Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Caracterización de bacteriófagos aislados a partir de aguas residuales de un hospital materno infantil y evaluación de la actividad frente a biofilms de *Acinetobacter baumannii* multidrogo-resistente

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico (a)

AUTORES

Dania Esmeralda CHAPOÑAN RIOJAS

Jesús Eduardo ESTRADA LÓPEZ

ASESOR

Dra. María Elena SALAZAR SALVATIERRA

Lima, Perú

2026



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

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

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

Referencia bibliográfica

Chapoñan D, Estrada J. Caracterización de bacteriófagos aislados a partir de aguas residuales de un hospital materno infantil y evaluación de la actividad frente a biofilms de *Acinetobacter baumannii* multidrogo-resistente [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2026.

Metadatos complementarios

Datos de autor 1	
Nombres y apellidos	Jesús Eduardo Estrada López
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	71927836
URL de ORCID	https://orcid.org/0009-0002-8138-7130
Datos de autor 2	
Nombres y apellidos	Dania Esmeralda Chapoñan Riojas
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	72372852
URL de ORCID	https://orcid.org/0009-0001-9129-132X
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Dra. María Elena Salazar Salvatierra
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	08675623
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-5661-4752
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Dra. Ana Maria Virginia Chávez Fernández De Amaranto
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07514130
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Mg. Maria Haydeé Chávez Gaona
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	44617218

Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Mg. Juana Pacifico Bedón
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	42263503
Datos de investigación	
Línea de investigación	A.02.04.06. Microorganismos de interés industrial, ambiental y bioprocesos
Grupo de investigación	Biofilms Bacterianos en el Perú - BIOBACT
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Cercado de Lima Latitud: -12.056456 Longitud: -77.023759
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2025-2026
URL de disciplinas OCDE	Enfermedades infecciosas https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.08 Salud pública, Salud ambiental https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.05

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

Caracterización de bacteriófagos aislados a partir de aguas residuales de un hospital materno infantil y evaluación de la actividad frente a biofilms de *Acinetobacter baumannii* multidrogo-resistente

Que presentan los Bachilleres en Farmacia y Bioquímica:

DANIA ESMERALDA CHAPOÑAN RIOJAS Y
JESÚS EDUARDO ESTRADA LÓPEZ

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, ha obtenido la siguiente calificación final:

19 (Diecinueve) - Aprobado con máximos honores

de conformidad con el Art. 14.° del Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para la obtención del Título Profesional de Químico Farmacéutico (a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Lima, 19 de octubre de 2026.

Dra. Ana Maria Virginia Chávez Fernández De Amaranto
Presidente

Mg. Maria Haydee Chávez Gaona
Miembro

Mg. Juana Pacífico Bedón
Miembro

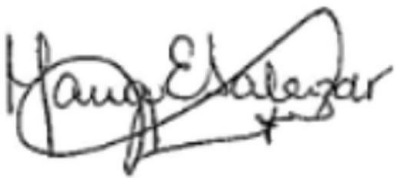
UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE
SAN MARCOS
Universidad del Perú, Decana de América

Anexo 1
CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, María Elena Salazar Salvatierra en mi condición de asesor acreditado con el Dictamen de la EP N° 034-FFB-EPFB-2026 de la tesis, cuyo título es "Caracterización de bacteriófagos aislados a partir de aguas residuales de un hospital materno infantil y evaluación de la actividad frente a biofilms de *Acinetobacter baumannii* multidrogo-resistente", presentado por los bachilleres Jesús Eduardo Estrada López y Dania Esmeralda Chapoñan Riojas para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico (a), **CERTIFICO** que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante la plataforma PIDS, el documento evaluado cuenta con el **2% de similitud**, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional**.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del Título Profesional de Químico Farmacéutico (a).

Lima, 16 de octubre de 2026

Firma del Asesor: 

Nombres y Apellidos del asesor: María Elena Salazar Salvatierra

DNI: 08675623

La vigencia del presente certificado corresponde a un período de noventa (90) días desde la fecha de su emisión; siempre que no haya observaciones en el texto durante el proceso de revisión por el jurado informante o surja alguna contingencia.

DEDICATORIA

A mis padres, por confiar en mí desde el primer momento, por brindarme calma en los momentos de incertidumbre, por ser siempre mi mayor apoyo incondicional.

A mi familia y amigos, por motivarme constantemente a seguir adelante. Gracias Leonel P. y gracias, Gerald L., por acompañarme en cada paso de este camino. Estaré siempre agradecida por su apoyo.

A quien me acompañó, por no dejar que me rinda, por alentarme a seguir adelante y a mi compañero de tesis, muchas gracias por todo.

Chapoñán Riojas, Dania Esmeralda

A mis padres, por estar ahí cuando más la necesito brindándome todo su apoyo, valores y sabios consejos. Por nunca dejar de creer en mí y ser el pilar de cada uno de mis logros.

A mi familia y amigos, por brindarme la motivación y aliento para seguir adelante en todos los proyectos que me planteo. A mi compañera de tesis, por su apoyo y dedicación a lo largo de este proceso.

A mi mejor amigo y compañero de vida, por enseñarme tanto de la vida, y apoyarme incondicionalmente en cada decisión que tomo.

Estrada López, Jesús Eduardo

AGRADECIMIENTOS

Estamos muy agradecidos con nuestra asesora, Dra. Maria Elena Salazar Salvatierra, por brindarnos siempre las facilidades y el apoyo para el desarrollo de este proyecto. A los docentes del Departamento de Microbiología y Parasitología Básica y Aplicada, quienes nos instruyeron y apoyaron incondicionalmente, compartiendo su conocimiento y abiertos a explicarnos y profundizar sus experiencias con nosotros. Al Dr. Gustavo Guerra Brizuela, por el apoyo incondicional durante esta investigación. A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, nuestra alma máter, por los espacios de recreación e investigación que nos permitieron sobrellevar este trabajo. A todos aquellos amigos y familiares que creen en nosotros.

Chapoñán Riojas, Dania Esmeralda

Estrada López, Jesús Eduardo

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....7
RESUMEN.....8
ABSTRACT.....9
I. INTRODUCCIÓN.....10
I.1. Planteamiento del problema.....10
I.2. Objetivos.....11
I.2.1. Objetivo general.....11
I.2.2. Objetivos específicos.....11
I.3. Importancia y alcance de la investigación (justificación).....12
I.4. Limitaciones de la investigación.....13
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....14
II.1. Marco teórico.....14
II.1.1. *Acinetobacter baumannii*.....14
II.1.1.1. Generalidades.....14
II.1.1.2. Importancia clínica.....14
II.1.1.3. Mecanismos de resistencia antimicrobiana.....15
II.1.1.4. Factores de virulencia.....17
II.1.2. Biofilms bacterianos.....18
II.1.2.1. Características y composición del biofilm.....18
II.1.2.2. Etapas del desarrollo del biofilm.....18
II.1.2.3. Factores que influyen en la formación del biofilm.....19
II.1.2.4. Relevancia clínica del biofilm de A. baumannii.....19
II.1.3. Bacteriófagos.....20
II.1.3.1. Generalidades.....20
II.1.3.2. Mecanismos de infección.....20
II.1.3.3. Factores que afectan a los bacteriófagos.....21
II.1.3.4. Resistencia bacteriana a los fagos.....21
II.1.4. Aguas residuales como reservorio de bacteriófagos.....22
II.2. Antecedentes del estudio.....22
II.3. Glosario de términos.....27
III. HIPÓTESIS Y VARIABLES.....29
III.1. Hipótesis.....29
III.2. Variables.....29
III.3. Operacionalización de variables.....30
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....31
IV.1. Área de estudio.....31
IV.2. Diseño de investigación.....31
IV.3. Población y muestra.....31
IV.4. Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de información.32
IV.4.1. Obtención de la cepa de A. baumannii MDR.....32

IV.4.2. Perfil de resistencia de las cepas.....32
IV.4.3. Recolección de muestra de aguas residuales..... 32
IV.4.4. Aislamiento y detección de los bacteriófagos..... 33
IV.4.5. Purificación y cuantificación de bacteriófagos..... 33
IV.4.6. Estabilidad fisicoquímica del bacteriófago..... 35
IV.4.6.1. Estabilidad térmica..... 35
IV.4.6.2. Estabilidad a la variación de pH..... 35
IV.4.6.3. Estabilidad a la luz UV.....35
IV.4.7. Determinación de la actividad antibiofilm de los bacteriófagos....36
IV.5. Análisis estadístico.....38
V. RESULTADOS.....39
V.1. Presentación y análisis de los resultados.....39
V.1.1. Perfil de resistencia de las cepas.....39
V.1.2. Aislamiento y detección de los bacteriófagos..... 39
V.1.3. Cuantificación de los bacteriófagos..... 40
V.1.4. Estabilidad fisicoquímica del bacteriófago..... 41
V.1.4.1. Estabilidad térmica..... 41
V.1.4.2. Estabilidad a la variación de pH..... 42
V.1.4.3. Estabilidad a la luz UV.....44
V.1.5. Determinación de la actividad antibiofilm de los bacteriófagos.....45
VI. DISCUSIÓN.....47
VII. CONCLUSIONES.....51
VIII. RECOMENDACIONES..... 52
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....53
X. ANEXOS..... 63

ABREVIATURAS

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- AHLs: Acil homoserina lactonas
- AMEs: Enzimas modificadoras de aminoglucósidos
- ATCC: *American Type Culture Collection*
- Bap: Proteínas asociadas al biofilm (*biofilm-associated proteins*)
- CDC: Caldo Doblemente Concentrado
- CpaA: Carbopeptidasa A
- CLSI: Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (*Clinical & Laboratory Standards Institute*)
- CMI: Concentración Mínima Inhibitoria
- DO: Densidad óptica
- DO_{NT}: DO del biofilm no tratado
- IAAS: Infecciones asociadas a la atención de la salud
- ITU: Infección del tracto urinario
- kDa: Kilodalton
- LPS: Lipopolisacárido
- MDR: Multidrogo-resistente (*multidrug-resistant*)
- MOI: Multiplicidad de infección (*multiplicity of infection*)
- NAV: Neumonía asociada al ventilador
- Omp: Porina de membrana externa (*outer membrane porin*)
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- PDR: Pandrogo-resistente (*pan drug resistant*)
- PetN: Fosfoetanolamina
- PNAG: poli-β-1,6-N-acetilglucosamina
- RND: Resistencia-nodulación-división
- SPE: Sustancia polimérica extracelular
- TSB: Caldo Tripticasa Soya
- TSA: Agar Tripticasa Soya
- UCI: Unidad de Cuidados Intensivos
- UFP: Unidad Formadora de Placas
- UV: Ultravioleta
- XDR: Extensamente resistente (*extensively drug resistant*)

RESUMEN

La resistencia bacteriana se ha incrementado con el paso del tiempo debido al uso indiscriminado de antibióticos, lo que ha ocasionado que las infecciones causadas por bacterias resistentes sean asociadas con una elevada mortalidad. *Acinetobacter baumannii* es considerado un patógeno crítico según la Organización Mundial de la Salud, debido a su multidrogo resistencia y a su frecuente asociación con infecciones nosocomiales.

El presente estudio tuvo como objetivo aislar y caracterizar bacteriófagos obtenidos de aguas residuales de un Hospital Materno Infantil de Lima Metropolitana, así como evaluar su actividad frente al biofilm de *A. baumannii* multidrogo-resistente. A partir de las muestras recolectadas se aisló un bacteriófago denominado vB_Aba, evidenciando la viabilidad de esta matriz. El fago mostró actividad lítica frente a cepas de *A. baumannii* multidrogo-resistente, y fue cuantificado por el método de doble capa.

En los ensayos de estabilidad fisicoquímica, el bacteriófago mostró estabilidad térmica a 50 °C, mientras que a 60 °C y 70 °C se observó una disminución marcada de su viabilidad. Asimismo, presentó mayor estabilidad a pH neutro, conservando también su estabilidad en condiciones ligeramente ácidas y alcalinas. La exposición a radiación ultravioleta evidenció una relación inversa entre el tiempo de exposición y viabilidad del bacteriófago, alcanzando su inactivación completa tras pocos minutos.

Finalmente, el bacteriófago vB_Aba demostró una marcada actividad disruptiva frente al biofilm maduro de *A. baumannii* multidrogo-resistente, alcanzando porcentajes de reducción cercanos al 99 % en comparación con el control.

Palabras clave: *Acinetobacter baumannii,* bacteriófago, biofilm, multidrogo resistencia, aguas residuales.

ABSTRACT

Bacterial resistance has increased over time due to the indiscriminate use of antibiotics, resulting in infections caused by resistant bacteria being associated with high mortality rates. *Acinetobacter baumannii* is considered a critical pathogen by the World Health Organization (WHO) because of its multidrug resistance and frequent association with healthcare-associated infections.

This study aimed to isolate and characterize bacteriophages obtained from wastewater from a maternal and child hospital in Metropolitan Lima, Peru, and to evaluate their activity against multidrug-resistant *A. baumannii* biofilms. A bacteriophage designated vB_Aba was isolated from the collected samples, demonstrating the suitability of this wastewater matrix as a source of bacteriophages. The phage exhibited lytic activity against multidrug-resistant *A. baumannii* strains, and its titer was determined using the double-layer agar method.

In physicochemical stability assays, the bacteriophage remained stable at 50 °C, whereas a marked decrease in viability was observed at 60 °C and 70 °C. It also exhibited greater stability at neutral pH while maintaining stability under slightly acidic and alkaline conditions. Exposure to ultraviolet (UV) radiation revealed an inverse relationship between exposure time and bacteriophage viability, with complete inactivation occurring after only a few minutes.

Finally, bacteriophage vB_Aba exhibited marked disruptive activity against mature multidrug-resistant *A. baumannii* biofilms, achieving biofilm reduction rates close to 99% compared with the control.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, bacteriophage, biofilm, multi-drug resistance, wastewater

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Planteamiento del problema

La resistencia bacteriana representa un importante problema de salud pública a nivel global pues las enfermedades infecciosas comunes dejan de responder ante los antibióticos convencionales (1), generando un incremento de la estancia hospitalaria del paciente, la adquisición de antibióticos más costosos y una elevada mortalidad de los pacientes principalmente hospitalizados (2). Esta se presenta a menudo en las Infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS), generando neumonías adquiridas en el hospital, infecciones del tracto urinario y bacteriemia (3), afectando principalmente a pacientes inmunocomprometidos y hospitalizados (4). En los hospitales, estos patógenos están expuestos a agentes estresantes que les permiten generar mecanismos para subsistir, donde pueden adquirir múltiple resistencia a antibióticos (5,6). Por otro lado, la resistencia bacteriana puede estar determinada por factores socioeconómicos como la frecuencia, tipo y uso indiscriminado de antibióticos, así como su aplicación en la industria alimentaria y vegetal y su presencia ambiental (1,7).

