cepas clínicas de *P. aeruginosa* (133), mientras que, los fagos PPaMa4/19 y PPaMa3/19 aislados de agua de río en Irán mostraron lisis contra *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus* (134). En diversos estudios se ha identificado el poder antibacteriano de los bacteriófagos no solamente frente a su hospedero específico, sino que también a otros géneros bacterianos, este potencial puede contribuir a combatir infecciones provocadas por mezclas bacterianas (107,135).

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

3.1. Nivel de Investigación

Descriptivo porque el objetivo principal de este estudio fue caracterizar bacteriófagos con capacidad lítica sobre *P. aeruginosa* MDR aislados de agua residual, sin la intervención directa en las variables de estudio.

3.2. Tipo y Diseño de Investigación

Básico descriptivo porque se exploró en las teorías del conocimiento científico existente, se generaron nuevos conocimientos con el propósito de proporcionar una base para futuras investigaciones aplicadas con bacteriófagos. El diseño es no experimental ya que no se manipulan las variables. Observacional- transversal, debido a que se caracterizaron las propiedades biológicas y fisicoquímicas de los bacteriófagos aislados a partir de diferentes muestras recolectadas en un único periodo de tiempo.

3.3. Material biológico

El material biológico estuvo constituido por los bacteriófagos aislados de muestras de agua residual del Hospital Regional Docente de Cajamarca (HRDC); por once aislamientos de *P. aeruginosa* MDR procedentes del cepario del área de bacteriología del Laboratorio Referencial Regional de Salud Pública (LRRSP) de Cajamarca correspondientes al año 2023; y por otras bacterias gramnegativas y grampositivas pertenecientes al LRRSP, empleadas en este estudio para la determinación de rango de hospederos.

3.4. Lugar de muestreo

En el presente estudio se recolectaron diez muestras de agua residual del HRDC con el objetivo de aislar bacteriófagos con capacidad lítica sobre *P. aeruginosa* MDR.

3.5. Diseño metodológico

3.5.1. Obtención de muestras de agua residual

Se colectaron en frascos estériles 10 muestras de 500 mL de agua residual del HRDC. Las muestras fueron transportadas al LRRSP de Cajamarca y se dejaron sedimentar durante 48 horas a temperatura ambiente. Luego, el sobrenadante se transfirió a otro recipiente y se procedió a filtrar con papel Whatman N°1 para eliminar las partículas sólidas grandes; se centrifugó a 3500 RPM durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se trasvasó a otro recipiente estéril y se rotuló.

3.5.2. Reactivación e identificación microbiológica de *Pseudomonas aeruginosa*

Se comprobó previamente la identificación correcta de los aislamientos. Para esto a cada criovial de *P. aeruginosa* conservado en Agar Base Sangre a 4 °C se agregaron 5 gotas de caldo BHI y se incubó durante 24 horas a 37 °C. Posteriormente, a partir de cada criovial se sembró una alícuota mediante la siembra por estría en agar Cetrimide y se incubó durante 24 horas a 37 °C. A cada uno de los aislamientos se le realizó tinción de Gram (Anexo 1) y las pruebas bioquímicas correspondientes en los medios Triple Sugar Iron (TSI), agar lisina hierro (LIA), sulfuro indol movilidad (SIM) y citrato de Simmons, y se incubó durante 24 horas a 37 °C. Luego, se evaluó cada resultado de las pruebas. Las bacterias con el fenotipo y bioquímica correspondiente a *P. aeruginosa* tal y como se evidencia en el Anexo 2, se repicaron por duplicado en crioviales con Agar Soya

Tripticasa (TSA) y se los incubó 48 horas a 37 °C. Todos los aislamientos se conservaron a 4 °C hasta su uso.

3.5.3. Evaluación del perfil de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa*

Para el antibiograma se empleó el método de Kirby Bauer. A partir, de los crioviales con los aislados reactivados se realizaron inoculaciones en agar Müller Hinton (MH) y se dejó incubar de 16 – 18 horas. Posteriormente, se preparó una suspensión bacteriana a una escala equivalente de 0,5 McFarland. Con un hisopo estéril se sembró en placas de agar MH por diseminación en superficie y se dejó reposar durante 10 minutos. Luego, se colocaron los discos de antimicrobianos correspondientes (Anexo 3) y se incubó por 24 horas a 37 °C. Finalmente, se analizaron los halos de inhibición para determinar la resistencia o sensibilidad de los aislados con base a los puntos de corte según el CLSI, 2025 (76).

Se consideraron solo las cepas MDR, definidos por Magiorakos *et al.*(74), es decir, aquellas que presentaron resistencia *in vitro* a mínimo un fármaco antimicrobiano de tres o más categorías farmacológicas: cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos, penicilinas antipseudomonales en combinación con inhibidores de β -lactamasas, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, ácidos fosfónicos y polimixinas.

3.5.4. Preparación de stock bacterianos

Los stock bacterianos se obtuvieron inoculando colonias de *P. aeruginosa* MDR en 1 mL de caldo Luria Bertani (LB). Luego, se incubaron a 37 °C hasta alcanzar el estado overnight y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

3.5.5. Determinación de infección previa por profagos en *P. aeruginosa*

Se empleó la metodología descrita por Sfredo (109), para evaluar si las bacterias presentaban infección por un bacteriófago lisogénico. Para ello, a placas de Petri conteniendo una fina capa de TSA se le adicionó una capa de 3 mL de medio semisólido, compuesto por Caldo Soya Trypticase (TSB) y 0,7% de agar, con 100 µL de *P. aeruginosa* MDR en una escala de 0,5 McFarland. Luego de solidificado el medio, se depositó sobre la superficie del agar gotas de 20 µL de inóculo de la misma bacteria en diferentes zonas, alrededor de 20 gotas. Las placas se incubaron por 24 horas a 37 °C.

El resultado se consideró positivo cuando se formaron zonas claras o translúcidas en el lugar donde se dispensaron las gotas del inóculo bacteriano, indicando la presencia de fagos lisogénicos por lo que la bacteria fue descartada de los ensayos posteriores con el fin de evitar resultados falsos positivos, como resultado negativo solo se observó el crecimiento bacteriano.

3.5.6. Enriquecimiento de bacteriófagos

Se realizó siguiendo el método de enriquecimiento descrito por Dini (95), con modificaciones. En un frasco de vidrio se colocaron 90 mL de Buffer SM y 10 mL de la muestra filtrada, se homogenizó y adicionó 10 mL de LB doblemente concentrado. Luego se centrifugó a 4000 RPM durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante en otro frasco de vidrio estéril. Se agregó cloruro de calcio ($CaCl_2$) hasta una concentración final de 10 mM, se mezcló y se dividió 10 mL en tubos de ensayo cuyo número correspondió al número de cepas de *P. aeruginosa* MDR, es decir, 11. A cada tubo de ensayo se le agregó 300 µL de cultivo overnight de *P. aeruginosa*, se rotuló con el código de la cepa correspondiente y se incubó a 37 °C por 24 horas. Luego, cada tubo de ensayo se trasvasó

a tubos Falcon y se agregó cloroformo al 4%, se dejó en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, se centrifugaron a 3500 RPM por 15 minutos, el sobrenadante se trasvasó a tubos de ensayo estériles, esto representó el lisado.

3.5.7. Determinación de bacteriófagos por la formación de placas líticas.

Se determinó la presencia de bacteriófagos líticos empleando la Prueba de la gota o Spot test descrita por Clokie y Kropinski (105), con modificaciones. Previamente, se preparó 300 mL de Top agar el que contuvo 0,7% de Agar - Agar, 1,1% de $CaCl_2$ puro y 0,5% de cloruro de sodio ($NaCl$). A continuación, para cada tubo de ensayo anterior, se empleó una suspensión de 5 mL de Top agar mantenido a 48 – 50 °C y se le inoculó 200 µL de overnight de *P. aeruginosa* MDR, se agitó por inversión y se vertió en una placa de Petri con agar nutritivo; se dejó solidificar por 15 minutos. Luego, en cada placa de Petri se agregó 10 µL del lisado obtenido en el enriquecimiento y se incubó a 37 °C por 24 horas. Finalmente, como resultado positivo se observó la presencia o ausencia de los halos o placas de lisis indicando la presencia de bacteriófagos.

3.5.8. Aislamiento y purificación de bacteriófagos

Se realizó empleando la Técnica de doble capa (DLA) con diluciones seriadas descrita por Clokie y Kropinski (105), con modificaciones. Se preparó una batería de 4 tubos Eppendorf con 990 µL de caldo LB cada uno, el primero se rotuló con el nombre de la cepa y el lisado, a los siguientes tubos se rotuló desde 10^{-1} hasta 10^{-3} . Con un asa bacteriológica estéril de 5 µL se tomó un corte de lisis de la placa de aislamiento y se agregó al primer tubo, se homogeneizó en el vórtex y se transfirieron 10 µL al siguiente tubo; se repitió el mismo procedimiento hasta llegar al último tubo.

Luego, se prepararon 3 placas de Petri con agar nutritivo y se rotuló desde 10^{-1} hasta 10^{-3} ; a cada placa se le inoculó 100 μ L de overnight de *P. aeruginosa* MDR más 200 μ L de cada dilución de bacteriófagos (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}); con 5 mL de Top agar mantenido a 48 – 50 °C. Luego, se dejó incubar a 37 °C por 24 horas. Después de la incubación, se examinaron las placas y se extrajo con el asa bacteriológica estéril la placa lítica más clara o transparente de bordes mejor definidos. Esta placa lítica se colocó en un tubo Eppendorf estéril con 900 μ L caldo LB. Este proceso se realizó de 3 a 5 veces para garantizar la obtención de un único bacteriófago.

Los bacteriófagos fueron codificados en función a los códigos de la cepa bacteriana hospedera inicial y de la muestra de agua residual del que fueron aislados.

3.5.9. Preparación de la suspensión madre de bacteriófagos purificados.

Luego de purificar los bacteriófagos, en un frasco estéril se agregó 100 mL de caldo LB doble concentrado y las placas de lisis de la placa Petri del quinto proceso de purificación. Posteriormente, se agregó 1,5 mL de *P. aeruginosa* MDR en cultivo overnight y se incubó a 37 °C por 48 horas. Después, se agregó cloroformo al 4%, se homogeneizó y se dejó reposar 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó a 4000 RPM por 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se vertió en un tubo Falcon estéril de 50 mL y se almacenó en oscuridad a 4 °C, para ello se cubrió el recipiente con papel aluminio.

3.5.10. Cuantificación de bacteriófagos purificados.

Se preparó una batería de 14 tubos estériles de 5 mL y se rotuló desde 10^{-2} hasta 10^{-15} . Se realizó empleando la técnica DLA con diluciones seriadas descrita anteriormente y se procedió al conteo de las unidades formadoras de placa (UFP) en las diluciones que

presentaron de 30-300 UFP por placa de Petri. Para determinar el título viral se empleó la siguiente fórmula:

$$UFP \times mL^{-1} = \frac{UFP \text{ en placa} \times \text{factor de dilución (0.1)}}{V \text{ de la dilución en mL}}$$

Donde:

UFP: Unidades formadoras de placa

mL: mililitros

V: Volumen

3.5.11. Caracterización biológica de bacteriófagos purificados

3.5.11.1. Determinación de rango de hospederos.

Se determinó la gama de bacterias susceptibles a cada bacteriófago según la técnica de la gota descrita por Clokie y Kropinski (105), con modificaciones. Se incluyeron las cepas de *P. aeruginosa* MDR en estudio, *Salmonella* sp. (BactCaj-05), *Klebsiella pneumoniae* (BactCaj-15), y *Klebsiella aerogenes* (BactCaj-09), pertenecientes al cepario del LRRSP y las cepas de referencia: *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Con este fin, a 5 mL de Top Agar mantenido a 50 °C se le agregó 100 µL del cultivo overnight de la cepa a analizar a una escala equivalente de 0,5 McFarland, se mezcló y se vertió en una placa con agar nutritivo. Luego de solidificado, se agregó 10 µL del stock de cada bacteriófago a una concentración de 10⁸ UFP/mL y se incubó por 24 horas a 37 °C. Una lectura positiva, es decir, la capacidad del fago para lisar a la cepa en estudio se evidenció por la formación de zonas de aclaramiento o translúcidas en la superficie del agar donde se colocaron las gotas del filtrado, como lectura negativa solo el crecimiento bacteriano, sin zonas de aclaramiento. El procedimiento se realizó por triplicado.

3.5.11.2. Curva de crecimiento de un solo paso

Se seleccionaron los bacteriófagos que lisaron la cepa que presentó mayor resistencia a ser infectada por los demás fagos, considerando también las características morfológicas de sus placas líticas y el rango de hospedero específico. Se seleccionó, además, el bacteriófago con capacidad lítica solo en su cepa hospedero inicial.

Se determinó la cinética de replicación fágica mediante la curva de crecimiento de un solo paso, descrita por Abedon *et al.* (136). En resumen, a un tubo con 200 μL de un lisado de bacteriófagos con un título de 10^5 UFP/mL se añadió 100 μL de *P. aeruginosa* MDR overnight. Se incubó durante 5 minutos a 37°C y se transfirió 100 μL de la mezcla a un tubo con 9,9 mL de caldo LB suplementado con 5 mM de CaCl_2 a 37°C . De la última mezcla, se transfirieron 100 μL a un tubo con 900 μL de caldo LB, se añadió 15 μL de cloroformo, se homogenizó por 30 segundos en vórtex, esto correspondió al tiempo inicial (T_0). Luego, se incubó a 37°C y después de 5 minutos, se tomó otra muestra de 100 μL y se procedió de la misma forma.

Se repitió el procedimiento cada 5 minutos por un periodo de 20 minutos, y posteriormente cada 10 minutos hasta completar una hora en total. Luego, se ejecutó la técnica de DLA con diluciones seriadas, se incubó 24 horas a 37°C y finalmente se realizaron los recuentos respectivos. El procedimiento se hizo por triplicado. Los datos obtenidos se plasmaron en un gráfico semi-logarítmico de tiempo (minutos) vs número de placas (UFP). A partir de este se halló el periodo de latencia y el tamaño de explosión de cada bacteriófago seleccionado.

3.5.11.3.Cálculo del tamaño de explosión

El tamaño de explosión representó el número de fagos liberados por célula bacteriana, se determinó luego de realizada la curva de crecimiento de un solo paso. Se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Tamaño de explosión} = \frac{\text{UFP / mL final (60 minutos)}}{\text{UFP / mL inicial (0 minutos)}}$$

3.5.12. Caracterización fisicoquímica de bacteriófagos

3.5.12.1.Efecto del pH en la concentración de los bacteriófagos

La suspensión de bacteriófagos se expuso a pH de 3, 5, 7 y 9. Para el ajuste a pH ácido de 3 y 5, se utilizó ácido clorhídrico (*HCl* 0,1M) y para el pH básico de 9, hidróxido de sodio (*NaOH* 0,1M). Se empleó la técnica de Dini (95) con modificaciones. Para ello, a un tubo Eppendorf de 1.5 mL se le agregó 100 µL de la suspensión de fagos titulada (concentración conocida) junto con 900 µL de solución salina (*NaCl* 0,9 % p/v) ajustada al pH específico para cada ensayo y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas de cada tubo. A 200 µL del bacteriófago se enfrentó con 100 µL de cultivo de overnight de *P. aeruginosa* MDR, se incubó durante 10 minutos a 37 °C. Luego, se cuantificó la concentración de bacteriófagos mediante la técnica DLA. El procedimiento se realizó para cada uno de los bacteriófagos por triplicado.

3.5.12.2.Efecto de la temperatura de incubación en la concentración de bacteriófagos

Se añadió a un tubo Eppendorf de 1,5 mL, 500 µL de la suspensión de fagos titulada (concentración conocida). Este se expuso a las temperaturas de 4 °C, 12 °C, 37 °C y 60 °C. Se utilizó la técnica de Dini (95), para ello se realizó diluciones seriadas de cada tubo

desde 10^{-3} hasta 10^{-15} y se enfrentó con 100 μL de *P. aeruginosa* overnight, se dejó incubar durante 10 minutos a 37 °C. Finalmente, se cuantificó la concentración de bacteriófagos mediante la técnica DLA. El procedimiento se realizó por triplicado.

3.6. Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Se utilizó el software Microsoft Excel 2023 para realizar las tablas y figuras que describieron las curvas de crecimiento de un solo paso, el rango de hospederos, la termoestabilidad y la resistencia al pH.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Reactivación e identificación microbiológica de *Pseudomonas aeruginosa*

Se reactivaron y caracterizaron microbiológicamente los once aislamientos de *P. aeruginosa* provenientes del LRRSP, Cajamarca. Todas mostraron crecimiento en agar Cetrimide con la formación de pigmento, mediante la tinción Gram se confirmó que se trataban de bacilos gramnegativos. En las pruebas bioquímicas, los aislamientos no fermentaron azúcares en el medio TSI, mostrando una reacción alcalina/alcalina (K/K). Además, utilizaron citrato de sodio en el medio citrato de Simmons y evidenciaron movilidad en el medio SIM, sin producción de indol ni sulfuro de hidrógeno. En el medio LIA se observó una reacción K/K, correspondiente a la generación de alcalinidad en todo el tubo, atribuida al metabolismo oxidativo característico de *P. aeruginosa* (Apéndice 2). Estos resultados confirmaron que todos los aislamientos correspondían a la especie de *P. aeruginosa*.

4.1.2. Perfil de resistencia de las *Pseudomonas aeruginosa* en estudio

En la Tabla 1 se muestra que las once cepas de *Pseudomonas aeruginosa* se definieron como MDR; esto significa que, fueron resistentes a por lo menos un representante de tres categorías diferentes de antimicrobianos (Apéndice 3). Por lo tanto, todas las bacterias evaluadas al presentar MDR, fueron consideradas para los ensayos posteriores de caracterización fágica.

Tabla 1. Perfil de resistencia antimicrobiano de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* MDR del LRRSP, Cajamarca¹.

