

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFFECTO ANTIMICROBIANO DE BACTERIOFAGOS AMBIENTALES**

**SOBRE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii* Y**

***Pseudomonas aeruginosa* MULTIFARMACORRESISTENTES**

Por

**LUISA ITZEL RODRIGUEZ RODRIGUEZ**

Como requisito parcial para obtener el grado de  
MAESTRA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
MICROBIOLOGÍA

EFFECTO ANTIMICROBIANO DE BACTERIÓFAGOS AMBIENTALES  
SOBRE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii* Y  
*Pseudomonas aeruginosa* MULTIFARMACORRESISTENTES

COMITÉ DE TESIS



Dr. José Alberto Valadez Lira  
Presidente



Dra. Licet Villarreal Treviño  
Secretario



Dra. Paola Bocanegra Ibarias  
Vocal



Dr. Humberto Antonio Salazar Sesatty  
Vocal



Dra. Itza Eloisa Luna Cruz  
Vocal



Dra. Katishka Arévalo Niño  
Subdirectora de Posgrado



EFFECTO ANTIMICROBIANO DE BACTERIÓFAGOS AMBIENTALES  
SOBRE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii* Y  
*Pseudomonas aeruginosa* MULTIFARMACORRESISTENTES

El siguiente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Inmunología Molecular perteneciente a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección del Dr. José Alberto Valadez Lira, así como en el Laboratorio de Infectología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, así como la Unidad de Microbioma y Microbiología Avanzada perteneciente al Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección de la Dra. Samantha Maribel Flores Treviño.

**COMITÉ DE TESIS**



Dr. José Alberto Valadez Lira  
Director de Tesis



Dra. Samantha Maribel Flores Treviño  
Asesor Externo

## **AVISO DE DERECHOS DE AUTOR**

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi profundo agradecimiento a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por los conocimientos impartidos durante mi carrera y por las valiosas enseñanzas que me han permitido llevar a cabo este proyecto.

Al Laboratorio de Infectología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por darme la oportunidad de ser miembro de sus instalaciones, por los conocimientos compartidos, el material, el espacio y los recursos proporcionados para la realización del presente proyecto.

A la Dra. Samantha Maribel Flores Treviño y Dr. José Alberto Valadez Lira, por darme la oportunidad de crecimiento profesional en el laboratorio, por sus conocimientos, paciencia y comprensión en el proceso de realización de la tesis, así como por abrirme las puertas a nuevas oportunidades.

A mis compañeros del laboratorio que me han apoyado en este camino: Edeer, Edith, Ale y Daphne, quienes me han acompañado con nuevos conocimientos y apoyo incansable. A mis amigos y compañeros de carrera Gustavo Garza, Alan Martínez, que me han apoyado con buenos momentos, diversión y conocimientos con otras perspectivas.

A mi familia especialmente a mi madre por todo el apoyo que me ha dado durante el camino, su amor y su presencia, a mi padre por demostrarme que puedo hacer todo, por criarme con amor, a mi primo por guiarme por el camino de las ciencias biológicas, a mis hermanos por las risas, la convivencia, el apoyo y las alas que me han dado en el camino, a mi tía Kata y mi abuelita por los ánimos y el amor que me han brindado estos años.

Por último, a mis amigos: Alan, Narváez, Laura, Joshua, que me han dado buenos momentos a lo largo de mi vida, me han apoyado, me escuchan y me alientan a seguir adelante.

## **DEDICATORIA**

### **A MI MADRE**

Leticia Rodriguez Elizalde

Por el apoyo a todas mis metas, el amor incondicional y la fe inquebrantable que tiene  
en mí.

### **A MI PADRE**

J. Jesús Rodriguez Rubio

Por demostrarme que puedo cumplir mis sueños y haber despertado en mí la pasión  
por la ciencia.

### **A MIS HERMANOS**

Yollintzin, Quetzalistli, Cuauhtzin y Cuauhnochtli.

Por ser una fuente de inspiración y fortaleza en este camino.

### **A MI FAMILIA**

A mi tía Kata, mi abuelita, mi primo Isra.

Por haberme apoyado en el camino haciéndome sonreír e instruyéndome en cada  
paso.

### **A MIS AMIGOS**

Alan, Yarely, Laura, Gustavo.

Por su inquebrantable apoyo, su constante ánimo y por estar siempre a mi lado en este  
viaje académico.

### **A LOS LECTORES**

“En un mundo donde incluso las bacterias encuentran formas de sobrevivir, adaptarse  
y persistir, quizá nosotros también podamos hacerlo. Espero que aprendamos a  
hacerlo.”

## ÍNDICE

|                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------|----|
| 1. RESUMEN .....                                               | 1  |
| 2. ABSTRACT.....                                               | 2  |
| 3. INTRODUCCIÓN .....                                          | 3  |
| 4. ANTECEDENTES .....                                          | 4  |
| 4.1. Generalidades .....                                       | 4  |
| 4.2. <i>Acinetobacter baumannii</i> .....                      | 4  |
| 4.2.1. Importancia clínica de <i>A. baumannii</i> .....        | 5  |
| 4.2.2. Tratamiento de <i>A. baumannii</i> .....                | 6  |
| 4.2.3. Farmacorresistencia en <i>A. baumannii</i> .....        | 6  |
| 4.2.4. Mecanismos de resistencia en <i>A. baumannii</i> .....  | 7  |
| 4.2.5. Factores de virulencia de <i>A. baumannii</i> .....     | 8  |
| 4.2.6. Producción de biopelícula en <i>A. baumannii</i> .....  | 9  |
| 4.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....                       | 10 |
| 4.3.1. Importancia clínica de <i>P. aeruginosa</i> .....       | 11 |
| 4.3.2. Tratamiento de <i>P. aeruginosa</i> .....               | 11 |
| 4.3.3. Farmacorresistencia en <i>P. aeruginosa</i> .....       | 12 |
| 4.3.4. Mecanismos de resistencia en <i>P. aeruginosa</i> ..... | 13 |
| 4.3.5. Factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i> .....    | 13 |
| 4.3.6. Producción de biopelícula en <i>P. aeruginosa</i> ..... | 14 |
| 4.4. Bacteriófagos .....                                       | 15 |
| 4.4.1. Historia del descubrimiento de los bacteriófagos .....  | 16 |
| 4.4.2. Clasificación de los bacteriófagos.....                 | 16 |
| 4.4.3. Aplicaciones de los bacteriófagos .....                 | 18 |
| 4.4.4. Aislamiento de bacteriófagos .....                      | 19 |
| 4.4.5. Bacteriófagos contra la producción de biopelícula ..... | 19 |
| 4.4.6. Bacteriófagos contra <i>A. baumannii</i> .....          | 19 |
| 4.4.7. Bacteriófagos contra <i>P. aeruginosa</i> .....         | 19 |
| 5. JUSTIFICACIÓN .....                                         | 21 |
| 6. HIPÓTESIS .....                                             | 22 |
| 7. OBJETIVOS .....                                             | 23 |
| 7.1. Objetivo general .....                                    | 23 |
| 7.2. Objetivos específicos.....                                | 23 |
| 8. MATERIALES Y MÉTODOS.....                                   | 24 |
| 8.1. Selección de aislamientos clínicos .....                  | 24 |

|        |                                                                           |    |
|--------|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 8.2.   | Identificación de los aislamientos .....                                  | 24 |
| 8.3.   | Determinación del perfil de susceptibilidad a antimicrobianos .....       | 25 |
| 8.4.   | Definición de la resistencia a antimicrobianos .....                      | 25 |
| 8.5.   | Determinación de la producción de biopelícula .....                       | 26 |
| 8.6.   | Selección de aislamientos MDR y productores.....                          | 28 |
| 8.7.   | Obtención de muestras ambientales .....                                   | 28 |
| 8.8.   | Aislamiento de bacteriófagos .....                                        | 28 |
| 8.8.1. | Enriquecimiento de bacteriófagos.....                                     | 28 |
| 8.8.2. | Spot Test.....                                                            | 29 |
| 8.8.3. | Ensayo en placa.....                                                      | 29 |
| 8.8.4. | Purificación .....                                                        | 29 |
| 8.9.   | Evaluación de actividad antimicrobiana de bacteriófagos ambientales ..... | 30 |
| 8.10.  | Evaluación de actividad antibiopelícula de bacteriófagos ambientales....  | 31 |
| 9.     | RESULTADOS .....                                                          | 33 |
| 9.1.   | Identificación de aislamientos clínicos.....                              | 33 |
| 9.2.   | Determinación del perfil de susceptibilidad.....                          | 34 |
| 9.3.   | Determinación de producción de biopelícula .....                          | 35 |
| 9.4.   | Selección de aislamientos para reto contra bacteriófagos .....            | 36 |
| 9.5.   | Aislamiento de bacteriófagos ambientales .....                            | 37 |
| 9.6.   | Determinación de perfil de erradicación de biopelícula.....               | 38 |
| 9.7.   | Actividad antimicrobiana de bacteriófagos ambientales.....                | 41 |
| 9.8.   | Actividad antibiopelícula de bacteriófagos ambientales .....              | 43 |
| 10.    | DISCUSIÓN .....                                                           | 49 |
| 11.    | CONCLUSIONES .....                                                        | 53 |
| 12.    | PERSPECTIVAS .....                                                        | 54 |
| 13.    | BIBLIOGRAFÍA .....                                                        | 55 |
| 14.    | RESUMEN BIOGRÁFICO .....                                                  | 62 |



## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Datos clínicos y demográficos de los pacientes de aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> y <i>A. baumannii</i> del 2021 al 2024 en un hospital de tercer nivel de atención en Nuevo León. ....            | 33 |
| Tabla 2. Puntos de corte y perfil de susceptibilidad a antibióticos en aislamientos de <i>A. baumannii</i> .....                                                                                                 | 34 |
| Tabla 3. Puntos de corte y perfil de susceptibilidad a antibióticos en aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> . ....                                                                                               | 34 |
| Tabla 4. Clasificación de resistencia a los antimicrobianos de <i>A. baumannii</i> y <i>P. aeruginosa</i> de acuerdo con diferentes criterios para clasificar la resistencia: Magiorakos et al., CDC e IDSA..... | 35 |
| Tabla 5. Producción de biopelícula de <i>A. baumannii</i> y <i>P. aeruginosa</i> .....                                                                                                                           | 35 |
| Tabla 6. Aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> y <i>A. baumannii</i> MDR y productores de biopelícula retados ante bacteriófagos ambientales. ....                                                                | 36 |
| Tabla 7. Concentraciones mínimas inhibitorias en células planctónicas y de erradicación de biopelícula en aislamientos clínicos de <i>A. baumannii</i> y <i>P. aeruginosa</i> . ....                             | 38 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Factores de virulencia de <i>A. baumannii</i> (Yehya et al., 2025). .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 9  |
| Figura 2. Factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i> (Mohan et al., 2024).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 14 |
| Figura 3. Morfología de diferentes familias de bacteriófagos. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 17 |
| Figura 4. Tipos de fagos. Los bacteriófagos pueden replicarse por líticos, lisogénicos o permanecer en estado crónico. En el ciclo lítico de replicación, los virus se liberan del huésped después de completar su replicación. El ciclo lisogénico implica la inclusión del genoma del huésped, este ciclo puede contribuir a la transferencia de genes virulentos de unas bacterias a otras (Rogovski et al., 2021). .... | 18 |
| Figura 5. Diagrama general para caracterización bacteriana. A) identificación, B) determinación de susceptibilidad y C) producción de biopelícula de aislamientos de <i>A. baumannii</i> y <i>P. aeruginosa</i> .....                                                                                                                                                                                                       | 27 |
| Figura 6. Diagrama general para aislamiento de bacteriófagos ambientales. A) obtención de muestra de aguas residuales, B) aislamiento de bacteriófago, C) Spot test y D) Ensayo en placa.....                                                                                                                                                                                                                               | 30 |
| Figura 7. Diagrama general para la determinación de la actividad antimicrobiana y antibiopelícula de bacteriófagos ambientales aislados. A) Inóculo inicial, B) actividad antimicrobiana, C) Viabilidad metabólica y D) Actividad antibiopelícula de los bacteriófagos aislados. ....                                                                                                                                       | 32 |
| Figura 8. Actividad de bacteriófago sobre cepa de <i>P. aeruginosa</i> (24-0824). a) Spot Test. b) Ensayo en placa dilución 10-6. c) Aumento de las placas líticas presentes en el ensayo en placa. d) Ensayo en placa observado desde estereoscopio (1.6X). ....                                                                                                                                                           | 37 |
| Figura 9. Actividad de bacteriófago sobre cepa de <i>P. aeruginosa</i> (24-1426). a) Spot Test. b) Ensayo en placa dilución 10-6. c) Aumento de las placas líticas presentes en el ensayo en placa. d) Ensayo en placa observado desde estereoscopio (1.6X). ....                                                                                                                                                           | 37 |
| Figura 10. Actividad de bacteriófago sobre cepa de <i>A. baumannii</i> (23-1139). a) Spot Test. b) Ensayo en placa dilución 10-4. c) Aumento de las placas líticas presentes en el ensayo en placa. d) Ensayo en placa observado desde estereoscopio (1.6X). ....                                                                                                                                                           | 38 |
| Figura 11. Diferencias entre MIC y MBEC de la cepa 24-0824 de <i>P. aeruginosa</i> . MIC: Concentración mínima de inhibición; MBEC: Concentración mínima de erradicación de biopelícula. ....                                                                                                                                                                                                                               | 39 |
| Figura 12. Diferencias entre MIC y MBEC de la cepa 24-1426 de <i>P. aeruginosa</i> . MIC: Concentración mínima de inhibición; MBEC: Concentración mínima de erradicación de biopelícula. ....                                                                                                                                                                                                                               | 40 |

Figura 13. Diferencias entre MIC y MBEC de la cepa 23-1139 de *A. baumannii*. MIC: Concentración mínima de inhibición; MBEC: Concentración mínima de erradicación de biopelícula. Actividad antimicrobiana del bacteriófago..... 40

Figura 14. Actividad antimicrobiana de bacteriófagos expresada en Log10 CFU/ml, los valores se obtuvieron por tiempo cada 10 minutos. A) *P. aeruginosa* 24-1426 con un MOI de 8. B) *P. aeruginosa* 24-0824 con un MOI de 8. C) *A. baumannii* 23-1139 con un MOI de 0.01. .... 41

Figura 15. Porcentaje de viabilidad metabólica con rezasurina de A) *P. aeruginosa* (24-0824, 24-01426) y B) *A. baumannii* (23-1139) y por MOI de fago utilizado en el ensayo. MOI; Multiplicidad de infección. .... 42

Figura 16. Morfología colonial de *P. aeruginosa* aislamiento 24-0824 después de ser sometida a diferentes tratamientos y antibióticos. A) Meropenem; B) Imipenem; C) Levofloxacin; D) Colistina. 6h F+A: Tratamiento 6 horas del fago posteriormente cambiado a un panel de antibióticos; F+A: Fago y antibiótico en conjunto; MOI: Multiplicidad de Infección del fago. .... 44

Figura 17. Morfología colonial de *P. aeruginosa* aislamiento 24-1426 después de ser sometida a diferentes tratamientos y antibióticos. A) Meropenem; B) Imipenem; C) Levofloxacin; D) Colistina. 6h F+A: Tratamiento 6 horas del fago posteriormente cambiado a un panel de antibióticos; F+A: Fago y antibiótico en conjunto; MOI: Multiplicidad de Infección del fago. .... 46

Figura 18. Morfología colonial de *A. baumannii* aislamiento 23-1139 después de ser sometida a diferentes tratamientos y antibióticos. A) Meropenem; B) Imipenem; C) Levofloxacin; D) Colistina. 6h F+A: Tratamiento 6 horas del fago posteriormente cambiado a un panel de antibióticos; F+A: Fago y antibiótico en conjunto; MOI: Multiplicidad de Infección del fago. .... 48

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

|                     |                                                                                                                              |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>%</b>            | Por ciento                                                                                                                   |
| <b>°C</b>           | Grados Celsius                                                                                                               |
| <b>ADN</b>          | Ácido desoxirribonucleico                                                                                                    |
| <b>ARNr</b>         | Ácido ribonucleico ribosomal                                                                                                 |
| <b>ATCC</b>         | <i>American Type Culture Collection</i>                                                                                      |
| <b>CBc</b>          | Complejo <i>Burkholderia cepacia</i>                                                                                         |
| <b>CMI</b>          | Concentración mínima inhibitoria                                                                                             |
| <b>CR</b>           | Resistencia a carbapenémicos                                                                                                 |
| <b>DTR</b>          | Resistencia difícil de tratar                                                                                                |
| <b>ESCR</b>         | Resistencia a cefalosporinas de espectro extendido                                                                           |
| <b>FQR</b>          | Resistencia a fluoroquinolonas                                                                                               |
| <b>h</b>            | Horas                                                                                                                        |
| <b>HCCA</b>         | ácido 4-bromo- $\alpha$ -cianocinámico                                                                                       |
| <b>LPS</b>          | Lipopolisacáridos                                                                                                            |
| <b>MALDI-TOF MS</b> | Espectrometría de masas mediante desorción/ionización láser asistida por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo. |
| <b>MDR</b>          | Multifarmacoresistente                                                                                                       |
| <b>mg</b>           | Miligramos                                                                                                                   |
| <b>min</b>          | Minutos                                                                                                                      |
| <b>mL</b>           | Mililitros                                                                                                                   |
| <b>MOI</b>          | Multiplicidad de infección                                                                                                   |
| <b>nm</b>           | nanómetros                                                                                                                   |
| <b>pH</b>           | Potencial de hidrógeno                                                                                                       |
| <b>TMP-STX</b>      | Trimetoprim-sulfametoxazol                                                                                                   |
| <b>TSB</b>          | Caldo soya tripticaseína                                                                                                     |
| <b>UCI</b>          | Unidad de cuidados intensivos                                                                                                |
| <b>µg</b>           | Microgramos                                                                                                                  |
| <b>µl</b>           | Microlitros                                                                                                                  |
| <b>µm</b>           | Micrómetros                                                                                                                  |

## 1. RESUMEN

Los patógenos nosocomiales *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* son bacterias Gram negativas pertenecientes al grupo ESKAPE, que presentan alta presencia en hospitales y alta resistencia a antimicrobianos. La producción de biopelícula además se ve involucrada en esta resistencia y protección contra el sistema inmune de huéspedes. Los bacteriófagos han sido analizados como una posible terapia contra estos patógenos; sin embargo, hay pocos estudios en México sobre esta terapia alternativa. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto antimicrobiano de bacteriófagos ambientales en aislamientos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* farmacorresistentes y productoras de biopelícula. Se identificaron los aislamientos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF de un hospital de tercer nivel de Nuevo León. Se obtuvo el perfil de susceptibilidad de los aislamientos clínicos seleccionados mediante microdilución en caldo. Se determinó la producción de biopelícula mediante tinción de cristal violeta. Se realizó el aislamiento de bacteriófagos ambientales de plantas de tratamiento de aguas residuales del área metropolitana de Monterrey mediante microscopía. Por último, se evaluó la actividad antimicrobiana de los bacteriófagos ambientales aislados sobre aislamientos clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* multifarmacorresistentes y productores de biopelícula. Se identificaron 35 aislamientos pertenecientes a *P. aeruginosa* con una alta resistencia a imipenem y levofloxacino y 29 de los aislamientos se identificaron como *A. baumannii* con una alta resistencia a meropenem, imipenem y levofloxacino. El 90,62 % de los aislamientos fueron productores de biopelícula. Se aislaron 3 fagos ambientales, dos de los fagos con actividad contra *P. aeruginosa* sin actividad antimicrobiana ni antibiopelícula, se observaron cambios morfológicos en las colonias de pigmentación y tamaño, y uno contra *A. baumannii*.

## 2. ABSTRACT

Nosocomial pathogens *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* are Gram-negative bacteria belonging to the ESKAPE group, which are highly prevalent in hospitals and exhibit high levels of antimicrobial resistance. Biofilm production is also implicated in this resistance and in protection against the host immune system. Bacteriophages have been investigated as a potential therapy against these pathogens; however, there are few studies in Mexico on this alternative therapy. The objective of this study is to evaluate the antimicrobial effect of environmental bacteriophages on drug-resistant, biofilm-producing isolates of *A. baumannii* and *P. aeruginosa*. The isolates were identified using MALDI-TOF mass spectrometry from a tertiary care hospital in Nuevo León. The susceptibility profile of the selected clinical isolates was determined using broth microdilution. Biofilm production was determined using crystal violet staining. Environmental bacteriophages were isolated from wastewater treatment plants in the Monterrey metropolitan area using microscopy. Finally, the antimicrobial activity of the isolated environmental bacteriophages was evaluated against clinical isolates of multidrug-resistant, biofilm-producing *A. baumannii* and *P. aeruginosa*. Thirty-five isolates belonging to *P. aeruginosa* with high resistance to imipenem and levofloxacin, and 29 of the isolates were identified as *A. baumannii* with high resistance to meropenem, imipenem, and levofloxacin. 90.62% of the isolates were biofilm-forming. Three environmental phages were isolated: two of the phages were active against *P. aeruginosa* but had no antimicrobial or anti-biofilm activity, and morphological changes in colony pigmentation and size were observed; one phage was active against *A. baumannii*.

