



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL

**FAGOTERAPIA Y CONTROL BIOLÓGICO APLICADO A CEPAS
BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES AISLADAS A PARTIR DE
MUESTRAS AMBIENTALES.**

LICDO. MÁXIMO A. MONTALVO-JUÁREZ
4-740-2433

DIRECTOR DE TESIS:
Dr. ALEX O. MARTÍNEZ-TORRES

TRABAJO DE GRADUACIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
MÁSTER EN MICROBIOLOGÍA
AMBIENTAL.

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2026

Dr. ALEX O. MARTÍNEZ TORRES, Investigador de los Laboratorios de Microbiología Experimental y Aplicada y Microbiología de Aguas, y Profesor Titular II TC del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, Universidad de Panamá.

CERTIFICA QUE: MÁXIMO A. MONTALVO-JUÁREZ

Ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis de Maestría, con el título: FAGOTERAPIA Y CONTROL BIOLÓGICO APLICADO A CEPAS BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES AISLADAS A PARTIR DE MUESTRAS AMBIENTALES.

Revisado este trabajo, autorizan su presentación para ser juzgado, y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Panamá el ____ de ____ de ____

DEDICATORIA

A mi madre, **Ida Juárez**, por la fuerza y la superación que siempre me inculcó, y por sembrar en mí el deseo de crecimiento académico que guía cada paso de este trabajo;

A mi hermano, **Víctor Montalvo Juárez**, por su apoyo incondicional y por recordarme que todo desafío se vence con disciplina y solidaridad;

Y a mis sobrinos, **Eduardo y Thiago**, cuyo entusiasmo y curiosidad me inspiran a avanzar cada día en este camino de aprendizaje.

Gracias a ustedes, este logro es también suyo.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor de tesis, el Dr. Alex O. Martínez-Torres por su apoyo constante, su paciencia y los valiosos conocimientos compartidos a lo largo de este trabajo.

A mis compañeras de investigación Alison Ramírez y Gina Hall, por su colaboración, dedicación y entusiasmo.

Al equipo de los Laboratorios de Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA) y de Microbiología de Aguas (LAMA), por brindar las instalaciones, el soporte técnico y el ambiente de trabajo necesarios.

A la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT), por su apoyo económico a través del Contrato por Mérito No. 200-2018 de la Ronda I de la convocatoria “Nuevos Investigadores de 2018”. Asimismo, por fomentar la generación de conocimiento en Panamá mediante sus convocatorias, especialmente la dirigida a nuevos investigadores, que permite la ejecución de proyectos e ideas a estudiantes de diversos niveles académicos y áreas del conocimiento

A los fondos CUFÍ de la Universidad de Panamá del 2018 por el apoyo económico para el desarrollo de este trabajo de graduación.

Al Departamento de Genómica y Proteómica del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, por su valioso soporte en el trabajo de secuenciación de genomas completos y por compartir su experiencia en genómica.

Al Centro Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAT) de Culiacán, México, y en especial a la Dra. Nohelia Castro Verde, el Dr. Cristóbal Chaidez y el Dr. Jean Pierre González, por su colaboración y contribuciones al proyecto.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE GENERAL.....	viii
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
GLOSARIO DE TÉRMINOS	xv
ABREVIATURAS	xvii
ABSTRACT	3
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO	5
Introducción	6
Descripción de la Problemática	7
Marco Teórico.....	8
A. La fascinante biología de los bacteriófagos.....	8
A.1. Los Bacteriófagos: Reguladores Ubicuos del Microbioma Global	8
A.2. Relevancia Ecológica y Ciclos Biogeoquímicos: Elementos Catalizadores de los Procesos Vitales.....	9
A.3. Breve Reseña Histórica del Descubrimiento y la Terapia Fágica: De la Observación Empírica a la Ciencia Contemporánea	9
A.4. Antecedentes en la Investigación de los Bacteriófagos.....	11
A.4.1. Estudios sobre el potencial terapéutico de los bacteriófagos:	11
B. Clasificación de los bacteriófagos y taxonomía.....	13
B.1. Clasificación por morfología del Virión	13
B.1.1. Tipos Morfológicos Clásicos.....	14
B.1.2. Desafíos y Avances en la Clasificación Morfológica.....	15
B.1.3. Características generales de la estructura de los bacteriófagos	17
B.2. Clasificación de fagos por ciclo de infección	19
B.2.1 Ciclo Lítico	19
B.2.2. Ciclo Lisogénico	20
B.2.3. Ciclo Pseudo Lisogénico	20
B.2.4. Infección Crónica.....	20
B.3 Importancia de los ciclos de vida de los fagos	21
B.4 Clasificación de fagos utilizando taxonomía filogenética	22
B.5. Clasificación de Fagos en Supergrupos	24
C. Los antibióticos.....	25
D. Bacterias	28
D.1. Morfología bacteriana.....	29

