



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Caracterización de bacteriófagos nativos candidatos a  
fagoterapia en infecciones causadas por Pseudomonas  
aeruginosa resistente a antibióticos y productoras de  
biopelícula**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo  
Parasitólogo

**AUTOR**

Carlos Daniel LLANOS ROSALES

**ASESOR**

Débora Elizabeth ALVARADO IPARRAGUIRRE

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Llanos, C. (2019). *Caracterización de bacteriófagos nativos candidatos a fagoterapia en infecciones causadas por Pseudomonas aeruginosa resistente a antibióticos y productoras de biopelícula*. Tesis para optar el título profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo. Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

---

METADATA

ORCID (CARLOS LLANOS): [57201443094](https://orcid.org/57201443094)

ORCID (Debora Alvarado): [36496392200](https://orcid.org/36496392200)

DNI AUTOR: 70014236

GRUPO DE INVESTIGACION: GENOMICA FUNCIONAL DE MICROORGANISMOS Y BIOREMEDACIÓN

INSTITUCION QUE FINANCIA: Vicerectorado de investigación-UNMSM

Años de duración: 1 año



**Universidad Nacional Mayor De San Marcos**  
(Universidad del Perú, Decana de América)

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGO MICROBIÓLOGO PARASITÓLOGO  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 14:15 horas del 13 de mayo de 2019, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo de **CARLOS DANIEL LLANOS ROSALES**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 019-EPMP-2018, el titulando expuso su tesis: **"CARACTERIZACIÓN DE BACTERIÓFAGOS NATIVOS CANDIDATOS A FAGOTERAPIA EN INFECCIONES CAUSADAS POR *Pseudomonas aeruginosa* RESISTENTE A ANTIBIÓTICOS Y PRODUCTORAS DE BIOPELÍCULA"** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 1.9, calificativo: ..APROBADO..CON..MAXIMO..HONORES..

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo** a **CARLOS DANIEL LLANOS ROSALES** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 15:20 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 13 de mayo de 2019.

Dr. ENRIQUE MAMANI ZAPANA  
(PRESIDENTE)

Mg. DEBORA ALVARADO IPARRAGUIRRE  
(ASESORA)

Blga. MONICA HUAMAN ITURRIZAGA  
(MIEMBRO)

Blgo. MIGUEL TALLEDO RIVERA  
(MIEMBRO)



## INFORME DE EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD

DIRECTOR E.P DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA : Dr. JUAN ATILIO JIMÉNEZ CHUNGA  
OPERADOR DEL PROGRAMA INFORMÁTICO DE SIMILITUDES : Dra. Liz Erika Cruz Pio  
DOCUMENTO EVALUADO \* : CARACTERIZACIÓN DE BACTERIOFAGOS NATIVOS CANDIDATOS A FAGOTERAPIA EN INFECCIONES CAUSADAS POR *Pseudomonas aeruginosa* RESISTENTE A ANTIBIÓTICOS Y PRODUCTORAS DE BIOPELÍCULA  
AUTOR (A) DEL DOCUMENTO \*\* : Bach. Carlos Daniel Llanos Rosales  
FECHA DE RECEPCIÓN : 29/04/19  
FECHA APLICACIÓN DEL SISTEMA INFORMÁTICO : 30/04/19  
SOFTWARE UTILIZADO : TURNITIN ( X )  
ITHENTICATE ( )  
OTRO (especificar)  
CONFIGURACIÓN DEL PROGRAMA DETECTOR DE SIMILITUDES : Excluye textos encomillados (x)  
: Excluye bibliografía (x)  
: Excluye cadenas menores a 40 palabras (x)  
: Otro criterio (especificar)  
PORCENTAJE DE SIMILITUDES \*\*\* : Siete por ciento (7%)  
FUENTES ORIGINALES DE LAS SIMILITUDES ENCONTRADAS : Universidad Peruana Cayetano Heredia (6%)  
Cybertesis.unmsm.edu (1%)

### OBSERVACIONES:

### CALIFICACIÓN DE ORIGINALIDAD

- Documento cumple criterio de originalidad sin observaciones ( X )
- Documento cumple criterio de originalidad con observaciones ( )
- Documento no cumple criterios de originalidad ( )

Ciudad universitaria, 2 de mayo de 2019

Dra. Liz Erika Cruz Pio  
Evaluador

Dr. Juan Atilio Jiménez Chunga  
Director EPMP



**A mi familia y a toda la gente que me apoyó.**

## AGRADECIMIENTOS

Escuché la palabra bacteriófagos a comienzos del 2012 durante mi preparación pre-universitaria, y me pareció sumamente interesante el concepto que aquellos seres a los cuales consideré como enfermedades (bacterias) tengan algo parecido a un antagonista que en su ambiente natural les ocasione la muerte, pese a lo incipiente del concepto, este me fue bastante útil al escoger el laboratorio en el cual realizaría prácticas, durante mis años de pregrado. Fue de esta manera y guiado un tanto por el azar que llegué al laboratorio del Blgo. Miguel Talledo (Lab. de Bacteriofagos) quien permitió el acercarme al estudio de estos microorganismos, así como conocer a muchos de mis grandes amigos quienes realizaban sus tesis en esa época y de quienes aprendí mucho.

Dos años después decidí mi salida del laboratorio en busca de aprender un poco más sobre fagoterapia y realizar mi tesis en este tema, así cuando llegué al Laboratorio de Resistencia a Antimicrobianos e Inmunopatología LID-UPCH a cargo del Dr. Jesús Tamariz quien desde el momento que ingresé al laboratorio se convirtió en un mentor para mí, enseñándome mucho sobre bacteriófagos e investigación científica sino también al permitirme interactuar en un ambiente de investigación científica y brindándome la confianza para realizarla con libertad, por estas razones me encuentro sumamente agradecido con él. Con la redacción de la propuesta y con el apoyo de la Mg. Débora Alvarado mi asesora interna con quien también estoy muy agradecido por la confianza y por todas las lecciones brindadas durante el transcurso de la tesis; fue posible obtener un fondo para subvencionar los gastos de mi tesis otorgado por el Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos con la cual estoy muy agradecido.



Con el financiamiento ganado pude llevar a cabo mi tesis en los dos temas que más me gustan: Resistencia antimicrobiana y fagoterapia, ya durante el desarrollo de la parte experimental recibí ayuda en diferentes ámbitos tanto en lo personal como en lo académico para los muestreos conté con la ayuda de varias personas en primer lugar María mi mejor amiga y autodenominada fan #1, Adrián Quintana amigo de aventuras algo complicadas y tanta otra gente que seguro olvido pero no por ello menos importante. Ya en la parte de la tesis que implicaba trabajo de laboratorio muchas personas me apoyaron tanto como con trabajo como con palabras de aliento: Luis Ocrosopoma, Wendy Lizarraga, Paul (Asto) Julián, Gustavo Mormontoy, Natali Soto y Gloria Flores; a mi parecer una persona a la que le debo mucho es Renzo Punil a quien conocí en el laboratorio de bacteriófagos quien pudo realizar la toma de la micrografía, además de corregir mis errores en la redacción de la tesis y comportarse como un tercer asesor por ello me encuentro muy agradecido con él. Otro agradecimiento importante es al Dr. Antunez de Mayolo quien fue una de las personas que estuvo pendiente de la realización de la manera más adecuada de mis experimentos y por contarme parte de su experiencia en el mundo de la ciencia; Así también agradecer al Dr. Humberto Guerra quien fue asesor del Dr. Tamariz y a quien cuando conocí se presentó como uno de mis modelos a seguir, una persona total mente lúcida e inteligente con dominio de muchos temas, con quien tuve el honor de ganar un financiamiento en fagoterapia y ha sido uno de mis revisores; agradecer también a Steve quien me apoyo con la parte estadística de esta tesis lo cual le brindó un valor extra, mencionar a Natali que me ayudó con toda la documentación de la sustentación de mi tesis y finalmente antes de que lo olvide quiero agradecer al profesor Wilser, quien fue la primera persona en confiar en mi potencial académico.

## ABREVIATURAS

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ARN: Ácido ribonucleico
- BLEE: Betalactamasa de espectro extendido
- MDR: Multidrogo-resistente
- MET: Microscopio electrónico de transmisión
- MOI: Multiplicidad de infección
- MTA: *Molten top agar*
- PBP: Proteínas de unión a penicilina
- PDR: Pandrogo-resistente
- RPM: Revoluciones por minuto
- TSA: Agar tripticasa soya
- TSB: Caldo tripticasa soya
- UFC: Unidades formadoras de colonia
- UFP: Unidades formadoras de placa
- XDR: Extremadamente drogo-resistente

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>ii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>5</b>
2.1 Resistencia a antibióticos .....	5
2.2. Mecanismos de resistencia a antimicrobianos .....	8
2.2.1 Inhibición enzimática .....	8
2.2.2 Modificación de las PBPs. ....	9
2.2.3 Modificación de Porinas .....	9
2.2.4 Bombas de eflujo.....	10
2.2.5 Modificación de sitio blanco .....	11
2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	12
2.3.1 Importancia clínica de <i>P. aeruginosa</i> .....	13
2.3.1.1 Infecciones de vías respiratorias .....	13
2.3.1.2 Infecciones en piel y tejidos blandos .....	14
2.3.1.3 Otras infecciones.....	15
2.3.2 Resistencia a antibióticos.....	15
2.3.3 Biopelícula y resistencia.....	17
2.4 Bacteriófagos .....	19

2.4.1 Estructura y clasificación.....	19
2.4.2 Replicación viral .....	22
2.4.2.1 Ciclo lítico .....	22
2.4.2.2. Ciclo lisogénico.....	23
2.4.3 Fagoterapia .....	25
<b>III. HIPÓTESIS.....</b>	<b>28</b>
<b>IV. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
A Materiales.....	30
B Métodos.....	31
5.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	31
5.1.1 Aislamiento .....	31
5.1.2 Caracterización .....	31
5.1.2.1 Prueba de sensibilidad antibiótica .....	31
5.1.2.2 Evaluación de producción de biopelícula – método del tubo.....	32
5.1.2.3 Detección de profagos mediante el empleo de mitomicina C.....	33
5.1.2.3.1 Determinación de la concentración de mitomicina C para la inducción.....	33
5.1.2.3.2 Prueba de inducción de profagos .....	33
5.2 Bacteriófagos.....	35
5.2.1 Aislamiento de bacteriófagos. ....	35
5.2.1.1 Enriquecimiento de filtrados.....	35
5.2.1.2 Detección de bacteriófagos .....	35

5.2.1.3 Preparación de suspensiones madre de bacteriófagos y determinación de la concentración de bacteriófagos.....	36
5.2.2 Caracterización de bacteriófagos .....	36
5.2.2.1 Determinación de la especificidad lítica frente a cepas nativas de <i>P. aeruginosa</i> “bacteriophage agar” .....	36
5.2.2.2 Curva de multiplicación de “un solo paso” (“One-step growth curve”).....	38
5.2.2.3 Microscopía electrónica.....	39
5.2.2.4 Análisis estadístico .....	39
<b>VI. RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
6.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	40
6.1.1 Aislamiento de <i>P. aeruginosa</i> a partir de muestras clínicas .....	40
6.1.2 Caracterización de aislamientos <i>P. aeruginosa</i> .....	40
6.1.2.1 Sensibilidad a antibióticos.....	40
6.1.2.2 Producción de biopelícula .....	43
6.1.2.3 Detección de profagos .....	45
6.2 Bacteriófago.....	46
6.2.1 Aislamiento de bacteriófagos .....	46
6.2.2 Caracterización de bacteriófagos.....	49
6.2.2.1 Rango de hospedero.....	49
6.2.2.2 Curva de crecimiento de “un solo paso” (“One-step growth curve”).....	52
6.2.2.3 Microscopía electrónica .....	53

VII.	DISCUSIÓN .....	54
VIII.	CONCLUSIONES .....	64
IX.	RECOMENDACIONES .....	65
X.	REFERENCIAS .....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Morfotipos de bacteriófagos y virus de arqueas .....	21
<b>Figura 2</b> Tipos de ciclos de replicación de bacteriófagos .....	24
<b>Figura 3</b> Método del tubo para evaluar producción de biopelícula. ....	32
<b>Figura 4</b> Niveles de no sensibilidad (resistencia total) en dos centros de salud .....	44
<b>Figura 5</b> Inducción de profagos por mitomicina C .....	45
<b>Figura 6</b> Placas de lisis de bacteriófagos nativos .....	47
<b>Figura 7</b> Rango de hospedero mediante la metodología “bacteriophage agar” .....	50
<b>Figura 8</b> Curva de multiplicación de “un solo paso”. ....	52
<b>Figura 9.</b> Micrografía electrónica del bacteriófago $\Phi$ MARC-GA .....	53

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Características de los aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> .....	41
<b>Tabla 2</b> Perfiles de sensibilidad a los antibióticos de los aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> .	42
<b>Tabla 3</b> Procedencia del aislamiento y su asociación con la clasificación de la resistencia .....	43
<b>Tabla 4</b> Procedencia del aislamiento y su asociación con la detección de profagos .....	46
<b>Tabla 5</b> Características principales de los bacteriófagos de <i>P. aeruginosa</i> .....	48
<b>Tabla 6</b> Procedencia del aislamiento y su asociación con la resistencia a fagos .....	50
<b>Tabla 7</b> Clasificación de resistencia y su asociación con la resistencia a fagos .....	51



## RESUMEN

Los altos niveles de resistencia a los antimicrobianos alrededor del mundo son alarmantes, ello ocasiona altas tasas de mortalidad así como cuantiosas pérdidas económicas. Actualmente existen bacterias frente a las cuales no se disponen de antibióticos capaces de hacerles frente; por ello la necesidad de explorar terapias alternativas como reemplazo o complemento a la terapia antibiótica convencional. Una de las alternativas más prometedoras es la fagoterapia, la cual emplea bacteriófagos (virus específicos de bacterias), para el tratamiento y control de infecciones bacterianas. El objetivo del presente estudio fue caracterizar fagos específicos para *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a antibióticos y productoras de biopelícula. Se aisló *P. aeruginosa* a partir de muestras de pacientes hospitalizados de dos centros de salud. Se determinó: su nivel de resistencia antibiótica, producción de biopelícula y presencia de profagos. Posteriormente se aislaron fagos nativos a partir de efluentes hospitalarios y se determinó su rango de hospedero (capacidad de infectar a cepas MDR y productoras de biopelícula). Debido a sus características morfológicas en la formación de placa y su amplio rango de hospedero, se seleccionó el fago  $\Phi$ MARC-GA para una caracterización microbiológica. Éste presentó un periodo de latencia de 40 minutos y un tamaño de explosión aproximado de 100 fagos, con morfotipo C1 perteneciente a la Familia *Podoviridae* del Orden *Caudovirales*. Las características del bacteriófago lo presentan como un candidato con gran potencial para fagoterapia en infecciones recalcitrantes ocasionadas por *P. aeruginosa* MDR y productora de biopelícula.

**Palabras clave:** Bacteriófagos, *Pseudomonas aeruginosa*, multidrogo-resistentes, MDR, productora de biopelícula, caracterización, fagoterapia.

## ABSTRACT

High levels of antimicrobial resistance around the world are alarming, this causes high mortality rates as well as large economic losses, currently there are bacteria against which there are no antibiotics capable of dealing with; therefore, there is a need to explore alternative therapies as a replacement or complement to conventional antibiotic therapy. One of the most promising alternatives is phage therapy, which uses bacteriophages (bacteria-specific viruses) for the treatment and control of bacterial infections. The aim of the present study was to characterize specific phages for drug resistant and biofilm-producing *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* were isolated from hospitalized samples from two institutions and were determined: antibiotic resistance profile (MDR, XDR and PDR), biofilm production and presence of prophages. Subsequently, native phages were isolated from hospital effluents and the host range was determined. Due to its morphological characteristics of plaque forming and its wide host range (capability to infect MDR and biofilm-producing strains), the  $\Phi$ MARC-GA phage was selected for a complete microbiological characterization. This phage showed a latency period of 40 minutes and a burst size of approximately 100 phages, the phage belongs to the morphotype C1 from Family *Podoviridae*, Order *Caudovirales*. This bacteriophage may be considered as a candidate with great potential for phage therapy in recalcitrant infections caused by MDR and biofilm producer *P. aeruginosa*.

**Key words:** Bacteriophages, *Pseudomonas aeruginosa*, multidrug-resistant, MDR, biofilm producer, characterization, phage therapy.

## I. INTRODUCCIÓN

Vivimos en una era marcada por la resistencia a antibióticos como lo menciona Borysowsky en el 2014. El uso inadecuado de los antimicrobianos ha generado una presión selectiva artificial que impulsa el surgimiento de bacterias multirresistentes conocidas en la actualidad como “superbacterias” que presentan resistencia a una gran cantidad de antibióticos limitando drásticamente las opciones terapéuticas para combatirlos, esto advierte el riesgo de entrar a una posible era “post antibiótica” en la cual, cualquier tipo de infección bacteriana signifique un alto riesgo de muerte, debido a que los antibióticos desde su descubrimiento han brindado un gran beneficio a la humanidad prolongando su esperanza de vida; La actual crisis de resistencia a antibióticos significa un problema de escala global que deja como saldo altas tasas de morbilidad y mortalidad así como el aumento en gastos asociados a la atención de salud, lo cual ha llevado a que la OMS la califique como la mayor amenaza a la salud pública global y la segunda causa de muerte a nivel mundial (WHO 2018).

El problema de resistencia a los antimicrobianos no se limita a un espacio geográfico, cabe resaltar que hay sectores en los cuales tiene un impacto mayor debido a su alta prevalencia. América latina si bien está conformada por países en desarrollo, gran parte de su población permanece en la pobreza y presenta problemas como: vivienda y saneamiento inadecuado y un sistema de salud ineficiente que lleva a la dispersión de microorganismos resistentes y variantes genéticas de resistencia, lo que junto a un inadecuado empleo de antibióticos se ve traducido en altas tasas de resistencia (Ramon-Pardo *et al.*, 2018). Frente a este problema varios países de América latina realizan esfuerzos para controlarlo mediante la incorporación de programas de control, vigilancia y gestión de antimicrobianos, lamentablemente estos no son suficientes. En este panorama el Perú no cuenta con un sistema de vigilancia efectivo, lo cual se ve

reflejado en el último reporte de resistencia a antimicrobianos del Instituto Nacional de Salud (INS) publicado el año 2012, el mencionado reporte presenta tasas de resistencia realmente alarmantes, en los principales patógenos bacterianos de importancia clínica, entre los cuales *Pseudomonas aeruginosa*; patógeno hospitalario oportunista, de elevada prevalencia en unidad de cuidados intensivos (UCI), resalta por poseer altos niveles de resistencia a todos los antibióticos evaluados en el estudio (INS, 2012).

Como se mencionó previamente existen diversas formas de hacer frente al problema de la resistencia a antibióticos. En el plan de acción de la OMS destaca el establecimiento de programas de vigilancia y control de la resistencia, la incorporación de comités de control de enfermedades infecciosas, educación en el uso adecuado de los antimicrobianos, etc. Debido a que la resistencia a antibióticos es un fenómeno natural reforzado por su uso inadecuado, estos esfuerzos serían vanos de no ir acompañados de la investigación en nuevos antibióticos (Hopkins, 2016) sin embargo las compañías farmacéuticas han disminuido el financiamiento para las investigaciones en desarrollo de nuevos antibióticos, ello debido a su elevado costo de producción y bajo rendimiento de inversión, lo que reduce su rentabilidad en comparación con otros medicamentos. En la actualidad existen alternativas para reemplazar o complementar al tratamiento antibiótico convencional, uno de ellos y quizás la alternativa más prometedora es el empleo de bacteriófagos y sus derivados como agentes antibacterianos (fagoterapia).

Los bacteriófagos son los organismos más abundantes de la tierra, son virus que infectan bacterias y por ello en su ambiente natural cumplen la función de controlar sus poblaciones. Desde su descubrimiento en 1915 y 1917 por Frederick W. Twort y Felix d'Hérelle independientemente, han sido empleados en el tratamiento de infecciones bacterianas ya que poseen características que los llevan a ser denominados como antibacterianos únicos como: auto replicación, especificidad, etc. (Górski *et al.*, 2009).