Debido a esta problemática, la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó las bacterias de mayor amenaza a la salud humana en tres categorías, basándose en la urgencia de desarrollar nuevos antibióticos para enfrentarlas (7,8). *Acinetobacter baumannii* pertenece a la categoría de prioridad crítica debido a que presenta cepas multidrogo-resistentes (MDR), resistentes a los carbapenémicos, que causan enfermedades infecciosas complicadas (1,9). Las infecciones generadas por esta bacteria solían ser tratadas con antibióticos como ampicilina, gentamicina, carbenicilina o ácido nalidíxico; pero debido a su pérdida de eficacia, actualmente se opta por administrar carbapenémicos, aminoglucósidos, cefalosporinas de amplio espectro o combinaciones de inhibidores de la betalactamasa con un antibiótico (10).

Los mecanismos de resistencia que desarrolla *A. baumannii* incluyen la modificación de la diana terapéutica, presencia de bombas de eflujo múltiples, degradación enzimática de fármacos, etc. (11). Sin embargo, el desarrollo de biofilms le proporciona cien veces más resistencia a los antibióticos en comparación con las bacterias planctónicas (12) por lo que la infección por bacterias formadoras de biofilm puede mantenerse posterior al uso de antibióticos (13). Además, *A. baumannii* puede formar biofilms en superficies bióticas y abióticas, por ejemplo, en dispositivos médicos como los respiradores artificiales que pueden infectar al paciente mediante su uso continuo (11,12).

Es por ello que las aguas residuales hospitalarias se vuelven de gran interés en esta investigación, pues constituyen un gran reservorio de microorganismos donde se hallan bacterias patógenas resistentes y ocurre una transmisión horizontal de genes de resistencia (14), además de haberse encontrado agentes biológicos que sirvan de alternativa terapéutica como bacteriófagos (15).

Por lo desarrollado anteriormente, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿los bacteriófagos aislados a partir de aguas residuales de un Hospital Materno Infantil de Lima Metropolitana presentarán actividad disruptiva frente al biofilm de *A. baumannii* MDR?

I.2. Objetivos

I.2.1. Objetivo general

Evaluar la actividad disruptiva de bacteriófagos obtenidos de aguas residuales de un Hospital Materno Infantil de Lima Metropolitana frente al biofilm de cepas de *A. baumannii* MDR.

I.2.2. Objetivos específicos

1. Aislar bacteriófagos a partir de aguas residuales hospitalarias, con actividad lítica frente a cepas de *A. baumannii* MDR.

2. Caracterizar los bacteriófagos aislados mediante la evaluación de su estabilidad térmica, tolerancia a variaciones de pH y exposición a la luz ultravioleta (UV).

3. Determinar la actividad disruptiva de los bacteriófagos aislados, a diferentes concentraciones, sobre el biofilm maduro de *A. baumannii* MDR.

I.3. Importancia y alcance de la investigación (justificación)

Según la OMS, la resistencia a los antimicrobianos se ha convertido en una de las principales amenazas globales para la salud. Las bacterias resistentes muestran una alta incidencia de infecciones en el tracto urinario, en la sangre y a nivel gastrointestinal (16). El Instituto Nacional de Salud señala que la resistencia a los antimicrobianos ocurre de manera natural, pero viene siendo acelerada por la automedicación causada por una falta de conciencia en la población sobre la resistencia bacteriana (17). Uno de los responsables es *A. baumannii,* ya que la resistencia global a antibióticos como los carbapenems alcanzó el 54,3 % (1). En Perú, esta bacteria presenta una alta tasa de infecciones, siendo así que para el año 2019, el porcentaje de *A. baumannii* resistente a carbapenem en el Perú se halló entre 50 y 60 % (7,18).

A. baumannii MDR muestra gran relevancia clínica, pues a pesar de que *Pseudomonas aeruginosa* también es una bacteria patógena crítica determinada por la OMS (1), la cantidad de infecciones por *A. baumannii* MDR es muy superior a esta (10). Por otro lado, esta problemática demostró gran relevancia durante la pandemia de COVID-19, periodo en el cual se registraron brotes de infecciones respiratorias secundarias asociadas al virus SARS-CoV-2, en los que *A. baumannii* MDR se identificó como un agente patógeno implicado (19).

Frente a la gran problemática que representa A. *baumannii* MDR, resurge la necesidad de utilizar a los bacteriófagos (o fagos) como

agentes terapéuticos (20). Los fagos tienen la capacidad de infectar a bacterias específicas, donde pueden proliferar y generar lisis celular (13). Algunos presentan baja especificidad (rango de hospedero más amplio) (21), y otros alta especificidad, los cuales tienen gran utilidad terapéutica ya que infectan solo bacterias específicas que pueden estar causando una infección, sin dañar otras células del paciente, por tanto, no presentando efectos adversos (22).

Los fagos son virus ubicuos que se encuentran en donde haya presencia de bacterias que le sirven de hospederas (22). Las aguas residuales, como resultado de la actividad rutinaria en los mismos, contienen restos orgánicos (como antibióticos) e inorgánicos, que las vuelve el medio propicio para el desarrollo de bacterias MDR y fagos (23).

Frente a lo expuesto, la resistencia de *A. baumannii* a los antibióticos y su capacidad para formar biofilm requiere vías alternativas para su erradicación. En este contexto, las aguas residuales hospitalarias constituyen una matriz de interés para la búsqueda y aislamiento de bacteriófagos con potencial actividad frente a *A. baumannii* MDR. El estudio de estos bacteriófagos permite explorar el potencial de esta matriz como fuente de agentes con actividad antibiofilm, así como realizar estudios posteriores de secuenciación genómica de los fagos para evaluar su potencial terapéutico, permitiendo optimizar el desarrollo de estrategias para el control y erradicación del biofilm de *A. baumannii* MDR.

I.4. Limitaciones de la investigación

La presente investigación encuentra limitaciones en la falta de acceso a recursos como la microscopía electrónica de transmisión, la cual permitiría realizar una identificación taxonómica del bacteriófago aislado, así como visualizar la estructura del biofilm posterior a la acción del bacteriófago.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

II.1. Marco teórico

II.1.1. *Acinetobacter baumannii*

II.1.1.1. Generalidades

Esta bacteria taxonómicamente pertenece a la familia Moraxellaceae y al género *Acinetobacter*. Es una bacteria Gram-negativa, presenta morfología de cocobacilo, y sus colonias son de apariencia mucoide y grisácea (2). No forma esporas, no tiene movilidad, es catalasa positiva, oxidasa negativa, no fermentativa y presenta metabolismo aerobio estricto (2, 24).

Es parte del grupo “ESKAPE”, donde están incluidas seis bacterias patógenas con gran relevancia clínica por la alta prevalencia de infecciones antibiótico-resistentes (9,25).

II.1.1.2. Importancia clínica

La adquisición de una infección por microorganismos MDR como *A. baumannii* puede darse por el uso reciente de antimicrobianos de amplio espectro, por la reciente hospitalización mayor a 5 días (26), uso de catéteres o cirugía reciente. Se conoce su flujo en los hospitales, sin embargo, hay información escasa de su circulación externa a estos (25).

Esta bacteria puede estar presente como parte del complejo *Acinetobacter calcoaceticus* / *Acinetobacter baumannii* (ACB), el cual es clínicamente relevante pues afecta a pacientes en estado crítico o a inmunocomprometidos (25). Tiene la capacidad de adherirse a superficies del ambiente hospitalario (dispositivos médicos, almohadas, colchones, sábanas)

y sobrevivir a pesar de las condiciones adversas (2, 25). Su ratio de mortalidad alcanza el 60 % en población vulnerable, donde se puede presentar neumonía y bacteriemia (25), así como meningitis, endocarditis, e infecciones del tracto urinario (ITUs) (11,19).

Puede encontrarse y aislarse en el tracto respiratorio, sangre, piel y heridas. Además, puede generarse una infección secundaria con *A. baumannii* MDR en pacientes infectados por SARS-COV-2, situación observada durante la pandemia de COVID-19 (19).

II.1.1.3. Mecanismos de resistencia antimicrobiana

- **Inactivación enzimática de antibióticos**: Las enzimas hidrolíticas betalactamasas son la principal defensa de *A. baumannii* contra los antibióticos betalactámicos (24). Los genes AmpC β-lactamasa y OXA-51 ofrecen actividad intrínseca pero limitada contra estos antibióticos (2). Sin embargo, pueden adquirir otros genes en sus plásmidos como los de las betalactamasas clase D que codifican enzimas contra los carbapenémicos (25). Por otro lado, se presenta resistencia a los aminoglucósidos mediante la producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AMEs), alterando un grupo funcional y disminuyendo su afinidad por los ribosomas (24).
- **Bombas de eflujo**: la sobreexpresión de bombas de eflujo está relacionada con la resistencia a múltiples antibióticos; por ejemplo, AdeABC se relaciona con los carbapenémicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos. AbeS le confiere resistencia a algunos macrólidos (24).

- **Reducción de la permeabilidad de la membrana externa**: El ingreso de los aminoglucósidos se ve limitado por la pérdida de la permeabilidad de la membrana (27).
- **Modificación del sitio diana**: Se presenta debido a mutaciones en las enzimas objetivas de estos fármacos como las fluoroquinolonas, perdiéndose afinidad por la ADN girasa y ADN topoisomerasa IV (24). En el caso de los aminoglucósidos, la producción de la enzima 16S ARNr metilasa alteran el sitio de unión del aminoglucósido a la subunidad ribosomal (24). Las polimixinas pierden eficacia cuando la bacteria genera fosfoetanolamina (PetN), que se une al lípido A de la membrana externa y altera su estructura (24).
- **Transferencia horizontal de genes**: se encontraron genes de enzimas como las AMEs dentro de los integrones de *A. baumannii* (24).
- **Tolerancia asociada al biofilm:** La resistencia a los antimicrobianos es mil veces superior en los biofilms que en bacterias planctónicas (19).

La resistencia a antibióticos puede presentarse de forma natural o adquirida; la última puede ocurrir mediante dos procesos: mutaciones en el ADN de la bacteria durante la replicación celular o mediante la transferencia horizontal de genes, que incluye: transformación (captura de ADN extracelular), transducción (inyección de ADN almacenado en un fago) o conjugación (transferencia del ADN a través de poros en las bacterias) (8).

II.1.1.4. Factores de virulencia

- **Producción de biofilm y quorum sensing**. El biofilm es el principal factor de virulencia de *A. baumannii,* pues le confiere resistencia a la desecación, a la respuesta inmune y a los antibióticos (2,9). Las proteínas BapAb y el exopolisacárido poli-β-1,6-N-acetilglucosamina (PNAG) participan en la formación de la matriz en respuesta a las condiciones adversas (2). Su formación se ve regulada por el Quorum sensing (que ocurre gracias a la transferencia horizontal de genes), donde se encuentran involucradas las acil homoserina lactonas (AHLs) (2,20).

- **Cápsula:** está compuesta por unidades compactas de azúcar que genera una barrera contra condiciones adversas como sequedad, antimicrobianos y respuestas inmunes como la fagocitosis; lo cual le permite mayor persistencia e infecciones más graves (24,28).

- **Lipopolisacárido**: Es el principal componente de la membrana externa, y su antígeno O-polisacárido puede promover la adherencia a las células hospederas (24,28).

- **Porinas**: La principal porina de membrana externa, OmpA, está involucrada en la invasión celular y apoptosis, ya que se une a la superficie de la célula hospedera e induce su muerte celular (24).

- **Motilidad**: *A. baumannii* realiza una motilidad espasmódica, que consiste en movimientos de extensión y retracción por medio de sus pili tipo IV (12,19). Además, algunas cepas pueden desplazarse

mediante una motilidad asociada a la superficie, donde participan los pili tipo IV, el quorum sensing, entre otros (24).

- **Sistemas de adquisición de hierro**: Puede utilizar sideróforos para el transporte de hierro (11) y posee proteínas para la captura directa de hierro como FecA y FecI. Esta bacteria evade la calprotectina, una proteína del sistema inmune que compleja metales divalentes (24,29). Se ha demostrado que la concentración de hierro influye en la formación de biofilm y la resistencia a los antibióticos (28).

II.1.2. Biofilms bacterianos

II.1.2.1. Características y composición del biofilm

Un biofilm bacteriano está compuesto principalmente de agua (hasta 97 %) (30) y de microorganismos que producen una matriz de sustancia polimérica extracelular (SPE): polisacáridos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (19,30). La matriz de SPE permite la adhesión entre células y a la superficie, la cual se modifica según las necesidades de la bacteria; además brinda protección contra los agentes antimicrobianos, desecación, radiación UV, alta presión y alta salinidad (30,31).

II.1.2.2. Etapas del desarrollo del biofilm

Ocurre un contacto inicial reversible de las bacterias planctónicas a la superficie biótica o abiótica (ocurre una adhesión más rápida a superficies hidrofóbicas como plástico, que hidrofílica como acero inoxidable). Luego la matriz de SPE fija la adhesión inicial, dando lugar a la formación de microcolonias.

La maduración del biofilm ocurre cuando se genera una mejor estructura y se forma dependiente de la fuente de nutrientes, donde ocurre la comunicación entre bacterias (19). También se generan espacios intersticiales que funcionan como un sistema de transporte de agua y nutrientes (19,31).

Las bacterias sésiles vuelven a entrar en modo móvil (proceso de dispersión) debido a la escasez de nutrientes, de oxigenación, acumulación de toxinas y la disolución de su matriz debido a enzimas sacarolíticas (12,19).

II.1.2.3. Factores que influyen en la formación del biofilm

Las cepas clínicas de *A. baumannii* forman biofilms más fuertes que las cepas ambientales. El desarrollo de este en una superficie abiótica favorece la resistencia antibiótica y la expresión de factores de virulencia como OmpA, pili tipo I, Bap, Omp CaO, entre otros (19). Por otro lado, en una superficie biótica requiere de pili mediado por chaperona-acomodador (19,25).

La alta concentración de nutrientes puede impedir la formación de biofilm, pues no favorece la competitividad entre bacterias, necesaria para su agregación (28).

Otros factores que intervienen son la temperatura, osmolaridad, concentración de hierro, luz, glucosa (12,19), porosidad de la superficie (28), entre otros.

II.1.2.4. Relevancia clínica del biofilm de *A. baumannii*

El biofilm de esta bacteria se encuentra asociada con infecciones relacionadas a los dispositivos médicos como catéteres urinarios, catéteres venosos centrales y tubos endotraqueales (32), así como a condiciones

inflamatorias crónicas como la prostatitis, cistitis, fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva y también infecciones en la piel (33). La formación de biofilm de cepas clínicas es superior a la de las cepas ambientales (28).

II.1.3. Bacteriófagos

II.1.3.1. Generalidades

Los bacteriófagos (o fagos) fueron descubiertos por Twort y d'Herelle en 1919, donde fueron brevemente utilizados y desplazados por los antibióticos después de 1940 (34,35). Son los microorganismos que más predominan en el ecosistema, presentan una alta especificidad a su hospedero, por lo cual no afecta a la flora comensal (36), sin embargo, debido a que actúan sobre receptores específicos, pueden verse limitados a actuar sobre distintas cepas patógenas (10). Suelen medir 20-200 nm y presentan una cápside que contiene el genoma de ADN o ARN de una cadena o doble (37).

