



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

**Efecto de bacteriófagos líticos sobre biopelículas producidas por
aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente.**

**TESINA
QUE PARA OBTENER EL:
GRADO DE ESPECIALISTA EN: BIOQUÍMICA CLÍNICA**

Presenta:
Zaide Gabriela Chávez Ortiz

Tutor:
Dr. José Molina López

Asesor Técnico:
Dr. Edgar González Villalobos



Cd. Mx. Ciudad Universitaria, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente: M en C Luis Manuel Perea Mejía
Vocal: M en C Carlos Alberto Eslava Campos
Secretario: Dr. Hugo Antonio Hernández Pérez
1er. Suplente: Dra. Verónica Viñuela Berni
2do. Suplente: Dr. Alberto García Lozano

Trabajo realizado en la Unidad Periférica de Investigación Básica Clínica en Enfermedades Infecciosas de Investigación/ Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina-UNAM, Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, de la Unidad de Hemato-Oncología e Investigación del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.

Tutor:

Dr. José Molina López

Sustentante:

QFB Zaide Gabriela Chávez Ortiz

Resumen

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) es una bacteria conocida por su capacidad para formar biopelículas, lo que dificulta el tratamiento de las infecciones asociadas a ella. En este estudio experimental, nos centramos en la evaluación de la actividad lítica de dos fagos: vB_Pae-phi_Mx1 y vB_Pae-phi_Mx2, sobre la biopelícula de 12 cepas de *P. aeruginosa* multirresistente. Se inició el estudio verificando la viabilidad y la pureza de todas las cepas que fueron usadas mediante el uso de MALDI-TOF y se identificó que una cepa (la número 1) no correspondía a *Pseudomonas*, por lo que fue excluida del análisis; posteriormente se realizó la propagación de los fagos en donde se obtuvo un título más alto para el fago vB_Pae-phi_Mx1. Al evaluar el efecto lítico se observó que el fago vB_Pae-phi_Mx1 presentaba una actividad lítica estadísticamente significativa contra todas las biopelículas de *P. aeruginosa* estudiadas, este hallazgo destaca la eficacia del fago en la eliminación del exopolisacárido. En el caso del fago vB_Pae-phi_Mx2, se obtuvo un efecto lítico en 11 de las 12 cepas analizadas, sin embargo, la cepa 83 demostró resistencia, indicando posibles variaciones en la susceptibilidad. Este estudio experimental proporciona evidencia de la capacidad lítica de los fagos vB_Pae-phi_Mx1 y vB_Pae-phi_Mx2 sobre la biopelícula de *P. aeruginosa*, lo que sugiere que podrían ser herramientas prometedoras en el control de biopelículas.

Índice

Introducción	1
Justificación	19
Hipótesis	20
Objetivo general	20
Objetivos específicos	20
Material	22
Metodología	24
Resultados	31
Discusión	38
Conclusión	45
Bibliografía.....	46

Introducción

En el ámbito hospitalario, la presencia y persistencia de microorganismos patógenos representan un desafío constante para la atención médica debido a su resistencia a los antibióticos, su capacidad para causar infecciones graves, además de los costos asociados con su tratamiento y manejo. Entre estos microorganismos, el acrónimo ESKAPE identifica a seis especies bacterianas que muestran una habilidad excepcional para evadir los efectos de los tratamientos antimicrobianos convencionales. Estos microorganismos son *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacter spp.* La resistencia a múltiples fármacos de estos microorganismos limita las opciones de tratamiento y aumenta la morbilidad y mortalidad asociadas a las infecciones hospitalarias. Además, la transmisión de estos microorganismos entre pacientes y la capacidad de formar biopelículas en dispositivos médicos contribuyen a su persistencia (Santajit & Indrawattana, 2016).

En México se han realizados distintos estudios para evaluar el impacto en las infecciones asociadas a sistemas de salud de *P. aeruginosa* multirresistente encontrando que al ser resistente limita las opciones de tratamiento (González et al. 2019), además de infectar a pacientes inmunocomprometidos disminuyendo su capacidad de supervivencia al desarrollar una patología crónica (Bustamante et al. 2021). Lo que evidencia la necesidad de buscar nuevas terapias que puedan ayudar a eliminar estas infecciones.

Multirresistencia

La multirresistencia a los antibióticos es un fenómeno preocupante que ha surgido como una amenaza a la salud pública en todo el mundo pues se trata de la capacidad que han desarrollado los microorganismos para resistir los efectos de los bactericidas. Es clasificado como un problema crítico porque se asocia con altas probabilidades en el fracaso de un tratamiento antibiótico e infecciones recurrentes, las infecciones comunes que alguna vez fueron tratables pueden volverse intratables (Huemer et al., 2020), lo que lleva a un incremento en la tasa de morbilidad y mortalidad, que, a su vez aumentan los costos de la atención médica (Jean & Harnod, 2022).

Se ha documentado que los microorganismos hacen uso de diferentes estrategias que permiten la supervivencia de éstos. La resistencia innata es una característica constante de una especie, cepa o grupo bacteriano, que se atribuye a sus características físicas como lo puede ser la impermeabilidad de la membrana celular, la falta de algún receptor al antimicrobiano o la producción de enzimas que modifiquen o inactiven a los antibióticos. Otro tipo de resistencia es la adquirida y existen dos estrategias principales: la mutación genética y la adquisición de ADN a través de la transferencia horizontal de genes. Esta diversidad de mecanismos se va desarrollando con la finalidad de garantizar la supervivencia al inhibir los efectos de los antibióticos (Urban et al., 2022).

La comprensión de estos mecanismos junto con la vigilancia de la resistencia es crucial para el desarrollo de nuevas estrategias efectivas para combatir las infecciones por bacterias multirresistentes a los antibióticos (Shelanah et al., 2017).

Panorama en México

El panorama en México como en muchos de los países en vías de desarrollo se encuentra en una posición vulnerable frente a la multirresistencia. El uso excesivo e inadecuado de antibióticos representa uno de los factores más importantes, lo anterior engloba la prescripción inadecuada, la automedicación, el consumo de medicamentos de baja calidad y su uso indiscriminado en la ganadería y la agricultura para promover el crecimiento animal y vegetal, lo que ha fomentado la resistencia (Amábile, 2010).

En el 2018 se creó la Red Temática de Investigación y Vigilancia de la Farmacorresistencia para contribuir en el estudio de este problema, sin embargo, se necesitan más estudios a nivel nacional para generar datos fenotípicos y genotípicos sobre la distribución y la prevalencia de las especies problema. El monitoreo continuo nacional e internacional de la resistencia a los antibióticos junto con la genotipificación es fundamental para implementar las medidas adecuadas en control de infecciones (Garza et al., 2021).

En el estudio realizado por González & cols en 2019 se usaron diferentes tipos de muestras buscando cepas de *P. aeruginosa* multirresistente en pacientes hospitalizados, de las 92 muestras analizadas se encontró que el 50.9% de las muestras presentaban genes indicativos de resistencia a los antibióticos disponibles para terapia, esta resistencia puede conducir a un aumento en la gravedad, complicaciones y mortalidad en pacientes hospitalizados (González et al., 2019).

Importancia clínica

En el ambiente hospitalario los microorganismos se enfrentan a una presión de selección constante debido a la presencia de antibióticos. Este mecanismo favorece a la selección de cepas bacterianas resistentes que pueden transmitirse entre pacientes generando infecciones nosocomiales (Infecciones Asociadas a los Servicios de Salud). Estas ocurren en pacientes que han sido hospitalizados por diversas razones, como procedimientos quirúrgicos, enfermedades crónicas u otras, y pueden presentarse en diferentes partes del cuerpo, como heridas, tracto urinario, pulmones o torrente sanguíneo (Limeiech et al., 2021). La propagación puede ocurrir por contacto directo entre pacientes, así como por el contacto con superficies o equipo médico contaminado, uno de los ejemplos más mencionados es la neumonía asociada a ventilación mecánica (Plata & Ferrer, 2022). *P. aeruginosa* ha sido la más asociada a infecciones nosocomiales con una alta tasa de morbilidad y mortalidad (Pang et al., 2019).

Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa es una bacteria de gran relevancia en el ámbito médico y de laboratorio debido a su amplia distribución en el medio ambiente y a su capacidad para causar infecciones oportunistas en los seres humanos y otras especies (Yuan et al., 2019). Se trata de una bacteria perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*, presenta una forma de bacilo y está clasificada dentro de los gramnegativos debido a la estructura de su pared celular (Sharma et al., 2014). El nombre *aeruginosa* proviene del color verde que puede adquirir en los cultivos gracias a la producción de

pigmentos como la pioverdina y la piocianina, sin embargo, el color puede variar dependiendo de las cepas y las condiciones de crecimiento (Schalk, 2023)

P. aeruginosa se puede encontrar en diversos entornos como suelos, agua, plantas, animales y sistemas hospitalarios (Sharma et al., 2014). Aunque puede formar parte de la microbiota normal, es considerado un patógeno oportunista capaz de causar infecciones nosocomiales (Jurado et al., 2012), especialmente en pacientes inmunocomprometidos o con enfermedades crónicas (Pang et al., 2019). Su adaptabilidad y resistencia le permite colonizar áreas en las que otros microorganismos podrían tener dificultades para sobrevivir (Thi et al., 2020).

Importancia clínica

Al tratarse de un patógeno oportunista *P. aeruginosa* está asociada a una amplia cantidad de infecciones nosocomiales como las que se mencionan a continuación:

- Infecciones del Tracto Respiratorio: Es causante de neumonías, especialmente en aquellos que requieren ventilación mecánica o que padecen de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o fibrosis quística (FQ). Estas infecciones pueden ser difíciles debido a la resistencia de la bacteria a múltiples antibióticos (Jurado et al., 2021; Bustamante et al., 2021).
- Infección del Tracto Urinario: En pacientes con sondas urinarias o catéteres, *P. aeruginosa* puede colonizar, propagarse y convertirse en una infección más grave (Estaji et al., 2019; González et al., 2019;).

- Infección de heridas: *P. aeruginosa* puede infectar heridas quirúrgicas, quemaduras y otros sitios de traumatismo. La infección de estas puede ser especialmente problemática en pacientes inmunocomprometidos (Vanderwoude et al., 2020).
- Bacteriemia y Sepsis: Cuando este microorganismo ingresa al torrente sanguíneo a través de heridas, dispositivos médicos u otros medios, puede llevar al paciente a una infección más grave poniendo en peligro su vida (Jurado et al., 2021).

Factores de virulencia

Su capacidad para causar infecciones proviene de su amplio repertorio de factores de virulencia, estos factores son herramientas biológicas que le permiten colonizar y evadir la respuesta inmunitaria del huésped. En la figura 1 se muestran algunos de ellos (Jurado et al., 2021).