### 3. INTRODUCCIÓN

Los estudios epidemiológicos han demostrado que alrededor de 700,000 personas han muerto a causa de bacterias resistentes a los antibióticos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) predice que este número puede incrementar a 10 millones para 2050 (Mancuso et al., 2021; Qin et al., 2022). La OMS publicó una lista de patógenos prioritarios ya que representan una amenaza para la salud global, estos patógenos son ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter*) representando una amenaza mundial humana por la adquisición de genes de resistencia a antimicrobianos (De Oliveira et al., 2020; Mancuso et al., 2021).

*Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* son bacilos Gram negativos que se asocian a las infecciones de asistencia sanitaria, particularmente problemáticas en la unidad de cuidados intensivos, además la OMS en 2019 dio un comunicado donde categorizó a *A. baumannii* como prioridad crítica, mientras que para *P. aeruginosa* lo catalogó como prioridad alta (Garrity, 2007; Jurado-Martín et al., 2021). La presencia de biopelícula también ayuda a la resistencia a factores de estrés como los antimicrobianos por ser una barrera física al proteger a un conglomerado de bacterias (Peterson , 1996).

Los bacteriófagos son virus que atacan bacterias con gran especificidad y pueden ser una oportunidad de tratamiento hacia patógenos de importancia clínica, sin embargo, han sido poco estudiados (Rogovski et al., 2021). Es por esto que en el presente trabajo se abordará el efecto antimicrobiano que pueden tener los bacteriófagos sobre *A. baumannii* y *P. aeruginosa* y si tienen algún efecto sobre la biopelícula en cepas productoras.

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1. Generalidades

Las Gammaproteobacterias son un rango taxonómico a nivel de clase, cuyos miembros exhiben una amplia variedad de características, entre ellas amplios rangos de aerobicidad, trofismo (quimioautotrofismo y fotoautotrofismo) y de adaptación a las temperaturas. En cuanto a la morfología de las bacterias puede variar en bacilos, bacilos curvos, cocos, espirilos o filamentos, teniendo a las bacterias más grandes conocidas (Williams et al., 2010). Las Gammaproteobacterias comprenden varios órdenes, entre los cuales se destacan varios Enterobacterales, Moraxellales, y Pseudomonadales (Garrrity, 2007).

Actualmente los patógenos han adquirido resistencia a los antibióticos, dando lugar a nuevas definiciones de resistencia difícil de tratar (DTR) refiriéndose a la no susceptibilidad a todos los agentes de primera línea, la multifarmacoresistencia (MDR) se define como la resistencia de al menos un agente en 3 categorías de antimicrobianos, la extensofarmacoresistencia (XDR) se define como la susceptibilidad limitada a 2 o menos antibióticos de todas las categorías y la panresistencia a los fármacos (PDR) es la resistencia a todos los agentes de todas las categorías (Cosentino et al., 2023).

Los patógenos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter*) se identificaron inicialmente como bacterias críticas MDR. A pesar de que se han desarrollado nuevas terapias, estas bacterias siguen siendo un reto en el área médica por las diversas adaptaciones, la obtención de genes de resistencia y la diseminación exitosa de éstas (Miller & Arias, 2024; Qin et al., 2022).

### 4.2. *Acinetobacter baumannii*

Es una bacteria Gram negativa, aerobio e inmóvil perteneciente a la familia *Moraxellaceae*, con morfología de cocobacilos que pueden llegar a ser esféricos en la etapa estacionaria de crecimiento, suelen encontrarse en pares o cadenas, sin motilidad tipo *swimming* pero sí motilidad tipo *twitching* presumiblemente por las fimbrias que tiene, con metabolismo estrictamente respiratorio. Generalmente el género es saprofita encontrándose de forma natural



en suelo, agua, aguas residuales y alimentos como vegetales crudos, también puede encontrarse de manera autóctona en la piel humana o tracto respiratorio, contenido de GC en ADN es de 38-47% (Garrity, 2007). Principalmente nosocomial que puede evitar el efecto biocida de los agentes antimicrobianos, se ha considerado de gran preocupación por su alta resistencia a los antibióticos y alta mortalidad asociada a sus infecciones (Ibrahim et al., 2021; Kyriakidis et al., 2021).

Se ha reportado que su multifarmacorresistencia (MDR, por sus siglas en inglés) se asocia a hospitalizaciones prolongadas, la presencia de catéteres y ventilación mecánica puede causar neumonía adquirida o asociada a ventilador, meningitis, septicemia, entre otros padecimientos (Kyriakidis et al., 2021). Puede sobrevivir durante largos periodos en el medio ambiente, lo que contribuye a su diseminación y propagación de cepas patógenas MDR (Ibrahim et al., 2021).

#### **4.2.1. Importancia clínica de *A. baumannii***

*A. baumannii* es responsable de diversos padecimientos nosocomiales que incluyen neumonía asociada a ventilador, sepsis especialmente en pacientes que se encuentran en la unidad de cuidados intensivos (UCI), meningitis, infecciones urinarias y en piel e incluso endocarditis (Ibrahim et al., 2021; Mendes et al., 2023), además supera el 50% de informes sobre infecciones secundarias junto a COVID-19 (Mendes et al., 2023). Se ha reportado una alta mortalidad por *A. baumannii* en casos de neumonía asociada a ventilación mecánica (NAV) que varía entre el 40% al 70%, en el caso de mortalidad por infecciones del torrente sanguíneo oscila entre el 28% a 43%. La infección de *A. baumannii* en pacientes con comorbilidades como diabetes y enfermedades pulmonares crónicas puede incrementar la mortalidad hasta un 64% (Ibrahim et al., 2021; Mendes et al., 2023).

El Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC), la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA) y el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de América (CDC) han declarado que *A. baumannii* multirresistente es una amenaza crítica en la salud mundial, y *Acinetobacter* resistente a carbapenémicos (CRA) pasó de un nivel de amenaza grave a urgente en 2019, considerándose el más grave de los organismos pertenecientes a ESKAPE (Mea et al., 2021). En la actualidad la OMS lo catalogó como un patógeno prioritario por la necesidad de nuevas terapias para tratarlo (Mendes et al., 2023).

Los factores de virulencia dependen de la especie y cepa e incluso de su entorno, actualmente el complejo de importancia clínica es *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (Acb) que incluye 5 especies patógenas (*A. baumannii*, *A. nosocomialis*, *A. pittii*, *A. seifertii* y *A. lactucae*), sin embargo, el de mayor patogenicidad y prevalencia es *A. baumannii* (Mendes et al., 2023).

#### **4.2.2. Tratamiento de *A. baumannii***

La terapia para *Acinetobacter* muchas veces puede resultar desafiante, ya que se ha determinado que es más común recuperar *A. baumannii* resistente a carbapenémicos de muestras respiratorias y heridas, sin embargo, esto no asegura que el 100% de las cepas encontradas en este tipo de muestras sean resistentes. Además, cuando *Acinetobacter* exhibe resistencia a carbapenémicos también tiene resistencia a la mayoría de otros antibióticos, por lo que no se tiene un régimen terapéutico claro. El enfoque sugerido para infecciones leves es usar un solo agente activo, el panel más sugerido es ampicilina-sulbactam, como tratamientos alternativos se pueden usar minociclina, tigeciclina, polimixina B (colistina), para infecciones moderadas a graves se recomienda usar al menos dos agentes con actividad *in vitro* se sugiere colistina con meropenem, ampicilina-sulbactam a altas dosis, derivados de tetraciclinas, meropenem de infusión prolongada o cefiderocol (Bartal et al., 2022; Tamma et al., 2022).

Además, se puede usar como tratamiento eravaciclina, imipenem-cilastatina o tigeciclina, aunque se recomienda solo unas ampicilina-sulbactam en monoterapia, todos los demás se pueden usar de forma susceptible en combinación con ampicilina-sulbactam a excepción de pacientes alérgicos a penicilina (Bartal et al., 2022). *A. baumannii* al ser una bacteria MDR es difícil de tratar, en la actualidad se aprobó un nuevo antibiótico el cefiderocol, el cual tiene buenos resultados como tratamiento de *Acinetobacter*, sin embargo, ya se han reportado cepas resistentes a este nuevo antibiótico (Mendes et al., 2023).

#### **4.2.3. Farmacorresistencia en *A. baumannii***

En un estudio de un hospital de Monterrey, Nuevo León, aislamientos de *A.* presentaron resistencia en un 49.8% a ampicilina-sulbactam, 88% a piperacilina-tazobactam, 86.3% a ceftazidima-avibactam, 88.2% a ceftazidima, 84.9% a imipenem, 85.4% a meropenem, 67% a

gentamicina, 83.7% a ciprofloxacino, 92.1% a levofloxacino, 32.5% a doxiciclina, 31 % a tigeciclina y 0.5% a colistina (Camacho-Ortiz et al., 2025).

En Etiopía se realizó un estudio con aislamientos de *A. baumannii* en el periodo de 2017 a 2021, donde se podía observar una resistencia creciente a lo largo de los años, ampicilina (86 a 92%), amoxicilina-clavulanato (81 a 84.7%), cloranfenicol (76 a 82.3%), cefotaxima (66.7 a 82.2%) y ciprofloxacino (58.5 a 66.7%), sin embargo, se pudo observar también una resistencia decreciente a tobramicina (61.1 a 25.2%), tazobactam (84.6 a 63.2%) y amikacina (31.6 a 26.2%), además se menciona que 73.7% de las cepas de *A. baumannii* son MDR (Araya et al., 2023).

Además, en un hospital de India se realizó un sondeo de agentes causales de infecciones en su unidad de cuidados intensivos, donde se estableció que *A. baumannii* fue la bacteria con más presencia en esa área y se identificó que la resistencia del 79.8% a imipenem, 77.1% a ciprofloxacino y 76.4 a ampicilina, seguidos por meropenem (74%), gentamicina (72%), piperacilina-tazobactam (73%), ceftazidima (63%) y levofloxacino (42%) (Lohiya & Deotale, 2023).

#### **4.2.4. Mecanismos de resistencia en *A. baumannii***

*A. baumannii* puede producir intrínsecamente betalactamasas, confiriéndole resistencia a algunas cefalosporinas, sin embargo, también puede adquirir genes de resistencia a carbapenémicos, resultando en la producción de carbapenemasas clase D que confiere resistencia a aminopenicilinas y carboxipenicilinas. Se observó con mayor frecuencia en México con 83.6% y con menor frecuencia la clase B, en México se reportó que el 1.2% de los casos asociados con *A. baumannii* contenían el gen para las carbapenemasas clase B, se ha reportado resistencia a la tercera generación de cefalosporinas (Bejarano et al., 2023; Ibrahim et al., 2021). Además, se han reportado cepas resistentes a la colistina debido a cambios en la estructura del lipopolisacárido (LPS), por los genes *lpxA/D/C* y *pmrA/B* lo que resulta en una modificación de la biosíntesis de lípidos A, pueden producir varias enzimas que modifican los aminoglucósidos y se relacionan con la resistencia a fluoroquinolonas (Ibrahim et al., 2021).

Por otro lado, se ha observado que la resistencia puede aumentar de manera intrínseca mediante el aumento de las bombas de eflujo, disminución de proteínas de membrana externa y mecanismos de resistencia adquirida. Los carbapenémicos como el meropenem e imipenem son los primeros en usarse para el tratamiento en contra de *A. baumannii*, sin embargo, desde que se descubrió la primera betalactamasa de tipo OXA resistente a carbapenémicos se han descubierto otras que pueden hidrolizar carbapenémicos (bla<sub>OXA-23</sub>, bla<sub>OXA-51</sub>, bla<sub>OXA-58</sub>), reportándose que la morbilidad y mortalidad aumenta en un 90% para las cepas que son resistentes a carbapenémicos. La última línea de defensa contra *A. baumannii* son las polimixinas, sin embargo, se han encontrado genes (*pmrB* y *pmrC*) que codifican para la resistencia de polimixinas (De Oliveira et al., 2020; Tu et al., 2023).

#### **4.2.5. Factores de virulencia de *A. baumannii***

A pesar de que no se han estudiado con profundidad los factores de virulencia de *A. baumannii* y *A. baylyi* se han comparado cepas patógenas con no patógenas, y se observó que las cepas patógenas tienen genes importantes en la detección de quorum, sideróforos y pili asociado a la motilidad, adherencia y el desarrollo de biopelícula. Además, el sistema de secreción tipo 6 (T6SS) estimula la respuesta inmune en las células eucariotas, la proteína de membrana externa OmpA puede causar muerte celular a través de focalización mitocondrial y nuclear, Omp38 induce la apoptosis de monocitos y células epiteliales, reduciendo la superficie mucosa e infectando más a profundidad del tejido, el polisacárido capsular (K1) de *A. baumannii* es necesario para su crecimiento y resistencia a la muerte en el suero humano (Ibrahim et al., 2021).

Tiene factores de virulencia como el LPS que se asocia con la adherencia, resistencia sérica, supervivencia en la infección tisular y evasión de la respuesta inmune del huésped, polisacárido capsular asociado a la adherencia, crecimiento en suero, supervivencia en infección tisular y desarrollo de biopelícula, la fosfolipasa asociada a resistencia sérica, invasión y supervivencia *in vivo*. La acinetobactina y NfuA son sistemas de adquisición de hierro que ayuda a la supervivencia *in vivo*, persistencia y muerte celular de células huésped. Además, tienen sistemas de adquisición de zinc, manganeso, sistema de secreción tipo 2 (T2SS), tipo 6 (T6SS), proteína de unión a plasminógeno, entre otros genes que ayudan a la resistencia a los antimicrobianos (Mea et al., 2021) (Fig. 1).

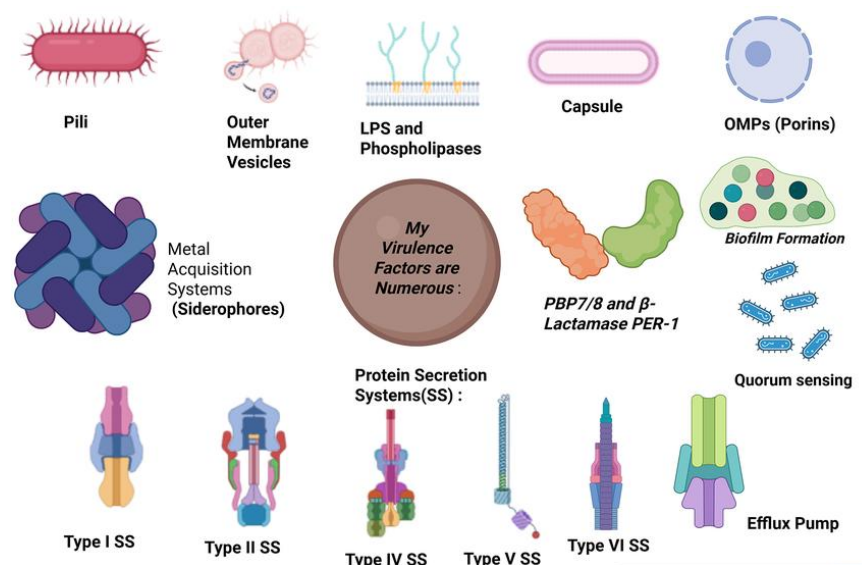


Figura 1. Factores de virulencia de *A. baumannii* (Yehya et al., 2025).

#### 4.2.6. Producción de biopelícula en *A. baumannii*

La biopelícula es una red de estructura acumulativa que se puede formar en superficies vivas y no vivas, su matriz está compuesta por carbohidratos, ácidos nucleicos, proteínas y otras macromoléculas, protege a las bacterias del estrés de medio ambiente, respuesta inmune, antibióticos y desinfectantes. Se ha demostrado que las células embebidas en biopelícula pueden resistir hasta 1000 veces más los antimicrobianos que sus contrapartes planctónicas (de Sousa et al., 2021; Ibrahim et al., 2021; Thi et al., 2020). La formación de biopelícula se asocia con el flagelo, los pili y otras adhesinas (Qin et al., 2022).

Las cepas de *A. baumannii* que son productoras de biopelícula tienen una tasa de supervivencia más alta que las cepas no productoras, siendo capaces de sobrevivir en las barandillas de las camas de los hospitales y ambientes húmedos, además se ha observado que los LPS son diferentes en las cepas productoras de biopelícula para protegerse de la humedad ambiental y confiere una mayor resistencia a los antibióticos (Ibrahim et al., 2021). La adherencia se ha observado en dispositivos médicos como catéteres, tubos endotraqueales de respiradores, botellas de tubos de diálisis, acero inoxidable y superficies de policarbonato, sin embargo, la superficie de preferencia para *Acinetobacter* es el policarbonato, observándose que las cepas pueden mantener sus factores de virulencia intactos en plástico, vidrio e incluso batas pero si afecta su viabilidad (Mea et al., 2021).

*Acinetobacter* puede seguir con motilidad o adherirse a una superficie, esto depende de los nutrientes presentes en el medio, *Acinetobacter* solo se adhiere cuando los nutrientes son escasos, después de la adherencia forman una estructura terciaria donde las células están en contacto unas con otras para formar la matriz. Se ha demostrado que los aislamientos clínicos de *A. baumannii* expresan más la formación de biopelícula que los aislamientos ambientales (Colquhoun & Rather, 2020; Mea et al., 2021). Las cepas de *Acinetobacter* productoras de biopelícula son capaces de sobrevivir la desecación el doble de tiempo que las células planctónicas, sin embargo, se observó que las productoras de biopelícula son menos resistentes a los antibióticos (Mea et al., 2021).

#### **4.3. *Pseudomonas aeruginosa***

Es una bacteria Gram negativa en forma de bacilo curvado, móviles por uno o varios flagelos y rara vez no móviles, aerobios y con metabolismo estrictamente respiratorio usando el oxígeno como aceptor terminal de electrones, aunque ocasionalmente pueden usar el nitrógeno como aceptor alternativo de electrones lo que les puede permitir un crecimiento anaerobio. Algunas especies pertenecientes al género de *Pseudomonas* son patógenas para humano, animales y plantas (Garrity, 2007). *P. aeruginosa* es una bacteria con un genoma amplio, el cual le permite la adaptación a diferentes ambientes, haciéndola una bacteria ubicua resistiendo ecosistemas naturales hasta tener huéspedes como humanos, plantas y animales, puede colonizar una gran variedad de hábitats entre ellos los contaminados por el ser humano como lo son las aguas residuales, derrames de petróleo, piscinas o agua contaminada con biocidas (Laborda et al., 2021).

Es un patógeno oportunista que puede infectar a pacientes que tengan enfermedades como fibrosis quística, heridas por quemaduras, cáncer, desordenes crónicos pulmonares, inmunodeficiencia y neumonía asociada a ventilación como el COVID-19 aumentando su morbilidad y mortalidad (Jurado-Martín et al., 2021; Qin et al., 2022; Thi et al., 2020). Se ha reconocido a *P. aeruginosa* como una bacteria potencialmente mortal y como un patógeno de prioridad según la OMS (Thi et al., 2020). Jurado-Martín et al. (2021) agrega que tiene una gran adaptabilidad y flexibilidad gracias a sus factores de virulencia, lo que le confiere una gran facilidad para adaptarse ante la respuesta inmune que pueda tener el huésped y a los factores de estrés del medio ambiente.

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

La importancia clínica de *P. aeruginosa* (de mayor interés clínico) radica en que es una bacteria extremadamente oportunista que suele causar infecciones graves en entornos hospitalarios, especialmente a personas inmunocomprometidas, neumonía asociada a atención médica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o fibrosis quística, al ser tan versátil es capaz de ocasionar infecciones agudas o crónicas, además tiene versatilidad en su resistencia a los antibióticos y puede transmitir la resistencia a los medicamentos por diferentes rutas, además se está extendiendo mundialmente. En 2017 la OMS colocó a *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos en el grupo crítico para los que se necesitan nuevos antibióticos (Grace et al., 2022; Jurado-Martín et al., 2021; Kothari et al., 2023; Qin et al., 2022).

*P. aeruginosa* presenta una población panmíctica lo que quiere decir que las cepas ambientales y las de importancia clínica son prácticamente indistinguibles, sin embargo, se han observado dos genes diferentes para secretar T3SS, *exoS* el cual se ha observado principalmente en infecciones respiratorias y *exoU* observándose principalmente en infecciones oculares (Laborda et al., 2021).

*P. aeruginosa* se ha vuelto resistente a desinfectantes y antibióticos tradicionales, lo que ha dificultado la retirada del entorno hospitalario y el tratamiento en pacientes infectados, su resistencia y protección contra el sistema inmune se debe a la producción de biopelícula, la tolerancia de la biopelícula a los antibióticos es multifactorial y depende de factores físicos, fisiológicos y genéticos (Ciofu & Tolker-Nielsen, 2019; Grace et al., 2022).

#### **4.3.2. Tratamiento de *P. aeruginosa***

Un estudio realizado a 3,184 aislamientos clínicos en Estados Unidos mostró que para antibióticos en combinación como ceftazidime-avibactam se observó una susceptibilidad del 97%, ceftolozano-tazobactam del 98.0%, imipenem-relebactam del 97.3% y tobramicina del 96.4%. Además, los aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a piperacilina-tazobactam, meropenem o MDR mantuvieron una buena actividad (Kothari et al., 2023).

