



División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento del Hombre y su Ambiente

Licenciatura en Biología

Para obtener el grado de Licenciado en Biología.

Aislamiento y caracterización de bacteriófagos activos contra *Pseudomonas aeruginosa*

Aldo Limones Martínez

Matricula: 2182033863

Asesor interno:

Asesor externo:

Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez

Número económico: 8758

**Departamento de Atención a la
Salud**

Dr. Rodolfo García Contreras

Cédula: 5468825

**Departamento de Microbiología
y Parasitología, Facultad de
Medicina, UNAM**

Resumen: *Pseudomonas aeruginosa* cada vez se ha vuelto más resistente a los antibióticos, por lo que ha adquirido más mecanismos de resistencia, aumentando su virulencia. Por esto mismo se ha buscado una alternativa al uso desmedido de estos mismos. El uso de bacteriófagos ha sido un sustituyente eficaz para combatir a esta bacteria multidrogoresistente (MDR). La importancia de esta investigación radica en aislar y caracterizar bacteriófagos con el potencial terapéutico de poder infectar *P. aeruginosa*. Para ello se amplificaron y purificaron diversos bacteriófagos, que fueron evaluados tanto *in vitro* como *in vivo* en *Galleria mellonella* (Polilla de cera). Entre los resultados obtenidos se encontraron 6 muestras con fagos de las 15 probadas, obtenidas a un título de 10^8 a 10^{10} UFP/mL. En el rango de huésped en cepas MDR los 6 bacteriófagos tienen un amplio rango de huésped, sin embargo, los más destacados es el fago CU y C2. Por otra parte en el trabajo también se aislaron mutantes resistentes a los fagos. En el aislamiento de mutantes de la cepa RME 58 hubo una ligera lisis en combinación en el goteo de los fagos al igual que en curvas de crecimiento. También se hizo un antibiograma de estas, las cuales no tuvieron diferencias significativas en el perfil de resistencia a antibióticos. En el modelo *in vivo* en *G. mellonella* no hubo eficiencia en los fagos, a excepción en mutantes donde el fago C2 tuvo una tasa de supervivencia del 50 %. La identificación de bacteriófagos con la capacidad de poder infectar con mayor eficiencia a cepas MDR sobresale los fagos CU y C2 con un potencial terapéutico.

Palabras clave: Bacteriófagos, multidrogoresistente, aislamiento, caracterización y antibióticos.

Índice

Introducción.....	1
Planteamiento del problema y justificación.....	2
Objetivo general.....	2
Objetivos específicos.....	2
Marco teórico.....	3
Metodología.....	4
Resultados.....	5
Aislamiento y caracterización de los bacteriófagos activos.....	5
Cambios en su perfil de resistencia a antibióticos de clonas resistentes de la cepa RME 58.....	11
Modelo <i>in vivo</i> infectando a <i>Galleria mellonella</i>	12
Discusión.....	13
Conclusión	14
Referencias.....	16
Anexo.....	20

Introducción

Los bacteriófagos son los microorganismos más abundantes en el mundo, aproximadamente en un total de 10^{30} a 10^{32} fagos como masa biológica (Dini, 2011). Son virus capaces de provocar una infección o lisis a las bacterias. Por esto mismo tienen una gran importancia en el área clínica y de investigación para combatir enfermedades causadas por bacterias patógenas como lo es *Pseudomonas aeruginosa* (Arimendi, *et al.* 2015). El uso de fagos como terapia actualmente es una alternativa a muchos antibióticos en países de Occidente (Harper, 2018). Sin embargo, ha sido una tarea complicada, el seleccionar un fago adecuado para una cepa específica de bacteria y el riesgo de que ellas mismas desarrollen un mecanismo de resistencia ante ellos (Furfaro, *et al.* 2018).

Las bacterias tienen diferentes mecanismos de resistencia ante los ataques de los fagos, uno de ellos son las mutaciones espontáneas, las cuales pueden modificar sus propios receptores de su superficie (Oechslin, 2018). Los principales receptores a fagos que componen las bacterias Gram negativas como *P. aeruginosa* son los lipopolisacáridos, flagelos y proteínas de la membrana externa. Además de que también tienen la capacidad de formar biopelículas que la pueden proteger del estrés ambiental, la fagocitosis y los bacteriófagos (Chegeni, *et al.* 2020).

Una de las investigaciones que aborda el uso de los bacteriófagos contra *P. aeruginosa* es la de Chegeni *et al.* 2020 en la que discuten el uso de la terapia con bacteriófagos para inhibir esta bacteria multirresistente. Yuan *et al.* (2019) aislaron y purificaron fagos para poder encontrar los más viables para infectar varias cepas de agente infeccioso. Un trabajo similar al anterior es el de Oliveria *et al.* (2020) en el que identifica y caracteriza bacteriófagos nuevos capaces de infectar cepas de *P. aeruginosa* resistentes a múltiples fármacos.

Es de gran importancia identificar nuevas cepas de fagos con el potencial terapéutico contra *P. aeruginosa*. Por lo que el objetivo de este estudio fue identificar bacteriófagos activos aislados de muestras de aguas de diferentes partes de la Ciudad de México, el interior del país y del extranjero. Después de aislarlos se determinará su rango de infección en una colección de cepas de *P. aeruginosa* multidrogoresistentes (MDR) aisladas de pacientes con neumonía y se generarán combinaciones de estos, los cuales se utilizarán para eliminar a estas cepas *in vitro* e *in vivo* en el modelo de infección de *Galleria mellonella*.

Planteamiento del problema y justificación

Pseudomonas aeruginosa es uno de los patógenos más comunes que causan infecciones nosocomiales difíciles de tratar por ello mismo es necesario ver la posibilidad de aislar bacteriófagos con capacidad de eliminar o re-sensibilizar a los antibióticos a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes a antibióticos. Esta bacteria provoca un daño tisular extenso con diversos factores de virulencia, y debido a su producción de biopelículas desarrolla infecciones crónicas y resistentes a los antibióticos (Vaitekenas, *et al.* 2021). Según el informe de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de EE. UU., se estima que cada año se producen en los Estados Unidos aproximadamente 51,000 infecciones relacionadas con la atención de la salud causadas por *P. aeruginosa* y el 13 % de estas infecciones son multirresistentes (MDR), con aproximadamente 400 muertes por año atribuidas a dichas infecciones (Tkhilaishvili, *et al.* 2019). Por esta razón, existe la necesidad urgente del descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos capaces de eliminarla. El uso de bacteriófagos tiene un enfoque prometedor para combatir cepas de *P. aeruginosas* resistentes a los antibióticos.

Un caso muy relevante en el uso de bacteriófagos es mencionado por Van Nieuwenhuysse *et al.* (2022) quienes muestran un caso clínico de un niño que padecía atresia biliar, quien fue atendido en el hospital universitario Saint-Luc. El día 20 mostraron que después de realizar un antibiograma de la cepa aislada, se mostró una gran resistencia a los antibióticos. En el día 53 el niño presentó estenosis biliares intrahepática y septicemia severa por *P. aeruginosa*. Por lo que en el día 58, se le aplicó la terapia de fagos, el cual utilizaron un cóctel de fagos nombrado como BFC1 en el que contenía dos cepas en específico para esta bacteria (PNM Y 14-1) por lo que posteriormente al suministrarlos fueron secuenciados, caracterizados y aprobados. Se le suministró 10 ml de BFC1 y al cabo de 8 días se le duplicó la dosis. Esto condujo a la erradicación de este patógeno, y el niño se estabilizó al pasar de los días.