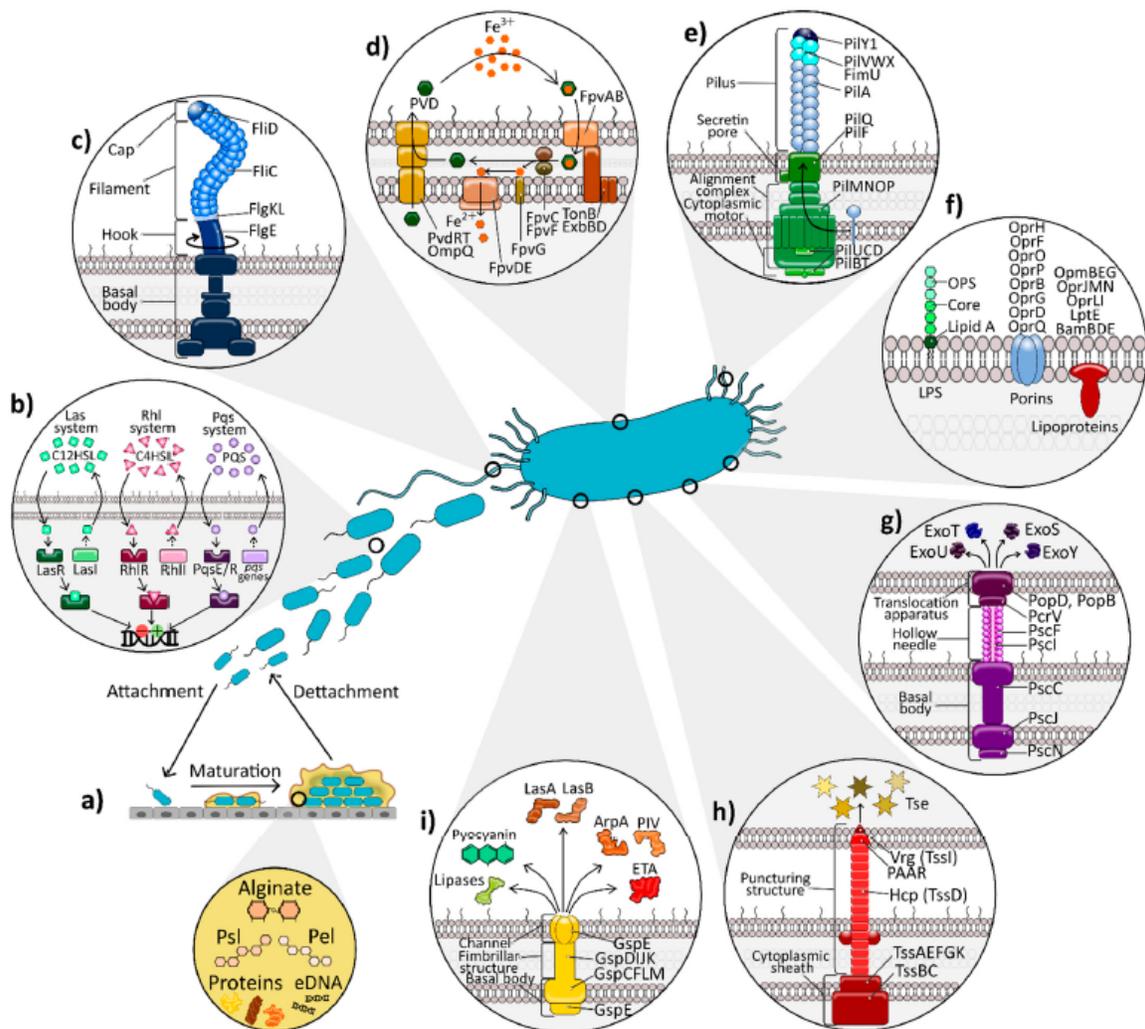


Figura 1: Factores de virulencia de *P. aeruginosa*. Esta bacteria presenta numerosas estructuras importantes para su virulencia, al ser un gramnegativo cuenta con lipopolisacárido (inciso f) que favorece la inflamación; también se pueden apreciar flagelos (c y e) que le otorgan movilidad y la capacidad de colonizar; cuenta con sistemas de secreción que facilitan la inyección de toxinas al hospedero (g y h) y otro que le permite secretar al exterior (i); la pioverdina (d) es importante en el secuestro del hierro; el *quorum sensing* (b) es un mecanismo de comunicación para coordinar a la población; y finalmente la formación de biopelículas (a) va a favorecer la supervivencia en diversos

entornos. Imagen tomada de *P. aeruginosa: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors* (2021).

Movilidad

Posee un flagelo polar responsable de la motilidad y que se considera un factor de virulencia importante pues la proteína FliC es responsable de unirse a las células de pulmón además su capacidad de unión flagelar contribuye al establecimiento inicial de la biopelícula. También cuenta con Pili tipo IV, el cual es una estructura esencial para el inicio de la infección al mediar la motilidad y adherencia (Sultan et al., 2021).

Sistemas de secreción

P. aeruginosa posee cinco sistemas capaces de secretar diferentes toxinas y enzimas para atacar al huésped. El sistema I y V implican la liberación de productos al medio extracelular como la proteasa alcalina, la esterasa y adhesinas. El sistema tipo II libera exoproteínas. El sistema tipo III es el más importante y es utilizado para desactivar el sistema inmunitario del huésped, inyectando directamente las toxinas al citosol de la célula blanco. El tipo IV produce toxinas bacterianas que eliminan al microbiota del huésped (Sultan et al., 2021).

Pigmentos

Entre los factores de virulencia se encuentran los pigmentos piocianina y pioverdina los cuales desempeñan un papel importante en la lesión de tejidos, así como la supresión del sistema inmunitario. La pioverdina secuestra al hierro del medio para ser usado en el desarrollo de biopelículas mientras que la piocianina presenta el efecto citotóxico que induce la lisis celular y libera el ADN al espacio extracelular para provocar un aumento en la viscosidad de la solución para favorecer la aparición de biopelícula (Thi et al., 2020). En la figura 2 se puede apreciar el color característico de un césped de *P. aeruginosa*.

Biopelícula

La formación de biopelículas por parte de *P. aeruginosa* es un factor de virulencia que favorece la supervivencia a la exposición de antibióticos y es considerado el inicio de infecciones crónicas (Ma et al., 2022).

Las biopelículas son estructuras tridimensionales de comunidades microbianas altamente organizadas que pueden adherirse a superficies bióticas (como el tejido humano) y abióticas (como dispositivos médicos), y desempeñan un papel crucial en la patogenicidad de *P. aeruginosa*. Se trata de una matriz extracelular compuesta principalmente de polisacáridos, algunas proteínas, ADN extracelular y lípidos (Moradali & Rehn 2020).

La biopelícula actúa como un escudo protector que ofrece numerosas ventajas a la bacteria, incluida la resistencia a los antimicrobianos, protección contra el sistema inmune del hospedero, la

facilitación de la colonización de superficies, proporciona nutrientes esenciales y la comunicación entre las células (Mauch et al, 2018).

Formación de biopelículas

Su formación es un proceso altamente regulado que involucra varios pasos y se ilustra en la figura 3 (Thi et al., 2020).

1. Adhesión inicial. La bacteria hace uso de sus flagelos, fimbrias y los Pili tipo IV para comenzar a adherirse a alguna superficie, la unión inicial es reversible y consta de interacciones electrostáticas y fuerzas de Van der Waals. Esta etapa es crucial para la colonización inicial.
2. Acumulación de células. Una vez que las células se han unido a la superficie, la unión cambia a su forma irreversible y las bacterias comienzan a multiplicarse.
3. Biopelícula joven. Las bacterias comienzan a formar microcolonias rodeadas por una matriz extracelular parcial que va a actuar como una especie de pegamento.
4. Maduración de la biopelícula. Las microcolonias comienzan a formar una estructura tridimensional altamente organizada que va a contener canales en donde los nutrientes estarán disponibles para todas las células que conforman la biopelícula.
5. Liberación. La formación de biopelícula es un proceso dinámico y el desprendimiento bacteriano es parte de ello, esto ocurre para liberar a la población dispersa y se da por el agotamiento de nutrientes o la presencia de agentes bactericidas.
6. Transición a fenotipos planctónicos. Las células liberadas van a pasar a este fenotipo para ocupar espacios no colonizados y repetir el ciclo.

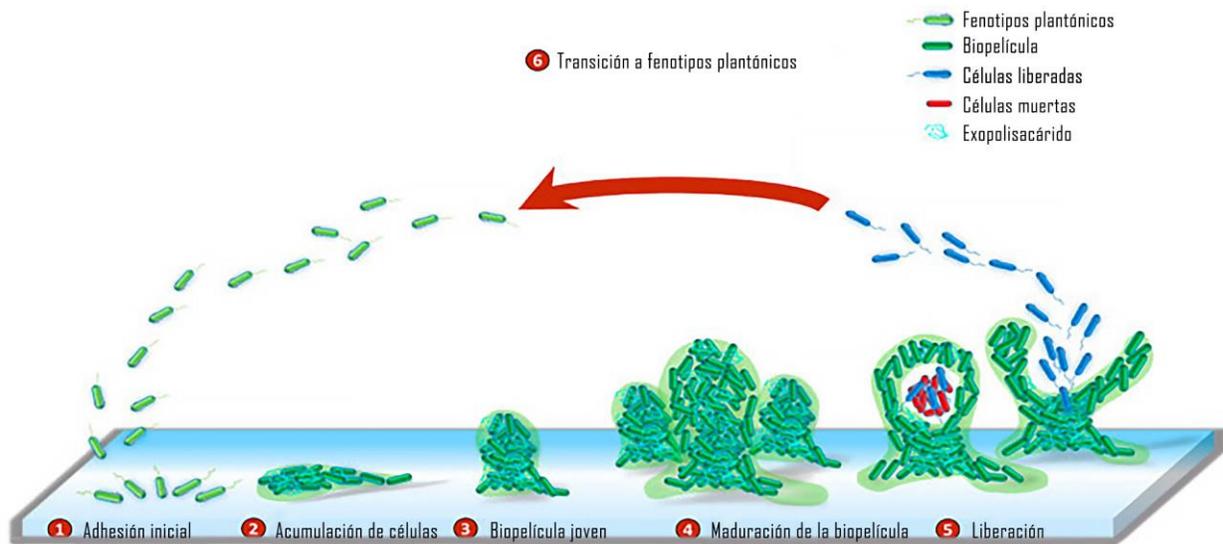


Figura 2. Formación de biopelícula. La formación de esta estructura es una estrategia adaptativa que le confiere a las bacterias ventajas significativas en términos de protección, supervivencia, acceso a nutrientes y capacidad de colonización en diversos entornos. Esto les permite persistir en ambientes hostiles y causar infecciones crónicas difíciles de tratar. Imagen tomada de *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms (Thi et al., 2020).

Las células que conforman la biopelícula, las células liberadas y las que tiene fenotipo plántico son fisiológicamente diferentes, siendo las células liberadas más citotóxicas para los macrófagos y sustancialmente más virulentas para el hospedero, en comparación con el fenotipo plántico (Maurice et al., 2018). Cabe mencionar que las biopelículas no solo son comunidades de un solo microorganismo, sino que participan varias especies aumentando la complejidad del sistema (Cendra & Torrents 2021).

Quorum sensing

La capacidad para promover la formación de biopelículas está mediada por un sistema denominado *Quorum sensing*, este es un mecanismo de comunicación celular para coordinar el comportamiento de una población celular, es la forma en la que las células se comunican e implica la producción, secreción y acumulación de autoinductores que resultan en la expresión de genes a escala poblacional. Este proceso regula la producción de factores de virulencia, tolerancia al estrés, ajuste metabólico y las interacciones que sostiene con el huésped (Jurado et al., 2021).