II.1.3.2. Mecanismos de infección

Los fagos principalmente presentan un ciclo de infección lítica, que empieza con este adhiriéndose a la pared celular y luego insertando su genoma, esta acción conduce a la síntesis de nuevos viriones que se terminan liberando con la lisis de la bacteria (37). Por otro lado, el ciclo lisogénico consiste en la incorporación del genoma del fago en el genoma bacteriano o en plásmidos (38), denominándose profrago, sin generar que la bacteria sea lisada y replicándose en sincronía con el genoma bacteriano hasta que sea desencadenado por estrés externo (37,39). Es posible

convertir este ciclo lisogénico en lítico removiendo los genes involucrados en la lisogenia (38).

II.1.3.3. Factores que afectan a los bacteriófagos

Los fagos pueden verse alterados por la luz ultravioleta, pues inactiva partículas de los fagos, induce la fase lisogénica, ralentiza el crecimiento de los fagos sobrevivientes, estimula la recombinación genética (40) y presenta acción mutagénica (cambios en el ADN) rompiendo bases de timina (41); algunos efectos son reversibles (40). Los virus con un genoma más grande y de cadena doble son más susceptibles a sufrir mayor daño por la mayor cantidad de bases objetivas (42).

La temperatura es un factor crítico, pues mientras se observará menor concentración de fagos a altas temperaturas por la modificación de las proteínas del fago (43); por otro lado, la estructura cristalina del hielo destruye a los fagos a una temperatura bajo 0 °C (41).

Además, los fagos pueden verse afectados por el pH, pues puede existir una disociación de la cápside por un exceso de iones (41).

Por otro lado, la concentración de iones como los de calcio puede ser necesaria para la inyección del ácido nucleico en el huésped bacteriano (41).

II.1.3.4. Resistencia bacteriana a los fagos

La resistencia que se presenta a los bacteriófagos es menor que a los antibióticos (28). Entre los mecanismos que los fagos presentan para generar resistencia se encuentran las vesículas de la membrana externa (VME) actúan como la principal línea de defensa contra los fagos, pues estos pueden inyectar su material genético

en las vesículas, impidiendo que ingrese al citoplasma y se multiplique. También puede ocurrir la ruptura del material inyectado o que la bacteria bloquee el receptor por la sobreproducción de exopolisacáridos o proteínas de unión (20,38).

II.1.4. Aguas residuales como reservorio de bacteriófagos

Las aguas residuales presentan especial interés para la obtención de bacteriófagos, ya que reciben efluentes de distinta procedencia, los cuales pueden contener una alta carga de diversos microorganismos (37), así como también sustancias orgánicas e inorgánicas propicias para la proliferación de estos (23). Se considera que las aguas residuales son uno de los principales puntos de recepción y posesión de genes de resistencia antibiótica debido a que contienen grandes cantidades de bacterias resistentes que realizan una transferencia horizontal mediante la conjugación (2,21,37).

En un contexto hospitalario se evidencia gran presencia de antibióticos, contribuyendo a que las bacterias adaptativas desarrollen resistencia al verse expuestas a estos agentes (14). Dado que la viabilidad de los bacteriófagos depende estrictamente de la presencia de su hospedero específico, las aguas residuales hospitalarias constituyen una matriz con una alta probabilidad de aislamiento de fagos con actividad lítica frente a *A. baumannii* MDR (9,21,44).

II.2. Antecedentes del estudio

Las enfermedades infecciosas son causadas por microorganismos con la capacidad de infectar a un huésped y proliferar dentro del mismo, afectando su estado de salud (45). Cuando la exposición al microorganismo genera una infección dentro de los centros de salud, se les denomina nosocomiales (46), las cuales afectan principalmente a pacientes inmunodeprimidos (4). La administración de antibióticos de

forma indiscriminada generó el desarrollo de cepas resistentes (26), que podría traducirse en un mayor desarrollo de biofilm como mecanismo de supervivencia ante factores de estrés (35). Entre las bacterias oportunistas productoras de biofilm más relevantes se encuentran *P. aeruginosa* y *A. baumanii* (13).

Acinetobacter baumannii es una bacteria oportunista asociada a infecciones nosocomiales debido al uso de dispositivos médicos, siendo más frecuente en pacientes hospitalizados que dependen de un ventilador mecánico (46), por lo que durante mucho tiempo los carbapenems fueron la terapia de primera línea para su tratamiento, hasta que se observó el desarrollo de cepas resistentes (47). En Perú, según lo reportado por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en el año 2010, la resistencia que *A. baumannii* presentó a meropenem fue de 51 %. Esta resistencia se encuentra asociada a cepas MDR (47,48), lo cual se demostró al realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana frente a antibióticos administrados en hospitales, observándose resistencia a ciprofloxacino, cefepime, amikacina (18,48), ceftriaxona, gentamicina, piperacilina- tazobactam, imipenem, meropenem (48), ceftazidima y rifampicina (18).

Quispe *et al.* (45) evaluaron la prevalencia de *A. baumannii* MDR en el Hospital Nacional Ramiro Priale Priale, Huancayo, durante el periodo 2012 a 2019. Evidenciaron una prevalencia de *A. baumannii* MDR de más del 90 % durante los últimos tres años abordados en el estudio; hallando una prevalencia de 0,5 % de cepas extensamente resistentes (XDR), dentro de las cuales principalmente se trataba de *A. baumannii*. Así mismo, el 65,9 % de cepas de *A. baumannii* presentó resistencia a los carbapenems.

Levy-Blitchtein *et al.* (49) evaluaron la presencia de cepas de *A. baumannii* en hospitales de Lima durante el periodo 2014-2016. Las muestras biológicas utilizadas fueron aspirado bronquial, sangre, orina, líquido cefalorraquídeo. Mediante pruebas de susceptibilidad antibacteriana, evidenciaron alta resistencia frente a antibióticos como

ceftazidima, levofloxacino, piperacilina/tazobactam (98,8 %), cefepima (97,5 %), tetraciclina (80 %), gentamicina (63,8 %), entre otros; clasificándolas como MDR, además de una cepa pandrogo-resistente (PDR).

Castillo *et al*. (18) determinaron bacteriemia por *A. baumannii* productor de oxacilinasa en hospitales de Lima mediante el aislamiento de *Acinetobacter spp.*, a partir de cinco hospitales de Lima, contando con un total de 112 muestras para aislamiento, de los cuales 79 muestras (70,5 %) fueron identificadas como *A. baumannii*, las cuales fueron sometidas a pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por medio de la concentración mínima inhibitoria (CMI), resultando que más del 50 % de los aislamientos de *A. baumannii* fueron resistentes a ceftriaxona, ciprofloxacino, amikacina, gentamicina, meropenem e imipenem.

Sisakthpour *et al*. (48) demostraron el potencial terapéutico de los bacteriófagos contra las infecciones por *A. baumannii* MDR en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) de hospitales universitarios médicos de Isfahán, a los cuales se les realizó el antibiograma para conocer la resistencia a los antibióticos a amikacina, cefepime, ceftazidima, ciprofloxacino y rifampicina. Los fagos fueron aislados a partir de aguas residuales del Hospital General Alzahra y el aislamiento y purificación se realizó mediante el método de doble capa. La caracterización de los fagos incluyó su estabilidad al pH, la temperatura y el cloroformo; además se evaluó su rango de hospedero. Se determinó que la concentración de fagos fue eficaz de forma similar para los valores de multiplicidad de infección (MOI) 1; 0,1 y 0,01.

Ndiaye et al. (22) evaluaron la actividad antibiofilm de fagos aislados a partir de aguas residuales ambientales en Dakar, Senegal, contra *A. baumanni*i XDR clínicos. Se obtuvieron fagos a una concentración de 10^{10} UFP/mL, uno de los fagos presentó halo y el otro no. Se evaluó su estabilidad a la temperatura y pH, perdiendo viabilidad en pH 3 y 12, y a temperaturas mayores a 55 °C. Se utilizó el método de tinción con cristal violeta en microplaca, donde se indujo la formación de biofilm

por 24 h, y posteriormente se incubó con fagos a MOI 1 y 10 durante 24 h. Se concluye que ambos MOI lograron disminuir significativamente el biofilm, aunque hubo más eficacia con MOI 1.

Baginska *et al*. (50) evaluaron la actividad lítica de fagos aislados de distintas fuentes hídricas en Polonia sobre *A. baumannii* MDR clínicas. Se obtuvieron 18 fagos inicialmente, sin embargo, el análisis genético identificó que se trataba de 12 fagos individuales, de los cuales 11 fueron temperados y solo 1 lítico. El único fago lítico presenta zonas de lisis grandes y halos bien marcados, además de una morfología muy distinta a los demás. El MOI óptimo varió entre las distintas cepas de fagos desde 0,001 hasta 10, logrando obtener concentraciones de desde 10^6 UFP/mL hasta 10^8 UFP/mL.

Vukotic *et al*. (9) evaluaron el tratamiento con dos fagos activos contra las cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenems; los fagos fueron obtenidos de aguas residuales de la ciudad de Belgrado. Mediante el spot test se evaluó la dinámica de los halos formados con el paso del tiempo para determinar la presencia de fagos o en su defecto, despolimerasas. Para evaluar la actividad antibiofilm de los fagos, se indujo la formación de biofilm en microplacas, que luego fueron teñidos con cristal violeta para cuantificarlo mediante su absorbancia; posterior al tratamiento con fagos a MOI 0,1 y 100 durante seis horas, se evidenció gran disminución en el recuento de células viables concluyendo que ambos fagos lograron lisar el biofilm de *A. baumannii*.

Erol *et al*. (51) evaluaron el efecto de los fagos de forma individual y en combinación con colistina sobre el biofilm maduro de *A. baumannii*. Los fagos fueron aislados de fuentes hídricas ambientales de Ankara, Turquía. Se indujo la formación de biofilms en microplacas para luego llevarse a un enfrentamiento con la combinación de fagos y el cóctel de fagos con antibióticos, cada uno fue distribuído en alícuotas de 200 uL en cada pocillo de la microplaca, posteriormente fueron evaluados en distintos periodos de incubación (6, 24 y 48 horas). Se concluye que la

sinergia entre fagos y antibióticos presenta una inhibición superior del biofilm en comparación al uso individual de antibióticos.

Grygorcewicz *et al*. (10) evaluaron la actividad antibiofilm de la terapia combinada de antibióticos con un cóctel de bacteriófagos en *A. baumannii* MDR. Las cepas fueron aisladas de ITUs en la Universidad Médica Pomerania de Polonia, y los fagos a partir de distintas muestras ambientales. La evaluación de la CMI y la prueba de susceptibilidad a antibióticos fue basada en el CLSI, donde se notó que el 40 % de las cepas fue resistente a meropenem. Se determinó la actividad antibiofilm mediante el ensayo de cristal violeta en microplaca, incubando la cepa por 24 horas para inducir la formación de biofilm, y luego el tratamiento con fagos individuales y en coctel durante 6 horas. Se demostró que el 60 % de cepas fueron fuertes productoras de biofilm. El coctel de cinco fagos combinado con sulfametoxazol demostró la mayor reducción del biofilm.

II.3. Glosario de términos

- **Actividad disruptiva del bacteriófago:** Capacidad del bacteriófago para penetrar, desestructurar y romper la matriz de polisacáridos del biofilm, logrando así la lisis de las células bacterianas sésiles (28).
- **Bacteria oportunista**: Es aquella bacteria que aprovecha e infecta un organismo con el sistema inmune debilitado (52).
- **Bacteria planctónica**: Es aquella bacteria que vive flotando libremente en medios acuosos (53).
- **Bacteriófago**: Son partículas virales infecciosas que pueden invadir y matar una bacteria específica a través del ciclo lítico (38).
- **Biofilm (biopelícula)**: Es una comunidad de microorganismos adherida a una superficie biótica o abiótica que se encuentra rodeada de una matriz de SPE, además son fisiológicamente distintas de las células planctónicas (11).
- **CMI**: Es la concentración más baja de antibiótico que puede inhibir la bacteria después de incubarla (54).
- **Densidad óptica:** Es el logaritmo negativo de la transmitancia, que es la fracción de la luz detectada al atravesar una cubeta que contiene una muestra (55).
- **Factor de virulencia:** Permite que la bacteria pueda generar infecciones y sobreviva bajo condiciones ambientales estresantes (24).
- **Fase exponencial**: Etapa del crecimiento microbiano donde las células se dividen a velocidad constante y máxima. Se presenta una alta uniformidad fisiológica, y su tasa de crecimiento se estabiliza. (53)
- **Halo**: Manifestación macroscópica de la actividad despolimerizante de los bacteriófagos (9).
- **Infección nosocomial**: Es aquella infección adquirida dentro de un hospital u otro establecimiento clínico (53).
- **Lipopolisacárido**: El lipopolisacárido es un componente de la pared celular involucrado en la permanencia en el suero humano, además de provocar una respuesta proinflamatoria (24).

- **MOI**: La multiplicidad de infección es la proporción de partículas de fagos respecto a células bacterianas en un volumen dado (21).
- **MDR**: Es la resistencia a 3 o más clases de antimicrobianos (49).
- **PDR**: Es la resistencia a toda clase de antimicrobiano (49).
- **Placa de lisis**: Placa transparente y visible a los ojos generada por la infección lítica del fago en la bacteria (37).
- **Prevalencia**: Cantidad de veces que se encuentra determinada condición en una población en un momento determinado (56).
- **Quorum sensing**: Es un tipo de comunicación entre bacterias para mantener la densidad poblacional (2,19).
- **Rango de hospedero**: Habilidad de un bacteriófago de infectar distintas bacterias o cepas (38).
- **Sideróforos**: Cinco grupos de moléculas quelantes de hierro de alta afinidad (24).
- **UFP**: Es una partícula de fago infecciosa, que se presenta visible como una placa de lisis en un cultivo bacteriano en medio sólido (57).
- **Viabilidad de bacteriófagos**: Capacidad de las partículas fágicas para conservar su infectividad y producir placas de lisis (57,58).
- **XDR**: Es la resistencia a todas las clases de antimicrobianos, excepto a dos o menos (25,49).

III. HIPÓTESIS Y VARIABLES

III.1. Hipótesis

- **H_1**: Los bacteriófagos obtenidos a partir de aguas residuales de un Hospital Materno Infantil de Lima Metropolitana presentan actividad disruptiva sobre el biofilm de *A. baumannii* MDR.
- **H_0**: Los bacteriófagos obtenidos a partir de aguas residuales de un Hospital Materno Infantil de Lima Metropolitana **no** presentan actividad disruptiva sobre el biofilm de *A. baumannii* MDR.