Código de la cepa	Antimicrobianos									
	FEP	CAZ	IMI	MEM	ATM	TPZ	LEV	NOR	CIP	AK
P07	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
P14	R	R	R	R	S	I	R	R	I	S
P15	R	R	R	R	S	R	R	R	I	S
P17	R	R	R	R	I	I	R	I	R	I
P18	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
P19	R	R	R	R	S	I	R	R	I	S
P20	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
P22	R	R	R	R	S	I	I	R	R	S
P23	R	R	R	R	S	R	R	R	R	I
P24	R	R	R	R	S	I	R	R	R	S
P25	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S

¹ Puntos de corte basados en el CLSI M100™ “Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 35th Edition”; S:sensible, I:Intermedio, R:Resistente, **FEP:** cefepima, **CAZ:** ceftazidima, **IMI:** imipenem, **MEM:** meropenem, **ATM:** aztreonam, **TPZ:** piperacilina/tazobactam, **LEV:** levofloxacino, **NOR:** norfloxacino, **CIP:** ciprofloxacino, **AK:** amikacina.

Nota: La clase y concentración de los antimicrobianos utilizados se detallan en el **Anexo 3**.

4.1.3. Determinación de infección previa por profagos en *P. aeruginosa*

En la Figura 1 se muestra la evaluación fenotípica de las once cepas de *P. aeruginosa* MDR, ninguna presentó la formación de placas líticas ni zonas de aclaramiento en la superficie del agar, evidenciado la ausencia de profagos activos. En todos los casos, el crecimiento bacteriano fue uniforme y continuo, sin indicios de lisis espontánea. Por lo tanto, todas las cepas fueron negativas a la presencia de profagos, por lo que se consideraron como calificadas para los ensayos posteriores.

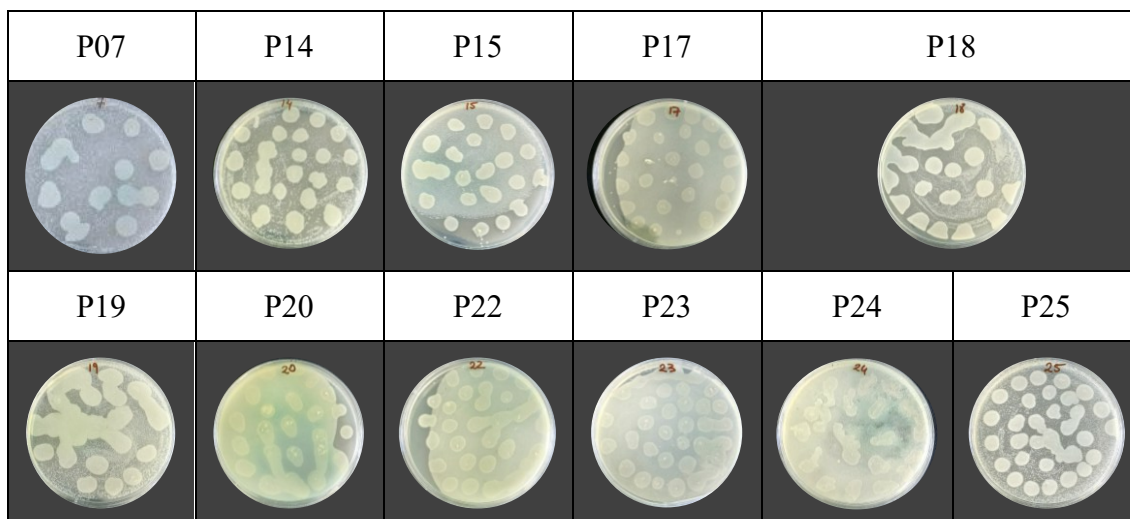


Figura 1. Evaluación fenotípica de profagos en las once cepas de *P. aeruginosa* MDR.

4.1.4. Determinación de la presencia de bacteriófagos por la formación de placas líticas

Se evidenció la formación de placas líticas mediante la observación de halos transparentes o completamente claros, como se muestra en el Apéndice 4. Según los datos presentados en la Tabla 2, ocho de las muestras de agua residual permitieron la obtención de un total de 22 placas líticas. Este resultado posibilitó el aislamiento y la purificación de los bacteriófagos con sus respectivas cepas hospedero iniciales.

Tabla 2. Detección de placas líticas por bacteriófagos aislados de las muestras de agua residual frente a cepas de *P. aeruginosa* MDR.

Muestras de agua residual	Cepas de <i>P. aeruginosa</i> MDR										
	P07	P14	P15	P17	P18	P19	P20	P22	P23	P24	P25
AR1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
AR2	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
AR3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
AR4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AR5	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
AR6	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
AR7	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
AR8	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
AR9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
AR10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

“+”: formación de placa lítica, “-”: sin formación de placa lítica.

4.1.5. Aislamiento y purificación de bacteriófagos

De los 22 bacteriófagos aislados (Apéndice 5), se identificaron y seleccionaron tres diferentes morfologías de placas líticas (Figura 2). Los fagos P07AR2, P24AR3, P07AR6, P07AR7, P07AR8 y P07AR9 formaron placas líticas de 2 – 4 mm de diámetro, de halos claros y de bordes definidos (Figura 2a). Los fagos P23AR3 y P24AR9 mostraron placas líticas de 1 – 2 mm, con bordes circulares regulares y apariencia ligeramente turbia a clara (Figura 2b). Por último, los fagos restantes produjeron de 0,2 – 1,4 mm, de halos claros a ligeramente turbios (Figura 2c).

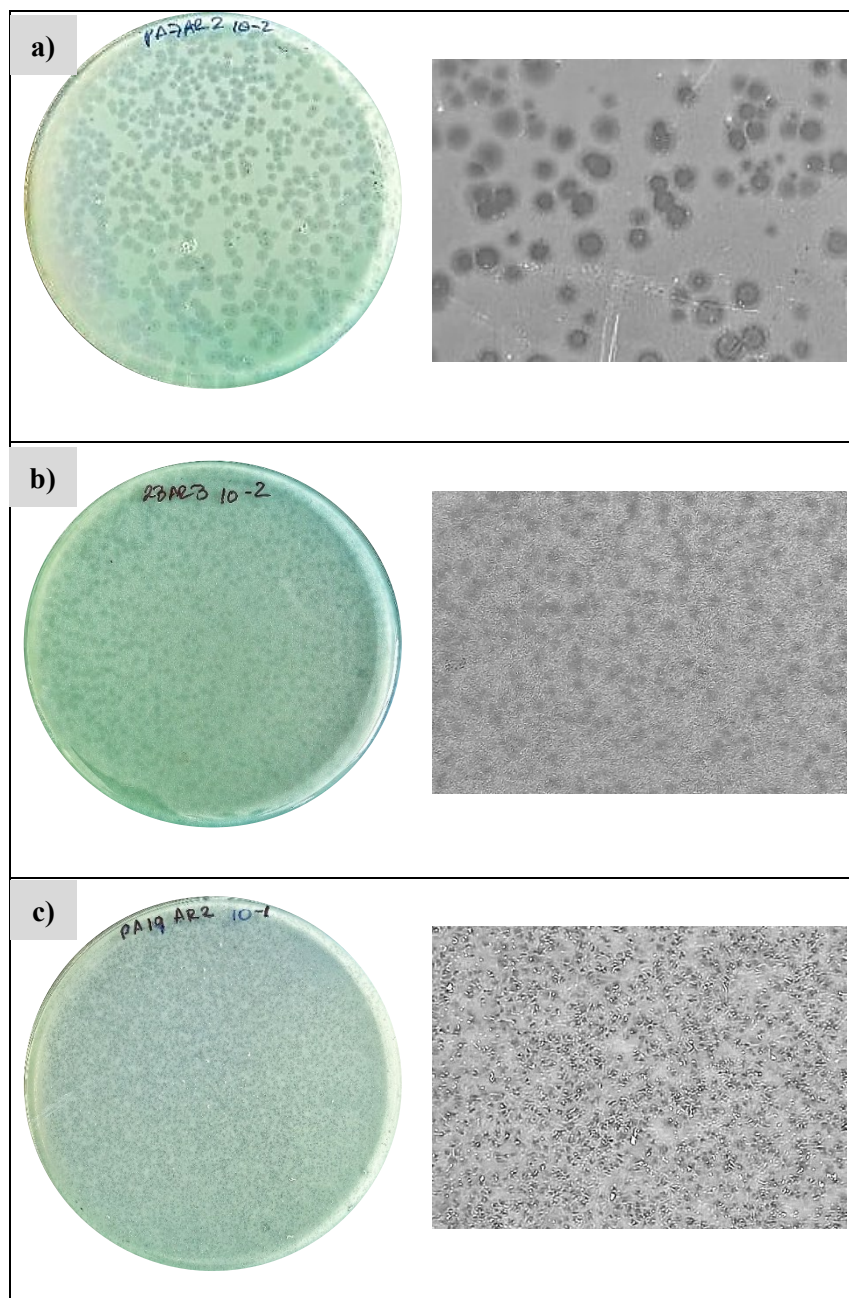


Figura 2. Placas líticas representativas de las tres morfologías observadas en los bacteriófagos, **a).** Placas líticas circulares de 2 – 4 mm, claras y con borde definidos, **b).** Placas líticas de 1 – 2 mm, circulares, de aspecto claro a ligeramente turbio y con bordes definidos y **c).** Placas líticas de 0,2 – 1,4 mm, con bordes definidos. En el **panel izquierdo** de la figura se observan las calvas en placas de Petri con agar nutritivo, mientras que en el **panel derecho** ampliaciones de las mismas para una mejor visualización de su morfología.

4.1.6. Titulación de los bacteriófagos purificados

Mediante la técnica doble capa de agar (DLA) y diluciones seriadas, se determinó la concentración de los 22 bacteriófagos cuyos títulos se indican en la Tabla 3. Destacan también los bacteriófagos P23AR3, P07AR7, P07AR9 y P07AR8 por superar una concentración de 10^{14} UFP/mL. Por el contrario, el bacteriófago P15AR1 presentó la menor concentración no superando los 10^8 UFP/mL.

Tabla 3. Titulación de los bacteriófagos purificados.

Código del bacteriófago	UFP /mL
P15AR1	$1,20 \times 10^7$
P15AR5	$1,40 \times 10^8$
P15AR6	$4,10 \times 10^8$
P24AR9	$1,90 \times 10^9$
P24AR3	$1,90 \times 10^9$
P07AR6	$2,20 \times 10^9$
P19AR2	$5,60 \times 10^9$
P15AR7	$1,30 \times 10^{10}$
P14AR1	$1,40 \times 10^{10}$
P07AR2	$1,40 \times 10^{10}$
P14AR2	$1,60 \times 10^{10}$
P23AR2	$2,10 \times 10^{11}$
P17AR6	$1,50 \times 10^{12}$
P19AR8	$1,70 \times 10^{12}$
P15AR2	$2,20 \times 10^{12}$
P17AR5	$1,40 \times 10^{13}$
P24AR8	$1,80 \times 10^{13}$
P22AR5	$3,20 \times 10^{13}$
P23AR3	$2,20 \times 10^{14}$
P07AR9	$1,10 \times 10^{15}$
P07AR7	$2,90 \times 10^{15}$
P07AR8	$8,50 \times 10^{15}$

4.1.7. Caracterización biológica de bacteriófagos purificados

4.1.7.1. Determinación de rango de hospederos

La determinación del rango de hospedero se realizó a través de la técnica de la gota por triplicado. Se evaluaron las 11 cepas de *P. aeruginosa* MDR, además de *P. aeruginosa* ATCC 27853 y cepas de otras especies como *E. coli* ATCC25922, *S. aureus* ATCC25923, *Klebsiella pneumoniae* (BactCaj-15), *K. aerogenes* (BactCaj-09) y *Salmonella* sp. (BactCaj-05). En la Tabla 4 se aprecian los resultados de la prueba para cada bacteriófago; P07AR8 logró lisar al 100% de las cepas de *P. aeruginosa* MDR en este estudio (Apéndice 6). Por el contrario, el bacteriófago P15AR1 lisó solamente a su cepa hospedera, es decir, P15 (Figura 3).

En la Figura 4 se observa que 12 bacteriófagos lisaron a *P. aeruginosa* ATCC 27853 entre ellos P07AR6 y P07AR8. Por otro lado, el bacteriófago P19AR2 infectó a *E. coli* ATCC25922, P07AR2 infectó a *Klebsiella pneumoniae* y *K. aerogenes*, P15AR2 infectó a *Salmonella* sp. y P14AR1 infectó a *S. aureus* ATCC25923 y *K. aerogenes*.

Tabla 4. Rango de hospederos de cada bacteriófago.

Fagos	Cepas bacterianas																
	P07	P14	P15	P17	P18	P19	P20	P22	P23	P24	P25	A	B	C	D	E	F
P14AR1	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-
P15AR1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P07AR2	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
P14AR2	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
P15AR2	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
P19AR2	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
P23AR2	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
P23AR3	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
P24AR3	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
P15AR5	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
P17AR5	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P22AR5	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
P07AR6	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P15AR6	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P17AR6	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P07AR7	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P15AR7	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
P07AR8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P19AR8	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P24AR8	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
P07AR9	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P24AR9	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

A: *P. aeruginosa* ATCC 27853, **B:** *K. pneumonie*, **C:** *Salmonella* sp., **D:** *K. aerogenes*, **E:** *S. aureus* ATCC25923, **F:** *E. coli* ATCC25922 “+”: el bacteriófago lisó la cepa, “-”: el bacteriófago no realizó lisis en la cepa. + :control positivo, cepa hospedero inicial del bacteriófago.

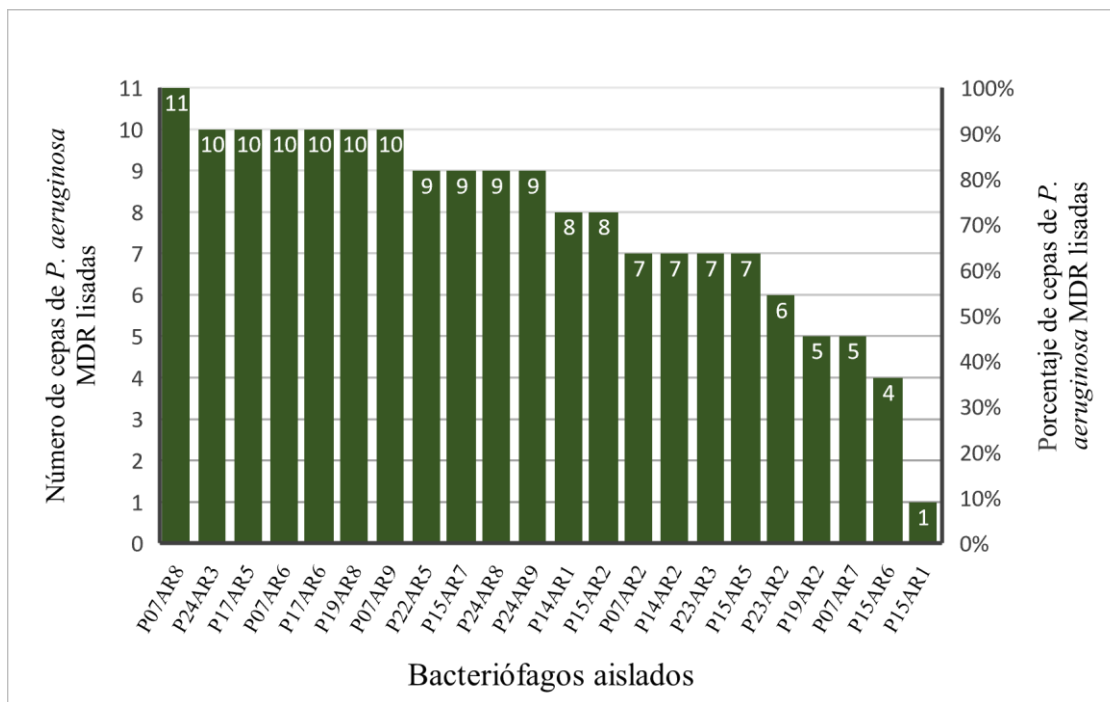


Figura 3. Capacidad lítica de los bacteriófagos sobre *P. aeruginosa* MDR, según el número y/o porcentaje de cepas lisadas.

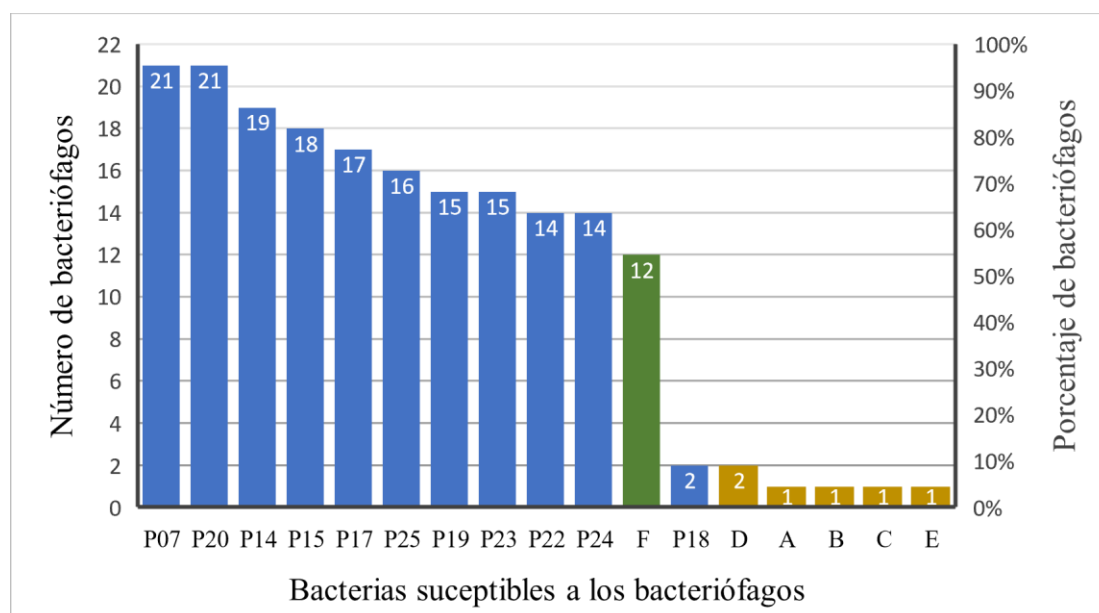


Figura 4. Susceptibilidad bacteriana frente a los 22 bacteriófagos obtenidos en este estudio, según el número y/o porcentaje de bacteriófagos que generaron lisis.