D.2 Requerimientos de Oxígeno y Respuesta a Factores Ambientales	30
D.3. Respuesta a la Tinción de Gram y Características de la Pared Celular	30
D.4. Nutrición, Metabolismo y Estrategias Energéticas	31
D.5. Filogenia y Clasificación Taxonómica	31
D.6. Patógenos de importancia médica según la OMS, bacterias del grupo ESKAPE	32
D.6.1. <i>P. aeruginosa</i>	33
D.6.2. <i>E. coli</i>	36
D.6.3. <i>Salmonella</i> spp.....	37
D.7. Impacto de las bacterias del grupo ESKAPE en la salud pública global y la situación en Panamá.....	38
D.8. La resistencia a los antibióticos	39
D.8.1. Mecanismos de resistencia bacterianos contra los antibióticos:	41
E. Fagoterapia y Control de Patógenos Multirresistentes: Avances y Perspectivas.	43
F. Objetivos del proyecto	46
G. Hipótesis	47
CAPÍTULO II MARCO METODOLÓGICO	48
H. Marco metodológico	49
H.1. Tipo de estudio.....	49
H.2. Población	49
H.3. Criterios de inclusión y exclusión	49
H.4. Variables	50
H.5. Área de muestreo.....	51
H.6. Procedimiento de recolección de datos.....	52
H.6.3. Cultivo de la bacteria hospedadora	53
H.6.4. Enriquecimiento.....	53
H.6.5. Aislamiento y purificación de bacteriófagos.	53
H.6.6. Prueba de Spot Test para la verificación de presencia de bacteriófagos.	54
H.6.7. Aislamiento.....	54
H.6.8. Purificación.....	55
H.6.9. Determinación del Título Viral	55
H.6.10. Propagación de Bacteriófagos	56
H.6.11. Concentración de Bacteriófagos	57
H.6.12. Microscopía Electrónica de Transmisión	57
H.7 Caracterización Biológica	57
H.7.1 Propagación de bacteriófagos en medio líquido.....	57

H.7.2. Sensibilidad al cloroformo	58
H.7.3. Efecto de la exposición a la luz UV	58
H.7.4. Resistencia del fago al pH.....	58
H.7.5. Efecto de la temperatura	59
H.8. Caracterización Molecular	59
H.8.1. Extracción de ADN de bacteriófagos.....	59
H.8.2. Secuenciación y preparación de librería	59
H.8.3. Análisis Bioinformáticos	59
CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
I. Resultados	62
I.1. Caracterización biológica.....	62
I.1.1. Aislamiento y purificación	62
I.1.2. Sensibilidad de los fagos al cloroformo.....	64
I.1.3. Efecto de la exposición a luz UV.....	66
I.1.4. Estabilidad del fago a diferentes pH	68
I.1.5. Efecto de la temperatura en la viabilidad del fago	70
I.2. Resultado de análisis de secuencias de fagos, genoma completo: ensamblaje, anotación de proteínas.	72
I.2.1 Ensamblaje del genoma completo, de <i>nov</i> o	72
I.2.2. Anotación de proteínas utilizando Pharokka.....	74
J. Discusión	94
CAPÍTULO IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	100
K. CONCLUSIONES.....	101
L. RECOMENDACIONES.....	102
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	103
ANEXO	124

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. CRONOLOGÍA SOBRE EL ESTUDIO DE BACTERIÓFAGOS.....	12
CUADRO 2. COMPARATIVA DE FORMAS BACTERIANAS Y SUS IMPLICANCIAS FUNCIONALES.....	30
CUADRO 3. COMPARATIVA DE CARACTERÍSTICAS Y RESPUESTA A LA TINCIÓN DE GRAM ENTRE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS.	31
CUADRO 4. VARIABLES EMPLEADAS PARA EL AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS.....	50
Cuadro 5. Listado de cepas ATCC empleadas como hospederas para el aislamiento de bacteriófagos.....	51
CUADRO 6. LISTA DE BACTERIÓFAGOS AISLADOS EMPLEADOS EN LA EXTRACCIÓN DE ADN Y ESTUDIOS MOLECULARES.	64
CUADRO 7. RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE ENSAMBLAJE DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS PARA LOS GENOMAS DE LOS FAGOS AISLADOS.....	73
CUADRO 8. RESUMEN DE LAS FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS DEL FAGO DE LA ATCC <i>E.</i> <i>COLI</i> 15597B.	76
CUADRO 9. HERRAMIENTA BACPHLIP PARA LA CLASIFICACIÓN DEL TIPO DEL FAGO DE LA ATCC <i>E. COLI</i> 15597B.	76
CUADRO 10. RESUMEN DE FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS DEL FAGO DE LA <i>E. COLI</i> ATCC 11229B- GAPRIVERVIRUS.	79
CUADRO 11. HERRAMIENTA BACPHLIP: PARA LA CLASIFICACIÓN DEL TIPO DEL FAGO DE LA <i>E. COLI</i> ATCC 11229B- GAPRIVERVIRUS.....	79
CUADRO 12. RESUMEN DE FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS DEL FAGO DE <i>E. COLI</i> ATCC 11229B_ MOSIGVIRUS.	82
CUADRO 13. HERRAMIENTA BACPHLIP: PARA LA CLASIFICACIÓN DEL TIPO DEL FAGO DE LA <i>E. COLI</i> ATCC 11229B_ MOSIGVIRUS.	82
CUADRO 14. RESUMEN DE LAS FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS DEL BACTERIÓFAGO 8739B.	85
CUADRO 15. HERRAMIENTA BACPHLIP: PARA LA CLASIFICACIÓN DEL TIPO DEL FAGO DE LA <i>E. COLI</i> ATCC 8739.....	85
CUADRO 16. RESUMEN DE LAS FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS DEL FAGO DE SALMONELLA ATCC 9842B.....	88
CUADRO 17. HERRAMIENTA BACPHLIP: PARA LA CLASIFICACIÓN DEL TIPO DEL FAGO DE LA <i>SALMONELLA</i> ATCC 9842B.....	88