Debido a diferentes factores: como la poca rigurosidad de los ensayos clínicos y deficiencias metodológicas entorno de estos, el interés en la investigación en fagoterapia se vio afectada, por otro lado el descubrimiento de los antimicrobianos de amplio espectro lo cual puso fin a las investigaciones en la mayoría de países de Europa, manteniéndose solo en algunos países pertenecientes a Europa del Este. En la actualidad la crisis de resistencia a antibióticos ha llevado a que los investigadores pongan interés en alternativas distintas a los antimicrobianos convencionales, entre ellos los bacteriófagos, que con el avance científico hace viable su aplicación, por ello países como EE.UU, Alemania, Francia, Bélgica y Suiza se encuentran investigando en el tema.

El empleo de los bacteriófagos ha alcanzado logros importantes en los diferentes campos de la industria y en medicina veterinaria, actualmente existen productos comerciales en base a bacteriófagos, aprobados por la FDA (Abedon *et al.*, 2017; Sulakvelidze y Barrow 2005). De otro lado, en medicina humana, la fagoterapia ha tenido un avance importante, llegando inclusive a su aplicación bajo ensayos clínicos controlados, en pacientes en los cuales las terapias convencionales resultaron fallidas. (Fish *et al.*, 2016) En el Perú la fagoterapia es aún poco estudiada, existen trabajos de caracterización de bacteriófagos contra patógenos de importancia alimentaria, Punil (2016), así también Tamariz *et al.*, (2014) evaluaron la actividad terapéutica de bacteriófagos nativos en infecciones ocasionadas por *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina, en ratones.

El presente estudio se compone de dos partes: La primera enfocada a la caracterización microbiológica de los aislamientos de *P. aeruginosa* de un Hospital Nacional de Nivel III y de una clínica privada, evaluando su perfil de resistencia a antimicrobianos, producción de biopelícula (cualidad que contribuye a la resistencia a los antibióticos), y finalmente la presencia de profagos. La determinación de estas características permitió conocer mejor a la población de *P. aeruginosa* circulando en nuestro medio. La segunda parte consistió en aislar bacteriófagos nativos con el fin de evaluar su efectividad frente a ambas poblaciones de *P. aeruginosa* seleccionar y caracterizar un bacteriófago nativo con potencial para ser empleado en fagoterapia.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Resistencia a antibióticos

Los antibióticos son definidos como sustancias químicas que tienen la propiedad de matar o inhibir el crecimiento de microorganismos sensibles, generalmente reconocidos por ser empleados en el control de infecciones bacterianas. La era moderna de los antibióticos comenzó con el descubrimiento de la penicilina por Sir Alexander Fleming en 1928 (Rocha *et al.*, 2015), desde entonces, han jugado un rol importante en los avances en medicina y cirugía, han prevenido satisfactoriamente infecciones en pacientes con tratamiento quimioterápico; pacientes con enfermedades crónicas como la diabetes, enfermedades renales en estado terminal, artritis reumatoide e incluso cirugías complejas como trasplante de órganos y tejidos y cirugía cardíaca. En síntesis, los antibióticos han extendido la expectativa de vida, disminuyendo brotes de infecciones bacterianas. El beneficio ha sido a nivel global (Lujan *et al.*, 2014).

Las bacterias normalmente viven en ecosistemas bastante complejos interactuando con diversas comunidades microbianas, eventualmente alguna de estas poblaciones posee la habilidad de secretar algún tipo de antimicrobiano para prevalecer sobre las otras, frente a ello las bacterias desarrollan uno o varios mecanismos de resistencia para permitir su subsistencia, por ello la resistencia a antibióticos constituyen un fenómeno natural. Esta resistencia puede ser intrínseca, adquirida o adaptativa. La resistencia intrínseca se refiere a la presencia o ausencia de genes en el genoma bacteriano que brindan un fenotipo de resistencia a uno o más antibióticos, la resistencia adquirida es aquella que como su nombre indica se adquiere mediante diferentes medios como la mutación o la adquisición de variantes genéticas de resistencia, la más relevante para la microbiología clínica, pues como se observa en la práctica cotidiana, bacterias anteriormente sensibles

a determinados antimicrobianos en la actualidad presentan fenotipos de resistencia a los mismos. Otro tipo de resistencia también relevante para la microbiología clínica, es la resistencia adaptativa, que es el desarrollo de un estado fisiológico que le permite a la bacteria o a una subpoblación de esta, resistir al efecto bactericida del antibiótico, sumamente relevante en organismos como *P. aeruginosa* que cuando se encuentra en un estado fisiológico de biopelícula puede resistir a antibióticos como aminoglicósidos, cosa que no pasa en el estado planctónico (Florian *et al.*, 2006).

La resistencia antibiótica al ser un fenómeno natural se presentó en el ambiente natural mucho antes del descubrimiento de los antibióticos como tal por ello no fue raro que se presentara a los inicios de su aplicación en la práctica clínica debido al uso inadecuado de estos, en diferentes áreas como la medicina humana y veterinaria, ganadería, acuicultura etc. Ha dado lugar a una presión selectiva considerada antinatural, lo que ha conducido a que los reportes de aislamientos resistentes, multirresistentes (MDR), extremadamente resistentes (XDR) y pandrogo-resistentes (PDR) (Magiorakos, 2012) hayan aumentado en gérmenes anteriormente sensibles, limitando su eficacia en el uso clínico. (Kobayashi *et al.*, 2009), lo cual se ve plasmado en el aumento de tasas de mortalidad y costos asociados a la salud. Según *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) sólo en Estados Unidos se estima al menos dos millones de pacientes por año contraen infecciones serias por microorganismos multirresistentes causando un aproximado de 23000 muertes, incremento en la morbilidad y los gastos asociados a la salud. Cabe mencionar que parte de esta morbilidad se debe también a los efectos adversos asociados al empleo de antibióticos. Esto ha conducido a que la resistencia a antimicrobianos, sea catalogada por la OMS como una de las principales amenazas a la salud pública mundial (WHO, 2017).



La resistencia a antimicrobianos no puede ser eliminada por completo, pero esto no significa que su desarrollo o diseminación no puedan ser controlados, en busca de ello, se han probado diferentes iniciativas como: el control de enfermedades infecciosas, vacunación, administración racional de antimicrobianos y vigilancia de la resistencia etc. que buscan disminuir la presión selectiva ocasionada por el empleo inadecuado de antimicrobianos y reducir la diseminación de microorganismos y sus determinantes genéticos de resistencia. La evidencia ha demostrado que todos estos esfuerzos solo ralentiza el problema por lo que deben estar acompañados por la gestión y el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos y tratamientos efectivos contra bacterias multirresistentes (Hopkins, 2016).

## **2.2. MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS**

La resistencia a los antibióticos puede ser adquirida por diferentes medios, presentamos los cinco que se presentan comúnmente en los aislamientos clínicos según De Sousa *et al.* (2016).

### **2.2.1. INHIBICIÓN ENZIMÁTICA**

Es el más común de los mecanismos de resistencia bacteriana, se basa en la modificación o destrucción del antibiótico con el fin de inhibir su efecto. Esta inhibición puede ser llevada a cabo por la hidrólisis del antibiótico como ocurre con los antibióticos betalactámicos; transferencias de un grupo funcional como ocurre con aminoglicósidos, lincosamida y rifampicina y otras modificaciones químicas como fenómenos de óxido-reducción o actividad de liasas como ocurre con streptograminas (Wright, 2005).

Uno de los mecanismos de inhibición enzimática más importantes son las betalactamasas, principal mecanismo de resistencia que complica el tratamiento de infecciones por Gram negativos. Este mecanismo presenta diferentes variables: penicilinasas, betalactamasas AmpC, betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas, presentando cada una de ellas un espectro de acción distinto frente a los diferentes antibióticos betalactámicos, siendo las carbapenemasas las de mayor impacto pues este mecanismo, brinda resistencia a la mayoría de betalactámicos incluidos los carbapenems considerados la última línea limitando considerablemente las opciones terapéuticas. (Tang *et al.*, 2016)

### **2.2.2. Modificación de las PBPs**

Las proteínas de anclaje de la penicilina (PBP) están involucradas en la construcción de peptidoglicano, el principal componente de la pared celular bacteriana, estas enzimas son catalizadores de las reacciones de transglicosilación y transpeptidación, que dan origen al peptidoglicano formando la cadena de glucanos y uniéndolas mediante puentes de glicinas, respectivamente. Una falla en estas proteínas llevaría a problemas en la estructura de la pared celular, pérdida de permeabilidad, lesiones, elongación o también muerte celular por lisis (Sun *et al.*, 2014). Por ello el blanco de gran cantidad de antibióticos betalactámicos son PBP. Existe una gran variedad de PBP con diferentes características como no tener actividad de transglicosilasa o no tener afinidad con algunos antibióticos betalactámicos confiriendo a la bacteria resistencia a estos, por ejemplo la PBP4 y PBP5 que confieren resistencia a penicilinas, sin embargo la más importante desde el punto de resistencia a antimicrobianos es la PBP2a, una proteína modificada que confiere resistencia a cefalosporinas y penicilinas, esta proteína es codificada por el Gen *mecA* y otros genes homólogos a este (*mecB* y *mecC*) dando origen a su más conocido portador, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA) (Becker *et al.*, 2014).

### **2.2.3. Modificación de porinas**

Una de las diferencias entre bacterias Gram positivas y Gram negativas es que estas últimas poseen una membrana externa, una bicapa lipídica que en su mayoría está compuesta por lipopolisacáridos, a los cuales le debe su característica de hidrofobicidad que dificulta el pasaje de compuestos hidrofílicos. Las porinas son proteínas que permiten el transporte de compuestos hidrofílicos a través de la membrana lipídica, (dependiendo

de varios factores como estructura, tamaño y carga) como los antibióticos (Livermore *et al.*, 2006).

Como menciona Pages *et al.* (2008), el uso prolongado de antimicrobianos es un factor importante en la aparición de organismos multirresistentes y un mecanismo para lograr esta multirresistencia es la modificación de porinas lo cual lleva a la disminución de la expresión de estas o a la incapacidad de cumplir su función, impidiendo el transporte de antibióticos a través de la membrana. Uno de los mecanismos de resistencia más conocidos asociados a porinas es la pérdida de las OprD en *P. aeruginosa* confiriendo resistencia a imipenem y en menor medida meropenem, se sabe también que esta situación no solo afecta a estos antibióticos sino también disminuye la sensibilidad en otros betalactámicos (Gootz, 2010).

#### **2.2.4. Bombas de eflujo**

Las bombas de eflujo han demostrado ser un mecanismo de resistencia bastante eficiente. En general han sido caracterizadas 5 familias de bombas de eflujo tanto en Gram negativos como en Gram positivos, estos últimos al tener una sola membrana celular poseen solo tres de estas familias en comparación a los Gram negativos en los que se han reportado las cinco (Stavri *et al.*, 2007).

Una de las familias de bombas de eflujo más estudiadas por su relevancia en la resistencia de Gram negativos es la RND (*Resistance Nodulation cell Division*), este sistema consiste en una bomba expulsora en la membrana (AcrB y MexB), un poro en la membrana externa (TolC y OprM), y una proteína que une a esas dos (AcrA y MexA), conformando la unidad. Los dos sistemas de bombas de eflujo más estudiados son: AcrAB-TolC en *E. coli* y MexAB-OprM en *P. aeruginosa*, los cuales pueden capturar moléculas del periplasma con gran especificidad, por ejemplo AcrAB-TolC puede exportar

tintes como acriflavina y etidio, antibióticos como betalactámicos, tetraciclinas rifampicina y cloranfenicol y también detergentes como triton X-100 (Wright *et al.*, 2005; Takatsuka *et al.*, 2010).

### **2.2.5. Modificación del sitio blanco**

Cambios relativamente pequeños en secuencias de ácidos nucleicos en el caso de unidades ribosomales, como la modificación de aminoácidos en el caso de proteínas, pueden alterar las estructuras moleculares que son blancos de los antibióticos lo suficiente como para impedir la unión y acción de estos. Por ello, la modificación del sitio blanco de un antibiótico, da como resultado un mecanismo de resistencia bastante rápido, con un impacto mínimo en el *fitness* microbiano (De Sousa *et al.*, 2016).

Sobre este mecanismo existen diversidad de ejemplos como el de la modificación de RNA ribosomal que impide la acción de los antimicrobianos frente a la síntesis de proteínas, así como la mutación en *gyrA* que conduce a altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas (Wright *et al.*, 2005; Dunkle *et al.*, 2010). Si bien, gran parte de este tipo de resistencia, puede ser alcanzado por mutación puntual; también hay enzimas que pueden modificar el sitio blanco, por ejemplo el mecanismo *mcr-1* que brinda resistencia a colistina (antibiótico de último recurso) mediante la modificación del Lípido A, presente principalmente en enterobacterias, mecanismo actualmente involucrado en la aparición de microorganismos panresistentes (Falgenhauer *et al.*, 2017).

### **2.3. *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas* es un género de bacterias Gram negativas bastante amplio y complejo, en el cual se puede encontrar bacterias de importancia clínica y ambiental por lo que sus estilos de vida pueden ser saprófitos o patógenos. Una de las principales características del género es su versatilidad metabólica que les permite degradar, desde compuestos carbonados de bajo peso molecular hasta compuestos aromáticos y compuestos tóxicos de elevado peso molecular, esta cualidad les permite desarrollar en un gran espectro de hábitats donde la mayoría de células crece en biopelículas agregadas sobre superficies de ambientes con mínima presencia de nutrientes y hasta hostiles (Hoiby *et al.*, 2015).

*P. aeruginosa* es una bacteria ubicua, no formadora de spora, de 1,5 a 5  $\mu\text{M}$  de longitud, usualmente móvil, oxidasa y catalasa positiva, posee un metabolismo netamente aerobio con el oxígeno como aceptor final de electrones, pero en algunos casos pueden usar el nitrato como aceptor de electrones alternativo para realizar un metabolismo anaerobio. (Hoiby *et al.*, 2015) Fue aislado por primera vez en 1882 por Gessard a partir de pus verde, color que constituye una de sus características principales debido a la producción de los pigmentos piocianina y pioverdina. Posee una capacidad metabólica bastante extensa (característica de su género) la cual puede verse ejemplificada en la variedad de fuentes carbonadas y receptores de electrones que puede emplear para su metabolismo, así también su habilidad de producir múltiples metabolitos secundarios y polímeros. Esta versatilidad bioquímica permite a *P. aeruginosa* habitar diferentes ambientes inclusive aquellos que son considerados como hostiles, como en el caso de los hospitales (Mayers *et al.*, 2017). Es considerada una bacteria ambiental pero también un patógeno oportunista capaz de causar graves infecciones tanto crónicas como agudas afectando

principalmente a pacientes con la inmunidad comprometida, por ello es uno de los patógenos más comunes en unidades de cuidados intensivos, sala de operaciones y sala de quemados (Lujan, 2014).

### **2.3.1. Importancia clínica de *P. aeruginosa***

Los individuos con las defensas intactas por lo general no presentan riesgo de infección por *P. aeruginosa*, pues esta no posee la habilidad de infectar tejidos comunes como faringe intestino o piel de personas sanas, con la excepción del “oído de nadador” que surge por una exposición continua a este agente; sin embargo, bajo circunstancias que comprometen la inmunidad del individuo, puede originarse una infección por *P. aeruginosa*, así en pacientes neutropénicos, en intervenciones quirúrgicas, quimioterapia, VIH u otras circunstancias; también pacientes que presentan tubos endotraqueales o ventiladores son susceptibles a infecciones por este patógeno, por ello es catalogado como un patógeno oportunista (Hoiby *et al.*, 2015).

#### **2.3.1.1. Infecciones de vías respiratorias**

En el caso de pacientes con fibrosis quística, la disminución en el líquido periciliar, se ve traducida en la poca eficiencia para eliminar los microbios provenientes del tracto respiratorio superior, por ello *P. aeruginosa* causa este tipo de infecciones. Una vez producida la infección, la bacteria tiene la particularidad de adoptar un fenotipo diferente al planctónico, que se caracteriza por la hiperproducción de biopelícula, permitiendo su subsistencia en las vías respiratorias bajas causando una infección crónica. *P. aeruginosa* representa el 80% de aislamientos y es la primera causa de muerte en pacientes con fibrosis quística (Mayers *et al.*, 2017). De otro lado, en pacientes con el tracto respiratorio sano, también se pueden dar infecciones, siempre y cuando, alguna intervención, como la colocación de un tubo endotraqueal o una traqueotomía, permitan el ingreso de patógeno

a las vías respiratorias bajas directamente, lugar en el cual pueden establecer una infección, por ello se le considera el principal aislamiento obtenido de vías respiratorias en pacientes de unidades de cuidados intensivos (Zavascki *et al.*, 2006; Hoiby *et al.*, 2015). Además de ser uno de los principales causante de neumonía nosocomial, también puede estar involucrado en cuadros de neumonía asociada a la comunidad, que se caracterizan por ser rápidamente progresivos, fatales y generalmente asociados a pacientes con enfermedades pulmonares previas, fumadores crónicos, infectados con VIH, etc. categorizados como neutropénicos (Mayers *et al.*, 2017).

### **2.3.1.2. Infecciones de piel y tejidos blandos**

Las infecciones localizadas de piel y tejidos blandos incluyen infecciones necrotizantes, infecciones asociadas a mordeduras o contacto animal, infecciones del pie diabético, infecciones de sitios quirúrgicos e infecciones por quemaduras, entre otras. En la mayoría de estas infecciones, el factor común, es el daño a la piel, una de las defensas esenciales del cuerpo humano; lo que facilita la colonización del tejido dañado rico en nutrientes. Otros factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de la infección son la sobre exposición al patógeno, diabetes, cirrosis o condiciones que inhabiliten el sistema inmune; en estos casos las infecciones por bacilos Gram negativos en general y *P. aeruginosa* en particular, son muy frecuentes (Stevens *et al.*, 2014; Dryden, 2010). *P. aeruginosa* es el principal patógeno en pacientes con quemaduras térmicas donde la infecciones es adquirida mediante la hidroterapia o por la misma exposición al ambiente del tejido dañado, así también puede estar presente en úlceras crónicas donde se establece produciendo una biopelícula en su superficie; siendo catalogado como el agente infeccioso más común en infecciones moderadas y severas del pie diabético, pudiendo extenderse hasta los huesos causando osteomielitis (Hoiby *et al.*, 2015).



### **2.3.1.3. Otras infecciones**

*P. aeruginosa* también puede causar infecciones del tracto urinario en pacientes con alguna complicación, sepsis o meningitis en recién nacidos y en pacientes con un previo trauma o cirugía y también endocarditis u osteomielitis en pacientes consumidores de drogas, estas infecciones son menos frecuentes (Hoiby *et al.*, 2015)

### **2.3.2. Resistencia a antibióticos en *P. aeruginosa***

En los últimos años la resistencia en *P. aeruginosa* ha ido en aumento al igual que en otras bacterias de importancia clínica, como menciona Porras *et al.*, (2012), este fenómeno puede deberse a la presión selectiva ejercida principalmente por el sobre empleo de cefalosporinas de tercera generación, carbapenems así como de antibióticos anti-pseudomónicos.

Uno de los mayores problemas cuando se aborda *P. aeruginosa* bajo enfoque terapéutico, es que posee resistencia intrínseca a un número importante de antibióticos, sumado a una eficiente capacidad de adquirirla mediante diversos mecanismos (Hoiby *et al.*, 2015). La resistencia intrínseca puede ser atribuida a su baja permeabilidad debido a la ineficiencia de sus porinas, lo cual restringe la captación de antibióticos, siendo las más abundante las OprF. De otro lado, las porinas OprD, moderadamente expresadas en la membrana externa, tienen un papel importante en el pasaje de carbapenems (sobre todo Imipenem), por ello una mutación que produce la pérdida de estas estructuras, puede reflejarse en una reducción a la susceptibilidad de este antibiótico (Bellido *et al.*, 1992). A pesar del importante rol que tiene la permeabilidad de la membrana externa en el fenómeno de multiresistencia, este no es el único; como se ha mencionado previamente las bombas

de eflujo permiten expulsar antibióticos del interior de la célula bacteriana, en el caso de *P. aeruginosa* el sistema MexAB-OprM es el más conocido, y participa en la resistencia a diversos antibióticos como fluoroquinolonas, algunos betalactámicos, tetraciclinas, macrólidos, sulfonamidas, etc. (Kohler *et al.*, 1996). Otro mecanismo importante, es la producción de betalactamasa AmpC, la cual se expresa en niveles insignificantes en cepas salvajes, por ello éstas pueden presentarse como sensibles a algunos betalactámicos, sin embargo una vez la interacción con el antibiótico estas cepas incrementan la producción de la enzima lo que disminuye su sensibilidad a estos. Es importante mencionar que estos mecanismos no se presentan por separado, su presentación conjunta le dan a *P. aeruginosa* su característica de resistencia intrínseca (Livermore, 1992).