En 2019 se aprobó el cefiderocol siendo una nueva cefalosporina que ayuda en las infecciones urinarias complicadas, también es la opción sugerida para la cistitis no complicada

pero difícil de tratar causada por *P. aeruginosa*, demostrando que es mejor opción que ceftazidima-avibactam y meropenem. También hay tratamientos combinados como ceftazidima-avibactam, ceftolozano-tazobactam, imipenem-cilastatina-relebactam, sin embargo, se usan únicamente como alternativa para cepas MDR, en el caso de las fluoroquinolonas son antibióticos de un espectro más amplio y se recomiendan principalmente para otitis externa aguda, infecciones en la piel o tejidos blandos e infección de vías urinarias complicada. Sin embargo, una de las limitaciones del uso de fluoroquinolonas es que se adquiere muy rápido la resistencia. El uso de tetraciclinas no es recomendado para *P. aeruginosa*, sin embargo, el uso de eravaciclina ha sido aprobado para su tratamiento. El uso de aminoglucósidos es altamente efectivo con un 94.5% de susceptibilidad y con una toxicidad mínima (de Sousa et al., 2021; Wood et al., 2023).

#### **4.3.3. Farmacorresistencia en *P. aeruginosa***

El descubrimiento, comercialización y administración de compuestos antimicrobianos para tratamientos revolucionó la medicina, sin embargo, esto mismo dio camino a la resistencia a los antimicrobianos usados de forma excesiva e innecesaria (Munita & Arias, 2016). Los mecanismos de resistencia adquiridos por las bacterias son principalmente los de regulación de transporte de antibióticos a través de la membrana bacteriana, la alteración del sitio objetivo del antibiótico y las modificaciones enzimáticas (Kyriakidis et al., 2021). Se ha detectado que han aumentado las cepas MDR de *P. aeruginosa* con tasas entre 15 y 30% según la región geográfica, sin embargo, también se ha observado que la resistencia a tratamientos de antibióticos combinados. En 2015 el ECDC informó que un total de 5.5% de aislados de *P. aeruginosa* fueron resistentes a cinco grupos de antimicrobianos bajo seguimiento, y reportaron que un 13% de aislados fueron resistentes a más de tres grupos de antimicrobianos (Kothari et al., 2023).

La tasa de resistencia a los antibióticos de *Pseudomonas* ha sido preocupante en las últimas 5 décadas. Los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* suelen exhibir una resistencia a los betalactámicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas e incluso a polimixinas de cepas aisladas del UCI que suelen mostrar una mayor incidencia a la resistencia a los antibióticos (Wood et al., 2023). En un estudio en Monterrey, Nuevo León, se observó resistencia del 21.8% a piperacilina-tazobactam, 13.2% a ceftazidima-avibactam, 18% a cefepime, 22.8% a



ceftazidima, 32.5% a imipenem, 24.8% a meropenem, 10.7% a amikacina, 8.3% a gentamicina, 10.6% a tobramicina, 18.2% a ciprofloxacino y 0% a colistina (Camacho-Ortiz et al., 2025).

#### **4.3.4. Mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa***

Uno de los mecanismos intrínsecos es evitar la entrada de antibióticos hidrofílicos a través de la disminución de la permeabilidad de la membrana externa y el uso de porinas específicas para los absorber los nutrientes necesarios, un ejemplo de esto es la porina OprD para la resistencia a carbapenémicos (de Sousa et al., 2021).

Las bombas de eflujo también contribuyen a la resistencia intrínseca a los antibióticos, las cuales son específicas de sustrato y pueden excluir una variedad de compuestos, entre ellos antibióticos que no están estructuralmente relacionados. Hay 5 tipos de bombas de eflujo (casete de unión a ATP, pequeña resistencia a múltiples fármacos, facilitador principal, división de nodulación de resistencia (RND) y extrusión de compuestos tóxicos y MDR) siendo la más prevalente en *Pseudomonas* el tipo RND (de Sousa et al., 2021; Foucrier et al., 2023).

Otro determinante es el gen *ampC* que codifica a la enzima hidrolítica betalactamasa confiriendo un nivel bajo de resistencia a las aminopenicilinas, mientras que la mayoría de las cefalosporinas inducen la activación de *ampC* y por lo tanto terminan hidrolizados estos compuestos. La adquisición de genes puede ayudar a la producción de betalactamasas de espectro extendido (ESBLs) confiriendo resistencia a la mayoría de betalactámicos incluidas penicilinas y cefalosporinas. Además, se ha detectado que *P. aeruginosa* puede alterar su membrana al estrés por fosforo, en consecuencia, antibióticos como la polimixina B es menos eficaz contra este microorganismo (de Sousa et al., 2021).

#### **4.3.5. Factores de virulencia de *P. aeruginosa***

Los LPS son un factor de virulencia que ayudan en gran medida a *Pseudomonas*, ya que sirve como componente estructural de superficie protegiendo a la célula, así como la endotoxina del lípido A permite el daño tisular, la unión y el reconocimiento de los receptores del huésped, además se ha demostrado que ayuda a la tolerancia a los antibióticos y la formación de biopelícula (Qin et al., 2022).

Por otro lado, las proteínas de membrana contribuyen al intercambio de nutrientes, adhesión y resistencia a antibióticos. También tiene 5 diferentes sistemas de secreción (T1SS, T2SS, T3SS, T5SS, T6SS), el T6SS asociado a los flagelos, también se ha reportado el T4SS a los pili asociados a la motilidad tipo *twitching* y a la adhesión celular a células epiteliales, además la exoenzima S y flagelos actúan como adhesinas importantes en el proceso de adhesión y el T3SS asociado a la secreción de componentes multitóxicos que contribuyen a la colonización del huésped, la adhesión, el *swimming*, la señalización quimiotáctica de respuesta asociada al *swarming* (de Sousa et al., 2021; Garrity, 2007; Qin et al., 2022). La motilidad de *Pseudomonas* se da por la presencia de flagelos polares, en algunos casos subpolar, algunas especies (como *P. stutzeri* y *P. mendocina*) son capaces de producir flagelos laterales de longitud corta que se desprenden más fácilmente que los polares (Garrity, 2007).

Se han enumerado 6 pigmentos producidos por *Pseudomonas* (piocianica, piorrubina, clorafina, oxifenazina, proteína azul de *Pseudomonas* y pioverdina), el más conocido es el pigmento azul piocianina, el cual le da color a las heridas por *P. aeruginosa* (Garrity, 2007) (Fig. 2).

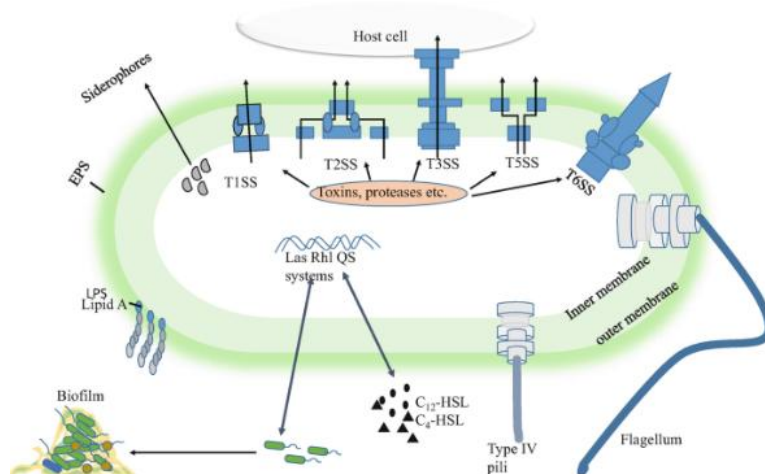


Figura 2. Factores de virulencia de *P. aeruginosa* (Mohan et al., 2024).

#### 4.3.6. Producción de biopelícula en *P. aeruginosa*

La formación de la biopelícula en *P. aeruginosa* se desencadena al asociarse con una superficie ya sea biótica o abiótica. El desarrollo de la biopelícula se divide en 5 etapas, en la primera etapa hay una unión reversible a la superficie, en la segunda etapa hay una afluencia

continua de células móviles, hay formación de microcolonias y después de la fijación hay secreción de genes *algC*, *algD* y *algU* responsables de la síntesis de sustancias poliméricas extracelulares del alginato. En la tercera etapa hay proliferación celular y pérdida de orgánulos de movilidad, en este momento la biopelícula madura. En la cuarta etapa la biopelícula ya maduró completamente, se forma una estructura tridimensional y se adopta una estructura multicelular en forma de hongo. En la última etapa la biopelícula se desprende en pequeños agregados o células individuales para su dispersión (de Sousa et al., 2021; Thi et al., 2020). El locus *psl* codifica a la síntesis de polisacáridos ricos en galactosa y manosa que desempeñan un papel esencial en la superficie celular, interacciones celulares y formación de biopelícula, el polisacárido Pel es un material de la matriz rico en glucosa, formado por el operón *pelABCDEF*, creando una matriz sensible a la celulasa. También se involucran diversas maquinarias para la formación de la biopelícula como lo es el *Quorum Sensing* (QS), los sistemas reguladores de dos componentes y la molécula de señalización de nucleótidos c-di-GMP (de Sousa et al., 2021; Thi et al., 2020).

La liberación de ADN por las células que sufrieron lisis celular puede servir como fuente de nutrientes, apoyar la organización y alineación celular a través de la motilidad tipo *twitching*, como quelante catiónico que interactúa con cationes divalentes ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) en membrana externa, activando el T4SS, también la deposición del ADN en el entorno lo convierte ácido lo cual limita la penetración de los agentes antimicrobianos (Thi et al., 2020).

#### **4.4. Bacteriófagos**

Los bacteriófagos son virus restringidos únicamente a bacterias que pueden ser usados como antibióticos naturales que se pueden usar en contra de infecciones tanto de bacterias Gram positivas como Gram negativas. Tienen una alta especificidad a nivel de especie e incluso cepa, haciendo que el microbiota intestinal no se vea afectada. Son fáciles de aislar al ser ubicuos y son abundantes en todos los nichos ecológicos pudiéndose aislar de suelo, agua, aguas residuales, hospitales, aguas termales, material fecal y en tracto gastrointestinal de animales e incluso del humano, además pueden propagarse rápidamente en todo el cuerpo y órganos como el cerebro, la glándula prostática y los huesos, a los que generalmente no llegan los antibióticos (Ibrahim et al., 2021; Tu et al., 2023).

El ciclo de vida de los fagos consta de 5 etapas: adsorción, infestación, replicación, ensamblaje y liberación (Chegini et al., 2020). Tienen una abundancia relativa de 1:5 entre bacterias y fagos. La identificación de los bacteriófagos es difícil, ya que no hay marcadores universales conservados a diferencia del gen bacteriano 16S rRNA y se suelen usar partes pequeñas del genoma para determinar la familia como la cápside viral g20 de T4 (Rogovski et al., 2021).

#### **4.4.1. Historia del descubrimiento de los bacteriófagos**

La primera descripción de los bacteriófagos fue dada por Frederick William Twort a principios del siglo XX, el cual sugirió que los virus podrían ser similares a las bacterias parasitarias que tenían necesidades nutricionales complejas, pensando que podría haber virus de vida libre. En uno de los cultivos observó micrococos amarillos y blancos (posiblemente *Staphylococcus*), sin embargo, había colonias más vidriosas, por lo que se creyó que durante el proceso de cultivo eran restos celulares considerando “una manifestación espontánea de fuerza destructiva” (Letarov, 2020).

Dos años de este descubrimiento Felix d’Herelle observó las mismas colonias vidriosas y transparentes en cultivos de *Shigella*, describiendo que en estas zonas podrían ser “parásitos intracelulares obligados” de las bacterias. Realizó experimentos para observar si podían ser usados como terapia, observó que no todos los fagos eran efectivos como tratamiento y que cada uno tenía una preparación y aplicación diferente (Ahmad et al., 2024).

En 1921 se realizó el primer estudio publicado sobre la terapia de fagos en pacientes con necrosis por *Streptococcus*, resultando en una mejoría en los pacientes (Dec et al., 2020). A pesar de que servían como terapia, el descubrimiento se vio eclipsado por el descubrimiento de la penicilina de Alexander Fleming y por la introducción de las sulfonamidas en 1940 por lo que pararon los estudios sobre los fagos (Ahmad et al., 2024; Dec et al., 2020).

#### **4.4.2. Clasificación de los bacteriófagos**

Hoy en día los bacteriófagos se clasifican en 870 especies, 142 familias, más de 204 géneros y 4978 especies de fagos, incluidos 6196 virus bacterianos y 88 virus arqueológicos. Se distinguen por forma, estructura y simetría de la cápside, ácido nucleico e interacción con el

huésped (Adriaenssens et al., 2017). Los fagos se caracterizan por tener forma filiforme o esférica y la presencia o ausencia de cabeza o cola. Los que tiene cola son el 96% de ellos, la mayoría tiene ADN bicatenario y en menor medida ADN monocatenario, ARN bicatenario o monocatenario (Dec et al., 2020). De acuerdo con la clasificación propuesta por (Goyal et al., 1987) pueden clasificarse por la función de sus receptores en el huésped:

- **Fagos somáticos:** Receptores presentes en pared celular.
- **Fagos capsulares:** Receptores en el polisacárido capsular.
- **Fagos de apéndice:** Receptores localizados en los factores de virulencia bacteriana como flagelos, pili o fimbrias.

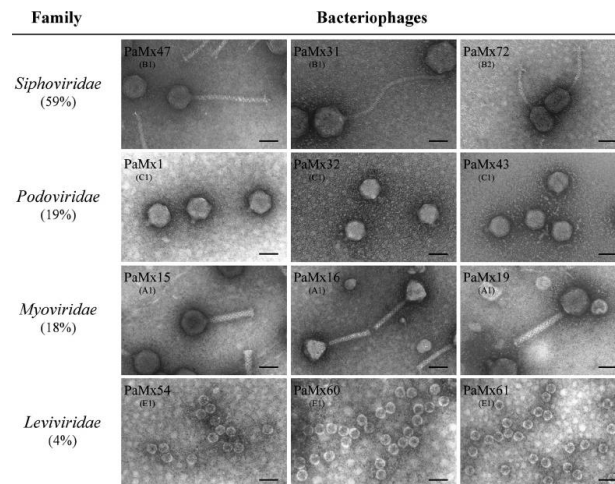


Figura 3. Morfología de diferentes familias de bacteriófagos.

Los fagos también pueden clasificarse por su ciclo de replicación (Rogovski et al., 2021), como se observa en la Fig. 1:

- **Fagos líticos:** los virus se liberan del huésped después de completar su replicación.
- **Fagos lisogénicos:** implica la inclusión del material genético en el genoma del huésped, este ciclo puede contribuir a la transferencia de genes virulentos de unas bacterias a otras.
- **Fagos en estado crónico:** los virus permanecen de forma crónica dentro de la célula, entran por el sistema de secreción o pili de la bacteria y usan este mismo mecanismo para salir, no hay lisis (Dale & Park, 2013).

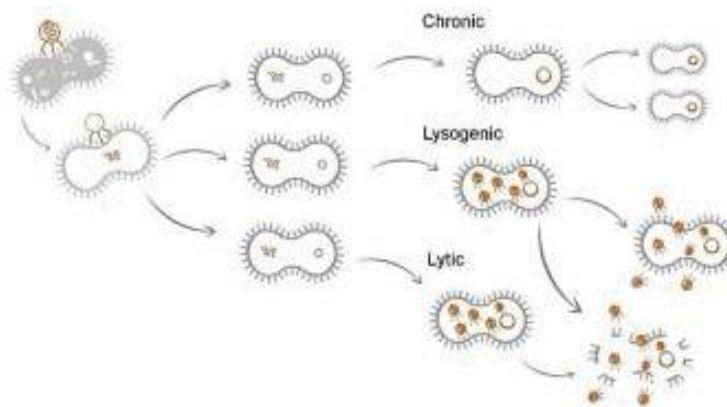


Figura 4. Tipos de fagos. Los bacteriófagos pueden replicarse por líticos, lisogénicos o permanecer en estado crónico. En el ciclo lítico de replicación, los virus se liberan del huésped después de completar su replicación. El ciclo lisogénico implica la inclusión del genoma del huésped, este ciclo puede contribuir a la transferencia de genes virulentos de unas bacterias a otras (Rogovski et al., 2021).

#### 4.4.3. Aplicaciones de los bacteriófagos

La reducción de la contaminación de los alimentos ha sido prioridad como prevención a las enfermedades que pueden provenir de alimentos contaminados, se pueden utilizar muchos métodos como la pasteurización, alta presión y radiación, sin embargo, no son adecuados para todos los alimentos. Se ha abordado el uso de bacteriófagos para reducir los patógenos en carne cruda o alimentos que están listos para ser consumidos, así como descontaminación de canales, actualmente hay fagos comercializados para *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Escherichia coli*, usando los fagos como bioconservación de los alimentos (Żbikowska et al., 2020).

En cuanto a la biotecnología se han estudiado con diversos fines como el diseño de medicamentos, entrega de vacunas de ADN y proteínas, detección de patógenos, selección de bibliotecas de proteínas, péptidos o anticuerpos. Están siendo modificados como nano-contenedores ajustables para el empaquetamiento y entrega de péptidos, usados también como biosensores y su uso como terapia antes enfermedades patógenas en la agricultura, ganadería y acuicultura (Sharma et al., 2017).

Los bacteriófagos líticos son las principales herramientas para la terapia con fagos, por su capacidad de invadir células bacterianas y matarlas. Los bacteriófagos lisogénicos también podrían tener una aplicación. Los mecanismos de transducción podrían permitir el uso de

bacteriófagos como herramientas genéticas para aumentar la susceptibilidad bacteriana a los antibióticos, sin embargo, no se ha explorado esta posibilidad. El uso de los bacteriófagos como tratamiento mostró una recuperación de un paciente con shigelosis en 9 días mientras que el tratamiento con antibióticos se observó mejoría hasta el día 29 (Rogovski et al., 2021).

#### **4.4.4. Aislamiento de bacteriófagos**

Los fagos pueden aislarse del suelo, agua, aceite e incluso en el aire, es por esto que hay diversas técnicas de muestreo para obtener los fagos. En el caso del agua puede ser por placa directa, ultrafiltración, métodos por absorción, en suelo se obtienen por método de enriquecimiento y en aire se muestrea con ayuda de impactadores, muestreadores con filtro o bomba de vacío en el laboratorio (Nair et al., 2022).

#### **4.4.5. Bacteriófagos contra la producción de biopelícula**

En presencia de biopelícula, los fagos pueden tener producción de enzimas que despolimerizan la matriz, lo cual ayuda a la eliminación de la misma, dando oportunidad a los antibióticos de penetrar la capa y llegar a las bacterias, así como los fagos atacarlas según el tratamiento, aumenta la eficacia con terapia combinada de fagos y antibióticos (Straka et al., 2022)

#### **4.4.6. Bacteriófagos contra *A. baumannii***

A pesar de que los bacteriófagos se pueden encontrar en gran cantidad de lugares, las fuentes principales donde se encuentran fagos para *A. baumannii* son efluentes hospitalarios, lesiones, esputo de pacientes o aves de granjas de pastoreos. Los sitios de reconocimiento de la cola de los fagos son abundantes y diversos, además los LPS, las lipoproteínas y la capsula de *A. baumannii* son sitios potenciales de unión (Tu et al., 2023).

#### **4.4.7. Bacteriófagos contra *P. aeruginosa***

Los cocteles de fagos pueden inhibir fácilmente la biopelícula de *P. aeruginosa* y destruir su estructura mediante la síntesis de enzimas como la polisacárida despolimerasa puede degradar los carbohidratos que forman la biopelícula bacteriana en el huésped, también forman enzimas peptidoglucano hidrolasas que forman desde el interior de la célula para liberar a los

fagos que ya se replicaron dentro de la bacteria. También se ha reportado que los bacteriófagos pueden inhibir la producción de la biopelícula con la síntesis de lactonasa de quorum (QQ) lo cual causa la hidrólisis de las lactonas de acil homoserina (AHL) y por lo tanto la actividad de detección del quorum (Chegini et al., 2020).



## 5. JUSTIFICACIÓN

*Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* son bacterias frecuentes asociadas a infecciones nosocomiales, las personas hospitalizadas están en un riesgo latente de contraer una de estas infecciones y complicar su estancia. Además, la adquisición de genes de resistencia a diversos fármacos y la producción de biopelícula también han sido de importancia, al hacer estas bacterias más difíciles de tratar, estas resistencias adquiridas dificultan el tratamiento convencional y se tiene que optar por terapias más agresivas, a esto se le agrega la multifarmacoresistencia (MDR).

Los bacteriófagos son virus restringidos únicamente a bacterias que pueden ser usados como antibióticos naturales en contra de infecciones tanto de bacterias Gram positivas como Gram negativas. Son abundantes en todos los nichos ecológicos y existen plataformas biotecnológicas para su aislamiento. Tienen una alta especificidad a nivel de especie e incluso cepa.

Actualmente hay abundantes reportes sobre infecciones por *A. baumannii* y *P. aeruginosa* en México y el mundo, pero actualmente no hay estudios relacionados con la terapia con bacteriófagos en México. Por lo anterior es de importancia dar un perfil claro de la farmacoresistencia y biopelícula de aislamientos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, y obtener una visión de la terapia de bacteriófagos como una oportunidad de nuevas terapias.