CUADRO 18. RESUMEN DE LAS FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS DEL FAGO DE LA CEPA DE SALMONELLA ATCC 14028B.....	91
CUADRO 19. HERRAMIENTA BACPHLIP PARA LA CLASIFICACIÓN DEL TIPO DEL FAGO DE LA <i>SALMONELLA</i> ATCC 14028B.....	91
CUADRO 20. RESUMEN DEL ANÁLISIS TAXONÓMICO	92

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. A. MORFOLOGÍA DEL VIRIÓN	16
FIGURA 2. COMPARACIÓN DE LAS MORFOLOGÍAS DE LA COLA DE LOS FAGOS SIMILARES A SIPHOVIRIDAE Y MYOVIRIDAE.....	17
FIGURA 3. ESTRUCTURAS REPRESENTATIVAS DE FAGOS CON COLA.	19
FIGURA 4. CICLOS DE REPLICACIÓN POSTINFECCIOSOS DE FAGOS CON COLA	22
FIGURA 5. CRONOLOGÍA QUE MUESTRA LA DÉCADA EN QUE LLEGARON A LA CLÍNICA NUEVAS CLASES DE ANTIBIÓTICOS.....	28
FIGURA 6. DIANAS DE LOS ANTIBIÓTICOS Y MECANISMOS DE RESISTENCIA	43
FIGURA 7. NÚMERO DE ANTIBACTERIANOS NO TRADICIONALES EN PROCESO CLÍNICO	44
FIGURA 8. BACTERIÓFAGOS AISLADOS SEGÚN CEPA ATCC EMPLEADA COMO HOSPEDERA: (1) <i>E. COLI</i> 15597, (2) <i>E. COLI</i> 11229, (3) <i>E. COLI</i> 8739.....	63
FIGURA 9. BACTERIÓFAGOS AISLADOS SEGÚN CEPA ATCC EMPLEADA COMO HOSPEDERA: (1) <i>S. ENTERICA</i> SUBESPECIE <i>ENTERICA</i> SEROVAR <i>TYPHIMURIUM</i> 14028, (2) <i>S. ENTERICA</i> SUBESPECIE <i>DIARIZONAE</i> 29934, (3) <i>S. ENTERICA</i> SUBESPECIE <i>ENTERICA</i> SEROVAR <i>BISPEBJERG</i> 9842.....	63
FIGURA 10. BACTERIÓFAGOS AISLADOS SEGÚN CEPA ATCC EMPLEADA COMO HOSPEDERA: <i>PSEUDOMONA AERUGINOSA</i> 9027.	64
FIGURA 11. EFECTOS DEL CLOROFORMO EN BACTERIÓFAGOS: A. EN CEPA ATCC DE <i>E. COLI</i> Y B. EN CEPA ATCC DE <i>SALMONELLA</i> SP.	66
FIGURA 12. EFECTOS DE LA LUZ UV EN BACTERIÓFAGOS AISLADOS.....	68
FIGURA 13. EFECTOS DEL PH EN BACTERIÓFAGOS AISLADOS	70
FIGURA 14. EFECTOS DE LA TEMPERATURA EN BACTERIÓFAGOS AISLADOS.	72
FIGURA 15. MAPA GENÓMICO DEL BACTERIÓFAGO PARA LA CEPA 15597B.	75
FIGURA 16. MAPA GENÓMICO DEL BACTERIÓFAGO PARA LA CEPA 11229B-GAPRIVERVIRUS.	78
FIGURA 17. MAPA GENÓMICO DEL BACTERIÓFAGO PARA LA CEPA 11229B-MOSIGVIRUS.	81
FIGURA 18. MAPA GENÓMICO DEL BACTERIÓFAGO PARA LA CEPA 8739B.	84
FIGURA 19. MAPA GENÓMICO DEL BACTERIÓFAGO PARA LA CEPA DE <i>SALMONELLA</i> 9842B.....	87
FIGURA 20. MAPA GENÓMICO DEL BACTERIÓFAGO PARA LA CEPA DE <i>SALMONELLA</i> ATCC 14028B.	90

FIGURA 21. PROCESO DE PREPARACIÓN DE AGAR PARA LOS ENSAYOS DE DOBLE CAPA.	125
FIGURA 22. DILUCIONES Y PREPRACIÓN DE BUFFER	125
FIGURA 23. ENSAYO DE DOBLE CAPA DE AGAR, FASE DE ENFRENTAMIENTO.	126
FIGURA 24. MEDICION DE ADN.	126
FIGURA 25. MICROSCOPIO ELECTRONICO DE TRANSMISION EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ESTRUCTURAS MICROSCÓPICAS (CIEMic) DE LA UNIVERSIDAD DE COSTA RICA.	127
FIGURA 26. FOTOGRAFIA POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION DEL BACTERIOFAGO PARA LA CEPA <i>S. ENTERICA</i> SUBESPECIE ENTERICA SEROVAR TYPHIMURIUM 14028.	127
FIGURA 27. FOTOGRAFIA POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION DEL BACTERIOFAGO PARA LA CEPA <i>E. COLI</i> 15597	128
FIGURA 28. MAPA DE CALOR PARA EL FAGO DE LA CEPA <i>E. COLI</i> 8739	128
FIGURA 29. MAPA DE CALOR PARA EL FAGO DE LA CEPA <i>S. ENTERICA</i> SUBESPECIE ENTERICA SEROVAR TYPHIMURIUM 14028.	129