De otra parte, *P. aeruginosa* tiene la particularidad de ser eficiente en adquirir resistencia adicional mediante la incorporación de secuencias de ADN (plásmidos, integrones o fagos) que insertan genes de resistencia que pueden ser rápidamente obtenidos mediante transferencia horizontal, entre estos encontramos BLEEs, Metalobetalactamasas (MBLs), metilasas del 16S rRNA, etc (Shahid *et al.*, 2003; Yokoyama *et al.*, 2003). Otro mecanismo relevante de adquisición de resistencia es la alteración de la expresión de ciertos mecanismos de resistencia intrínseca, por ejemplo mutaciones que comprometan genes represores de bombas de eflujo, llevando a la sobre expresión de estas, reduciendo la susceptibilidad a gran variedad de antibióticos (Poole *et al.*, 1996). Estas mutaciones también pueden estar involucradas en la pérdida de permeabilidad de la membrana externa, cuando se trata de porinas o en la pérdida de afinidad por el antibiótico, cuando la mutación se da al nivel de los sitios blanco de la acción de este. Adicional a este mecanismo, se ha descubierto que la presencia de mutaciones que no tienen repercusión de manera aislada, al presentarse en conjunto, pueden disminuir la

sensibilidad de la bacterias (Fernandez *et al.*, 2011), así también se han reportado mutaciones al nivel del *Missmatch repair system* (MMR), el cual es responsable de la reparación del ADN, generando un fenotipo hipermutable conocido como *mutator* que tiene la capacidad de adquirir resistencia a betalactámicos, aminoglicósidos y fluoroquinolonas mucho más rápido que fenotipos *non-mutators* (Oliver *et al.*, 2010).

Los mecanismos adaptativos en *P. aeruginosa* al igual que en otros organismos son inducidos en respuesta a condiciones extremas de pH, anaerobiosis, formación de biopelícula o la exposición a antibióticos en concentración sub-inhibitoria, estas condiciones llevan a la desregulación de uno o más genes de resistencia por ejemplo, la hiperproducción de AmpC en respuesta a la exposición continua a betalactámicos, (Llanes *et al.*, 2013 ) o también la sobre expresión del sistema de bomba de eflujo MeXY-OprM por exposición a aminoglicósidos (Hocquet *et al.*, 2003).

### **2.3.3. Biopelícula y resistencia**

La biopelícula representa una asociación de microorganismos, los cuales se ubican dentro de una matriz de exopolisacárido, formando diferentes asociaciones entre los participantes de esta. Este tipo de organización microbiana es considerada una estrategia de adaptación a diferentes ambientes, pueden encontrarse en distintas superficies ambientales también en aparatos clínicos como implantes médicos, catéteres endovenosos o urinarios, tubos endotraqueales, etc; si bien se desarrollan preferentemente en superficies inertes las biopelículas también pueden crecer en tejido vivo, como en el caso de la endocarditis y particularmente en *P. aeruginosa*, los aislamientos que presentan fenotipo productor de biopelícula están asociados a infecciones crónicas en pacientes con fibrosis quística (Donlan, 2001; Mulcahy *et al.*, 2010).

Usualmente las bacterias en estado planctónico estimulan la producción de anticuerpos pero estos son poco efectivos frente a la biopelícula incluso en personas inmunocompetentes (Costerton *et al.*, 1999), el tratamiento de infecciones de este tipo es complicado debido a que los antimicrobianos empleados son rápidamente inactivados o fallan al penetrar la estructura de la biopelícula por ello es calificada como una forma de resistencia adaptativa y le otorga a la bacteria una serie de ventajas, principalmente la resistencia a antibióticos equivalente de 10 a 1000 veces más que en su estado planctónico; cabe resaltar que este parámetro de resistencia no es evaluado en el laboratorio clínico convencionalmente y los ensayos *in vivo* al realizarse en aislamientos en estado planctónico fallan al predecir la eficacia (Mah y O'Toole, 2001; Moreau-Marquis *et al.*, 2008). Los mecanismos que llevan a la resistencia son variados: la matriz de exopolisacáridos limita la interacción entre las bacterias y el antimicrobiano, lo cual depende de su ubicación en la biopelícula, siendo las más internas las que interactúan menos con el antibiótico (Hoyle *et al.*, 1992); al encontrarse en un estado de biopelícula la bacteria disminuye su tasa de crecimiento volviéndose menos activa metabólicamente lo que limita la eficacia de los antimicrobianos que tienen como blanco el metabolismo. Otro punto importante es que en el estado fisiológico de biopelícula algunas subpoblaciones presentan diferentes fenotipos de resistencia, por ejemplo el sobreexpresar bombas de eflujo, confiriendo resistencia a antibióticos como aminoglicósidos (Zhang y Mah, 2008); además también puede entrar en un estado fisiológico conocido como "persistente", el cual consiste en una subpoblación dentro de la biopelícula que es capaz de tolerar el tratamiento antibiótico mediante la inactivación fisiológica de dicha subpoblación (dormancia). Este estado se encuentra fuertemente vinculado a infecciones recalcitrantes (Mayers *et al.*, 2017).

## **2.4. Bacteriófagos**

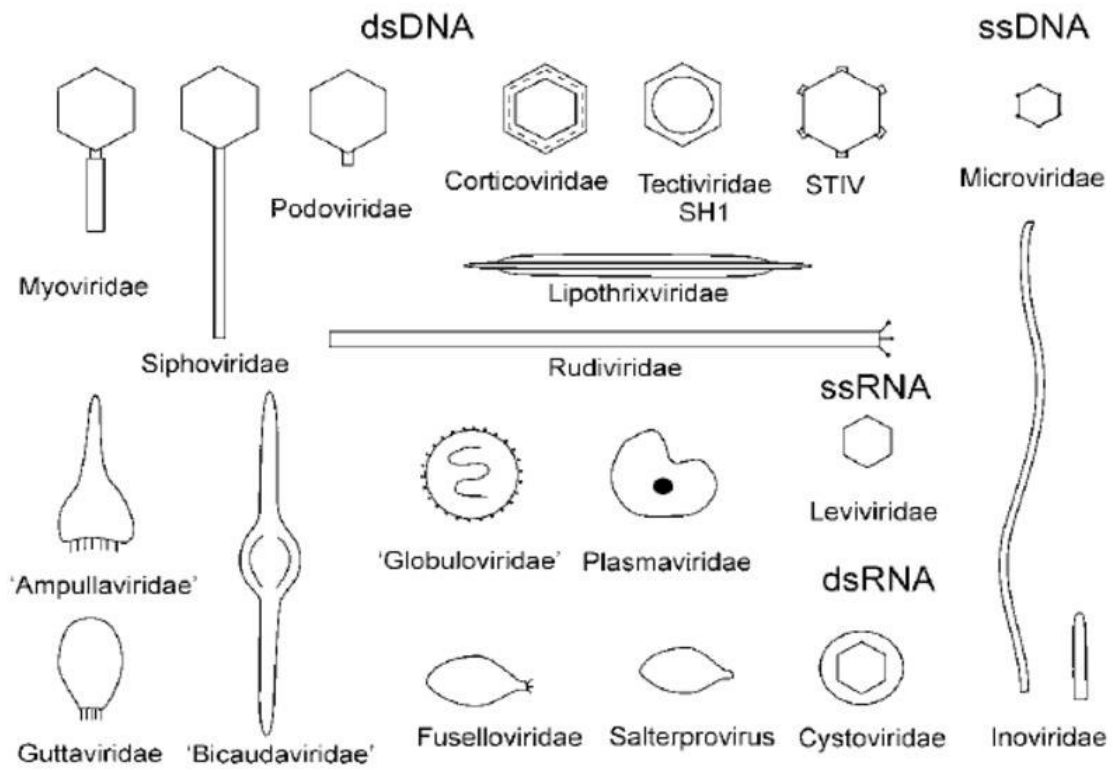
Los bacteriófagos o fagos son parásitos intracelulares obligados, virus que infectan bacterias de manera específica; empleando su maquinaria biosintética para replicarse; están compuestos principalmente por una estructura proteica llamada cápside y material genómico que se encuentra protegido por esta, al igual que en otros virus. El bacteriófago más estudiado es el T4. Los fagos pueden encontrarse en cualquier lugar donde sea viable el crecimiento de bacterias, como: desagües, residuos sólidos, fuentes de agua marina y continental, muestras clínicas, efluentes (desechos) hospitalarios; Son los organismos más abundantes del mundo, así como los más diversos, se estima una cantidad de  $10^{31}$  partículas virales además se menciona que existe 10 veces más bacteriófagos que número de células bacterianas en todo el mundo (Jurczak-Kurek *et al.*, 2016). En la naturaleza cumplen dos funciones con respecto a su hospedero (antagonista o sinérgica; lítica o lisogénica), sus características como ente biológico han sido de mucha utilidad para diferentes disciplinas de la ciencia sobre todo la biología molecular, campo en el cual son los virus más estudiados. Comúnmente son conocidos como reguladores de poblaciones microbianas; debido a ello desde su descubrimiento hace aproximadamente 100 años han sido empleados como agentes antibacterianos y en los últimos años debido a la crisis antibiótica, tanto ellos como sus derivados han atraído la atención de muchos investigadores como una posible solución a esta (Gómez *et al.*, 2009; Bragg *et al.*, 2016).

### **2.4.1 Estructura y clasificación**

Al igual que otros virus, los bacteriófagos son microorganismos bastante pequeños poseyendo en su mayoría un tamaño aproximado entre 24 y 200 nm, están compuestos básicamente de un ácido nucleico (ADN o ARN) que puede variar en tamaño, arreglo

(circular, lineal o segmentado) y estructura (de doble cadena o simple), y una estructura de cubierta llamada cápside que está conectada, en la mayoría de los casos, con una cola que posee fibras involucradas en la interacción con los receptores de la superficie bacteriana. Algunos bacteriófagos al no presentar estas estructuras las reemplazan con otras que cumplen una función similar (Mayer, 2015; Watanabe *et al.*, 2007). Los viriones pueden ser de forma isométrica, filamentosa o pleomorfa; además estos pueden presentar lípidos en su estructura o una envoltura lipídica. (Figura 1; Ackermann, 2006). Las propiedades fisicoquímicas de los bacteriófagos así como su tipo de ácido nucleico han sido las características principales para realizar su clasificación, en la actualidad el ICTV (Comité Internacional de Taxonomía Viral) emplea para la clasificación cada propiedad disponible de estos virus, pero por razones prácticas, las propiedades fisicoquímicas y el tipo de ácido nucleico se mantienen como las más importantes incorporando cada vez más el empleo de información genómica (Lwoff *et al.*, 1962).

Los bacteriófagos que poseen cola pertenecen al Orden *Caudovirales*, que abarca a la mayoría de los bacteriófagos representando al 96% del total de bacteriófagos identificados hasta el momento. Los viriones consisten en una cápside icosaédrica, la cual contiene una molécula de ADN de doble cadena; estos pueden realizar ciclo lítico o lisogénico; íntimamente relacionados por la evolución y ciclo de vida y se dividen en tres familias bastante grandes: *Myoviridae* (cola larga contráctil), *Siphoviridae* (cola larga no contráctil) y *Podoviridae* (cola corta, no contráctil). Los bacteriófagos con diferentes morfologías a las del Orden *Caudovirales*, como: isométricas, pleomórficas o filamentosas, se distribuyen en siete familias que difieren profundamente en sus características y como es de esperarse forman grupos polifiléticos una característica de estos bacteriófagos es que en su mayoría presentan un rango de hospedero estrecho (Ackerman *et al.*, 2014).



**Figura 1. Morfotipos de bacteriófagos y virus de arqueas.** (Tomado de Ackerman, 2006)

## 2.4.2 Replicación viral

### 2.4.2.1 Ciclo lítico

También llamado ciclo productivo o virulento, su principal característica es la producción de una nueva generación de bacteriófagos y la muerte del hospedero bacteriano, cumpliendo un papel antagonista en relación a su hospedero. Este ciclo comienza con la adsorción que es la adhesión de los receptores del bacteriófago a determinadas estructuras bacterianas como, *pili*, flagelo, cápsula o pared. Una vez el fago se haya fijado a esta, inyecta su material genético dejando a la cápside junto con las demás estructuras fuera, la siguiente etapa comprende la síntesis de las estructuras virales y el ensamblaje de los viriones, lo que lleva a que los bacteriófagos desaparezcan brevemente del lisado, por esta razón la fase es denominada eclipse. Por otro lado el metabolismo bacteriano es redirigido a la síntesis de los componentes fágicos, un punto relevante en esta etapa es la replicación del ácido nucleico del bacteriófago, este evento divide la transcripción bacteriana en dos etapas, la temprana y la tardía; los productos generados en la primera son esenciales para la replicación del genoma viral; y post-replicación se da a lugar la segunda en la cual principalmente se produce ARNm para generar las proteínas estructurales del virión y las encargadas de la lisis celular (Engelkirk *et al.*, 2011). Una vez terminada la síntesis de estos componentes se procede al ensamblaje, en el caso de los caudovirales, el ADN se une a una estructura pre formada de la cápside y esta a su vez se liga con otras estructuras virales teniendo como resultado la progenie del fago, finalmente con el objetivo de liberar la progenie viral e infectar a otras bacterias, el bacteriófago emplea el sistema holina-endolisina que permite degradar el principal componente de la pared celular bacteriana (peptidoglicano) generando inestabilidad que finalmente resulta en lisis celular (Schmelcher *et al.*, 2012; Borysowsky *et al.*, 2014).



### 2.4.2.2 Ciclo lisogénico

Este ciclo representa la integración del material genético del bacteriófago dentro del genoma bacteriano, que resulta en un fago integrado a la bacteria referido como profago. De manera similar al ciclo lítico, el ciclo lisogénico presenta una fase de adsorción, una vez realizada esta etapa el genoma fágico se vuelve latente, persistiendo de manera integrada o independiente al genoma bacteriano, dependiendo principalmente de la presencia de integrasas en el genoma. El profago se replica más o menos de manera sincronizada con la bacteria, esta relación se mantiene indefinidamente hasta que se rompa espontáneamente o bajo la acción de algún estímulo físico o químico como los son ciertos inductores como: mitomicina C, luz UV, antibióticos, etc. lo cual finalmente resulta en la formación de nuevos bacteriófagos (Campbell, 2006; Lwoff, 1953). Una variante de este estados es conocido como pseudo-lisogenia o el tercer ciclo de los bacteriófagos que al igual que la lisogenia permite la supervivencia del hospedero, en este estado el bacteriófago emplea a la bacteria hospedero como "carrier" y su genoma no se replica dentro de esta pudiendo generar una subpoblación que no contenga el genoma fágico integrado, recuperando su actividad (lítica o lisogénica) cuando las condiciones mejoran (Fortier y Sekolovik *et al.*, 2013) (Figura 2).

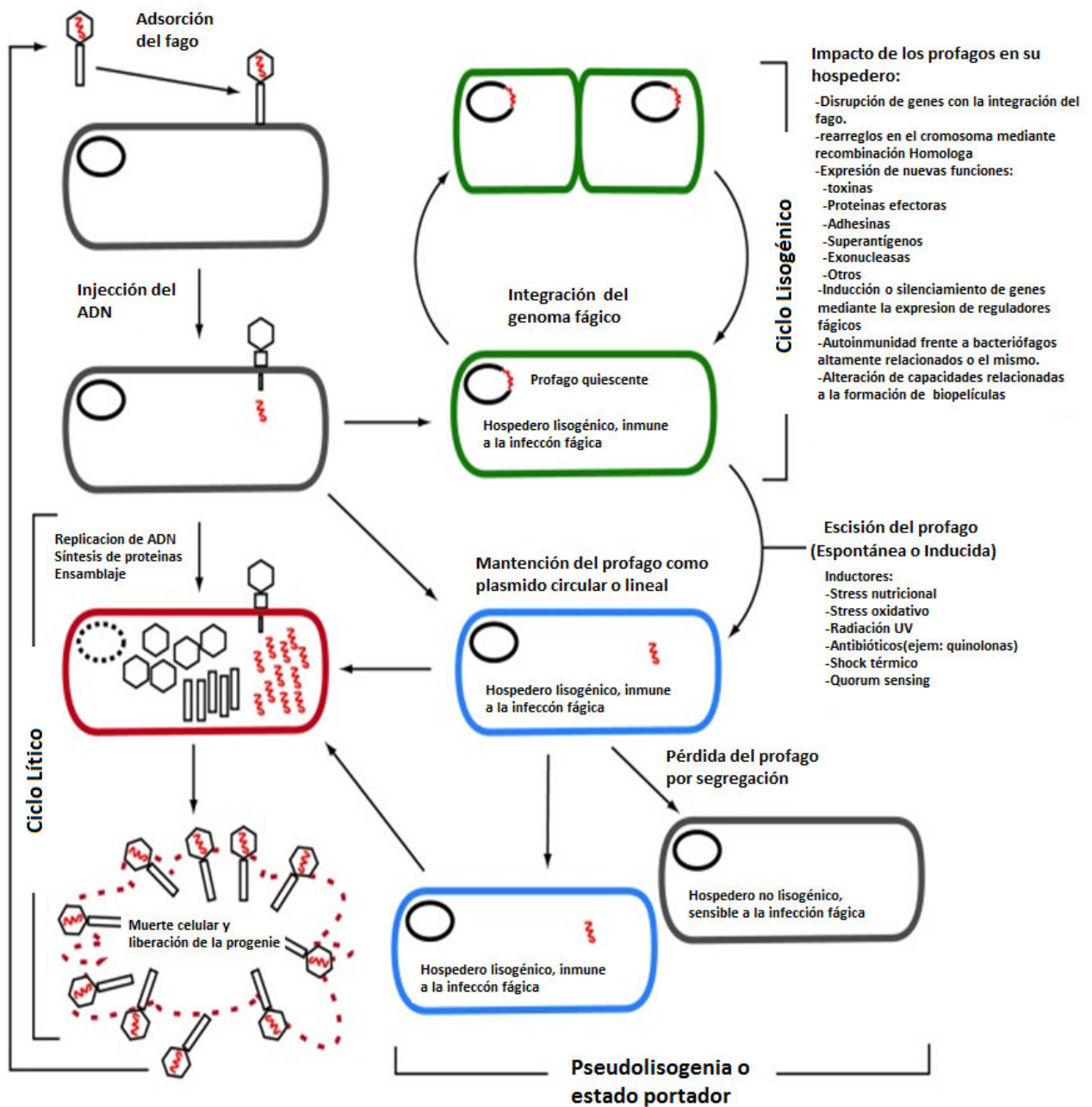


Figura 2. Tipos de ciclos de replicación de bacteriófagos.