III.2. Variables

- **Variable independiente:** Concentración de bacteriófagos de *Acinetobacter baumannii* MDR
- **Variable dependiente**: Densidad del biofilm de *Acinetobacter baumannii* MDR

III.3. Operacionalización de variables

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIÓN	INDICADOR	TÉCNICA DE ANÁLISIS	UNIDAD DE MEDIDA
Concentración de bacteriófagos de *A. baumannii* MDR (VI: variable independiente)	Virus específicos de *A. baumannii* MDR que se replican e infectan a esta cepa bacteriana. Actúan solo sobre este objetivo y no dañan la microflora normal del huésped (59).	Cantidad de bacteriófagos aislados a partir de las aguas residuales de un Hospital Materno Infantil de Lima Metropolitana, que se replican e infectan en cepas de *A. baumannii* MDR, y que fueron purificados, cuantificados y evaluados en su estabilidad fisicoquímica.	Aislamiento de bacteriófagos	Presencia de bacteriófagos	Spot test	Presencia/ ausencia de placa de lisis
			Purificación y cuantificación de bacteriófagos	Cantidad de Unidades Formadoras de Placas (UFP)	Método de doble capa	UFP/mL(*)
			Estabilidad a la variación de pH	Viabilidad de bacteriófagos frente a la variación de pH	Método de doble capa	UFP/mL (expresado como % de viabilidad)
			Estabilidad térmica	Viabilidad de bacteriófagos frente a la variación de temperatura	Método de doble capa	UFP/mL (expresado como % de viabilidad)
			Estabilidad a la luz UV	Viabilidad de bacteriófagos frente a la variación del tiempo de exposición a la luz UV	Método de doble capa	UFP/mL (expresado como % de viabilidad)
Densidad del biofilm de *A. baumannii* MDR (VD: variable dependiente)	Cantidad de comunidad microbiana cubierta por una matriz de exopolisacáridos autosintetizada y generada sobre una superficie biótica o abiótica (11).	Cantidad de biofilm de *A. baumannii* MDR generado en micropocillos, que serán expuestos a distintas concentraciones de bacteriófagos para evaluar su actividad disruptiva sobre el biofilm.	Disrupción del biofilm	Densidad óptica (DO) (λ=570 nm) del cristal violeta extraído	Espectrofotometría UV-vis	Unidades de DO (expresado como % de reducción del biofilm)

(*) La concentración de bacteriófagos adicionalmente se ajustó a 3 distintas multiplicidades de infección (MOI): 0,1; 0,01 y 0,001 para evidenciar la proporción bacteriófagos:bacterias en los micropocillos durante la exposición sobre el biofilm.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Área de estudio

Las muestras de aguas residuales fueron recolectadas del Hospital Nacional Docente Madre-Niño “San Bartolomé”; Avenida Alfonso Ugarte N°825, Lima, Perú, coordenadas 12°2′59.28″ S, 77°2′31.19.
Por otro lado, la fase experimental se realizó en el Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

IV.2. Diseño de investigación

- Básico: busca enriquecer el conocimiento.
- Cuantitativo: los resultados son de carácter numérico.
- Experimental: se manipula el efecto de una VI sobre la VD.

IV.3. Población y muestra

- **Fase I:** Aislamiento y caracterización del bacteriófago:
  - **Población**: Aguas residuales de un Hospital Materno Infantil.
  - **Muestra**: 2 frascos de 500 mL.
  - **Unidad de estudio**: Bacteriófagos aislados.

- **Fase II**. Determinación de la actividad disruptiva de los fagos sobre el biofilm:
  - **Población**: Cepas de *A. baumannii* del cepario del Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
  - **Muestra**: Cepas escogidas de *A. baumannii* con perfil de multidrogo-resistencia.
  - **Unidad de estudio**: Biofilm maduro de *A. baumannii* MDR.

IV.4. Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de información

IV.4.1. Obtención de la cepa de *A. baumannii* MDR

Las cepas fueron obtenidas del cepario del Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, las cuales fueron aisladas a partir de muestras de pacientes de un hospital de Lima Metropolitana. Las cepas se mantuvieron refrigeradas en caldo TSB (Merck®) y glicerol a una temperatura de 4 °C bajo condiciones adecuadas.

IV.4.2. Perfil de resistencia de las cepas

Se accedió a los datos del perfil de resistencia antimicrobiana y se comprobó el carácter multidrogorresistente (MDR) de *A. baumannii* MDR, los cuales fueron obtenidos mediante el test de susceptibilidad antimicrobiana de acuerdo al CLSI M100, 35° ed (60). Este procedimiento consistió en utilizar un hisopo para tomar un inóculo a partir de TSB con cepa en fase exponencial, que luego se sembró en TSA, y se extendió en toda la superficie del agar Mueller-Hinton. Luego se expuso la cepa a discos con antibióticos para evaluar el halo de inhibición (60).

IV.4.3. Recolección de muestra de aguas residuales

La muestra de aguas residuales fue obtenida a partir de un Hospital Materno Infantil de Lima Metropolitana, con autorización institucional mediante el Oficio N°0447-OADI-2026/ CIEI-CI-HONADOMANI-SB. La recolección de la muestra se realizó en frascos de vidrio estériles con capacidad de 500 mL. Posteriormente a la recolección, una porción de la muestra fue empleada para determinar el rango de pH mediante tiras de papel indicador. Seguidamente la muestra fue transportada al laboratorio en condiciones de refrigeración evitando la exposición

a la luz y manteniendo la cadena de frío con geles de refrigeración para su posterior procesamiento (61).

IV.4.4. Aislamiento y detección de los bacteriófagos

Se centrifugó 50 mL de la muestra de aguas residuales a 4500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el sobrenadante se filtró a través de papel filtro 0,45 µm (Whatman®). Para el enriquecimiento de los bacteriófagos, se mezcló 50 mL del filtrado con CDC en una proporción 1:1 y se añadió una colonia de *A. baumannii* MDR. La mezcla fue incubada a 37 °C durante 24 h. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó y se filtró en viales estériles a través de una jeringa estéril con filtro bacteriológico de 0,22 µm (MS®) para remover completamente las bacterias (9,54).

Para la detección de los bacteriófagos se empleó la técnica del *Spot test, basada en* Kropinski *et al.* (57)*,* en una placa de agar nutritivo solidificado (1,5 %), mediante el remojo de un hisopo estéril, se agregó una suspensión de *A. baumannii* MDR en fase exponencial con un equivalente al estándar 0,5 de McFarland (preparada en un Densitómetro Biosan® DEN 1B), la cual fue distribuida en toda la superficie del agar. Luego se dejó secar por 10 minutos para llevarlo a incubación a 37 °C por 6 horas. Pasado el tiempo de incubación se colocó 5 µL del filtrado obtenido del aislamiento en tres puntos equidistantes, dejándolos reposar por 20 minutos antes de llevar a incubar a 37 °C por 18 horas (62, 57).

IV.4.5. Purificación y cuantificación de bacteriófagos

Se utilizó el método de doble capa, el cual consistió en colocar sobre una placa Petri el *underlay* (capa inferior) compuesto por agar nutritivo solidificado (1,5 %), al cual se le agregó el *overlay* (capa superior) (Figura 1). Esta última capa estuvo compuesta de agar nutritivo (0,5 %), 100 µL del filtrado de fagos en distintas

diluciones en suero fisiológico (desde 10^{-4} hasta 10^{-8}) y 100 µL de la suspensión de *A. baumannii* MDR en fase exponencial con un equivalente al estándar 0,5 de McFarland. Una vez vertido, se dejó en reposo secando durante 20 minutos y luego se llevó a incubar a 37°C por 18 horas (48,54).

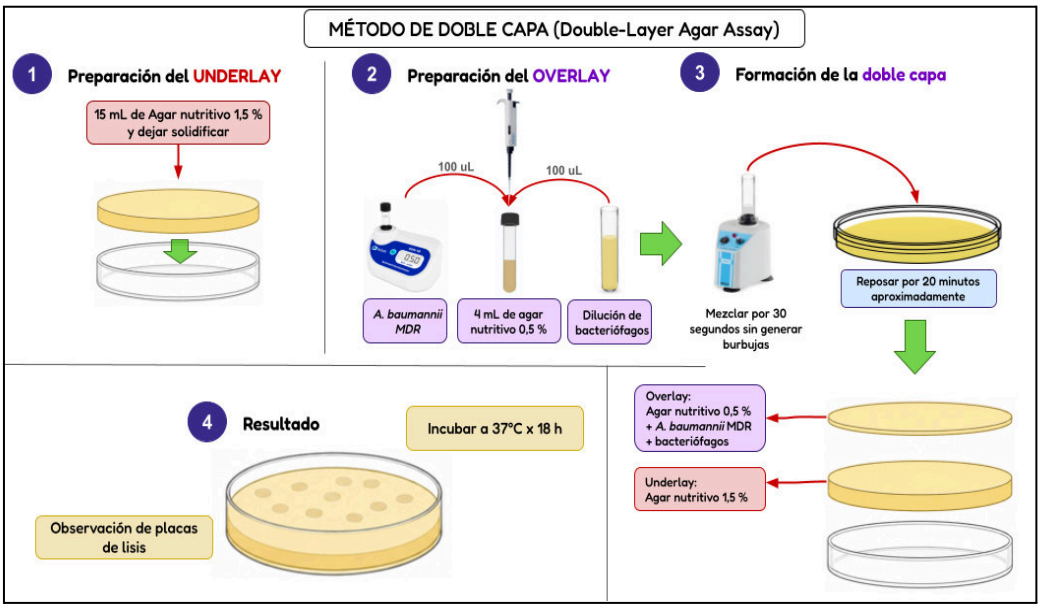


Figura 1. Diagrama del método de doble capa (Referencia propia).

La purificación fue realizada en la dilución que permitió observar de forma aislada distintas formas y tamaños de placas de lisis obtenidas en el primer doble capa realizado, donde se tomó la placa de lisis que presentó un halo más grande y traslúcido, y se inoculó en 5 mL de TSB (que contenía la cepa en suspensión), la cual fue incubada a 37 °C por 18 h. Se centrifugó y luego se filtró a través de una membrana de 0,22 µm para nuevamente realizar el método de doble capa, lo cual se repitió hasta la observación de una misma morfología de las placas de lisis (37,48).

Para la cuantificación, se realizó nuevamente la técnica de doble capa utilizando el fago purificado en una dilución que permita tener un rango contable de placas de lisis, abarcando desde dilución 10^{-4} hasta 10^{-7}. Los resultados se expresaron como unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mL) (40,48).

IV.4.6. Estabilidad fisicoquímica del bacteriófago

IV.4.6.1. Estabilidad térmica

El tratamiento térmico fue realizado por baño maría utilizando tubos TSB que contenían una dilución conocida del bacteriófago, los cuales fueron incubados a diferentes temperaturas (50 °C, 60 °C y 70 °C) a diferentes intervalos de tiempo (30 y 60 minutos). Pasado el tiempo de tratamiento, se retiraron y se llevaron a un baño de agua fría (4 °C), posteriormente se realizó la titulación de bacteriófagos mediante el método de doble capa utilizado en la cuantificación, en donde se empleó 100 µL de la dilución conocida de los bacteriófagos expuestos y 100 µL de la suspensión de *A. baumannii* MDR en fase exponencial sin exposición, así mismo, se utilizó como control positivo la dilución conocida de fagos que permitió tener un rango contable de placas de lisis (63).

IV.4.6.2. Estabilidad a la variación de pH

Se preparó diluciones conocidas de bacteriófagos en tubos con suero fisiológico, posteriormente fueron llevados a distintos pH (3, 6, 7 y 9), siendo ajustados con hidróxido de sodio 0,1 N o ácido clorhídrico 0,1 N según lo requerido. Se realizó el seguimiento de los valores utilizando un medidor multiparámetro de pH calibrado y verificado (63). Las diluciones preparadas y ajustadas fueron incubadas a 37 °C por 60 minutos. Se realizó la titulación de bacteriófagos mediante el método de doble capa descrito en la cuantificación, tomándose 100 µL de los tubos post-exposición a la temperatura y 100 µL de la suspensión de *A. baumannii* MDR en fase exponencial (41,63).

IV.4.6.3. Estabilidad a la luz UV

Se preparó una dilución de bacteriófagos conocida en suero fisiológico y se vertió 2,5 mL en placas Petri de vidrio. Estas fueron colocadas dentro de una cabina con lámpara de luz UV

(290 nm) a 30 cm de distancia de la lámpara durante 30, 60, 90 y 120 segundos (64). Posteriormente, se realizó el método de doble capa descrito en la cuantificación, tomando 100 µL de la dilución de fagos expuesta y 100 µL de una suspensión de *A. baumannii* MDR en fase exponencial (41,44).

Todos los resultados de estabilidad se expresaron como porcentaje (%) de viabilidad de los fagos después de la exposición a las distintas temperaturas, pH y tiempo bajo la luz UV; considerando la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad}(\%) = \frac{Concentración\ de\ fagos\ (\frac{UFP}{mL})_{post-exposición}}{Concentración\ de\ fagos\ (\frac{UFP}{mL})_{inicial}} \times 100$$

IV.4.7. Determinación de la actividad antibiofilm de los bacteriófagos

Con el objetivo de determinar la capacidad disruptiva del bacteriófago frente al biofilm maduro de *A. baumannii* MDR se utilizó el método de microtitulación de biofilm con cristal violeta basado en el método de Stepanovic *et al*. (65) con ligeras modificaciones (33,66,67).

Evaluación de la capacidad de formación de biofilm: Se determinó la capacidad de formación de biofilm de las cepas clínicas susceptibles al fago aislado, donde posteriormente solo se realizó el ensayo con las cepas que presentaron una capacidad de formación de biofilm de clasificación débil a fuerte, pero no aquellas no formadoras de biofilm. El criterio de clasificación está descrito en la Tabla 1, donde DOc es la densidad óptica de corte, definida como tres veces la desviación estándar por encima del promedio de la densidad óptica del control negativo; y DOb es el promedio de la densidad óptica del biofilm formado (65).

Tabla 1. Criterio de clasificación para la capacidad de formación de biofilm (65).

CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOFILM	
Fuerte	4 DOc < DO**b**
Moderado	2 DOc < DO**b** ≤ 4 DOc
Débil	DOc < DO**b** ≤ 2 DOc
No formador	DO**b** ≤ DOc

DOc: Densidad óptica de corte (control negativo). DOb: Densidad óptica del biofilm formado.

Preparación del inóculo bacteriano: Se llevó cada cepa de *A. baumannii* MDR en fase exponencial a un equivalente al estándar 0,5 de McFarland en TSB. Posteriormente, se dispensaron alícuotas de 150 µL de cada suspensión en microplacas estériles con base plana de 96 pocillos.

Formación del biofilm: Se emplearon dos microplacas estériles, una exclusivamente para la formación de biofilm y otra para evaluar la acción de los bacteriófagos en el biofilm ya formado. Como control negativo se emplearon 150 µL de TSB, con la finalidad de verificar la esterilidad durante todo el procedimiento. Por otro lado, como control positivo de referencia se empleó la cepa *A. baumannii* ATCC 19606 ajustada a la misma escala McFarland en TSB. Se indujo la formación de biofilm incubando las microplacas a 37 °C por 24 horas (66,67).