GLOSARIO DE TÉRMINOS

1. **Adsorción (fágica):** Proceso inicial de la infección fágica mediante el cual el bacteriófago reconoce y se une de forma específica a receptores moleculares en la superficie de la bacteria hospedera.
2. **Bacteriófago (fago):** Virus que infecta exclusivamente bacterias, utilizando la maquinaria celular del hospedero para su replicación. Puede presentar ciclos líticos o lisogénicos.
3. **Cápside:** Estructura proteica que rodea y protege el material genético del fago. Su estabilidad influye directamente en la resistencia del fago a condiciones ambientales adversas.
4. **Ciclo lítico:** Proceso de replicación viral en el cual el fago infecta la bacteria, se replica activamente y provoca la lisis celular para liberar nuevas partículas virales.
5. **Control biológico:** Estrategia que emplea organismos vivos o sus derivados (como bacteriófagos) para reducir o eliminar poblaciones bacterianas patógenas sin recurrir a agentes químicos tradicionales.
6. **Endolisina:** Enzima codificada por fagos líticos que degrada la pared celular bacteriana desde el interior, permitiendo la lisis y liberación de los viriones.
7. **Ensamblaje genómico:** Proceso bioinformático mediante el cual se reconstruye la secuencia completa del genoma del fago a partir de lecturas de secuenciación.
8. **Especificidad de hospedero (rango de hospedero):** Conjunto de cepas bacterianas susceptibles a la infección por un fago determinado; puede ser estrecho o amplio.
9. **Fagoterapia:** Aplicación terapéutica de bacteriófagos para tratar infecciones bacterianas, especialmente aquellas causadas por bacterias multirresistentes.
10. **Genoma fágico:** Conjunto completo de material genético del bacteriófago, generalmente ADN bicatenario en fagos de cola.
11. **Holina:** Proteína fágica que forma poros en la membrana citoplasmática bacteriana, permitiendo el acceso de endolisinas a la pared celular.
12. **Lisogenia:** Estado en el cual el genoma del fago se integra al cromosoma bacteriano y se replica pasivamente sin causar lisis inmediata.

13. **Lisis bacteriana:** Ruptura de la célula bacteriana como resultado del ciclo lítico del fago, liberando nuevas partículas virales.
14. **Morfología de placa:** Características visuales (tamaño, claridad, halos) de las placas de lisis en agar, asociadas al tipo de infección y eficiencia lítica del fago.
15. **Multirresistencia bacteriana:** Capacidad de una bacteria para resistir simultáneamente a múltiples clases de antibióticos.
16. **Periodo de latencia:** Tiempo transcurrido entre la infección del fago a la bacteria y la liberación de nuevos viriones.
17. **Radiación ultravioleta (UV):** Tipo de radiación electromagnética capaz de dañar el ADN y proteínas de los fagos, reduciendo su viabilidad.
18. **Rango de estabilidad:** Intervalo de condiciones físicas (temperatura, pH) en el cual el fago mantiene su infectividad.
19. **Reservorio ambiental:** Ambiente natural o antropogénico que alberga bacterias y sus fagos asociados, facilitando procesos de coevolución.
20. **Sintenia genómica:** Conservación del orden y orientación de genes entre genomas relacionados, utilizada en análisis comparativos y filogenéticos.
21. **Transducción:** Mecanismo de transferencia horizontal de genes mediado por bacteriófagos.

ABREVIATURAS

ANI: Average Nucleotide Identity

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses

MDR: Multidrug Resistant (Multirresistente)

UFP/mL: Unidades Formadoras de Placa por mililitro

UV: Ultravioleta

pH: Potencial de hidrógeno

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

WGS: Whole Genome Sequencing

RESUMEN

La vulnerabilidad en salud, resultado de infecciones por un creciente número de bacterias multirresistentes, debido al uso indiscriminado de antibióticos tanto en salud humana, como animal, sin dejar de lado, la complejidad, toxicidad y efectos secundarios que pueden acarrear los nuevos productos farmacológicos contra bacterias y los pocos descubrimientos de nuevos antibióticos, son problemática de escala mundial, que han tomado fuerza en los últimos años, y que requieren de soluciones oportunas y eficientes. En Panamá, los estudios sobre bacteriófagos y su posible utilidad como alternativa a la terapia antimicrobiana y/o control biológico son escasos. El objetivo de este proyecto es aislar de aguas residuales provenientes de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) de la ciudad de Panamá, bacteriófagos (fagos) que puedan tener actividad lítica contra cepas bacterianas multirresistentes ambientales y clínicas. Para esto, se seleccionaron como huéspedes cepas bacterianas de referencia de *Escherichia coli* (ATCC 8739, 11229 y 15597), *Salmonella enterica* (ATCC 29934, 9842 y 14028) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027). Se realizaron procesos de enriquecimiento selectivo para posteriormente aplicar ensayos basados en las técnicas de doble capa de agar en los procesos de aislamiento, purificación y caracterización biológica. Para garantizar la pureza de los concentrados de bacteriófagos, se realizaron entre 3 a 5 rondas de aislamiento de las unidades formadoras de placas (UFP) con características morfológicas iguales. La caracterización biológica se centró en evaluar la sensibilidad de los fagos al cloroformo, pH, luz UV y temperatura. En la caracterización morfológica se emplearon microscopía electrónica de transmisión y para la caracterización genética se realizaron extracciones de ADN, se secuenciaron el genoma completo de cada fago aislado utilizando tecnología Illumina y se realizaron, los análisis bioinformáticos pertinentes.