4.1.7.2. Curva de crecimiento de un solo paso

Como lo indica la Figura 5, los periodos de latencia variaron desde 5 minutos (P07AR6 y P07AR8) hasta 10 minutos (15AR1) con tamaños de explosión de 19,8 UFP/mL para 15AR1; 23,8 UFP/mL para P07AR6 y 52 UFP/mL para P07AR8.

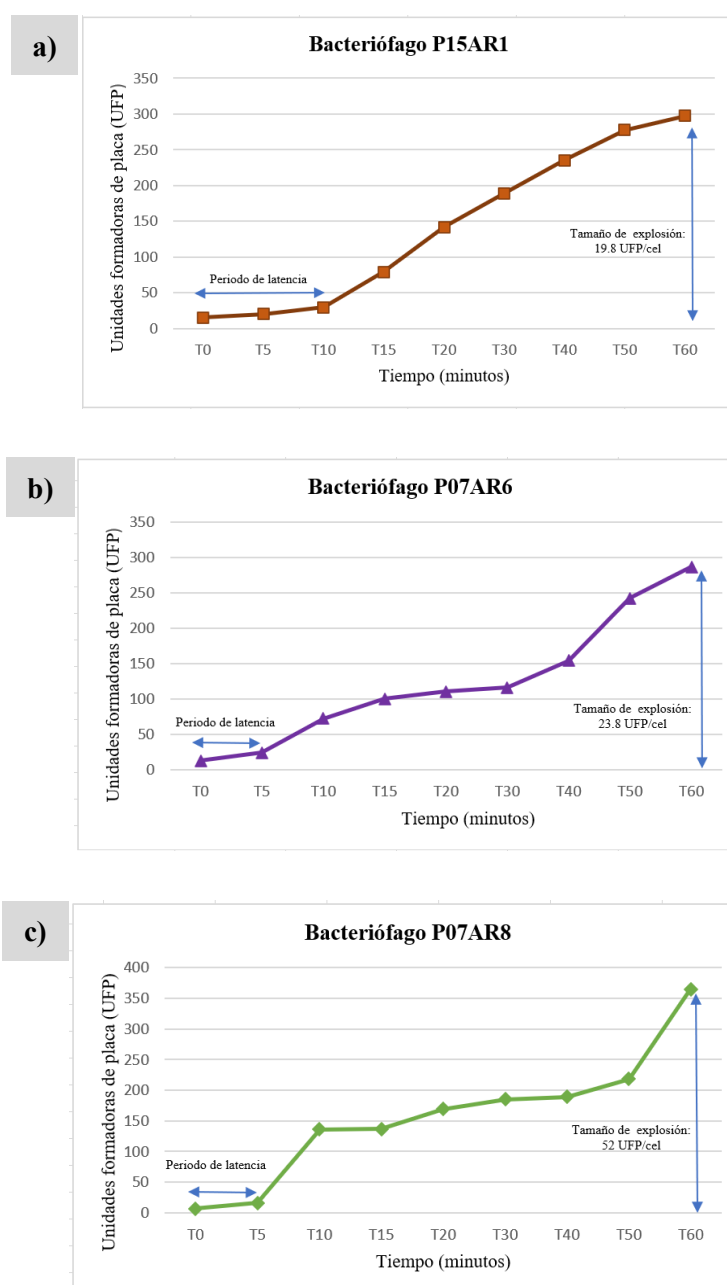


Figura 5. Curvas de crecimiento un solo paso para los bacteriófagos seleccionados. Se muestra el promedio de tres repeticiones $\pm$ desviación estándar. a) P15AR1, b) P07AR6, c) P07AR8. Los datos numéricos correspondientes se detallan en el Apéndice 7.

4.1.8. Caracterización fisicoquímica de bacteriófagos

4.1.8.1. Efecto del pH sobre la concentración de los bacteriófagos

En esta caracterización se expusieron a los 22 bacteriófagos a los pH de 3, 5, 7 y 9, los cuales fueron incubados durante una hora a 37 °C, posterior al tiempo de incubación se determinó la titulación de cada bacteriófago. En la Figura 6 se muestra el efecto de los diferentes pH sobre la concentración de cada bacteriófago. Los P14AR1 y P15AR5 mostraron ligera sensibilidad a pH 9, mientras que los bacteriófagos P07AR2, P15AR6, P17AR6, P07AR7, P24AR8 y P24AR9 redujeron su concentración a pH 3 (Apéndice 8). Por su parte, los bacteriófagos P15AR1 y P17AR5 redujeron su titulación a pH 3, 5 y 9 en un máximo de una escala.

4.1.8.2. Efecto de la temperatura sobre la concentración de los bacteriófagos

La viabilidad de los bacteriófagos frente a las temperaturas de 4 °C, 12 °C, 37 °C y 60 °C durante una hora se muestran en la Figura 7. Todos los bacteriófagos fueron estables a 4 °C incluso los bacteriófagos P15AR6 y P24AR8 mostraron ligeramente el incremento de su titulación a esta temperatura. Por el contrario, la mayoría de los fagos fueron sensibles a 60 °C, perdiendo incluso el 100% de su infectividad como es el caso del bacteriófago P17AR5. Sin embargo, algunos como P14AR2, P23AR2, P23AR3, P07AR6, P15AR6, P07AR8 y P19AR8 redujeron un máximo de dos escalas logarítmicas a 60 °C. Los bacteriófagos P19AR2, P14AR1, P15AR7, P19AR8, P15AR2, P17AR5, P22AR5, P23AR3 y P07AR7 mostraron ser ligeramente sensibles a 12 °C al igual que P07AR9 (Apéndice 9).

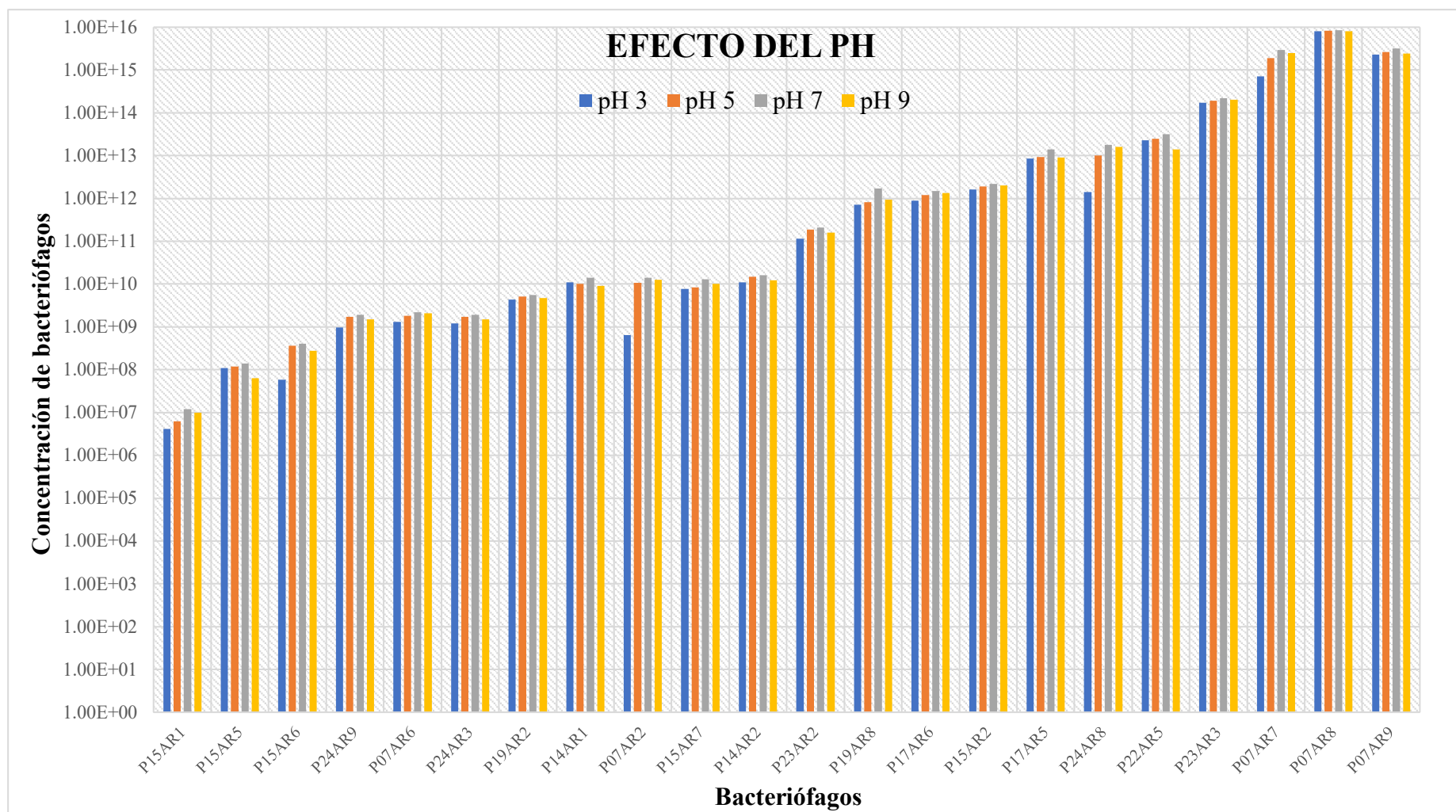


Figura 6. Efecto del pH sobre la titulación de los bacteriófagos.

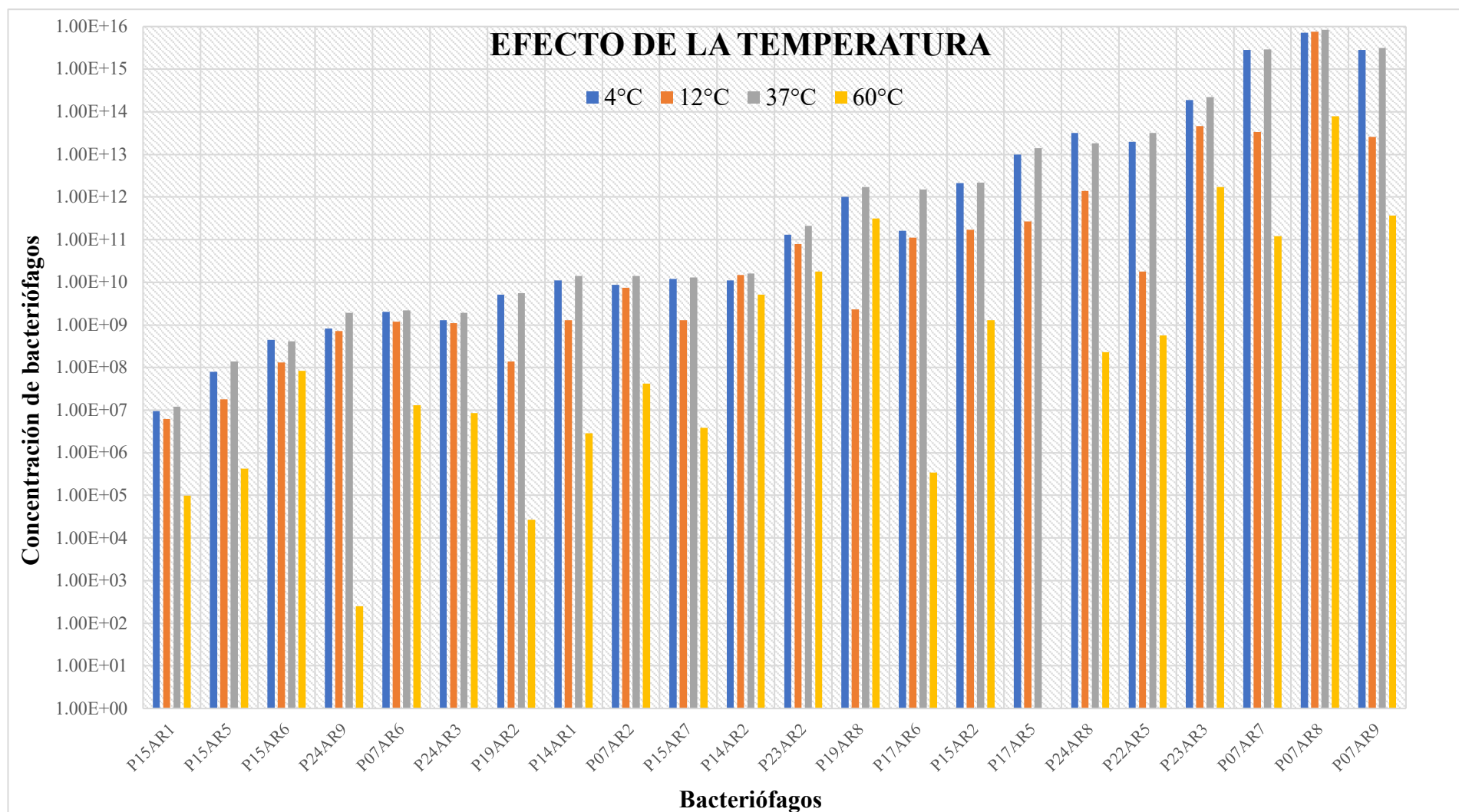


Figura 7. Efecto de las temperaturas de incubación sobre la titulación de los bacteriófagos.

4.2. Discusión

Aislar y caracterizar bacteriófagos líticos contra *P. aeruginosa* multirresistente (MDR) es fundamental para el desarrollo de alternativas terapéuticas frente a infecciones causadas por bacterias resistentes a múltiples antimicrobianos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido esta urgencia, clasificando a *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos como patógeno de alta prioridad en 2024, debido a su alta frecuencia en ambientes hospitalarios y a su difícil control y erradicación (137,138).

En el presente estudio, las once cepas de *P. aeruginosa* fueron confirmadas como bacilos gramnegativos productores de pigmento en agar Cetrimide (Apéndice 2). Con base a la definición de Magiorakos *et al.* (74), estas bacterias fueron clasificadas como MDR, evidenciando resistencia a por lo menos un representante de tres o más categorías diferentes de antimicrobianos. Las once cepas resultaron no sensibles (resistentes o con sensibilidad intermedia) a carbapenémicos, cefalosporinas de tercera y cuarta generación, y fluoroquinolonas (Tabla 1), evidenciando patrones de resistencia antimicrobiana (RAM) alarmantes. La cepa P18 fue resistente a aztreonam (ATM) y amikacina (AK), pero fue sensible a piperacilina/tazobactam (TPZ), perfil que sugiere la mayor amplitud de resistencia entre los aislados analizados, lo que concuerda con estudios previos que describen la limitada eficacia terapéutica frente a cepas *P. aeruginosa* MDR debido a la resistencia combinada a β -lactámicos aminoglucósidos y fluoroquinolonas (10,39,40,47,48,53,139,140).

Este patrón de resistencia coincide con lo reportado por Llanos (20), quien encontró niveles elevados de no susceptibilidad en *P. aeruginosa* frente a la mayoría de betalactámicos, con excepción de TPZ. Asimismo, Cubas y Huaripata (41), en un estudio

realizado en la región de Cajamarca confirmaron altos niveles de resistencia de *P. aeruginosa* frente a cefalosporinas, monobactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas, resultados que se alinean con los obtenidos en la presente investigación. En conjunto, estos hallazgos refuerzan la necesidad urgente de implementar alternativas terapéuticas efectivas frente a cepas MDR de *P. aeruginosa*. En este contexto, los bacteriófagos líticos representan una herramienta prometedora para su posible aplicación dada su capacidad específica para eliminar bacterias resistentes.

Conocer las características fenotípicas de los bacteriófagos es esencial para comprender su comportamiento biológico y su posible potencial terapéutico (141). Para este fin, es necesario la selección de bacteriófagos estrictamente líticos ya que los fagos lisogénicos no generan lisis celular inmediata y por esto, ciertas bacterias pueden adquirir genes de resistencia a antimicrobianos e incluso modular negativamente la respuesta al tratamiento (142). Con base a ello, el análisis de profagos es una herramienta relevante para detectar bacterias que podrían contener fagos lisogénicos.

En la presente investigación, la evaluación de las once cepas de *P. aeruginosa* MDR no evidenció la presencia de profagos (Figura 1). Se utilizó el protocolo descrito por Sfredo (109), quien, en contraste con estos hallazgos, reportó la detección de dos muestras positivas a profagos. Este método empleado se basa en la capacidad de algunos fagos lisogénicos para activarse espontáneamente producto del estrés metabólico o la densidad celular elevada, al activarse estos profagos entrarían en ciclo lítico, lo cual se evidencia en la formación de halos de lisis (143).

Las aguas residuales son la fuente primaria para el aislamiento de bacteriófagos debido a su elevada carga y diversidad bacteriana (2,57,78). Esta premisa fue validada en el presente estudio en el que se procesaron 10 muestras de agua residual del Hospital Regional Docente de Cajamarca (HRDC), logrando el aislamiento de 22 bacteriófagos activos frente a *P. aeruginosa* MDR en ocho de las muestras (Tabla 2). Estos hallazgos coinciden con los reportados por García y Porras (3), quienes aislaron fagos frente a *P. aeruginosa* en el 66,6% de filtrados de agua residual. La ausencia de lisados en las dos muestras restantes del presente estudio podría atribuirse a la falta de la bacteria hospedera, ya que en ausencia de un hospedero específico tampoco se produce el desarrollo de fagos contra dicha bacteria (22).

El uso de cloroformo al 4% para el aislamiento de bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa* resultó determinante para obtener partículas fágicas libres de restos bacterianos y compuestos lipídicos (2), favoreciendo la liberación y recuperación de fagos sin envoltura lipídica en el sobrenadante (144). Diversos estudios indican que los fagos obtenidos por este método suelen pertenecer al orden *Caudovirales*, que son predominantemente líticos y resistentes a solventes orgánicos (82,144), incluyendo miembros de la familia *Myoviridae* (145). Este enfoque es relevante, ya que estos fagos suelen presentar mayor estabilidad frente a variaciones fisicoquímicas (118,136,146). Bajo este método, en el presente estudio se aislaron 22 bacteriófagos, lo que evidencia su eficacia para la recuperación de bacteriófagos no asociados a lípidos o desnudos con potencial lítico.