## 6. HIPÓTESIS

Los bacteriófagos ambientales presentan actividad antimicrobiana contra aislamientos clínicos multifarmacorresistentes productores de biopelícula de *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*.

## 7. OBJETIVOS

### 7.1. Objetivo general

Determinar la actividad antimicrobiana de los bacteriófagos ambientales aislados de aguas residuales contra cepas clínicas multifarmacorresistentes y productoras de biopelícula de *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*.

### 7.2. Objetivos específicos

1. Seleccionar e identificar aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* de un hospital de tercer nivel de Nuevo León.
2. Determinar el perfil de susceptibilidad de los aislamientos clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* seleccionados.
3. Determinar la producción de biopelícula de los aislamientos clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* seleccionados.
4. Aislar bacteriófagos ambientales de plantas de tratamiento de aguas residuales del área metropolitana de Monterrey.
5. Evaluar la actividad antimicrobiana de los bacteriófagos ambientales aislados sobre aislamientos clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* multifarmacorresistentes y productores de biopelícula.

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1. Selección de aislamientos clínicos

Se obtuvieron aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* provenientes del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León en el periodo de 2020 a 2024. Los aislamientos se reactivaron metabólicamente en Agar Sangre (MCD Lab, México) y se incubaron a 37°C por 24 horas. La pureza del cultivo se verificó y se llevaron a conservación los aislamientos en crioviales de 2 ml con caldo soya tripticasa (Becton Dickinson Diagnostic, Estados Unidos) suplementado con 15% de glicerol. Los aislamientos se conservaron en ultracongelación a -80°C hasta su uso.

### 8.2. Identificación de los aislamientos

La confirmación de la identificación se realizó por espectrometría de masas a través de la desorción/ionización con láser asistida por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS, Microflex LT System, Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). De cada aislamiento se transfirieron con ayuda de un aplicador de madera 1-2 colonias de cultivo joven de 24 horas de incubación a un pocillo de la placa de acero inoxidable de 96 pocillos. Posteriormente se le añadió 1 µl de ácido fórmico al 70% a cada pocillo para facilitar la extracción de proteínas, dejándola secar completamente a temperatura ambiente. Seguido se agregó 1 µl de matriz HCCA (ácido 4-bromo- $\alpha$ -cianocinámico, Sigma-Aldrich, Toluca, México) y se dejó secar por completo a temperatura ambiente. Después, la placa se introdujo al equipo usando el software FlexControl 3.4 y se analizó mediante el software MALDI biotyper 4.0 para comparar los espectros de proteínas de los aislamientos con la base de datos del equipo. Se tomó en cuenta como una identificación confiable de género y especie una puntuación  $\geq 2.0$ . Los aislamientos con una puntuación de 1.5-2.0 se tomó como una identificación segura de género, pero probable especie y una puntuación  $\leq 1.5$  como una identificación no confiable. Todos los aislamientos con un score  $< 2.0$  se volvieron a introducir en el equipo para confirmar su clasificación (Fig. 5A).

### 8.3. Determinación del perfil de susceptibilidad a antimicrobianos

Se determinó la susceptibilidad de las cepas seleccionadas mediante el método de microdilución en caldo según los criterios establecidos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) establecido en el documento M-100 de la versión 2025.

Las soluciones stock se prepararon con la concentración 1 mg/ml de los antibióticos (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). A partir de la solución de trabajo se obtuvieron 200 µl de cada antibiótico y se realizó una dilución 1:1 con caldo Müller-Hinton. Después se tomaron las cepas jóvenes de un cultivo de Agar Sangre de 24 h, el inóculo se ajustó a 0.5 en la escala de McFarland y se diluyó 1:150 en caldo Müller-Hinton fresco y estéril. Posteriormente, se colocaron 100 µl de inóculo en cada pocillo del panel de antibióticos, teniendo un pocillo sin inocular como control negativo. Los paneles de antibióticos se incubaron a 37°C por 18-24 h, seguido se realizaron las mediciones de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), siendo el indicador la concentración de antibiótico en la que a simple vista no se aprecia crecimiento bacteriano. Se usaron cepas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *E. coli* ATCC 25922 como control de calidad (Fig. 5B).

### 8.4. Definición de la resistencia a antimicrobianos

La multifarmacoresistencia (MDR) se define como la no susceptibilidad de uno o más agentes en 3 o más categorías de antimicrobianos tanto en aislamientos Gram positivos y Gram negativos. La resistencia a los carbapenémicos se define como la no susceptibilidad en *P. aeruginosa* y el complejo *A. baumannii* a uno o más antibióticos pertenecientes a la categoría de carbapenémicos (imipenem y meropenem) (Magiorakos et al., 2012). La resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido se describe como la resistencia a una o más cefalosporinas de espectro extendido (ceftazidima y cefepime). La resistencia a las fluoroquinolonas se define como la resistencia a una o más fluoroquinolonas (ciprofloxacino y levofloxacino) en patógenos Gram negativos. La resistencia difícil de tratar (DTR) está definida como la actividad intermedia a resistente de todos los agentes  $\beta$ -lactámicos reportados (ceftazidima, cefepime, ceftriaxona o piperacilina/tazobactam (ceftriaxona se excluye para *P. aeruginosa*) y ampicilina/sulbactam para *A. baumannii*; carbapenémicos (imipenem y meropenem) y fluoroquinolonas

(ciprofloxacino y levofloxacino) para patógenos Gram negativos de acuerdo con el IDSA (Camacho-Ortiz et al., 2025).

### **8.5. Determinación de la producción de biopelícula**

Se utilizó el protocolo propuesto por Stepanovic *et al.* para determinar la producción de biopelícula con cristal violeta con modificaciones menores (Stepanović et al., 2007)

A partir de un cultivo puro en agar sangre de 24 h se ajustó en solución salina a 1 en la escala de McFarland, posteriormente se realizó una dilución 1:100 en caldo soya tripticaseína, después se transfirieron 200 µl a una microplaca de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (Corning Costar, NY, Estados Unidos). Se realizaron 4 repeticiones para cada uno de los aislamientos, dejando un pocillo con caldo sin inocular como control negativo. La placa se incubó a 37°C durante 24 h. Se usaron cepas control de *S. aureus* ATCC 29213 como control positivo de producción de biopelícula y *S. hominis* ATCC 27844 como control negativo de producción de biopelícula. Seguido se tomaron 100 µl de células plantónicas y se leyeron en el lector de microplacas (iMark™, Bio-Rad Laboratories Inc, CA, Estados Unidos) a 595 nm.

Para determinar la densidad óptica (DO) de la biopelícula se desecharon las células plantónicas descartando el sobrenadante, posteriormente se realizaron tres lavados con agua estéril y se dejó secar la placa completamente. Para la fijación de la biopelícula se le adicionaron 200 µl de metanol absoluto a cada pocillo, se incubó por 10 min, se desechó el metanol y se dejó secar la placa completamente. Posterior al secado se le agregaron 200 µl de cristal violeta al 0.5% a cada pocillo y se dejó incubar por 15 min. Una vez pasado el tiempo se descartó el cristal violeta y se realizaron 3 lavados con agua estéril, se dejó secar por completo. Después se agregaron 200 µl de ácido acético a cada pocillo y se dejó en agitación por 15 min para dejar actuar el ácido acético para disolver el cristal violeta adherido a la biopelícula. Para finalizar, se realizó la lectura de DO en un lector de microplacas (iMark™, Bio-Rad Laboratories Inc, CA, Estados Unidos) a 595 nm.

Se usó como criterio de evaluación la DO según el rango obtenido. Para la interpretación de los resultados se obtuvo el promedio de la absorbancia obtenida en cada pocillo de la misma cepa, la DO del punto de corte (DO<sub>c</sub>) se obtuvo de 3 veces la desviación estándar de la DO del

control negativo, el valor final de una cepa analizada se obtuvo del promedio dividido sobre el punto de corte obtenido. Si se obtuvieron valores negativos, fueron considerados como  $\leq 0$  no productora, si los valores son entre  $DO_{495} \times DO_{495}$ , productora fuerte (Stepanović et al., 2007) (Fig. 5C).

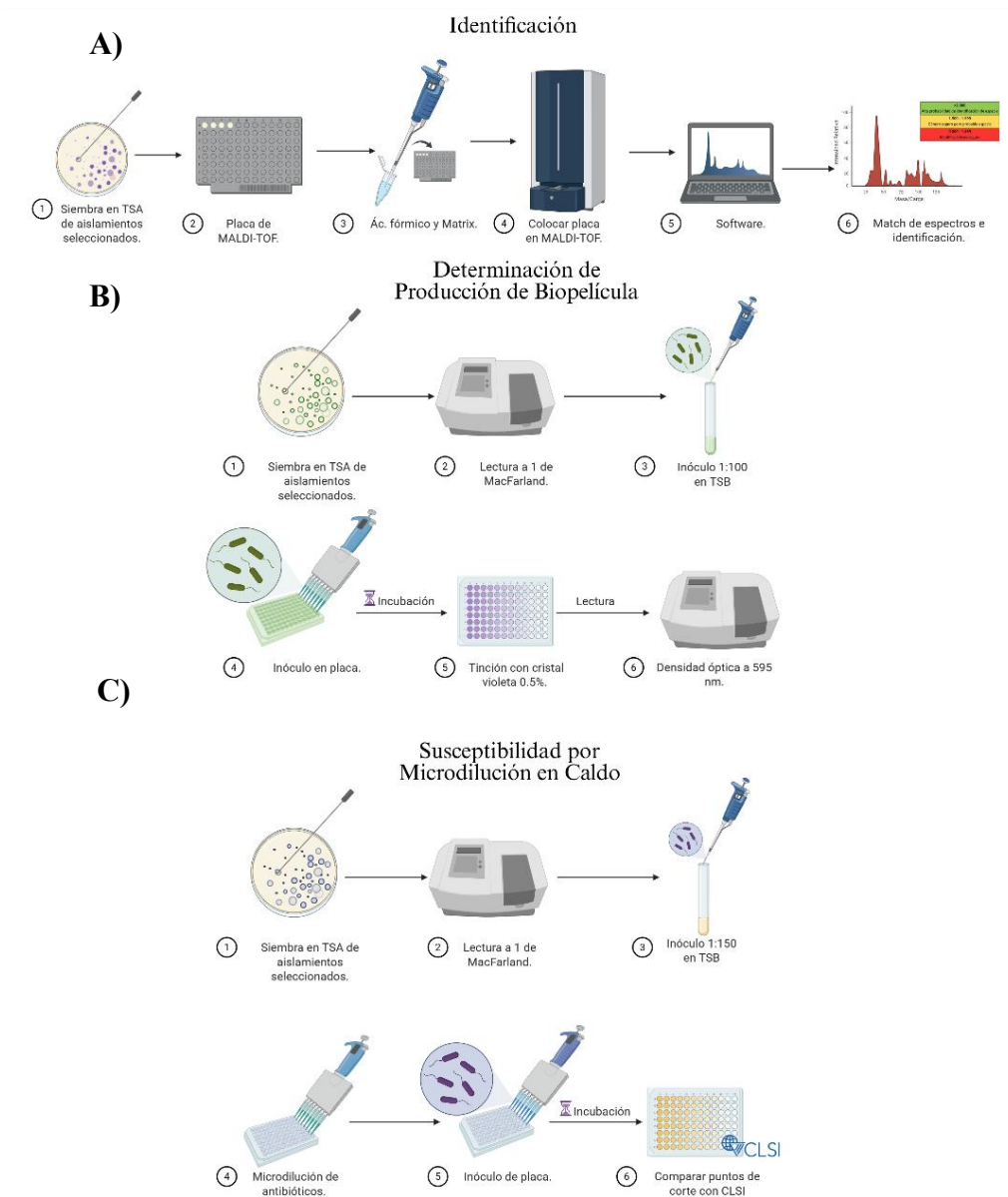


Figura 5. Diagrama general para caracterización bacteriana. A) identificación, B) determinación de susceptibilidad y C) producción de biopelícula de aislamientos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*.

## **8.6. Selección de aislamientos MDR y productores**

Se seleccionaron los aislamientos clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* de acuerdo con su perfil de susceptibilidad (MDR y resistentes a carbapenémicos vs. susceptibles) y con su producción de biopelícula (fuertes productores vs. no productores).

## **8.7. Obtención de muestras ambientales**

La obtención de muestras ambientales se realizó de plantas de tratamiento de aguas residuales del área metropolitana de Monterrey. Se usó una botella de plástico limpia, se tomó una porción de las aguas tratadas hasta alcanzar un tercio de la capacidad de la botella para después agitarla vigorosamente, se desechó el agua obtenida y se repitió la obtención de agua residual y se agitó por 2 veces más. Posteriormente, se llenó la botella con la muestra y se tapó la botella, se le etiquetó con datos como fecha, hora y dónde se obtuvo (Fig. 6A).

## **8.8. Aislamiento de bacteriófagos**

A partir de un cultivo de 24 h en agar LB de los aislamientos bacterianos se tomó una asada y se colocó en un tubo con caldo LB al 1X por duplicado. Para el enriquecimiento bacteriano se colocaron 3 ml de caldo LB al 1X en un tubo Falcon de 15 ml y se agregaron 15 µl del caldo inoculado anteriormente, se homogeneizó y se colocó en la incubadora con agitador a 37°C por 18 h.

### **8.8.1. Enriquecimiento de bacteriófagos**

El enriquecimiento de los bacteriófagos se realizó a partir de un tubo Falcon de 50 ml, se colocaron 4 ml de las muestras de agua residual, 4 ml de caldo LB al 3X y 100 µl de bacteria activada del enriquecimiento bacteriano, se colocó en agitador a 200 rpm a 37°C, se mantuvo en incubación por 4 h. Seguido se colocó el tubo con la muestra en una centrífuga a 12,000 g por 10 min. Después se obtuvo el sobrenadante y se pasó a un tubo Falcon de 50 ml nuevo, teniendo cuidado de no absorber el pellet. Se agregaron 5 ml de caldo LB al 3X al tubo con el sobrenadante y se agregaron 100 µl de bacteria en fase logarítmica, colocando en incubadora con agitador a 200 rpm a 37°C por 18 h. Posteriormente se centrifugó el tubo Falcon incubado a 12,000 g por 10 min, se obtuvo el sobrenadante con jeringa estéril y se filtró en tubo Falcon



de 15 ml. A partir del filtrado se tomaron 10 µl y se realizaron diluciones seriadas en tubos Eppendorf de 1 ml etiquetados con las diluciones ( $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-7}$ ) (Fig. 6B).

### **8.8.2. Spot Test**

El Spot test se realizó colocando 250 µl de cultivo bacteriano de las bacterias de interés en tubos Falcon de 15 ml con 3 ml de TOP agar al 0.5X y vertiendo inmediatamente en una placa de Petri con Agar LB al 1X ya solidificado. Se dejó reposar por 15 min, después de los tubos Eppendorf con las diluciones de PBS se colocó una gota de 10 µl en la placa de cada dilución obtenida. Se colocó una gota de 10 µl de PBS como control negativo y una gota de 10 µl del filtrado directo, se dejaron secar las gotas y se colocó a 37°C por 18-24 h (Fig. 6C).

### **8.8.3. Ensayo en placa**

Se colocaron 200 µl de caldo LB inoculado con las cepas bacterianas y se etiquetaron con las diluciones realizadas en el paso anterior. Se agregaron 50 µl de las diluciones con PBS, seguido en tubos Falcon de 15 ml con 3 ml de TOP Agar al 0.5X líquido se le agregaron los 250 µl de las diluciones realizadas y se mezcló, después el contenido se vertió en una placa de Petri con Agar LB 1X por dilución ( $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-7}$ ), se incubó toda la noche a 37°C (Fig. 6D).

### **8.8.4. Purificación**

La purificación de los bacteriófagos se realizó colocando 90 µl de PBS en tubos Eppendorf, a partir de las placas que tuvieron placa líticas presentes, se raspó con una puntilla de 200 µl para pipeta estéril el centro de una placa lítica manualmente, se colocó la puntilla en la pipeta y se pipeteó 30 veces para realizar diluciones ( $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-10}$ ), posteriormente se pasaron 50 µl a tubos de 1.5 ml Eppendorf con bacterias e incubar 15 min, después se colocaron los 50 µl en Top agar al 0.5X, se llevó a vórtex y se vació en caja Petri con agar LB al 1X ya solidificado, incubar toda la noche a 37°C. Se repitió este paso 4 veces más para la purificación.

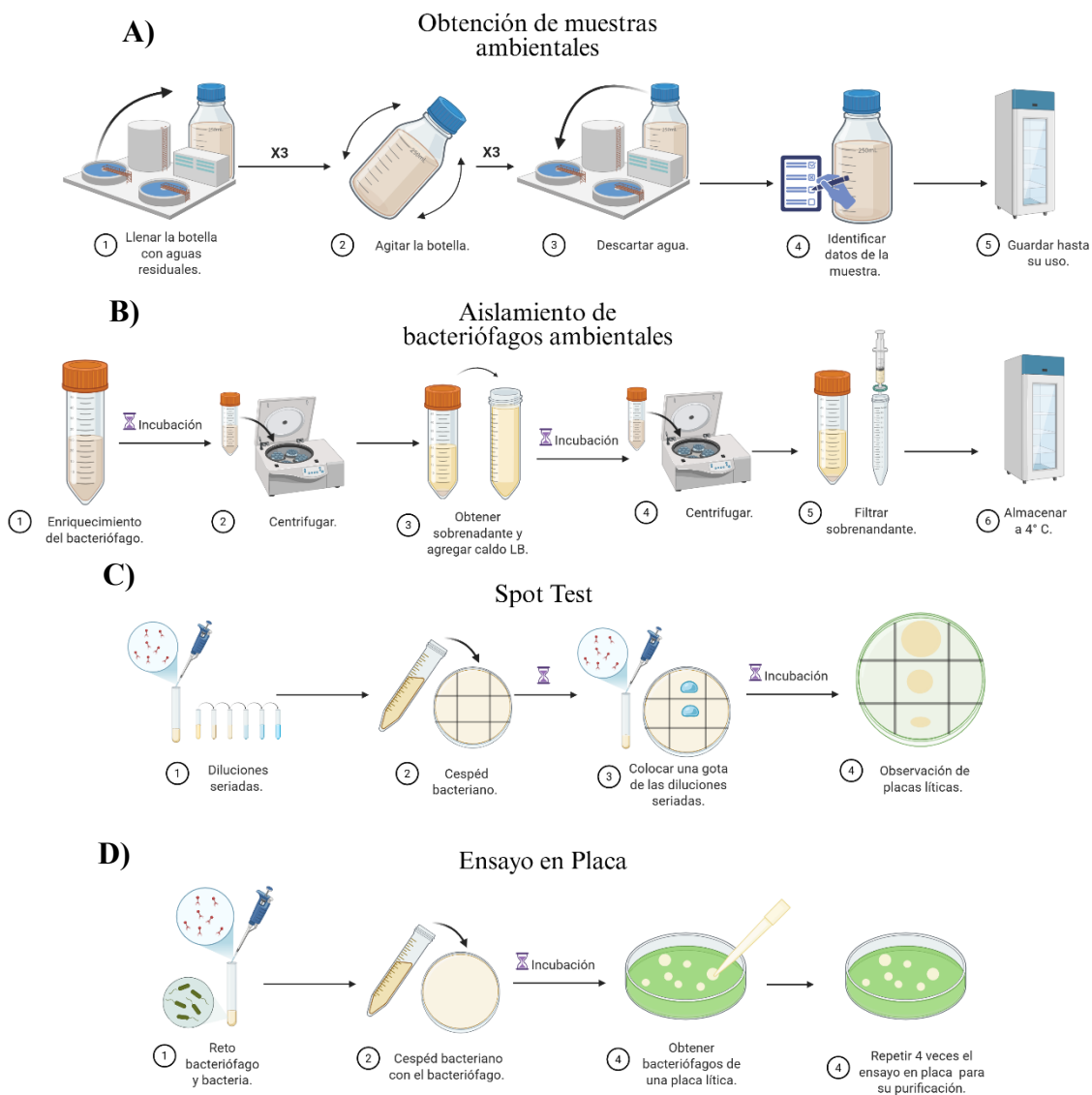


Figura 6. Diagrama general para aislamiento de bacteriófagos ambientales. A) obtención de muestra de aguas residuales, B) aislamiento de bacteriófago, C) Spot test y D) Ensayo en placa.

## 8.9. Evaluación de actividad antimicrobiana de bacteriófagos ambientales

La actividad antimicrobiana de los fagos se realizó por medio de cuenta en placa, a partir de un cultivo de 24 h en agar soya tripticaseína se llevó al 0.5 en la escala de McFarland. Posteriormente se diluyó 1:10 en caldo Muller Hinton, se realizaron diluciones seriadas, posteriormente de las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ , se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y cada dilución se colocó en una placa con agar Muller Hinton y se distribuyó con un asa Digrafsky. Posteriormente se retó contra el fago a un MOI de 0.1, se realizaron diluciones seriadas y se inocularon nuevas

placas con las mismas diluciones. Se volvieron a hacer diluciones cada 10 minutos a partir del caldo inoculado, hasta los 30 minutos (Fig. 7B).