Palabras clave: bacteria multirresistentes, antibióticos, bacteriófago, fagoterapia, secuenciación de genoma completo.

ABSTRACT

Vulnerability in health, resulting from infections by an increasing number of multi-resistant bacteria, the indiscriminate use of antibiotics in animal health, inefficient methods for disinfection and sanitation in production chains, without leaving aside the complexity, toxicity and side effects that new pharmacological and bactericidal products can cause, are a worldwide problem that has gained strength in recent years and requires timely and efficient solutions. In Panama, studies on bacteriophages and their usefulness as an alternative to antimicrobial therapy and/or biological control are scarce. The objective of this project was to isolate, quantify, biologically and genotypically characterize bacteriophages (phages) that have lytic activity against environmental and clinical multi-resistant bacterial strains isolated from wastewater from the wastewater treatment plant (WWTP) in Panama City. Reference strains of *Escherichia coli* (ATCC 8739, 11229 and 15597), *Salmonella enterica* (ATCC 29934, 9842 and 14028) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) were selected for the isolation of bacteriophages. Selective enrichment processes were carried out to subsequently apply assays based on double-layer agar techniques in the isolation, purification and biological characterization processes. To ensure the purity of the bacteriophage concentrates, 3 to 5 rounds of isolation of plaque-forming units (PFU) with identical morphological characteristics were performed. The biological characterization focused on evaluating the sensitivity of the phages to chloroform, pH, UV light and temperature, as well as their lytic capacity against multi-resistant clinical and environmental strains. In the morphological characterization, transmission electron microscopy was used and for genetic characterization, DNA extractions were performed, the complete genome of each isolated phage was sequenced using Illumina technology and the relevant bioinformatics analyses were performed.

Keywords: multidrug resistance bacteria, antibiotic, bacteriophage, phage therapy, whole genome sequencing.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y

MARCO TEÓRICO

Introducción

Las enfermedades infecciosas han sido una de las principales causas de muerte en todo el mundo y aunque el descubrimiento de los antibióticos disminuyó significativamente esta realidad, rápidamente surgieron la resistencia y multirresistencia bacteriana contra estos. La resistencia a los antibióticos es un problema de salud mundial, que requiere de un abordaje completo e integrado. Por ello, la OMS recomienda e insta la investigación en vías de soluciones oportunas, amigables con el hombre, la producción y su entorno¹. Actualmente, es necesario formular nuevos tratamientos para enfermedades en salud humana, animal y vegetal, además de mejores productos para el control biológico y la desinfección/sanitización en cadenas de producción, por lo que, se hace necesario retomar los estudios sobre los bacteriófagos y su capacidad lítica contra bacterias. El objetivo principal de esta investigación es aislar bacteriófagos con capacidad lítica contra cepas multirresistentes de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Salmonella* sp. a partir de aguas residuales provenientes de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) de la ciudad de Panamá, empleando cepas ATCC y ensayos basados en las técnicas clásicas de doble capa de agar.

Los bacteriófagos se aislaron, purificaron y caracterizaron biológicamente en relación con su sensibilidad al cloroformo, pH, luz UV, temperatura y su capacidad lítica frente a cepas ambientales multirresistentes. Además, se propagaron para su concentración y análisis morfológico por microscopía electrónica de transmisión, extracción de ácidos nucleicos, PCR, digestión con enzimas de restricción, secuenciación de genoma completo y análisis filogenético. Con estos ensayos, se tratará de obtener bacteriófagos que pudiesen emplearse en formulaciones con posibilidad de aplicaciones terapéuticas o de biocontrol.

Descripción de la Problemática

Históricamente, la vida del hombre y la calidad de esta ha sido mermada por múltiples enfermedades, y gran parte de estas enfermedades son causadas por bacterias. Es por esto, por lo que, desde tiempos muy antiguos, la humanidad ha estado en busca de tratamientos eficaces que contrarresten dichas enfermedades. Desde la antigüedad, hace más de 2000 años, pueblos como Grecia, China y Egipto emplearon cataplasmas de productos naturales a base del moho para la cura de quemaduras y heridas²⁻⁴.