En este estudio, se evaluaron las morfologías de las placas líticas generadas por los 22 fagos aislados, clasificándolas en tres tipos (Figura 2). Dado que cada calva de lisis puede

reflejar características intrínsecas del fago relacionadas a su tasa de adsorción, tiempo de lisis, tamaño de explosión, morfología del fago y su afinidad por receptores específicos (136,147), se mantuvo constante la densidad de *P. aeruginosa* (0.5 McFarland) y el medio de cultivo (agar nutritivo), de forma que las variaciones observadas dependieran principalmente a estas propiedades.

El primer tipo correspondió a placas líticas de 2 – 4 mm, halos claros, circulares y bordes definidos (Figura 2a), observadas en fagos como P07AR6 y P07AR8, que exhibieron tiempos de latencia de 5 minutos y tamaños de explosión de 23 y 51,8 UFP/célula, respectivamente (Figura 5), lo que sugiere una lisis eficiente, atribuible a la producción suficiente de progenie fágica lo que permite infectar rápidamente células bacterianas y expandir la zona de lisis (147,148). Este patrón coincide con lo reportado por Ameh *et al.* (148), quienes demostraron que fagos capaces de generar placas de aproximadamente 3 mm, eliminaban poblaciones de *E. coli* (MOI 1) en 6 horas, mientras que aquellos con placas medianas o pequeñas requerían entre 12 y 18 horas. De forma similar, Kaur *et al.* (149) indicaron que una alta tasa de adsorción, un período de latencia corto y un tamaño de explosión grande favorecen la formación placas líticas más amplias.

En contraste, otros fagos generaron placas líticas de 0,2 – 1,4 mm y con bordes que variaban de ligeramente difusos a definidos (Figura 2c), como P15AR1, que presentó el mayor tiempo de latencia y el menor tamaño de explosión (19,8 UFP/célula) (Figura 5). Esto podría asociarse a una baja tasa de adsorción, que prolonga la fase extracelular y retrasa el inicio de la infección, limitando la eficiencia fágica resultando en placas líticas pequeñas y difusas (1,108). No obstante, estudios previos evidencian que latencia y tamaño de explosión no siempre se correlacionan. García y Porras (3), observaron fagos

con igual latencia (0 minutos) pero tamaños de explosión muy distintos (1000 y 42 UFP/célula). Latz *et al.* (116), describieron variaciones similares con latencias prolongadas. Dennehy *et al.* (147) destacan que la eficiencia de lisis y la expansión del halo dependen también de la disponibilidad del hospedero. En el presente estudio, sí se observó que mayores tamaños de explosión coincidieron con halos más amplios y definidos.

Se ha evidenciado que las características fisiológicas y estructurales del hospedero influyen en el periodo de latencia y el tamaño de explosión de un fago, factores como el tamaño celular, la tasa de crecimiento, los receptores de membrana, los mecanismos de defensa intrínsecos como sistemas CRISPR-Cas y su maquinaria biosintética, pueden modular la eficiencia de la infección fágica y por ende alterar los parámetros cinéticos del ciclo lítico (150,151). De este modo, *P. aeruginosa* es una bacteria de rápido crecimiento, con tiempos de duplicación de aproximadamente de 20 a 30 minutos en condiciones óptimas, lo que favorecería ciclos fágicos más cortos y productivos (152).

En este sentido, García y Porras (3) describieron fagos contra *P. aeruginosa* con periodos de latencia entre 0 y 10 minutos, con tamaños de explosión desde 3 688 hasta 15 UFP/célula. En contraste, el fago ASCF1 de *L. monocytogenes* exhibió tiempos de latencia de 120 minutos y un tamaño de explosión reducido de 9,72 UFP/célula (21), posiblemente asociado al ritmo metabólico de su hospedero, que es de crecimiento lento, en comparación con *P. aeruginosa*, pudiendo generar así ciclos líticos más prolongados. Del mismo modo, Cuyutupa (115), reportó fagos de *Salmonella enterica* serovar Infantis con un tiempo de latencia de 10 minutos y tamaño de explosión de 32,93 UFP/célula, valores comparables a los observados en este estudio con el bacteriófago P07AR6

(periodo de latencia de 5 minutos y tamaño de explosión de 23,8 UFP/célula) (Figura 5), lo cual se explicaría por las similitudes en las tasas de crecimiento rápidas y maquinarias activas entre *S. Infantis* y *P. aeruginosa*, favoreciendo ciclos líticos más eficientes.

La determinación de la concentración de partículas fágicas activas es fundamental en la caracterización de bacteriófagos, ya que permite evaluar su estabilidad a lo largo del tiempo y bajo diferentes condiciones de pH, temperatura y almacenamiento, además, este parámetro facilita la comparación de la eficiencia de replicación entre diferentes fagos o frente a distintas cepas hospedero (1). En este estudio, la titulación de los bacteriófagos varió ampliamente desde 10^7 UFP/mL (P15AR1) hasta 10^{15} UFP/mL (P07AR8) (Tabla 3), lo cual refleja diferencias intrínsecas en la eficiencia del ciclo lítico de cada fago.

Diversos estudios han reportado títulos similares en fagos contra *P. aeruginosa*. Por ejemplo, García y Porras (3) obtuvieron concentraciones que oscilaron entre 10^4 y 10^{12} UFP/mL, mientras que Sánchez (2), reportó valores entre 10^7 y 10^{13} UFP/mL, lo cual es consistente a lo reportado en el presente estudio. En contraste, fagos como ASCF1 dirigido contra *L. monocytogenes* presentó una concentración de 10^8 UFP/mL (21), que ha comparación de P07AR9 y otros fagos que superaron la concentración de 10^{14} UFP/mL, es considerablemente menor. Esto puede atribuirse en parte a la menor tasa de crecimiento de su hospedero.

Esta variabilidad en los títulos se explica por la interacción de múltiples factores, aunque el tamaño de explosión es uno de los más influyentes este actúa en conjunto con la eficiencia de adsorción del fago, el número de ciclos líticos realizados durante el cultivo, la eficiencia de ensamblaje de nuevas partículas virales y el tipo de metabolismo del

hospedero (105,136,148). En este contexto, la marcada diferencia en las concentraciones de P15AR1 y P07AR8, puede atribuirse a que este último presenta un menor tiempo de latencia y un mayor tamaño de explosión, condiciones que favorecen un mayor número de ciclos líticos y, por tanto, una producción superior de viriones en el mismo periodo de incubación. Además, una probable mayor afinidad de P07AR8 por los receptores bacterianos podría aumentar su eficiencia de adsorción, permitiendo infectar un mayor número de células por unidad de tiempo y sostener así títulos elevados, como los observados en este estudio.

Los receptores bacterianos que interaccionan con los sistemas de reconocimiento de los bacteriófagos pueden variar tanto entre familias fágicas como entre cepas de una especie bacteriana, esta variabilidad condiciona la amplitud del rango de hospedero (153). En el presente estudio, se consideró como hospedero a aquella cepa en la que se observó la formación de halo de lisis en placas de doble agar (Apéndice 6). Estos halos son producto de enzimas líticas fágicas, principalmente holinas y lisinas, que se difunden a través de la capa de agarosa y degradan la envoltura celular bacteriana, generando así zonas traslucidas en el agar (154). La especificidad del rango de hospederos se ve condicionado por la variabilidad estructural de los receptores bacterianos y la diversidad funcional de las enzimas líticas (155).

En *P. aeruginosa* diversos estudios han identificado receptores para bacteriófagos, tales como el lipopolisacárido (LPS), especialmente su núcleo (156) y Antígeno O - específico (157), el pili tipo IV (158) y las proteínas de membrana externa como OprF y OprM (159). Por ejemplo, Garbe *et al.* (158) observó que el fago JG024 utilizó al menos dos receptores, el pili tipo IV y el LPS, que le permitió infectar un amplio espectro de hospederos

alcanzando hasta un 84% de efectividad. En acorde, Sánchez (2) observó que el fago F1AO-501 infectó el 80% de cepas de *P. aeruginosa* MDR. Resultados similares fueron obtenidos en este estudio en los que se reportó elevados rangos de hospederos donde fagos como P24AR3, P17AR5, P07AR6, P17AR6, P19AR8 y P07AR9 lisaron el 90,91% de *P. aeruginosa* en estudio, mientras que, P07AR8 lisó el 100% (Figura 3), lo que sugiere el uso de múltiples receptores conservados entre las cepas bacterianas.

En contraste, el fago P15AR1 que lisó únicamente a su cepa hospedero original (Figura 3), podría tener afinidad por receptores altamente variables entre las cepas, como proteínas de membrana externa, limitando de este modo el espectro de infección, esto es independiente de la titulación que presente el bacteriófago (160). Lo anteriormente mencionado ha sido documentado por Al-Wrafy *et al.*, quienes observaron que la proteína fágica PA-PP fue eficiente solo para la cepa PAR50 de *P. aeruginosa* (160). Del mismo modo, Llanos (20) reportó bacteriófagos que solo lisaron a su cepa hospedero inicial, acorde a lo observado con el fago P15AR1.

La resistencia bacteriana a los fagos puede manifestarse en diferentes etapas del ciclo fágico. Las bacterias han desarrollado múltiples mecanismos de adaptación, como la mutación en receptores bacterianos, el sistema CRISPR/Cas, e incluso la activación de sistemas de defensa abortiva (Abi), que inducen el suicidio celular para impedir la replicación del fago (152,155). En este contexto, Li *et al.* (151), determinaron que la variante PA1RG de *P. aeruginosa* que carecía del antígeno O de cadena larga, era menos susceptible a la infección por fagos. Las mutaciones de resistencia para los fagos varían según el tipo de LPS al que se une, incluso puede haber mutaciones en el pili tipo IV, lo que impediría la formación del receptor al que se une (152). Estos factores mencionado

podrían estar involucrados en la resistencia observada en la cepa P18 de *P. aeruginosa* frente a la mayoría de los fagos analizados en este estudio.

La capacidad de los fagos para superar los mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa* involucran el transporte de enzimas, como las depolimerasas, localizadas en la cápside o cola, capaces de degradar la biopelícula y facilitar el acceso del fago a sus receptores diana, otros, modifican sus bases de nucleótidos, evitando el reconocimiento por las nucleasas del hospedero y asegurando la integridad de su ADN viral (155). Asimismo, algunos han desarrollado proteínas anti-CRISPR (Acr), que bloquean el sistema de defensa CRISPR-Cas bacteriano, impidiendo la degradación de su material genético, en *P. aeruginosa*, se han descrito AcrIF1, AcrIF2 y AcrIF3, capaces de neutralizar el sistema tipo I-F, que permite al fago completar su ciclo lítico y mantener títulos elevados en el tiempo (150). Este tipo de adaptaciones podrían explicar la capacidad lítica de los fagos P07AR8 y P07AR6, que fueron los únicos en lisar a la cepa P18 (Apéndice 6), lo que sugiere que poseen mecanismos adicionales de evasión de defensas bacterianas.

En este estudio, a pesar de que la mayoría de bacteriófagos fueron específicos para *P. aeruginosa*, algunos mostraron capacidad de infectar otras bacterias gramnegativas (*E. coli*, *Salmonella* sp., *Klebsiella pneumoniae*, y *K. aerogenes*) e incluso grampositivas (*S. aureus* ATCC25923) (Figura 4). Esto ha sido reportado por Kim *et al.* (107), quienes describieron que el bacteriófago PA1Ø aislado contra *P. aeruginosa*, mostró fuerte actividad lítica contra *Shigella sonnei*, *S. aureus*, *Streptococcus salivarius* y *L. monocytogenes*. De esto se deduce que muchos bacteriófagos utilizan receptores de adhesión que están presentes en una amplia gama de bacterias, como el LPS y las proteínas de membrana externa ubicadas en la superficie de las bacterias gramnegativas

(152). Esto se evidenció en el fago Φ SER1, que infectó diversas especies del orden Enterobacterales, además se destaca la presencia de genes codificadores de fibras y proteínas de cola que permiten una unión flexible (161).

Los bacteriófagos aislados en las aguas residuales del HRDC, al estar expuestos a muchas especies bacterianas, posiblemente coevolucionaron para reconocer patrones repetitivos comunes entre especies diferentes. Esta hipótesis concuerda con lo reportado por Filik *et al.*, quienes determinaron que en *P. aeruginosa*, el antígeno O presenta patrones glucídicos repetitivos que pueden ser estructuralmente similares a los ácido teicoicos de *S. aureus*, lo que facilitaría la unión accidental o adaptativa, sobre todo en fagos con fibras flexibles (162). De manera coherente, González *et al.* (19) tras evaluar el rango de hospederos, observaron que dos bacteriófagos líticos aislados contra *P. aeruginosa* también fueron capaces de lisar a *S. aureus*, hallazgo que coincide con los resultados obtenidos en la presente investigación para el fago P14AR1.

Es importante destacar que, aunque se utilizó una misma cepa hospedera para el aislamiento de bacteriófagos a partir de diferentes muestras de agua residual, los fagos resultantes no necesariamente corresponden al mismo. Esto se evidenció claramente en la comparación de los bacteriófagos P07AR2 y P07AR9, que, a pesar de haber empleado la misma cepa para su aislamiento, difirieron significativamente en su caracterización. El fago P07AR2 no fue específico para *P. aeruginosa* ya que lisó cepas de *K. pneumoniae* y *K. aerogenes*, además presentó sensibilidad a 60 °C y pH 3. Por el contrario, el fago P07AR9 fue específico para *P. aeruginosa* lisando exclusivamente a 10 cepas de esta especie y manteniendo estabilidad frente a 60 °C y a los distintos niveles de pH.

Estos resultados reflejan la diversidad funcional y genómica entre fagos aislados de diferentes fuentes, incluso cuando se utiliza una misma cepa como sistema de enriquecimiento. Casos similares han sido reportados por Wannasrichan *et al.* (132), quienes aislaron el fago JJ01 (miovirus) utilizando como hospedero a *P. aeruginosa* PA01 y observaron una especificidad estricta hacia esta especie bacteriana. En contraste, Kim *et al.* (107) también utilizaron la cepa de *P. aeruginosa* PA01 para aislar el bacteriófago lítico PA1Ø (sifovirus) el cual mostró actividad lítica no solo contra *P. aeruginosa* sino también contra *S. sonnei*, *S. aureus*, *S. salivarius* y *L. monocytogenes*. Estos hallazgos refuerzan la idea de que el origen ambiental del fago y su diversidad natural influyen significativamente en su especificidad y estabilidad, incluso cuando el aislamiento se realice utilizando el mismo hospedero.

Las variaciones de temperatura y pH pueden alterar la dinámica replicativa de los bacteriófagos, lo que resulta crítico para su aplicación biotecnológica en áreas como la fagoterapia, la industria alimentaria o el tratamiento de aguas (163). En este estudio, se evaluó la concentración de los 22 fagos después de una hora de exposición a pH 3, 5, 7 y 9, así como temperatura de 4 °C, 12 °C, 37 °C y 60 °C. En general, todos mantuvieron su infectividad a nivel de pH, con reducciones máximas de hasta dos órdenes logarítmicos (Figura 6), lo que denota una estabilidad considerable. El fago P07AR2 mostró mayor sensibilidad a pH 3 (Apéndice 8), patrón también observado en el fago vB_PaeM_SCUT-S2S2 (164), mientras que la mayoría de los fagos mostró estabilidad entre pH 5 y 9, en concordancia con lo reportado previamente (2,18).

La tolerancia al pH puede asociarse a la solidez estructural de la cápside, donde proteínas ricas en enlaces disulfuro o con disposición compacta tipo β – hojas, como, los miovirus,

resisten mejor la protonación excesiva y la desnaturalización (163). El pH ácido puede generar cambios electrostáticos e interferir con la adsorción al receptor bacteriano, reduciendo la infectividad sin destruir al fago (156), como ocurrió con P07AR2. Por otro lado, a pH 9 solo se observaron leves reducciones, posiblemente debido a la disociación proteica (163), como en P14AR1 y P15AR5. Los resultados confirman que el pH 3 ejerce mayor efecto adverso, probablemente por la alteración de interacciones no covalentes esenciales, que puede desestabilizar la estructura proteica (165,166). En acorde a esto, Sánchez (2) observó que el F1AO-505 redujo más su título a pH 3 que a pH 9.

Bacteriófagos aislados en entornos con pH variable, como aguas residuales hospitalarias, probablemente han desarrollado adaptaciones que favorecen su tolerancia (163). Esto se evidenció en los fagos P07AR7 y P15AR7, procedentes de la misma muestra, que mostraron una ligera reducción en sus títulos a pH 3, de igual forma con P15AR6 y P17AR6. Este comportamiento coincide con otros estudios que demuestran que las variaciones ambientales incluida la acidez impactan en la estabilidad de las partículas fágicas (167). Estos hallazgos resaltan que la estabilidad frente al pH no solo depende de la estructura proteica, sino también del nicho ecológico de origen.

Por otra parte, en este estudio, la mayoría de los fagos fueron estables a 4 °C (Figura 7). Singularmente, los bacteriófagos P24AR8 y P15AR6 tras incubación por una hora a 4 °C exhibieron, en comparación con 37 °C, ligeras mejoras en la titulación. Esto puede atribuirse a que a temperaturas bajas se minimiza la actividad de enzimas degradativas residuales del hospedero, como las proteasas o nucleasas, además, de la reducción de reacciones espontáneas que pueden comprometer la integridad del fago, favoreciendo así su viabilidad previa a la titulación (1,163).

En contraste, el bacteriófago P17AR5 se inactivó completamente a 60 °C perdiendo el 100% de su infectividad (Apéndice 9), además, evidenció una ligera reducción a 12 °C, lo que indica una alta sensibilidad térmica. Estos patrones concuerdan con estudios previos: García y Porras (3) reportaron que el fago LR3 se inactivó a 60 °C después de 5 minutos de incubación. Otros estudios, como los de Yu *et al.* (168), Akremi *et al.* (18) y Wang *et al.* (169), han confirmado la estabilidad térmica de diversos fagos entre 4 °C y 55 °C, con pérdidas marcadas solo a temperaturas más extremas. A temperaturas altas los bacteriófagos pueden prolongar el periodo de latencia (163), además, pueden generar que las proteínas de la cápside, la cola, las proteínas de unión a receptores y enzimas se desnaturalicen, perdiendo su funcionalidad (170).