Objetivo general

Identificar los bacteriófagos que infectan a cepas multidrogoresistentes (MDR) de *Pseudomonas aeruginosa*

Objetivos específicos

1. Aislar y purificar los bacteriófagos activos de diferentes muestras de agua residuales de la CDMX y de diferentes partes del mundo en *P. aeruginosa*

2. Caracterizar mediante curvas de inhibición y crecimiento los bacteriófagos activos en *P. aeruginosa* y su rango de hospedero.
3. Probar la eficacia de combinaciones de bacteriófagos *in vitro* contra cepas multidrogoresistentes (MDR) y sus clonas resistentes de *P. aeruginosa*
4. Probar la eficacia de combinaciones de bacteriófagos *in vivo* en el modelo de *Galleria mellonella* (Polilla de la cera) contra cepa MDR y clonas resistentes de *P. aeruginosa*

Marco Teórico

P. aeruginosa es una bacteria aerobia Gram negativa, móvil, no formadora de esporas, oxidasa positiva y no fermentadora de lactosa. Debido a la producción de pigmentos solubles en agua como la pioverdina, que es un pigmento fluorescente amarillo verdoso, y la piocianina, que es un pigmento azul verdoso, es fácilmente detectable en agar (Kang, *et al.* 2019). También son productoras de betalactamasas que se asocian con la aparición tardía de VAP donde se ven tasas de letalidad más altas que las causadas por otras bacterias (Pachori, *et al.* 2019).

Las bacterias multidrogoresistentes (MDR) son capaces de formar biopelículas, las cuales son definidas como comunidades bacterianas adheridas a la superficie que pueden causar graves enfermedades (Thi, *et al.* 2020). Un paso importante en la formación de las biopelículas es la detección de la superficie, donde las células planctónicas nadan libremente, como *P. aeruginosa*, en la que hay al menos dos circuitos de detección de superficie distintos, los sistemas Wsp y Pil-Chp, que pueden contribuir a iniciar la formación de biopelículas (Lee, *et al.* 2020). Las cepas PAO1, se adhieren relativamente rápido a una superficie en comparación con lo que ocurre con PA14, lo que da como resultado que PAO1 muestre un aumento constante y progresivo de una población de células superficiales que se une de forma irreversible (es decir, se compromete a formar biopelículas) (Armbruster, *et al.* 2019).

El aislamiento de fagos activados para uso terapéutico contra diferentes especies bacterianas es especial para garantizar que exhiban un ciclo de vida bactericida, sean activos frente a bacterias clínicamente relevantes y no contengan genes bacterianos que puedan mejorar la aptitud de la bacteria (Vaitekenas, *et al.* 2021). Un ejemplo claro es la investigación de Yuan, *et al.* (2019) en la que examinaron el bacteriófago vB_PaeM_LS1 como bacteriófago terapéutico, analizaron su genoma el cual constaba una molécula de ADN lineal de doble cadena de 66.095 pb de longitud y con un contenido de G + C del 55,7 %. También analizaron la unión de la gran subunidad terminasa mostrando que el bacteriófago vB_PaeM_LS1 tenía similitud con el género *Pbunavirus*. Por lo que

su potencial del bacteriófago lítico para alterar las biopelículas de *P.aeruginosa* lo evaluaron mediante microscopía electrónica de barrido y recuento bacteriano. En este estudio revelaron que el bacteriófago vB_PaeM_LS1 con su efecto lítico mostró un alto impacto potencial en la inhibición del crecimiento de la formación de biopelículas de *P. aeruginosa*.

Otra investigación es la de Sharma *et al.* (2021), en la que aislaron y caracterización detalladamente al fago DRL-P1 altamente lítico aislado de aguas residuales en la que apareció como miembro de la familia de fagos Myoviridae, presentando una absorción rápida (~ 5 min), latencia corta (~ 30 min) y gran tamaño de ráfaga (~ 100 PFU por célula infectada). No identificaron genes de resistencia a toxinas o antibióticos y su tolerancia a las técnicas de liofilización, encapsulación, conservando la actividad lítica incluso después de 18 meses de almacenamiento, demostrando el potencial descontaminante de DRL-P1 por lo que sugieren que es un buen candidato para futuras aplicaciones.

Metodología

Se utilizó una cepa de referencia de *P. aeruginosa* PA14 proveniente de pacientes con quemaduras las cuales fueron provistas por el Dr. Rafael Franco Cendejas del Instituto Nacional de Rehabilitación y una cepa ambiental aislada. Las cepas de pacientes con quemaduras provienen de una colección de 200 y fueron seleccionadas mediante la aplicación de campos pulsados para descartar redundancia genómica (López, *et al.*, 2019).

Los bacteriófagos inicialmente se trabajaron con una colección de 15 fagos provenientes de diversos ríos contaminados los cuales fueron aislados y parcialmente caracterizados por el colaborador Daniel Cázares del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM (Cazares, *et al.*, 2021) y posteriormente se procedió a aislar más de diversas fuentes ambientales, como cuerpos de agua y suelos. Para aislar y caracterizar la capacidad lítica de los fagos se utilizó la cepa PA 14 de referencia, por el método de goteo en placa, el cual se llevó a cabo en doble tapiz en medio sólido de Lysogeny Broth (LB) a una concentración del 0.7 % goteando 5µ de fago filtrado. Los fagos que produjeron placas de lisis claras en la primera amplificación (indicativo de que podrían ser líticos) en por lo menos alguna de las cepas clínicas fueron aislados y purificados por ultracentrifugación (Jenkinson, 2018).

Para cumplir con los objetivos 2 y 3, una vez que se identificaron a los fagos líticos candidatos, se procedió a infectar a cepas MDR y a aislar variantes mutantes resistentes a su infección (por ejemplo, aquellas clonas que crezcan dentro de las placas de lisis). Las clonas potencialmente resistentes a la infección se verificarán mediante nuevos ensayos de infección en placa y curvas de

crecimiento en presencia de los fagos. Posteriormente se determinará si estas cepas resistentes sufrieron cambios en sus perfiles de resistencia a los 10 antibióticos más comúnmente usados (piperacilina, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, doripenem, meropenem, amikacina, gentamicina, ciprofloxacino y tigeciclina) para tratar infecciones causadas por *P. aeruginosa* mediante el método de micro dilución seriada en placa (Hyman, 2019).