Mecanismos de multirresistencia

P. aeruginosa está ampliamente relacionado con la resistencia a los antibióticos y se encuentra dentro de la lista de patógenos prioritarios para la investigación y el desarrollo de nuevas terapias (Botelho et al., 2019).

Resistencia intrínseca

P. aeruginosa posee una serie de mecanismos de resistencia intrínseca que le permiten sobrevivir a la presencia de antibióticos. Estos incluyen una membrana externa impermeable que dificulta la entrada de ciertos antibióticos, contiene porinas o canales que controlan el paso de sustancias hacia el interior y este microorganismo los puede modificar para impedirles el acceso. También posee bombas de eflujo que pueden expulsar a los antibióticos antes de llegar al blanco, la familia MexAB-OprN es responsable del flujo de beta-lactámicos, MexEF-OprN se encarga de las quinolonas y MexXY-OprM expulsa aminoglucósidos. La sobreexpresión de múltiples bombas en

algunas cepas clínicas va ampliando la resistencia a múltiples fármacos (Martin et al., 2018; Pang et al., 2019; Laborda et al., 2022).

La producción de enzimas que inactivan o modifican a los antibióticos es otro mecanismo de resistencia, tal es el caso de las beta-lactamasas y las enzimas modificadoras de aminoglucósidos; además de la producción de AmpC (gen que codifica para la enzima beta-lactamasa), *P. aeruginosa* también puede expresar ESBL (beta lactamasa de espectro extendido) y metalo-beta-lactamasa de imipenem (Huemer et al., 2020). Un estudio en México encontró que el 40% de los aislados de *P. aeruginosa* son resistentes a ceftazidima, imipenem o levofloxacino, lo que va disminuyendo las opciones de tratamiento (Amábile, 2010).

Resistencia adquirida y adaptativa

Las causas principales de la multiresistencia incluyen la transferencia genética de elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones e integrones (Subedi et al., 2018). En un estudio reciente realizado con seis cepas mexicanas de *P. aeruginosa* se encontraron 21 islas genómicas y 28 profagos que contribuyen con la resistencia a los antibióticos (Espinosa et al., 2022). El mecanismo de resistencia adaptativa y uno de los más relevantes en la clínica es la formación de biopelículas, las cuales usará como barrera para evitar la difusión de bactericidas (Mauch et al., 2018; Moradali & Rehm, 2020; Thi et al., 2020).

Bacteriófagos

Los bacteriófagos (fagos) son virus que infectan y se replican dentro de las bacterias. Estos agentes son de gran importancia en el ecosistema por su papel en la regulación de poblaciones bacterianas, además tienen aplicaciones significativas en diversos campos como la medicina, la biotecnología y actualmente están regresando al campo de la investigación, este interés se debe a la posibilidad de utilizarlos como terapia antibacteriana contra bacterias multirresistentes (Abdelsattar et al., 2022; Wegrzyn, 2022).

Historia

El descubrimiento de los fagos tiene sus raíces en las observaciones del británico Ernest Hankin en donde se describe una actividad antibacteriana en muestras de agua del río Ganges sobre el microorganismo *Vibrio cholerae*, donde notó que algo en el agua tenía la capacidad de matar a la bacteria, pero aún no se comprendía completamente este fenómeno. En el año de 1915 el inglés Frederik Twort logra demostrar que había virus que infectaban y mataban a las bacterias iniciando el término de agente bacteriolítico. Fue hasta 1917 que el microbiólogo canadiense Félix d'Herelle quien trabajaba con muestras de pacientes con disentería bacilar quién acuña el término “bacteriófago” para hacer referencia al responsable de eliminar a las bacterias asociadas a la enfermedad, él demostró que se trataba de virus que eliminaban específicamente a alguna cepa. Con el tiempo, algunos científicos continuaron con el estudio de los bacteriófagos y se descubrieron más detalles sobre su estructura y función (Domingo & Georgel, 2016; Egido et al., 2022).

Distribución

La presencia y abundancia de estos virus está relacionada con la disponibilidad de bacterias en un entorno dado, las condiciones ambientales como la temperatura, salinidad, el pH y los nutrientes también pueden influir en la presencia y diversidad de los fagos en un área específica (Dion et al., 2020).

Existen numerosas investigaciones sobre la distribución de los fagos provienen de ambientes acuáticos como los océanos, ríos, lagos, cuerpos subterráneos y aguas residuales, sin embargo, también se pueden encontrar en los suelos. Donde sea que haya bacterias es probable que existan fagos adaptados para infectarlas, llevando a la conclusión de que, aunque su distribución es extensa hay patrones endémicos de un área específica (Dion et al., 2020).

Estructura

En general, todos tienen una organización estructural característica que les permite infectar a su blanco, presentan una cápside compuesta de proteínas capsoméricas que forman una estructura sólida para albergar, proteger y empacar su material genético, este puede ser ADN o ARN de cadena doble o cadena sencilla (Dion et al., 2020). La cola del fago es una estructura tubular que se conecta a la cabeza y sirve como un conducto para la inyección del material genético en las células del huésped. Dependiendo del tipo de fago, la cola puede ser corta y rígida o larga y flexible. La placa basal es la estructura en la base de la cola que se adhiere a la superficie del huésped. Puede tener estructuras especializadas como fibras de adhesión que le van a permitir reconocer y unirse específicamente a su objetivo, las estructuras anteriormente descritas se pueden apreciar en la figura 3. Además de las partes mencionadas, los fagos contienen otras proteínas estructurales y

enzimas que desempeñan un papel en la infección y replicación del fago dentro de la bacteria. Estas proteínas están involucradas en la perforación de la membrana, la replicación del material genético viral y la liberación de nuevas partículas virales (Strathdee et al., 2023).

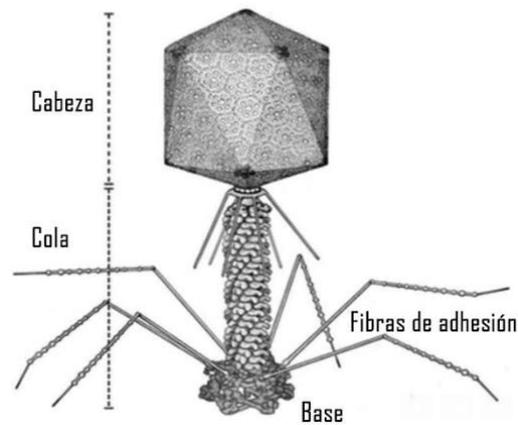


Figura 3: Representación de un fago. Su estructura está compuesta por una cápside proteica que alberga el ADN o ARN. Desde esta estructura central salen apéndices que le permiten al fago anclarse a la superficie de la bacteria huésped para transferir su material genético durante el proceso de infección. Imagen tomada de Bacteriophages: an overview of control strategies against multiple bacterial infections in different fields (Jamal et al., 2019).

Mecanismos de replicación

Según el mecanismo de replicación los fagos se dividen en dos tipos: los líticos y los lisogénicos, la diferencia radica en que estos últimos tienen la capacidad de integrarse al material genético bacteriano en un estado denominado “profago” y permanecer latentes durante algún tiempo antes de ser activados y entrar en el ciclo lítico (Harada et al., 2018). En la figura 4 hay una representación esquemática de los ciclos.

Ciclo lítico

Es el proceso de replicación más común y directo de los fagos en el cual se adhiere a la superficie de la bacteria a través de receptores específicos, inyecta su material genético al interior, este material se va a replicar usando la maquinaria de la célula para sintetizar proteínas virales. A medida que se ensamblan dichas partículas, la célula huésped se lisa, liberando una gran cantidad de fagos recién formados para infectar a otras células bacterianas (Domingo & Geogel, 2016; Jamal et al., 2019).

Ciclo lisogénico

El ciclo lisogénico está caracterizado por la adherencia de la partícula fágica, la inyección del material genético y la integración de este último al genoma bacteriano. Durante esta fase, la célula huésped continúa su ciclo de vida normal sin sufrir lisis celular. El profago permanece latente, replicándose junto con el ADN bacteriano durante varias generaciones de células, sin embargo, bajo ciertas condiciones como el daño en el ADN bacteriano o condiciones desfavorables, el profago puede ser inducido a salir del estado latente, activándose y dando lugar al ciclo lítico (Harada et al., 2018).

Aplicaciones

A medida que la resistencia a los antibióticos se convierte en un problema global cada vez más urgente, la fagoterapia y otras aplicaciones que hacen uso de los fagos ganan importancia como alternativas terapéuticas (Moye et al., 2018).

- Fagoterapia: Esta es una de las aplicaciones más destacadas de los bacteriófagos en la medicina. Los fagos se pueden utilizar para tratar infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos. Se aíslan fagos específicos para el microorganismo causante de la infección, el objetivo es que se pueda administrar al paciente cuando los antibióticos tradicionales han fallado (Duan et al., 2021; Pirnay et al., 2018; Vashisth et al., 2023).
- Desinfección: Los bacteriófagos tiene potencial en la desinfección de entornos clínicos, pueden ayudar a eliminar bacterias patógenas en superficies y en dispositivos médicos para prevenir la propagación de infecciones nosocomiales (Song et al, 2021).
- Biotecnología: Los fagos se usan para la introducción selectiva de material genético en bacterias, lo que permite la producción de proteínas recombinantes y la modificación de cepas bacterianas para aplicaciones industriales y médicas (Harada et al., 2018), (Moye et al., 2018).

En México el enfoque terapéutico con fagos aún no se ha desarrollado completamente debido a que esta área aún se encuentra en etapas tempranas de investigación, aunque hay un interés creciente se necesitan más estudios que respalden su eficacia y seguridad. De igual forma la regulación en torno a esta terapia en desarrollo aún no se encuentra establecida (González et al., 2022). La investigación de la aplicación de terapéutica para *P. aeruginosa* se encuentra aún en la parte *in vitro*, sin embargo, hay investigaciones sobre fagos para *E. coli* más completas, tal es el caso de los fagos ϕ Ec3 y ϕ Ec4, que demostraron un suso potencial contra infecciones urinarias (González et al., 2021).

Justificación

¿Algunos fagos líticos tendrán la capacidad de eliminar la biopelícula formada por cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*?

La formación de biopelículas bacterianas representa un desafío significativo en diversos entornos, desde el ámbito clínico hasta la industria de dispositivos médicos. Entre los microorganismos que tiene la capacidad de formar biopelículas resistentes a los tratamientos convencionales, *P. aeruginosa* se destaca como uno de los patógenos más problemáticos. Esta bacteria es conocida por su resistencia a múltiples antibióticos y a su capacidad para formar biopelículas que protegen a las células bacterianas de la acción de los agentes antimicrobianos.

En este contexto, la utilización de fagos líticos se presenta como una estrategia prometedora y específica para combatir la formación de biopelículas de *P. aeruginosa*. En esta investigación se propone la utilización de un bacteriófago para disminuir la formación de biopelículas. La justificación se basa en los siguientes puntos:

- Resistencia Antibiótica: La falta de opciones terapéuticas efectivas subraya la necesidad de explorar alternativas para controlar las infecciones causadas por *P. aeruginosa*.
- Especificidad y selectividad: Los fagos son altamente específicos para su huésped bacteriano, lo que minimiza el riesgo de dañar a bacterias que forman parte del microbioma normal.
- Potencial impacto ambiental: La formación de biopelículas de *P. aeruginosa* no solo es un problema asociado al sistema de salud, también es un problema en entornos industriales en donde puede causar obstrucción y contaminación. El uso de fagos puede tener un impacto positivo en la mitigación de este problema.