Cuantificación del biofilm: Para cuantificar el biofilm, se utilizó el método de tinción con cristal violeta (65). Una vez formado el biofilm, las microplacas se lavaron por triplicado con buffer fosfato salino (pH 7,4) para eliminar las células planctónicas no adheridas, luego se dejó secar por 30 minutos. Se realizó la fijación del biofilm con 200 µL de metanol durante 15 minutos, que posteriormente fue drenado, se dejó secar por 30 minutos. Se añadieron 250 µL de cristal violeta 0,1 % a los micropocillos con el

biofilm ya formado, dejando reposar durante 15 minutos, luego fueron lavados por triplicado con buffer fosfato salino y se dejó secar por 30 minutos. Se retiró el cristal violeta adherido al biofilm utilizando 250 µL de etanol 96° por pocillo, luego se agitó ligeramente para asegurar una extracción uniforme (66) y se realizó la lectura a 570 nm utilizando un lector de microplacas ELISA (Biobase-EL10A®) (54).

Tratamiento del biofilm: Se realizó el tratamiento del biofilm con distintas multiplicidades de infección de los bacteriófagos: MOI 0,1 equivalente a 1,8 x 10^7 UFP/mL; MOI 0,01 equivalente a 1,8 x 10^6 UFP/mL y MOI 0,001 equivalente a 1,8 x 10^5 UFP/mL. Se añadieron 150 µL de cada dilución sobre los pocillos con biofilm maduro y se dejaron incubando a 37 °C por 18 h. Transcurrido el tiempo de la acción bacteriolítica, el biofilm residual fue teñido con cristal violeta y posteriormente solubilizado para la determinación de la densidad óptica a 570 nm (22). Todos los ensayos se realizaron por quintuplicado.

La actividad de los bacteriófagos sobre el biofilm maduro se determinó en base a las lecturas de la densidad óptica del biofilm (CB) (formado en los micropocillos de la microplaca control), del control negativo (CN) y del grupo experimental tratado con fagos (GE), utilizando la siguiente ecuación (59):

$$\text{Disrupción del biofilm (\%)} = \frac{(\mathrm{DO_{CB}} - \mathrm{DO_{CN}}) - (\mathbf{DO_{GE}} - \mathrm{DO_{CN}})}{(\mathrm{DO_{CB}} - \mathrm{DO_{CN}})} \times 100$$

Por lo tanto, la disrupción del biofilm evalúa la diferencia entre la densidad del biofilm formado y la densidad del biofilm residual posterior a la exposición a los fagos.

IV.5. Análisis estadístico

Los datos de la densidad óptica del biofilm maduro de *A. baumannii* MDR expresados en respuesta a las distintas concentraciones de bacteriófagos (expresados como MOI 0,001; 0,01 y 0,1) y al grupo

control sin tratamiento fueron procesados en el software IBM SPSS Statistics v. 26. Se calcularon las medias y desviaciones estándar para cada condición experimental.

Los supuestos estadísticos se verificaron mediante la prueba de Shapiro-Wilk para la normalidad y el test de Levene para la homogeneidad de varianzas. Para comparar la reducción de la densidad óptica respecto al control y entre los diferentes MOI, se aplicó un análisis de varianza de una vía ANOVA, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Todos los análisis consideraron un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

V. RESULTADOS

V.1. Presentación y análisis de los resultados

V.1.1. Perfil de resistencia de las cepas

Las cepas de *A. baumannii* obtenidas del cepario del Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología "Marco Antonio Garrido Malo" son cepas clínicas que presentan resistencia a los carbapenems (imipenem, meropenem), fluoroquinolonas (levofloxacino, ciprofloxacino), aminoglucósidos (tobramicina, amikacina) y betalactámicos con inhibidores de betalactamasa (piperacilina-tazobactam, ampicilina-sulbactam). Estos perfiles encajan dentro de la categoría de multidrogo-resistencia según Magiorakos *et al*. (68).

V.1.2. Aislamiento y detección de los bacteriófagos

Las aguas residuales obtenidas del Hospital Materno Infantil fueron enfrentadas a 10 cepas clínicas de *A. baumannii* MDR, donde se logró aislar un único bacteriófago, al que se le denominó **vB_Aba**, correspondiente a la cepa bacteriana "**C19**". Mediante el método de *Spot test*, el fago aislado fue enfrentado a las demás cepas para ampliar el número de hospederos en el presente estudio, donde se observaron placas de lisis que demostraron actividad de vB_Aba sobre la cepa bacteriana "**C12**"; además se

utilizó la cepa *A. baumannii* ATCC 19606 y se verificó la capacidad lítica del fago sobre esta. En las tres cepas se observó la presencia de un halo alrededor de las placas de lisis (Figura 2). El almacenamiento de fagos se realizó en crioviales con glicerol al 15 % a una temperatura de -20 °C, manteniéndose protegidos de la luz.

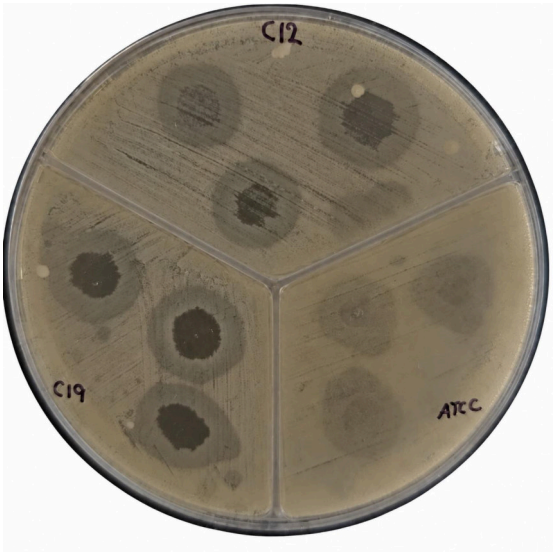


Figura 2. Spot test positivo de vB_Aba con presencia de halos en cepas de *A. baumannii.*

V.1.3. Cuantificación de los bacteriófagos

Se determinó la concentración de bacteriófagos aislados mediante la técnica de doble capa, donde el número de placas de lisis fue inversamente proporcional a la dilución de fagos inoculados. La dilución de fagos 10^{-6} permitió hacer el recuento de placas de lisis en el rango de 30 a 300 UFP (57), obteniéndose una concentración aproximada de $6x10^{8}$ UFP/mL tanto en C12 como en C19 (Figura 3).

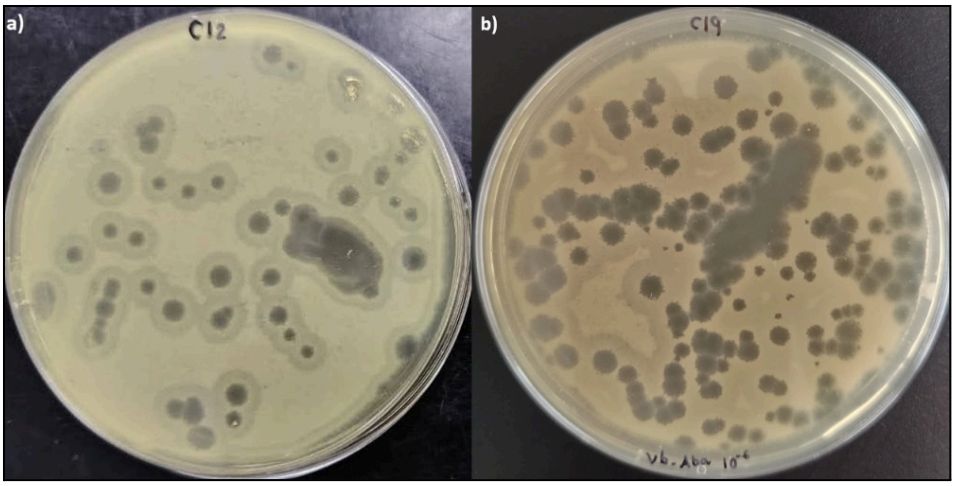


Figura 3. Placas de lisis observadas en la cuantificación de los bacteriófagos por el método de doble capa. a) C12 b) C19.

El tamaño de las placas de lisis observado a las 18 horas de incubación fue de 1-4 mm de diámetro, con una mediana de 3 mm. Por otro lado, las zonas de aclaramiento (halos) presentan diámetros de 5-11 mm, con una mediana de 7 mm. Además, se observó la expansión progresiva de estos halos con el transcurso del tiempo.

V.1.4. Estabilidad fisicoquímica del bacteriófago

V.1.4.1. Estabilidad térmica

La dilución preparada de los bacteriófagos C12 y C19 fue expuesta a variaciones en la temperatura, donde no se evidenciaron cambios notables entre los dos tiempos de exposición (30 y 60 minutos) a cada temperatura. A los 50 °C los fagos se mantuvieron muy estables en ambos tiempos, reduciendo su concentración entre 15-20 %; a los 60 °C disminuyó hasta casi un 80 %, y a los 70 °C se redujo hasta un 100 % (Figura 4 y 5).

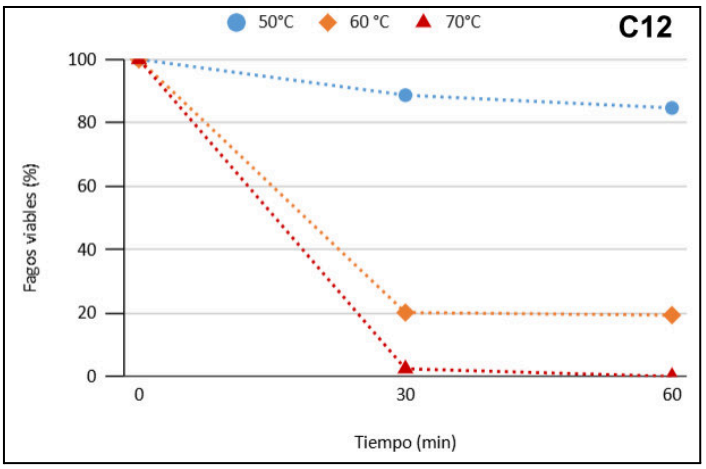


Figura 4. Estabilidad de vB_Aba en C12 a diferentes temperaturas (50, 60, 70 °C) en distintos tiempos (30, 60 minutos).

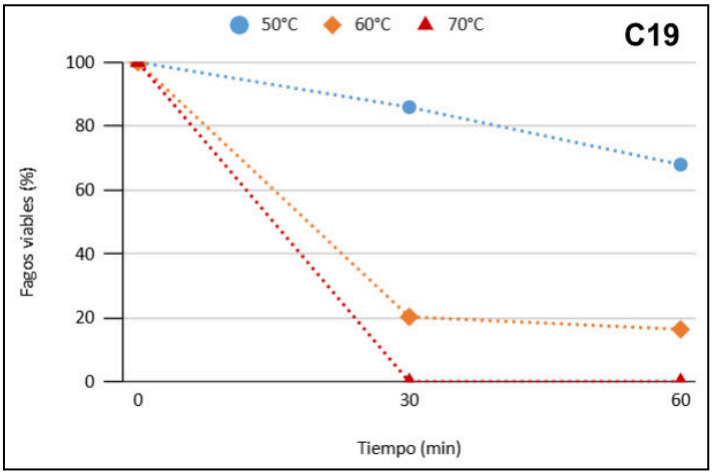


Figura 5. Estabilidad de vB_Aba en C19 a diferentes temperaturas (50, 60, 70 °C) en distintos tiempos (30, 60 minutos).

V.1.4.2. Estabilidad a la variación de pH

Al evaluar el bacteriófago vB_Aba a diferentes pH (3, 6, 7, 9) se observó que en *A. baumannii* MDR C12 mostró mayor estabilidad al pH que en la cepa C19, pues en los pH evaluados se mantuvo con mayor porcentaje de viabilidad. Se observó que en C12 como en C19 el mayor porcentaje de fagos se encontró en pH 7

(considerándose como 100 %), posteriormente se evidenció una ligera disminución en pH 6 y 9, y presentaron los valores más bajos en pH 3 (aproximadamente 60 % de viabilidad) (Figura 6).

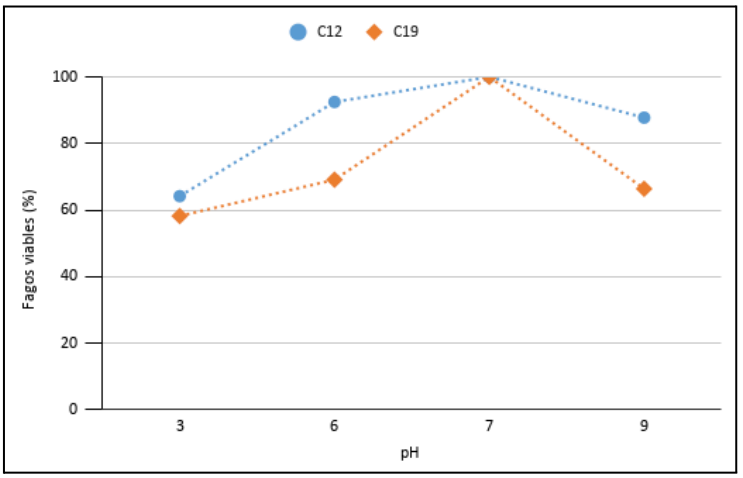


Figura 6. Estabilidad de vB_Aba en C12 y C19 a diferentes rangos de pH (3, 6, 7, 9).

Por otro lado, a los 5 días posteriores a la refrigeración de las placas evaluadas, se observó crecimiento de colonias sobre las placas de lisis en todos los pH evaluados de la cepa C12; sin embargo, estas no se observaron en la cepa C19 (Figura 7).

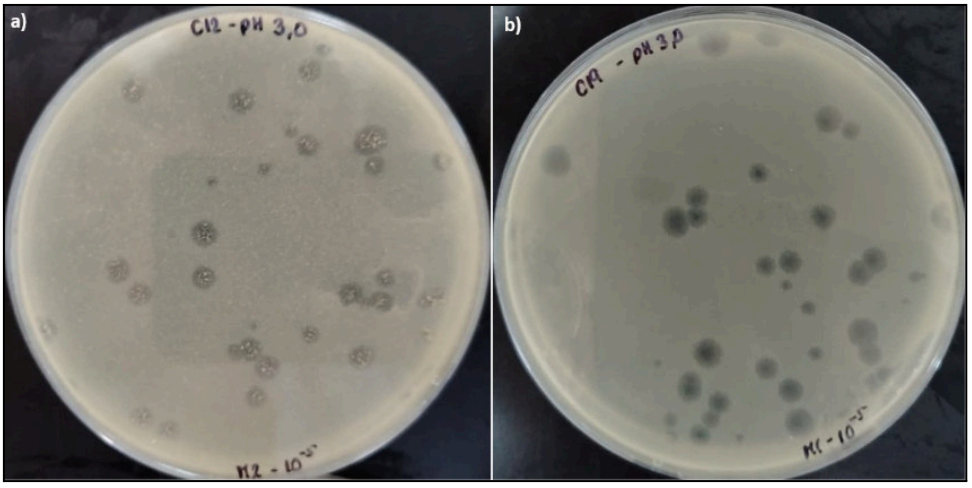


Figura 7. Apariencia de placas de lisis en placas refrigeradas del ensayo de estabilidad al pH. a) C12 b) C19.