Aquellos fagos que promovieron la resistencia a su infección que ocasionaron una disminución en la resistencia de sus hospederos a alguno o varios de los antibióticos se seleccionaron para estudios posteriores que incluirán la caracterización de los mecanismos implicados en la sensibilización a los antibióticos. Finalmente, para el objetivo 4, se utilizaron larvas del insecto *Galleria mellonella* en las que se hizo una dilución 10^{-5} del precultivo de la cepa utilizada, inyectando 20 μ L en la segunda o tercera propagación, para evaluar la letalidad de las cepas originales, la eficacia de los fagos líticos seleccionados para aumentar la sobrevivencia de las larvas y eliminar a las bacterias *in vivo* (Ramarao, *et al.* 2012).

Análisis estadísticos

En los análisis estadísticos se utilizó herramientas como Excel y GraphPad prism 8.02. Los cambios en la sensibilidad a antibióticos se analizaron mediante pruebas de ANOVA de una vía para datos independientes y la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis (Soto, 2013). La supervivencia de *Galleria mellonella* se analizó mediante curvas tipo Kaplan-Meyer (Ricra, 2020). Si los datos no cumplen la normalidad y/o homogeneidad de varianza, se utilizará la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Resultados

Aislamiento y caracterización de los bacteriófagos activos

En total se aislaron 15 muestras de aguas residuales, de las cuales 8 (01, 02, 03, 04, C1, C2, C3 y C4) son pertenecientes a la laguna Mandinga en Veracruz, 5 muestras (P.V 1, 2, 3, 4 y 5) son del río Mismaloya de Puerto Vallarta y 2 (CU y Cardio) fueron recolectadas de charcos de agua de Ciudad Universitaria en la CDMX y el otro en los alrededores del Instituto Nacional de Cardiología. Estas mismas muestras se utilizó el método de goteo en placas para su primera amplificación, utilizando la cepa PA14 como hospedero, se goteo las muestras de agua, obteniendo solo 6 muestras con fagos activos (Figura 1). Después se procedió a purificar el fago estriándolo para después hacer una segunda

amplificación en la que se obtuvo con un título alto los fagos CU con 1.96×10^{10} UFP/mL y el fago C2 con 1.96×10^{10} UFP/mL (Tabla 1).

Figura 1. Goteo en placas de las muestras de agua.

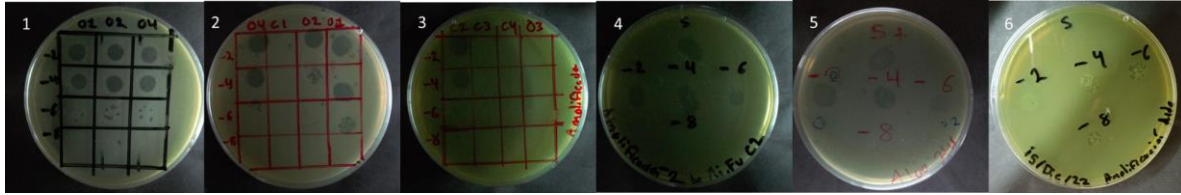


Tabla 1. Titulación de bacteriófagos de dos amplificaciones (UFP/mL).

Bacteriófagos	Primer amplificación Título 1 en -6	Segunda amplificación Título 2 en -6	En dilución en -8
1	6.8×10^{10}	4×10^8	-
2	4×10^8	9.2×10^9	-
4	2.2×10^{10}	1.4×10^9	-
C2	1.5×10^9	1.96×10^{10}	-
CU	1.7×10^9	1.24×10^{10}	-
Cardio	1.2×10^{10}	3.8×10^9	1.5×10^{11}

La secuenciación del DNA fágico no se pudo realizar por falta de tiempo, sin embargo, es un punto de partida para futuras investigaciones. Para ver el rango de hospedero se goteo en cepas multidrogoresistentes obteniendo el fago CU y C2 como capaces de poder identificar lisis claras en las cepas RME 118, RME 58, RME 60 RME 22, RME 66, RME101, E12, E1, MT2 y PAO1 de *P. aeruginosa* (Tabla 2) (Figura 2. Anexo). El fago 02 y 04 solo pudieron lisar claramente las cepas RME 66, RME101, E12, E1, MT2 y PAO1. Por último, con un menor rango de hospedero está el fago 01 solo las cepas RME 66, RME101, E12, E1, MT2 y PAO1 y el fago Cardio que liso a las cepas RME 66, RME101, E12, E1, MT2 y PAO1.

Tabla 2. Rango de hospedero en cepas multidrogoresistentes.

Cepas de <i>P.aeruginosas</i>	Fagos					
	01	02	04	C2	CU	Cardio
RME 118	Red	Red	Red	Blue	Blue	Red
RME 58	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red
RME 60	Red	Red	Red	Blue	Blue	Red
RME 22	Red	Blue	Blue	Blue	Blue	Red
RME 66	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Red
RME 101	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue

E12	■	■	■	■	■	■
E1	■	■	■	■	■	■
MT2	■	■	■	■	■	■
PA01	■	■	■	■	■	■

Presencia de Fago	■
No hay presencia de Fago	■

En la eficacia de combinaciones se seleccionó una cepa multidrogoresistente (RME 58) y como control la cepa PA14 para aislar clonas resistentes a los fagos marcados como 58 R1F01, 58 R1F02, 58 R1F04, 58 R1FC2 y 58 R1FCU para la cepa RME 58 y para el control PA14 se nombraron 14 R1F01, 14 R1F02, 14 R1F04, 14 R1FC2 y 14 R1FCU (Figura 3 y 4. Anexo). Los cuales R es de resistente, F es de fago seguido con el nombre asignado. En el goteo en placa de las clonas resistentes de la cepa PA14 se pudo observar que en 14 R1F01 sólo el fago 04 y CU se vio ligeramente lisis, en la mutante 14 R1F02 sólo el fago cardio se vio ligeramente lisis, en la mutante 14 R1F04 y 14 R1FC2 solo los fagos 04, 02, CU y cardio pudieron producir una lisis ligera, en 14 R1FCU solo se pudo observar lisis con el fago cardio y para 14 R1FCardio se apreció lisis con los fagos 01, 02, 04, C2 y CU (Tabla 3). Para las clonas resistentes de RME 58 se pudo observar una mayor resistencia a los fagos por lo que solo hubo ligeramente lisis, para ello se usó 6 fagos de la colección y se pudo observar en la mutante 58 R1FC2 una lisis más clara por el fago FRN2 (Tabla 4).

Tabla 3. Clonas resistentes de la cepa PA14 más los fagos 01, 02, 04, C2, CU y Cardio.

Clonas resistentes de la cepa PA14	Fagos					
	1	2	4	C2	CU	Cardio
R1F01	■	■	■	■	■	■
R1F02	■	■	■	■	■	■
R1F04	■	■	■	■	■	■
R1FC2	■	■	■	■	■	■
R1FCU	■	■	■	■	■	■
R1FCardio	■	■	■	■	■	■

Tabla 4. Clonas resistentes de la cepa RME 58 con los fagos 01, 02, 04, C2, CU, Cardio, F1, F10, FRN2, FX y FQ.