Bacteriófagos como P14AR2, P23AR2, P23AR3, P07AR6, 15AR6, P07AR8 y P19AR8 mostraron buena tolerancia a 60 °C. Estudios sugieren que la resistencia térmica de algunos fagos se le atribuye a mayor cantidad de enlaces iónicos y puentes de hidrógeno que estabilizan su estructura y confieren mayor compactación, además poseen mayor proporción de aminoácidos hidrofóbicos (171,172). Estos mismos fagos pueden portar endolisinas termoestables como LysPA26 que obtuvo una actividad antibacteriana contra *P. aeruginosa* del 90% a 50 °C (173), o la endolisina PVP-SE1gp146 que pudo mantener su actividad contra la misma especie a temperaturas de hasta 90 °C (174). Por este motivo, la infectividad a alta temperatura de los fagos observados podría estar relacionada con alguno de estos mecanismos.

Asimismo, la estabilidad fisicoquímica de los fagos tiende a estar relacionada con la de su hospedero, dado que ambos coexisten en los mismos nichos ecológicos, generando así presión selectiva para ambos (3,175). Esto ha sido reportado por Alegre (21), que observó

que el fago ASCF1 fue estable entre 4 °C y 45 °C coincidiendo con el rango de crecimiento de su hospedero, *L. monocytogenes*. De forma análoga, el fago ΦYS40, que infecta a *Thermus thermophilus*, cuyo rango óptimo de crecimiento es 65 °C, fue estable a 78 °C y, en menor medida, a 55 °C (176). En *P. aeruginosa*, una bacteria mesófila que crece entre 4 °C y 42 °C se esperaría que sus fagos toleren temperaturas similares o superiores dependiendo de su morfología y composición estructural, sin embargo, esta correspondencia no es absoluta pues la infectividad depende también de la afinidad por receptores bacterianos, la estabilidad conformacional de las proteínas de la cápside y otras interacciones moleculares (177).

Se observó, además, una leve reducción en la titulación a 12 °C en comparación con 4 °C. Litt *et al.* (165) reportaron un patrón similar, donde un fago lítico de *E. coli* redujo más su concentración a 25 °C que a 15 °C. De igual forma, Alegre (21) reportó que el fago de *L. monocytogenes* permaneció estable a 4 °C, pero redujo su concentración a 24 °C. Estos resultados podrían explicarse porque, a temperaturas intermedias (12 °C y 25 °C), ciertas reacciones moleculares y enzimáticas continúan, aunque a una velocidad inferior a la óptima, lo que prolonga la fase de latencia y aumenta el riesgo de daño en proteínas esenciales como las de unión a receptores, haciéndolas más susceptibles a la pérdida de actividad, en contraste, a 4 °C la actividad catalítica de las proteínas se reduce considerablemente o incluso se detiene, lo que limita procesos degradativos, contribuyendo a preservar la integridad estructural del fago (170,174,178).

Como se evidenció en la presente investigación, la temperatura ejerce una presión selectiva más intensa que el pH. En acorde a ello, se han reportado estudios como el realizado con el fago MS2, donde se observó que a medida que la temperatura aumenta

las proteínas fágicas se desnaturalizan incluso cuando se mantiene el pH a condiciones óptimas. Por el contrario, a pesar de las variaciones de pH, el fago MS2 permanece relativamente estable a una temperatura óptima (166). Esta diferencia puede deberse a que la temperatura afecta de manera directa la integridad de la estructura de la cápside y la actividad de sus enzimas, mientras que el pH afecta más cargas y protonación de residuos bacterianos lo que altera la adsorción al receptor o la actividad enzimática, pero sin romper directamente la estructura fágica (167).

Al integrar los parámetros analizados, en los que se incluye, el rango de hospederos, la tolerancia a diferentes condiciones fisicoquímicas y la cinética de replicación, los bacteriófagos P07AR8, P07AR6, P14AR2, P24AR3 y P15AR2 perfilan como candidatos potenciales para diversas aplicaciones biotecnológicas. En particular, P07AR8 destaca por reunir características particularmente deseables tales como un amplio espectro de infección, especificidad frente a cepas de *P. aeruginosa*, marcada actividad lítica frente a aislados altamente resistentes, elevada titulación y buena estabilidad frente a variaciones de pH y temperatura. Estos hallazgos no solo permiten entender la biología de los fagos aislados, sino que también contribuyen a identificar candidatos idóneos que podrían integrarse a terapias fágicas, reforzando el potencial de los bacteriófagos como herramientas biológicas complementarias o alternativas a los antimicrobianos convencionales en el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa* MDR.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Se logró la caracterización de los 22 bacteriófagos aislados en ocho de las diez muestras de agua residual del HRDC, demostrando que estos ambientes constituyen una fuente accesible y relevante para la búsqueda de fagos.

El rango de hospederos de los bacteriófagos mostró una variación desde el 90,91% (P24AR3, P17AR5, P07AR6, P17AR6, P19AR8, P07AR9) hasta el 36,36% (P15AR6), destacando el bacteriófago P07AR8, por su amplio espectro al lisar el 100% de las cepas de *P. aeruginosa* MDR estudiadas, contrario a P15AR1, cuya lisis se limitó a su cepa hospedero inicial (9,09%).

Los bacteriófagos P07AR8 y P07AR6 presentaron ciclos líticos eficientes con un tiempo de latencia de 5 minutos. El fago P07AR8 reportó el mayor tamaño de explosión con 52 UFP/célula, seguido por P07AR6 con 23,8 UFP/célula. En contraste, P15AR1 mostró un tiempo de latencia de 10 minutos y un tamaño de explosión de 19,8 UFP/célula.

Los bacteriófagos demostraron una alta estabilidad al mantener sus titulaciones casi intactas ante variaciones de pH (3, 5, 7, y 9) y temperaturas de 4 °C, 12 °C y 37 °C. No obstante, se observó una sensibilidad crítica a 60 °C. Se identificó a seis fagos (P07AR8, P07AR6, P14AR2, P24AR8, P15AR6 y P24AR3) como los más estables a las condiciones fisicoquímicas y biológicas evaluadas.

5.2. Recomendaciones

Para preservar la viabilidad y capacidad infectiva de los bacteriófagos, se recomienda realizar repiques periódicos cada seis meses.

Evaluar la morfología de los bacteriófagos mediante microscopía electrónica de transmisión para determinar su estructura y clasificación taxonómica.

Efectuar una secuenciación completa del genoma de los bacteriófagos con mayor estabilidad como P07AR8, a fin de confirmar la ausencia de genes asociados a lisogenia, factores de virulencia o marcadores de resistencia a antibióticos, garantizando así su seguridad para aplicaciones biotecnológicas.

Evaluar la eficacia de los bacteriófagos seleccionados en modelos más complejos, como biofilms bacterianos, cultivos celulares u otros sistemas *ex vivo*, con el fin de simular condiciones clínicas reales y validar su efectividad terapéutica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abedon ST, Culler RR. Optimizing bacteriophage plaque fecundity. *J Theor Biol.* 2007;249(3).
2. Sánchez Llatas CJ. Caracterización fenotípica de bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente (PAMR) aislados de agua de albañal, Provincia Trujillo, La Libertad, 2019 [Internet] [Licenciatura]. [La Libertad]: Universidad Nacional de Trujillo; 2020 [cited 2024 Feb 9]. Available from: <https://dspace.unitru.edu.pe/server/api/core/bitstreams/d62ef908-d830-45f8-8df7-6e2406496ca8/content>
3. García Salazar IA, Porras Nicho MY. Aislamiento de bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogo – resistente en aguas de tres ríos de la provincia de Lima-Perú [Internet]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2018 [cited 2024 Jan 26]. Available from: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/11042/Llanos_rc.pdf?sequence=1&isAllowed=y
4. Jáuregui Rojas P, Vásquez Tirado G, Rodríguez Montoya R, Albínez Pérez J. Factores de riesgo para infección por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente en pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica de la unidad de cuidados intensivos. Estudio multicéntrico. *Revista del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo* [Internet]. 2021 [cited 2024 Feb 8];14(1). Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2227-47312021000100002&lng=es.
5. Díaz Santos E, Mora Jiménez C, del Río-Carbajo L, Vidal-Cortés P. Treatment of severe multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Medicina Intensiva (English Edition)* [Internet]. 2022 [cited 2024 Feb 8];46(9). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0210569122001036?via%3Dihub>
6. Kumar N, Vasundhara, Chavan SK. *Pseudomonas aeruginosa*: A Persistent Pathogen and Current Approaches to Treatment-Microbiology [Internet]. Vol. 3, Salud, Ciencia y Tecnología. 2023 [cited 2024 Feb 8]. Available from: <https://revista.saludcyt.ar/ojs/index.php/sct/article/view/404>
7. Álvarez Otero J, Lamas Ferreiro JL, González González L, Rodríguez Conde I, Fernández Soneira MJ, Arca Blanco A, *et al.* Resistencia a carbapenemas en

- Pseudomonas aeruginosa* aisladas en urocultivos: Prevalencia y factores de riesgo. Revista Española de Quimioterapia [Internet]. 2017 [cited 2024 Feb 8];30(3). Available from: <https://www.seq.es/seq/0214-3429/30/3/alvarez25apr2017.pdf>
8. Viseda Torrellas Y. Enfermedades nosocomiales; prevalencia, control y relación con la resistencia a los antibióticos [Internet]. Universidad del País Vasco; 2021 [cited 2024 Feb 8]. Available from: https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/54278/TFG_Viseda.pdf?sequence=1&isAllowed=y
 9. Escolá Vergé L, Los Arcos I, Almirante B. New antibiotics for the treatment of infections by multidrug-resistant microorganisms. Med Clin (Barc) [Internet]. 2020 [cited 2024 Feb 8];154(9). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0025775319307110>
 10. Espinoza Pesantez DI, Esparza Sánchez GF. Resistencia enzimática en *Pseudomonas aeruginosa*, aspectos clínicos y de laboratorio. Revista chilena de infectología [Internet]. 2021 [cited 2024 Jan 26];38(1). Available from: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182021000100069
 11. Aguilar GR, Swetschinski LR, Weaver ND, Ikuta KS, Mestrovic T, Gray AP, *et al.* The burden of antimicrobial resistance in the Americas in 2019: a cross-country systematic analysis. Lancet Regional Health - Americas [Internet]. 2023 [cited 2024 Feb 8];25. Available from: [https://www.thelancet.com/journals/lanam/article/PIIS2667-193X\(23\)00135-7/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanam/article/PIIS2667-193X(23)00135-7/fulltext)
 12. Sousa AM. Bacteriófagos características gerais, utilidades e aplicações biotecnológicas [Internet]. [Brasil]: Universidade Federal de Minas Gerais; 2012 [cited 2024 Feb 13]. Available from: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-99UJCW/1/monografia_antonio_verfinal_16_04_2012.pdf
 13. Brown Jaque MA. Bacteriófagos en el cuerpo humano. Universidad de Barcelona. 2018.
 14. Vaitekenas A, Tai AS, Ramsay JP, Stick SM, Kicic A. *Pseudomonas aeruginosa* resistance to bacteriophages and its prevention by strategic therapeutic cocktail formulation. Vol. 10, Antibiotics. 2021.

15. Nour El-Din HT, Kettal M, Granados Maciel JC, Beaudoin G, Oktay U, Hrapovic S, *et al.* Isolation, Characterization, and Genomic Analysis of Bacteriophages Against *Pseudomonas aeruginosa*. Clinical Isolates from Early and Chronic Cystic Fibrosis Patients for Potential Phage Therapy. *Microorganisms*. 2025 Mar 1;13(3).
16. Rieper F, Wittmann J, Bunk B, Spröer C, Häfner M, Willy C, *et al.* Systematic bacteriophage selection for the lysis of multiple *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Front Cell Infect Microbiol*. 2025;15.
17. Zhang Y, Wang R, Hu Q, Lv N, Zhang L, Yang Z, *et al.* Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages and control hemorrhagic pneumonia on a mice model. *Front Microbiol*. 2024;15.
18. Akremi I, Merabishvili M, Jlidi M, Haj Brahim A, Ben Ali M, Karoui A, *et al.* Isolation and Characterization of Lytic *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophages Isolated from Sewage Samples from Tunisia. *Viruses* [Internet]. 2022 [cited 2024 Feb 9];14(11). Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/14/11/2339>
19. González P L, Lossada C, Galué Durán G, Zabala I, Pérez A, Alvarado Y. Characterization of lytic-specific phages of *Pseudomonas aeruginosa* with a broad infective spectrum [Internet]. Vol. 26, Scientific Journal from the Experimental Faculty of Sciences. 2018 [cited 2024 Feb 9]. Available from: <https://produccioncientificaluz.org/index.php/ciencia/article/view/36017/38449>
20. Llanos Rosales CD. Caracterización de bacteriófagos nativos candidatos a fagoterapia en infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antibióticos y productoras de biopelícula [Internet] [Bachiller]. [Lima]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2019 [cited 2024 Jan 26]. Available from: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/11042/Llanos_rc.pdf?sequence=1&isAllowed=y
21. Alegre Quijano A. Aislamiento y caracterización de un bacteriófago lítico de *Listeria monocytogenes* [Internet]. [Lima]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2019 [cited 2024 Feb 9]. Available from: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/10963/Alegre_qa.pdf?sequence=3&isAllowed=y
22. Punil Luciano RJ. Caracterización de un bacteriófago específico de *Escherichia coli* aislado de aguas residuales de “La Taboada” [Internet]. [Lima]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017 [cited 2024 Feb 9]. Available from:

https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/7363/Punil_lr.pdf?sequence=3&isAllowed=y

23. Moragues-Solanas L, Scotti R, O'Grady J. Rapid metagenomics for diagnosis of bloodstream and respiratory tract nosocomial infections: current status and future prospects. *Expert Rev Mol Diagn.* 2021;21(4).
24. Saleem Z, Godman B, Hassali MA, Hashmi FK, Azhar F, Rehman IU. Point prevalence surveys of health-care-associated infections: a systematic review. Vol. 113, *Pathogens and Global Health.* 2019.
25. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antibiotic Resistance Threats in The United States 2019. Vol. 10, CDC. 2019.
26. Ombelet S, Kpossou G, Kotchare C, Agbobli E, Sogbo F, Massou F, *et al.* Blood culture surveillance in a secondary care hospital in Benin: epidemiology of bloodstream infection pathogens and antimicrobial resistance. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2022 [cited 2024 Feb 9];22(1). Available from: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-022-07077-z>
27. Yao JF, Li N, Jiang J. Clinical characteristics of bloodstream infections in pediatric acute leukemia: A single-center experience with 231 patients. *Chin Med J (Engl)* [Internet]. 2017 [cited 2024 Feb 9];130(17). Available from: https://journals.lww.com/cmj/fulltext/2017/09050/clinical_characteristics_of_bloodstream_infections.10.aspx
28. Nourelhouda S, Aouatef R. Caractérisation des souches pathogènes responsables d'infection liées aux soins [Master]. Université de Biskra; 2024.
29. Hernández A, Yagüe G, García Vázquez E, Simón M, Moreno Parrado L, Canteras M, *et al.* Infecciones nosocomiales por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente incluido carbapenémicos: factores predictivos y pronósticos. Estudio prospectivo 2016-2017. *Rev Esp Quimioter* [Internet]. 2018 [cited 2024 Feb 9];31(2). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6159385/>
30. Agüero A, Infante K, Delgado F. Infecciones nosocomiales por bacterias gramnegativas y estadía prolongada en cuidados intensivos pediátricos. *Revista Habanera de Ciencias Médicas.* 2021;20(3).
31. Reynolds D, Kollef M. The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. *Drugs* [Internet]. 2021 [cited 2024 Feb 9];81(18):2117–31. Available from: <https://www.mendeley.com/catalogue/2c4c8ad7-59eb-36a8-930a-bb12545f3e7a/>

32. Ávila Torres YY, Cáceres Rojas MF, Aguilera Becerra AM. Infecciones asociadas con dispositivos, perfil microbiológico y resistencia bacteriana en unidades de cuidados intensivos de Casanare, Colombia. *Revista Investigación en Salud Universidad de Boyacá*. 2021;8(2).
33. Ioannou P, Alexakis K, Maraki S, Kofteridis DP. *Pseudomonas* Bacteremia in a tertiary hospital and factors associated with mortality. *Antibiotics* [Internet]. 2023 [cited 2024 Feb 9];12(4). Available from: <https://www.mdpi.com/2079-6382/12/4/670>
34. García Rodríguez JF, Mariño Callejo A. The factors associated with the trend in incidence of Bacteraemia and associated mortality over 30 years. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2023 [cited 2024 Feb 9];23(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9897612/>
35. Meschiari M, Onorato L, Bacca E, Orlando G, Menozzi M, Franceschini E, *et al.* Long-Term Impact of the COVID-19 Pandemic on In-Hospital Antibiotic Consumption and Antibiotic Resistance: A Time Series Analysis (2015–2021). *Antibiotics* [Internet]. 2022 [cited 2024 Feb 9];11(6). Available from: <https://www.mdpi.com/2079-6382/11/6/826>
36. Mayta Barrios MM, Ramírez Illescas JJ, Pampa Espinoza L, Yagui Moscoso MJ. Molecular characterization of carbapenemases in Perú during 2019. *Rev Perú Med Exp Salud Pública* [Internet]. 2021 [cited 2024 Feb 9];38(1):113–8. Available from: https://www.hospitalhuaycan.gob.pe/SIESMAR/Archivos/epidemiologia/3.2.0.0/A_lertas_Epidemiologicas-250422233056918.pdf
37. García-Cedrón D, De La Cruz Noriega M, Cabanillas-Chirinos L, Otiniano NM, Rojas-Villacorta W, Salvatierra-Espinola W, *et al.* Carbapenemase-Producing Bacteria Isolated from ICU Patients of a Peruvian Government Hospital during the COVID-19 Pandemic: A Descriptive Analysis. *Medicina (Lithuania)*. 2023 Oct 1;59(10).
38. Salvador Luján G, Ramírez Illescas J, Delgado Flores M, Núñez Llanos A, Mayta Barrios M. Primer reporte de carbapenemasa tipo KPC en *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital del Perú. *Rev Perú Med Exp Salud Pública* [Internet]. 2021 [cited 2024 Feb 8];38(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2021.383.7044>.
39. Rivera Granados JM. Frecuencia de *Pseudomonas aeruginosa* en secreciones endotraqueales de pacientes COVID-19 hospitalizados en una clínica privada de