En la primera Conferencia Internacional sobre Enfermedades Infecciosas y Nanomedicina que se celebró en Nepal en diciembre de 2012, uno de sus principales temas a tratar fue la creciente problemática que enfrenta el mundo ante la crisis de resistencia contra los antibióticos, que desde los años 60 ha venido en aumento, lo que podría entenderse como una inminente era post-antibiótica que amenazaría la salud humana, animal y vegetal⁵⁻⁷. A medida que avanzamos hacia una era post-antibiótica, métodos alternativos para el control de enfermedades bacterianas necesitan ser investigados. La fagoterapia representa una alternativa a retomar con antecedentes que dan luces de su viabilidad⁸. Se ha reconocido bajo experimentos la respuesta positiva con fagoterapia aplicada a animales con enfermedades locales y sistémicas por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, y también, a *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* y *Vibrio vulnificus*. Los bacteriófagos también han sido efectivos al tratar patógenos intracelulares resistentes a los antibióticos utilizando *Mycobacterium smegmatis*, como un vector para suministrar el fago lítico TM4 para el tratamiento de infecciones micobacterianas intracelulares (*Mycobacterium avium* o *Mycobacterium tuberculosis*). Además, los fagos han sido eficaces en el tratamiento de infecciones no sistémicas, tales como infecciones gastrointestinales causadas por cepas de *E. coli* enteropatógenas en terneros, cerdos y corderos, e ileocecititis causada por *Clostridium difficile* en hámster. También, se ha demostrado la eficacia de los fagos en la prevención de la destrucción de los injertos de piel por *P. aeruginosa*⁹.

Sin embargo, los estudios con fagos decayeron al ser desplazados por la utilización de antibióticos, los cuales se consideraron una forma de tratamiento más efectiva en aquel momento, ya que se administraba sin la identificación del

agente causal de la infección, pero el tiempo ha demostrado que fue un error y hoy es necesario el análisis de nuevas terapias, menos tóxicas y más efectivas. Es por esto, que retomar los estudios basados en bacteriófagos es un hecho necesario que requiere del interés de todos¹⁰.

Los modelos de estudio con fagos han permitido una comprensión más profunda de la naturaleza única de la terapia con fagos, pero también, han resaltado la necesidad de más investigaciones sobre su farmacocinética y farmacodinámica^{6,11}.

Górski¹², “proponen la creación de estructuras públicas que funcionen como centros de referencia para la fagoterapia en cada región. También, sugieren que los hospitales construyan bibliotecas de fagos propias, para poder efectuar las pruebas de sensibilidad con los patógenos aislados y dirigir así los tratamientos, del mismo modo en que hoy se realiza con los antibióticos”¹³.

Los bacteriófagos fueron aislados a partir de aguas residuales, purificados y cuantificados por el método de doble capa de agar, se analizó su rango hospedero con cepas multirresistentes aisladas a partir de muestras clínicas y ambientales. También, se realizaron técnicas de microscopía electrónica y de biología molecular para identificar su morfología y su genotipificación, respectivamente.

Marco Teórico

A. La fascinante biología de los bacteriófagos

A.1. Los Bacteriófagos: Reguladores Ubicuos del Microbioma Global

Los bacteriófagos, comúnmente denominados fagos, constituyen las entidades biológicas más prevalentes y enigmáticas de la Tierra, superando en abundancia a cualquier otro organismo. Se estima la existencia de aproximadamente 10^{31} viriones, distribuidos extensamente en todos los ecosistemas acuáticos y terrestres, con una proporción aproximada de un billón de fagos por cada gramo de sedimento^{14,15}. Estos virus especializados no solo ejercen un control sobre las poblaciones bacterianas, modulando la arquitectura y funcionalidad de las comunidades microbianas, sino que también actúan como vectores fundamentales en la transferencia horizontal de genes, un mecanismo crucial para la adaptación bacteriana y la consecuente diversidad microbiana global¹⁶.

Su influencia resulta indispensable para el mantenimiento de la homeostasis planetaria.

A.2. Relevancia Ecológica y Ciclos Biogeoquímicos: Elementos Catalizadores de los Procesos Vitales

La actividad de los fagos incide directamente en ciclos biogeoquímicos de importancia crítica, tales como los del carbono, nitrógeno y fósforo. La lisis bacteriana, fenómeno conocido como "shunt viral", propicia la liberación de una considerable cantidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos, lo que acelera la remineralización y sostiene la productividad primaria en ecosistemas acuáticos y terrestres¹⁷. Las bacterias y arqueas, bajo la influencia de los fagos, emergen como los principales impulsores de estos procesos, contribuyendo, por ejemplo, a la generación de aproximadamente la mitad del oxígeno atmosférico^{14,15}. Se ha calculado que los bacteriófagos eliminan entre el 15% y el 40% de las bacterias oceánicas diariamente, impactando así la proporción de carbono disuelto, la productividad del fitoplancton, la producción de oxígeno y, potencialmente, la regulación climática global¹⁵. Su ubicuidad y diversidad son elementos esenciales para la fisiología microbiana, la dinámica poblacional, la evolución y las aplicaciones terapéuticas¹⁴.

A.3. Breve Reseña Histórica del Descubrimiento y la Terapia Fágica: De la Observación Empírica a la Ciencia Contemporánea

Si bien la evidencia de la actividad de los bacteriófagos se remonta a épocas antiguas, su estudio formal se inició a principios del siglo XX. Ernest Hankin fue pionero en 1896 al documentar actividad antibacteriana en aguas de la India contra *Vibrio cholerae*, atribuyéndola a una sustancia filtrable¹⁸. Posteriormente, en 1915, Frederick Twort observó la destrucción de colonias bacterianas por partículas filtrables, postulando que se trataba de una manifestación bacteriana anómala, una enzima o "algún tipo de virus ultramicroscópico". Sin embargo, fue Félix d'Herelle quien, en 1917, acuñó el término "bacteriófago" ("devorador de bacterias") para describir estos virus que infectaban bacterias^{8,15,18-21}.