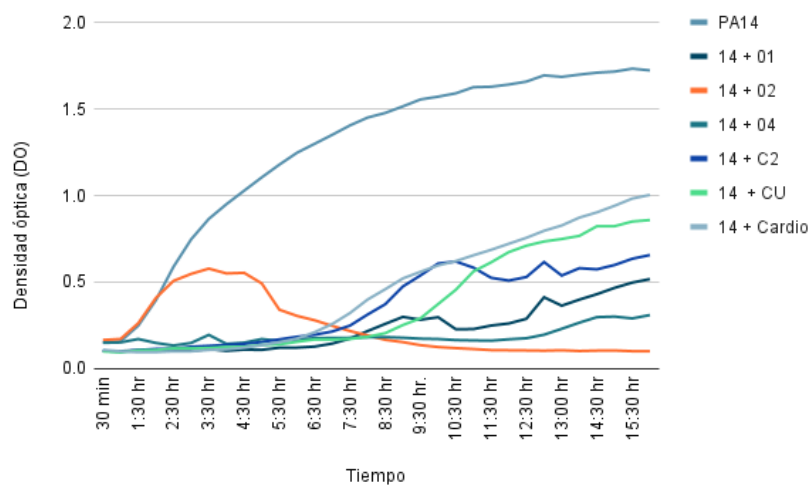
Clonas resistentes de la cepa RME 58	Fagos											
	1	2	4	C2	CU	Cardio	F1	F7	F10	FRN2	FX	FQ

R1F01	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
R1F02	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
R1F04	Red	Red	Blue	Red	Blue	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Blue
R1FC2	Red	Red	Blue	Red	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Red
R1FCU	Red	Red	Blue	Red	Blue	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red

Presencia de Fago	Blue
No hay presencia de Fago	Red

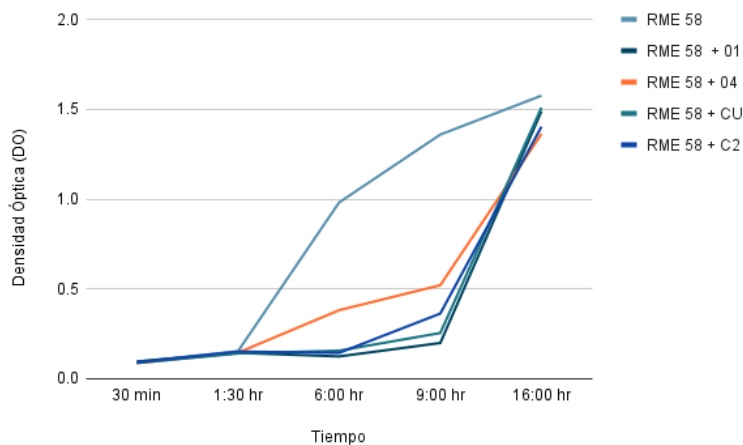
Las curvas de inhibición por fagos se observan en el eje de la Y una densidad óptica (DO) inicial de 0.05 y en el eje de la X el tiempo transcurrido durante 15 hr. En el control PA14 con el fago 01 hay un leve crecimiento en 2:30 hr, sin embargo, conforme pasa el tiempo se muestra una inhibición total y para el fago 02 en las primeras 7 hr se mantiene la inhibición del fago, las horas restantes se observó un aumento en el crecimiento (Figura 5). El fago 04 mantiene un nulo crecimiento hasta las 12:30 hr, en las horas restantes empieza a ver un aumento. La curva se mantiene para el fago C2 hasta las 7:30 sin crecimiento, a partir de ese tiempo empieza a ver crecimiento de las resistentes (Figura 5). Para el fago CU se observa latente hasta las 9:30 hr y el fago cardio hay un crecimiento a las 5:30 (Figura 5).

Figura 5. Curva de inhibición de la cepa PA14 con los fagos 01, 02, 04, C2, CU y Cardio.



Las curvas de inhibición por fagos en RME 58 como cepa multidrogorresistente se observa una disminución en el crecimiento con el fago 01 durante 9 hr, a partir de allí hay un aumento en el mismo. El fago 04 tiene un aumento a partir de 1:30 hr, sin embargo, se observa a las 9 hr crecimiento exponencial a comparación de la cepa original. La inhibición se mantiene en 1:30 para el fago CU y para C2 se mantiene en exhibición hasta las 9 hr (Figura 6).

Figura 6. Curva de inhibición con la cepa RME 58 con los fagos 01, 04, CU y C2..



Para poder ver la inhibición del crecimiento por fago en las clonas resistentes se hicieron las siguientes curvas de crecimiento iniciando con una DO de 0.05. El crecimiento de las clonas sin fago se puede observar una similitud entre 1 y 1.5 en 58 R1F01, 58 R1F04, 58 R1FC2 y con un crecimiento lento se encuentra 58 R1FCU (Figura 7). Al hacer una combinación entre fagos se puede observar que para 58 R1F01 no hay ninguna inhibición del crecimiento por ningún fago (Figura 8). Para 58 R1FC2 hay una inhibición total en el crecimiento por parte del fago F10 y con el fago 04 se mantiene hasta su decrecimiento (Figura 8). En 58 R1F04 se nota una leve disminución en el crecimiento por parte del fago C2 y CU entre 0.50 y 1 (Figura 8). La clona 58 R1FCU tiene un decrecimiento con el fago 04 (Figura 8).

Figura 7. Curva de crecimiento sin fago de las clonas resistentes de la cepa RME 58.

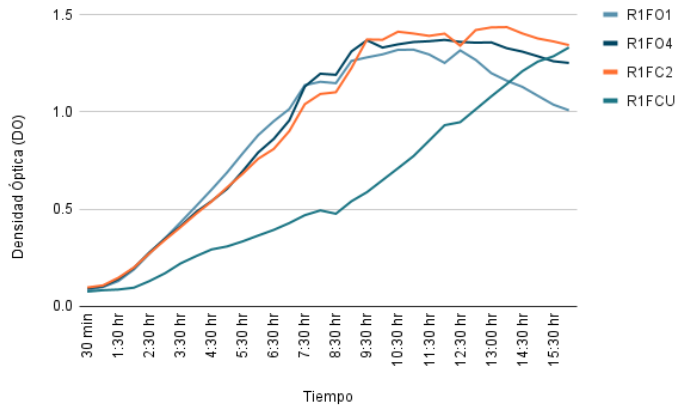
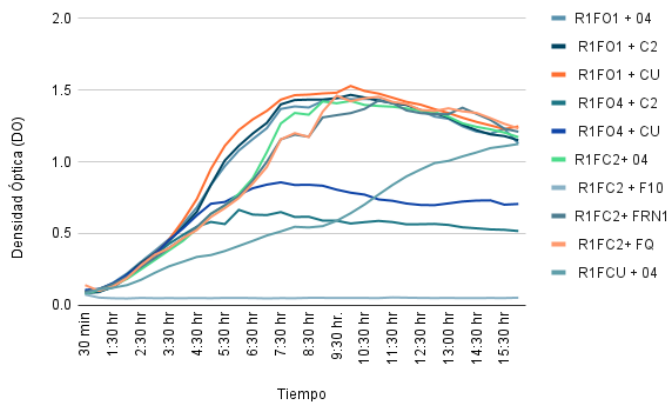


Figura 8. Curva de inhibición de clonas resistentes de la cepa RME 58 con los fagos aislados.