La aplicación de fagos líticos para eliminar biopelículas formadas por cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* representa una alternativa específica y aplicable en la reducción de la resistencia a antibióticos en el área hospitalaria y en la industria médica.

Hipótesis

La aplicación de fagos líticos específicos dirigidos contra *P. aeruginosa* puede reducir la biopelícula formada por esta bacteria, lo que podría convertirse en una estrategia efectiva para el control y la eliminación de infecciones persistentes, así como en otros sistemas en donde estas biopelículas sean un factor de riesgo.

Objetivo general

Evaluar la capacidad lítica de dos fagos específicos contra cepas de *P. aeruginosa* multirresistente como estrategia alternativa en la eliminación de las biopelículas formadas por éstas.

Objetivos específicos

- Corroborar la identidad de las cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes mediante sistemas automatizados.
- Propagar dos fagos líticos específicos para *P. aeruginosa*.

- Evaluar la actividad de los fagos en la eliminación de los exopolisacáridos de las biopelículas formadas por cepas de *P. aeruginosa* multidrogo resistentes aisladas de un grupo de pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Material

Cepas de *P. aeruginosa*

Se evaluó la pureza de 13 cepas de *P. aeruginosa* y una de *E. coli* utilizando la técnica de desorción/ionización por láser asistida por matriz o MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization, time off flight). Las cepas fueron identificadas en un estudio previo en un grupo de pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez, todos se encontraban en servicios distintos (Aguilar et al., 2022), cada cepa corresponde a un aislado de un paciente y se identificaron con claves numéricas como se indica en la tabla 1, las muestras de las que se aislaron fueron de sangre y orina. Las cepas fueron seleccionadas por sus características de multirresistencia (Según la clasificación de Magiorakos et al., 2012) y su capacidad para producir biopelículas. En el perfil de susceptibilidad se probaron 14 antibióticos y se encontró que solo aztreonam y colistina fueron efectivos para este brote de *P. aeruginosa* (Aguilar et al., 2022).

Tabla 1: Cepas utilizadas en el estudio.

Microorganismo	Cepa
<i>P. aeruginosa</i>	4H
	1
	10
	12
	18
	20
	26
	31
	52
	65
	74
	83
	115
<i>E. coli</i> (control negativo)	K12

Bacteriófagos

- vB_Pae-phi_Mx1
- vB_Pae-phi_Mx2

Los fagos vB_Pae-phi_Mx1 y vB_Pae-phi_Mx2 se obtuvieron anteriormente de muestras de agua provenientes del Río de los Remedios y Guanajuato respectivamente, se aislaron y caracterizaron. Como parte integral de los ensayos para este proyecto, se llevó a cabo la propagación de los bacteriófagos, esta propagación tuvo como propósito asegurar que hubiera una cantidad suficiente de bacteriófagos disponibles para abordar de manera efectiva los objetivos. Los fagos fueron aislados y caracterizados por el investigador Gerardo Rodea.

El proceso para aislamiento de estos fagos siguió el protocolo en González et al., 2021 en donde el proceso inicia con la recolección de las muestras de agua residual, seguido por la purificación, caracterización de la morfología por microscopía electrónica y el aislamiento de ADN.

Metodología

Se trató de un estudio experimental que se busca demostrar la eficacia de fagos líticos en la eliminación de biopelículas, las cuales, representan un factor clave en la patogenicidad y resistencia a los tratamientos contra *P. aeruginosa*. Como se mencionó anteriormente las cepas utilizadas se obtuvieron de un estudio previo en donde se demostró que presentan multirresistencia y generan biopelículas (Aguilar et al., 2022).

Criterios de inclusión

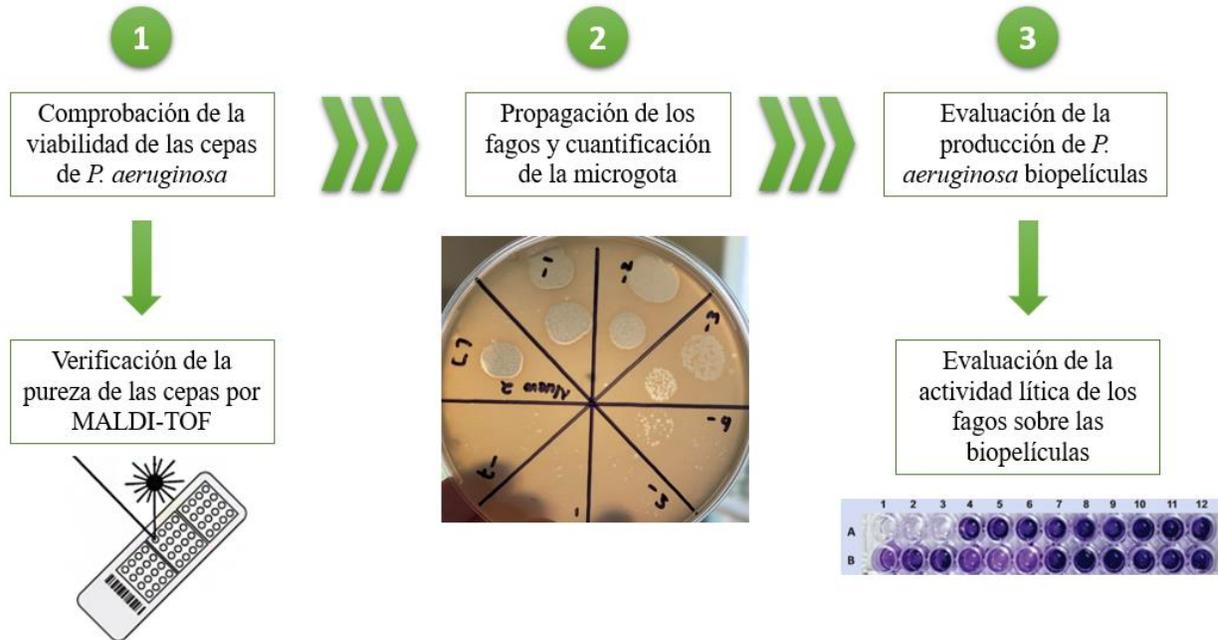
1. Se seleccionaron únicamente cepas de *P. aeruginosa* caracterizadas como multirresistentes y que hayan sido aisladas de pacientes.
2. Las cepas de *P. aeruginosa* debieron demostrar su capacidad para formar biopelícula de forma *in vitro*.

Criterios de exclusión

1. Las cepas que se encontraron contaminadas o que no fueron *P. aeruginosa* se descartaron para el análisis.
2. Cepas de *P. aeruginosa* que no formaron biopelículas en condiciones *in vitro*.

En la figura 4 se describe el procedimiento general que siguió durante el desarrollo experimental de este proyecto.

Figura 4: Diagrama general. El estudio experimental se llevó a cabo en tres etapas secuenciales, en primer lugar la verificación de la viabilidad de las cepas, seguido de la propagación de los fagos y finalmente la evaluación del efecto lítico de los mismos sobre las biopelículas.



Evaluación de la pureza de las cepas por MALDI-TOF

Cada cepa se sembró por estría cruzada en placas de Agar Luria Bertani (LB) con el fin de verificar la viabilidad de las cepas, además de obtener colonias aisladas para ser analizadas en el MALDI-TOF, esta técnica es útil en la identificación rápida de bacterias y hongos, en la figura 6 se ilustra una placa que contiene la muestra y el reactivo matriz.

El procedimiento inició depositando una muestra de cada cepa bacteriana sobre una placa metálica mezclándola con el reactivo matriz y se dejó cristalizar a temperatura ambiente, la función del reactivo es ayudar a absorber la energía del láser y facilitar la ionización. Al ingresar al equipo

(VITEK® MS BIOMÉRIEUX) la muestra se irradió con un láser para permitir la evaporación y ionización del material, los iones cargados entraron en un campo eléctrico y pasaron hacia el detector, los iones más ligeros y cargados viajaron más rápido que los más pesados con la misma carga. El tiempo que tardaron los iones en llegar al detector se registra como tiempo de vuelo, a partir de este parámetro se generó un espectro que representa la distribución de masas de los iones de muestra (Ashfaq et al., 2022).



Figura 5: Placa para MALDI-TOF. Esta placa contiene una muestra celular de las cepas que se usaron en el estudio, posteriormente se agregó el reactivo matriz y se ingresó al equipo para realizar la identificación.

Cada microorganismo presenta un espectro único debido a la composición molecular, el espectro de cada muestra se comparó con una base de datos y de esta forma se determinó la identidad de cada cepa (Ashfaq et al., 2022).

Propagación del fago

Se sembró en una placa de Agar LB a la cepa permisiva de los fagos que fue 4H y se incubó durante 24 h a 37° C. Se tomaron algunas colonias y se depositaron en 100 ml de caldo LB complementado con MgCl₂ 2.5 mM, se incubó por 3 h a 37° C con el fin de tener un cultivo fresco de la cepa

permissiva, luego de la incubación se agregaron 100 μ l del fago y ahora se incubó por 24 h a 37° C. Posteriormente se realizaron dos centrifugaciones, la primera a 4,000 rpm durante 20 minutos a 4° C y la segunda a 10,000 rpm por 10 minutos a 4° C, luego se filtró con una membrana de 20 μ m para eliminar a las bacterias remanentes. El sobrenadante se usó para la precipitación con NaCl 1M y se incubó por 1 h a 8° C, después se centrifugó a 11,000 rpm y al sobrenadante se le agregó una cantidad suficiente de polietilenglicol (PEG 8000) para alcanzar una concentración del 10% p/v, se incubó a 4° C por 24 h, pasado el tiempo se volvió a centrifugar a 4,000 rpm durante 30 minutos a 4° C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se hidrató con 2 ml de Buffer Fosfato Salino (PBS) 1X (Zhao et al. 2019).

Cuantificación del fago

Para obtener el título se usó el método cuantificación por microgota, las diluciones se realizaron a partir del concentrado obtenido en el punto anterior comenzando en 10^{-1} hasta 10^{-13} usando PBS 1X como diluyente.

Para este ensayo se cultivó a la cepa permissiva (4H) en caldo LB incubando 3 h a 37° C, se tomaron 100 μ l de cultivo y se agregaron a un tubo con agar blando fundido, se vertió esta solución en una placa de Agar LB y se dejó gelificar para formar el césped. Posterior a esto se dividió la placa y se agregaron gotas de 10 μ l de cada dilución del fago, estos inóculos se colocaron por triplicado. La placa se incubó por 24 h a 37° C y después se contabilizaron las placas líticas (Mazzocco et al. 2009), para obtener la concentración se usó la siguiente ecuación.

$$UFP \text{ ml}^{-1} = \#placas \text{ líticas} * \left(\frac{1}{alícuota}\right) * \left(\frac{1}{dilución}\right)$$

UFP= Unidades formadoras de placas.

Evaluación de la producción de biopelícula con cristal violeta usando la técnica con modificaciones descrita por Christensen (Christensen et al., 1985).