V.1.4.3. Estabilidad a la luz UV

Del mismo modo, se evaluó la estabilidad de vB_Aba frente a la exposición a luz ultravioleta, evidenciando una correlación inversa entre el tiempo de exposición a la luz UV y el número de placas de lisis observadas, siendo así que a los 30 segundos de exposición se observó una reducción de aproximadamente 85 % de fagos, luego a los 60 segundos permaneció solo 1 % de fagos (Figura 8), y posterior a ello su inactivación total (Figura 9).

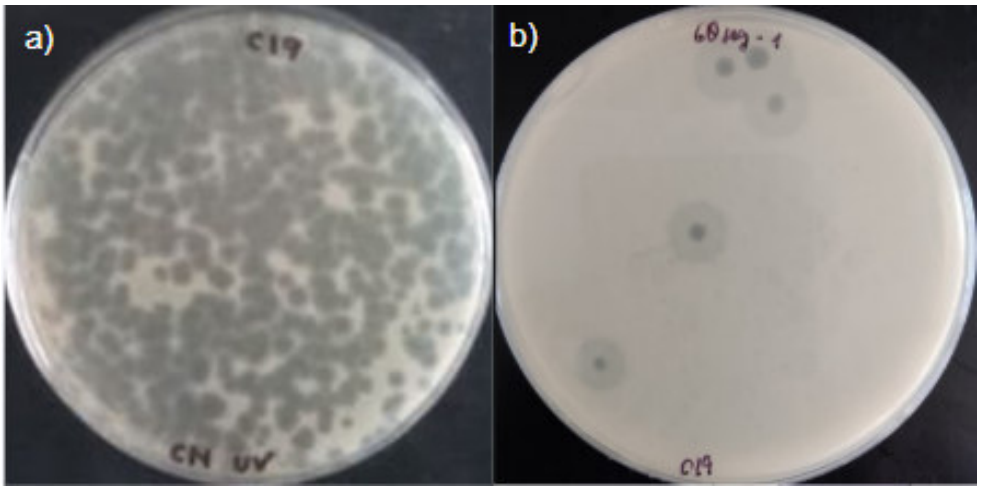


Figura 8. Estabilidad de C19 a la luz UV. a) Sin exposición b) Con 60 segundos de exposición.

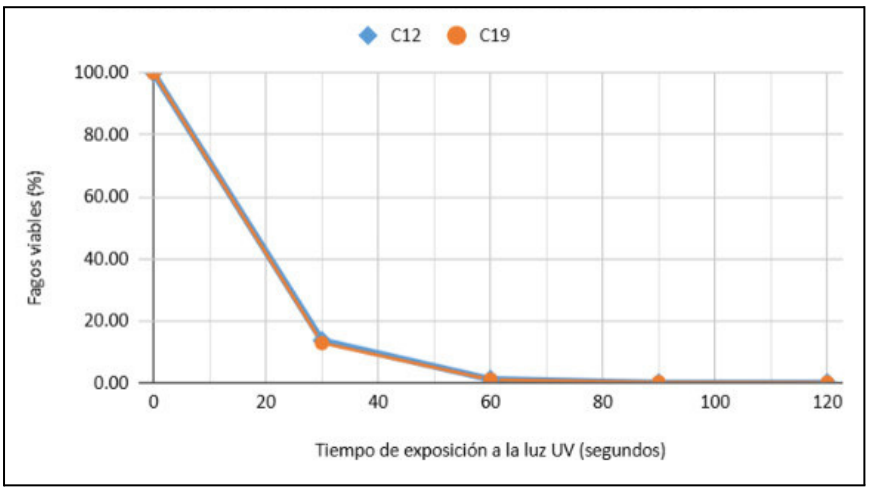


Figura 9. Estabilidad de vB_Aba en C12 y C19 frente a la exposición a la luz UV en distintos tiempos.

V.1.5. Determinación de la actividad antibiofilm de los bacteriófagos

La evaluación de la capacidad formadora de biofilm de las cepas en evaluación mostró que *A. baumannii* MDR C12 es una cepa no formadora de biofilm, por lo cual no continuó siendo utilizada en este ensayo; por otro lado, la cepa C19 mostró ser una fuerte formadora de biofilm, mostrando grandes halos adheridos a la pared de los pocillos (Figura 10). Además, se comprobó la robustez del método al observarse que *A. baumannii* ATCC 19606 es una fuerte formadora de biofilm, por encima de la capacidad de la cepa C19.

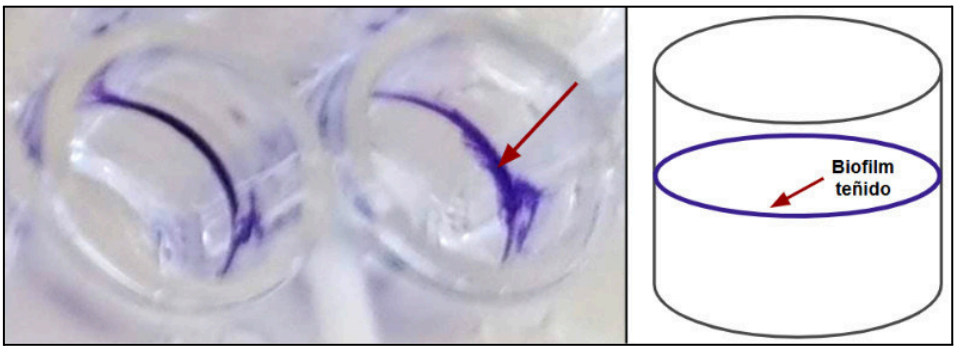


Figura 10. Formación de biofilm de C19 en microplaca luego de ser teñidos con CV 0,1 % y representación gráfica.

Al evaluar la actividad disruptiva del bacteriófago vB_Aba frente al biofilm maduro de *A. baumannii* MDR C19, utilizando los preparados con MOI: 0,001 (DO 0,072±0,007); 0,01 (DO 0,126±0,021) y 0,1 (DO 0,180±0,030), se observó que el tratamiento con MOI 0,001 mostró el mayor porcentaje de actividad disruptiva, reduciendo el 99,6 % del biofilm bacteriano. Se mantuvo un grupo control (sin tratamiento) para determinar la concentración inicial del biofilm maduro y evaluar las diferencias en la densidad óptica post-tratamiento, observándose una DO significativamente mayor a los pocillos tratados (Figura 11).

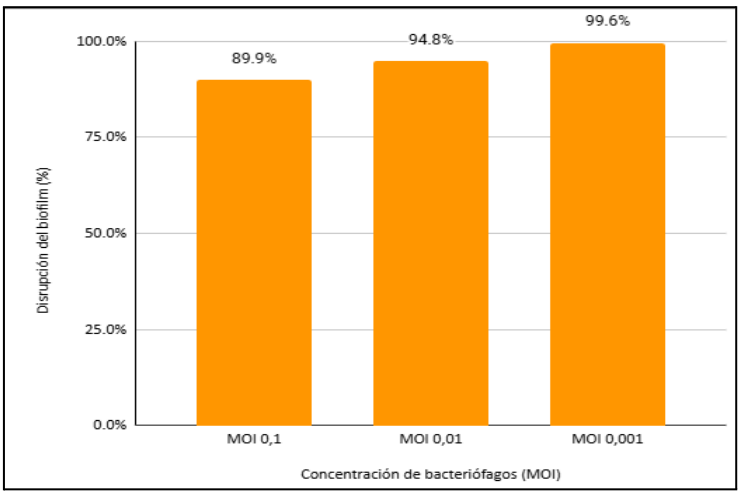


Figura 11. Porcentaje de disrupción de biofilm de *A. baumannii* MDR C19 por vB_Aba.

El análisis de varianzas (ANOVA) demostró que la exposición a las distintas concentraciones del bacteriófago reduce de manera significativa la densidad óptica del biofilm maduro de *A. baumannii* MDR ($F(2,12) = 31,15$; $p < 0,001$). Posteriormente, la prueba post-hoc de Tukey confirmó diferencias estadísticas significativas al comparar todas las multiplicidades de infección (MOI) entre sí. Al evaluar los tratamientos, el MOI 0,001 (DO: 0,072±0,007) exhibió la mayor capacidad de disrupción sobre el biofilm, superando al MOI 0,01 ($p = 0,005$) y al MOI 0,1 ($p < 0,001$) (ver Anexo 8). Este hallazgo demuestra que la menor dosis evaluada optimiza la cinética de lisis y la difusión del fago en la matriz de exopolisacáridos.

VI. DISCUSIÓN

Acinetobacter baumannii MDR es un patógeno oportunista asociado a infecciones nosocomiales, entre ellas la neumonía asociada a ventilación mecánica, con capacidad de colonización e invasión celular, favoreciendo su diseminación hacia diversos tejidos (69). A causa de estas características y a su perfil de multirresistencia, a lo largo del tiempo se han investigado métodos que ataquen específicamente a la cepa que no resulten perjudiciales con las células del huésped. Bajo este contexto, la terapia con bacteriófagos ha resaltado como una alternativa prometedora, ya que no se ha evidenciado citotoxicidad (70), lo que justifica la necesidad de evaluación e investigación.

La formación de placas de lisis observada en el spot test y ensayo de doble capa (Figura 2 y 3) evidenció la actividad lítica del bacteriófago aislado de aguas residuales hospitalarias, frente a cepas de *A. baumannii* MDR. Esta formación indica una interacción entre el bacteriófago y la cepa hospedera, lo cual es respaldado con lo presentado por Wintachai *et al.* (71). Se evaluó la actividad lítica del bacteriófago frente a 10 cepas clínicas de *A. baumannii* MDR, observándose que el bacteriófago vB_Aba pudo lisar únicamente a dos cepas de *A. baumannii* MDR C12 y C19, la cuales mostraron placas de lisis uniformes, de mayor tamaño y bien definidas. Caso contrario, las 8 cepas restantes no presentaron alteraciones en su crecimiento, lo cual evidencia la alta especificidad de los fagos, incluso dentro de la misma especie bacteriana. Esta especificidad guarda estrecha relación con las características de la pared celular bacteriana, que incluso puede ser modificada como mecanismo de defensa (72). El perfil de resistencia de las cepas C12 y C19 presenta bastante similitud, lo cual podría explicar el porqué ambas fueron susceptibles al mismo fago. Diversos estudios encontraron una asociación entre la resistencia bacteriana a ciertos antibióticos con la susceptibilidad a los fagos (73).

Según lo descrito en el presente estudio, las zonas de lisis se encontraron rodeadas por halos que crecieron de forma progresiva con el transcurrir del tiempo. Vukotic *et al.* (9) confirman este comportamiento en fagos aislados y

enfrentados contra *A. baumannii* en la expansión de halos de forma progresiva de 2 o 3 mm por día; la velocidad de esta expansión puede estar asociada a características particulares del bacteriófago, así como a la variabilidad genética de la cepa enfrentada. Además, demostraron que los halos más próximos a las zonas de lisis presentaron altas concentraciones de fagos, sin embargo, las zonas más distantes no presentaron ningún fago, quedando demostrado que los halos se expanden por la difusión pasiva de las enzimas (9).

Del mismo modo, Blasco *et al.* (33) describieron zonas de aclaramiento atribuidas a la actividad de enzimas como la despolimerasa en bacteriófagos contra *A. baumannii*. Esta propiedad enzimática permite degradar polisacáridos capsulares y la matriz extracelular (9), lo que potencia su eficacia frente a comunidades bacterianas organizadas en biofilm, al facilitar la interacción con los receptores específicos de la superficie bacteriana (28,71).

A pesar de que en el presente estudio no se realizó un análisis genómico, las características observas en las placas de lisis translúcidas sugieren que vB_Aba podría corresponder a un bacteriófago con ciclo lítico. Esta inferencia es consistente con lo reportado en estudios previos, como el realizado por Baginska *et al*., donde el único fago lítico aislado no presentó proteínas integrasas ni proteínas represoras CI, a diferencia de los demás fagos lisogénicos (50).

Diversas investigaciones han demostrado que los bacteriófagos pueden inactivarse o ver afectada su viabilidad por múltiples factores como la temperatura, pH y luz UV, las cuales fueron estudiadas en el presente trabajo durante periodos de tiempo progresivos. Se evidenció que vB_Aba se mantiene relativamente estable a una temperatura de 50 °C y 60 °C pero queda inactivado al 100 % cuando es expuesto por 1 h a 70 °C. Se ha demostrado que la exposición a altas temperaturas como 65 °C conlleva al desprendimiento del complejo de la cola del fago, ocasionando la eyección del material genético; además la exposición a temperaturas mayores como 80 °C puede conllevar a la desnaturalización de la cápside (74). Por lo

tanto, los resultados obtenidos son congruentes con la literatura, resaltando la importancia de evitar la exposición a altas temperaturas.

El pH es capaz de afectar la cápside de los bacteriófagos debido a su composición proteica, ya que se desnaturalizan a valores extremos de pH y el genoma queda expuesto a ser hidrolizado (75,76). La estabilidad al pH demostró que vB_Aba se encuentra relativamente estable en el rango de pH 6 a 9, pero menor viabilidad a pH 3 (ácido). Estas características de estabilidad le otorgan cierta viabilidad para ser utilizada como terapia fágica y ser administrada por vía oral pues no se verá muy comprometida por los distintos pH y temperaturas del tracto digestivo (22).

Baginska *et al.* (50) mencionan además que los bacteriófagos pueden ser afectados por desinfectantes, iones metálicos y la exposición a la luz UV. En el presente estudio se evidenció que la exposición del lisado de bacteriófago (10^4 UFP/mL) a la luz UV bajo las condiciones del ensayo, durante un tiempo superior a 1 minuto, tuvo como consecuencia la inactivación total del bacteriófago. Del mismo modo, Nayagam halló una inactivación total pasado el minuto de exposición a la luz UV (77). La luz ultravioleta tipo C (254 nm) tiene una potente actividad virucida debido a reacciones fotoquímicas en la cápside (por la densidad de aminoácidos aromáticos), envoltura y/o ácidos nucleicos de los virus (64,78). También se presenta distinta susceptibilidad a la luz UV debido a la estructura y longitud del genoma, donde se sabe que los ácidos nucleicos monocatenarios y de mayor longitud son más susceptibles que los bicatenarios y de menor longitud (64). Es por ello que deben mantenerse cubiertos de la luz para evitar su degradación.

En relación con los resultados obtenidos, se observó una diferencia marcada en la capacidad de formación biofilm entre las dos cepas de *A. baumannii* MDR analizadas, a pesar de pertenecer a la misma especie, presentar perfiles de resistencia similares y una respuesta comparable ante el bacteriófago vB_Aba. Estas diferencias pueden estar asociadas al origen clínico de los aislamientos. En este sentido la cepa C19, obtenida de secreción bronquial, mostró una alta capacidad de formación de biofilm,

mientras que la C12, aislada de sangre, presentó una capacidad significativamente menor.

Este resultado coincide con lo reportado por estudios previos, como el descrito por Ahmad I *et al.* (79), quienes señalan que la variabilidad en la capacidad de formación de biofilm entre cepas clínicas de *A. baumannii* puede atribuirse a diferencias genéticas que regulan la expresión de factores asociados a la adhesión y producción de matriz extracelular. Entre estos factores destaca pili Csu, el cual ha sido descrito como un determinante importante en la adhesión a células epiteliales y en las etapas iniciales de formación de biofilm.