- Lima 2020 [Internet] [Licenciatura]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2022 [cited 2024 Feb 9]. Available from: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/18093/Rivera_gj.pdf?sequence=1&isAllowed=y
40. Llontop Cornejo VJ. Determinación de genes blaSHV, blaTEM, blaCTX-M, en *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* BLEE+, aisladas en dos hospitales de Cajamarca. [Doctoral]. [Trujillo]: Universidad Nacional de Trujillo; 2021.
 41. Cubas Alberca NL, Huaripata Vásquez YE. Susceptibilidad bacteriana en cultivos de pacientes de la Unidad de Cuidados Intensivos en el Hospital Regional Docente de Cajamarca, 2016-2018. [Internet]. [Jaén]: Universidad Nacional de Jaén; 2016 [cited 2024 Jan 26]. Available from: <http://repositorio.unj.edu.pe/handle/UNJ/355>
 42. Blas Asipali VM. Carbapenemasas en bacterias gramnegativas no fermentadoras, aisladas en unidades críticas del Hospital Regional Docente Cajamarca, agosto a diciembre -2018. [Internet]. [Cajamarca]: Universidad San Pedro ; 2019 [cited 2024 Feb 9]. Available from: http://publicaciones.usanpedro.edu.pe/bitstream/handle/20.500.129076/17989/Tesis_66062.pdf?sequence=1&isAllowed=y
 43. Wu W, Jin Y, Bai F, Jin S. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Molecular Medical Microbiology [Internet]. 2015 [cited 2024 Feb 9]. p. 753–67. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B978012397169200041X>
 44. Paz Zarza VM, Mangwani Mordani S, Martínez Maldonado A, Álvarez Hernández D, Solano Gálvez SG, Vázquez López R. *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. Revista chilena de infectología [Internet]. 2019 [cited 2024 Jan 26];36(2). Available from: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182019000200180
 45. Luján Roca DÁ. *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. Acta bioquímica clínica latinoamericana [Internet]. 2014 [cited 2024 Feb 9];48(4). Available from: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572014000400009&lng=es.
 46. Procop G, Church D, Hall G, Janda W, Koneman E, Schreckenberger P, *et al.* Bacilos gramnegativos no fermentadores. In: Koneman Diagnóstico Microbiológico. 7 ed. Wolters Kluwer; 2017.

47. Cabrera Venegas YJ. Adaptación de *Pseudomonas aeruginosa* a la infección crónica en fibrosis quística: identificación de cepas con peptidoglicano de reducida capacidad inflamatoria y/o resistencia a la lisozima [Internet] [Maestría]. [España]: Universidad de las Islas Baleares; 2016 [cited 2024 Feb 9]. Available from: https://dspace.uib.es/xmlui/bitstream/handle/11201/146244/tfm_2015-16_MMAV_ycv529_438.pdf?sequence=1
48. García Castillo M del C. *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística: Dinámica poblacional y análisis ecológico según morfotipo, crecimiento en biopelículas y frecuencia de mutación [Internet] [Doctoral]. [Madrid]: Universidad Autónoma de Madrid; 2012 [cited 2024 Feb 9]. Available from: https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/12607/60958_Garc%c3%ada%20Castillo%20Ma%20Carmen.pdf?sequence=1&isAllowed=y
49. Sánchez Diener IA. Estudio de la interacción entre los marcadores de virulencia, perfil de resistencia y clones de alto riesgo en los modelos *Caenorhabditis elegans* y *Galleria mellonella*. Evaluación del valor predictivo como marcadores pronósticos en la bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa*. [Internet]. 2021 [cited 2024 Feb 9]. Available from: https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/673483/Sanchez_Diener_IrinaAlexis.pdf?sequence=1&isAllowed=y
50. Ben Haj Khalifa A, Moissenet D, Vu Thien H, Khedher M. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. Ann Biol Clin (Paris) [Internet]. 2019 [cited 2024 Feb 9];69(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21896403/>
51. Ruiz Martínez L. *Pseudomonas aeruginosa*: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. Tesis doct, Universidad de Barcelona. 2007.
52. Elfadadny A, Ragab RF, AlHarbi M, Badshah F, Ibáñez-Arancibia E, Farag A, *et al*. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: navigating clinical impacts, current resistance trends, and innovations in breaking therapies. Front Microbiol. 2024;15.
53. Hernández A, Yagüe G, García Vázquez E, Simón M, Moreno Parrado L, Canteras M, *et al*. Infecciones nosocomiales por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente incluido carbapenémicos: factores predictivos y pronósticos. Estudio prospectivo

- 2016-2017. Rev Esp Quimioter [Internet]. 2018 [cited 2024 Feb 9];31(2). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6159385/>
54. Bodí M, Garnacho J. *Pseudomonas aeruginosa*: tratamiento combinado frente a monoterapia. Med Intensiva [Internet]. 2007 [cited 2024 Feb 8];31(2). Available from: <https://www.medintensiva.org/es-pseudomonas-aeruginosa-tratamiento-combinado-frente-articulo-13101464>
 55. Ochoa SA, López Montiel F, Escalona G, Cruz Córdova A, Dávila LB, López Martínez B, *et al.* Pathogenic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains resistant to carbapenems associated with biofilm formation. Bol Med Hosp Infant Mex [Internet]. 2013 [cited 2024 Feb 9];70(2). Available from: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462013000200010
 56. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics [Internet]. Vol. 7, Signal Transduction and Targeted Therapy. 2022 [cited 2024 Feb 9]. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41392-022-01056-1>
 57. Suárez Cárdenas KO. Aislamiento y caracterización de un bacteriófago específico de *Vibrio cholerae* procedente de aguas residuales de Lima - Perú [Bachiller]. [Lima]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017.
 58. Friedman L, Kolter R. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. J Bacteriol [Internet]. 2004 [cited 2024 Feb 9];186(14). Available from: <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/34427/24155421.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 59. Bolívar Vargas AF, Torres Caycedo MI, Sánchez Neira Y. Biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* as mechanisms of resistance and tolerance to antibiotics. Revista de Facultad Ciencias de la Salud [Internet]. 2021 [cited 2024 Feb 9];23(2):47–57. Available from: <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/rfcs/article/view/1780/1542>
 60. Fang Z li, Zhang L yan, Huang Y min, Qing Y, Cao K yuan, Tian G bao, *et al.* OprD mutations and inactivation in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from China. Infection, Genetics and Evolution. 2014;21.

61. Jeannot K, Sobel ML, El Garch F, Poole K, Plésiat P. Induction of the mexXY efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on drug-ribosome interaction. *J Bacteriol.* 2005;187(15).
62. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv.* 2019;37(1):177–92.
63. Horcajada JP, Montero M, Oliver A, Sorlí L, Luque S, Gómez-Zorrilla S, *et al.* Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2019 [cited 2024 Feb 8];32(4). Available from: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/cmr.00031-19>
64. Montero MM. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos [Internet] [Doctoral]. TDX (Tesis Doctorals en Xarxa). [Barcelona]: Universidad Autònoma de Barcelona; 2012 [cited 2025 Jul 22].
65. Hooper DC, Jacoby GA. Topoisomerase inhibitors: Fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(9).
66. Elfadadny A, Ragab RF, AlHarbi M, Badshah F, Ibáñez-Arancibia E, Farag A, *et al.* Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: navigating clinical impacts, current resistance trends, and innovations in breaking therapies. Vol. 15, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media SA; 2024.
67. Singh S, Singh SK, Chowdhury I, Singh R. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. *Open Microbiol J.* 2017;11(1).
68. Limoli DH, Jones CJ, Wozniak DJ. Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiol Spectr.* 2015;3(3).
69. Colvin KM, Irie Y, Tart CS, Urbano R, Whitney JC, Ryder C, *et al.* The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environ Microbiol.* 2012;14(8).
70. Park S, Sauer K. Controlling Biofilm Development Through Cyclic di-GMP Signaling. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2022.
71. Sonbol F, El-Banna T, Elgaml A, Aboelsuod K. Impact of Quorum Sensing system on virulence factors production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Pure Appl Microbiol.* 2022;16(2):1226–38.

72. Venturi V. Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. Vol. 30, FEMS Microbiology Reviews. 2006.
73. Jiménez Pearson MA, Galas M, Corso A, Hormazábal JC, Duarte Valderrama C, Salgado Marcano N, *et al.* Latin American consensus to define, categorize, and report multidrug-resistant, extensively drug-resistant, or pandrug-resistant pathogens. *Rev Panam Salud Pública*. 2019;43.
74. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18(3).
75. European Food Safety Authority. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2022–2023. *EFSA Journal*. 2025 Mar 1;23(3).
76. Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 35th ed. Vol. 45, CLSI supplement M100 Clinical and Laboratory Standards Institute. 2025.
77. Chan BK, Siström M, Wertz JE, Kortright KE, Narayan D, Turner PE. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep*. 2016;6.
78. Gaviria A G, González M, Castaño J. Técnica para aislamiento de bacteriófagos específicos para *E . coli* DH5α a partir de aguas residuales isolation techniques. *Rev MVZ Córdoba* [Internet]. 2012 [cited 2024 Feb 9];17(1). Available from: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69323749007>
79. Czajkowski R, Jackson RW, Lindow SE. Editorial: Environmental bacteriophages: From biological control applications to directed bacterial evolution. Vol. 10, *Frontiers in Microbiology*. 2019.
80. Prada Peñaranda C. Evaluación del efecto de los bacteriófagos en biopelículas formadas por *Pseudomonas aeruginosa* [Internet]. [Bogotá]: Universidad de los Andes; 2009 [cited 2024 Feb 8]. Available from: <https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/25212/u371708.pdf?sequence=1>
81. Hatfull GF. Bacteriophage genomics. *Curr Opin Microbiol*. 2008;11(5):447–53.
82. Harper DR, Abedon ST, Burrowes BH, McConville ML. Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy. 2nd ed. Vol. 2; Springer; 2021.

83. Koonin E V., Senkevich TG, Dolja VV. The ancient virus world and evolution of cells. *Biol Direct*. 2006;1.
84. Hendrix RW. Bacteriophages: Evolution of the Majority. *Theor Popul Biol*. 2002;61(4).
85. Swenson KM, Guertin P, Deschênes H, Bergeron A. Reconstructing the modular recombination history of *Staphylococcus aureus* phages. *BMC Bioinformatics*. 2013;14, 15.
86. Botstein D. A theory of modular evolution for bacteriophages. *Ann N Y Acad Sci*. 1980;354(1).
87. Hatfull GF, Hendrix RW. Bacteriophages and their genomes. *Curr Opin Virol*. 2011;1(4):298–303.
88. Pedulla ML, Ford ME, Houtz JM, Karthikeyan T, Wadsworth C, Lewis JA, *et al*. Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes. *Cell*. 2003;113(2).
89. Martinsohn JT, Radman M, Petit MA. The λ red proteins promote efficient recombination between diverged sequences: Implications for bacteriophage genome mosaicism. *PLoS Genet*. 2008;4(5).
90. Swanson MM, Reavy B, Makarova KS, Cock PJ, Hopkins DW, Torrance L, *et al*. Novel bacteriophages containing a genome of another bacteriophage within their genomes. *PLoS One*. 2012;7(7).
91. Comeau AM, Bertrand C, Letarov A, Tétart F, Krisch HM. Modular architecture of the T4 phage superfamily: A conserved core genome and a plastic periphery. *Virology*. 2007;362(2).
92. Turner D, Kropinski AM, Adriaenssens EM. A roadmap for genome-based phage taxonomy. *Viruses*. 2021;13(3).
93. Xu J, Hendrix RW, Duda RL. Chaperone-protein interactions that mediate assembly of the bacteriophage lambda tail to the correct length. *J Mol Biol*. 2014;426(5).
94. McNair K, Bailey BA, Edwards RA. PHACTS, a computational approach to classifying the lifestyle of phages. *Bioinformatics*. 2012;28(5).
95. Dini C. Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) [Internet] [Doctoral]. [Argentina]: Universidad Nacional de la Plata; 2011 [cited 2024 Feb 9]. Available from: https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2686/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y

96. Segundo A, Hernández B, López V, Torres A. Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas (fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* [Internet]. 2010 [cited 2024 Feb 9];41(3). Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/579/57916078003.pdf>
97. Filik K, Szermer-Olearnik B, Oleksy S, Brykała J, Brzozowska E. Bacteriophage Tail Proteins as a Tool for Bacterial Pathogen Recognition—A Literature Review. Vol. 11, *Antibiotics*. 2022.
98. Zhu Y, Shang J, Peng C, Sun Y. Phage family classification under *Caudoviricetes*: A review of current tools using the latest ICTV classification framework. Vol. 13, *Frontiers in Microbiology*. 2022.
99. Turner D, Shkoporov AN, Lood C, Millard AD, Dutilh BE, Alfenas-Zerbini P, *et al.* Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee. *Arch Virol*. 2023;168(2).
100. Zhu Y, Shang J, Peng C, Sun Y. Phage family classification under *Caudoviricetes*: A review of current tools using the latest ICTV classification framework. Vol. 13, *Frontiers in Microbiology*. 2022.
101. Domínguez Navarrete N. Bacteriófagos. *Revista de la Facultad de Medicina Humana* [Internet]. 2020 Jan 15 [cited 2024 Feb 9];20(1):164–5. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2308-05312020000100164&lng=es.
102. Washizaki A, Yonesaki T, Otsuka Y. Characterization of the interactions between *Escherichia coli* receptors, LPS and OmpC, and bacteriophage T4 long tail fibers. *Microbiologyopen* [Internet]. 2016 [cited 2024 Feb 9];5(6). Available from: <https://doi.org/10.1002/mbo3.384>
103. Dowah ASA, Clokie MRJ. Review of the nature, diversity and structure of bacteriophage receptor binding proteins that target Gram-positive bacteria [Internet]. Vol. 10, *Biophysical Reviews*. 2018 [cited 2024 Feb 9]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29299830/>
104. Samson JE, Magadán AH, Sabri M, Moineau S. Revenge of the phages: Defeating bacterial defences. Vol. 11, *Nature Reviews Microbiology*. 2013.
105. Clokie MRJ, Kropinski AM. Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions. In: *Methods in molecular biology*. 1st ed. 2009.

- 106.Shors T. Los bacteriófagos. In: Virus: Estudio molecular con orientación clínica. 1st ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A; 2009. p. 588–601.
- 107.Kim S, Rahman M, Kim J. Complete Genome Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* Lytic Bacteriophage PA1Ø Which Resembles Temperate Bacteriophage D3112. J Virol. 2012;86(6).
- 108.Gallet R, Kannoly S, Wang IN. Effects of bacteriophage traits on plaque formation. BMC Microbiol. 2011;11.
- 109.Sfredo Schenkel T. Isolamento de bacteriófagos líticos em efluentes hospitalares e sua atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* multirresistentes [Internet] [Maestría]. [Novo Hamburgo]: Universidad Fevale; 2021 [cited 2024 Jan 26]. Available from: <https://biblioteca.feevale.br/Vinculo2/000029/000029c3.pdf>
- 110.Nang SC, Lin YW, Petrovic Fabijan A, Chang RYK, Rao GG, Iredell J, *et al.* Pharmacokinetics/pharmacodynamics of phage therapy: a major hurdle to clinical translation. Vol. 29, Clinical Microbiology and Infection. 2023.
- 111.Myers J, Davis J, Lollo M, Hudec G, Hyman P. More's the Same—Multiple Hosts Do Not Select for Broader Host Range Phages. Viruses. 2023;15(2).
- 112.Fong K, Wong CWY, Wang S, Delaquis P. How Broad Is Enough: The Host Range of Bacteriophages and Its Impact on the Agri-Food Sector. PHAGE: Therapy, Applications, and Research. 2021;2(2):83–91.
- 113.Šivec K, Podgornik A. Determination of bacteriophage growth parameters under cultivating conditions. Appl Microbiol Biotechnol. 2020;104(20).
- 114.Ross A, Ward S, Hyman P. More is better: Selecting for broad host range bacteriophages. Front Microbiol. 2016;7(9).
- 115.Cuyutupa Guillen AY. Aislamiento y caracterización de bacteriófagos líticos aislados de intestino de pollos y específicos de *Salmonella* Infantis multidrogo-resistente. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2022.
- 116.Latz S, Krüttgen A, Häfner H, Buhl EM, Ritter K, Horz HP. Differential effect of newly isolated phages belonging to PB1-like, phiKZ-like and LUZ24-like viruses against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* under varying growth conditions. Viruses. 2017;9(11).
- 117.Kutter E. Phage host range and efficiency of plating. Methods Mol Biol [Internet]. 2009 [cited 2024 Feb 9];501. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19066818/>

- 118.Ackermann HW. Bacteriophage Electron Microscopy. Adv Virus Res [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2025 Jul 11];82:1–32. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780123946218000170>
- 119.Naicker K, Durbach SI. Epifluorescent microscopy to evaluate bacteriophage capsid integrity. Biotechniques [Internet]. 2007 [cited 2024 Feb 9];43(4). Available from: <https://www.future-science.com/doi/full/10.2144/000112584>
- 120.Knezevic P, Petrovic O. A colorimetric microtiter plate method for assessment of phage effect on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. J Microbiol Methods. 2008 Aug;74(2–3):114–8.
- 121.Zago M, Scaltriti E, Fornasari ME, Rivetti C, Grolli S, Giraffa G, *et al.* Epifluorescence and atomic force microscopy: Two innovative applications for studying phage-host interactions in *Lactobacillus helveticus*. J Microbiol Methods [Internet]. 2012 Jan [cited 2024 Feb 9];88(1):41–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22024504/>
- 122.Arana L, Orruño M. Detección y cuantificación de microorganismos en el medio acuático. España; 2014.
- 123.Reina J, Reina N. Fagoterapia ¿una alternativa a la antibioticoterapia? Revista Española de Quimioterapia. 2018;31(2).
- 124.Dublanchet A, Bourne S. The epic of phage therapy. In: Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology. 2007.
- 125.Maddocks S, Fabijan AP, Ho J, Lin RCY, Ben Zakour NL, Dugan C, *et al.* Bacteriophage therapy of ventilator-associated pneumonia and empyema caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Am J Respir Crit Care Med [Internet]. 2019 [cited 2024 Feb 9];200(9):1179–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31437402/>
- 126.Courtwright A, Koval C, Lehman S, Morales S, Furr CL, Rosas F, *et al.* Safety and Efficacy of Bacteriophage Therapy in Lung Transplant Candidates and Recipients. The Journal of Heart and Lung Transplantation [Internet]. 2019 [cited 2024 Feb 9];38(4). Available from: https://academic.oup.com/cid/article/77/Supplement_5/S416/7334981
- 127.Sousa AM. Bacteriófagos características gerais, utilidades e aplicações biotecnológicas [Internet] [Especialidad]. [Brasil]: Universidade Federal de Minas Gerais; 2012 [cited 2024 Feb 13].