Las cepas de *P. aeruginosa* y *E. coli* se sembraron por triplicado en placas de agar LB y se incubaron por 24 h a 37°C con el fin de tener cultivos jóvenes. Posteriormente se inocularon las colonias en 4 ml de caldo LB y se incubaron por 4 h a 37° C. Con el cultivo anterior se realizó un ajuste al tubo para tener una concentración celular aproximada de 1×10^8 .

En cada uno de los pozos de las placas de poliestireno se colocaron 180 μ l de caldo LB complementado al 1% con glucosa y se agregaron 20 μ l de la suspensión bacteriana ajustada al 1×10^8 . Cada cultivo inoculó por triplicado y se incluyeron 9 pozos con caldo LB adicionado con glucosa como blanco. Las placas se incubaron de manera estática por 24 h a 37° C, se realizaron dos placas, una para observar la producción de biopelícula y otra para evaluar el efecto del fago sobre ella. Posterior a la incubación se retiró el medio y se realizaron tres lavados con 200 μ l de Buffer Fosfato Salino (PBS) 1X para eliminar a las células no adheridas. La biopelícula se fijó con calor incubando por 24 h a 37°C (Yuan et al., 2019).

Para evaluar el efecto del fago se preparó una solución de cada uno a una MOI de 0.1 y se agregaron 200 μ l a cada pozo de la placa incubándola por 1 h a 37° C. A la placa que se usó para medir la producción de biopelícula se le agregó PBS 1X y también incubó por 1 h a 37° C. Después de la incubación se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se procedió a realizar la tinción con 50 μ l de cristal violeta al 1% durante 15 minutos a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se retiró

el cristal violeta y se realizaron tres lavados con agua desionizada. Las placas se dejaron secar a temperatura ambiente durante 20 minutos. La biopelícula se solubilizó con 200 µl de etanol puro incubando por 10 minutos, el contenido se transfirió a una placa nueva y se realizó la lectura de la densidad óptica (DO) a 600 nm mediante un lector Multiskan EX de Thermo Fisher (Yuan et al., 2019).

La interpretación se realizó de acuerdo con los criterios de Stepanović (Stepanović et al., 2007) en donde se indica lo siguiente:

Ecuación para calcular el punto de corte de la DOc:

$$DOc = X \text{ (promedio del control negativo)} + 3 \text{ SD (desviación estándar control negativo)}$$

Criterios:

$DO \leq DOc$ No productor de biopelícula

$DOc < DO \leq 2 DOc$ Productor débil

$2 DOc < DO \leq 4 DOc$ Productor moderado

$4 < DOc$ Productor fuerte

A continuación, se describe la tabla de operacionalización de las variables identificadas en el estudio.

Variables	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional	Unidad de medida
Densidad Óptica	Cuantitativa	Medida cuantitativa utilizada para evaluar la cantidad de luz absorbida por una muestra en función de la longitud de onda específica de la luz incidente. Representa la reducción en la intensidad de la luz que pasa a través de una muestra, y se expresa generalmente en una escala adimensional	$DO = -\log(I/I_0)$ DO= densidad óptica I= intensidad de la luz que pasa a través de una muestra I ₀ = intensidad de la luz incidente	Absorbancia Adimensional
Fagos líticos	Independiente/ Cuantitativa	Tipo de virus que infecta bacterias, su ciclo de vida implica la infección, replicación y lisis de la célula permisiva.	Capacidad lítica	Absorbancia Adimensional

El análisis estadístico se realizó en el programa IBM SPSS V.26, en primer lugar, se verificó que los resultados siguieran una distribución normal y con base en este resultado se seleccionó un modelo que nos permitió evaluar si hubo un cambio significativo en la reducción / eliminación de biopelícula formada por *P. aeruginosa*; como los datos tuvieron una distribución normal se usó una prueba t-Student para muestras independientes.

Resultados

Inicialmente las cepas proporcionadas para el proyecto fueron recuperadas de viales de conservación y sometidas a una siembra masiva en agar LB para verificar su viabilidad. En las placas se observó un crecimiento exitoso de todas las cepas, lo que sugiere que han sobrevivido al proceso de almacenamiento y conservación y están en condiciones para su uso en experimentos posteriores.



Figura 6: Viabilidad de las cepas. En la imagen se observa un crecimiento de las cepas 31, 52,65, 83 y 115 correspondientes a *P. aeruginosa* en donde es posible apreciar el característico color verde debido a la producción de piocianina y pioverdina. El crecimiento rotulado como K12 corresponde a una cepa de *E. coli*.

La identificación por MALDI-TOF se realizó a partir de colonias aisladas, por lo cual se realizó previamente una siembra por estría cruzada. Los resultados se detallan en la tabla 2 y siguiendo lo descrito en los criterios de inclusión y exclusión se tuvo que descartar el uso de la cepa número 1

pues el cultivo no correspondía a *P. aeruginosa*. La cepa rotulada como K12 se esperaba que correspondiera a *E. coli* debido a que sería utilizada como control negativo en la producción de biopelícula, esta cepa fue descrita anteriormente como no productora en González et al., 2021.

Tabla 2: Evaluación de la pureza de las cepas.

Cepa	Resultado
4H	<i>P. aeruginosa</i>
1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
10	<i>P. aeruginosa</i>
12	<i>P. aeruginosa</i>
18	<i>P. aeruginosa</i>
20	<i>P. aeruginosa</i>
26	<i>P. aeruginosa</i>
31	<i>P. aeruginosa</i>
52	<i>P. aeruginosa</i>
65	<i>P. aeruginosa</i>
74	<i>P. aeruginosa</i>
83	<i>P. aeruginosa</i>
115	<i>P. aeruginosa</i>
K12	<i>E. coli</i>

Propagación de bacteriófagos

La propagación de los fagos se llevó a cabo mediante la técnica anteriormente descrita y se determinó el título por cuantificación en microgota, obteniendo los siguientes resultados para el fago vB_Pae-phi_Mx1.

Placa 1

$$UFP \text{ ml}^{-1} = 34 * \left(\frac{1}{0.01}\right) * \left(\frac{1}{10^{-10}}\right)$$

$$UFP = 3.4 \times 10^{13}$$

Placa 2

$$UFP \text{ ml}^{-1} = 31 * \left(\frac{1}{0.01}\right) * \left(\frac{1}{10^{-10}}\right)$$

$$UFP = 3.1 \times 10^{13}$$

Placa 3

$$UFP \text{ ml}^{-1} = 38 * \left(\frac{1}{0.01}\right) * \left(\frac{1}{10^{-10}}\right)$$

$$UFP = 3.8 \times 10^{13}$$

$$\text{Título del fago vB_Pae-phi_Mx1} = 3.43 \times 10^{13} \text{ UFP ml}^{-1}$$

En el caso de fago vB_Pae-phi_M2 se alcanzó el siguiente título:

Placa 1

$$UFP \text{ ml}^{-1} = 49 * \left(\frac{1}{0.01}\right) * \left(\frac{1}{10^{-6}}\right)$$

$$UFP = 4.9 \times 10^9$$

Placa 2

$$UFP \text{ ml}^{-1} = 45 * \left(\frac{1}{0.01}\right) * \left(\frac{1}{10^{-6}}\right)$$

$$UFP = 4.5 \times 10^9$$

Placa 3

$$UFP \text{ ml}^{-1} = 51 * \left(\frac{1}{0.01}\right) * \left(\frac{1}{10^{-6}}\right)$$

$$UFP = 5.1 \times 10^9$$

$$\text{Título del fago vB_Pae-phi_Mx2} = 4.83 \times 10^9 \text{ UFP ml}^{-1}$$

Evaluación de la producción de biopelícula de *P. aeruginosa* y del efecto lítico de los fagos sobre la biopelícula

Los datos obtenidos en nuestro estudio demostraron que todas las cepas de *P. aeruginosa* evaluadas fueron productoras de biopelícula, los resultados se encuentran en la tabla 3 en la columna denominada “sin fago” y en la figura 7 se observa la biopelícula formada en una placa de Elisa.

Tabla 3: Producción de biopelícula y efecto lítico de los fagos vB_Pae-phi_Mx1 y vB_Pae-phi_Mx2.

Cepa	Absorbancias promedio a 600 nm			Efecto lítico	
	Sin Fago	Fago vB_Pae-phi_Mx1	Fago vB_Pae-phi_Mx2	Fago vB_Pae-phi_Mx1	Fago vB_Pae-phi_Mx2
4H	0.192	0.032	0.072	Positivo	Positivo
10	0.498	0.106	0.092	Positivo	Positivo
12	0.354	0.108	0.055	Positivo	Positivo
18	0.390	0.066	0.191	Positivo	Positivo
20	0.115	0.008	0.055	Positivo	Positivo
26	0.807	0.019	0.271	Positivo	Positivo
31	0.590	0.109	0.205	Positivo	Positivo
52	0.782	0.157	0.246	Positivo	Positivo
65	0.488	0.079	0.156	Positivo	Positivo
74	0.184	0.094	0.121	Positivo	Positivo
83	0.254	0.117	0.235	Positivo	Negativo
115	0.291	0.019	0.125	Positivo	Positivo



Figura 7: Biopelícula de *P. aeruginosa* en agar LB. La cepa 26 resultó ser la mayor productora de biopelícula en el estudio, la parte blanquecina que se observa en el centro de los pozos es el exopolisacárido.

A partir de estos resultados se calcularon los intervalos señalados en la tabla 4 para clasificar a las cepas como productor débil, moderado y fuerte, se encontró que todas son fuertes productoras de biopelícula.

Tabla 4: Intervalos para clasificar a las cepas productoras de biopelícula, calculados a partir del control negativo (*E. coli K12*)

DOc	Productor débil	Productor moderado	Productor fuerte
0.021	≤ 0.042	0.043 - 0.083	≥ 0.084

En la tabla 3, las columnas que llevan el título Fago vB_Pae-phi_Mx1 y Fago vB_Pae-phi_Mx2 contienen los resultados correspondientes al tratamiento con los fagos, los datos siguieron una distribución normal y se aplicó una prueba t-Student (para un intervalo de confianza de 95% y una $p < 0.005$) para evaluar si existía un efecto lítico significativo. Las figuras 8 y 9 fueron construidas a partir de estos datos y se observa que el fago vB_Pae-phi_Mx1 tiene efecto lítico en el cien por ciento de las cepas estudiadas, en todas las muestras tratadas con este, hubo una disminución en la absorbancia obtenida. El fago vB_Pae-phi_Mx2 tuvo un efecto lítico en 11 cepas de las 12 que fueron usadas en los ensayos.