La formación de biofilm representa un factor de gran relevancia clínica, ya que dificulta la erradicación bacteriana al limitar la penetración de antibióticos y la acción del sistema inmunológico del huésped. Como se describió previamente, la observación de halos en placa confirma la actividad despolimerasa de los bacteriófagos aislados. Estos resultados, en conjunto con los obtenidos en la evaluación de densidad óptica en el ensayo de micropocillos, evidenciaron la actividad del bacteriófago frente a biofilms de *A. baumannii* MDR. Este efecto podría atribuirse a la capacidad del bacteriófago para penetrar y desestructurar un biofilm previamente formado, así como la inhibición del crecimiento bacteriano, lo que impediría la formación de la biopelícula (32). Ambos mecanismos resultan ser de suma relevancia desde el punto de vista terapéutico, teniendo en consideración que el biofilm constituye un factor de virulencia de suma importancia, debido a su asociación a complicaciones clínicas mayores.

Se debe de tener en consideración la pérdida de susceptibilidad bacteriana al bacteriófago con el paso del tiempo (Figura 7), fenómeno que puede explicarse por la adquisición de resistencia mediada por modificaciones en los receptores bacterianos involucrados en la infección fágica (38). Bajo este contexto, diversos estudios sugieren el uso de bacteriófago como agentes sensibilizadores de antibióticos o como agentes moduladores de virulencia, más que como agentes bactericidas (51). La sinergia de bacteriófagos y antibióticos ha demostrado un efecto beneficioso en la

eliminación del biofilm de *Acinetobacter baumannii*, según lo reportado por Grygorcewicz *et al*. (10). No obstante, los autores señalan que concentraciones elevadas de antibióticos podrían destruir las bacterias localizadas en la superficie del biofilm, lo que potencialmente limitaría la penetración y propagación del bacteriófagos hacia las capas más profundas del biofilm.

Es importante resaltar que, aunque las cepas C12 y C19 se comporten de forma similar con relación al fago vB_Aba y presenten un muy parecido perfil de resistencia bacteriana, la C12 resultó ser no formadora de biofilm y la C19 una fuerte formadora de biofilm. Esta capacidad puede ser explicada por el origen de la muestra clínica y características genéticas propias.

Además, el MOI con mayor actividad disruptiva frente al biofilm maduro de *A. baumannii* fue el MOI 0,001. Según lo realizado por Orozco *et al*., no hallaron diferencias significativas en la disrupción del biofilm utilizando distintos MOI (3) para un mismo bacteriófago aislado; no obstante, según lo hallado por Baginska *et al*., el MOI óptimo fue muy distinto utilizando distintos bacteriófagos contra la misma cepa (50). Este hallazgo sugiere que el MOI óptimo puede variar considerablemente incluso entre bacteriófagos que infectan al mismo hospedero (28), lo que resalta la importancia de la determinación experimental de este parámetro.

VII. CONCLUSIONES

- Se aisló un bacteriófago que fue denominado vB_Aba, a partir de la muestra de aguas residuales de un hospital Materno Infantil de Lima Metropolitana, el cual presentó actividad lítica sobre las cepas C12 y C19 de *A. baumannii* MDR.

- Los fagos demostraron ser estables a la exposición a 50 °C pero inestables en 60 y 70 °C; así mismo demostraron tener mayor estabilidad a pH 7, pero la menor estabilidad a pH 3 (ácido); en cuanto a la exposición UV se demostró una correlación inversa, donde a mayor tiempo de exposición se presentó un menor recuento de placas de lisis, alcanzando la completa eliminación a los 2 minutos.

- Se confirmó la actividad disruptiva de los bacteriófagos frente al biofilm de *A. baumannii* MDR, donde todos los MOI evaluados (0,1; 0,01 y 0,001) redujeron el biofilm maduro. Sin embargo, la menor concentración de fagos evaluada (MOI 0,001) redujo el biofilm en mayor porcentaje (99 %) en comparación al control negativo. Se demuestra que los fagos aislados a partir de aguas residuales representan una alternativa potencial para el control y erradicación de *A. baumannii* MDR.

VIII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda someter el lisado de fagos a estudios de microscopía electrónica de transmisión, para poder observar la morfología y tamaño de los bacteriófagos, además realizar su secuenciación genómica, para confirmar su tipo de ciclo e identificar los genes involucrados en la actividad lítica y posteriormente clasificarlos según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV).

- Para utilizar los bacteriófagos aislados con fines terapéuticos, se debe realizar su estabilidad para almacenamiento a largo plazo, conocer su rango de hospedero frente a más cepas de *A. baumannii* y otras especies bacterianas, así como estudios clínicos para determinar su seguridad en los pacientes.

- En cuanto al biofilm bacteriano, es importante discriminar la totalidad de la actividad de los fagos sobre este mediante estudios de metabolismo bacteriano, recuento de células viables post-tratamiento y observación al microscopio electrónico de transmisión.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud (OMS). Resistencia a los antibióticos [Internet]. 2020 [citado el 6 de setiembre del 2025]. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibióticos.
2. Ahuatzin-Flores OE, Torres E, Chávez-Bravo E. *Acinetobacter baumannii*, a Multidrug-Resistant Opportunistic Pathogen in New Habitats: A Systematic Review. Microorganisms. 2024;12(4):644. doi: 10.3390/microorganisms12040644
3. Orozco AK, González JP, Quiñones B, Castro N, Valdez JB, Chaidez C. Bacteriophage Indie resensitizes multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* to antibiotics in vitro. Sci Rep. 2025;15(1):11578. doi: 10.1038/s41598-025-96669-1
4. Liu JY, Dickter J. Nosocomial Infections: A history of Hospital-Acquired Infections. Gastrointest Endosc Clin N Am. 2020;30(4):637–52 doi:10.1016/j.giec.2020.06.001
5. Despotovic A, Milosevic B, Milosevic I, Mitrovic N, Cirkovic A, Jovanovic S, *et al*. Hospital-acquired infections in the adult intensive care unit-Epidemiology, antimicrobial resistance patterns, and risk factors for acquisition and mortality. Am J Infect Control. 2020;48(10):1211-5. doi: 10.1016/j.ajic.2020.01.009
6. Moffa L, Tana C. Healthcare-Associated Infections (HAIs) in the Elderly: Molecular Mechanisms of Immunosenescence and Clinical, Nutritional and Therapeutic Implications. Int J Mol Sci. 2025;26(19):9649. doi: 10.3390/ijms26199649
7. Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles G, Gray A, *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. Lancet. 2022;399(10325):629-55. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0
8. Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. Pathogens. 2021;10(10):1310. doi: 10.3390/pathogens10101310

9. Vukotic G, Obradovic M, Novovic K, Di Luca M, Jovcic B, Fira D, *et al*. Characterization, Antibiofilm, and Depolymerizing Activity of Two Phages Active on Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Front Med. 2020;7:426. doi: 10.3389/fmed.2020.00426
10. Grygorcewicz B, Wojciuk B, Roszak M, Łubowska B, Błażejczak P, Jursa-Kulesza J, *et al*. Environmental Phage-Based Cocktail and Antibiotic Combination Effects on *Acinetobacter baumannii* Biofilm in a Human Urine Model. Microbial Drug Resistance. 2021(27);1:25-35. doi: 10.1089/mdr.2020.0083
11. Gedefie A, Demsis W, Ashagrie M, Kassa Y, Tesfaye M, Tilahun M, *et al*. *Acinetobacter baumannii* Biofilm Formation and Its Role in Disease Pathogenesis: A Review. Infect Drug Resist. 2021;14:3711-9. doi: 10.2147/IDR.S332051
12. Upmanyu K, Haq QMR, Singh R. Factors mediating *Acinetobacter baumannii* biofilm formation: Opportunities for developing therapeutics. Curr Res Microb Sci. 2022;3:100131. doi: 10.1016/j.crmicr.2022.100131
13. Pallee S, Chandra KS, Kushneet KS, Surya JN, Singh DK. Biofilms: Understanding the structure and contribution towards bacterial resistance in antibiotics. Medicine in microecology. 2023;16:100084. doi: 10.1016/j.medmic.2023.100084
14. Męcik M, Stefaniak K, Harnisz M, Korzeniewska E. Hospital and municipal wastewater as a source of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in the environment: a review. Environ Sci Pollut Res. 2024;31(36):48813-38. doi: 10.1007/s11356-024-34436-x
15. Parra B, Sandoval M, Arriagada V, Amsteins L, Aguayo C, Opazo-Capurro A, *et al*. Isolation and Characterization of Lytic Bacteriophages Capable of Infecting Diverse Multidrug-Resistant Strains of *Pseudomonas aeruginosa*: PaCCP1 and PaCCP2. Pharmaceuticals. 2024;17(12):1616. doi: 10.3390/ph17121616
16. World Health Organization (WHO). Global antibiotic resistance surveillance report 2025: WHO Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) - Summary [Internet]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2025 [citado el 13 de octubre del

2025]. Disponible en: https://www.who.int/publications/i/item/9789240116337

17. Instituto Nacional de Salud (INS). INS presenta la situación actual de la Resistencia Microbiana y Salud Pública en el Perú en una nueva jornada académica de sus viernes científicos [Internet]. 2023 [citado el 16 de octubre del 2025]. Disponible en: https://www.gob.pe/institucion/ins/noticias/790661-ins-presenta-situacion-actual-de-la-resistencia-microbiana-y-salud-publica-en-el-peru-en-una-nueva-jornada-academica-de-sus-viernes-cientifi
18. Castillo Y, Nieto C, Astocondor L, Jacobs J, Garcia C. Bacteriemia por *Acinetobacter baumannii* productor de oxacilinasa en hospitales de Lima, Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2019;36(2):364-6. doi: 10.17843/rpmesp.2019.362.4152
19. Perez S, Innes GK, Walters MS, Mehr J, Arias J, Greeley R, *et al*. Increase in Hospital-Acquired Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection and Colonization in an Acute Care Hospital During a Surge in COVID-19 Admissions — New Jersey, February–July 2020. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2020;69:1827-31. doi: 10.15585/mmwr.mm6948e1
20. Tu Q, Pu M, Li Y, Wang Y, Li M, Song L, *et al*. *Acinetobacter Baumannii* Phages: Past, Present and Future. Viruses. 2023;15(3):673. doi: 10.3390/v15030673
21. Klai N, Sellamuthu B. Bacteriophages isolated from hospital wastewater and its role in controlling drug-resistant pathogens. En: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Amsterdam: Elsevier; 2020. p. 327-76. doi: 10.1016/B978-0-12-819722-6.00010-9
22. Ndiaye I, Debarbieux L, Sow O, Ba B, Diagne M, Cissé A, *et al*. Characterization of two Friunavirus phages and their inhibitory effects on biofilms of extremely drug resistant *Acinetobacter baumannii* in Dakar, Senegal. BMC Microbiol. 2024;24(1):449. doi: 10.1186/s12866-024-03608-7
23. Alharbi NM, Ziadi MM. Wastewater as a fertility source for novel bacteriophages against multi-drug resistant bacteria. Saudi J Biol Sci. 2021;28(8):4358-64. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.04.025

24. Ayoub C, Hammoudi D. Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. Antibiotics. 2020;9(3):119. doi: 10.3390/antibiotics9030119
25. Nocera FP, Attili AR, DeMartino L. *Acinetobacter baumannii*: Its Clinical Significance in Human and Veterinary Medicine. Pathogens. 2021;10(2):127. doi: 10.3390/pathogens10020127
26. Plata-Menchaca EP, Ferrer R. Current treatment of nosocomial pneumonia and ventilator-associated pneumonia. Rev Esp Quimioter. 2022;35(Suppl 3):25-29. doi: 10.37201/req/s03.06.2022
27. Reina R, León C, Garnacho J. Treatment of *Acinetobacter baumannii* severe infections. Med Intensiva (Engl Ed). 2022;46(12):700-10. doi: 10.1016/j.medine.2022.08.007
28. Grygiel I, Bajrak O, Wójcicki M, Krusiec K, Jończyk E, Górski A, *et al*. Comprehensive Approaches to Combatting *Acinetobacter baumannii* Biofilms: From Biofilm Structure to Phage-Based Therapies. Antibiotics. 2024;13(11):1064. doi: 10.3390/antibiotics13111064
29. Ibrahim S, Al-Saryi N, Al-Kadmy IMS, Aziz SN. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. Mol Biol Rep. 2021;48(10):6987-6998. doi: 10.1007/s11033-021-06690-6 .
30. Srinivasan R, Santhakumari S, Poonguzhali P, Geetha M, Dyavaiah M, Xiangmin L. Bacterial Biofilm Inhibition: A Focused Review on Recent Therapeutic Strategies for Combating the Biofilm Mediated Infections. Front Microbiol. 2021;12:676458. doi: 10.3389/fmicb.2021.676458
31. Torres-Boncompte J, Sanz-Zapata M, Garcia-Llorens J, Soriano J, Catalá-Gregori P, Sevilla-Navarro S. In Vitro Insights into the Anti-Biofilm Potential of *Salmonella Infantis* Phages. Antibiotics. 2025;14(8):744. doi: 10.3390/antibiotics14080744
32. Shahed-Al-Mahmud M, Roy R, Sugiokto FG, Islam MN, Lin MD, Lin LC, *et al*. Phage φAB6-Borne Depolymerase Combats *Acinetobacter baumannii* Biofilm Formation and Infection. Antibiotics (Basel). 2021;10(3):279. doi: 10.3390/antibiotics10030279
33. Blasco L, Bleriot I, Gonzales de Aledo M, Fernandez-García L, Pacios O, Oliveira H, *et al*. Development of an Anti-*Acinetobacter baumannii*

Biofilms Phago Cocktail: Genomic Adaptation to the Host. Antimicrob Agents Chemother. 2022;66(3):e01923-21. doi: 10.1128/aac.01923-21

34. LaVergne S, Hamilton T, Biswas B, Kumaraswamy M, Schooley RT, Wooten D. Phage Therapy for a Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Craniectomy Site Infection. Open Forum Infect Dis. 2018;5(4):ofy064. doi: 10.1093/ofid/ofy064
35. Zhang F, Cheng W. The Mechanism of Bacterial Resistance and Potential Bacteriostatic Strategies. Antibiotics (Basel). 2022;11(9):1215. doi: 10.3390/antibiotics11091215
36. Tan Y, Su J, Fu M, Zhang H, Zeng H. Recent Advances in Phage-Based Therapeutics for Multi-Drug Resistant *Acinetobacter baumannii*. Bioengineering. 2023;10(1):35. doi: 10.3390/bioengineering10010035
37. Runa V, Wenk J, Bengtsson S, Jones BV, Lanham AB. Bacteriophages in Biological Wastewater Treatment Systems: Occurrence, Characterization, and Function. Front Microbiol. 2021;12:730071. doi: 10.3389/fmicb.2021.730071
38. Kaur G, Agarwal R, Sharma RK. Bacteriophage Therapy for Critical and High-Priority Antibiotic-Resistant Bacteria and Phage Cocktail-Antibiotic Formulation Perspective. Food Environ Virol. 2021;13:433-46. doi: 10.1007/s12560-021-09483-z
39. Batinovic S, Wassef F, Knowler SA, Rice D, Stanton C, Rose J, *et al*. Bacteriophages in Natural and Artificial Environments. Pathogens. 2019;8(3);100. doi: 10.3390%2Fpathogens8030100
40. Adams MH. Bacteriophages. New York: Interscience Publishers. 1959. p.65, 511
41. Mutai IJ, Juma AA, Inyimili MI, Nyachieo A, Nyamache AK. Efficacy of diversely isolated lytic phages against multi-drug resistant *Enterobacter cloacae* isolates in Kenya. Afr J Lab Med. 2022;11(1):1673. doi: 10.4102/ajlm.v11i1.1673
42. Horton L, Torres AE, Narla S, Lyons AB, Kohli I, Gelfand JM, *et al*. Spectrum of virucidal activity from ultraviolet to infrared radiation. Photochem Photobiol Sci. 2020;19(10):1262-70. doi: 10.1039/d0pp00221f