Para determinar la viabilidad bacteriana se usó el método de resazurina. A partir de un cultivo de 24 h en agar soya tripticaseína, se llevó al 0.5 en la escala de McFarland. Posteriormente se realizó el reto antimicrobiano contra los fagos a un MOI de 0.1 y se realizaron microdiluciones, dejando un volumen total de 180  $\mu$ L de bacteria retada con fago. Después se agregaron 20  $\mu$ L de resazurina. Se dejó incubando 3 horas. Se realizó la lectura en un espectrofotómetro (Synergy 2 BioTeK, Winooski, Vermont, Estados Unidos) a una absorbancia de 570 nm y 600 nm (Fig. 7C).

La comparación de los tiempos de actividad antimicrobiana obtenidos mediante el conteo en placa se analizó utilizando la prueba de Student (GraphPad 8.0 Software Inc., San Diego, CA, EE. UU.). A valores de  $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.005$  y  $p \leq 0.001$ , las pruebas se consideraron estadísticamente significativas.

#### **8.10. Evaluación de actividad antibiopelícula de bacteriófagos ambientales**

Para determinar la actividad antibiopelícula y la susceptibilidad en células de biopelícula *in vitro* se utilizó el dispositivo Calgary Biofilm Device (MEBCTM, Innovotech, AB, Canadá). De un cultivo puro de agar soya tripticaseína de 24 h y se ajustó a 1 en la escala de McFarland. Se diluyó 1:50 en caldo Muller-Hinton, se tomaron 200  $\mu$ L y se colocaron en cada pocillo de la microplaca. Se colocó la cubierta del dispositivo de Calgary dejando las clavijas en medio de los pocillos y se incubaron a 37°C por 18-24 h. Las clavijas se lavaron 3 veces con agua destilada estéril para retirar las células sin adherencia. La cubierta se colocó a un panel con diferentes tratamientos de fago, fago y antibiótico, 6 horas con fago y posteriormente antibiótico y solamente antibiótico, se incubó a 37°C de 18-24 h. Se retiró la cubierta del panel de antibióticos y se lavaron las clavijas con agua destilada estéril. Posteriormente en una microplaca estéril se colocaron 200  $\mu$ L de caldo Müller-Hinton y se colocó la cubierta con las clavijas. Posteriormente se colocó en sonicación durante 10 min a 40 kHz con un ultrasonificador (Branson 5800, Danbury, USA) y se dejó reposando 10 min. Para finalizar, se quitó la cubierta con las clavijas y se colocó una tapa habitual, se incubó a 37°C por 24 h y se determinó la resistencia a los tratamientos de las células en biopelícula. Después de la exposición a los antibióticos se determinó la

Concentración Mínima de Erradicación de Biopelícula (CMEB) (Catto & Cappitelli, 2019; Ceri et al., 1999; Oliveira & Cunha Mde, 2010) (Fig. 7D).

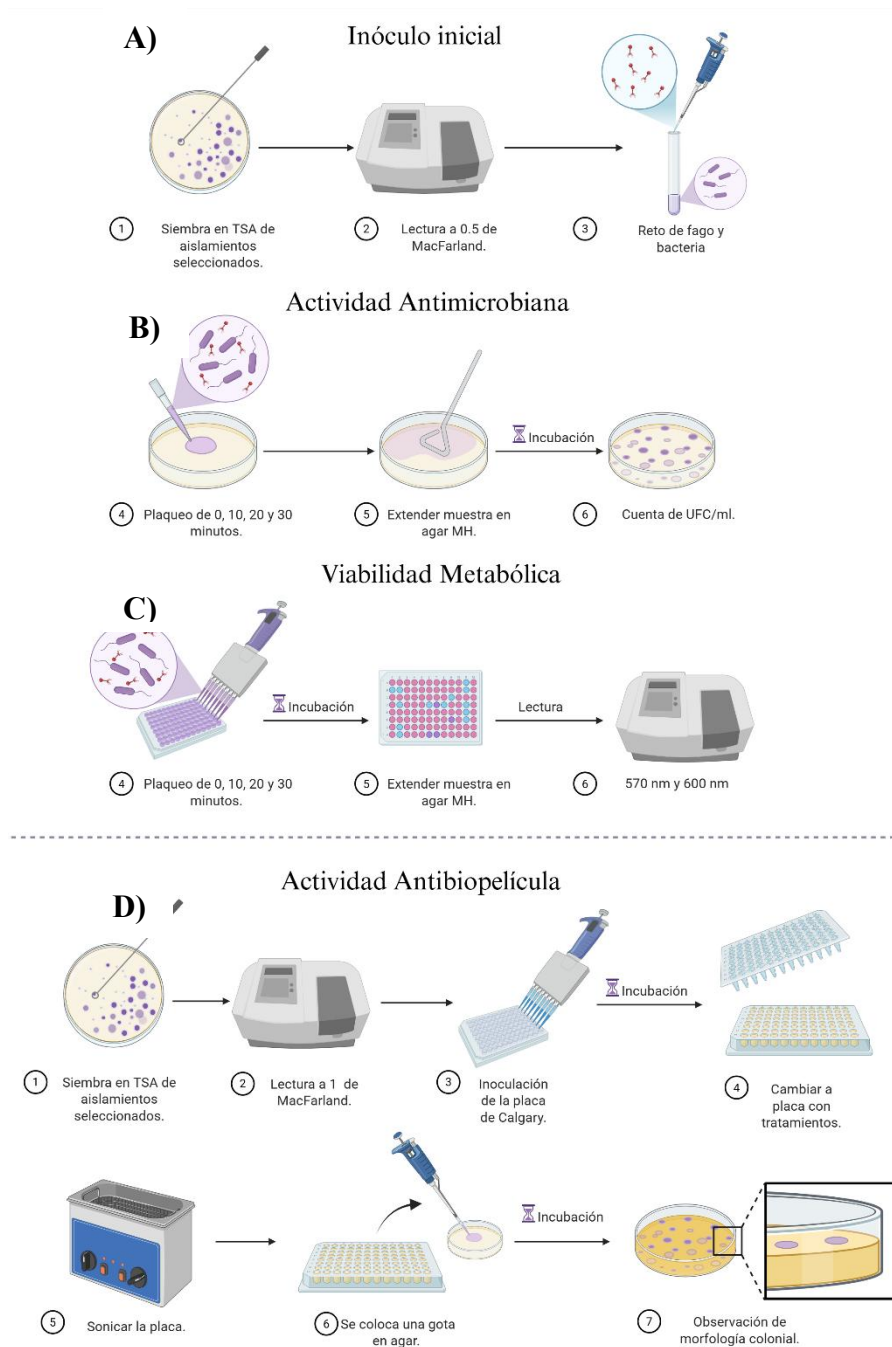


Figura 7. Diagrama general para la determinación de la actividad antimicrobiana y antibiopelícula de bacteriófagos ambientales aislados. A) Inóculo inicial, B) actividad antimicrobiana, C) Viabilidad metabólica y D) Actividad antibiopelícula de los bacteriófagos aislados.

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Identificación de aislamientos clínicos

Se seleccionaron 64 aislamientos clínicos previamente identificados como *A. baumannii* y *P. aeruginosa* en un periodo de 2021-2024 provenientes del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de Monterrey, Nuevo León.

De los 64 aislamientos se identificó el 54.69 % (n=35) como cepas pertenecientes a *P. aeruginosa*, mientras que el resto fue identificado como *A. baumannii* (45.31%, n=24).

Las salas de origen con mayor prevalencia son medicina interna (17.2%), traumatología (18.8%) y la unidad de cuidados intensivos (35.9 %). En cuanto al tipo de espécimen se excluyeron aquellos como en heridas o infecciones en el canal auditivo, dando como resultado el aspirado traqueal (35.9%), tejido (21.9%) y lavado broncoalveolar (9.4 %) como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Datos clínicos y demográficos de los pacientes de aislamientos de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* del 2021 al 2024 en un hospital de tercer nivel de atención en Nuevo León.

|                          | Total n (%) | <i>P. aeruginosa</i> n (%) | <i>A. baumannii</i> n (%) |
|--------------------------|-------------|----------------------------|---------------------------|
| <b>Pacientes</b>         | 64 (100)    | 35 (54.7)                  | 29 (45.3)                 |
| <b>Sexo</b>              |             |                            |                           |
| <b>Masculino</b>         | 45 (70.3)   | 27 (77.1)                  | 18 (62.1)                 |
| <b>Sala de origen</b>    |             |                            |                           |
| <b>Medicina Interna</b>  | 11 (17.2)   | 7 (20.0)                   | 4 (13.8)                  |
| <b>TyO</b>               | 12 (18.8)   | 6 (17.1)                   | 6 (20.7)                  |
| <b>UCI</b>               | 23 (35.9)   | 10 (28.6)                  | 13 (44.8)                 |
| <b>Otros</b>             | 18 (28.1)   | 12 (34.3)                  | 6 (20.7)                  |
| <b>Tipo de espécimen</b> |             |                            |                           |
| <b>AT</b>                | 23 (35.9)   | 10 (28.6)                  | 13 (44.8)                 |
| <b>LBA</b>               | 6 (9.4)     | 3 (8.6)                    | 3 (10.3)                  |
| <b>Tejido</b>            | 14 (21.9)   | 9 (25.7)                   | 5 (17.2)                  |
| <b>Otros</b>             | 21 (32.8)   | 14 (40.0)                  | 8 (27.6)                  |

UCI: Unidad de cuidados intensivos. TyO: Traumatología. AT: Aspirado traqueal. LBA: Lavado broncoalveolar.

## 9.2. Determinación del perfil de susceptibilidad

Se determinó el perfil de susceptibilidad de *A. baumannii* a antibióticos como meropenem, imipenem, levofloxacin y colistina. Observándose una alta resistencia a meropenem (68.97%), imipenem (62.1%) y levofloxacin (55.17%) y una alta actividad intermedia para colistina (86.21%) como se muestra en la Tabla 2.

| Tabla 2. Puntos de corte y perfil de susceptibilidad a antibióticos en aislamientos de <i>A. baumannii</i> . |                 |    |    |                           |            |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|----|----|---------------------------|------------|------------|
| Antibiótico                                                                                                  | Puntos de corte |    |    | Perfil de susceptibilidad |            |            |
|                                                                                                              | CMI (µg/mL)     |    |    | % (n)                     |            |            |
|                                                                                                              | S               | I  | R  | Susceptible               | Intermedio | Resistente |
| Imipenem                                                                                                     | ≤2              | 4  | ≥8 | 20.69 (6)                 | 10.34 (3)  | 68.97 (20) |
| Meropenem                                                                                                    | ≤2              | 4  | ≥8 | 20.69 (6)                 | 17.24 (5)  | 62.10 (18) |
| Levofloxacin                                                                                                 | ≤1              | 2  | ≥4 | 24.14 (7)                 | 20.69 (6)  | 55.17 (16) |
| Colistina                                                                                                    | -               | ≤2 | ≥4 | -                         | 86.21 (25) | 13.79 (4)  |

CMI: concentración mínima inhibitoria; S: susceptible; I: intermedio; R: resistente.

En el caso de *P. aeruginosa* se observó una alta resistencia a imipenem (60%) y levofloxacin (45.71%) y una alta actividad intermedia para colistina (88.57%) y meropenem (57.14%) como se muestra en la Tabla 3.

| Tabla 3. Puntos de corte y perfil de susceptibilidad a antibióticos en aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> . |                 |    |    |                           |            |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|----|----|---------------------------|------------|------------|
| Antibiótico                                                                                                   | Puntos de corte |    |    | Perfil de susceptibilidad |            |            |
|                                                                                                               | CMI (µg/mL)     |    |    | % (n)                     |            |            |
|                                                                                                               | S               | I  | R  | Susceptible               | Intermedio | Resistente |
| Imipenem                                                                                                      | ≤2              | 4  | ≥8 | 25.71 (9)                 | 14.29 (5)  | 60 (21)    |
| Meropenem                                                                                                     | ≤2              | 4  | ≥8 | 17.14 (6)                 | 57.14 (20) | 25.71 (9)  |
| Levofloxacin                                                                                                  | ≤1              | 2  | ≥4 | 31.43 (11)                | 22.86 (8)  | 45.71 (16) |
| Colistina                                                                                                     | -               | ≤2 | ≥4 | -                         | 88.57 (31) | 11.43 (4)  |

CMI: concentración mínima inhibitoria; S: susceptible; I: intermedio; R: resistente.

Los aislamientos analizados presentaron una multifarmacoresistencia en un 96,55% en *A. baumannii* y un 80% en *P. aeruginosa*, presentando resistencia a carbapenémicos, cefalosporinas de espectro extendido, fluoroquinolonas y polimixinas. Además, se observa que el 55.17% de las cepas de *A. baumannii* pertenecen al grupo de resistencia difícil de tratar, mientras que de *P. aeruginosa* únicamente presenta el 5.71% de las cepas en esta categoría, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Clasificación de resistencia a los antimicrobianos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* de acuerdo con diferentes criterios para clasificar la resistencia: Magiorakos et al., CDC e IDSA.

|                      | <b>Magiorakos, et al.</b> |            | <b>CDC</b>   |            | <b>IDSA</b>  |
|----------------------|---------------------------|------------|--------------|------------|--------------|
|                      | <b>% (n)</b>              |            | <b>% (n)</b> |            | <b>% (n)</b> |
|                      | <b>MDR</b>                | <b>CR</b>  | <b>ESCR</b>  | <b>FQR</b> | <b>DTR</b>   |
| <i>A. baumannii</i>  | 96.55 (28)                | 86.21 (25) | 93.10 (27)   | 93.10 (27) | 55.17 (16)   |
| <i>P. aeruginosa</i> | 80 (28)                   | 74.29 (26) | 25.71 (9)    | 48.57 (17) | 5.71 (2)     |

MDR: Multifarmacorresistente; CR: Resistencia a carbapenémicos; ESCR: Resistencia a cefalosporinas de espectro extendido; FQR: Resistencia a fluoroquinolonas; DTR: Resistencia difícil de tratar; CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*; IDSA: *Infectious Diseases Society of America*.

### 9.3. Determinación de producción de biopelícula

Se observó que el 90.62% de las cepas fueron productoras de biopelícula, encontrándose más cepas de producción moderada (35.94%) y fuerte (35.94%). La bacteria con mayor producción de biopelícula fue *P. aeruginosa* con el 97.14% de las cepas analizadas siendo productoras y el 82.86% siendo productoras de moderadas a fuertes, mientras que en el caso de *A. baumannii* se observa una distribución más pareja entre no productoras, productoras débiles, moderadas y fuertes, como se puede observar en la Tabla 5.

Tabla 5. Producción de biopelícula de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*.

| <b>Especies</b>      | <b>n</b> | <b>Producción de biopelícula</b> |              |                 |               |
|----------------------|----------|----------------------------------|--------------|-----------------|---------------|
|                      |          | <b>% (n)</b>                     |              |                 |               |
|                      |          | <b>Sin producción</b>            | <b>Débil</b> | <b>Moderado</b> | <b>Fuerte</b> |
| <i>A. baumannii</i>  | 29       | 17.24% (5)                       | 24.14% (7)   | 31.03% (9)      | 27.59% (8)    |
| <i>P. aeruginosa</i> | 35       | 2.86% (1)                        | 8.57% (3)    | 40% (14)        | 42.86% (15)   |

#### 9.4. Selección de aislamientos para reto contra bacteriófagos

Se seleccionaron 10 aislamientos de *A. baumannii* y 10 aislamientos de *P. aeruginosa* que presentaran resistencia a carbapenémicos, así como que la producción de biopelícula fuera moderada o fuerte, tratando de obtener diferentes perfiles de resistencia para observar el comportamiento que se tenía al retarlos con bacteriófagos (Tabla 6). Dos cepas de *P. aeruginosa* fueron positivas al reto con el fago, observándose placas líticas puntiformes, mientras que para los aislamientos de *A. baumannii* únicamente una cepa fue positiva, observándose placas líticas que formaban un halo alrededor.

Tabla 6. Aislamientos de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* MDR y productores de biopelícula retados ante bacteriófagos ambientales.

| Aislamiento | Especie              | CR | MDR | Biopelícula | Bacteriófago |
|-------------|----------------------|----|-----|-------------|--------------|
| 24-1066     | <i>P. aeruginosa</i> | Si | Si  | Fuerte      | Negativo     |
| 24-0574     | <i>P. aeruginosa</i> | Si | Si  | Fuerte      | Negativo     |
| 24-1472     | <i>P. aeruginosa</i> | Si | Si  | Moderada    | Negativo     |
| 24-0834     | <i>P. aeruginosa</i> | Si | Si  | Fuerte      | Negativo     |
| 24-1197     | <i>P. aeruginosa</i> | Si | Si  | Fuerte      | Negativo     |
| 24-0824     | <i>P. aeruginosa</i> | Si | Si  | Fuerte      | Positivo     |
| 24-1013     | <i>P. aeruginosa</i> | Si | Si  | Moderada    | Negativo     |
| 24-0809     | <i>P. aeruginosa</i> | Si | Si  | Fuerte      | Negativo     |
| 24-1426     | <i>P. aeruginosa</i> | Si | Si  | Fuerte      | Positivo     |
| 23-1123     | <i>A. baumannii</i>  | Si | Si  | Moderada    | Negativo     |
| 23-1139     | <i>A. baumannii</i>  | Si | Si  | Moderada    | Positivo     |
| 22-2281     | <i>A. baumannii</i>  | Si | Si  | Fuerte      | Negativo     |
| 21-0659     | <i>A. baumannii</i>  | Si | Si  | Fuerte      | Negativo     |
| 23-1288     | <i>A. baumannii</i>  | Si | Si  | Moderada    | Negativo     |
| 22-2169     | <i>A. baumannii</i>  | Si | Si  | Moderada    | Negativo     |
| 21-0872     | <i>A. baumannii</i>  | Si | Si  | Fuerte      | Negativo     |
| 23-0799     | <i>A. baumannii</i>  | Si | Si  | Moderada    | Negativo     |
| 23-1609     | <i>A. baumannii</i>  | Si | Si  | Moderada    | Negativo     |
| 24-0524     | <i>A. baumannii</i>  | Si | Si  | Fuerte      | Negativo     |
| 23-1671     | <i>A. baumannii</i>  | Si | No  | Fuerte      | Negativo     |
| 22-1999     | <i>P. aeruginosa</i> | Si | Si  | Moderada    | Negativo     |

MDR: Multifarmacorresistente; CR: Resistencia a carbapenémicos.



### 9.5. Aislamiento de bacteriófagos ambientales

En la cepa 24-0824 de *P. aeruginosa* se observó actividad del bacteriófago hasta la dilución ( $10^{-7}$ ), como se muestra en la Fig. 8. Se observaron placas líticas de 1-2 mm. A pesar de que hay gran cantidad de fagos, son muy pequeñas las placas líticas presentes en el cultivo. El aislamiento clínico de *P. aeruginosa* se obtuvo de la unidad de cuidados intensivos (UCI) a partir de un cultivo de aspirado traqueal de un paciente masculino en el año 2024.

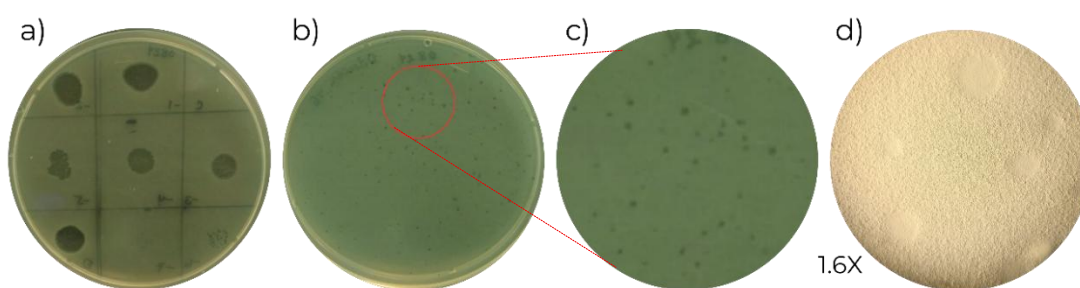


Figura 8. Actividad de bacteriófago sobre cepa de *P. aeruginosa* (24-0824). a) Spot Test. b) Ensayo en placa dilución 10-6. c) Aumento de las placas líticas presentes en el ensayo en placa. d) Ensayo en placa observado desde estereoscopio (1.6X).

En la cepa 24-1426 de *P. aeruginosa* se observó actividad del bacteriófago a una dilución ( $10^{-7}$ ), como se muestra en la Fig. 9. Se observan placas líticas puntiformes de 1-2 mm. El aislamiento clínico de *P. aeruginosa* se obtuvo de medicina interna a partir de una muestra de orina de un paciente masculino en el año 2024.