128. Meza Pacheco A. Aislamiento y caracterización de bacteriófagos para cepas nosocomiales de *Acinetobacter Baumannii* de Lima e Iquitos, Perú 2014 - 2015. Universidad Católica de Santa María; 2016.
129. Flores Escobar GI. Caracterización de bacteriófagos líticos de *Salmonella enterica* aislados de muestras de pollos. [Lima]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017.
130. Azizian R, Nasser A, Askari H, Taheri Kalani M, Sadeghifard N, Pakzad I, *et al.* Sewage as a rich source of phage study against *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Biologicals*. 2015;43(4).
131. Valero-Rello A. Diversity, specificity and molecular evolution of the lytic arsenal of *Pseudomonas* phages: in silico perspective. *Environ Microbiol*. 2019;21(11).
132. Wannasrichan W, Htoo HH, Suwansaeng R, Pogliano J, Nonejuie P, Chaikereeratsak V. Phage-resistant *Pseudomonas aeruginosa* against a novel lytic phage JJ01 exhibits hypersensitivity to colistin and reduces biofilm production. *Front Microbiol*. 2022;13.
133. Amankwah S, Adisu M, Gorems K, Abdella K, Kassa T. Assessment of Phage-Mediated Inhibition and Removal of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm on Medical Implants. *Infect Drug Resist*. 2022;15.
134. Majdani R, Hatefird R. Isolation and Characterization of Two Lytic Bacteriophages Against *Pseudomonas aeruginosa* and Evaluation of Their Antibacterial Effects on Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in The Northwest of Iran. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 2022;16(4).
135. Choi YM, Kim OY, Kim KH, Kim BC, Rhee MS. Combined effect of organic acids and supercritical carbon dioxide treatments against nonpathogenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *E. coli* O157:H7 in fresh pork. *Lett Appl Microbiol*. 2009;49(4).
136. Abedon ST, Hyman P, Thomas C. Experimental Examination of Bacteriophage Latent-Period Evolution as a Response to Bacterial Availability. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(12).
137. Organización Mundial de la Salud. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Centro de Prensa Organización Mundial de la Salud. WHO [Internet]. 2017 [cited 2024 Feb 8]; Available from: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

138. World Health Organization (OMS). WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024 Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. 2024.
139. Jáuregui Rojas P, Vásquez Tirado G, Rodríguez Montoya R, Albínez Pérez J. Factores de riesgo para infección por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente en pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica de la unidad de cuidados intensivos. Estudio multicéntrico. Revista del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo [Internet]. 2021 [cited 2024 Feb 8];14(1). Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2227-47312021000100002&lng=es.
140. Ministerio de Salud. Riesgo de infecciones asociadas a la atención de la salud causadas por Enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. coproductoras de carbapenemasas en el Perú. Instituto Nacional de Salud; 2022.
141. Ramírez K, Cazarez-Montoya C, López-Moreno HS, Castro-del Campo N. Bacteriophage cocktail for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7: Stability and potential allergenicity study. PLoS One. 2018;13(5).
142. Samson JE, Magadán AH, Sabri M, Moineau S. Revenge of the phages: Defeating bacterial defences. Vol. 11, Nature Reviews Microbiology. 2013.
143. Nanda AM, Thormann K, Frunzke J. Impact of spontaneous prophage induction on the fitness of bacterial populations and host-microbe interactions. Vol. 197, Journal of Bacteriology. 2015.
144. Pelzek AJ, Schuch R, Schmitz JE, Fischetti VA. Isolation of bacteriophages from environmental sources, and creation and functional screening of phage DNA libraries. Current Protocols in Essential Laboratory Techniques. 2013.
145. Oliveira VC, Bim FL, Monteiro RM, Macedo AP, Santos ES, Silva-Lovato CH, *et al.* Identification and Characterization of New Bacteriophages to Control Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm on Endotracheal Tubes. Front Microbiol. 2020;11.
146. Jończyk E, Kłak M, Międzybrodzki R, Górski A. The influence of external factors on bacteriophages. Vol. 56, Folia Microbiol. 2011.
147. Dennehy JJ, Abedon ST, Turner PE. Host density impacts relative fitness of bacteriophage $\Phi 6$ genotypes in structured habitats. Evolution. 2007;61(11).
148. Ameh EM, Tyrrel S, Harris JA, Pawlett M, Orlova E V., Ignatiou A, *et al.* Lysis Performance of Bacteriophages with Different Plaque Sizes and Comparison of

- Lysis Kinetics After Simultaneous and Sequential Phage Addition. PHAGE: Therapy, Applications, and Research. 2020;1(3).
- 149.Kaur S, Harjai K, Chhibber S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* phage plaque size enhancement using sublethal concentrations of antibiotics. Appl Environ Microbiol. 2012;78(23).
 - 150.Borges AL, Zhang JY, Rollins MCF, Osuna BA, Wiedenheft B, Bondy-Denomy J. Bacteriophage Cooperation Suppresses CRISPR-Cas3 and Cas9 Immunity. Cell. 2018;174(4).
 - 151.Li G, Shen M, Yang Y, Le S, Li M, Wang J, *et al.* Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to phage PaP1 predation via O-antigen polymerase mutation. Front Microbiol. 2018;9.
 - 152.Liu Y, Yao Z, Mao Z, Tang M, Chen H, Qian C, *et al.* Quorum sensing gene lasR promotes phage vB_Pae_PLY infection in *Pseudomonas aeruginosa*. BMC Microbiol. 2024 Dec 1;24(1).
 - 153.Quirós Fernández P. Los bacteriófagos como elementos de transmisión genética horizontal de resistencias a antibióticos y toxinas Stx.
 - 154.Shymialevich D, Wójcicki M, Wardaszka A, Świder O, Sokołowska B, Błażej S. Application of Lytic Bacteriophages and Their Enzymes to Reduce Saprophytic Bacteria Isolated from Minimally Processed Plant-Based Food Products—In Vitro Studies. Viruses. 2023;15(1).
 - 155.Vaitekenas A, Tai AS, Ramsay JP, Stick SM, Kicic A. *Pseudomonas aeruginosa* resistance to bacteriophages and its prevention by strategic therapeutic cocktail formulation. Vol. 10, Antibiotics. 2021.
 - 156.Pires DP, Kropinski AM, Azeredo J, Sillankorva S. Complete Genome Sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophage phiIBB-PAA2. Genome Announc. 2014;2(1).
 - 157.Pan X, Cui X, Zhang F, He Y, Li L, Yang H. Genetic evidence for O-specific antigen as receptor of *Pseudomonas aeruginosa* phage K8 and its genomic analysis. Front Microbiol. 2016;7.
 - 158.Garbe J, Wesche A, Bunk B, Kazmierczak M, Selezska K, Rohde C, *et al.* Characterization of JG024, a *Pseudomonas aeruginosa* PB1-like broad host range phage under simulated infection conditions. BMC Microbiol. 2010;10.

- 159.Chan BK, Siström M, Wertz JE, Kortright KE, Narayan D, Turner PE. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep*. 2016;6.
- 160.Al-Wrafi F, Brzozowska E, Górka S, Drab M, Strus M, Gamian A. Identification and characterization of phage protein and its activity against two strains of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep*. 2019;9(1).
- 161.Bhetwal A, Maharjan A, Shakya S, Satyal D, Ghimire S, Khanal PR, *et al*. Isolation of Potential Phages against Multidrug-Resistant Bacterial Isolates: Promising Agents in the Rivers of Kathmandu, Nepal. *Biomed Res Int*. 2017;2017.
- 162.Filik K, Szermer-Olearnik B, Oleksy S, Brykała J, Brzozowska E. Bacteriophage Tail Proteins as a Tool for Bacterial Pathogen Recognition—A Literature Review. Vol. 11, *Antibiotics*. 2022.
- 163.Jończyk-Matysiak E, Łodej N, Kula D, Owczarek B, Orwat F, Międzybrodzki R, *et al*. Factors determining phage stability/activity: challenges in practical phage application. Vol. 17, *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2019.
- 164.Guo Y, Chen P, Lin Z, Wang T. Characterization of two *Pseudomonas aeruginosa* viruses vB_PaeM_SCUT-S1 and vB_PaeM_SCUT-S2. *Viruses*. 2019;11(4).
- 165.Litt PK, Jaroni D. Isolation and Physiomorphological Characterization of *Escherichia coli* O157:H7-Infecting Bacteriophages Recovered from Beef Cattle Operations. *Int J Microbiol*. 2017;2017.
- 166.Feng YY, Ong SL, Hu JY, Tan XL, Ng WJ. Effects of pH and temperature on the survival of coliphages MS2 and Q β . *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2003;30(9).
- 167.Fister S, Robben C, Witte AK, Schoder D, Wagner M, Rossmanith P. Influence of environmental factors on phage-bacteria interaction and on the efficacy and infectivity of phage P100. *Front Microbiol*. 2016;7.
- 168.Yu X, Xu Y, Gu Y, Zhu Y, Liu X. Characterization and genomic study of “phiKMV-Like” phage PAXYB1 infecting *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep*. 2017;7(1).
- 169.Wang X, Tang J, Dang W, Xie Z, Zhang F, Hao X, *et al*. Isolation and Characterization of Three *Pseudomonas aeruginosa* Viruses with Therapeutic Potential. *Microbiol Spectr*. 2023;11(3).
- 170.Silva YJ, Costa L, Pereira C, Cunha Â, Calado R, Gomes NCM, *et al*. Influence of environmental variables in the efficiency of phage therapy in aquaculture. *Microb Biotechnol*. 2014;7(5).

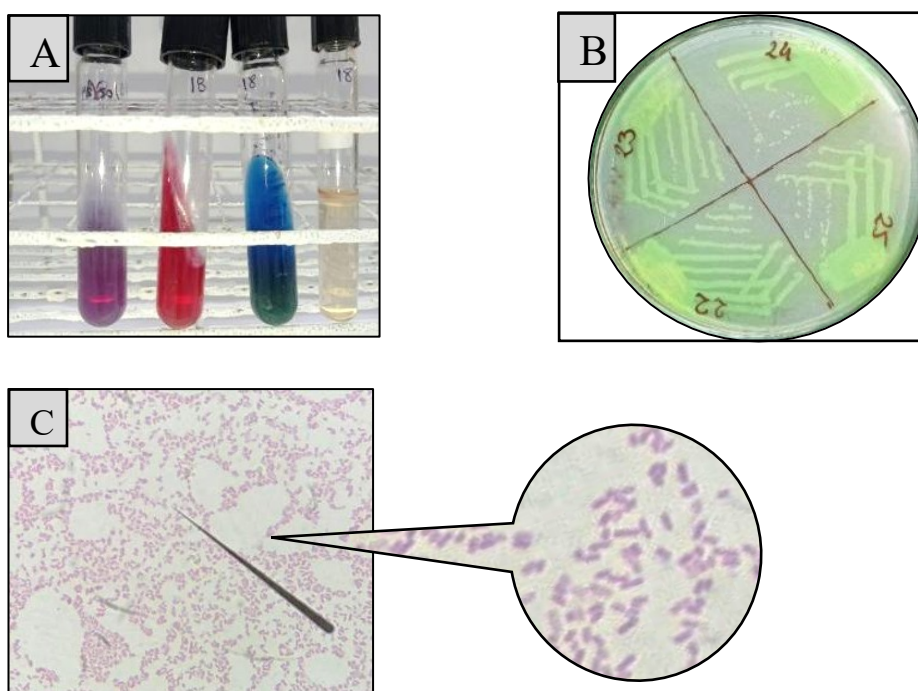
171. White HE, Sherman MB, Brasilès S, Jacquet E, Seavers P, Tavares P, *et al.* Capsid Structure and Its Stability at the Late Stages of Bacteriophage SPP1 Assembly. *J Virol.* 2012;86(12).
172. Stone NP, Demo G, Agnello E, Kelch BA. Principles for enhancing virus capsid capacity and stability from a thermophilic virus capsid structure. *Nat Commun.* 2019;10(1).
173. Guo M, Feng C, Ren J, Zhuang X, Zhang Y, Zhu Y, *et al.* A novel antimicrobial endolysin, LysPA26, against *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* 2017;8(2).
174. Walmagh M, Briers Y, dos Santos SB, Azeredo J, Lavigne R. Characterization of modular bacteriophage endolysins from *Myoviridae* phages OBP, 201Q2-1 and PVP-SE1. *PLoS One.* 2012 May 1;7(5).
175. Stone NP, Demo G, Agnello E, Kelch BA. Principles for enhancing virus capsid capacity and stability from a thermophilic virus capsid structure. *Nat Commun.* 2019;10(1).
176. Sakaki Y, Oshima T. Isolation and characterization of a bacteriophage infectious to an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8. *J Virol.* 1975;15(6).
177. Jończyk-Matysiak E, Łodej N, Kula D, Owczarek B, Orwat F, Międzybrodzki R, *et al.* Factors determining phage stability/activity: challenges in practical phage application. Vol. 17, *Expert Review of Anti-Infective Therapy.* 2019.
178. Asija K, Teschke CM. Of capsid structure and stability: The partnership between charged residues of E-loop and P-domain of the bacteriophage P22 coat protein. *Virology.* 2019;534.
179. Smith A, Hussey M. Gram Stain Protocols [Internet]. American Society for Microbiology; 2005.

APÉNDICES

Apéndice 1. Toma de muestras de agua residual del HRDC

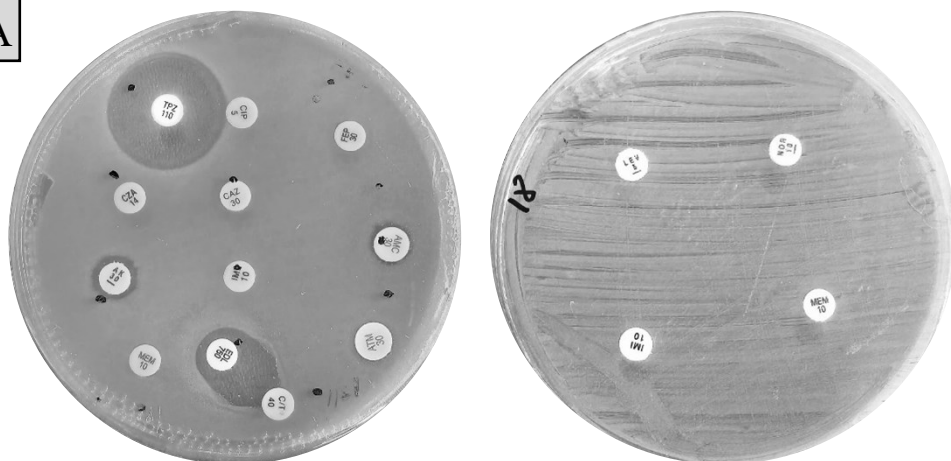


Apéndice 2. Identificación de aislamientos de *P. aeruginosa*, (A) pruebas bioquímicas en LIA, TSI, citrato de Simmons y MIO, (B) crecimiento en Agar Cetrimide, (C) Observación microscópica con tinción de Gram a 1000x.



Apéndice 3. Método de difusión en disco para evaluar susceptibilidad a antimicrobianos en *P. aeruginosa*. **A)** Perfil de resistencia de la cepa P18, **B)** Perfil de resistencia de la cepa P07.