43. Kering KK, Zhang X, Nyaruaba R, Yu J, Wei H. Application of Adaptive Evolution to Improve the Stability of Bacteriophages during Storage. Viruses. 2020;12(4):423. doi: 10.3390/v12040423
44. Mahmoud ES, Taha RM, Bassyouni RH, Ahmed FA, Samhan FA. Isolation and characterization of lytic bacteriophages specific for antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii.* Labyrinth: Fayoum Journal of Science and Interdisciplinary Studies. 2023;1(2):55-64. doi: 10.21608/ifjsis.2023.228796.1035
45. Quispe-Pari F, Kong-Paravicino C, Eguiluz M, Hurtado-Alegre J, Acosta J. Prevalencia de bacterias multidrogoresistentes en un hospital público ubicado en la sierra del Perú. An Fac Med. 2023;84(2):177-85. doi: 10.15381/anales.v84i2.24951
46. Arista-Olvera NX, Lozano-Nuevo JJ, García-López VH, Narváez-Rivera JL, Garro-Almendaro AK, Zamora-Cervantes LE, *et al*. Infección nosocomial por *Acinetobacter* y su efecto en un hospital de segundo nivel. Med Interna Mex. 2019;35(4):477-84. doi: 10.24245/mim.v35i4.2368
47. Labarca JA, Salles MJC, Seas C, Guzmán-Blanco M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. Crit Rev Microbiol. 2016;42(2):276–92. doi: 10.3109/1040841X.2014.940494
48. Sisakhtpour B, Mirzaei A, Karbasizadeh V, Hosseini N, Shabani M, Moghim S. The characteristic and potential therapeutic effect of isolated multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* lytic phage. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2022;21(1):1. doi: 10.1186/s12941-022-00492-9
49. Levy-Blitchtein S, Roca I, Plasencia-Rebata S, Vicente-Taboada W, Velásquez-Pomar J, Muñoz L, *et al*. Emergence and spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* international clones II and III in Lima, Peru. Emerging Microbes & Infections. 2018;7(1):1-9. doi: 10.1038/s41426-018-0127-9
50. Bagińska N, Harhala MA, Cieślik M, Orwat F, Weber B, Dąbrowska K, *et al*. Biological Properties of 12 Newly Isolated *Acinetobacter baumannii*-Specific Bacteriophages. Viruses. 2023;15(1):231. doi: 10.3390/v15010231

51. Erol HB, Kaskatepe B, Yildiz S, Altanlar N. The effect of phage-antibiotic combination strategy on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* biofilms. Journal of Microbiological Methods. 2023;210:106752. doi: 10.1016/j.mimet.2023.106752
52. Riccardi N, Rotulo GA, Castagnola E. Definition of Opportunistic Infections in Immunocompromised Children on the Basis of Etiologies and Clinical Features: A Summary for Practical Purposes. Curr Pediatr Rev. 2019;15(4):197-206. doi: 10.2174/1573396315666190617151745
53. Willey JM, Sandman KM, Wood DH. Prescott's Microbiology. 12th ed. New York: McGraw Hill; 2023. p.146, 740
54. Ebrahimi S, Sisakhtpour B, Mirzaei A, Karbasizadeh V, Moghim S. Efficacy of isolated bacteriophage against biofilm embedded colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. Gene Rep. 2021; 22: 100984. doi: 10.1016/j.genrep.2020.100984
55. Mira P, Yeh P, Hall BG. Estimating microbial population data from optical density. PLoS One. 2022;17(10):e0276040. doi: 10.1371/journal.pone.0276040
56. Ruiz AJ, Gomez C. Epidemiología Clínica - Investigación Clínica y Aplicada. Colombia, Bogotá: Editorial Médica Panamericana; 2015. p.114
57. Kropinski AM, Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. Methods Mol Biol. 2009;501:69-76. doi: 10.1007/978-1-60327-164-6_7
58. Cangelosi GA, Meschke JS. Dead or alive: molecular assessment of microbial viability. Appl Environ Microbiol. 2014;80(19):5884-91. doi: 10.1128/AEM.01763-14
59. Su J, Tan Y, Liu S, Zou H, Huang X, Chen S, *et al.* Characterization of a novel lytic phage vB_AbaM_AB4P2 encoding depolymerase and its application in eliminating biofilms formed by *Acinetobacter baumannii*. BMC Microbiol. 2025;25(1):123. doi: 10.1186/s12866-025-03854-3
60. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 35th ed. 2025. p.30,80.
61. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Guía para el análisis y la cuantificación del SARS-CoV-2 en aguas residuales [Internet].

Washington D.C. 2021 [citado el 18 de setiembre del 2025]. Disponible en: https://iris.paho.org/items/2e28211b-411a-4a21-84e2-46a3fde4215c

62. Champagne CP, Gardner N. The spot test method for the in-plant enumeration of bacteriophages with paired cultures of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Int Dairy J. 1995;5(5):417-25. doi: 10.1016/0958-6946(95)00011-Q
63. Yang H, Liang L, Lin S, Jia S. Isolation and Characterization of a Virulent Bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii*. BMC Microbiol. 2010;10:131. doi: 10.1186/1471-2180-10-131
64. Weyersberg L, Klemens E, Buehler J, Vatter P, Hessling M. UVC, UVB and UVA susceptibility of Phi6 and its suitability as a SARS-CoV-2 surrogate. AIMS Microbiol. 2022;8(3):278-91. doi: 10.3934/microbiol.2022020
65. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, *et al*. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS. 2007;115(8):891-9. doi: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
66. Abdelghafar A, El-Ganiny A, Shaker G, Askoura M. Isolation of bacteriophage targeting *Pseudomonas aeruginosa* and exhibits a promising in vivo efficacy. AMB Express. 2023;13(79). doi: 10.1186/s13568-023-01582-3
67. Wang R, You X, Liu X, Fei B, Li Y, Wang D, *et al.* Characterization of phage HZY2308 against *Acinetobacter baumannii* and identification of phage-resistant bacteria. Virol J. 2024;21:283. doi: 10.1186/s12985-024-02556-y
68. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al*. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012;18(3):268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
69. Xu A, Zhu H, Gao B, Weng H, Ding Z, Li M, *et al*. Diagnosis of severe community-acquired pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii*

through next-generation sequencing: a case report. BMC Infect Dis. 2020;20:45. doi: 10.1186/s12879-019-4733-5

70. Górski A, Borysowski J. Bacteriophage Interactions With Epithelial Cells: Therapeutic Implications. Front Microbiol. 2021;11:631161. doi: 10.3389/fmicb.2020.631161
71. Wintachai P, Surachat K, Chaimaha G, Septama AW, Smith DR. Isolation and Characterization of a *Phapecoctavirus* Infecting Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in A549 Alveolar Epithelial Cells. Viruses. 2022;14(11):2561. doi: 10.3390/v14112561
72. Dicks L, Vermeulen W. Bacteriophage-Host Interactions and the Therapeutic Potential of Bacteriophages. Viruses. 2024;16(3):478. doi: 10.3390/v16030478
73. Giormezis N, Rechenioti A, Doumanas K, Sotiropoulos C, Paliogianni F, Kolonitsiou F. Bacteriophage Resistance, Adhesin's and Toxin's Genes Profile of *Staphylococcus aureus* Causing Infections in Children and Adolescents. Microorganisms. 2025;13(3):484. doi: 10.3390/microorganisms13030484
74. Vörös Z, Csík G, Herényi L, Kellermayer M. Temperature-Dependent Nanomechanics and Topography of Bacteriophage T7. J Virol. 2018;92(20):e01236-18. doi: 10.1128/JVI.01236-18
75. Lin K, Schulte CR, Marr LC. Survival of MS2 and Φ6 viruses in droplets as a function of relative humidity, pH, and salt, protein, and surfactant concentrations. PLoS One. 2020;15(12):e0243505. doi: 10.1371/journal.pone.0243505
76. Li M, Lin H, Wang L, Wang J. Complete genome sequence of the extreme-pH-resistant *Salmonella* bacteriophage αα of the family Microviridae. Arch Virol. 2020;166(1):325-29. doi: 10.1007/s00705-020-04880-4
77. Nayagam AG, Wyatt EA, Bahrami PP, Singhal S. Survival of Thermostable Φ6 Genotypes in Acidic, Basic, and UV Environments. bioRxiv. 2025. doi: 10.1101/2025.09.24.678363
78. Mawatari K, Onoda Y, Kadomura-Ishikawa Y, Emoto T, Yamaguchi M, Hirano N, *et al*. Evaluation and Comparison of the UV-LED Action Spectra for Photochemical Disinfection of Coliphages and Human

Pathogenic Viruses. Microorganisms. 2025;13(12):2798. doi: 10.3390/microorganisms13122798

79. Ahmad I, Nadeem A, Mushtaq F, Zlatkov N, Shahzad M, Zavialov A, *et al.* Csu pili dependent biofilm formation and virulence of *Acinetobacter baumannii*. npj Biofilms Microbiomes. 2023;9:101. doi: 10.1038/s41522-023-00465-6

X. ANEXOS

ANEXO 1: Muestreo de aguas residuales



a. Apertura de la zona de muestreo.



b. Zona de muestreo.

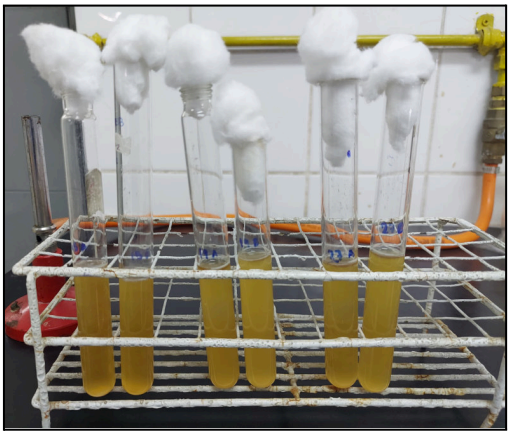


c. Aguas residuales muestreadas.

ANEXO 2: Aguas residuales hospitalarias recién muestreadas.



ANEXO 3: Activación de las cepas de *A. baumannii* MDR.

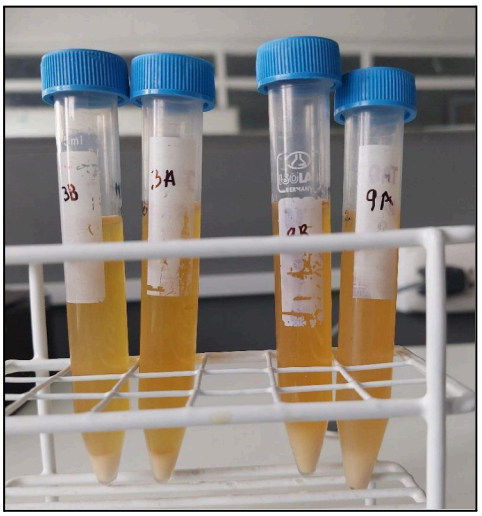


ANEXO 4: Incubación en caldo doble concentrado.



ANEXO 5: Centrifugación de las muestras, posterior a la incubación en caldo doble concentrado.

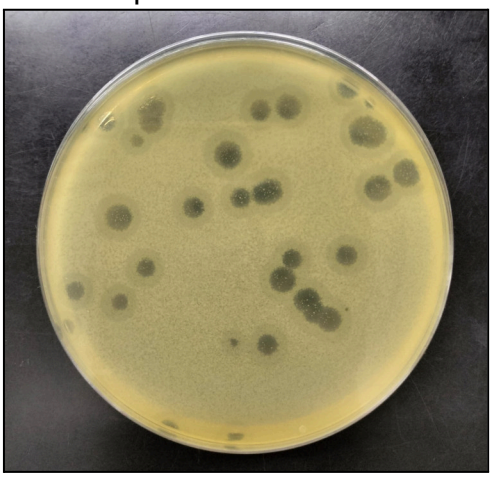




ANEXO 6: Escala McFarland 0,5 de *A. baumannii* MDR.



ANEXO 7: Observación de las placas de lisis en la cepa de *A. baumnnii* MDR mediante el método de doble capa.



ANEXO 8: Reportes del análisis estadístico

Estadísticas descriptivas para la densidad del biofilm de *A. baumannii* MDR según el MOI de fagos expuesto.

Descriptivos

Densidad del biofilm

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% de intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
,001	5	,072400	,0073348	,0032802	,063293	,081507	,0660	,0850
,010	5	,125800	,0209452	,0093670	,099793	,151807	,1090	,1610
,100	5	,180000	,0300250	,0134276	,142719	,217281	,1460	,2250
Total	15	,126067	,0496566	,0128213	,098568	,153566	,0660	,2250

Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.

Pruebas de normalidad

	Multiplicidad de infección de fagos	Shapiro-Wilk		
Densidad del biofilm	,001	,799	5	,079
	,010	,831	5	,141
	,100	,966	5	,850

Prueba de homogeneidad de varianzas de Levene.

Pruebas de homogeneidad de varianzas

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Densidad del biofilm	Se basa en la media	1,791	2	12	**,209**
	Se basa en la mediana	1,792	2	12	,208
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	1,792	2	8,620	,223
	Se basa en la media recortada	1,844	2	12	,200

Prueba de igualdad de medias de ANOVA.

ANOVA

Densidad del biofilm

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,029	2	,014	31,146	**<.001**
Dentro de grupos	,006	12	,000		
Total	,035	14			

Prueba de comparaciones múltiples (*post-hoc*) de Tukey.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Densidad del biofilm

HSD Tukey

(I) Multiplicidad de infección de fagos	(J) Multiplicidad de infección de fagos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
,001	,010	-,0534000*	,0136333	,005	-,089772	-,017028
	,100	-,1076000*	,0136333	<.001	-,143972	-,071228
,010	,001	,0534000*	,0136333	,005	,017028	,089772
	,100	-,0542000*	,0136333	,005	-,090572	-,017828
,100	,001	,1076000*	,0136333	<.001	,071228	,143972
	,010	,0542000*	,0136333	,005	,017828	,090572

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.