### 2.4.3 Fagoterapia

La fagoterapia es un tratamiento basado en la actividad bactericida de los bacteriófagos líticos. Los fagos reconocen a su bacteria hospedero dentro de la cual se multiplicarán, para finalmente romper esta célula y liberar su progenie, que infectará nuevas células bacterianas, aumentando el número de fagos de forma exponencial y, magnificando su efecto antibacteriano. A la fagoterapia se le atribuyen diversas ventajas en comparación al tratamiento con antibióticos convencionales, como se mencionó previamente el número de fagos crece exponencialmente al lisa a la bacteria blanco, permitiendo que esta terapia tenga mayor efecto en el sitio mismo de la infección; además, gracias a su capacidad de mutación, los fagos pueden contrarrestar la resistencia que podrían generar las bacterias hacia ellos. En cambio, los antibióticos siempre mantienen el mismo principio activo, de manera que cuando las bacterias desarrollan resistencia, éstos quedan inactivos; el tratamiento con bacteriófagos no genera efectos secundarios nocivos para los humanos, animales o plantas, mientras que los antibióticos pueden causar alergias, desórdenes intestinales, favorecer infecciones secundarias y provocar múltiples efectos adversos. Incluso se considera que los fagos tienen un efecto benéfico al estimular el sistema inmune; seleccionar y producir un nuevo fago es un procedimiento relativamente rápido y económico; la alta especificidad que caracteriza a los fagos (incluso cepa-específicos), es un aspecto ventajoso, pues limita el tratamiento a la bacteria causante de la infección, sin afectar la microbiota normal. Finalmente, se sabe que los bacteriófagos que realizan ciclo lítico son agentes bactericidas, por lo tanto, las bacterias infectadas no vuelven a ser viables, mientras que algunos antibióticos son bacteriostáticos y permiten con mayor facilidad la adquisición de resistencia (Borysowsky *et al.*, 2014; Abedon *et al.*, 2017).

Los inicios de la fagoterapia se remontan al año 1919, en el Hospital Enfants-Malades de París, donde Felix D'Herelle experimentó con éxito la actividad antibacteriana de los fagos para el tratamiento de disentería en un niño de 12 años, mediante el empleo de un preparado de fagos contra *Shigella*, el cual logró controlar la infección. Junto a él, otros investigadores continuaron los estudios en fagoterapia hasta más allá de los años 30. Posteriormente el interés en la fagoterapia disminuyó debido a la aparición de los antibióticos, carencia de información sobre las propiedades de los fagos y aspectos regulatorios para la experimentación terapéutica con humanos; lo que se vio reflejado en la disminución de investigaciones y publicaciones entre 1950 y 1980. De hecho, sólo ciertos países de Europa del Este continuaron desarrollando esta línea durante esos años. En la actualidad el escenario es diferente: la actual crisis de resistencia a antibióticos lleva a los investigadores a evaluar otras alternativas; de otra parte, los adelantos científicos han dilucidado mucha información sobre las propiedades y comportamiento de los fagos, a raíz de ello el empleo de bacteriófagos como antibacterianos ha tenido logros importantes en diferentes ámbitos de la actividad humana como en la industria alimentaria y la veterinaria encontrándose actualmente productos comerciales en base a bacteriófagos aprobados por la FDA (*Agriphage and Intralytix*) por otro lado en el campo de la medicina humana la fagoterapia ha tenido varios obstáculos en los países de occidente mientras que en países del oriente existen versiones comerciales de cócteles de bacteriófagos disponibles como tratamiento en algunos países de la antigua unión soviética como Rusia y Georgia, (Bragg *et al.*, 2016) mientras que en países como Polonia es un tratamiento de carácter experimental en caso de que ninguna otra terapia esté disponible y está enmarcado dentro de la ley de prácticas médicas (Polish Law Gazette No. 28 / 1997). Sin embargo, dadas las condiciones actuales el interés de países de occidente en la fagoterapia en medicina humana ha aumentado de manera significativa, lo cual se ve reflejado en la integración de grupos importantes de

Francia, USA, Inglaterra, España, a la investigación en esta alternativa terapéutica (Prada *et al.*, 2015). En el Perú, la investigación en bacteriófagos como agente antibacteriano aun es incipiente, habiendo trabajos en caracterización de bacteriófagos frente a patógenos de importancia en la industria alimentaria (Punil, 2017; Flores, 2017) y en el ámbito médico, Tamariz *et al.*, (2014) ha realizado trabajos en modelos animales para evaluar la efectividad de la terapia con bacteriófagos en infecciones por *S. aureus* resistente a meticilina (SARM), demostrando la efectividad del tratamiento de infecciones localizadas.

La fagoterapia convencional es caracterizada por emplear bacteriófagos nativos como agentes antimicrobianos, características que hace referencia a bacteriófagos no modificados genéticamente, pero en estos últimos años existen diferentes iniciativas por mejorar el rendimiento de estos bacteriófagos en el área terapéutica mediante ingeniería genética (NEXTBIOTICS; ELIGO)

### III. HIPÓTESIS

- ✓ H<sub>1</sub>: Existen bacteriófagos nativos que pueden constituirse como candidatos para el tratamiento de infecciones asociadas a *Pseudomonas aeruginosa* resistente a drogas y productoras de biopelícula.
  
- ✓ H<sub>0</sub>: No existen bacteriófagos nativos que pueden constituirse como candidatos para el tratamiento de infecciones asociadas a *Pseudomonas aeruginosa* resistente a drogas y productoras de biopelícula.

#### IV. OBJETIVOS

##### GENERAL:

- ✓ Aislar y caracterizar bacteriófagos nativos candidatos a fagoterapia en infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a drogas y productoras de biopelícula.

##### ESPECÍFICOS:

- ✓ Aislamiento de *P. aeruginosa* a partir de muestras clínicas de pacientes hospitalizados.
- ✓ Determinar el perfil de resistencia de los aislamientos de *P. aeruginosa*.
- ✓ Evaluar la producción de biopelícula y presencia de profagos en los aislamientos de *P. aeruginosa*.
- ✓ Aislamiento de bacteriófagos específicos para *P. aeruginosa* a partir de efluentes hospitalarios.
- ✓ Determinar el rango de hospedero de los bacteriófagos nativos de *P. aeruginosa*.
- ✓ Determinar las características microbiológicas de un bacteriófago de *P. aeruginosa*.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. MATERIALES

#### Material Biológico

- *P. aeruginosa* ATCC 27853.
- Aislamientos de *P. aeruginosa* obtenidos durante enero-febrero del 2018, provenientes de un Hospital Nacional de Nivel III y una clínica privada aisladas a partir de diferentes tipos de muestras de pacientes.

#### Materiales de laboratorio y equipos.

Se utilizaron los materiales y equipos del Laboratorio de Resistencia a antimicrobianos e Inmunopatología LID- UPCH y del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología FCB - UNMSM.



## **B. MÉTODOS**

### **5.1 *Pseudomonas aeruginosa***

#### **5.1.1 Aislamiento**

Los aislamientos fueron obtenidos a partir de muestras clínicas de pacientes hospitalizados, se consideraron muestras de secreciones, vías respiratorias bajas y altas, vías urinarias y hemocultivos. Fueron cultivados en placas de agar sangre, agar Mac conkey y ceftrimide a 37°C durante 24 horas, la identificación se realizó por las características morfológicas de las colonias y la confirmación de especies se llevó a cabo con el sistema automatizado *Vitek 2 Biomérieux*-Francia.

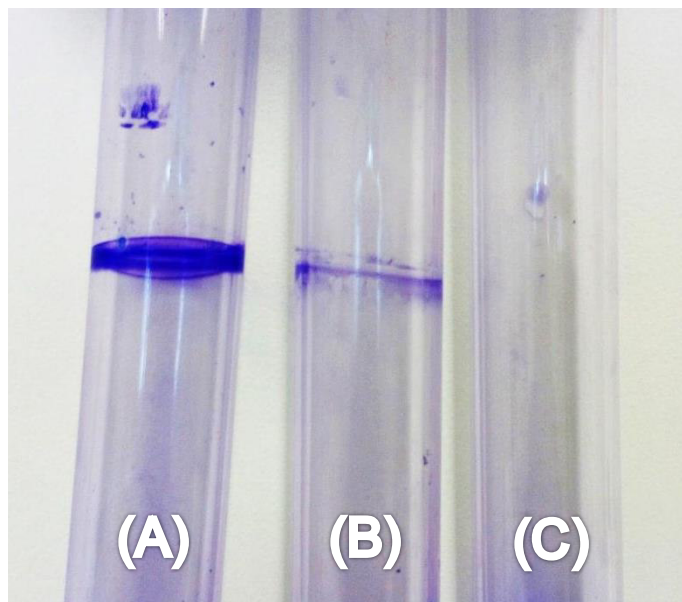
#### **5.1.2 Caracterización**

##### **5.1.2.1 Prueba de sensibilidad antibiótica**

Los patrones de sensibilidad de los diferentes aislados fueron estudiados usando el método de concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante el sistema *Vitek 2 Biomérieux*, la interpretación de las susceptibilidades se basó en los lineamientos de interpretación del documento M100-S27 (CLSI, 2017). En base a los resultados de la prueba de susceptibilidad los microorganismos fueron clasificados como resistentes (R), multidrogo-resistentes (MDR), extremadamente resistentes (XDR) y pandrogo-resistentes (PDR) según la clasificación de Magiorakos *et al.* (2012).

### 5.1.2.2 Evaluación de producción de la biopelícula – Método del Tubo

La detección de biopelícula se realizó mediante el método del tubo (cualitativo), para ello se inocularon 10  $\mu$ L de cultivo de toda la noche de la cepa problema en un tubo de 10mL de TSB y se incubó a 37°C por 24 horas, después de la incubación los tubos fueron decantados y lavados con buffer fosfato (pH 7.3), una vez secos fueron teñidos con cristal violeta al (0.1%) por 30 segundos, el exceso de tinción fue lavado con agua desionizada y los tubos fueron secados de manera invertida, la formación de biopelícula fue considerada positiva conforme a la coloración en la parte superior (interface liquido/aire) del tubo a evaluar de acuerdo al siguiente puntaje 1: débil/ninguna; 2: moderada ;3: alta/fuerte (Figura 3), el experimento fue realizado por triplicado. (Christensen *et al.*, 1982).



**Figura 3. Método del tubo para evaluar producción de biopelícula.**

Parámetros de producción de *biofilm* (A) alta; (B) moderada; (C) débil/ninguna

### **5.1.2.3 Detección de profagos mediante el empleo de mitomicina C**

Para determinar la presencia de profagos en los cultivos aislados de *P. aeruginosa*, se procedió a la inducción de estos en los aislamientos indicados anteriormente. La inducción se realizó con una solución madre de mitomicina C a una concentración de 10 µg /mL y se determinó la concentración adecuada mediante el siguiente procedimiento:

#### **5.1.2.3.1 Determinación de la concentración de mitomicina C para la inducción**

Para determinar la concentración adecuada de mitomicina C para la inducción, se sembraron todos los aislamientos en 2 mL de TSB y se incubaron a 37°C toda la noche, 10 µL del cultivo fueron sembrados en 3mL de TSB con diferentes concentraciones del mutágeno (0, 1, 2 y 3 µg /mL) preparados a partir de la solución madre de mitomicina C. Se incubaron a 37°C por 24 horas, se seleccionó la concentración más alta de mitomicina C a la cual crecieron todas las cepas como la ideal para realizar la prueba de inducción de profagos.

#### **5.1.2.3.2 Prueba de inducción de profagos**

Para detectar profagos en los aislamientos de *P. aeruginosa*, se empleó mitomicina C como agente mutágeno, a la concentración previamente obtenida, y los resultados de la prueba se evaluaron por la formación de placas de lisis (Clokic y Kropinski, 2008):

- Se transfirió un volumen de 200 µL de cepa toda la noche a dos tubos estériles, uno control y uno experimental.
- Se preparó MTA (TSA al 0,6% de agar) para realizar la bicapa,

- Se añadieron 4 mL de medio MTA a 45°C sin mitomicina como control, por otro lado en el caso experimental se empleó MTA suplementado con mitomicina C a 1 µg /mL (concentración adecuada obtenida previamente) .
- Rápidamente se agitaron los tubos (control y experimental) en vortex por 20 segundos aproximadamente y fueron dispensados en placas con base de TSA como en el método de bicapa (Adams, 1959).
- Ambas placas (control y experimental) fueron incubadas a 37°C y se observó la formación de placas de lisis a las 12 y 24 horas.
- La lectura se realizó evidenciando la formación de placas de lisis en un microscopio compuesto a 40X de aumento, la clasificación se realizó mediante la lectura de placas; Si la placa Petri experimental y el control, presentaban placas de lisis, se interpretó como un profago espontáneo, si sólo estaban presentes en la placa experimental, se consideró un profago inducible.

## **5.2 Bacteriófagos**

### **5.2.1 Aislamiento de bacteriófagos.**

#### **5.2.1.1 Enriquecimiento de filtrados**

Considerando que por lo general la concentración de fagos en muestras ambientales, se encuentra por debajo de los límites de detección de los métodos de laboratorio comúnmente empleados. se procedió a enriquecer las muestras colectadas, añadiéndole la bacteria hospedera a fin de incrementar la concentración de bacteriófagos.

Un volumen de 50 mL de muestra líquida (efluente hospitalario y agua del río Lurín) fue colectado y centrifugado a 5000 rpm x 15 minutos posteriormente el sobrenadante fue filtrado mediante membranas de 0,45  $\mu$ M. A 90 mL de TSB se añadieron 5mL de filtrado junto con un inóculo de 5 mL de un cultivo de *P. aeruginosa* ATCC 27853 incubado *overnight*, los tubos fueron incubados por 24 horas a 37°C. Posteriormente, 10mL del cultivo fueron filtrados mediante membranas de 0,45  $\mu$ M. El procedimiento de enriquecimiento, se repitió dos veces y el filtrado final fue conservado a 4°C hasta su empleo en la detección de bacteriófagos.

#### **5.2.1.2 Detección de bacteriófagos**

A partir de las muestras enriquecidas se realizaron diluciones de 1/10 finalmente se tomaron 100  $\mu$ L de las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-8}$  para obtener bacteriófagos aislados y realizar la detección de estos por la presencia de placas de lisis mediante la técnica de doble capa de agar según Adams, 1959.

### **5.2.1.3 Preparación de suspensiones madre de bacteriófagos y determinación de la concentración de los mismos.**

A partir de las placas de cultivo de fagos, se obtuvo cuidadosamente una sola placa de lisis con un tip estéril colocándola en un tubo con 10 mL de TSB. Se agitó en vortex para liberar los bacteriófagos, luego se centrifugó a 10 000 rpm x 10 minutos y se filtró el sobrenadante mediante membranas de 0,45  $\mu\text{m}$ , con esta suspensión se realizaron 4 enfrentamientos fago-bacteria, consistentes en mezclar el bacteriófago con su respectivo hospedero, a fin de aumentar el título del bacteriófago para ello se inoculó 1mL de filtrado y 1 mL de cepa de toda la noche en 8 mL de TSB incubándose 24 horas a 37°C y posteriormente se centrifugó y filtró como previamente se ha descrito. A partir del filtrado final se realizaron diluciones 1/10 hasta alcanzar la dilución  $10^{-9}$  y se procedió al cultivo cuantitativo mediante la técnica de bicapa (cada dilución por triplicado). Las placas fueron incubadas a 35°C por 24 horas, se contaron las placas Petri que presentaron un número de entre 30 y 300 placas de lisis, de esta manera se determinó la concentración de fagos en Unidades Formadoras de Placas por mililitro (UFP/mL).

## **5.2.2. Caracterización de Bacteriófagos**

### **5.2.2.1 Determinación de la especificidad lítica frente a cepas nativas de *P. aeruginosa***

Se empleó la técnica del agar suplementado con bacteriófagos "*Bacteriophage agar*" para ello primero se tuvo placas con base de TSA (15 mL aprox), posteriormente se empleó MTA licuado a 48°C y se dispuso en alícuotas de 4 mL en tubos de 10 mL, A cada tubo se inoculó 100  $\mu\text{L}$  de una suspensión de bacteriófagos de título  $10^9$  UFP/mL, se mezcló

empleado un vortex, inmediatamente esta mezcla fue distribuida homogéneamente en la placa con base de TSA (15mL aprox.) y se dejó solidificar a temperatura ambiente en una superficie plana generando una placa de agar suplementado con bacteriófagos (experimental), de manera parecida se procederá con la placa control pero sin añadir la suspensión de bacteriófagos a evaluar.

En un tubo de microcentrífuga de 200 uL se agregaron 100 µL de buffer fosfato (pH 7,3) y con un palillo de dientes estéril se colectó y resuspendió una colonia de *P. aeruginosa* crecida en medio sólido. De esta suspensión se inoculó una gota de 3 µL sobre el medio, tanto en el medio suplementado con bacteriófagos (experimental) como en el que no fue suplementado (control) y se dejaron secar las gotas por 10 minutos. Posteriormente las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas. La lectura se realizó mediante la comparación de la placa experimental con la placa control, si la cepa era susceptible a la infección del bacteriófago, su crecimiento únicamente se evidenciaba en la placa control más no en la experimental. (Letarov *et al.*, 2017). Esta operación se repitió para todos los aislamientos de *P. aeruginosa* y posteriormente se seleccionó al bacteriófago que presentó un mayor rango de hospedero y características morfológicas compatibles con un fago lítico (tamaño y claridad de la palca de lisis), y se evaluó su especificidad lítica frente a cepas estándar a fin de realizar una mejor descripción de su rango de hospedero. Se incluyeron las cepas ATCC, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Escherichia coli* 25922, *Klebsiella pneumoniae* 700603, *Enterococcus faecium* 29212, *Enterococcus gallinarum* 45973, *Salmonella* Tiphys 14028, *Salmonella* Enteritidis 13076 y *Staphylococcus aureus* 25923, a fin de una mejor caracterización.

### 5.2.2.2 Curva de crecimiento de “un solo paso” (“One-step growth curve”)

Una vez evaluadas las características morfológicas, así como el rango de hospedero, se seleccionó un bacteriófago, en base a las características ya mencionadas, para determinar su ciclo de replicación, tiempo de generación y el tamaño de estallido (número de fagos producidos por bacteria infectada). Para ello se realizó la curva de un solo paso de acuerdo al método de Pajunen *et al.*, (2000) con algunas modificaciones:

- Se inocularon 15 mL de TSB con la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853. Se incubó durante 18 – 20 horas a 35 – 37 °C. El crecimiento bacteriano fue cuantificado mediante el recuento de UFC en placas de las diluciones  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ . procedimiento empleado para calcular la MOI (multiplicidad de infección) (MOI= Número UFP/ Número UFC de *P. aeruginosa*).
- En un tubo de 15 mL fueron colocados 2 mL del cultivo bacteriano y 0.1 mL de una suspensión de bacteriófagos ( $1 \times 10^9$  UFP/mL). La mezcla fue homogeneizada mediante vortex y mantenida en reposo durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Un volumen de 0.1 mL de la mezcla anterior fue diluido en 9.9 mL de TSB. Luego de mezclar mediante vortex se tomó 0.1 mL y fue diluido en 9.9 mL de TSB. Esta última dilución fue incubada a 35 - 37 °C tomando previamente un volumen de 100  $\mu$ L para cuantificar el número inicial de bacteriófagos al tiempo cero ( $t_0$ ).
- A intervalos regulares (5 minutos) se cuantificaron los bacteriófagos presentes en la suspensión mediante el método de la doble capa de agar, realizado por



duplicado. Los conteos se realizaron en las placas que contenían entre 30 a 300 UFP.

### **5.2.2.3 Microscopía electrónica**

La morfología de los bacteriófagos fue examinada mediante microscopia electrónica empleando el método de tinción negativa, para lo que se tomó una rejilla de cobre revestida por Formvar, y se añadió a su superficie 10 µL de una solución del bacteriófago ( $10^{10}$  UFP/mL) y se dejó fijar por 15 minutos. posteriormente esta fue teñida con acetato de uranilo al 2% por 15 minutos. se removi6 el excedente para observar la muestra en el microscopio de transmisión (TEM) JEOL JEM-1400Plus a 110 kV con una ampliación de 120 000 X. los bacteriófagos fueron clasificados de acuerdo a las directrices del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) (Lefkowitz *et al.*, 2016).

Este trabajo fue realizado en el Instituto Carlos Chagas Fiocruz – Paraná – Brasil.

### **5.2.2.4. Análisis estadístico**

Se empleó la prueba de hipótesis para evaluar la asociación entre las diferentes características evaluadas en los aislamientos de *P. aeruginosa* así como la asociación de estas características con la resistencia a los bacteriófagos aislados. Se consideró como significativo un  $p < 0,05$  para confirmar la hipótesis.

## VI. RESULTADOS

### 6.1 *Pseudomonas aeruginosa*

#### 6.1.1 Aislamiento de *P. aeruginosa* a partir de muestras clínicas

Entre enero y febrero del 2018, se obtuvieron 42 aislamientos de *P. aeruginosa*, 18 provenientes de una clínica privada (PAE 1- 19), el aislamiento PAE 4 se eliminó del estudio al no ser confirmada como *P. aeruginosa*, y 24 de un Hospital Nacional de Nivel III de la ciudad de Lima (PAE 20 – 43) (Tabla1).