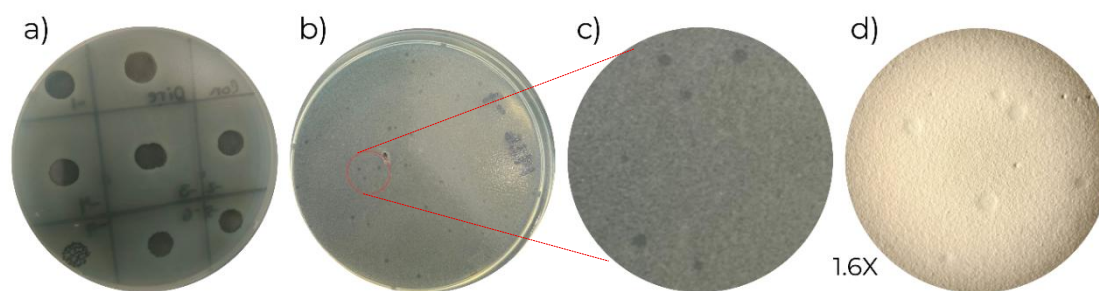


Figura 9. Actividad de bacteriófago sobre cepa de *P. aeruginosa* (24-1426). a) Spot Test. b) Ensayo en placa dilución 10-6. c) Aumento de las placas líticas presentes en el ensayo en placa. d) Ensayo en placa observado desde estereoscopio (1.6X).

Para la cepa 23-1139 de *A. baumannii* se observó actividad del bacteriófago hasta dilución ( $10^{-7}$ ), como se muestra en la Fig. 10. Se observan placas líticas de 3-5 mm con un halo alrededor de ellas de hasta 8 mm. El aislamiento clínico de *A. baumannii* se obtuvo de medicina interna a partir de una muestra de orina de un paciente masculino del año 2023.

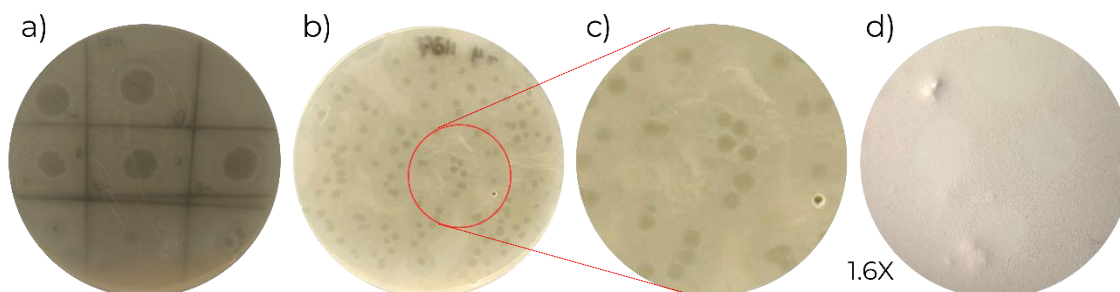


Figura 10. Actividad de bacteriófago sobre cepa de *A. baumannii* (23-1139). a) Spot Test. b) Ensayo en placa dilución 10-4. c) Aumento de las placas líticas presentes en el ensayo en placa. d) Ensayo en placa observado desde estereoscopio (1.6X).

## 9.6. Determinación de perfil de erradicación de biopelícula

Para el perfil de erradicación de biopelícula se usó como criterio de inclusión la producción de biopelícula y la actividad del bacteriófago sobre la cepa probada. En los resultados obtenidos se observa un aumento de la resistencia a los antimicrobianos hasta 9-10 veces en células que se encuentran dentro de la biopelícula, a diferencia de aquellas que son planctónicas, como se observa en la Tabla 7.

Tabla 7. Concentraciones mínimas inhibitorias en células planctónicas y de erradicación de biopelícula en aislamientos clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*.

| Especie                      | Producción de biopelícula | Imipenem ( $\mu\text{g/mL}$ ) |      | Meropenem ( $\mu\text{g/mL}$ ) |      | Levofloxacin ( $\mu\text{g/mL}$ ) |      | Colistina ( $\mu\text{g/mL}$ ) |      |
|------------------------------|---------------------------|-------------------------------|------|--------------------------------|------|-----------------------------------|------|--------------------------------|------|
|                              |                           | CMI                           | CMEB | CMI                            | CMEB | CMI                               | CMEB | CMI                            | CMEB |
| <i>P. aeruginosa</i> 24-0824 | Fuerte                    | <0.5                          | >256 | 0.5                            | >256 | 2                                 | >256 | <0.125                         | >256 |
| <i>P. aeruginosa</i> 24-1426 | Fuerte                    | >256                          | >256 | 128                            | >256 | 8                                 | >256 | 0.5                            | >256 |
| <i>A. baumannii</i> 23-1139  | Fuerte                    | 4                             | >256 | 8                              | >256 | 0.5                               | >256 | 0.125                          | >256 |

CMI: concentración mínima inhibitoria; CMEB: concentración mínima de erradicación de biopelícula.

La cepa 24-0824 tiene un incremento de 10 veces (0.125-512  $\mu\text{g/mL}$ ) a la resistencia en imipenem en células en biopelícula. En cuanto a meropenem hay un aumento de 9 veces (0.5-512  $\mu\text{g/mL}$ ), levofloxacino un incremento de 8 veces (2-512  $\mu\text{g/mL}$ ) y colistina un aumento de 13 veces (0.065-512  $\mu\text{g/mL}$ ). Al ser una cepa fuerte productora de biopelícula en este caso se observa que este factor de virulencia es un potencial para su supervivencia frente a los antibióticos probados (Fig. 11).

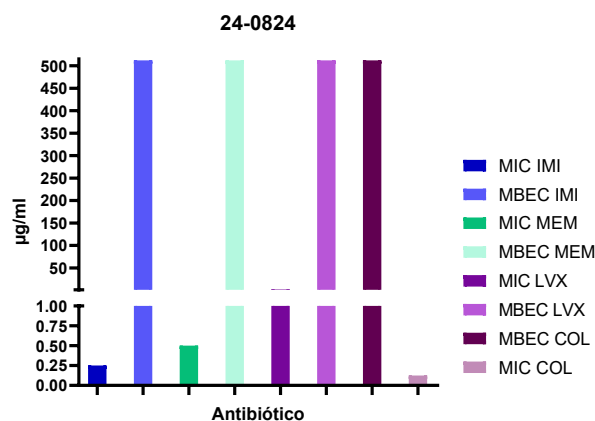


Figura 11. Diferencias entre MIC y MBEC de la cepa 24-0824 de *P. aeruginosa*. MIC: Concentración mínima de inhibición; MBEC: Concentración mínima de erradicación de biopelícula.

La cepa 24-1426 no mostró un aumento en la resistencia de imipenem puesto que ya era resistente y ambas concentraciones llegaron a ser mayores a los 256  $\mu\text{g/mL}$ . En el caso de meropenem aumentó 2 veces (128-512  $\mu\text{g/mL}$ ), sin embargo, no tiene relevancia ya que la cepa sin el uso de la biopelícula ya es resistente. En el caso de levofloxacino incremento 6 veces (8-512  $\mu\text{g/mL}$ ), sin embargo, el punto de corte para la resistencia es 4, por lo que, a pesar de que sí aumenta la resistencia, el levofloxacino no es un antibiótico que pueda ser usado para el tratamiento de este aislamiento. En cuanto a la colistina se observa un aumento de 9 veces (0.5-512  $\mu\text{g/mL}$ ), en este caso la producción de biopelícula sí influye en el tratamiento del paciente (Fig. 12).

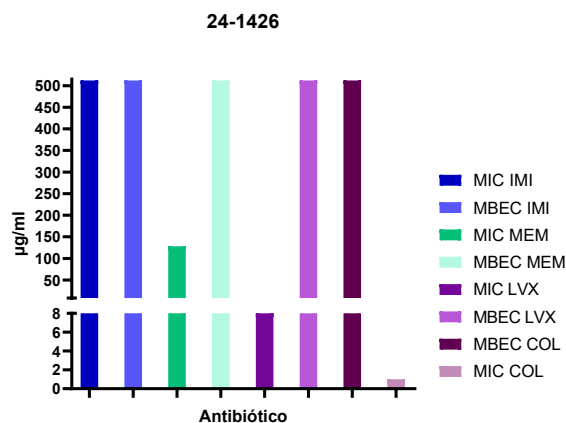


Figura 12. Diferencias entre MIC y MBEC de la cepa 24-1426 de *P. aeruginosa*. MIC: Concentración mínima de inhibición; MBEC: Concentración mínima de erradicación de biopelícula.

La cepa 23-1139 aumentó 7 veces su resistencia a imipenem (4-512 µg/mL), para meropenem hubo un incremento de 6 veces a la resistencia (8-512 µg/mL), para levofloxacinó incrementó 9 veces (0.5-512 µg/mL), como se muestra en la Fig. 13. En este caso el tratamiento con este antibiótico sí puede verse afectado por la presencia de biopelícula, mientras que para colistina hubo un aumento de 10 veces (0.125-512 µg/mL).

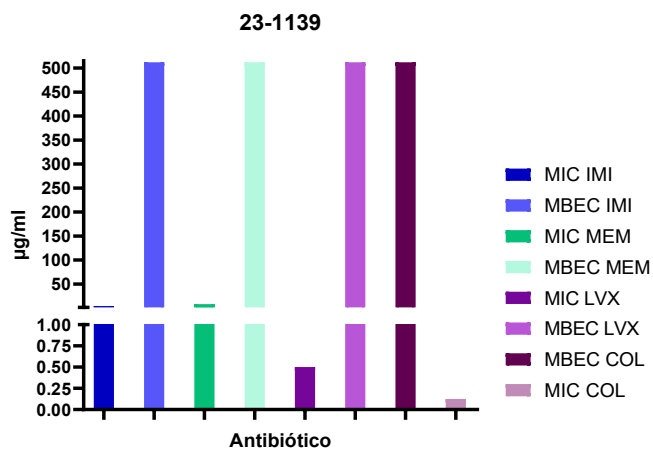


Figura 13. Diferencias entre MIC y MBEC de la cepa 23-1139 de *A. baumannii*. MIC: Concentración mínima de inhibición; MBEC: Concentración mínima de erradicación de biopelícula. Actividad antimicrobiana del bacteriófago

## 9.7. Actividad antimicrobiana de bacteriófagos ambientales

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los bacteriófagos contra la cepa de *P. aeruginosa* 24-0824 y se observó una disminución del 9.52% con respecto al control. A los 10 min se observó una disminución de 1.8%, a los 20 min un aumento de 3.06% y a los 30 min una disminución de 3.28%, sin cambios significativos con respecto al control (Fig. 14A).

La cepa *P. aeruginosa* 24-1426 mostró tener diferencias significativas con respecto al control en los tiempos 20 y 30 minutos con un aumento de UFC de 20.04% y 23.4% respectivamente, mientras que en el tiempo 0 y 10 hubo un aumento de 16.62% y 5.6% respectivamente (Fig. 14B).

En el caso de la cepa de *A. baumannii* 23-1139 se observaron diferencias significativas en cuanto al uso del fago sobre la cepa en los tiempos 0, 10, 20 y 30 con respecto al control, con una disminución de 14.71%, 18.47%, 9.69% y 11% respectivamente (Fig. 14C).

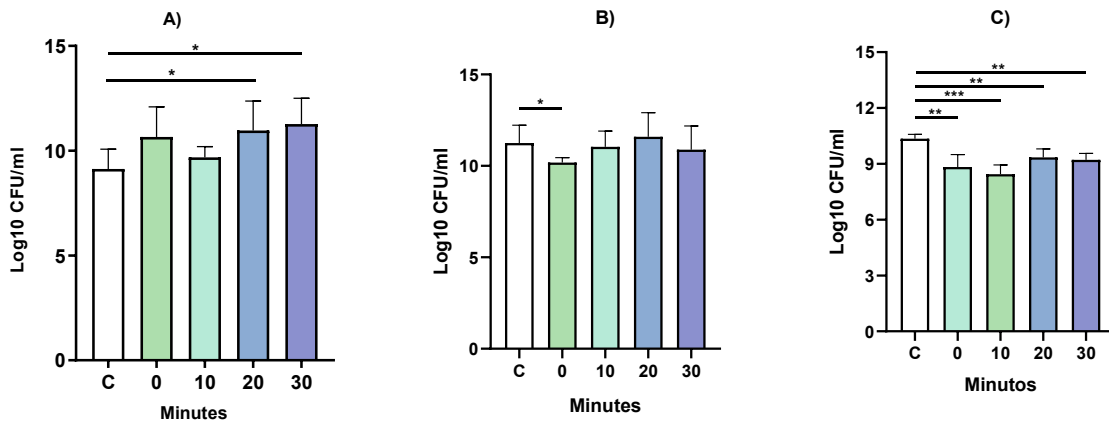


Figura 14. Actividad antimicrobiana de bacteriófagos expresada en Log10 CFU/ml, los valores se obtuvieron por tiempo cada 10 minutos. A) *P. aeruginosa* 24-1426 con un MOI de 8. B) *P. aeruginosa* 24-0824 con un MOI de 8. C) *A. baumannii* 23-1139 con un MOI de 0.01.

En la cepa 24-0824 la viabilidad baja hasta 20.90% (MOI 8), se eleva hasta 76.15% (MOI 4) y 89.82% (MOI 0.06, Fig. 15A). La cepa 24-1426 muestra incremento de la viabilidad hasta 302.45% (MOI 8), decrece hasta 91.04% (MOI 4) y se mantiene variando entre 91.04% y 99.68% (Fig. 15A). La cepa 23-1139 (Fig. 15B) muestra una viabilidad de 9.07% (MOI 0.1), que aumenta a 60.76% (MOI 0.05) y hasta 83.7%, 84.5%, 87.21% (MOI 0.025, 0.0125, 0.0065), y disminuye a 72.38% (MOI 0.0031), 66.89% (MOI 0.0015) y 62.14% (MOI 0.0007).

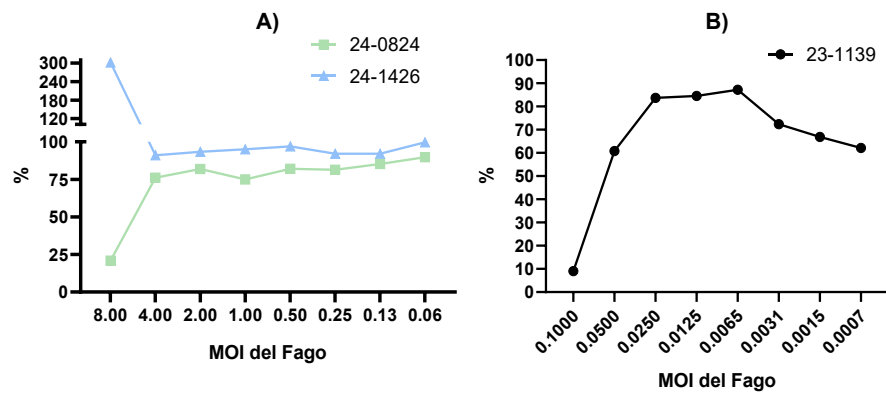


Figura 15. Porcentaje de viabilidad metabólica con rezasurina de A) *P. aeruginosa* (24-0824, 24-01426) y B) *A. baumannii* (23-1139) y por MOI de fago utilizado en el ensayo. MOI; Multiplicidad de infección.

### 9.8. Actividad antibiopelícula de bacteriófagos ambientales

La morfología colonial de *P. aeruginosa* 24-0824 se vio afectada conforme el uso de diferentes tratamientos y antibióticos (Fig. 16). Al ser tratada con el fago la colonia no presenta anormalidades en los bordes, ni presenta *swarming*, con pigmentación de color verde.

En el tratamiento con meropenem (Fig. 16A) las concentraciones de 2-8 µg/mL muestran las colonias con muescas, con forma filamentosa y borde lobulados, en el centro sin crecimiento bacteriano dando un aspecto rugoso. En el tratamiento del fago con meropenem los bordes son regulares en la concentración 8 µg/mL, con presencia de muescas. En las concentraciones 2 y 4 µg/mL los bordes son irregulares lobulados, el color del medio es verdoso, y el de la colonia es beige. En el tratamiento con el fago de 6 horas y meropenem la colonia muestra bordes irregulares, hay un cambio de pigmentación en la concentración 8 µg/mL.

En el tratamiento con imipenem (Fig. 16B) en las concentraciones 2 y 4 µg/mL el color es blanco, mientras que a 8 µg/mL hay pigmentación verde. En el tratamiento del fago con imipenem se observa una colonia con bordes uniformes a 8 µg/mL. En la concentración 4 µg/mL la colonia crece de forma irregular, rugosa y con menor masa colonial, a 2 µg/mL la colonia se observa más pequeña y con bordes irregulares. Para el tratamiento de 6 horas en conjunto con imipenem las colonias mantienen un tamaño similar con bordes irregulares formando ondulaciones, sin presencia de *swarming*, se observa pigmentación de las colonias de un color verde azulado.

En el tratamiento con levofloxacin (Fig. 16C) en las concentraciones 2-4 µg/mL se observan colonias de color beige, irregulares, con poca motilidad tipo *swarming*, además presentan pigmentación del medio. A 8 µg/mL se observa un crecimiento irregular, filamentoso, sin presencia de *swarming*. En el tratamiento de levofloxacin y fago se observa a 8 µg/mL colonias más chicas con bordes más irregulares de color blanco y conforme van disminuyendo las concentraciones disminuye la presencia del pigmento. En el tratamiento de 6 horas con fago y levofloxacin las colonias son de color blanco, con crecimiento y bordes irregulares, con zonas sin crecimiento bacteriano, zonas más elevadas que otras, manteniendo la misma morfología en

las concentraciones 2-8  $\mu\text{g/mL}$ , con variación de tamaño pues disminuye conforme se aumenta la concentración.

En el tratamiento con colistina (Fig. 16D) hay crecimiento irregular, con zonas sin crecimiento bacteriano, a 2  $\mu\text{g/mL}$  la colonia es blanca con pigmentación del medio, a 0.5 y 1  $\mu\text{g/mL}$  no hay pigmentación del medio y se observa menor densidad celular. En el tratamiento con colistina y fago combinados se observan colonias con bordes regulares con pequeñas muescas a 0.5 y 1  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que a 2  $\mu\text{g/mL}$  se observa una colonia con bordes irregulares con proyecciones hacia el exterior, con menor densidad celular. En el tratamiento de 6 horas con fago y colistina hay colonias de color blanco a beige con el medio pigmentado de un color verde azulado, las colonias se encuentran lobuladas, con crecimiento regular en todas las concentraciones.

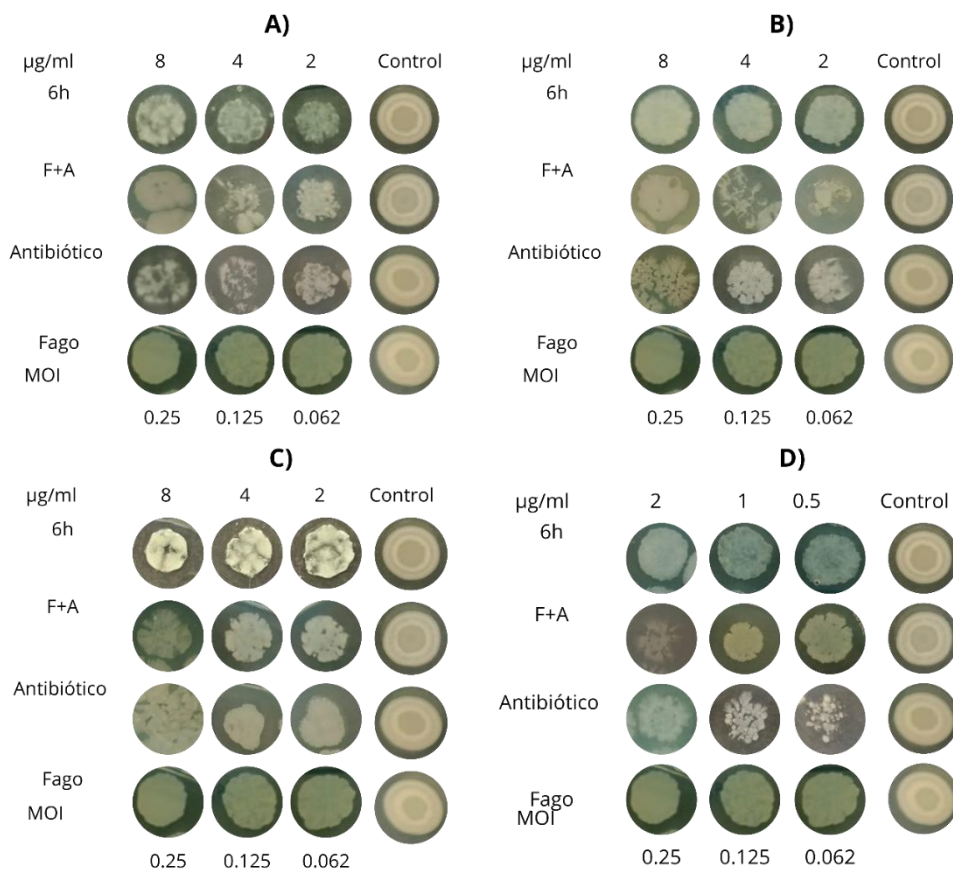


Figura 16. Morfología colonial de *P. aeruginosa* aislamiento 24-0824 después de ser sometida a diferentes tratamientos y antibióticos. A) Meropenem; B) Imipenem; C) Levofloxacino; D) Colistina. 6h F+A: Tratamiento 6 horas del fago posteriormente cambiado a un panel de antibióticos; F+A: Fago y antibiótico en conjunto; MOI: Multiplicidad de Infección del fago.