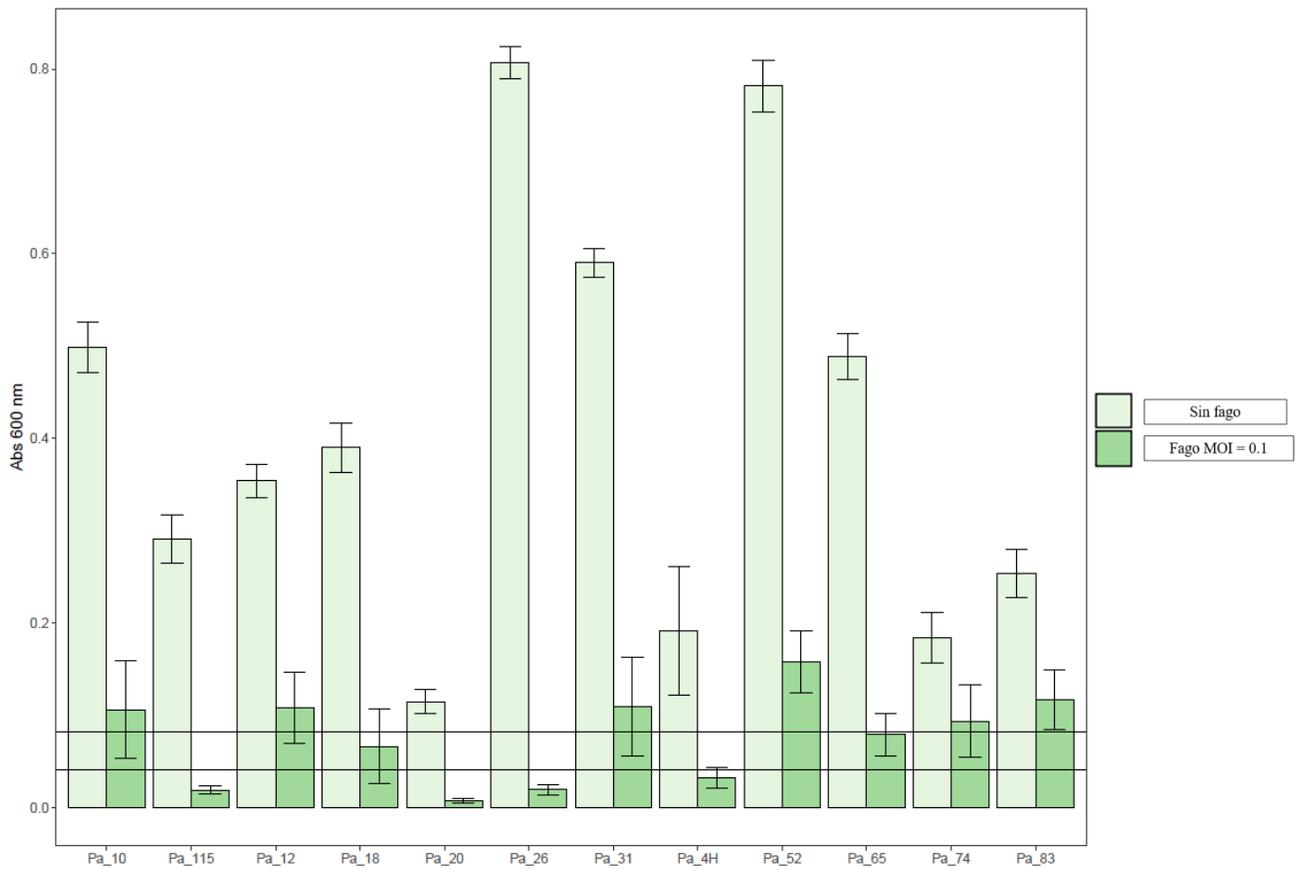


Figura 8: Efecto lítico del bacteriófago vB_Pae-phi_Mx1 sobre las cepas de *P. aeruginosa*. En esta figura se muestra en las barras color verde claro la cantidad de biopelícula que produjo cada cepa mientras que en las barras color verde oscuro se observa el efecto que tuvo el fago sobre la biopelícula. Las cepas se encuentran señaladas como “Pa” por la abreviación de *P. aeruginosa* y los números corresponden a cada cepa. En el caso de las cepas 115, 20, 26 y 4H el efecto lítico fue tan evidente que por su DO se clasificarían como productoras débiles del exopolisacárido.

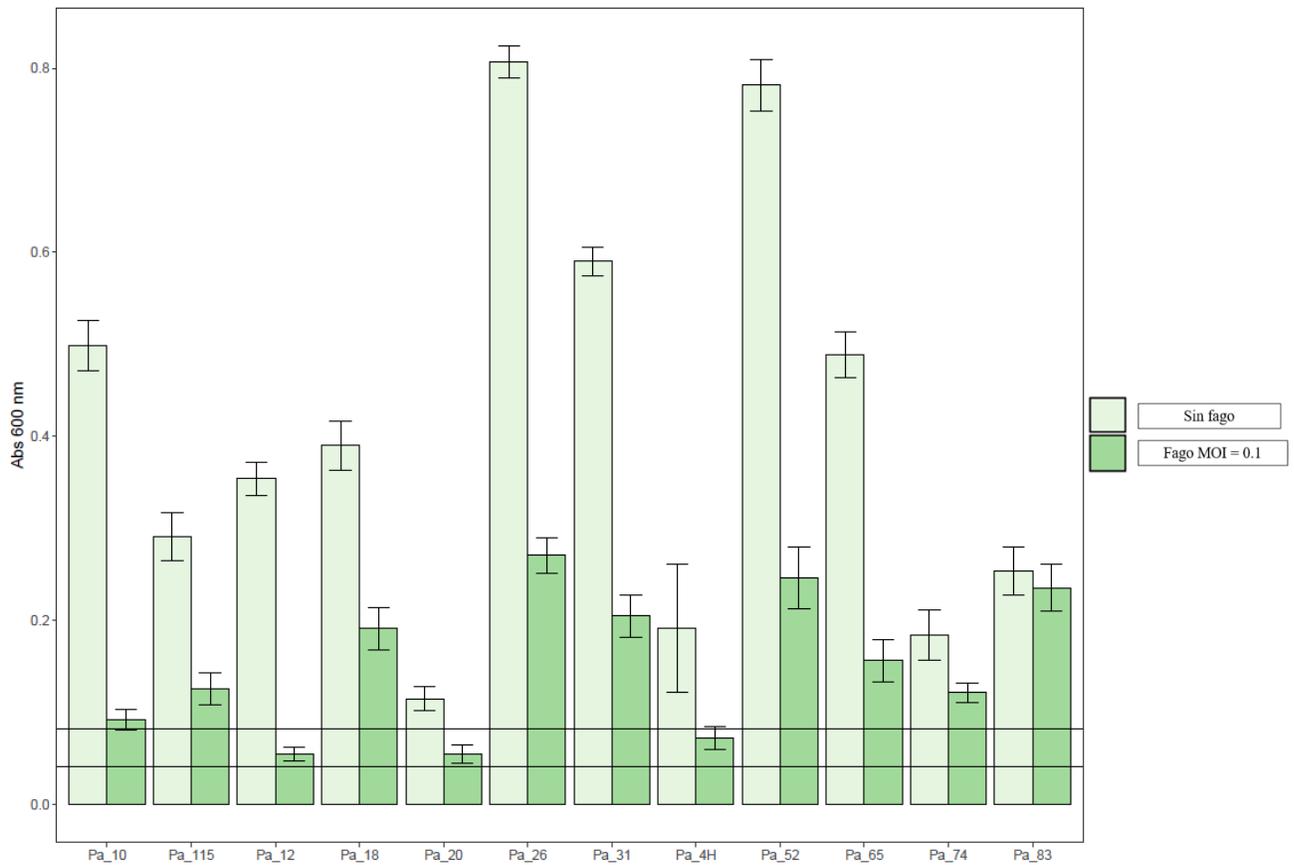


Figura 9: Efecto lítico del bacteriófago vB_Pae-phi_Mx2 sobre las cepas de *P. aeruginosa*. De la misma forma que la figura anterior se tiene en las barras color verde claro la cantidad de biopelícula que produce cada cepa y en verde oscuro el efecto del fago sobre ella. En el caso de este fago el efecto lítico más evidente fue sobre las cepas 122, 20 y 4H que terminaron en el intervalo de productor moderado y sobresale el efecto nulo que tuvo sobre la cepa 83.

Discusión

La identificación precisa de las cepas microbianas es esencial, ya que cualquier error en esta etapa puede comprometer la validez de los resultados y conclusiones de los estudios siguientes. Los cultivos bacterianos son susceptibles a la contaminación, y la presencia de otras especies microbianas puede afectar significativamente los resultados que se obtienen en la identificación por espectrometría de masas. La comparación de los perfiles proteicos obtenidos con bases de datos genómicas ayuda a identificar de forma rápida y precisa a los microorganismos presentes en una muestra, además puede proporcionar información valiosa sobre la variabilidad genética dentro de la especie (Tsuchida et al., 2020).

Como parte del experimento se comprobó la viabilidad y la pureza de 13 cepas de *P. aeruginosa* que originalmente fueron obtenidas de un estudio previo en donde se caracterizaron como cepas multirresistentes y productoras de biopelícula (Aguilar et al., 2022). En nuestra identificación se obtuvo que la cepa identificada con el número 1 correspondía a *Stenotrophomonas maltophilia*, por lo que su uso tuvo que ser descartado según lo establecido en los criterios de exclusión. En cuanto a las cepas 4H, 10, 12, 18, 20, 26, 31, 52, 65, 74, 82 y 115, resultó que todas pertenecían a *P. aeruginosa* con un nivel de confianza del 99.9 %. También se realizó la identificación de otra cepa que se usó como control negativo a la producción de biopelícula, la cual corresponde a *E. coli* K12, esta cepa se había clasificado previamente como no productora de biopelícula (González et al., 2021) y al no conseguir una cepa de *P. aeruginosa* no productora se optó por utilizar esta cepa como control.

La identificación mediante la técnica MALDI-TOF causó un avance significativo en bacteriología al ofrecer una alternativa rápida y precisa para la identificación de bacterias y hongos. A diferencia

de los métodos tradicionales, que suelen requerir cultivos prolongados y pruebas bioquímicas laboriosas, el MALDI-TOF permite identificar microorganismos en cuestión de minutos a partir de una colonia. Esta rapidez es especialmente crucial en entornos clínicos, donde la toma de decisiones rápidas es esencial para el tratamiento de infecciones. Además, el MALDI-TOF proporciona una identificación más precisa y confiable al basarse en perfiles proteicos únicos de los microorganismos, en lugar de características fenotípicas variables. Esto resulta en una mayor especificidad y sensibilidad, reduciendo la posibilidad de errores de identificación y mejorando la gestión de infecciones (Ashfaq et al., 2022).

El título viral, expresado como el número de unidades formadoras de placa por mililitro ($UFP\ ml^{-1}$), es un indicador crítico de la capacidad de los fagos para infectar y replicarse en sus hospedadores bacterianos. Se propagaron los fagos vB_Pae-phi_Mx1 y vB_Pae-phi_Mx2 obteniendo títulos de $3.43 \times 10^{13}\ UFP\ ml^{-1}$ y $4.83 \times 10^9\ UFP\ ml^{-1}$ respectivamente. Los resultados obtenidos en la propagación revelan diferencias notables en los títulos virales. Varios factores pueden influir en por qué algunos fagos alcanzan un título más alto durante su propagación. Factores ambientales, como la temperatura, el pH y la concentración de nutrientes, pueden afectar la propagación de los fagos. La capacidad de un fago para infectar y propagarse eficientemente está directamente relacionada con su especificidad hacia la bacteria hospedadora. Si un fago encuentra una cepa bacteriana más susceptible y compatible, es más probable que alcance un título más alto durante la propagación. Desde su aislamiento y caracterización en un estudio previo se usó a la cepa 4H como la especie permisiva, por lo que para este experimento se usaron las mismas condiciones para asegurar títulos altos que nos permitieran realizar los demás experimentos (Jofre & Muniesa, 2020; Gavric & Knezevic, 2022).