#### 6.1.2 Caracterización de aislamientos

##### 6.1.2.1 Sensibilidad a antibióticos

Se obtuvieron niveles de resistencia de los 42 aislamientos de *P. aeruginosa* para 6 grupos de antibióticos distintos (Tabla 2). De estos, 16 (38%) fueron considerados resistentes, 7 (16,6 %) multirresistentes, 18 (42,8 %) extremadamente resistentes y 1 (2,3%) panresistentes (Tabla1). La prueba de hipótesis determinó una asociación entre la procedencia de los aislamientos y la clasificación de la resistencia ( $p=0,012$ ), siendo los aislamientos de la clínica privada en mayoría MDR mientras que los aislamientos del Hospital Nacional de Nivel III en su mayoría fueron considerados como XDR (Tabla 3).

**Tabla 1. Características de los aislamientos de *P. aeruginosa*. Cuadro integrativo de las características (Procedencia, perfil de resistencia, producción de biopelícula y detección de profagos) de los 42 aislamientos de *P. aeruginosa*.**

CEPA	PROCEDENCIA	CLASIFICACIÓN DE RESISTENCIA	PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULA	DETECCIÓN DE PROFAGOS
PAE 1	CLINICA PRIVADA	Resistente	Débil-ninguna	No se detecto profagos
PAE 2	CLINICA PRIVADA	Resistente	Moderada	No se detecto profagos
PAE 3	CLINICA PRIVADA	XDR	Fuerte	No se detecto profagos
PAE 5	CLINICA PRIVADA	MDR	Débil-ninguna	No se detecto profagos
PAE 6	CLINICA PRIVADA	MDR	Fuerte	No se detecto profagos
PAE 7	CLINICA PRIVADA	MDR	Fuerte	No se detecto profagos
PAE 8	CLINICA PRIVADA	XDR	Moderada	No se detecto profagos
PAE 9	CLINICA PRIVADA	Resistente	Débil-ninguna	No se detecto profagos
PAE 10	CLINICA PRIVADA	XDR	Fuerte	No se detecto profagos
PAE 11	CLINICA PRIVADA	Resistente	Moderada	No se detecto profagos
PAE 12	CLINICA PRIVADA	Resistente	Fuerte	No se detecto profagos
PAE 13	CLINICA PRIVADA	PDR	Moderada	No se detecto profagos
PAE 14	CLINICA PRIVADA	MDR	Debil-ninguna	No se detecto profagos
PAE 15	CLINICA PRIVADA	Resistente	Moderada	No se detecto profagos
PAE 16	CLINICA PRIVADA	MDR	Moderada	No se detecto profagos
PAE 17	CLINICA PRIVADA	XDR	Fuerte	No se detecto profagos
PAE 18	CLINICA PRIVADA	MDR	Débil-ninguna	No se detecto profagos
PAE 19	CLINICA PRIVADA	Resistente	Fuerte	No se detecto profagos
PAE 20	HOSPITAL NACIONAL DE NIVEL III	Resistente	Moderada	Presencia de profago inducible
PAE 21	HOSPITAL NACIONAL DE NIVEL III	MDR	Fuerte	Presencia de profago espontáneo
PAE 22	HOSPITAL NACIONAL DE NIVEL III	XDR	Fuerte	No se detecto profagos
PAE 23	HOSPITAL NACIONAL DE NIVEL III	XDR	Fuerte	Presencia de profago inducible
PAE 24	HOSPITAL NACIONAL DE NIVEL III	Resistente	Fuerte	No se detecto profagos
PAE 25	HOSPITAL NACIONAL DE NIVEL III	XDR	Moderada	No se detecto profagos
PAE 26	HOSPITAL NACIONAL DE NIVEL III	Resistente	Moderada	Presencia de profago inducible
PAE 27	HOSPITAL NACIONAL DE NIVEL III	XDR	Moderada	Presencia de profago espontáneo
PAE 28	HOSPITAL NACIONAL DE NIVEL III	XDR	Moderada	Presencia de profago espontáneo
PAE 29	HOSPITAL NACIONAL DE NIVEL III	Resistente	Débil-ninguna	No se detecto profagos
PAE 30	HOSPITAL NACIONAL DE NIVEL III	Resistente	Débil-ninguna	No se detecto profagos
PAE 31	HOSPITAL NACIONAL DE NIVEL III	XDR	Fuerte	No se detecto profagos
PAE 32	HOSPITAL NACIONAL DE NIVEL III	XDR	Moderada	Presencia de profago inducible
PAE 33	HOSPITAL NACIONAL DE NIVEL III	XDR	Moderada	Presencia de profago inducible
PAE 34	HOSPITAL NACIONAL DE NIVEL III	Resistente	Moderada	Presencia de profago espontáneo
PAE 35	HOSPITAL NACIONAL DE NIVEL III	XDR	Débil-ninguna	Presencia de profago inducible
PAE 36	HOSPITAL NACIONAL DE NIVEL III	XDR	Moderada	Presencia de profago inducible
PAE 37	HOSPITAL NACIONAL DE NIVEL III	Resistente	Moderada	Presencia de profago espontáneo
PAE 38	HOSPITAL NACIONAL DE NIVEL III	XDR	Moderada	Presencia de profago espontáneo
PAE 39	HOSPITAL NACIONAL DE NIVEL III	XDR	Fuerte	No se detecto profagos
PAE 40	HOSPITAL NACIONAL DE NIVEL III	XDR	Fuerte	Presencia de profago espontáneo
PAE 41	HOSPITAL NACIONAL DE NIVEL III	Resistente	Fuerte	No se detecto profagos
PAE 42	HOSPITAL NACIONAL DE NIVEL III	Resistente	Fuerte	Presencia de profago inducible
PAE 43	HOSPITAL NACIONAL DE NIVEL III	XDR	Moderada	No se detecto profagos

**Tabla 2. Perfiles de sensibilidad a los antibióticos de los aislamientos de *P. aeruginosa*. Perfiles de sensibilidad de las 42 cepas aisladas en el estudio frente a diferentes antibióticos**

ANTIBIÓTICOS	POLIMIXIAS		CARBAPENEMS		CEFALOSPORINAS		PENICILINAS + INHIBIDOR DE B-LACTAMASAS		FLUOROQUOLONAS		AMINOGLICÓSIDOS	
	COLISTINA	MEROPENEM	IMPENEM	CEFEPIME	CEFTAZIDIME	PIPERACILINA/TAZOBACTAM	CIPROFLOXACINA	AMIKACINA	GENTAMICINA			
CEPAS												
PAE 1	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
PAE 2	S	R	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S
PAE 3	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
PAE 5	S	S	R	S	S	I	S	I	S	S	S	S
PAE 6	S	I	S	R	I	R	R	S	S	S	S	S
PAE 7	S	I	S	R	I	R	R	S	S	S	S	S
PAE 8	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
PAE 9	S	R	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S
PAE 10	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
PAE 11	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	S	S
PAE 12	S	S	S	I	I	R	R	S	S	S	S	S
PAE 13	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
PAE 14	S	S	I	S	R	R	R	S	S	S	S	S
PAE 15	S	R	R	S	S	I	R	S	S	S	S	S
PAE 16	S	S	I	S	I	R	R	S	S	S	S	S
PAE 17	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
PAE 18	S	I	I	I	I	I	I	S	S	S	S	S
PAE 19	S	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
PAE 20	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PAE 21	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
PAE 22	S	R	R	R	R	I	S	S	S	S	S	S
PAE 23	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R
PAE 24	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
PAE 25	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
PAE 26	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PAE 27	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
PAE 28	S	I	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
PAE 29	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PAE 30	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
PAE 31	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R
PAE 32	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R
PAE 33	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R
PAE 34	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R
PAE 35	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
PAE 36	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PAE 37	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
PAE 38	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
PAE 39	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
PAE 40	S	R	R	R	S	I	I	I	R	R	R	R
PAE 41	S	R	R	R	R	I	I	I	S	S	S	S
PAE 42	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
PAE 43	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R

**Tabla 3. Procedencia del aislamiento y su asociación con la clasificación de la resistencia.** Prueba de hipótesis para determinar la asociación entre la procedencia del aislamiento y clasificación de la resistencia (n=42)

	Procedencia		Valor de p
	Clínica Privada	Hospital Nacional de Nivel III	
<b>Clasificación de Resistencia</b>			0.012
Resistente	7 (43.8)	9 (56.2)	
MDR	6 (85.7)	1 (14.3)	
XDR	4 (22.2)	14 (77.8)	
PDR	1 (100.0)	0 (0.0)	

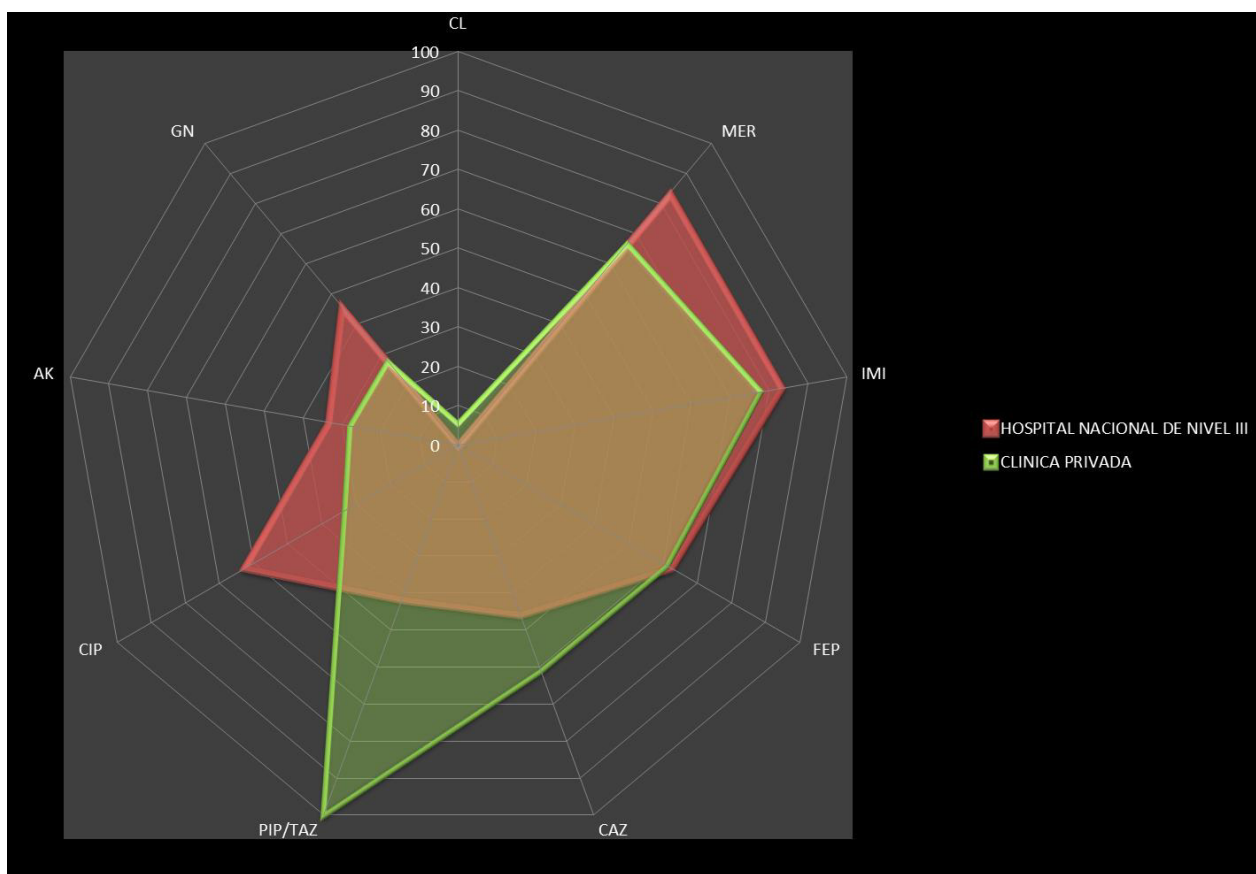
Nota: Porcentajes mostrados en columna

A fin de realizar una mejor comparación con otros estudios se determinó las tasas de no susceptibilidad (suma de porcentajes de aislamientos Resistentes e Intermedios) de estos aislamientos. Obteniéndose para el Hospital Nacional de Nivel III, tasas de No susceptibilidad del 83% para meropenem, 83% para imipenem, 62,5% para cefepime, 45,8% para ceftazidime, 41,6% para piperacina tazobactam, 62,5 % para ciprofloxacina , 33,3% para amikacina, 45,8 % para gentamicina y 0% para colistina, la no susceptibilidad para los aislamientos de la clínica privada fueron del 66,6 % para meropenem , 77,7% para imipenem, 61,1% para cefepime, 61,1% para ceftazidime, 100% para piperacina/tazobactam, 28% para ciprofloxacina, 28% para amikacina y gentamicina y, 5,5% para colistina (Figura 4).

### 6.1.2.2 Producción de biopelícula

Dieciséis (38%) de los aislados fueron caracterizados como fuertes productores de biopelícula, 18 (43%) como productores medios, mientras que 8 (19%) fueron caracterizados como productores débiles o no productores, además se observaron

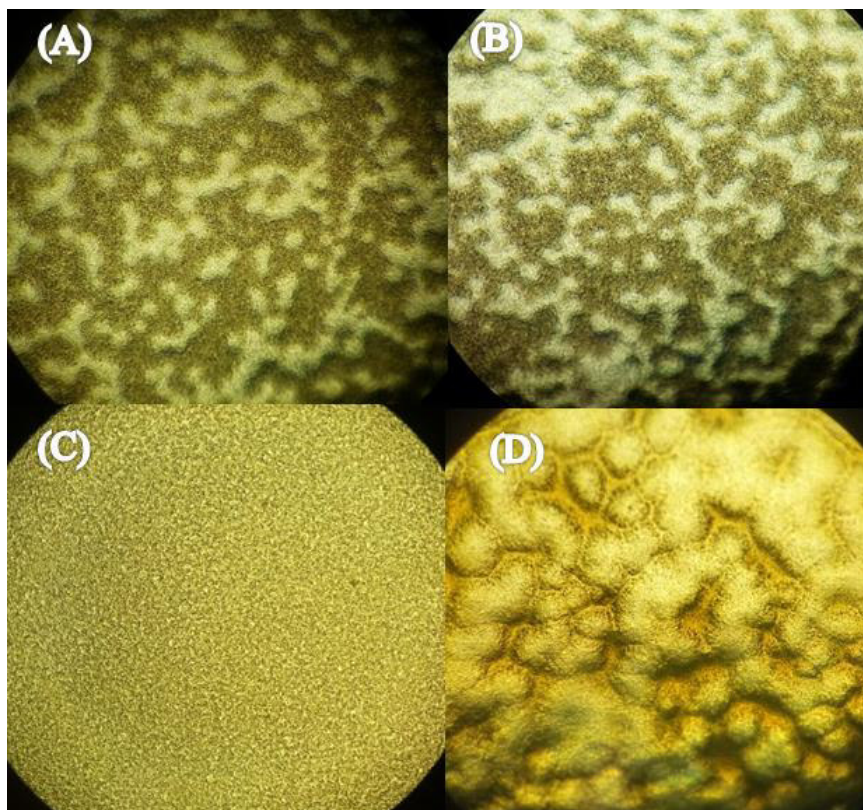
diferencias relevantes entre ambos centros de salud con respecto a la producción de biopelícula de sus aislados (Tabla1). El análisis estadístico no mostró asociación entre esta característica con otras características de los aislamientos evaluados en el presente estudio (procedencia, clasificación de resistencia, detección de profagos y resistencia a bacteriófagos).



**Figura 4. Niveles de No sensibilidad en *P. aeruginosa* 2 centros de salud.** Cuadro comparativo de niveles de No sensibilidad total a antibióticos entre los aislados del Hospital Nacional de Nivel III y la clínica privada. AK: amikacina GN: gentamicina CL: colistina MER: meropene IMI: imipenem FEP: cefepime CIP: ciprofloxacina PIP/TAZ: Piperacillina/tazobactam CAZ: ceftazidima

### 6.1.2.3 Detección de profagos

La inducción de profagos por mitomicina C detectó 15 aislamientos con profagos (35,7%), estos en su totalidad provenían del Hospital Nacional de Nivel III, representando el 62,5% de los aislamientos de dicho hospital (Tabla 1). De estos, 7 fueron considerados profagos espontáneos y 8 profagos inducibles representando 16,6 % y 19 % del total de aislamientos respectivamente (Figura 5). La prueba de hipótesis realizada para determinar la asociación entre la procedencia del aislamiento y la detección de profagos confirmó esta relación siendo los aislamientos con profagos más prevalentes entre los aislamientos del III. ( $p < 0,001$ ) (Tabla 4).



**Figura 5. Inducción de profagos por mitomicina C.** Resultados de la inducción de profagos observados a 40x (A) PAE 27 se observan pequeñas placas de lisis en la placa control(sin mitomicina); (B) PAE 27 se observan placas de lisis en la que placa experimental (con mitomicina C), **Resultado PAE 27: Profago espontáneo**; (C) PAE 23 placa control no presenta placas de lisis; (D) PAE 23 placa experimental se observan pequeñas placas de lisis. **Resultado PAE 23: Profago Inducible**

**Tabla 4. Procedencia del aislamiento y su asociación con la producción de profagos.**

Prueba de hipótesis para determinar la asociación entre la Procedencia del aislamiento y la detección de profagos (n=42)

	Procedencia		Valor de p
	Clínica Privada	Hospital Nacional de Nivel III	
<b>Detección de Profagos</b>			< 0.001
Negativo	18 (66.7)	9 (33.3)	
Inducible	0 (0.0)	8 (100.0)	
Espontáneo	0 (0.0)	7 (100.0)	

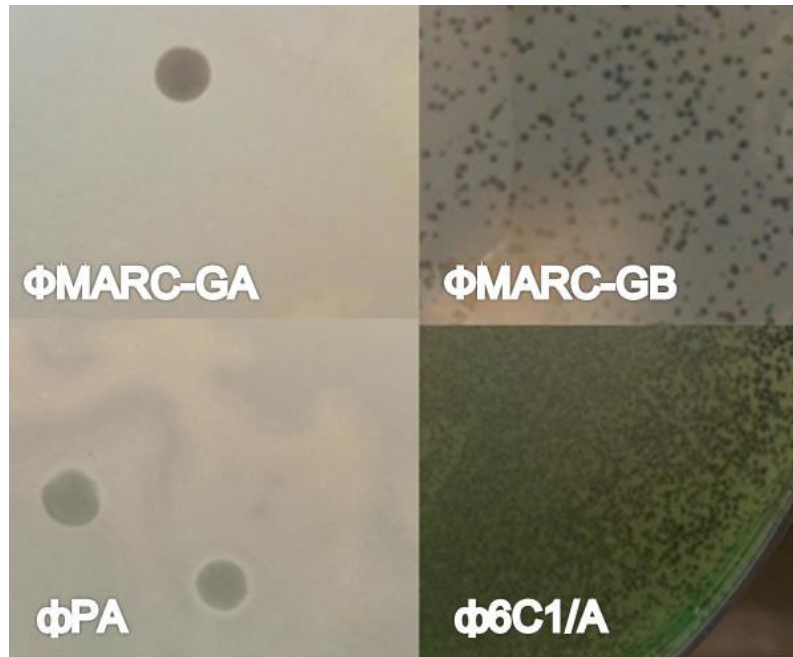
Nota: Porcentajes mostrados en columna

## 6.2 Bacteriófago

### 6.2.1 Aislamiento de bacteriófagos

Se aislaron y purificaron 9 bacteriófagos; 5 a partir de efluentes hospitalarios que fueron denominados  $\Phi$ MARC-GA,  $\Phi$ MARC-GB,  $\Phi$ 6C1/A,  $\Phi$ PA, y  $\Phi$ OA y 4 a partir de muestras del río Lurín que fueron denominados  $\Phi$ MX12,  $\Phi$ MX14,  $\Phi$ MX10 y  $\Phi$ MX5; estos bacteriófagos fueron aislados utilizando la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 con excepción del bacteriófago  $\Phi$ 6C1/A que para su aislamiento se empleó como hospedero el aislamiento salvaje PAE 10 (Figura 6). Estos bacteriófagos presentaron diferentes tipos de morfología (tamaño y aspecto) los cuales se explican a detalle en la Tabla 5.