Cambios en su perfil de resistencia a antibióticos de clonas resistentes de la cepa RME 58

Se seleccionaron 10 antibióticos para ver su sensibilidad en la cepa RME 58 y sus clonas resistentes a los fagos de *Pseudomonas aeruginosa*. En el perfil de su sensibilidad a antibióticos no hubo ninguna diferencia dado que todas son resistentes a los mismos antibióticos. No hubo diferencias significativas en la cantidad mínima inhibitoria (CMI) en piperacilina, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, doripenem, meropenem, amikacina, gentamicina, ciprofloxacino y tigeciclina. Sin embargo, la mutante 58 R1F01 y 58 R1F04 si tuvieron diferencias

significativas ya que aumentó su CMI en imipenem y disminuye su sensibilidad en 58 R1F04. En la prueba de ANOVA tuvo un valor de $P > 0.999$ por lo que no hay diferencias significativas en el cambio de CMI.

Antibiótico	Clonas resistentes											
	RME 58	CM1	58 R1F01	CMI	58 R1FO 2	CMI	58 R1F 04	CMI	58 R1F C2	CMI	58 R1F CU	CMI
BLEE												
Ampicilina / Sulbactam												
Piperacilina / Tazobactam	R	≥ 128	R	≥ 12 8	R	≥ 12 8	R	≥ 12 8	R	≥ 12 8	R	≥ 12 8
Cefoxitina												
Ceftazidima	R	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64
Ceftriaxona	R	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64
Cefepima	R	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64
Doripenem	R	≥ 8	R	≥ 8	R	≥ 8	R	≥ 8	R	≥ 8	R	≥ 8
Ertapenem												
Imipenem	R	≥ 16	R	2*	R	≥ 16	R	2*	R	≥ 16	R	≥ 16
Meropenem	R	8	R	8	R	8	R	≥ 16	R	8	R	8
Amicaciona	R	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64
Gentamicina	R	≥ 16	R	≥ 16	R	≥ 16	R	≥ 16	R	≥ 16	R	≥ 16
Ciprofloxacino	R	≥ 4	R	≥ 4	R	≥ 4	R	≥ 4	R	≥ 4	R	≥ 4
Tigeciclina	R	≥ 8	R	≥ 8	R	≥ 8	R	≥ 8	R	≥ 8	R	≥ 8

Modelo *in vivo* infectando a *Galleria mellonella*

La infección en *Galleria mellonella* con la cepa RME 58 se hizo con una dilución a la 10^{-5} el cual se goteo en placas con el medio solido Lysogeny Broth (LB) para observar cuántas unidades formadoras de placas (UFC) se inyectaron inicialmente en la polilla de cera, por lo que se obtuvo lo siguiente en 20 microlitros: 11 UFC en R1F01, 21 UFC en R1F04, 21 UFC en R1FC2 y 29 en R1FCU (Figura 9. Anexo). En la infección de la cepa RME 58 en las larvas todas murieron el primer día con un porcentaje de supervivencia de 0. Con el fago 01 hubo un porcentaje de supervivencia de 30 el primer día, para el fago 02 el porcentaje de supervivencia es de 10 hasta el día 3, con el fago 04 es de un 0% en el primer día, el porcentaje de supervivencia en el primer día del fago C2 y CU es del 50 % y para el fago cardio es de 0% (Figura 10). En las clonas resistentes a los fagos se escogió el fago CU y C2 por tener un perfil sobresaliente para poder infectar mutantes resistentes a los fagos en la que se obtuvo lo siguiente: el fago

CU en las larvas infectadas por las mutantes 58 R1F01 y 58 R1FC2 tiene 40 % de supervivencia en el día 1, sin embargo, R1F04 tuvo un porcentaje de supervivencia de 0 muriendo el primer día (Figura 12). La mutante 58 R1F01 con el fago C2 tuvo una tasa de supervivencia del 50 % al día 5 (Figura 13).

Figura 10. Análisis de supervivencia de la cepa RME 58 con los fagos 01, 02, 04, C2 y CU modelo *in vivo* con *G. mallonella*.

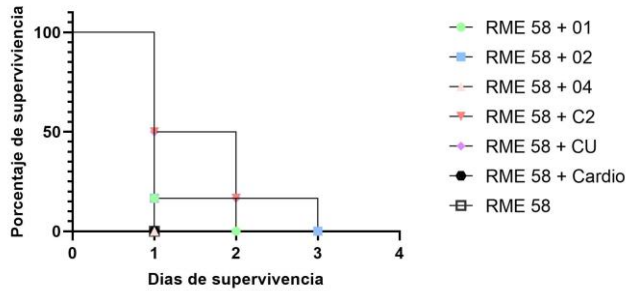


Figura 11. Análisis de supervivencia en clones resistentes de la cepa RME 58 los fagos en modelo *in vivo* con *G. mallonella*.

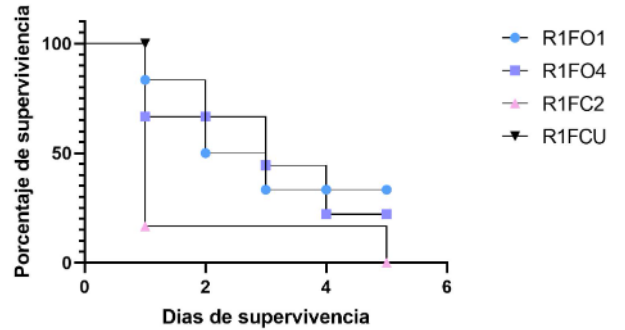


Figura 12. Análisis de supervivencia en clones resistentes de la cepa RME 58 con el fago CU en modelo *in vivo* con *G. mallonella*.

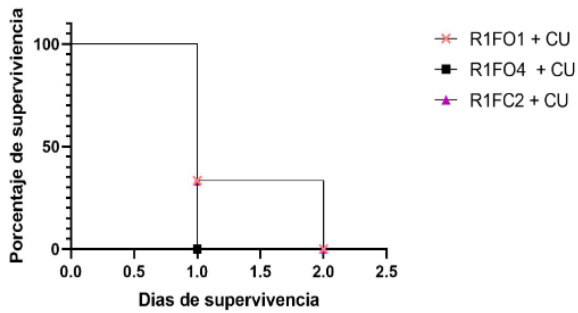
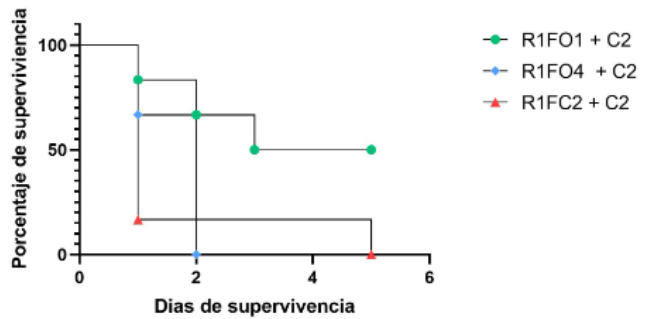


Figura 13. Análisis de supervivencia en clones resistentes de la cepa RME 58 con el fago C2 en modelo *in vivo* con *G. mallonella*.