En conjunto, la propagación exitosa de fagos y el alcance de títulos más altos son el resultado de una interacción compleja entre el fago, la bacteria hospedadora y el entorno circundante. Cada uno de estos factores puede contribuir de manera significativa a la dinámica de infección del fago y al éxito en la propagación (Jamal et al., 2019).

Es necesario analizar detalladamente los protocolos utilizados en la propagación de cada fago para identificar posibles variaciones en las condiciones experimentales como la concentración de nutrientes, la temperatura, el tiempo de incubación y otros parámetros que nos permitan optimizar el medio que nos lleven a obtener un título más alto en la propagación del fago vB_Pae-phi_Mx2 (Jamal et al., 2019).

La biopelícula generada por *P. aeruginosa* es una de las principales causas de resistencia a los antibióticos e infecciones crónicas, está compuesta principalmente por un exopolisacárido (EPS), una matriz polimérica que proporciona cohesión estructural a la biopelícula (Jurado et al., 2021). En este estudio se encontró que todas las cepas de *P. aeruginosa* disponibles resultaron ser fuertes productoras de biopelícula, según los criterios de Stepanovic, los cuales fueron calculados a partir de la DOc de nuestro control negativo.

Como se observa en la figura 6 y 7, los resultados del efecto lítico de los fagos sobre las biopelículas producidas por *P. aeruginosa* son distintos, lo que ofrece una perspectiva sobre la variabilidad de la respuesta de las cepas a la infección por los fagos, los cuales poseen enzimas líticas, como las polisacaridasas, capaces de degradar el EPS, dichas enzimas actúan como "tijeras moleculares" que cortan los enlaces del exopolisacárido, deshaciendo la matriz que sostiene la biopelícula. La lisis del EPS por las enzimas bacteriófagas debilita la estructura de la biopelícula, disminuyendo su

cohesión y favoreciendo la exposición de las células bacterianas al entorno circundante (Harper et al., 2014).

Los fagos específicos de *P. aeruginosa* se unen a receptores en la superficie de las células bacterianas e inician el proceso de infección. Los fagos introducen su material genético en la célula, utilizando la maquinaria celular para replicarse y ensamblarse. Este proceso, a menudo, culmina en la lisis celular. Este proceso liberará nuevos fagos al entorno, pero también desencadena la liberación de las células bacterianas atrapadas en la biopelícula. Este fenómeno contribuye a la reducción global de la masa de la biopelícula (Yuan et al, 2019).

El efecto lítico observado de los fagos vB_Pae-phi_Mx1 y vB_Pae-phi_Mx2 sobre las biopelículas de las diferentes cepas de *P. aeruginosa* se puede atribuir a una combinación de dos procesos fundamentales: la acción de enzimas capaces de lisar el exopolisacárido y la lisis directa de las células bacterianas. Estos mecanismos trabajan en sinergia para dismantelar la compleja arquitectura de la biopelícula y ejercer un impacto significativo en la integridad de *P. aeruginosa*. El hecho de que el efecto sea estadísticamente significativo refuerza la confianza en la validez y reproducibilidad de los resultados obtenidos. La significancia estadística indica que la reducción observada en la biopelícula no es el resultado de variaciones aleatorias, sino que hay una relación causal entre la presencia del fago y la disminución en la cantidad de biopelícula (Rossito et al., 2018).

La combinación de la destrucción del EPS y la lisis celular inducida por los fagos genera un efecto sinérgico que debilita y disuelve la biopelícula de *P. aeruginosa*. La degradación del EPS desestabiliza la matriz, mientras que la lisis celular libera las células bacterianas que contribuyen a la formación de la biopelícula. Este efecto dual no solo afecta la estructura física de la biopelícula,

sino que también interrumpe la cohesión y persistencia de *P. aeruginosa* en forma de biopelícula. Los resultados obtenidos con el fago vB_Pae-phi_Mx1 representan oportunidades prometedoras en la búsqueda de estrategias terapéuticas alternativas en la gestión de infecciones asociadas a biopelículas de *P. aeruginosa* multirresistente a antibióticos (Chegini et al., 2020).

El efecto lítico del fago vB_Pae-phi_Mx2 ofrece una perspectiva similar, a pesar de la resistencia observada en la cepa 83, el efecto lítico significativo en las otras cepas sugiere que el fago podría ser una herramienta valiosa en el control de biopelículas asociadas con *P. aeruginosa*. No obstante, la comprensión de los factores responsables de la resistencia en la cepa 83 puede proporcionar información clave para mejorar la eficacia de los tratamientos futuros. La falta de respuesta significativa de esta cepa al fago vB_Pae-phi_Mx2 podría deberse a diversos factores, como variaciones en la estructura de la biopelícula, diferencias en la expresión de receptores bacterianos o incluso la presencia de sistemas de defensa bacteriana específicos. La caracterización más detallada de la cepa 83 y la exploración de estos posibles mecanismos de resistencia proporcionarían información valiosa sobre las interacciones específicas entre los bacteriófagos y sus hospedadores. Además, la posible aparición de resistencia bacteriana a los bacteriófagos y la dinámica a largo plazo de la interacción bacteriófago-biopelícula deben abordarse en futuros estudios (Yuan et al, 2019).

En este análisis, se evaluó únicamente el efecto lítico del fago en un solo intervalo de tiempo. Es importante tener en cuenta que existen otros estudios de investigación que llevan a cabo esta evaluación en varios intervalos de tiempo. Esta metodología permite obtener información más detallada sobre la actividad lítica del fago, ya que se pueden observar diferentes etapas de la interacción entre el fago y la biopelícula a lo largo del tiempo. Además, al analizar varios intervalos

de tiempo, es posible identificar un pico máximo de actividad lítica, es decir, el momento en el que el fago muestra la máxima eficacia para eliminar la biopelícula. Estos estudios con múltiples intervalos de tiempo proporcionan una visión más completa y detallada de la actividad del fago, lo que puede ser crucial para comprender mejor su mecanismo de acción y optimizar su uso como tratamiento antimicrobiano (Yuan et al, 2019).

Evaluar si los fagos pueden eliminar las biopelículas de las superficies o del material quirúrgico es de suma importancia en el ámbito de la salud y la seguridad sanitaria. Las biopelículas pueden formarse en una amplia gama de entornos, incluyendo dispositivos médicos, implantes y equipos quirúrgicos, representando un riesgo significativo de infecciones nosocomiales y complicaciones postoperatorias. Evaluar la capacidad de los fagos para eliminar estas biopelículas es crucial, ya que los fagos ofrecen una alternativa prometedora a los tratamientos convencionales. Si los fagos demuestran ser eficaces para eliminar las biopelículas de las superficies o del material quirúrgico, esto podría tener un impacto significativo en la prevención y el tratamiento de las infecciones asociadas a biopelículas, reduciendo la incidencia de complicaciones postoperatorias y mejorando los resultados clínicos para los pacientes. Además, esta investigación podría abrir nuevas vías para el desarrollo de terapias antimicrobianas más efectivas y específicas, contribuyendo así a combatir la creciente amenaza de la resistencia a los antibióticos y mejorar la seguridad en los entornos médicos y quirúrgicos (Del Pozo, 2018).

Aunque la terapia con el uso de fagos muestra un gran potencial como alternativa a los antibióticos tradicionales, aún queda mucho por investigar y desarrollar en este campo. Los resultados de este proyecto pueden considerarse como un paso inicial importante y pueden sentar las bases para futuros estudios de investigación, incluidos los estudios de investigación de fase 0, que se enfocan

en investigar la viabilidad y la seguridad de nuevos tratamientos en humanos antes de avanzar a ensayos clínicos más amplios. Es importante destacar que, en Europa, ya se están llevando a cabo estudios clínicos de fase I y fase II en la terapia con fagos, lo que indica un creciente interés y reconocimiento de esta terapia como una opción viable para el tratamiento de infecciones bacterianas. Estos estudios clínicos proporcionarán información valiosa sobre la eficacia y seguridad de la terapia con fagos en humanos, lo que podría impulsar aún más la investigación en este campo y llevar a la adopción clínica generalizada de esta prometedora terapia (Harper et al., 2011).

Conclusión

La efectividad variable de los fagos entre las cepas destaca la necesidad de una selección cuidadosa de los mismos para ser utilizados en distintas terapias. Estos resultados tienen implicaciones importantes en el diseño y aplicación de estrategias terapéuticas basadas en fagos. Además, la identificación de cepas resistentes subraya la importancia de una evaluación continua y personalizada de la eficacia de los fagos antes de su implementación clínica.

Estos resultados respaldan la investigación continua sobre la aplicación de fagos en el control de biopelículas bacterianas y resaltan la importancia de comprender los mecanismos subyacentes para maximizar su eficacia.

Bibliografía

Abdelsattar A, Dawoud A, Makky S, Nofal R, Aziz RK, El-Shibiny A. Bacteriophages: from Isolation to Application (2022). *Curr Pharm Biotechnol.* 23(3):337-360. doi: 10.2174/1389201022666210426092002.

Aguilar-Rodea P, Estrada-Javier EL, Jiménez-Rojas V & cols. New Variants of *Pseudomonas aeruginosa* High-Risk Clone ST233 Associated with an Outbreak in a Mexican Paediatric Hospital (2022). *Microorganisms.* 10(8):1533. doi: 10.3390/microorganisms10081533.

Amábile-Cuevas C. Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes (2010). *J Infect Dev Ctries.* 29;4(3):126-31. doi: 10.3855/jidc.427.

Ashfaq MY, Da'na DA, Al-Ghouti MA. Application of MALDI-TOF MS for identification of environmental bacteria: A review (2022). *J Environ Manage* 305:114359. doi: 10.1016/j.jenvman.2021.114359.

Botelho J, Grosso F, Peixe L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* - Mechanisms, epidemiology and evolution (2019). *Drug Resist Updat.* 44:100640. doi: 10.1016/j.drug.2019.07.002.

Bustamante AE, Fernández LT, Rivas LC, Mercado-Longoria R. Disparities in cystic fibrosis survival in Mexico: Impact of socioeconomic status (2021). *Pediatr Pulmonol.* 56(6):1566-1572. doi: 10.1002/ppul.25351.

Cendra MDM, Torrents E. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and their partners in crime (2021). *Biotechnol Adv.* 49:107734. doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107734.

Chegini Z, Khoshbayan A, Taati Moghadam M, Farahani I, Jazireian P, Shariati A. Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a review (2020). *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 19(1):45. doi: 10.1186/s12941-020-00389-5.

Del Pozo JL. Biofilm-related disease (2018). *Expert Rev Anti Infect Ther.* 16(1):51-65. doi: 10.1080/14787210.2018.1417036.

Dion MB, Oechslin F, Moineau S. Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nat Rev Microbiol.* 2020 Mar;18(3):125-138. doi: 10.1038/s41579-019-0311-5.

Domingo-Calap P, Georgel P, Bahram S. Back to the future: bacteriophages as promising therapeutic tools (2016). *HLA.* 87(3):133-40. doi: 10.1111/tan.12742.