La inherente capacidad lítica de los fagos motivó a d'Herelle a explorar su potencial terapéutico. Sus observaciones en pacientes afectados por disentería

y un estudio con conejos infectados con *Shigella*, sugirieron una correlación entre la presencia de fagos y la remisión de la enfermedad, marcando así, el inicio de la fagoterapia en humanos²².

Las décadas de 1920 y 1930 fueron testigos de un considerable auge en la investigación de la fagoterapia y la comercialización de preparados fágicos. No obstante, el escepticismo de la Asociación Médica Estadounidense, aunado al descubrimiento de la penicilina y el subsiguiente auge de los antibióticos, condujo a un drástico declive del interés en la fagoterapia en las naciones occidentales. A pesar de ello, la investigación y aplicación clínica de los bacteriófagos persistieron y prosperaron en la Unión Soviética y Europa del Este^{22,23}.

La aplicación terapéutica de los fagos se fundamenta en la comprensión de sus dos ciclos de vida principales:

- **Fagos líticos (o virulentos):** Infectan, se replican y lisan la célula bacteriana hospedera, liberando nuevas partículas virales. Su acción destructiva los convierte en candidatos idóneos para la terapia.
- **Fagos templados (o lisogénicos):** Integran su genoma en el ADN bacteriano, permaneciendo en un estado latente y replicándose sincrónicamente con el cromosoma hospedero sin inducir la muerte celular inmediata. Bajo ciertas condiciones de estrés, pueden transitar al ciclo lítico. Aunque no son directamente líticos, su aptitud para transferir genes bacterianos y la eventualidad de inducir lisis poseen implicaciones en la ecología microbiana y, en menor medida, en la terapéutica^{15,24}.

Desde su descubrimiento, los fagos han constituido herramientas primordiales en la biología molecular, vectores esenciales en la transferencia horizontal de genes y una fuente valiosa de instrumentos diagnósticos y genéticos. La creciente emergencia de resistencia a los antibióticos y la escasez de nuevos agentes antimicrobianos han posicionado a los bacteriófagos como una alternativa prometedora frente a la actual crisis de salud pública.

La asombrosa diversidad de los viriones de bacteriófagos en cuanto a tamaño, morfología, complejidad y composición genómica representa el mayor reservorio inexplorado de genes y proteínas en la biosfera. Una comprensión profunda de

su biología y su intrínseca interacción con las bacterias, resulta crucial para el avance de los sistemas microbianos y para el beneficio tanto de la salud humana como de la sostenibilidad ambiental^{14,25}.

A.4. Antecedentes en la Investigación de los Bacteriófagos

La investigación sobre bacteriófagos ha adquirido una relevancia notable, particularmente en el contexto de la creciente resistencia a los antibióticos. Diversos estudios y centros de investigación a nivel global han explorado su potencial terapéutico y sus diversas aplicaciones.

A.4.1. Estudios sobre el potencial terapéutico de los bacteriófagos:

- **Aplicación contra bacterias Gram-negativas *in vivo*:** Manohar, Nachimuthu y Lopes (2018) evaluaron el potencial de tres bacteriófagos frente a cepas multirresistentes de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* en larvas de *Galleria mellonella*. Los fagos (pertenecientes a las familias Podoviridae y Myoviridae) exhibieron una alta infectividad *in vitro*. Los resultados *in vivo* indicaron la necesidad de dosis múltiples para alcanzar una eficacia completa, lográndose una supervivencia del 100% en larvas infectadas con *E. coli* y *E. cloacae* tras la administración de tres dosis. En el caso de *K. pneumoniae*, una única dosis se mostró prometedora. Para infecciones bacterianas mixtas, se requirió la administración de al menos cuatro dosis de un cóctel de fagos.
- **Control de *E. coli* enterotoxigénica en productos alimenticios:** Dewanggana et al. (2022) describieron el aislamiento y la caracterización del bacteriófago DW-EC, capaz de controlar *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), agente etiológico de la diarrea. Este fago, aislado de un alimento tradicional indonesio, demostró una elevada especificidad para ETEC. Los análisis revelaron que DW-EC pertenece a la antigua familia Myoviridae y posee genes asociados al ciclo lítico, lo que lo confiere como un agente de biocontrol adecuado. La investigación demostró que DW-EC redujo significativamente la población de ETEC en diversas muestras de alimentos, sugiriendo su viabilidad como método alternativo para la conservación alimentaria y la prevención de infecciones por ETEC.

- **Fagos líticos de aguas residuales con potencial terapéutico:** Khorshidtalab et al. (2022), aislaron y caracterizaron 14 bacteriófagos líticos y sus respectivas bacterias hospederas Gram-negativas a partir de aguas residuales municipales en Trabzon, Turquía.

Cuadro 1. Cronología sobre el estudio de bacteriófagos.