Discusión

Celosia (2020) obtuvo como resultados que el bacteriófago BI EPEC con un título de $2.62 \pm 0.67 \times 10^{10}$ UFP/mL, el cual es el más alto de 6 fagos aislados con títulos entre 10^8 a 10^{10} UFP/mL. De acuerdo con Kolenda (2020) los bacteriófagos con potencial terapéutico tiene un título que oscila entre 10^7 a 10^9 UFP/mL. Por lo que comparado con los resultados obtenidos se puede apreciar que los 6 fagos aislados tienen un título sobresaliente con potencial terapéutico. El goteo en placas para el rango de hospedero de los 6 fagos aislados en cepas multidrogoresistentes se observó que solo el fago C2 y el fago CU pudo infectar a las 10 cepas seleccionadas, comparado con otro estudio de Llanos (2019) se observa en menor rango en el cual utilizo 9 fagos contra 46 cepas MDR de *P. aeruginosa* en el que obtuvo que el fago ϕ 6C1/A infectó a 7 y el ϕ MARC-GB a 6 cepas de origen clínico. Otra investigación es la de Majdani *et al.* (2020) donde aisló 15 fagos de los cuales se les hizo un rango de huésped en 15 cepas en el que destacó con un espectro más amplio el fago PPaMa1/18 infectando a 12 cepas.

En la curva de inhibición con la cepa RME 58 se pudo observar que los fagos inhibieron el crecimiento en 9 hr aproximadamente con una multiplicidad de infección (MOI) de 10, comparado con Sharma *et al.* (2021) se obtuvieron resultados similares con una MOI de 10 en la que el crecimiento fue nulo durante 8 horas en una cepa multidrogoresistente. Otra investigación es la de Imam *et al.* (2019) donde infecta a la cepa PAO1 con el fago MIJ3 durante 2 horas, 11 veces, en la que se puede observar un estado de inhibición durante el tiempo tomado con una MOI de 10. En la terapia con fagos, se recomienda repetir la dosis para aumentar la concentración de fagos en los sitios de infección (Li, *et al.* 2022). Sin embargo, estudios recientes demuestran que las dosis altas tratamientos de larga duración hay más probabilidad de mutaciones resistentes a los fagos (El, *et al.* 2019).

Yang *et al.* (2020) al aislar mutantes resistentes a fagos por goteo en placas de *P. aeruginosa* pudo observar que al gotear dos fagos con el nombre PaoP5 y PaoP5-m1 en 5 mutantes la lisis es completamente clara a excepción de una donde la lisis no es tan clara. Por lo que comparado con los resultados obtenidos en este trabajo las lisis es ligeramente observable, esto mismo se ve reflejado en la curva de crecimiento donde crece de manera similar con fago y sin fago a excepción del fago 04 que disminuye ligeramente la mutante del fago CU de RME 58. También se pudo observar que las mutantes del fago CU en RME 58 y como control en resistentes de PA14 del fago CU y 04 tenían producción de piomelanina dado que producen una pigmentación café o marrón, lo que indica que solo el 15 % de este pigmento se observa en mutantes resistentes a fagos reflejando una aberración en rutas metabólicas de la tirosina en mutaciones en

hmgA lo que lleva a la auto comulación y autooxidación produciendo un aumento en su virulencia (Menon, *et al.* 2022).

Xuan *et al.* (2022) obtuvo resultados similares en la resistencia en antibióticos en mutante de PO1 con el nombre PA01-R1 donde no tuvo diferencias significativas en cuanto la CM1 y la cepa original a excepción de la gentamicina y la polimixina en la que tuvo de diferencia 1 y de 8 CM1 una de otra. Otra investigación es la de Li *et al.* (2022) en la que utilizaron las clonas resistentes a los fagos de la cepa silvestre ZS-PA-16 a la que nombraron phipa4-R, obteniendo perfiles idénticos en la prueba de susceptibilidad a antibióticos, por lo contrario la cepa ZS-PA-35 y las mutantes phipa2-R y phipa10-R tuvieron perfiles diferentes a antibióticos, por lo que ambas cepas silvestres son resistentes a tetraciclina-clavulánico y tigeciclina, y sensibles a ceftazidima, cefoperazona/sulbactam, cefepima, amikacina, tobramicina, ciprofloxacina, levofloxacina y colistina. Mencionado lo anterior el perfil de resistencia a antibióticos de las mutantes aisladas de RME 58 de los fagos 01, 04, C2 y CU en cuanto a su CMI no tuvieron diferencias significativas.

Antonie *et al.* (2021) en el modelo en vivo de *Galleria mellonella* vio la eficacia que tiene el fago PEV2 en la cepa PAV237 en 4 días en diferentes MOI de 50.000, 5000 y 500 nombrándolos en grupo 5,6 y 7 en la que tuvo una tasa de supervivencia entre el 30 y 60 % a comparación del grupo 2 con el antibiótico PBS que dio solo un 20 %, sin embargo, con el antibiótico marbofloxacino tuvo una tasa de supervivencia mucho mayor entre el 90 y 100 %. Otra investigación es la de Jeon y Yong (2019) en la utiliza los fagos B-R656 y B-R1836 para poder infectar en MOI de 100, 10 y 1 en las cepas de *P. aeruginosa* (R656 y R1836) en 72 hr en la que pudo observar en una MOI de 10 una tasa de supervivencia del 20 al 30 % y en una MOI de 100 entre 50 y 60 %, por lo que concluye una demostración con gran eficacia de los dos fagos en la infección de *P. aeruginosa* sobre *G. mellonella*. Comparado con los resultados obtenidos el fago CU y C2 tuvo una tasa de supervivencia del 20 % con una MOI de 100 en RME 58 y en la mutante R1F01 con el fago C2 su tasa es del 50 %, por lo que es menor a las investigaciones mencionadas en la cepa huésped y mayor en resistentes.

Conclusión

La identificación de bacteriófagos activos contra cepas multidrogoresistente de *P. aeruginosa* es de suma importancia para combatir este agente infeccioso, por esto mismo se identificó los bacteriófagos C2 y CU con la posibilidad de ser usados en fago terapias contra patógenos como lo es *P. aeruginosa*. En el aislamiento y purificación de aguas residuales se identificaron 6 fagos con potencial terapéutico de solo 15 muestras, de estos fagos destacó el fago CU y C2. Por lo que se espera en futuros estudios se muestre genéticamente si no tienen genes relacionados a la lisogenia y sean fagos puramente líticos para su eficacia en combatir infecciones de cepas multidrogoresistentes.