Egido JE, Costa AR, Aparicio-Maldonado C, Haas PJ, Brouns SJJ. Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance (2022) *FEMS Microbiol* 9;46(1) doi: 10.1093/femsre/fuab048.

Espinosa-Camacho LF, Delgado G, Cravioto A, Morales-Espinosa R. Diversity in the composition of the accessory genome of Mexican *Pseudomonas aeruginosa* strains (2022). *Genes Genomics*. 44(1):53-77. doi: 10.1007/s13258-021-01155-3.

Estaji M, Tabasi M, Sadeghpour Heravi F, Kheirvari Khezerloo J, Radmanesh A, Raheb J, Ghadirzadeh MR, Tabatabaei A. Genotypic identification of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with urinary tract infection (2019). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 65:23-28. doi: 10.1016/j.cimid.2019.03.014.

Fernando SA, Gray TJ, Gottlieb T. Healthcare-acquired infections: prevention strategies (2017). *Intern Med J*. 47(12):1341-1351. doi: 10.1111/imj.13642.

Garza-González E, Bocanegra-Ibarias P, Bobadilla-Del-Valle M, and cols. Drug resistance phenotypes and genotypes in Mexico in representative gram-negative species: Results from the infivar network (2021). *PLoS One*. 17;16(3):e0248614. doi: 10.1371/journal.pone.0248614.

Gavric D, Knezevic P. Optimized Method for *Pseudomonas aeruginosa* Integrative Filamentous Bacteriophage Propagation (2022). *Front Microbiol*. 12:707815. doi: 10.3389/fmicb.2021.707815.

González-Olvera EM, Pérez-Morales R, González Zamora A, Castro-Escarpulli G, Palma-Martínez I, Alba-Romero JJ. Antibiotic resistance, virulence factors and genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* in

public hospitals of northeastern Mexico (2019). *J Infect Dev Ctries.* 13(5):374-383. doi: 10.3855/jidc.10953.

González-Villalobos E, Molina-López J, Balcázar JL. Phage therapy for urinary tract infections: does it really work? (2022) *Int Microbiol.* 25(3):665-667. doi: 10.1007/s10123-022-00237-w.

González-Villalobos E, Ribas-Aparicio RM, Montealegre GER, Belmont-Monroy L, Ortega-García Y, Aparicio-Ozores G, Balcázar JL, Eslava-Campos CA, Hernández-Chiñas U, Molina-López J. Isolation and characterization of novel bacteriophages as a potential therapeutic option for *Escherichia coli* urinary tract infections (2021). *Appl Microbiol Biotechnol.* 105(13):5617-5629. doi: 10.1007/s00253-021-11432-6.

Harada LK, Silva EC, Campos WF, Del Fiol FS, Vila M, Dąbrowska K, Krylov VN, Balcão VM. Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art (2018). *Microbiol Res.* 212-213:38-58. doi: 10.1016/j.micres.2018.04.007.

Harper DR, Anderson J, Enright MC. Phage therapy: delivering on the promise (2011). *Ther Deliv.* 2(7):935-47. doi: 10.4155/tde.11.64.

Harper DR, Morales S. Bacteriophage therapy: practicability and clinical need meet in the multidrug-resistance era (2014). *Future Microbiol.* (7):797-9. doi: 10.2217/fmb.12.58. PMID: 22827299.

Huemer M, Mairpady Shambat S, Brugger SD, Zinkernagel AS. Antibiotic resistance and persistence- Implications for human health and treatment perspectives (2020). *EMBO Rep.* 23;21(12) doi: 10.15252/embr.202051034.

Jamal M, Bukhari SMAUS, Andleeb S, Ali M, Raza S, Nawaz MA, Hussain T, Rahman SU, Shah SSA. Bacteriophages: an overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields (2019). *J Basic Microbiol.* (2):123-133. doi: 10.1002/jobm.201800412.

Jean SS, Harnod D, Hsueh PR. Global Threat of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria (2022). *Front Cell Infect Microbiol.* 12:823684. doi: 10.3389/fcimb.2022.823684.

Jofre J, Muniesa M. Bacteriophage Isolation and Characterization: Phages of *Escherichia coli* (2020). *Methods Mol Biol.* 2075:61-79. doi: 10.1007/978-1-4939-9877-7_4.

Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors (2021). *Int J Mol Sci.* 22(6):3128. doi: 10.3390/ijms22063128.

Laborda P, Hernando-Amado S, Martínez JL, Sanz-García F. Antibiotic Resistance in *Pseudomonas* (2022). *Adv Exp Med Biol.* 1386:117-143 doi: 10.1007/978-3-031-08491-1_5.

Lemiech-Mirowska E, Kiersnowska ZM, Michałkiewicz M, Depta A, Marczak M. Nosocomial infections as one of the most important problems of healthcare system (2021). *Ann Agric Environ Med.* 28(3):361-366. doi: 10.26444/aaem/122629.

Ma LZ, Wang D, Liu Y, Zhang Z, Wozniak DJ. Regulation of Biofilm Exopolysaccharide Biosynthesis and Degradation in *Pseudomonas aeruginosa* (2022). *Annu Rev Microbiol.* 76:413-433. doi: 10.1146/annurev-micro-041320-111355.

Martin LW, Robson CL, Watts AM, Gray AR, Wainwright CE, Bell SC, Ramsay KA, Kidd TJ, Reid DW, Brockway B, Lamont IL. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* Antibiotic Resistance Genes Varies Greatly during Infections in Cystic Fibrosis Patients (2018). *Antimicrob Agents Chemother.* 62(11):e01789-18. doi: 10.1128/AAC.01789-18.

Mauch RM, Jensen PØ, Moser C, Levy CE, Høiby N. Mechanisms of humoral immune response against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection in cystic fibrosis (2018). *J Cyst Fibros.* (2):143-152. doi: 10.1016/j.jcf.2017.08.012.

Maurice NM, Bedi B, Sadikot RT. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Host Response and Clinical Implications in Lung Infections (2018). *Am J Respir Cell Mol Biol.* (4):428-439 doi: 10.1165/rcmb.2017-0321TR.

Mazzocco A, Wadell TE, Lingohr E, Johnson P (2009) Enumeration of bacteriophages using small drop plaque assay system (2019). *Bacteriophages Methods and Protocols*, vol 1, 1st edn. Humana press, New York, pp 81–85.

Moradali MF, Rehm BHA. Bacterial biopolymers: from pathogenesis to advanced materials (2020). *Nat Rev Microbiol.* (4):195-210. doi: 10.1038/s41579-019-0313-3.

Moye ZD, Woolston J, Sulakvelidze A. Bacteriophage Applications for Food Production and Processing (2018). *Viruses.* 10(4):205. doi: 10.3390/v10040205.

Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies (2019). *Biotechnol Adv.* 37(1):177-192. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013.

Pirnay JP, Verbeken G, Ceysens PJ, Huys I, De Vos D, Ameloot C, Fauconnier A (2018) The Magistral Phage. *Viruses* 10:64. doi: 10.3390/v10020064.

Plata-Menchaca EP, Ferrer R. Current treatment of nosocomial pneumonia and ventilator-associated pneumonia (2022). *Rev Esp Quimioter.* (3):25-29. doi: 10.37201/req/s03.06.2022.

Ramos-Vivas J, Superio J, Galindo-Villegas J, Acosta F. Phage Therapy as a Focused Management Strategy in Aquaculture (2021). *Int J Mol Sci.* 22(19):10436. doi: 10.3390/ijms221910436.

Rossitto M, Fiscarelli EV, Rosati P. Challenges and Promises for Planning Future Clinical Research Into Bacteriophage Therapy Against *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis. An Argumentative Review (2018). *Front Microbiol.* 9:775. doi: 10.3389/fmicb.2018.00775.

Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens (2016). *Biomed Res Int.* 2016;2016:2475067. doi: 10.1155/2016/2475067.

Schalk IJ, Perraud Q. *Pseudomonas aeruginosa* and its multiple strategies to access iron (2023) . *Environ Microbiol.* 25(4):811-831. doi: 10.1111/1462-2920.16328.

Sharma G, Rao S, Bansal A, Dang S, Gupta S, Gabrani R. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets (2014). *Biologicals.* 42(1):1-7. doi: 10.1016/j.biologicals.2013.11.001.

Song J, Ruan H, Chen L, Jin Y, Zheng J, Wu R, Sun D. Potential of bacteriophages as disinfectants to control of *Staphylococcus aureus* biofilms. (2021) *BMC Microbiol.* 21:57. doi: 10.1186/s12866-021-02117-1.

Strathdee SA, Hatfull GF, Mutalik VK, Schooley RT. Phage therapy: From biological mechanisms to future directions (2023). *Cell*. 186(1):17-31. doi: 10.1016/j.cell.2022.11.017.

Subedi D, Vijay AK, Willcox M. Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective (2018). *Clin Exp Optom*. 101(2):162-171. doi: 10.1111/cxo.12621

Sultan M, Arya R, Kim KK. Roles of Two-Component Systems in *Pseudomonas aeruginosa* Virulence (2021). *Int J Mol Sci*. 22(22):12152. doi: 10.3390/ijms222212152.

Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms (2020). *Int J Mol Sci*. 21(22):8671. doi: 10.3390/ijms21228671.

Tsuchida S, Umemura H, Nakayama T. Current Status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology (2020). *Molecules*. 25(20):4775. doi: 10.3390/molecules25204775.

Urban-Chmiel R, Marek A, Stępień-Pyśniak D, Wieczorek K, Dec M, Nowaczek A, Osek J. Antibiotic Resistance in Bacteria-A Review (2022). *Antibiotics (Basel)*. 11(8):1079. doi: 10.3390/antibiotics11081079.

Vanderwoude J, Fleming D, Azimi S, Trivedi U, Rumbaugh KP, Diggle SP. The evolution of virulence in *Pseudomonas aeruginosa* during chronic wound infection (2020). *Proc Biol Sci.* 287(1937):20202272. doi: 10.1098/rspb.2020.2272.

Vashisth M, Jaglan AB, Yashveer S, Sharma P, Bardajaty P, Virmani N, Bera BC, Vaid RK, Anand T. Development and Evaluation of Bacteriophage Cocktail to Eradicate Biofilms Formed by an Extensively Drug-Resistant (XDR) *Pseudomonas aeruginosa* (2023). *Viruses.* 15(2):427. doi: 10.3390/v15020427.

Węgrzyn G. Should Bacteriophages Be Classified as Parasites or Predators? (2022). *Pol J Microbiol.* 71(1):3-9. doi: 10.33073/pjm-2022-005.

Yuan Y, Qu K, Tan D, Li X, Wang L, Cong C, Xiu Z, Xu Y. Isolation and characterization of a bacteriophage and its potential to disrupt multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms (2019). *Microb Pathog.* 128:329-336. doi: 10.1016/j.micpath.2019.01.032.

Zhao J, Zhang Z, Tian C, Chen X, Hu L, Wei X, Li H, Lin W, Jiang A, Feng R, Yuan J, Yin Z, Zhao X. Characterizing the Biology of Lytic Bacteriophage ν B_EaeM_φEap-3 Infecting Multidrug-Resistant *Enterobacter aerogenes* (2019). *Microbiol.* 2019 Mar 10:420. doi: 10.3389/fmicb.2019.00420.