En el caso de la cepa 24-1426 de *P. aeruginosa* (Fig. 17), la colonia sin tratamiento es de color blanco con poca pigmentación verdosa, tiene bordes ondulados, con zonas sin crecimiento bacteriano, con poca movilidad tipo *swarming*, sin pigmentación del medio. Al ser tratada con el fago hay diferentes cambios morfológicos, en el MOI de 0.25 hay colonias pequeñas, unidas, sin pigmentación, de color blanco. En el MOI 0.125 el crecimiento es irregular con poco pigmento de color verde, el medio pigmentado. En los MOI de 0.062 las colonias tienen pigmentación verde, con crecimiento irregular y bordes lobulados.

En el tratamiento con meropenem (Fig. 17A), se observa que en las concentraciones 2 y 4  $\mu\text{g/mL}$  las colonias no tienen pigmentación, poca movilidad tipo *swarming*, se observa mucosidad, a 8  $\mu\text{g/mL}$  la colonia es regular de color beige, con mayor densidad celular en los bordes. En el tratamiento de fago con meropenem en todas las concentraciones las colonias son de color beige, con poca motilidad tipo *swarming*, bordes irregulares. El tratamiento de 6 horas fago y meropenem en la concentración 2  $\mu\text{g/mL}$  la colonia es circular con bordes irregulares con poca movilidad tipo *swarming*, con pigmentación verdosa. A partir de la concentración 4 y 8  $\mu\text{g/mL}$  las colonias son de color beige con bordes irregulares. Conforme va aumentando la concentración del antibiótico y fago hay menor movilidad tipo *swarming* y un halo delimitado en el borde de la colonia.

En el tratamiento con imipenem (Fig. 17B) en todas las concentraciones hay poca movilidad tipo *swarming*, destacando solo en algunas partes de la colonia y no en todo el borde. Hay similitud con el control en el color de la colonia, la movilidad y la pigmentación que libera. En el tratamiento de fago con imipenem todas las concentraciones tienen colonias de color beige, circulares, con bordes irregulares ondulados, poca movilidad, mucosas. En el tratamiento de 6 horas fago e imipenem las colonias de todas las concentraciones tienen bordes irregulares y lobulados, con presencia de una ligera pigmentación con mayor densidad celular en los bordes, en la concentración 2  $\mu\text{g/mL}$  hay zonas en el centro translucidas, posiblemente por la presencia de fagos.

En el tratamiento con levofloxacin (Fig. 17C) las colonias son beige sin pigmentación, con bordes lobulados, manteniendo su tamaño entre concentraciones. En el tratamiento de levofloxacin en conjunto con el fago se observan colonias circulares, con la variación del

tamaño ( $\sim 1\text{-}2\text{ mm}$ ), brillantes y mucosas, de color blanco y beige, sin motilidad. En el tratamiento de 6 horas con fago y después antibiótico hay movilidad tipo *swarming*. En la concentración  $4\text{ }\mu\text{g/mL}$ , las colonias tienen bordes filamentosos, crecimiento irregular, de color blanco. En la concentración  $2\text{ }\mu\text{g/mL}$  no hay motilidad, la colonia está bien delimitada y tiene crecimiento regular. En la concentración  $8\text{ }\mu\text{g/mL}$  hay poca motilidad, crecimiento regular y algunas proyecciones en los bordes.

Las colonias en presencia de colistina (Fig. 17D) son de color blanco a beige, sin pigmentación, crecimiento regular con bordes lobulados ( $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ ), a  $1\text{ }\mu\text{g/mL}$  la colonia tiene menor densidad celular con zonas translúcidas, manteniendo la morfología, a  $0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$  la colonia mantiene la morfología, sin embargo, es más pequeña, sin zonas translúcidas. En el tratamiento de 6 horas con fago y antibiótico se pueden observar diferentes morfologías coloniales. En todas las concentraciones las colonias no presentan pigmentación, a  $0.5$  y  $1\text{ }\mu\text{g/mL}$  se observan colonias rugosas, con bordes irregulares, a  $2\text{ }\mu\text{g/mL}$  los bordes son regulares con pequeñas proyecciones al exterior.

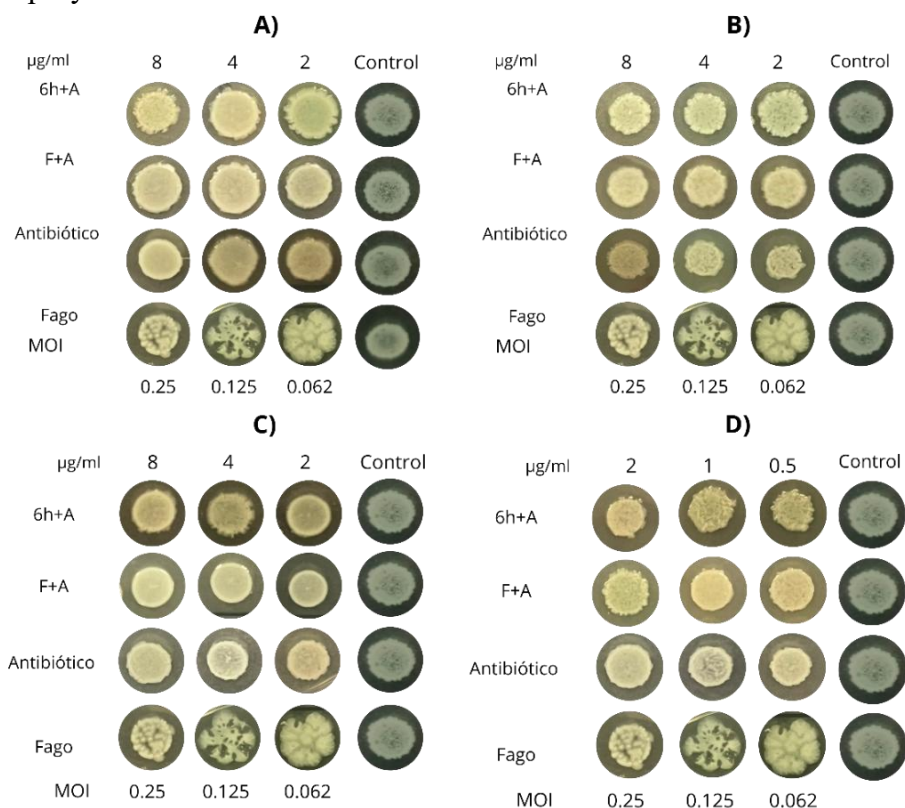


Figura 17. Morfología colonial de *P. aeruginosa* aislamiento 24-1426 después de ser sometida a diferentes tratamientos y antibióticos. A) Meropenem; B) Imipenem; C) Levofloxacin; D) Colistina. 6h F+A: Tratamiento 6 horas del fago posteriormente cambiado a un panel de antibióticos; F+A: Fago y antibiótico en conjunto; MOI: Multiplicidad de Infección del fago.

La viabilidad de las células bacterianas de *A. baumannii* 23-1139 (Fig. 18) no se vio afectada en gran medida. En el tratamiento con fago las colonias de los diferentes MOI muestran un color blanco-beige, bordes regulares con presencia de un halo marcado de color blanco que delimita una mayor densidad celular en los bordes de las colonias.

En el tratamiento con meropenem (Fig. 18A). En la concentración 8 µg/mL la colonia tiene bordes ligeramente irregulares, el centro menos denso que los bordes. En concentraciones inferiores las colonias son circulares con bordes regulares, con mayor densidad celular en los bordes que en el centro. En el tratamiento con fago y meropenem no se observan diferencias con el control. En tratamiento de 6 horas con fago y meropenem (8 µg/mL) las colonias son circulares con bordes irregulares, con mayor densidad celular en los bordes, y con huecos que posiblemente se formaron por la presencia de los fagos. En concentraciones inferiores se observan dos halos bien delimitados, con el centro translúcido.

En el tratamiento con imipenem (Fig. 18B) en todas las concentraciones las colonias tienen 2 halos, el centro se observa translúcido, sin embargo, a partir del primer halo hay mayor densidad hasta el segundo halo, el control únicamente presenta un halo. El tratamiento de fago con imipenem las colonias son circulares con bordes regulares, con presencia de mayor densidad celular en los bordes. No se presentan diferencias entre los tratamientos y el control; en la concentración 8 µg/mL el color es más amarillo. En el tratamiento 6 horas con fago y posteriormente imipenem las colonias son circulares con bordes regulares, con presencia de mayor densidad celular en el borde, sin diferencias entre una concentraciones y el control.

En el caso del tratamiento con levofloxacin (Fig. 18C) a 8 µg/mL las colonias son de color blanco con bordes irregulares y dentados y bordes con mayor densidad celular. En la concentración 2 µg/mL se observan colonias circulares, con bordes regulares, de color blanco-beige con mayor densidad celular en los bordes. En el tratamiento de fago con levofloxacin las colonias tienen mayor densidad que en el tratamiento del levofloxacin solo. En la concentración 8 µg/mL las colonias son de color beige, con bordes regulares pero ondulados, los bordes presentan una mayor densidad celular que el centro de la colonia. A partir de la concentración 2 y 4 µg/mL la morfología del borde cambia a ser regular sin ondulaciones. En el tratamiento de 6 horas con fago y posteriormente levofloxacin no se observan cambios

morfológicos entre concentraciones, observándose colonias beige, circulares con bordes regulares y mayor densidad celular en los bordes.

En el tratamiento con colistina (Fig. 18D), a 2  $\mu\text{g/mL}$  la colonia empieza a tener ondulaciones en los bordes, el borde más denso característico. En 0.5  $\mu\text{g/mL}$  se observan 2 halos, donde el centro se observa más translúcido y el borde con mayor densidad celular. En el tratamiento de fago y colistina las colonias son muy similares al control, circulares de color beige con bordes regulares y mayor densidad celular en los bordes. En el tratamiento de 6 horas con fago y posteriormente colistina no se observan cambios morfológicos comparado con el control.

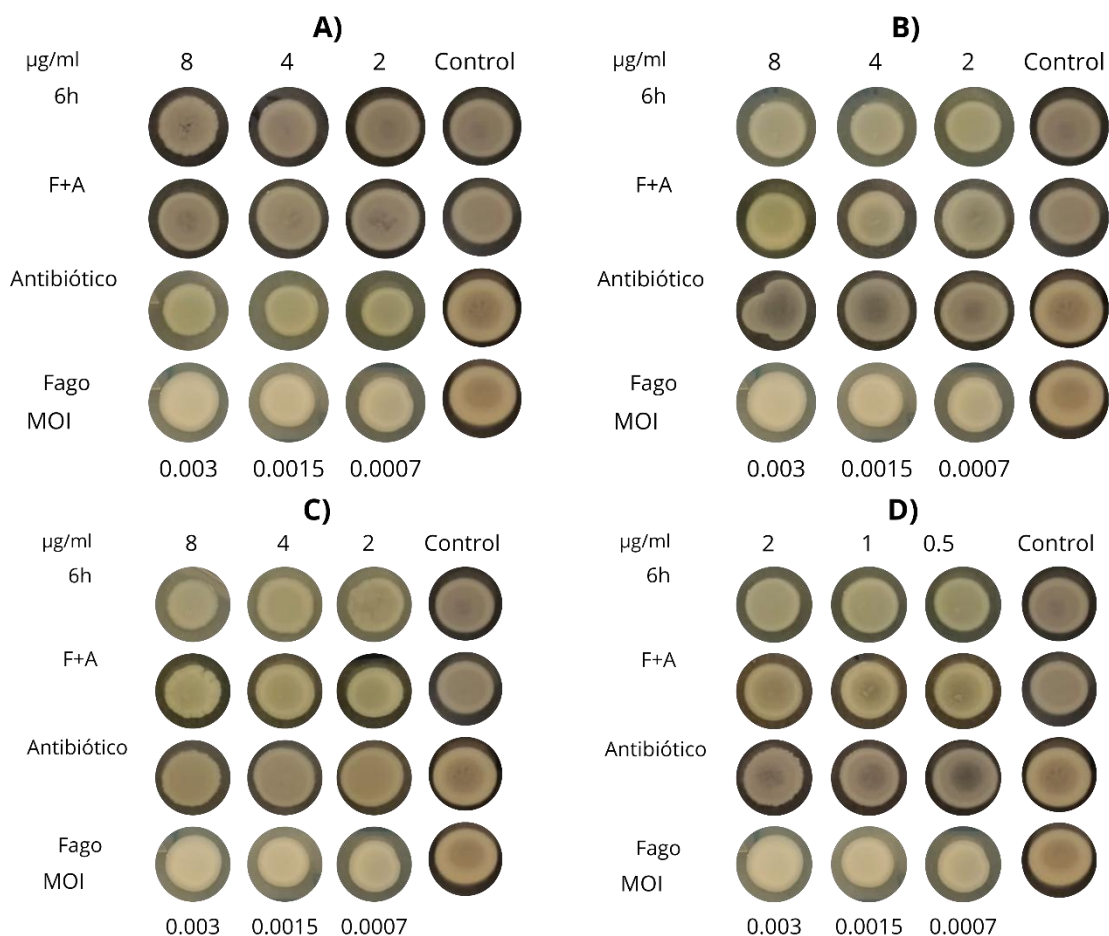


Figura 18. Morfología colonial de *A. baumannii* aislamiento 23-1139 después de ser sometida a diferentes tratamientos y antibióticos. A) Meropenem; B) Imipenem; C) Levofloxacin; D) Colistina. 6h F+A: Tratamiento 6 horas del fago posteriormente cambiado a un panel de antibióticos; F+A: Fago y antibiótico en conjunto; MOI: Multiplicidad de Infección del fago.

## 10. DISCUSIÓN

Se obtuvieron 64 aislados clínicos de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, Monterrey, Nuevo León. Los sitios más comunes de infección fueron tejidos, orina y muestras de aspirado traqueal. Estas cepas se analizaron con diferentes antibióticos, incluidos dos carbapenémicos. Se observó una alta resistencia en *P. aeruginosa* a imipenem (60%), seguido de la levofloxacin (45.71%) y meropenem (25.71%). Por otro lado, en el caso de la colistina, el 88.57% de las cepas mostraron actividad intermedia según el CLSI (2025). A pesar de mostrar poca actividad, se ha determinado que el uso de colistina en pacientes no suele tener una eficacia consistente (Nadir & Batirel, 2024), por lo que, aunque no se observe crecimiento, el uso de este antibiótico no garantiza el éxito del tratamiento. Por otro lado, *A. baumannii* mostró una alta resistencia al meropenem (68.97%) e imipenem (62.1%), una susceptibilidad media a levofloxacin (55.17%) y una alta actividad intermedia a la colistina (86.21%).

Thabit y colaboradores (2024) mencionan una mayor resistencia a carbapenémicos y fluoroquinolonas que a los aminoglucósidos, con un 43.8% de cepas que muestran actividad intermedia a la colistina, 52.4% de resistencia al imipenem, 59.5% a levofloxacin y el 48% al meropenem, sin embargo, la resistencia a la colistina en cepas de *P. aeruginosa* es mayor en Arabia Saudita. Los antibióticos como meropenem, imipenem y levofloxacin presentan una resistencia menor que la obtenida en los resultados presentados. La solución presentada por Thabit y colaboradores en pacientes con ventilación mecánica y que presenten una infección bacteriana es el uso de los antibióticos antes mencionados inmediatamente ante la sospecha de *P. aeruginosa*, sin embargo, esto podría provocar que la infección empeorara si no se trata de *P. aeruginosa* o está ya sea resistente, pudiendo agravarse por el uso indiscriminado de antibióticos. Los antibióticos como meropenem, levofloxacin e imipenem tenían una susceptibilidad superior al 75 % en 2017 (Valero et al., 2019).

En el caso de *A. baumannii*, se observó una resistencia del 95% en colistina, 96% a imipenem, 93% a meropenem y 97% a levofloxacin en hospitales de Arabia Saudita, con un aumento a la resistencia de diversos antimicrobianos en los últimos años (Thabit et al., 2025), observándose que en México la resistencia a estos antibióticos todavía no es tan alta en comparación con Arabia Saudita. Por otro lado, en Delhi, se reportó en 2018 susceptibilidad del

45% a colistina y 53.3% a carbapenémicos en general, además reportándose que el 86.6% de las cepas analizadas de *A. baumannii* eran MDR (Tewari et al., 2018). El 96.55% de los aislamientos de *A. baumannii* analizados en el presente estudio son reportados como MDR. En el caso de *P. aeruginosa* se reportó en Ecuador que 46.7% de las cepas analizadas eran MDR (Zurita et al., 2024), mientras que en las cepas analizadas en este estudio se presentaron 80% MDR.

En un estudio de un grupo de investigación de Túnez se evaluaron 33 cepas de *P. aeruginosa*, de las cuales el 39.4% eran fuertes productoras de biopelícula con potencial de virulencia y resistencia a los tratamientos antimicrobianos. Las cepas no productoras tienen una virulencia limitada, a diferencia de las productoras moderadas y fuertes. Los resultados obtenidos muestran que las bacterias utilizan la producción de biopelícula como factor de virulencia para protegerse del entorno que las rodea y de posibles ataques derivados del uso de desinfectantes o antibióticos (Islam et al., 2023). Se realizó un estudio donde se recopilaron datos globales de *A. baumannii* y su producción de biopelícula reportados anteriormente. Estos datos arrojaron que el 65.63% de las cepas eran productoras de biopelícula con 41.34% productoras fuertes, 33.57% productoras moderadas y 27.63% productoras débiles (Gedefie et al., 2023). En comparación con los datos presentados en este estudio, donde el 27.59% fueron productoras fuertes, 31.03% productoras moderadas y 24.14% fueron productoras débiles. A pesar de que difieren en cuanto a la producción fuerte, se observa que el 86.2% son productoras, siendo aproximadamente un 20% más que los datos reportados por Gedefie y colaboradores.

En cuanto a la erradicación de biopelícula se observó que las células de *A. baumannii* que formaron biopelícula resistían los antibióticos de 6 a 9 veces la concentración obtenida en las pruebas de susceptibilidad. En China se detectó un aumento de 4 a 1024 veces la resistencia a los antibióticos en cepas productoras de biopelícula de *A. baumannii*. Antibióticos como la colistina tenían un MIC de 0.5-4 µg/ml a un aumento de MBEC de hasta 256 µg/ml, para imipenem el MIC fue de 0.5-4 µg/ml a un aumento de 1,024 µg/ml, concluyendo que, si hay bacterias susceptibles, la producción de biopelícula puede ser un factor que los ayude a resistir los antibióticos (Shenkutie et al., 2020). Se observó una reducción de la viabilidad celular en presencia de meropenem de 0.03125 µg/ml a 5 µg/ml. Por otro lado, *P. aeruginosa* demostró que tuvo un aumento de la resistencia a la biopelícula de 2 a 10 veces (0.5-128 µg/ml a 512

µg/ml). Se ha reportado que en el caso de imipenem aumenta entre 9 y 10 veces (1 a >256 µg/ml) mientras que para colistina hay aumentos de 9-12 veces según la cepa analizada (1 a 256-1024 µg/ml). En el caso de las fluoroquinolonas como ciprofloxacino el aumento fue de 7-9 veces (0.25 a 64-256 µg/ml) (Goodyear et al., 2022).

El uso de bacteriófagos ha sido estudiado en bacterias ESKAPE para obtener tratamientos alternativos, para *Staphylococcus aureus* se utilizó solución de fago proveniente del instituto Eliava en Georgia, los fagos de *Enterococcus faecium* se recuperaron de aguas residuales de Maryland y *P. aeruginosa* mostró placas líticas a partir de aguas residuales de Orlando (Kunz Coyne et al., 2024). En Jalisco, México se probó agua estancada en cepas pertenecientes al grupo ESKAPE, sin embargo, únicamente se encontró un fago que tenía actividad lítica contra *A. baumannii* (Vera-Jauregui et al., 2025). Por otro lado, en Alemania, se recuperaron muestras de saliva y heces de perro, además de muestras de aceite y del ambiente, donde se encontraron 2 tipos de fagos líticos que tienen actividad contra *P. aeruginosa* (Dalponte et al., 2025). En el actual trabajo se obtuvieron placas líticas en 2 cepas de *P. aeruginosa* y en una cepa de *A. baumannii* a partir de una planta de tratamiento de agua en San Nicolas de los Garza, Nuevo León.

En cuanto a la actividad antimicrobiana, se puede observar diferencia en el comportamiento de las cepas de *P. aeruginosa*, la cepa 24-1426 exhibió que el uso del fago puede tener un aumento de células viables, por otro lado, la cepa 24-0824 mostró una disminución en el tiempo 0 de tratamiento, sin embargo, posteriormente las células viables aumentaron sin diferencias significativas con el control. Se ha observado que los fagos en algunas cepas de *P. aeruginosa* son capaces de reducir hasta un 60% la viabilidad en el minuto 10 después del tratamiento, sin embargo, entre más pase el tiempo, las células viables pueden igualarse al control (Torres-Barceló et al., 2014).