La caracterización mediante curvas de inhibición y crecimiento en cepas multidrogoresistentes (MDR) sobresalen con un perfil amplio de infección con potencial terapéutico son los fagos CU y C2 al igual que en el rango de hospedero, sin embargo, el fago 04 también destaca inhibiendo ligeramente el crecimiento. Probando la eficacia de combinaciones de bacteriófagos *in vitro* contra cepas MDR (Multidrogoresistentes) y sus clonas resistentes de *P. aeruginosa* el fago C2 y CU es eficaz dado los demás fagos su infección es ligeramente notable por lo que su comportamiento de las clonas resistentes es similar a la cepa original. Se sugiere en futuras investigación aislar fagos mutantes con el potencial de poder infectar mutantes resistentes a ellos mismos.

Probando la eficacia de combinaciones de bacteriófagos *in vivo* en el modelo de *Galleria mellonella* (Polilla de la cera) contra la cepa multidrogoresistente y clonas resistentes de *P. aeruginosa* los fagos aislados son ligeramente ineficaces con tasas de supervivencia de menos del 20 % en la cepa MDR y 50 % en mutantes, pero como posibles candidatos están el fago C2 y CU tanto en infección en larvas con la cepa MDR y en mutantes resistente a la cepa huésped.

Bibliográficas

Arizmendi, N., Hernández E., Villegas, O. y Torres O. (2015). Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéutica*. 2, 23-24.

Armbruster, C. R., Lee, C. K., Parker, J., de Anda, J., Xia, A., Zhao, K. y Parsek, R. (2019). Heterogeneity in surface sensing suggests a division of labor in *Pseudomonas aeruginosa* populations. *ELife*, 8, 3-6.

Antoine, C., Laforêt, F., Blasdel, B., Glonti, T., Kutter, E., Pirnay, J. P. y Thiry, D. (2021). *Efficacy assessment of PEV2 phage on Galleria mellonella larvae infected with a Pseudomonas aeruginosa dog otitis isolate*. *Research in Veterinary Science*. 136, 598–601. doi:10.1016/j.rvsc.2021.04.010

Cazares, D., Bustamante, V. y Martínez, I. (2019) El enemigo de mi enemigo es mi amigo. *Biotechnol Pharmaceuticals*. 2, 3-4.

Chegini, Z., Khoshbayan, A., Taati Moghadam, M., Farahani, I., Jazireian, P., y Shariati, A. (2020). Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: A review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 19(1), 1-17.

Dini, C. (2011). *Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata). 4 (4), 13-14.

El Haddad, L., Harb, P. Gebara A., Stibich A., y Chemaly F. (2019). A systematic and critical review of bacteriophage therapy against multidrugresistant ESKAPE organisms in humans. *Clinical Infectious Diseases*. 69, 167-178. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy947>.

Furfaro, L. L., Payne, M. S., y Chang, B. J. (2018). Bacteriophage therapy: clinical trials and regulatory hurdles. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 376-378.

Harper, D. R. (2018). Criteria for selecting suitable infectious diseases for phage therapy. *Viruses*. 10(4), 177-178.

Hyman, P. (2019). Phages for phage therapy: Isolation, characterization, and host range breadth. *Pharmaceuticals*. 12(1). 2-7.

Imam, M., Alrashid, B., Patel, F., Dowah, A., Brown, N., Millard, A., Clokie, M. y Galyov, E. (2019). vB_PaeM_MIJ3, a novel jumbo phage infecting *Pseudomonas aeruginosa*, possesses unusual genomic features. *Frontiers in Microbiology*. 10, 10-11. doi: 10.3389/fmicb.2019.02772

Jenkinson, J. (2018). Molecular biology meets the learning sciences: Visualizations in education and outreach. *Journal of molecular biology*. 430(21), 4013-4027.

Jeon, J., y Yong, D. (2019). Two novel bacteriophages improve survival in *Galleria mellonella* infection and mouse acute pneumonia models infected with extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. 85(9), 18-20.

Kang, D., Revtovich, A. V., Chen, Q., Shah, K. N., Cannon, C. L. y Kirienko, N. V. (2019). Pyoverdine-dependent virulence of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Frontiers in Microbiology*. 10, 1-8.

Kolenda C., Josse J., Medina M., Fevre C., Lustig S., Ferry T. y Laurent F. (2020). Evaluation of the Activity of a Combination of Three Bacteriophages Alone or in Association with Antibiotics on *Staphylococcus aureus* Embedded in Biofilm or Internalized in Osteoblasts. *Antimicrob Agents Chemother*. 64(3). 1-4. doi: 10.1128/AAC.02231-19. PMID: 31871084; PMCID: PMC7038305.

Lee, C. K., Vachier, J., de Anda, J., Zhao, K., Baker, A. E., Bennett, R. R. y Wong, G. C. (2020). Social cooperativity of bacteria during reversible surface attachment in young biofilms: A quantitative comparison of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 and PAO1. *MBio*. 11(1), 6-14.

López, L.E., Garza G., Hernández, M., Franco, R., Loarca, D., Romero, D., Nguyen, P.T.D., Maeda, T., González, B., Díaz, M., Sánchez, J.L., Díaz, D. y García, R. (2019). AiiM Lactonase Strongly Reduces Quorum Sensing Controlled Virulence Factors in Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Burned Patients. *Frontiers in microbiology*. 10. 4-8.

Li, N., Zeng, Y., Wang, M., Bao, R., Chen, Y., Li, X. y Tan, D. (2022). Characterization of phage resistance and their impacts on bacterial fitness in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology Spectrum*, 10(5), 20-22.

Lukman, C., Yonathan, C. Magdalena, S. y Waturangi, D. (2020). Isolation and characterization of pathogenic *Escherichia coli* bacteriophages from chicken and beef offal. *BMC Research Note*,13, 8-10. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4859-y>

Llanos, D. (2019). Caracterización de bacteriófagos nativos candidatos a fagoterapia en infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antibióticos y productoras de biopelícula. *Tesis EP Microbiología y Parasitología*. 3, 40-43.

Majdani, R. y Shams, E. (2022) Isolation and characterization of lytic bacteriophages against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from human infections

in the north-west of Iran. *Iranian Journal Microbiology*.14(2),12-14. doi: 10.18502/ijm.v14i2.9189

Menon, N. D., Penziner, S., Montañaño, E. T., Zurich, R., Pride, D. T., Nair, B. G. y Nizet, V. (2022). Increased innate immune susceptibility in hyperpigmented bacteriophage-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 66(8), 22-23.

Oechslin, F. (2018). Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy. *Viruses*. 10(7), 351-352.

Oliveira, V. C., Bim, F. L., Monteiro, R. M., Macedo, A. P., Santos, E. S., Silva-Lovato, C. H., y Watanabe, E. (2020). Identification and characterization of new bacteriophages to control multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilm on endotracheal tubes. *Frontiers in microbiology*. 11, 3-8.

Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. y Cheng, Z. (2019). Resistencia a antibióticos en *Pseudomonas aeruginosa*: mecanismos y estrategias terapéuticas alternativas. *Avances en biotecnología*. 37 (1), 177-192.

Pachori, P., Gothwal, R., y Gandhi, P. (2019). Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes & diseases*. 6(2), 109-119.

Rebasa, P. (2005). Conceptos básicos del análisis de supervivencia. *Cirugía española*. 78(4), 222-230.