**Figura 6 Placas de Lisis de bacteriófagos nativos.**  
Placas de lisis de los bacteriófagos  $\phi$ MARC-GA,  $\phi$ MARC-GB,  $\phi$ PA,  $\phi$ 6C1/A aislados de efluentes hospitalarios.

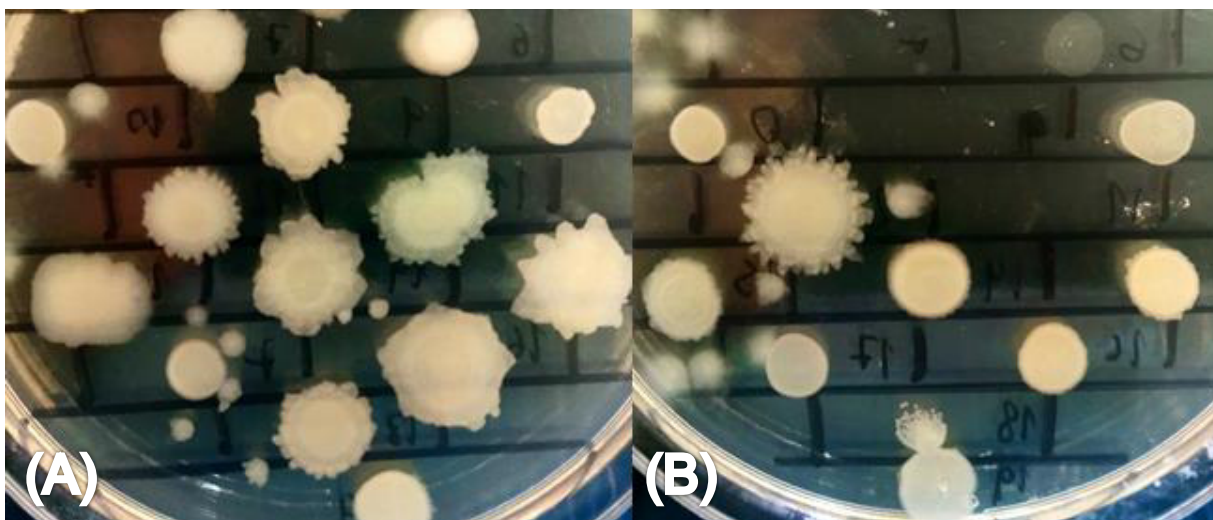
**Tabla 5. Características principales de los bacteriófagos de *P. aeruginosa* aislados y su evaluación de rango de hospedero.** Cuadro integrativo de las características (fuente, tamaño de placa, características de placa, rango de hospedero) de los 9 fagos nativos aislados en el presente estudio. (+:positivo;-:negativo; NSR: no se realizó)

BACTERIÓFAGOS									
CODIGO	ΦMARC-GA	ΦMARC-GB	Φ6C1/A	ΦPA	ΦOA	ΦMX12	ΦMX14	ΦMX10	ΦMX5
FUENTE	Efluente hospitalario	Efluente hospitalario	Efluente hospitalario	Efluente hospitalario	Efluente hospitalario	Rio Lurín - Lima	Rio Lurín - Lima	Rio Lurín - Lima	Rio Lurín - Lima
TAMAÑO	4 mm	1mm	0,5mm	4 mm	4 mm	4 mm	3mm	3mm	3mm
CARACTERÍSTICAS	Centro claro	centro claro/borde turbio	centro claro/borde turbio	Centro claro	Centro claro	Centro claro	Centro claro	Centro claro	Centro claro
RANGO DE HOSPEDERO (BACTERIOPHAGE AGAR)									
PAE 1	-	-	-	-	-	+	-	-	-
PAE 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE 5	+	-	-	+	+	+	+	+	-
PAE 6	+	-	-	+	+	+	-	+	-
PAE 7	+	-	-	+	+	+	-	+	+
PAE 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE 9	+	+	-	-	-	-	-	-	-
PAE 10	-	-	+	-	-	-	-	-	-
PAE 11	+	+	-	+	+	-	-	-	-
PAE 12	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PAE 13	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PAE 14	-	-	-	-	-	+	-	-	-
PAE 15	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PAE 16	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PAE 17	-	-	+	-	-	-	-	-	-
PAE 18	+	-	-	+	+	-	-	-	-
PAE 19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE 20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE 21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE 22	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE 23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE 24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE 25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE 26	-	-	+	-	-	-	-	-	-
PAE 27	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE 28	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE 29	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE 30	+	-	+	-	-	-	-	-	-
PAE 31	-	-	+	-	-	-	-	-	-
PAE 32	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE 33	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE 34	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE 35	-	-	+	-	-	-	-	-	-
PAE 36	-	-	+	-	-	-	-	-	-
PAE 37	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE 38	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE 39	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE 40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE 41	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE 42	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE 43	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P. aeruginosa 27853	+	+	-	+	+	+	+	+	+
E.coli 25922	-	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR
K. pneumoniae 700603	-	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR
E. faecium 29212	-	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR
E. Gallinarum 45973	-	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR
S. Tiphys 14028	-	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR
S. Enteritidis 13076	-	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR
St. Aureus 25923	-	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR

## 6.2.2 Caracterización de bacteriófagos

### 6.2.2.1 Rango de hospedero

De los bacteriófagos aislados de efluente hospitalario: el fago  $\Phi$ MARC-GA logró infectar a 7 aislamientos; el fago  $\Phi$ MARC-GB logró infectar a 6 aislamientos, todos de la clínica privada; el fago  $\Phi$ 6C1/A logró infectar a 7 aislamientos; los fagos  $\Phi$ PA y  $\Phi$ OA presentaron perfiles similares infectando ambos a 7 aislamientos, todos de la clínica privada. Los bacteriófagos aislados de agua de río únicamente lograron infectar a varios aislamientos de la clínica privada: el fago  $\Phi$ MX-12 logró infectar a 5 aislamientos, el fago  $\Phi$ MX-14 logró infectar a 1 aislamiento, el fago  $\Phi$ MX-5 logró infectar a 1 aislamiento y finalmente el fago  $\Phi$ MX-10 logró infectar a 3 aislamientos (Figura 7; Tabla 5). El análisis estadístico demostró asociación entre resistencia a fagos y la procedencia de los aislamientos resistentes, siendo los aislamientos más resistentes a la mayoría de nuestros fagos los provenientes del Hospital Nacional de Nivel III ( $p < 0,05$ ) (Tabla 6), así también se determinó la asociación entre resistencia a fagos y la clasificación de resistencia antimicrobiana siendo los aislamientos MDR más sensibles a la infección por bacteriófagos ( $p < 0,05$ ) (Tabla 7). No se encontró una asociación entre la producción de biopelícula y la resistencia a los bacteriófagos aislados.



**Figura 7 Rango de hospedero mediante la metodología “bacteriophage agar”.** Resultados de la determinación del rango de hospedero del bacteriófago  $\Phi$ MARC-GA (A) placa control presenta el crecimiento normal de los aislamientos (B) placa experimental (suplementada con el bacteriófago  $\Phi$ MARC-GA) presenta la inhibición del crecimiento de los aislamientos sensibles al bacteriófago  $\Phi$ MARC-GA.

**Tabla 6. Procedencia del aislamiento y su asociación con la resistencia a fagos.**

Prueba de hipótesis para determinar la asociación entre resistencia a fagos y la procedencia del aislamiento (n=42)

	Clinica Privada (n=18)	Hospital Nacional de Nivel III (n=24)	valor de p
	n (%)	n (%)	
$\Phi$ MARC-GA	12 (66.7)	23 (95.8)	0.031
$\phi$ MARC-GB	12 (66.7)	24 (100.0)	0.004
$\phi$ 6C1/A	16 (88.9)	19 (79.2)	0.679
$\phi$ PA	13 (72.2)	24 (100.0)	0.010
$\phi$ OA	13 (72.2)	24 (100.0)	0.010
$\Phi$ MX12	13 (72.2)	24 (100.0)	0.010
$\Phi$ MX14	17 (94.4)	24 (100.0)	0.429
$\Phi$ MX10	15 (83.3)	24 (100.0)	0.071
$\phi$ MX5	17 (94.4)	24 (100.0)	0.429

Nota: Porcentajes mostrados en columna

**Tabla 7. Clasificación de resistencia y su asociación con la resistencia a fagos.**

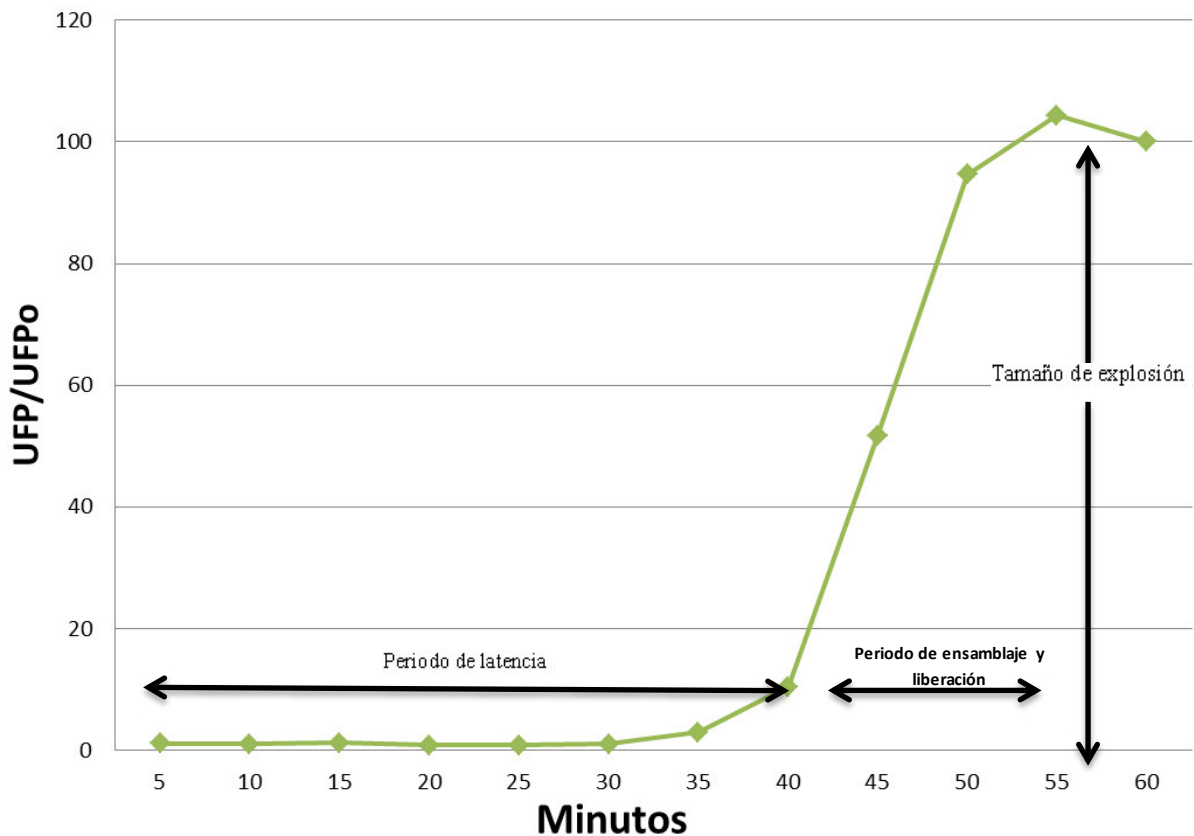
Prueba de hipótesis para determinar la asociación entre Resistencia a fagos y la clasificación de resistencia antimicrobiana (n=42)

	Resistente (n=16)	MDR (n=7)	XDR (n=18)	PDR (n=1)	valor de p
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
ΦMARC-GA	13 (81.3)	3 (42.9)	18 (100.0)	1 (100.0)	0.004
φMARC-GB	12 (75.0)	6 (85.7)	18 (100.0)	0 (0.0)	0.017
φ6C1/A	14 (87.5)	7 (100.0)	13 (72.2)	1 (100.0)	0.452
φPA	15 (93.8)	3 (42.9)	18 (100.0)	1 (100.0)	0.001
φOA	15 (93.8)	3 (42.9)	18 (100.0)	1 (100.0)	0.001
ΦMX12	15 (93.8)	3 (42.9)	18 (100.0)	1 (100.0)	0.001
ΦMX14	16 (100.0)	6 (85.7)	18 (100.0)	1 (100.0)	0.190
ΦMX10	16 (100.0)	4 (57.1)	18 (100.0)	1 (100.0)	0.005
φMX5	16 (100.0)	6 (85.7)	18 (100.0)	1 (100.0)	0.190

Nota: Porcentajes mostrados en columna

### 6.2.2.2 Curva de crecimiento de “un solo paso” (“One-step growth curve”)

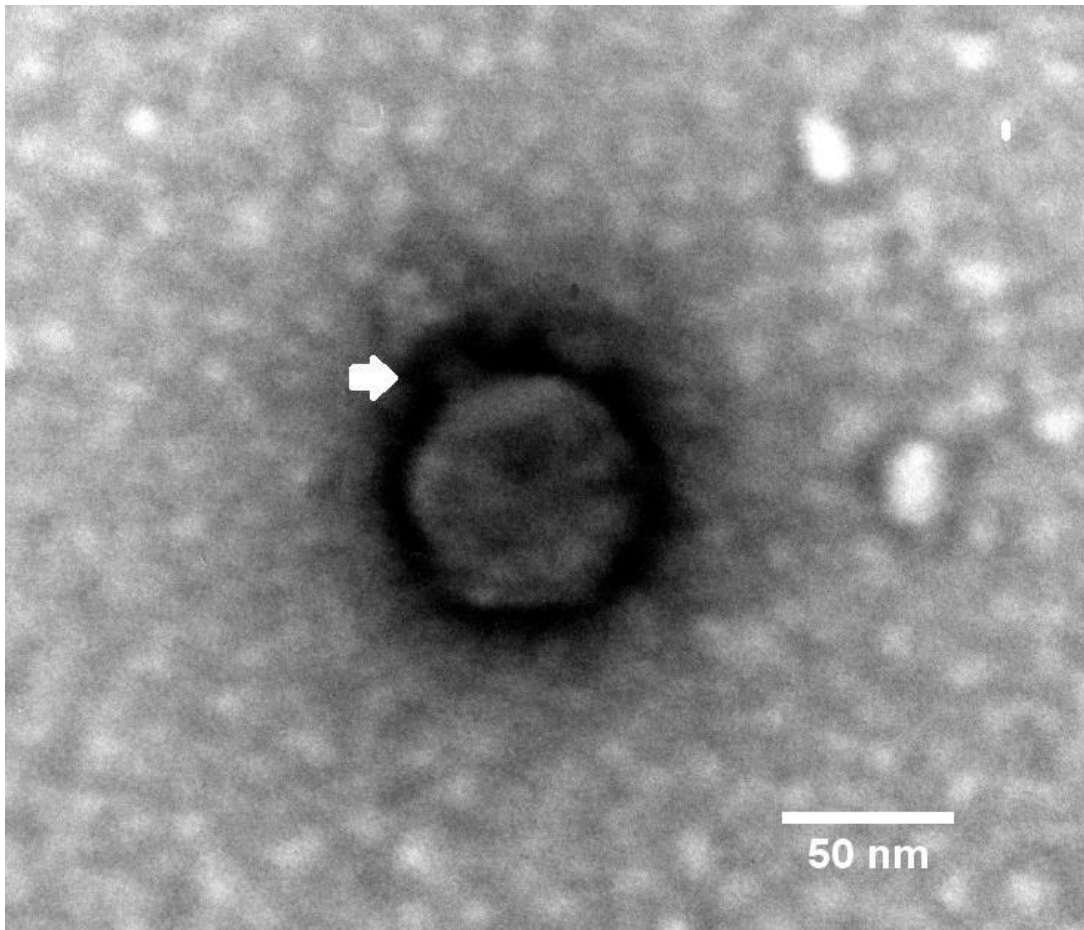
La curva de un solo paso del fago  $\Phi$ MARC-GA empleando a *P. aeruginosa* ATCC 27853 como hospedero, con una MOI (multiplicidad de infección) de 0,05. Se observa en la Figura 8, que el fago nativo  $\Phi$ MARC-GA presentó un periodo de latencia de aproximadamente 40 minutos y el tiempo en que dicho fago libera su progenie (explosión o *burst*) se dio a los 50 minutos con una liberación promedio de 100 bacteriófagos por bacteria infectada, el periodo de ensamblaje y liberación tomó 15 minutos, comenzando en el minuto 40 y concluyendo en el minuto 55.



**Figura 8. Curva de multiplicación de “un solo paso”.** Curva de crecimiento de un paso del bacteriófago  $\Phi$ MARC-GA en la cepa hospedera *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, se observa el número de bacteriófagos producidos por tiempo.

### 6.2.2.3 Microscopía electrónica

En la micrografía del bacteriófago  $\Phi$ MARC-GA, se observa que éste presenta cabeza con morfología icosaédrica con un diámetro 69,22 nm, posee una cola corta no flexible con un tamaño de 11,38 x 9 nm. Siguiendo las directrices para la clasificación viral de la de la ICTV en el 2016 (Lefkowitz *et al.*, 2016), se determinó que la morfología de la ultraestructura del bacteriófago en cuestión correspondía al morfotipo C1 de la Familia *Podoviridae*, Orden *Caudovirales*, cuyas características principales son presentar una cápside icosaédrica y una cola corta como se puede observar en la Figura 9.



**Figura 9. Micrografía electrónica del bacteriófago  $\Phi$ MARC-GA.** Tinción negativa, utilizando acetato de uranilo al 2%. Escala de 50 nm con magnitud de aumento de 120 000X (la flecha blanca señala la cola)

## VII. DISCUSIÓN

En la actualidad *Pseudomonas aeruginosa* es uno de los patógenos de mayor importancia clínica debido a su versatilidad para desarrollar resistencia a los antimicrobianos por diferentes mecanismos moleculares los cuales realizan sinergia lo que conduce al fenómeno de multirresistencia. En este estudio los porcentajes de no susceptibilidad de los aislamientos de *P. aeruginosa* fueron elevados, pero más aún los aislamientos procedentes del Hospital Nacional de Nivel III presentaron niveles más elevados de no susceptibilidad en la mayoría de antibióticos betalactámicos con la excepción de piperacilina/tazobactam, este patrón se repitió con aminoglicósidos y fluoroquinolonas, es importante mencionar que para colistina, señalado actualmente como antibiótico de último recurso para infecciones por bacterias multidrogo-resistentes, se obtuvo una no sensibilidad del 1% sin embargo, considerando que en la actualidad existe un debate sobre las metodologías de evaluación de su sensibilidad, y la mayoría de sistemas automatizados como la plataforma Vitek (empleada en este estudio) han sido objetadas. Consideramos esta una limitación del estudio, pudiendo haberse generado resultados falsos negativos que podrían haber subestimado el porcentaje mencionado (Mayers *et al.*, 2017). Comparando los porcentajes de no susceptibilidad de los aislamientos obtenidos en este estudio con los niveles de no susceptibilidad obtenidos en Argentina según el reporte de vigilancia realizado por el Instituto Carlos Malbrán en el año 2016 (INEI-ANLIS), se encuentran diferencias importantes, así para los antibióticos betalactámicos se presentaron tasas de no susceptibilidad cercanas al 20%, siendo significativamente inferiores a los porcentajes de resistencia de los aislamientos obtenidos en este estudio para betalactámicos y otros antibióticos, (SIREVA, 2016), algo muy similar ocurre al comparar los porcentajes de no susceptibilidad de nuestro estudio con los obtenidos de la vigilancia nacional de resistencia a antimicrobianos en Bogotá - Colombia



realizada el 2014 (Ovalle, *et al.*, 2017), siendo nuestros niveles de no susceptibilidad muy superiores, tanto para aislamientos de unidades de cuidados intensivos y de otras áreas de hospitalización. En Perú, el último informe de resistencia antimicrobiana en bacterias de origen hospitalario realizado por el Instituto Nacional de Salud (INS) en el año 2012 nos revela índices de no susceptibilidad en *P. aeruginosa* muy parecidos a los obtenidos en los aislamientos procedentes del Hospital Nacional de Nivel III, con la diferencia que los niveles de no susceptibilidad, a carbapenems y cefepime, de nuestros aislamientos, fueron mucho más elevados; para los aminoglicósidos los niveles fueron bajos. De otro lado los aislamientos de la clínica privada mostraron niveles cercanos a los presentados por el estudio del INS, para todos los betalactámicos con excepción de piperacilina/tazobactam donde los porcentajes de no susceptibilidad fueron mucho más altos a lo descrito por el INS (INS, 2012). La mayoría de aislamientos presentaron diferentes perfiles de resistencia: MDR, XDR e inclusive un aislamiento PDR, además la estadística inferencial empleada determinó que existe una relación entre las clasificaciones de resistencia previamente mencionada y la procedencia de los aislamientos, encontrándose más aislados MDR en los procedentes de clínica privada, mientras que predominaron los XDR en los aislamientos del Hospital Nacional de Nivel III.