En el caso de *A. baumannii* se puede observar que hay una reducción significativa de colonias viables, con mayor efecto a los 10 minutos. En Tailandia un estudio similar demostró que las colonias viables pueden reducirse hasta un 50%, sin embargo, hay mayor efecto con un MOI mayor, mostrando que el uso de un MOI de 0.01 si tiene una reducción significativa, sin embargo, es de mayor eficacia un MOI de 1 (Janesomboon et al., 2025).

Los sistemas de captación de hierro son una parte importante para la supervivencia de *P. aeruginosa* en el ambiente, la pioverdina es un sideróforo de alta afinidad y se empieza a expresar en condiciones deficientes de hierro, su color suele ser verde, mientras que la pioquelina es un sideróforo de baja afinidad presente en condiciones con abundante hierro y suele ser de un color blanco amarillento (Cornelis & Dingemans, 2013). Se observó que la pioverdina tuvo presencia únicamente en algunos tratamientos y en algunas concentraciones, donde en la cepa 24-0824 muestra colonias de color verde en el tratamiento con fagos y la disminución del color a medida que sube la concentración, sin embargo, los tratamientos con antibiótico solo se puede observar que a medida que sube la concentración se observa mayor pigmentación de color verde del medio, a medida de que se reduce la concentración las colonias se tornan de color blanco o beige. Se ha reportado que los fagos pueden ayudar a la captación de hierro dentro de una biopelícula al formar un agregado con el hierro, además el agregado puede ser tanto con hierro libre como ferroso, donde se observa un mayor crecimiento de *P. aeruginosa* por esta mayor captación de hierro con ayuda del fago Pf (Khosravi et al., 2026).

En el caso de *A. baumannii* no hubo cambios significativos en la morfología colonial ni reducción de biopelícula, las colonias se mostraban muy similares al control, con mayor densidad celular en los bordes, sin embargo, se ha reportado en China el fago es capaz de disminuir la actividad bacteriana y la biopelícula en un 89.53% (Wang et al., 2024), por otro lado, en España se reportó que el uso del fago puede aumentar la producción de biopelícula según la cepa y el fago utilizado, a pesar de que no aumenta en gran medida, se puede observar un ligero aumento de masa de biopelícula, sin embargo al comparar con las células viables, estas disminuyeron (Blasco et al., 2022).

Una de las limitaciones en el presente estudio fueron las condiciones experimentales *in vitro* dentro del laboratorio, ya que no reflejan completamente el comportamiento como tratamiento *in vivo*. Adicionalmente el uso de la técnica de conteo en placa puede presentar limitaciones en cuanto a precisión, influyendo en la cuantificación de la viabilidad bacteriana. Así mismo se observó un aumento en la mucosidad en la biopelícula de *P. aeruginosa* al retarlo con los fagos, interfiriendo con los resultados finales.



## 11. CONCLUSIONES

1. Se aislaron 64 cepas bacterianas, de las cuales 54.69% fueron identificadas como *P. aeruginosa* y 45.51% identificadas como *A. baumannii*.
2. Para los aislamientos clínicos de *A. baumannii* se determinó alta resistencia a meropenem (68.97%), imipenem (62.1%) y levofloxacin (55.17%) y una alta actividad intermedia para colistina (86.21%). En aislamientos de *P. aeruginosa* se observó alta resistencia a imipenem (60%) y levofloxacin (45.71%) y una alta actividad intermedia para colistina (88.57%) y meropenem (57.14%). El 96.55% de los aislamientos de *A. baumannii* y el 80% de los aislamientos de *P. aeruginosa* fueron categorizados como MDR. El 86.21% de *A. baumannii* y el 74.29% de *P. aeruginosa* presentaron resistencia a carbapenémicos.
3. El 90.62% de los aislamientos fueron productores de biopelícula. El 97.14% de los aislamientos de *P. aeruginosa* fueron fuertes productoras de biopelícula. El 82.87% de aislamientos de *A. baumannii* son productoras moderadas a fuertes. En células de biopelícula, se observó resistencia a meropenem, imipenem, levofloxacin y colistina en los aislamientos seleccionados de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*.
4. Se aislaron 2 bacteriófagos contra aislamientos de *P. aeruginosa* y 1 bacteriófago contra un aislamiento de *A. baumannii*.
5. No se observó actividad antimicrobiana por bacteriófagos en los aislamientos de *P. aeruginosa*. Se observó actividad antimicrobiana en el aislamiento del fago con MOI 0.01 de *A. baumannii*. No se observó actividad antibiopelícula en los tratamientos con fago y la combinación de fago y antibiótico en ningún aislamiento. Por otra parte, *P. aeruginosa* presentó cambios morfológicos después de los tratamientos, siendo los más notorios cambios de morfología del borde y pigmentación, mientras que *A. baumannii* no presentó cambios morfológicos drásticos.

## 12. PERSPECTIVAS

- Caracterizar los bacteriófagos ambientales aislado de aguas residuales por medio del microscopio electrónico de transmisión (TEM).
- Caracterizar la secuencia genética de los bacteriófagos ambientales aislados.
- Analizar las curvas de absorción, cinética lítica y burstsiza de bacteriófagos con los aislamientos de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* susceptibles a los fagos.
- Analizar la actividad de inhibición de biopelícula que pueden presentar los bacteriófagos ambientales aislados de los aislamientos pertenecientes a *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.
- Los hallazgos obtenidos abren la posibilidad de explorar bacteriófagos para diversos patógenos, especialmente los pertenecientes a las bacterias ESKAPE. Evaluar la actividad antimicrobiana y antibiopelícula de los bacteriófagos frente a aislamientos ESKAPE con multifarmacorresistencia.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

- Adriaenssens, E. M., Krupovic, M., Knezevic, P., Ackermann, H. W., Barylski, J., Brister, J. R., Kuhn, J. H. (2017). Taxonomy of prokaryotic viruses: 2016 update from the ICTV bacterial and archaeal viruses subcommittee. *Arch Virol*, 162(4), 1153-1157. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3173-4>
- Ahmad, T. A., Houjeiry, S. E., Kanj, S. S., Matar, G. M., & Saba, E. S. (2024). From forgotten cure to modern medicine: The resurgence of bacteriophage therapy. *J Glob Antimicrob Resist*, 39, 231-239. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2024.10.259>
- Araya, S., Gebreyohannes, Z., Tadlo, G., Gessew, G. T., & Negesso, A. E. (2023). Epidemiology and Multidrug Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* Isolated from Clinical Samples in Ethiopia. *Infect Drug Resist*, 16, 2765-2773. <https://doi.org/10.2147/idr.S402894>
- Bartal, C., Rolston, K. V. I., & Nesher, L. (2022). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: Colonization, Infection and Current Treatment Options. *Infect Dis Ther*, 11(2), 683-694. <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00597-w>
- Bejarano, J. I. C., Vega, N. C., Díaz, J. L., & de los Santos, A. M. J. R. L. d. I. P. (2023). *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos en población pediátrica: panorama epidemiológico. 36(1), 42-46.
- Blasco, L., Bleriot, I., González de Aledo, M., Fernández-García, L., Pacios, O., Oliveira, H., Tomás, M. (2022). Development of an Anti-*Acinetobacter baumannii* Biofilm Phage Cocktail: Genomic Adaptation to the Host. *Antimicrob Agents Chemother*, 66(3), e0192321. <https://doi.org/10.1128/aac.01923-21>
- Camacho-Ortiz, A., Flores-Treviño, S., & Bocanegra-Ibarias, P. (2025). Prevalence of difficult-to-treat resistance in ESKAPE pathogens in a third level hospital in Mexico. *Infect Prev Pract*, 7(1), 100426. <https://doi.org/10.1016/j.infpip.2024.100426>
- Chegini, Z., Khoshbayan, A., Taati Moghadam, M., Farahani, I., Jazireian, P., & Shariati, A. (2020). Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a review. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 19(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00389-5>
- Ciofu, O., & Tolker-Nielsen, T. (2019). Tolerance and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial Agents-How *P. aeruginosa* Can Escape Antibiotics. *Front Microbiol*, 10, 913. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00913>

- Colquhoun, J. M., & Rather, P. N. (2020). Insights Into Mechanisms of Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii* and Implications for Uropathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*, 10, 253. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00253>
- Cornelis, P., & Dingemans, J. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front Cell Infect Microbiol*, 3, 75. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00075>
- Cosentino, F., Viale, P., & Giannella, M. (2023). MDR/XDR/PDR or DTR? Which definition best fits the resistance profile of *Pseudomonas aeruginosa*? *Curr Opin Infect Dis*, 36(6), 564-571. <https://doi.org/10.1097/qco.0000000000000966>
- Dalponte, A., Filor, V., Lübke-Becker, A., Fulde, M., Alter, T., Müsken, M., & Bäumer, W. (2025). Characterization and purification of *Pseudomonas aeruginosa* phages for the treatment of canine infections. *BMC Microbiol*, 25(1), 289. <https://doi.org/10.1186/s12866-025-04005-4>
- De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Walker, M. J. (2020). Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev*, 33(3). <https://doi.org/10.1128/cmr.00181-19>
- de Sousa, T., Hébraud, M., Dapkevicius, M., Maltez, L., Pereira, J. E., Capita, R., Poeta, P. (2021). Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222312892>
- Dec, M., Wernicki, A., & Urban-Chmiel, R. (2020). Efficacy of experimental phage therapies in livestock. *Anim Health Res Rev*, 21(1), 69-83. <https://doi.org/10.1017/s1466252319000161>
- Foucrier, A., Dessalle, T., Tuffet, S., Federici, L., Dahyot-Fizel, C., Barbier, F.,...Bouglé, A. (2023). Association between combination antibiotic therapy as opposed as monotherapy and outcomes of ICU patients with *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia: an ancillary study of the iDIAPASON trial. *Crit Care*, 27(1), 211. <https://doi.org/10.1186/s13054-023-04457-y>
- Gedefie, A., Alemayehu, E., Mohammed, O., Bambo, G. M., Kebede, S. S., & Kebede, B. (2023). Prevalence of biofilm producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolates: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 18(11), e0287211. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0287211>

- Goodyear, M. C., Garnier, N. E., Levesque, R. C., & Khursigara, C. M. (2022). Liverpool Epidemic Strain Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Display High Levels of Antimicrobial Resistance during Both Planktonic and Biofilm Growth. *Microbiol Spectr*, 10(3), e0102422. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01024-22>
- Grace, A., Sahu, R., Owen, D. R., & Dennis, V. A. (2022). *Pseudomonas aeruginosa* reference strains PAO1 and PA14: A genomic, phenotypic, and therapeutic review. *Front Microbiol*, 13, 1023523. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1023523>
- Ibrahim, S., Al-Saryi, N., Al-Kadmy, I. M. S., & Aziz, S. N. (2021). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. *Mol Biol Rep*, 48(10), 6987-6998. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06690-6>
- Islam, O. K., Islam, I., Saha, O., Rahaman, M. M., Sultana, M., Bockmühl, D. P., & Hossain, M. A. (2023). Genomic variability correlates with biofilm phenotypes in multidrug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep*, 13(1), 7867. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35056-0>
- Janesomboon, S., Sawaengwong, T., Muangsombut, V., Vanaporn, M., Santanirand, P., Kritsiriwuthinan, K., Withatanung, P. (2025). Synergistic antibacterial activity of curcumin and phage against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Sci Rep*, 15(1), 8959. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-94040-y>
- Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., & McClean, S. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *Int J Mol Sci*, 22(6). <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>
- Khosravi, A., Gupta, A., Hajfathalian, M., Burgener, E. B., Rodriguez, S. P., Milla, C. E., & Bollyky, P. L. (2026). Phage-Mediated Iron Acquisition by *Pseudomonas aeruginosa*. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.64898/2026.01.26.700923>
- Kothari, A., Kherdekar, R., Mago, V., Uniyal, M., Mangain, G., Kalia, R. B., Omar, B. J. (2023). Age of Antibiotic Resistance in MDR/XDR Clinical Pathogen of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmaceuticals (Basel)*, 16(9). <https://doi.org/10.3390/ph16091230>
- Kunz Coyne, A. J., Eshaya, M., Bleick, C., Vader, S., Biswas, B., Wilson, M., Rybak, M. J. (2024). Exploring synergistic and antagonistic interactions in phage-antibiotic combinations against ESKAPE pathogens. *Microbiol Spectr*, 12(10), e0042724. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00427-24>

- Kyriakidis, I., Vasileiou, E., Pana, Z. D., & Tragiannidis, A. (2021). Acinetobacter baumannii Antibiotic Resistance Mechanisms. *Pathogens*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/pathogens10030373>
- Laborda, P., Sanz-García, F., Hernando-Amado, S., & Martínez, J. L. (2021). Pseudomonas aeruginosa: an antibiotic resilient pathogen with environmental origin. *Curr Opin Microbiol*, 64, 125-132. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.09.010>
- Letarov, A. V. (2020). History of Early Bacteriophage Research and Emergence of Key Concepts in Virology. *Biochemistry (Mosc)*, 85(9), 1093-1010. <https://doi.org/10.1134/s0006297920090096>
- Lohiya, R., & Deotale, V. (2023). Surveillance of health-care associated infections in an intensive care unit at a tertiary care hospital in Central India. *GMS Hyg Infect Control*, 18, Doc28. <https://doi.org/10.3205/dgkh000454>
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*, 18(3), 268-281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., & Biondo, C. (2021). Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/pathogens10101310>
- Mea, H. J., Yong, P. V. C., & Wong, E. H. (2021). An overview of Acinetobacter baumannii pathogenesis: Motility, adherence and biofilm formation. *Microbiol Res*, 247, 126722. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126722>
- Mendes, S. G., Combo, S. I., Allain, T., Domingues, S., Buret, A. G., & Da Silva, G. J. (2023). Co-regulation of biofilm formation and antimicrobial resistance in Acinetobacter baumannii: from mechanisms to therapeutic strategies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 42(12), 1405-1423. <https://doi.org/10.1007/s10096-023-04677-8>
- Miller, W. R., & Arias, C. A. (2024). ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. *Nat Rev Microbiol*, 22(10), 598-616. <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01054-w>

- Mohan, M. S., Salim, S. A., Forgia, N., & Busi, S. (2024). *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors and Biofilm Components: Synthesis, Structure, Function and Inhibitors. In S. Busi & R. Prasad (Eds.), *ESKAPE Pathogens: Detection, Mechanisms and Treatment Strategies* (pp. 317-347). Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-99-8799-3\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-99-8799-3_11)
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Nadir, Y., & Batirel, A. A. (2024). Review of Colistin Susceptibility Testing with Current Data. *Mediterranean Journal of Infection Microbes and Antimicrobials*, 13. <https://doi.org/10.4274/mjima.galenos.2024.24056.3>.
- Nair, A., Ghugare, G. S., & Khairnar, K. (2022). An Appraisal of Bacteriophage Isolation Techniques from Environment. *Microb Ecol*, 83(3), 519-535. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01782-z>
- Peterson JW. Bacterial Pathogenesis. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8526/>
- Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., Wu, M. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*, 7(1), 199. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1>
- Rogovski, P., Cadamuro, R. D., da Silva, R., de Souza, E. B., Bonatto, C., Viancelli, A., Fongaro, G. (2021). Uses of Bacteriophages as Bacterial Control Tools and Environmental Safety Indicators. *Front Microbiol*, 12, 793135. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.793135>
- Sharma, S., Chatterjee, S., Datta, S., Prasad, R., Dubey, D., Prasad, R. K., & Vairale, M. G. (2017). Bacteriophages and its applications: an overview. *Folia Microbiol (Praha)*, 62(1), 17-55. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0471-x>
- Shenkutie, A. M., Yao, M. Z., Siu, G. K., Wong, B. K. C., & Leung, P. H. (2020). Biofilm-Induced Antibiotic Resistance in Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates. *Antibiotics (Basel)*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110817>
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. J. A. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing

- conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *II*5(8), 891-899.
- Straka, M., Dubinová, M., & Liptáková, A. (2022). Phascinating Phages. *Microorganisms*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071365>
- Tamma, P. D., Aitken, S. L., Bonomo, R. A., Mathers, A. J., van Duin, D., & Clancy, C. J. (2022). Infectious Diseases Society of America Guidance on the Treatment of AmpC  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacterales, Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*, and *Stenotrophomonas maltophilia* Infections. *Clin Infect Dis*, 74(12), 2089-2114. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab1013>
- Tewari, R., Chopra, D., Wazahat, R., Dhingra, S., & Dudeja, M. (2018). Antimicrobial Susceptibility Patterns of an Emerging Multidrug Resistant Nosocomial Pathogen: *Acinetobacter baumannii*. *Malays J Med Sci*, 25(3), 129-134. <https://doi.org/10.21315/mjms2018.25.3.13>
- Thabit, A. K., Alghamdi, A. M., Miaji, M. Y., Alharbi, F. S., Jawah, A. F., Alturki, F.,..., t. S. A. S. s. g. (2024). Antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in Saudi Arabia: a national antimicrobial resistance surveillance study [Original Research]. *Volume 12 - 2024*. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2024.1436648>
- Thabit, A. K., Alharbi, F. S., Jawah, A. F., Alghamdi, A. M., Miaji, M. Y., Alturki, F.,...Eljaaly, K. (2025). A National Surveillance of the Antibiotic Susceptibility of *Acinetobacter baumannii* in Saudi Arabia. *Antibiotics (Basel)*, 14(2). <https://doi.org/10.3390/antibiotics14020209>
- Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Int J Mol Sci*, 21(22). <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>
- Torres-Barceló, C., Arias-Sánchez, F. I., Vasse, M., Ramsayer, J., Kaltz, O., & Hochberg, M. E. (2014). A window of opportunity to control the bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa* combining antibiotics and phages. *PLoS One*, 9(9), e106628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106628>
- Tu, Q., Pu, M., Li, Y., Wang, Y., Li, M., Song, L., Tong, Y. (2023). *Acinetobacter Baumannii* Phages: Past, Present and Future. *Viruses*, 15(3). <https://doi.org/10.3390/v15030673>
- Valero, A., Isla, A., Rodríguez-Gascón, A., Canut, A., & Ángeles Solinís, M. (2019). Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and antimicrobial activity using PK/PD



- analysis: an 18-year surveillance study [10.1016/j.eimc.2019.02.009]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(10), 626-633. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2019.02.009>
- Vera-Jauregui, E., Avila-Novoa, M. G., González-Torres, B., Guerrero-Medina, P. J., Chaidez, C., González-López, I., Gutiérrez-Lomelí, M. (2025). A Newly Discovered Obolenskivirus Phage with Sustained Lytic Activity Against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *14*(10), 961.
- Wang, R., You, X., Liu, X., Fei, B., Li, Y., Wang, D., Li, Y. (2024). Characterization of phage HZY2308 against *Acinetobacter baumannii* and identification of phage-resistant bacteria. *Virology*, 21(1), 283. <https://doi.org/10.1186/s12985-024-02556-y>
- Williams, K. P., Gillespie, J. J., Sobral, B. W. S., Nordberg, E. K., Snyder, E. E., Shallom, J. M., & Dickerman, A. W. (2010). Phylogeny of Gammaproteobacteria. *192*(9), 2305-2314. <https://doi.org/doi:10.1128/jb.01480-09>
- Wood, S. J., Kuzel, T. M., & Shafikhani, S. H. (2023). *Pseudomonas aeruginosa*: Infections, Animal Modeling, and Therapeutics. *Cells*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/cells12010199>
- Yehya, A., Ezzeddine, Z., Chakkour, M., Dhaini, Z., Bou Saba, M. S., Bou Saba, A. S.,...Ghssein, G. (2025). The intricacies of *Acinetobacter baumannii*: a multifaceted comprehensive review of a multidrug-resistant pathogen and its clinical significance and implications. *Front Microbiol*, 16, 1565965. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1565965>
- Żbikowska, K., Michalczyk, M., & Dolka, B. (2020). The Use of Bacteriophages in the Poultry Industry. *Animals (Basel)*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/ani10050872>
- Zurita, J., Sevillano, G., Solís, M. B., Paz, Y. M. A., Alves, B. R., Changuan, J., & González, P. (2024). *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones and their association with multidrug-resistant. *J Glob Antimicrob Resist*, 38, 332-338. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2024.07.003>

## 14. RESUMEN BIOGRÁFICO

Luisa Itzel Rodriguez Rodriguez

Candidato para el grado de Maestra en Ciencias con Orientación en Microbiología

|                          |                                                                                                                                                                                                            |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tesis:                   | EFECTO ANTIMICROBIANO DE BACTERIÓFAGOS AMBIENTALES SOBRE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE <i>Acinetobacter baumannii</i> Y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MULTIFARMACORRESISTENTES                                  |
| Campo de Estudio:        | Ciencias de Biológicas                                                                                                                                                                                     |
| Datos Personales:        | Nacido en Aguascalientes, Aguascalientes, el 11 de julio de 2001. Hija de José de Jesús Rodriguez Rubio y Leticia Rodriguez Elizalde.                                                                      |
| Educación:               | Egresada del CBTis #168 “Francisco I. Madero”, grado obtenido de Técnico en Laboratorio Clínico. Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Grado obtenido como Químico Bacteriólogo Parasitólogo. |
| Experiencia Profesional: | Asistente de Investigación en Laboratorio de Infectología del Hospital Universitario en el año 2022 y Unidad de Microbioma y Microbiología Avanzada (UMMA) en el año 2024.                                 |