Ricra, H. J., y Ullilen, J. L. (2020). Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico a diferentes concentraciones de las hojas de Luma chequen (Molina) A. Gray" Arrayán" en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. *Tesis EP Microbiología y Parasitología*. 5, 7-10

Ramarao, N., Nielson, C. y Lereclus, D. (2012). The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *Journal of Visualized Experiments*. 4, 70-72.

Sharma, S., Datta, S., Chatterjee, S., Dutta, M., Samanta, J., Vairale, M. G., y Dwivedi, S. K. (2021). Isolation and characterization of a lytic bacteriophage against *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific reports*. 11(1), 1-22.

Thi, M. T., Wibowo, D., y Rehm, B. H. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International journal of molecular sciences*. 21(22), 8-10.

Tkhilaishvili, T., Winkler, T., Müller, M., Perka, C., y Trampuz, A. (2019). Bacteriophages as adjuvant to antibiotics for the treatment of periprosthetic joint

infection caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 64(1), 10-11.

Vaitekenas, A., Tai, A.S., Ramsay, J.P., Stick, S.M y Kicic, A. (2021) A *Pseudomonas aeruginosa* Resistance to Bacteriophages and Its Prevention by Strategic Therapeutic Cocktail Formulation. *Antibiotics*. 10, 2-4. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020145>

Van Nieuwenhuysse, B., Van der Linden, D., Chatzis, O., Lood, C., Wagemans, J., Lavigne, R., y Pirnay, JP. (2022). Bacteriophage-antibiotic combination therapy against extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection to allow liver transplantation in a toddler. *Nature Communications*. 13 (1), 1-12.

Yuan, Y., Qu, K., Tan, D., Li, X., Wang, L., Cong, C., y Xu, Y. (2019). Isolation and characterization of a bacteriophage and its potential to disrupt multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbial pathogenesis*, 128, 329-336.

Yang, Y., Shen, W., Zhong, Q., Chen, Q., He, X., Baker, JL., Xiong, K., Jin X., Wang, J., Hu, F. y Le, S. (2020). Desarrollo de un cóctel de bacteriófagos para limitar la aparición de bacterias resistentes a los fagos *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in microbiology*. 11, 327-330. doi: 10.3389/fmicb.2020.00327

Anexo

Figura 2. Goteo en placas de las cepas multidrogoresistentes: RME 22 (5), 58 (2), 60 (1), 66(10), 101 (9), 118 (3), E12 (4), E1(6), MT2 (7), PAO1(8).

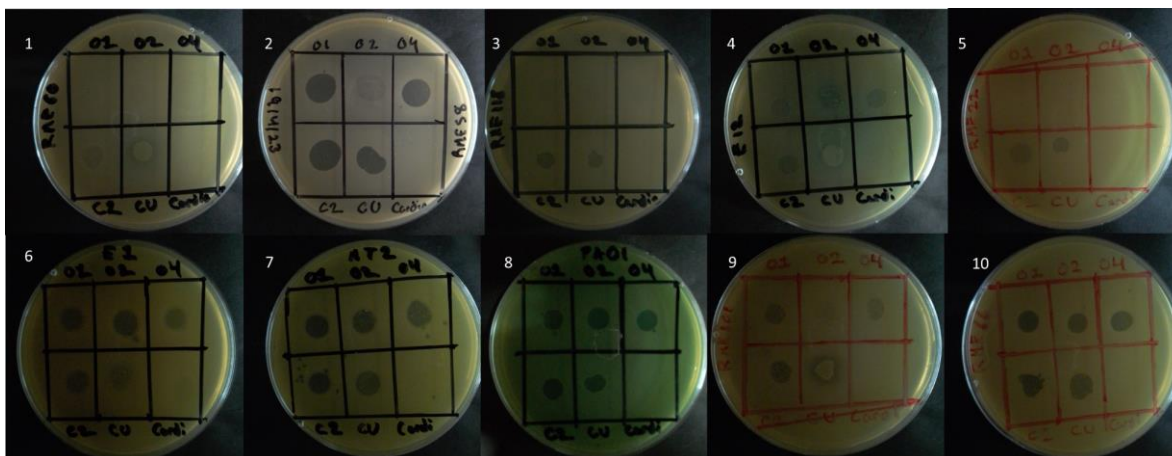


Figura 3. Goteo en placas de clonas resistentes a fagos de PA14: R1F01 (1), R1F02 (2), R1F04 (3), R1FC2 (4), R1FCU (5), R1FCardio (6).

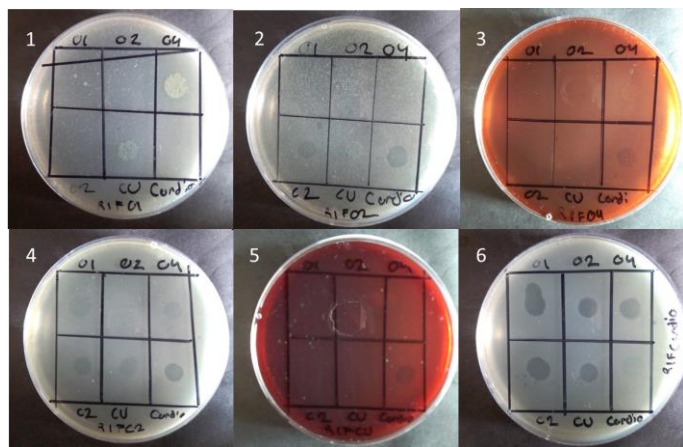


Figura 4. Goteo en placas de de clonas resistentes a fagos de RME 58: R1F01 (1), R1F04 (2), R1FC2 (3), R1FCU (4).

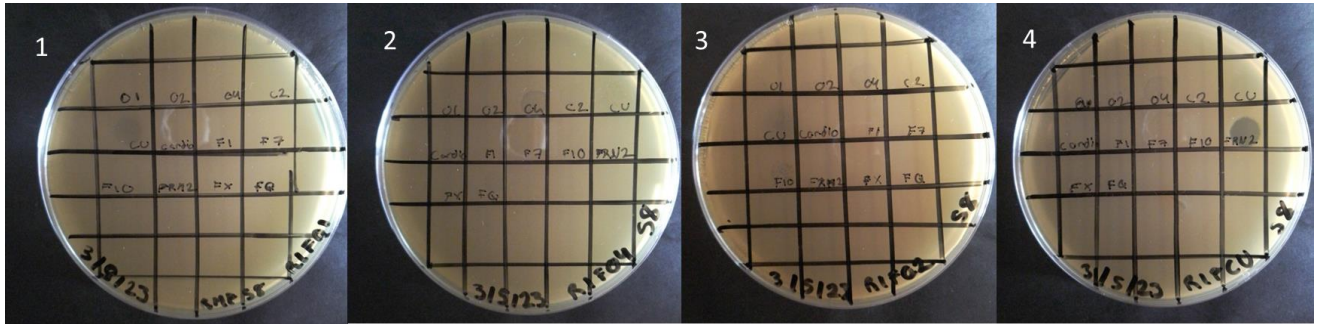


Figura 9. Goteo en placa de dilución a la 10^{-5} de UFC de clonas de RME 58.