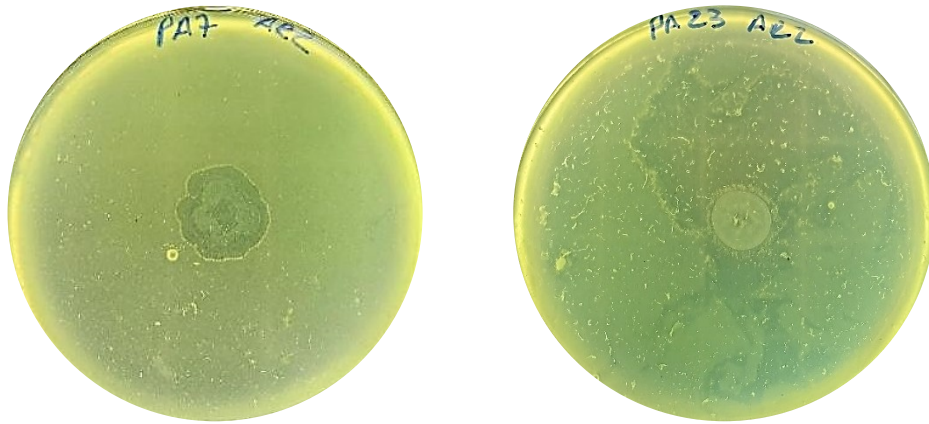
A



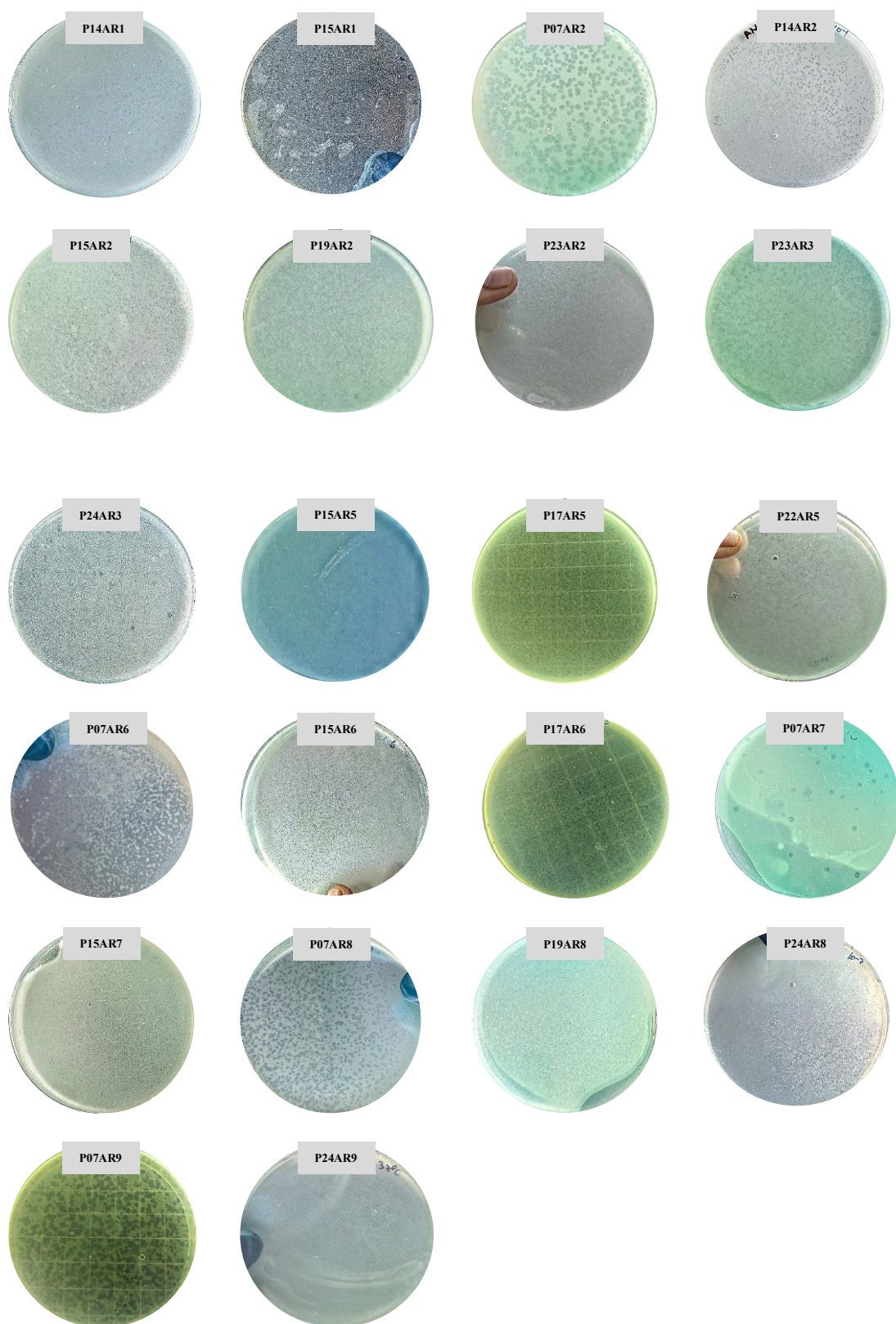
B



Apéndice 4. Placas líticas formadas por la actividad de los bacteriófagos empleando la técnica de *spot test*.

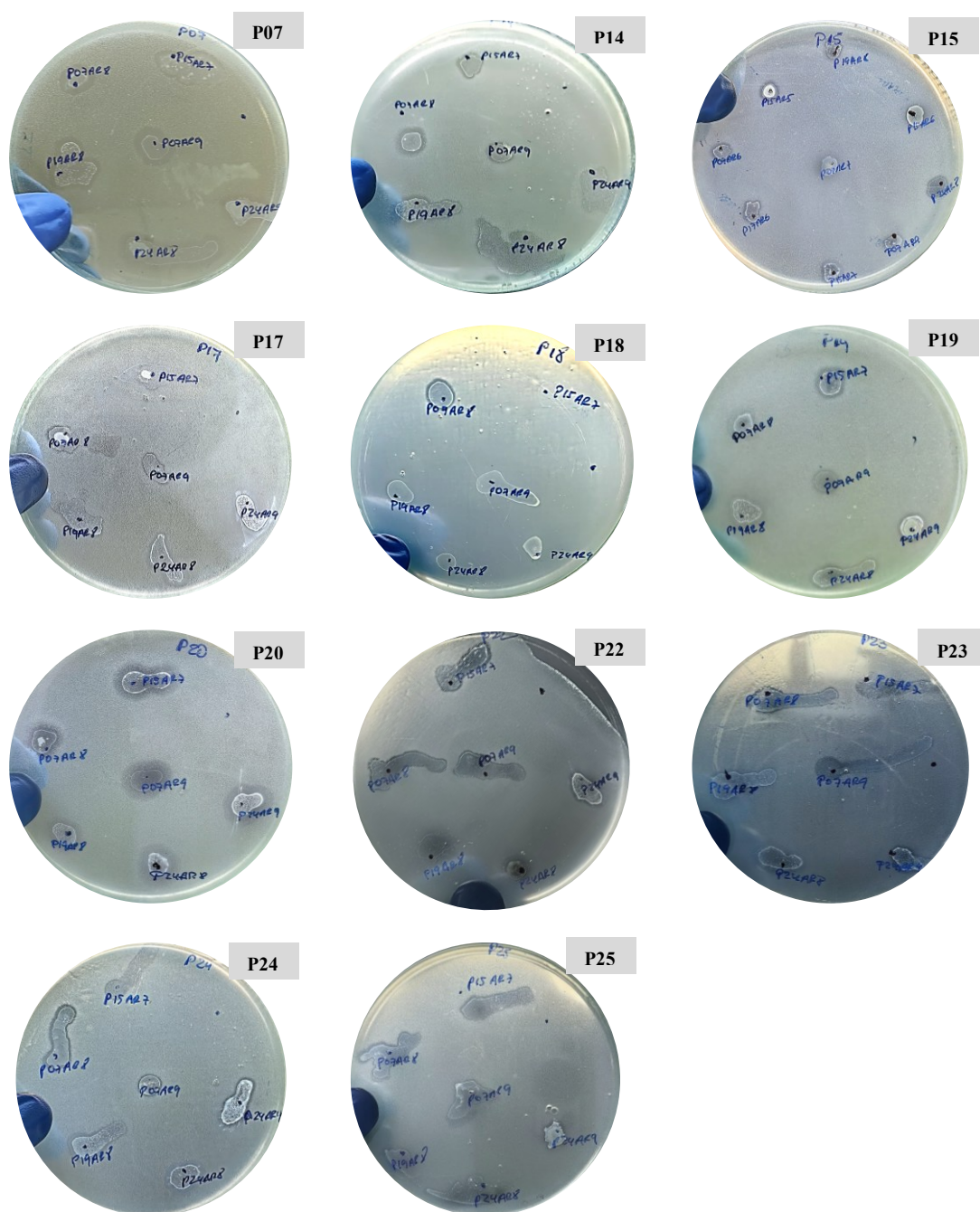


Apéndice 5. Morfología de las placas líticas de los 22 bacteriófagos purificados.



Las vistas macroscópicas muestran la morfología de las placas de lisis directamente en las placas de Petri con agar nutritivo, evidenciando así la diversidad morfológica de los 22 bacteriófagos.

Apéndice 6. Rango de hospederos de seis bacteriófagos sobre los aislados de *P. aeruginosa* en estudio.



Vista macroscópica de la técnica *spot test* para la determinación de rango de hospederos. La formación de halos transparentes indica la lisis bacteriana producto de la acción de los bacteriófagos.

Apéndice 7. Valores de las repeticiones de las curvas de crecimiento de los bacteriófagos seleccionados.

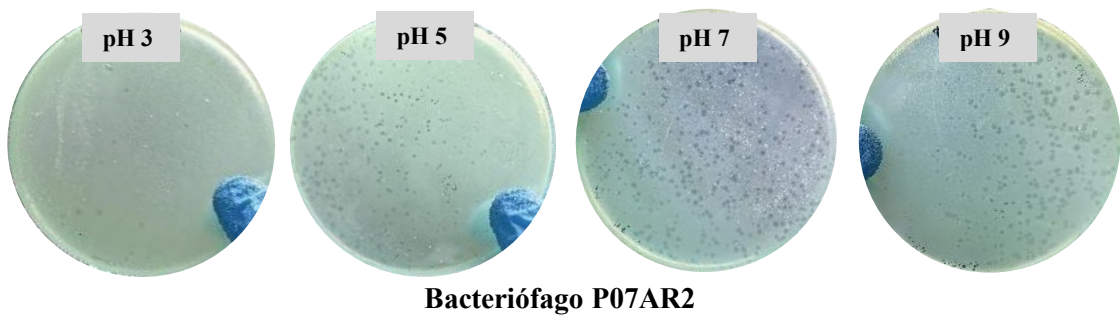
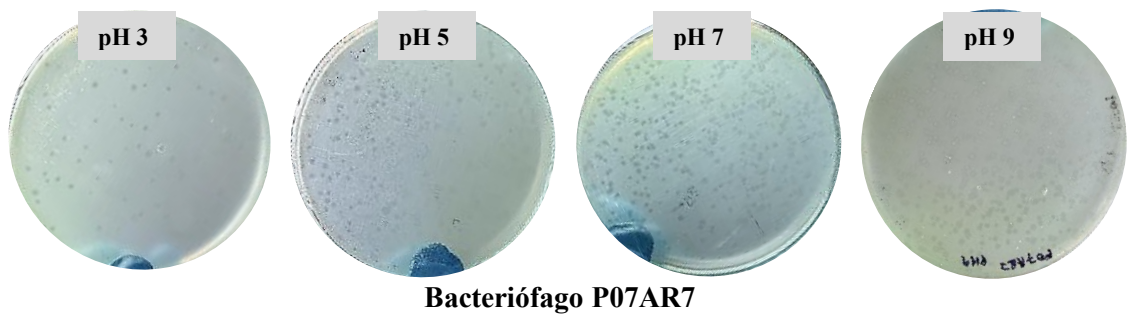
Bacteriófago P07AR8						
Tiempo (min)	R1	R2	R3	Media	SD	Desv. Error
0	13	12	12	12.31579	1	0.333333
5	25	24	23	23.97221	1.527525	0.57735
10	73	72	72	72.33028	1	0.333333
15	102	99	100	100.3179	1.732051	0.881917
20	111	110	110	110.3313	1	0.333333
30	117	116	115	115.9943	2.309401	0.57735
40	155	154	154	154.3319	2.309401	0.333333
50	243	241	242	241.9972	1.527525	0.57735
60	287	286	286	286.3326	1.527525	0.333333

Bacteriófago P07AR6						
Tiempo (min)	R1	R2	R3	Media	SD	Desv. Error
0	13	12	12	12.31579	0.57735	0.333333
5	25	24	23	23.97221	1	0.57735
10	73	72	72	72.33028	0.57735	0.333333
15	102	99	100	100.3179	1.527525	0.881917
20	111	110	110	110.3313	0.57735	0.333333
30	117	116	115	115.9943	1	0.57735
40	155	154	154	154.3319	0.57735	0.333333
50	243	241	242	241.9972	1	0.57735
60	287	286	286	286.3326	0.57735	0.333333

Bacteriófago P15AR1						
Tiempo (min)	R1	R2	R3	Media	SD	Desv. Error
0	15	15	16	15.31915	0.57735	0.333333
5	19	20	21	19.96664	1	0.57735
10	29	29	30	29.32584	0.57735	0.333333
15	78	80	79	78.99156	1	0.57735
20	141	142	143	141.9953	1	0.57735
30	189	187	191	188.9859	2	1.154701
40	236	235	235	235.3324	0.57735	0.333333
50	278	276	278	277.3301	1.154701	0.666667
60	297	296	299	297.3281	1.527525	0.881917

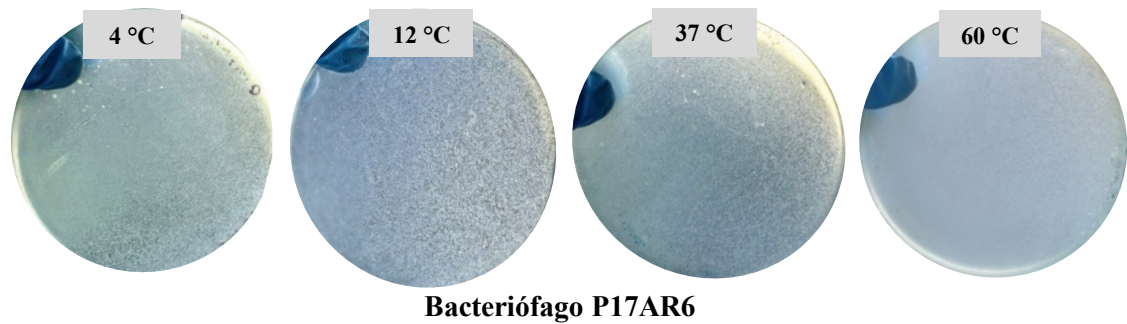
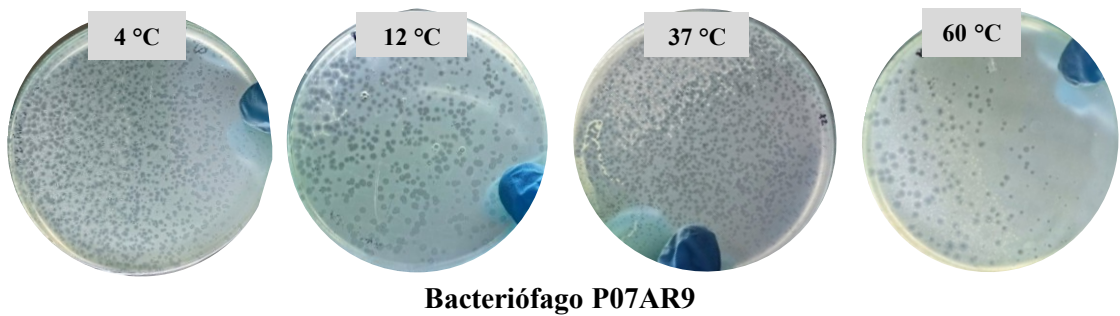
R1: Repetición 1, **R2:** Repetición 2, **R3:** Repetición 3, **SD:** Desviación estándar, **min:** minutos

Apéndice 8. Efecto de pH sobre la concentración de los bacteriófagos.



Vista macroscópica de placa de Petri con agar nutritivo

Apéndice 9. Efecto de la temperatura de incubación sobre la concentración de los bacteriófagos.



Vista macroscópica de placa de Petri con agar nutritivo

ANEXOS

Anexo 1. Procedimiento de la coloración Gram

Para el procedimiento, con un asa bacteriológica estéril se tomó una colonia bacteriana fresca y se extendió de manera uniforme sobre una lámina portaobjetos limpia agregando una pequeña gota de agua destilada estéril para facilitar la dispersión. Luego, se dejó secar a temperatura ambiente y se fijó al calor. A contaminación, se aplicó el colorante cristal de violeta durante 1 minuto, seguido se enjuagó con agua destilada. Después se añadió Lugol como mordiente y se dejó actuar durante 3 minutos, posteriormente se lavó con agua destilada. Se decoloró con alcohol acetona durante 15 segundos seguido de otro enjuague. Posteriormente, se agregó el colorante de contraste, es decir, safranina durante 1 minutos, luego se enjuagó con agua destilada. Finalmente, la lámina se secó a temperatura ambiente y se observó al microscopio utilizando el objetivo de 100x colocando una gota de aceite de inmersión (179).

Anexo 2. Características diferenciales para la identificación de *Pseudomonas aeruginosa*.

Pigmento	Movilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	LIA	H_2S	Citrato de Simmons	Lactosa	Manitol	Sacarosa	Arginina	$NO_3 - NO_2$	$NO_3 - N_2$	Urea	ONPG	Acetamida	Esculina
V	+	+	+	K/K	K/K	-	+	-	V	V	+	+	V	V	-	+	-

K/K. alcalino/alcalino, + (90% o más de cepas positivas); - (90% o más de cepas negativas); V (11-89% de cepas positivas).

Adaptado de: Procop *et al.* (46)

Anexo 3. Lista de antimicrobianos que se utilizaron y criterios de susceptibilidad según CLSI, 2025 (76).

Grupo	Antimicrobiano	Conc.	Categoría		
			R	I	S
Cefalosporinas	Cefepima (FEP)	30 µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18
	Ceftazidima (CAZ)	30 µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18
Carbapenémicos	Imipenem (IMI)	10 µg	≤ 15	16 – 18	≥ 19
	Meropenem (MEM)	10 µg	≤ 15	16 – 18	≥ 19
Monobactámico	Aztreonam (ATM)	30 µg	≤15	16 – 21	≥ 22
Penicilina antipseudomonal + inhibidor de β -lactamasas	Piperacilina / Tazobactam (TPZ)	110 µg	≤ 17	18 - 21	≥ 22
Fluoroquinolonas	Levofloxacin (LEV)	5 µg	≤ 14	15 – 21	≥ 22
	Norfloxacin (NOR)	10 µg	≤ 12	13 – 16	≥ 17
	Ciprofloxacin (CIP)	5 µg	≤ 18	19 – 24	≥ 25
Aminoglucósidos	Amikacina (AK)	30 µg	≤ 14	15 - 16	≥ 17

Conc.: concentración del antimicrobiano por disco, **S:** sensible, **I:** Intermedio, **R:** resistente, **≥:** Diámetro de halo de inhibición mayor o igual, **≤:** Diámetro de halo de inhibición menor o igual.