Para la determinación de la producción de biopelícula empleamos el método del tubo descrito por Christensen *et al.* (1982) que si bien no es descrito como el “*gold standard*” posee una sensibilidad del 84.3%, una especificidad del 58.6% y una exactitud del 75% como según lo reportado por Shivani *et al.*, (2014) trabajando con *P. aeruginosa*, parámetros bastante aceptables para detectar la producción de este mecanismo de resistencia. Se encontró un 38% de aislados caracterizados como fuertes productores de biopelícula, porcentaje elevado en comparación a otros estudios que obtuvieron entre un 10 y 20% (Shivani *et al.* 2014; Costa *et al.*, 2017), más aún si consideramos que tales

estudios evaluaron aislamientos provenientes de vías respiratorias, en donde se ha descrito que la producción de biopelícula es elevada. Como fue mencionado previamente no se encontró relación estadística significativa entre la producción de biopelícula y los perfiles de susceptibilidad de los aislamientos en estado planctónico (Costa *et al.*, 2018).

Se determinó 1 µg/mL como la concentración óptima de mitomicina C a emplear, debido a que concentraciones elevadas de mitomicina C pueden llevar a la inhibición total del crecimiento del aislamiento a evaluar, por otro lado concentraciones bajas ocasionan que el mutágeno no tenga efecto alguno. Casualmente la concentración obtenida coincide con la recomendación de Clokie y Kropinski (2008), empleada para inducción de profagos de *Lactobacillus*. Si bien, para la detección de profagos, se han descrito diferentes metodologías e inductores, es importante considerar que la inducción de la lisis de los profagos no siempre permite detectar todos los bacteriófagos funcionales más aun se ha demostrado que no son útiles para la detección de profagos defectuosos (Borysowsky *et al.*, 2014). La presencia de profagos en bacterias patógenas, está asociada a diferentes beneficios como el transporte genético horizontal, recursos de variación genética y ventajas de competición bacteriana, como se menciona en varios trabajos previos (Davies *et al.*, 2016; James *et al.*, 2012). Por otro lado, estos profagos suelen contener genes que confieren al hospedero resistencia a la superinfección por otros fagos, como los que son empleados en fagoterapia pudiendo presentar un inconveniente para su empleo (Samson *et al.*, 2013).

El análisis estadístico permitió evidenciar una relación significativa entre la procedencia de los aislamientos y la detección de profagos (Tabla 5), siendo los aislamientos del Hospital Nacional de Nivel III los que presentaron más profagos inducibles y espontáneos, lo que permite plantear que los aislados de este centro de salud presentarían características diferentes respecto a su diversidad genética y aptitud

que los aislamientos de la clínica privada. Las cepas epidémicas de Liverpool (LES) componen un grupo específico determinado por análisis de macro restricción caracterizadas principalmente por estar asociadas a niveles altos de resistencia a los antibióticos, causar superinfección en pacientes previamente infectados, con una cepa distinta, y generalmente estar asociadas a un mal pronóstico para el paciente (Jeukens *et al.*, 2013), estas tienen la particularidad de presentar tanto bacteriófagos inducibles como espontáneos, los cuales les brindan diferentes características como la capacidad de superinfección con respecto a otras cepas de *P. aeruginosa*, así como diversos factores de virulencia (Davies, 2015); características que nos permiten proponer una similitud al menos fenotípica con los aislamientos del Hospital Nacional de Nivel III. Si bien según el método de inducción se observaron 2 tipos de profagos: inducibles y espontáneos (según la nominación de Lwoff en 1962) En el caso de estas no se encontró relación estadística entre la ausencia o presencia de bacteriófagos (inducibles y espontáneos) con la producción de biopelícula, lo cual coincide con lo descrito por Nanda (2015); Así también, en nuestros aislados no se encontró una relación significativa entre la resistencia antimicrobiana y la presencia de profagos, esto puede ser atribuido a que una de las maneras de obtener resistencia a diferentes antibióticos, es el resultado de la mutación, como es conocido en patógenos como *P. aeruginosa*, lo cual se ve reflejado en las cepas LES cuyas altas tasas de resistencia están asociadas a mutaciones puntuales en la expresión de bombas de eflujo (Salunkhe *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos nos permiten evidenciar los elevados niveles de resistencia a antimicrobianos en nuestro medio y una gran diversidad fenotípica de los aislamientos de *P. aeruginosa* de dos establecimientos de salud de la ciudad de Lima lo cual refleja el grave problema de la resistencia a antibióticos en el Perú, sus consecuencias son severas para el sistema de salud pues limitan las opciones terapéuticas, obligando a los clínicos a

emplear estrategias de tratamiento más costosas y agresivas, como lo es el tratamiento prolongado y continuo con betalactámicos o el empleo de polimixinas a pesar de su elevada toxicidad (Mayers *et al.*, 2017). Frente a este problema es necesario el empleo de políticas de control, las cuales deben ir de la mano con el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para asegurar su efectividad. En la actualidad los bacteriófagos se muestran como una alternativa terapéutica que puede surgir como remplazo o complemento a los antibióticos, sin embargo todavía se requiere dilucidar muchos aspectos relacionados a su empleo, por lo que se hace necesario realizar estudios a nivel microbiológico, molecular y clínico. En este contexto se realizó el presente estudio aislándose nueve bacteriófagos líticos capaces de infectar a aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* con el fin de emplearlos en fagoterapia de infecciones causadas por este patógeno.

La especificidad de los bacteriófagos es casi tan diversa como los bacteriófagos mismos, inclusive ello es considerado como una desventaja frente a los antimicrobianos convencionales ya que estos últimos pueden ser empleados en tratamientos empíricos debido a su amplio rango de acción, por ello se recomienda la identificación de bacteriófagos que tengan actividad lítica frente a diferentes clonas de una especie bacteriana, razón por la cual en el presente estudio se evaluaron diversos bacteriófagos buscando su actividad frente a ambas poblaciones de *P. aeruginosa*. Los nueve bacteriófagos aislados fueron efectivos frente a 19 aislamientos del germen de estudio (45% del total de aislados) encontrándose una relación estadísticamente significativa entre la resistencia a los bacteriófagos evaluados y la procedencia de los aislamientos siendo los aislados de la clínica privada la población más susceptible (Tabla 6), (78 % de aquella población), resultados muy parecidos a los que obtuvieron Latz *et al.* (2017) quienes lograron abarcar un espectro del 79% de aislamientos multirresistentes a

antibióticos, que resultaron sensibles a sus bacteriófagos aislados. Los aislamientos del Hospital Nacional de Nivel III demostraron ser los más resistentes a los bacteriófagos. Los aislamientos bacterianos resistentes a los bacteriófagos aislados presentaron diferentes perfiles de producción de biopelícula, no encontrándose relación estadística entre estas dos variables, por otro lado la clasificación de resistencia a antibióticos presentó una relación estadísticamente significativa con la resistencia a bacteriófagos siendo las cepas MDR más sensibles a la mayoría de nuestros bacteriófagos aislados mientras que las XDR presentaron más resistencia a la infección por estos (Tabla 7).

Existe una gran diversidad de mecanismos de resistencia a bacteriófagos. Los profagos al infectar a una bacteria brindan una serie de ventajas competitivas, una de ellas es la resistencia a la superinfección por otros bacteriófagos, lo que permite que la cepa hospedera se mantenga viable y que el profago no tenga que competir por los recursos celulares de esta (Bondy-Denomy *et al.*, 2016; Samson *et al.*, 2013). Si bien los aislamientos bacterianos resistentes a nuestros bacteriófagos mostraron diferentes características, como presencia de profagos, el bacteriófago  $\Phi 6C1/A$  fue capaz de superinfectar a una bacteria con esta característica además de ser efectivo principalmente frente a aislamientos del Hospital Nacional de Nivel III (población de aislamientos más resistente a bacteriófagos), esto refleja cierta similitud con los resultados obtenidos por Bondy-Denomy *et al.*, (2016) donde se observaron diferentes patrones de superinfección en cepas lisógenas; así también Essoh *et al.* (2013), en una población de aislados de *P. aeruginosa* con un 90% de cepas lisógenas, logró el aislamiento de bacteriófagos capaces de superinfectar a estas cepas. Es conocido que las bacterias pueden desarrollar resistencia a bacteriófagos por distintos medios sin embargo esto no significa un impedimento para aplicar esta opción terapéutica ya que una de las mayores ventajas de los bacteriófagos como agente antimicrobiano es evolucionar tan rápido como sus

hospederos desarrollando nuevas formas de infectarlos (Samson *et al.*, 2013; Pirnay *et al.*, 2018) así que para evitar la generación de cepas resistentes se recomienda el empleo de un coctel de bacteriófagos (solución de 2 ó más bacteriófagos), de tal manera si la cepa a tratar desarrolla resistencia a un bacteriófago esta pueda ser infectada por el otro (Merabishvili *et al.*, 2017).

Tomando el rango de hospedero y la morfología de placa de lisis como características principales para la selección del bacteriófago candidato a fagoterapia, se seleccionó al Fago  $\Phi$ MARC-GA para la caracterización microbiológica completa, cabe resaltar que otro de los candidatos fue el fago  $\Phi$ C6/1A pero debido a que su cepa hospedera fue una XDR y no fue posible su amplificación con *P. aeruginosa* ATCC 27853, fue descartado ya que, según mencionan Lobočka *et al.*, (2014) una cepa con características patogénicas como la multirresistencia no debe ser empleada como cepa de amplificación, por el peligro biológico que esta supone, de la misma forma Pirnay *et al.* (2018), mencionan entre los requerimientos para fagoterapia el empleo de cepas no o poco patogénicas para la producción de bacteriófagos.

Cada bacteriófago presenta un rango de hospedero particular, en el caso de fagoterapia es deseable más no indispensable que el bacteriófago presente un rango de hospedero amplio, que le permita infectar diversas clonas y componer un “coctel” que contenga pocos bacteriófagos y alcance un rango amplio de efectividad, equiparable a un antibiótico de amplio espectro sin sus desventajas (Ross *et al.*, 2016; Casey *et al.*, 2018). El bacteriófago  $\Phi$ MARC-GA logró infectar únicamente a un 14% de la población total, esto responde a diversos factores como el mismo fago, el estado fisiológico del huésped o también la resistencia a los bacteriófagos del huésped (Örmälä y Jalasvuori, 2013). Pese a su rango de hospedero un tanto estrecho, el bacteriófago  $\Phi$ MARC-GA logró infectar aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes y multirresistentes, así también a productoras y

no productoras de biopelícula por lo que sumado a las características morfológicas previamente mencionadas le permitieron ser seleccionado como candidato para fagoterapia.

Las características del ciclo de replicación de un bacteriófago dependen de la naturaleza misma de este bacteriófago así como la del hospedero bacteriano que se emplee para este fin, teniendo en algunos casos una mayor o menor eficiencia con un hospedero diferente otro de los factores relevantes para el ciclo de replicación del fago es el ambiente al que se enfrenta el huésped influyendo directamente en el tamaño de explosión del bacteriófago (Middelboe *et al.*, 2000). Estas características del ciclo de replicación son de suma importancia para conocer mejor el potencial de un bacteriófago como agente terapéutico. Comparando el ciclo de replicación del bacteriófago  $\Phi$ MARC-GA con los ciclos de replicación de los bacteriófagos aislados por Latz *et al.* (2017) también de *P. eruginosa* MDR este se asemeja a las características de ciclo de vida del bacteriófago SL1 (aislado por Latz) el cual posee un periodo de latencia de 45 minutos y un tamaño de explosión de aproximadamente 100 bacteriófagos y difiere del bacteriófago SL2 y SL4 que presentan un periodo de latencia de 30 y 50 minutos y un tamaño de explosión de 22 y 16 bacteriófagos, respectivamente; De otro lado los bacteriófagos vB\_kakheti25 y vb\_pe-tbilisim32 aislados por Karumidze *et al.* (2012) presentan un tiempo de latencia de 20 minutos y un tamaño de explosión de 120 y 210 UFP respectivamente siendo estos superiores en ambas características de productividad al fago  $\Phi$ MARC-GA.

Finalmente, comparando el fago  $\Phi$ MARC-GA con fagos caracterizados para otros hospederos, Como el fago S6 de Flores (2017) para *Salmonella* Tiphymurium, este último presenta un tamaño de explosión mayor al fago  $\Phi$ MARC-GA y también un periodo de latencia más corto, esta característica se repite también en el fago  $\Phi$ GF1 aislado por Punil

(2017), pero en comparación a este fago el bacteriófago  $\Phi$ MARC-GA presentó un tamaño de explosión más alto.

El bacteriófago  $\Phi$ MARC-GA presenta un periodo de latencia corto y posee un alto tamaño de explosión siendo estas dos características deseadas desde el punto de vista de la fagoterapia ya que la liberación de un número alto de progenie aumenta las probabilidades que el fago alcance a más bacterias blanco lo cual es necesario para una infección productiva incrementando sus concentraciones, en presencia del hospedero, una ventaja más sobre los antibióticos. Otra ventaja adicional es disminuir el riesgo de selección de cepas resistentes al fago, pues infectan bacterias más rápido de lo que estas pueden replicarse. Estas características hicieron al bacteriófago  $\Phi$ MARC-GA un buen candidato para fagoterapia, sin embargo como ya se ha mencionado estas características son influenciadas por varios factores entre ellos la naturaleza del hospedero, por lo que para la aplicación en fagoterapia se hace necesario estimar la eficiencia del bacteriófago en la cepa a tratar para incrementar su efectividad terapéutica (Mohammadali y Anders, 2015; Hyman & Abedon, 2009). La ultraestructura del bacteriófago  $\Phi$ MARC-GA lo ubica dentro de la Familia *Podoviridae*, morfotipo C1, común entre los bacteriófagos de *P. aeruginosa*, según lo reportado por Essoh *et al.*, (2015). En el 2012 Sepúlveda-Robles *et al.*, aislaron una colección de 68 bacteriófagos de los cuales 19 % presentaban morfotipo C1 y además estaban estrechamente relacionados mediante su perfil de RFLP.

A la luz de la información internacional revisada, la posibilidad de que el bacteriófago  $\Phi$ MARC-GA pueda ser utilizado como agente antimicrobiano es bastante alta, ello debido a que cuenta con la mayoría de características deseables para la fagoterapia como su marcada actividad lítica, que se evidencia en las características de su ciclo de replicación, y la capacidad de infectar a cepas multirresistentes y productoras de biopelícula, lo que le brinda la posibilidad de componer un cóctel de bacteriófagos contra infecciones severas



de *P. aeruginosa*, pero para ello es necesario realizar un estudio más completo sobre la biología del bacteriófago (genómica) así como estudios que acrediten su aplicación con seguridad los mismos que no fueron objeto del presente estudio.

En la actualidad la fagoterapia ha alcanzado grandes logros en las diferentes áreas en las cuales se le emplea, sin embargo aún es un tema con mucho por investigar, pues aun los bacteriófagos como agentes antimicrobianos poseen algunas limitantes propias de la biología de estos; Sin embargo gracias a la atención que últimamente se le ha tomado, han surgido diferentes campos de investigación, los cuales buscan generar agentes antimicrobianos basados en bacteriófagos empleando sus propiedades más relevantes y corrigiendo sus deficiencias lo que resulta esperanzador frente a la amenaza constante que presenta la resistencia a antimicrobianos.

En estos últimos años el estudio en bacteriófagos ha aumentado increíblemente como se ha mencionado previamente, la incorporación de la biología de sistemas en esta área de investigación ha sido crucial para dilucidar el funcionamiento de estos como agentes antibacterianos, y solo es con el alcance de estos conocimientos cuando podríamos no solo del aislamiento de un agente antibacteriano basado en un organismo vivo sino también en su diseño.

## VIII. CONCLUSIONES

- ❖ Es posible obtener aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* a partir de muestras clínicas provenientes de un Hospital de Nivel III y de una clínica privada.
- ❖ Los aislamientos de *P. aeruginosa* presentaron altos niveles de resistencia a la mayoría de antibióticos evaluados en el estudio, observándose aislamientos MDR y XDR; diferentes perfiles de producción de biopelícula y así también una parte de estos aislamientos presentaron profagos, tanto inducibles como espontáneos.
- ❖ Se obtuvieron nueve bacteriófagos capaces de infectar a varios aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*.
- ❖ El bacteriófago  $\Phi$ MARC-GA presenta un rango de hospedero estrecho, infectando a cepas de *P. aeruginosa* MDR y productoras de biopelícula, mas no a aislamientos en los que se detectó profago.
- ❖ El bacteriófago  $\Phi$ MARC-GA presenta características que lo califican como candidato para fagoterapia en infecciones recalcitrantes por *P. aeruginosa*.

## IX. RECOMENDACIONES

- ❖ Para un mejor estudio de susceptibilidad a los bacteriófagos es necesario emplear técnicas de tipificación genética en las cepas a evaluar.
- ❖ La evaluación de la efectividad de los bacteriófagos para infectar cepas de *P. aeruginosa* también debe ser evaluado en estado de biopelícula para tener una idea más clara de su efectividad terapéutica en dichas condiciones
- ❖ El secuenciamiento del genoma completo de los bacteriófagos a fin de evaluar la inocuidad genética mediante la detección de determinantes genéticos posiblemente dañinos, para su empleo en fagoterapia.

## X. REFERENCIAS

- ABEDON Stephen, GARCÍA Pilar, MULLANY Peter AMINOV Rustam. Phage Therapy: Past, Present and Future. 2017, *Frontiers in Microbiology*. Vol 8 no 981. p.1-7
- ACKERMANN Hans. WEGRZYN Grzegorz. General Characteristics of Bacteriophages,. En: BORYSOWSKY Jan. MIEDZYBRODZKI Ryszard. GORSKI Andrzej. Phage therapy: Current research and applications, 1st ed, Norfolk UK, Caister Academic Press; 2014 p3-22
- ACKERMANN, Hans. Classification of bacteriophages. *The bacteriophages*, 2006, vol. 635, p. 8-16.
- ADAMS, M. H. Bacteriophages. Interscience Publishers. 1959. New York, p 27.
- BECKER K, BALLHAUSEN B, KOCK R, KRIEGESKORTE A. Methicillin resistance in Staphylococcus isolates: the “mec alphabet” with specific consideration of mecC, a mec homolog associated with zoonotic S. aureus lineages. *International Journal of Medical Microbiology* 2014; Vol. 304 No. 7 p.794-804.
- BELLIDO F, MARTIN NL, SIEHNEL RJ, HANCOCK RE. Reevaluation, using intact cells, of the exclusion limit and role of porin OprF in Pseudomonas aeruginosa outer membrane permeability. *J Bacteriol*. 1992;Vol.174 No.16 p.5196–203.
- BONDY-DENOMY Joseph, QIAN Jason, WESTRA Edze R, BUCKLING Angus, GUTTMAN David S , DAVIDSON Alan R, MAXWELL Karen L. Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. *The ISME Journal*. 2016 Vol. 10 No. 12 p. 2854-2866

- BORYSOWSKY Jan. MIEDZYBRODZKI Ryszard. GORSKI Andrzej. Phage therapy: Current research and applications, 1st ed, Norfolk UK, Caister Academic Press; 2014
- BRAGG *et al.*, The potential use of bacteriophage therapy as a treatment option in a post-antibiotic era en: KON Kateryna, RAI Mahendra. Antibiotic Resistance Mechanisms and New Antimicrobial Approaches *Academic Press* 1ra ed. 2016
- CAMPBELL Allan. General aspects of lysogeny. Oxford University Press 2006 p.66-73
- CASEY Eoghan, VAN SINDEREN Douwe, MAHONY Jennifer. In Vitro Characteristics of Phages to Guide 'Real Life' Phage Therapy Suitability. *Viruses* 2018.Vol. 10, No. 163 p.2-20
- CHRISTENSEN Gordon, SIMPSON Andrew, BISNO Alan, BEACHEY Edwin. Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and Immunity*. 1982 Vol. 37 No. 1 p.318-326
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. informational supplement. CLSI document M100 S27. PA, USA: Wayne; 2017.
- CLOKIE, M.R. and KROPINSKI, Andrew M. *Bacteriophages: methods and protocols* Humana, 2008. Press, New York
- COSTA Jailton, RODRIGUES Lilian, LUNA de ARAÚJO Paula, BEZERRA João VIEIRA Maria , CAMARGO de MORAIS Marcia. Biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and structural changes in LasR protein of isolates non biofilm-producing. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2018, Vol.22, No. 2 p.129-136

- COSTA Jailton, RODRIGUES Lilian, PEREIRA DA PAZ Jussyêgles, AQUINO Marcelle, VIEIRA Maria, CAMARGO de MORAIS Marcia Analysis of biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with ventilator-associated pneumonia. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 2017 Vol. 29 No.3 p.310-313
- Costerton J, Stewart P, Greenberg E. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284:1318-22.
- DAVIES Emily V, JAMES Chloe E, KUKAVICA-IBRULJ Irena, LEVESQUE Roger C, BROCKHURST Michael A. WINSTANLEY Craig. Temperate phages enhance pathogen fitness in chronic lung infection. *The ISME Journal*. 2016. Vol. 10 No.10 p. 2553–2555
- DAVIES Emily V. “The role of prophages in *Pseudomonas aeruginosa*”. Tesis Doctoral. Universidad de Liverpool, 2015.
- DE SOUSA K. *et al.*, mechanisms of antibacterial resistance: shedding some light on these obscure processes? KON Kateryna, RAI Mahendra. *Antibiotic Resistance Mechanisms and New Antimicrobial Approaches Academic Press* 1ra ed. 2016
- DONLAN RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis*. 2001;Vol. 33 No.8 p.1387–92.
- DRYDEN Mathew. Complicated skin and soft tissue infection. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 2010; Vol. 65 Supl. 3 p.35–44.
- DUNKLE JA, XIONG L, MANKIN AS, CATE JH. Structures of the *Escherichia coli* ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; Vol. 107 No. 40 p.17152-17157.

- ENGELKIRK, Paul G.; DUBEN-ENGELKIRK, Janet L.; BURTON, Gwendolyn R. Wilson. *Burton's microbiology for the health sciences*. Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
- ESSOH Christiane, BLOUIN Yann, LOUKOU Guillaume, CABLANMIAN Arsher , LATHRO Serge, KUTTER Elizabeth *et al.*, The Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Strains from Cystic Fibrosis Patients to Bacteriophages PLoS ONE 2015 Vol. 8 No. 4 p. e60575 doi:10.1371/journal.pone.0060575
- ESSOH\* *et al.* Investigation of a Large Collection of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophages Collected from a Single Environmental Source in Abidjan, Côte d'Ivoire. *PLoS ONE* 2015. Vol. 10 No. 6
- FALGENHAUER Linda *et al.*, Genome Analysis of the Carbapenem- and Colistin-Resistant *Escherichia coli* Isolate NRZ14408 Reveals Horizontal Gene Transfer Pathways towards Panresistance and Enhanced Virulence Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2017; Vol. 61 No.4 p.e02359-16.
- FERNANDEZ L, BREIDENSTEIN EB, HANCOCK RE. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resist Updat*. 2011 Vol. 14 No.1 p.1–21.
- FISH, R., Kutter, E., Wheat, G., Blasdel, B., Kutateladze, M., and Kuhl, S. Bacteriophage treatment of intransigent diabetic toe ulcers: a case series. *J. Wound Care* 2016. Vol 25 p. S27–S33.
- FLORES Gloria. “Caracterización de bacteriófagos líticos de *Salmonella enterica* aislados de muestras de pollos”. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2017.
- FLORIAN Christian, ALVARADO Débora, COHA Juana Evaluación in vitro de la resistencia a ciprofloxacina en biopelículas y poblaciones planctónicas de

Pseudomonas aeruginosa de origen hospitalario. *An Fac Med Lima* 2006; Vol 67 No.4  
p 290 - 297

- FORTIER Louis, SEKULOVIC Ognjen. Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence*. 2013; Vol. 4 No. 5 p.354–365
- GÓMEZ María, VIVES Martha. "Bacteriófagos, virus de bacterias que curan infecciones". Hipótesis: Apuntes científicos Uniandinos. 2009, vol. 10 n°10 p. 36-46
- GOOTZ TD. The global problem of antibiotic resistance. *Critical Reviews in Immunology* 2010; Vol. 30 No.1 p.79-93.
- GÓRSKI Andrzej, MIEDZYBRODZKI Ryszard, BORYSOWSKY Jan, WEBER Beata, LOBOCKA Malgorzata, *et al.*, Bacteriophage therapy for the treatment of infections. *Current opinion in investigational drugs* 2009; Vol 10 p. 766-74.
- HOCQUET D *et al.*, MexXY-OprM efflux pump is necessary for a adaptive resistance of Pseudomonas aeruginosa to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(4):1371–5.
- HOIBY Neils CIOFU Oana BJARNSHOLT Thomas. *Pseudomonas*. en: JORGENSEN James, PFALLER Michael, CARROLL Karen, FUNKE Guido , LANDRY Marie, RICHTER Sandra, WARNOCK David. *Manual of Clinical Microbiology*,. USA: ASM Press 11va ed. 2015 p.773-790.
- HOPKINS Susan. The international and national challenges faced in ensuring prudent use of antibiotics en: LAUNDY Matthew GILCHRIST Mark WHITNEY Laura. *Antimicrobial stewardship*. Oxford university press 1ra ed. 2016
- HOYLE BD, ALCANTARA J, COSTERTON JW. Pseudomonas aeruginosa biofilm as a diffusion barrier to piperacillin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992; Vol. 36 No.9 p. 2054-2056.



- Hyman P, Abedon ST. Practical methods for determining phage growth parameters. *Methods Mol Biol.* 2009; 501: 175–202. doi: [10.1007/978-1-60327-164-6\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_18) PMID: 19066822
- INEI-ANLIS. VIGILANCIA de la RESISTENCIA a los ANTIMICROBIANOS Red WHONET- Red SIREVA II Argentina: 2010-2016.[online]2016 Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2018/08/Vigilancia-de-la-Resistencia-a-los-Antimicrobianos-2010-2016.pdf>
- INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Informe de la resistencia antimicrobiana en bacterias de origen hospitalario. Laboratorio de infecciones Intrahospitalarias. Peru: INS; 2012. Informe :1-9
- JAMES Chloe E, FOTHERGILL Joanne L, KALWIJ Hannah, HALL Amanda J, Jennifer Cottell, Differential infection properties of three inducible prophages from an epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiology* 2012. Vol.12 No.1 p. 1-10
- JURCZAK-KUREK Agata, GAŚSIOR Tomasz, NEJMAN-FALEŃCZY Bożena, BLOCH Sylwia, DYDECKA Aleksandra, TOPKA Gracja, NECEL Agnieszka *et al.*, Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage *Scientific Reports* vol. 6, 2016 no 34338
- KARUMIDZE Natia THOMAS Julie. KVATADZE A. Nino *et al.*, Characterization of lytic *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages via biological properties and genomic sequences. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2012, Vol. 94, No6, p.1609–1617
- KOBAYASHI Hiroyuki. KOBAYASHI Osamu. and KAWAI Shin., Pathogenesis and Clinical Manifestations of Chronic Colonization by *Pseudomonas aeruginosa* and

Its Biofilms in the Airway Tract, Journal of Infection Chemotherapy, 2009, Vol 15 no 3. p.125-142.

- KOHLER T *et al.*, Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; Vol. 40 No. 10 p. 2288-90.
- LATZ Simone, KRÜTTGEN Alex, HÄFNER Helga, BUHL Eva, RITTER Klaus HORZ Hans-Peter, Differential Effect of Newly Isolated Phages Belonging to PB1-Like, phiKZ-Like and LUZZ4-Like Viruses against Multi-Drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* under Varying Growth Conditions. *Viruses* 2017 Oct Vol.9 No.11. p. E315.
- LEFKOWITZ, Elliot J., DAVISON, Andrew J., SABANADZOVIC, Sead, *et al.*, (ed.). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Tenth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2016. Online. [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/)
- LETAROV Andrey V., KULIKOV Eugene E. Determination of the Bacteriophage Host Range: Culture-Based Approach en: AZEREDO Joana, SANNA Sillankorva. *Bacteriophage Therapy: From Lab to Clinical Practice. Springer.* 1ra ed. 2017.
- LIVERMORE DM, WOODFORD N. The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in Microbiology* 2006; Vol. 14 No.9 p.413-420
- LIVERMORE DM. Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992;Vol. 36 No.9 p. 2046-8.

- LLANES C,*et al.*, Diversity of beta-lactam resistance mechanisms in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: a French multicentre study. *J Antimicrob Chemother.* 2013; Vol. 68 No. 8 p.1763-71
- LOBOCKA Malgorzata HEJNOWICZ Monika GAGALA Urszula WEBER Beata WEGRZYN Grzegorz DADLEZ Michal. The First Step to Bacteriophage Therapy: How to choose the Correct Phage,. En: BORYSOWSKY Jan. MIEDZYBRODZKI Ryszard. GORSKI Andrzej. *Phage therapy: Current research and applications*, 1st ed, Norfolk UK, Caister Academic Press; 2014 p23-67
- LUJÁN Daniel. *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta bioquímica clínica latinoamericana.* 2014. Vol 48 no 4 p. 465-474.
- LWOFF André, HORNE Robert, TOURNIER Paul. *A System of Viruses Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology*, 1962. Vol. 27. p.51-55
- LWOFF André. Lysogeny. *Bacteriology Reviews.* 1953; Vol.17 No.4 p.269–337.
- MAGIORAKOS Anna SRINIVASAN A. CAREY B. *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; Vol. 18 no 3 p.268–281
- MAH TF, O'TOOLE GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001;Vol. 9 No.1 p.34-9.
- MAYER, D.G. Bacteriophage. In: *Microbiology and Immunology On-line*, Hunt, R.C. 2015. editor. <http://www.microbiologybook.org/mayer/phage.htm>
- MAYERS Douglas. SOBEL Jack. OUELLETTE Marc. KAYE Keith MARCHAIM Dror. *Antimicrobial Drug Resistance Clinical and Epidemiological Aspects* Springer Switzerland, Volume 2. 1ra ed. 2017. p. 899-912

- MERABISHVILI Maia, PIRNAY Jean-Paul, DE VOS Daniel. Guidelines to Compose an Ideal Bacteriophage Cocktail en: AZEREDO Joana, SANNA Sillankorva. Bacteriophage Therapy: From Lab to Clinical Practice. *Springer*. 1ra ed. 2017.
- MIDDELBOE, Mathias. Bacterial growth rate and marine virus–host dynamics. *Microbial Ecology*, 2000, vol. 40, no 2, p. 114-124.
- MOHAMMADALI Khan M., ANDERS Nilsson S. Isolation of Phages for Phage Therapy: A Comparison of Spot Tests and Efficiency of Plating Analyses for Determination of Host Range and Efficacy. *PLoS ONE*(2015) Vol. 10 No. 3: e0118557. doi:10.1371/ journal.pone.0118557
- MOREAU-MARQUIS S, STANTON BA, O'TOOLE GA. Pseudomonas aeruginosa biofilm formation in the cystic fibrosis airway. *Pulm Pharmacol Ther.* 2008;Vol. 21No.4 p.595–9.
- MULCAHY LR, BURNS JL, LORY S, LEWIS K. Emergence of Pseudomonas aeruginosa strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. *J Bacteriol.* 2010;Vol192 No.23): 6191–9.
- NANDA Arun M. THORMANN Kai, FRUNZKEA Julia. Impact of Spontaneous Prophage Induction on the Fitness of Bacterial Populations and Host-Microbe Interactions. *Journal of Bacteriology.* 2015 Vol. 197 No. 3 p. 410-419.
- OLIVER A. Mutators in cystic fibrosis chronic lung infection: prevalence, mechanisms, and consequences for antimicrobial therapy. *Int J Med Microbiol.* 2010; Vol. 300 No.8 p.563–72.
- ÖRMÄLÄ Anni-Maria, JALASVUORI Matti. Phage therapy: Should bacterial resistance to phages be a concern, even in the long run? *Bacteriophage.* 2013 Vol.3 No.1 p. e24219.

- OVALLE M. SAAVEDRA S. GONZÁLEZ M, HIDALGO A. DUARTE C., BELTRÁN M. Resultados de la vigilancia nacional de la resistencia antimicrobiana de enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores en infecciones asociadas a la atención de salud, Colombia, 2012-2014 *Biomédica* 2017 Vol. 37 No.4 p.473-485
- PAGES JM, JAMES CE, WINTERHALTER M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews in Microbiology*. 2008; Vol. 6 No. 12 p. 893-903.
- PAJUNEN Marie, KILJUNEN Saija, SKURNIK Mikael. Bacteriophage YeO3-12, Specific for *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3, Is Related to Coliphages T3 and T7. *Journal of Bacteriology*. 2000 Vol. 182 No.18 p.5114–5120
- PIRNAY Jean-Paul, VERBEKEN Gilbert, CEYSSENS Pieter-Jan, HUYS Isabelle, DE VOS Daniel, AMELOOT Charlotte, FAUCONNIER Alan. The Magistral Phage. *Viruses* 2018.Vol. 10, No. 2 p.64
- POOLE K, TETRO K, ZHAO Q, NESHAT S, HEINRICHS DE, BIANCO N. Expression of the multidrug resistance operon mexA-mexB-oprM in *Pseudomonas aeruginosa*: mexR encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; Vol. 40 No.9 p.2021–8.
- PORRAS Marlyn. VEGA José NUÑEZ Santiago. Overview of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and Novel Therapeutic Approaches, *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2012, Vol. 3 no.4 p. 519-527
- PRADA Catalina, HOLGUÍN Ángela, GONZÁLEZ Andrés, VIVES Martha. Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. *Perspectivas en Colombia. Universitas Scientiarum*, 2015. Vol. 20 No.1 p.43-60

- PUNIL, Renzo J. “Caracterización de un bacteriófago específico de *Escherichia coli* aislado de aguas residuales de “La Taboada”, Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2017.
- RAMON-PARDO P, SATI H, GALAS M. Enfoque de una salud en las acciones para enfrentar la resistencia a los antimicrobianos desde una óptica latinoamericana. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2018; Vol.35 No. 1 p.103-9
- ROCHA Claudio, REYNOLDS Nathanael, SIMONS Mark. Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. *Revista Peruana de Medicina Experimental Salud Publica*, 2015; vol 32 no1 p.139-145
- ROSS Alexa, WARD Samantha, HYMAN Paul. More Is Better: Selecting for Broad Host Range Bacteriophages. *Frontiers in Microbiology*. 2016. Vol. 7 No. 1352.
- SALUNKHE Prabhakar, SMART Catherine H. MORGAN J. Alun. PANAGEA Stavroula, WALSHAW Martin J., HART C. Anthony, GEFTERS Robert, TÜMMLER Burkhard, WINSTANLEY Craig. Cystic Fibrosis Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa* Displays Enhanced Virulence and Antimicrobial Resistance. *Journal Bacteriology*. 2005 Vol. 187 No. 14 p. 4908–4920
- SAMSON Julie, MAGADÁN Alfonso, MOURAD Sabri, MOINEAU Sylvain. Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nature Reviews Microbiology* 2013 Vol. 11 p. 675–687.
- SCHMELCHER Mathias DONOVAN, David M, LOESSNER Martin J, Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiology*. 2012. Vol. 7 No.10 p. 1147–1171.

- SEPÚLVEDA-ROBLES Omar, KAMEYAMA Luis, GUARNEROS Gabriel High Diversity and Novel Species of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology* 2012. Vol. 78 No. 12 p. 4510-4515
- SHAHID M, MALIK A, SHEEBA. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring R-plasmids and AmpC beta-lactamases isolated from hospitalised burn patients in a tertiary care hospital of North India. *FEMS Microbiol Lett.* 2003;Vol. 228 No. 2 p.181–6.
- SHIVANI Saxena,GOPA Banerjee, RAJIV Garg, MASTAN Singh. Comparative Study of Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients of Lower Respiratory Tract Infection *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2014 Vol. 8 No.5 DC09-DC11
- STAVRI M, PIDDOCK LJ, GIBBONS S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007; Vol. 59 No.6 p.1247-1260.
- STEVENS Dennis, BISNO Alan, CHAMBERS Henry, DELLINGER Patchen, GOLDSTEIN Ellie, GORBACH Sherwood, HIRSCHMANN Jan, KAPLAN Sheldon, MONTOYA Jose, WADE, James. Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft tissue infections: 2014 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases.* 2014. Vol. 59 no. 2 p.147-159
- SULAKVELIDZE, Alexander. and BARROW, P., Phage therapy in animals and agribusiness, en KUTTER, Elizabeth. and SULAKVELIDZE, Alexander *Bacteriophages: Biology and Applications.*, CRC Press, 2005, p. 335-380.

- SUN S, SELMER M, ANDERSSON DI. Resistance to beta-lactam antibiotics conferred by point mutations in penicillin-binding proteins PBP3, PBP4 and PBP6 in *Salmonella enterica*. *PLoS One*. 2014; Vol 9 No. 5 p.e97202.
- TAKATSUKA Y, CHEN C, NIKAIDO H. Mechanism of recognition of compounds of diverse structures by the multidrug efflux pump AcrB of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; Vol. 107 No.15 p.6559-6565.
- TAMARIZ Jesús, LEZAMETA Lizzet, GUERRA Humberto. Fagoterapia frente a infecciones por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en ratones. *Revista Peruana de Medicina Experimental Salud Publica*. 2014 Vol 31 no 1 p. 69–77
- TANG, Hung-Jen *et al.*, “Clinical Significance of Community- and Healthcare-Acquired Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Isolates.” *PLoS ONE*. 2016;11;3 Vol. 11 No. 3 p: e0151897. *PMC*. Web. 1 Sept. 2018.
- TRIVEDA L. GOMATHI S. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Enterococci: An evaluation of three different screening methods. *Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2016. Vol.5 No. 3 p. 643-650
- WATANABE, Ryohei., MATSUMOTO, Tetsuya., SANO, Go., ISHII, Yoshikazu., TATEDA, Kazuhiro., SUMIYAMA, Yoshinobu *et al.*, Efficacy of bacteriophage therapy against gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Antimicrob. Agents Chemother*; 2007. Vol. 51 No. 2 p. 446–452.
- World Health Organization (WHO).who.int [Internet ][actualizado 2 Mar 2017; citado 20 sept 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/resistencia-a-los-antibioticos>
- World Health Organization (WHO).who.int [Internet ][actualizado 7 Feb 2018; citado 12 mayo 2018]. Disponible en:



<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>

- Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; Vol. 57No. 10 p.1451-1470.
- YOKOYAMA K,*et al.*, Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet*. 2003;Vol. 362 No.9399 p. 1888–93.
- ZAVASCKI Alexandre, BARTH Afonso, FERNANDEZ Juliana, MORO Ana, GONCALVES Ana, GOLDANI Luciano. Reappraisal of *Pseudomonas aeruginosa* hospital-acquired pneumonia mortality in the era of metallo-beta-lactamase-mediated multidrug resistance: a prospective observational study. *Critical Care*. 2006. Vol 10 no 4 :R114
- ZHANG L, MAH TF. Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. *J Bacteriol*. 2008; Vol. 190 No. 13 p.4447– 52.