Año	Investigador(es)	Hallazgo
1896	Ernest Hankin	Describió una sustancia con efecto bactericida en aguas del Ganges contra <i>Vibrio cholerae</i> ²⁶ .
1898	Gamaleya	Observó efecto lítico similar sobre <i>Bacillus subtilis</i> ²⁷ .
1915	Frederick Twort	Observó un "agente filtrable" que destruía colonias de micrococos ²⁷ .
1917	Félix d'Herelle	Identificó e introdujo el concepto de bacteriófago y aplicó fagoterapia ^{27,28} .
1921	Bruynoghe & Maisin	Aplicaron fagoterapia contra <i>Staphylococcus aureus</i> ²⁷ .
1939	Helmut Ruska	Primera visualización de un fago mediante microscopía electrónica ²⁹ .
1943	Luria y Delbrück	Propusieron que las mutaciones bacterianas ocurren de forma espontánea ³⁰ .
1952	Hershey y Chase	Confirmaron que el ADN es el material genético mediante el uso de fagos ³¹ .
1955	Seymour Benzer	Estableció la recombinación entre nucleótidos individuales en genes virales ³² .
1962	Lwoff, Horne y Tournier	Propusieron una clasificación de los virus basada en morfología y tipo de genoma ²⁷ .
1967–68	Gellert et al.	Aislaron enzimas de restricción en <i>E. coli</i> ²⁷ .
1976	Walter Fiers et al.	Secuenciaron el genoma de ARN del fago MS2 ³³ .
1977	Frederick Sanger et al.	Secuenciaron el genoma del fago ΦX174 ³⁴ .
1985–1988	George Smith	Desarrolló la técnica de presentación de fagos ³⁵ .

1989	Berg y Borsheim	Informaron sobre la abundancia de fagos en ambientes acuáticos ²⁷ .
1990	Bratbak y Proctor	Relación entre fagos y el control poblacional microbiano en ambientes naturales ²⁷ .
1996	Waldor & Mekalanos	Descubrieron que el fago CTXφ introduce genes de toxina en <i>V. cholerae</i> ³⁶ .
1999– 2012	Breitbart, Hendrix, Brüssow	Se amplió la comprensión sobre diversidad y ecología viral; se identificó CRISPR-Cas ²⁷ .
2013	Craig Venter Institute	Construcción del primer genoma viral sintético ²⁷ .
2018	Instituto Eliava / Frances Arnold et al.	Ensayos clínicos con fagos en humanos (PhagoBurn); Premio Nobel a la evolución dirigida con fagos ²⁷ .

B. Clasificación de los bacteriófagos y taxonomía

Los fagos son tan abundantes y diversos que ningún sistema de clasificación único captura con precisión todos los rasgos únicos de los fagos. El universo de los fagos abarca cada rincón del planeta, incluido el suelo, el agua dulce, los entornos marinos y el intestino humano. También, los fagos tienen una variedad de formas, comportamientos y secuencias genómicas. Por lo que, actualmente, la investigación se vale de múltiples esquemas de categorización que generalizan algunas características para aprender sobre cada nuevo fago³⁷.

Los bacteriófagos pueden clasificarse de cuatro formas diferentes: morfología, ciclo de infección, taxonomía y supergrupos.

B.1. Clasificación por morfología del Virión

La clasificación de los fagos o virus que infectan bacterias se fundamenta en la morfología de su virión, la cual comprende su forma, estructura y características físicas. Esta aproximación ha sido históricamente esencial y mantiene su pertinencia en la virología de bacteriófagos. El Rol de la Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), constituye la técnica primordial para la visualización y diferenciación de fagos con base en su morfología. El desarrollo del microscopio electrónico entre 1950 y 1960 marcó una era crucial, al posibilitar la observación y clasificación detallada de los fagos por parte de la comunidad científica. Durante este período, se identificaron y agruparon diversas formas, incluyendo

las icosaédricas, filamentosas y aquellas provistas de cola, basándose en la presencia o ausencia de estas y en su estructura general (Bradley 1967; Valencia-Toxqui y Ramsey 2024).

B.1.1. Tipos Morfológicos Clásicos

Clásicamente, los fagos se clasifican según la morfología de sus partículas virales (viriones):

A. Caudoviricetes (Fagos con Cola)

Estos fagos presentan una cabeza icosaédrica y una cola. Se subdividen en tres morfotipos principales, anteriormente clasificados como familias:

- **Myoviridae (actualmente parte de Caudoviricetes):** Fagos con cola contráctil, como T4, P1 y Mu.
- **Siphoviridae (actualmente parte de Caudoviricetes):** Fagos con cola larga no contráctil, como lambda y T1.
- **Podoviridae (actualmente parte de Caudoviricetes):** Fagos con cola corta rígida, como T7 y P22 (Ackermann, 2003).

La taxonomía formal de los bacteriófagos con cola se consolidó gracias a la labor pionera de David Bradley (Universidad Memorial, Canadá). Él empleó microscopía electrónica y tinción con naranja de acridina para clasificar a estos fagos en los tres morfotipos principales: cola contráctil, cola larga no contráctil y cola corta no contráctil (Turner et al. 2024).

B. Fagos sin Cola

El legado de David Bradley, además de los fagos provistos de cola, existen fagos sin cola que pueden manifestar pleomorfismo, ser filamentosos (como M13) o poliédricos, en ocasiones con envoltura (como phi6). Los fagos icosaédricos sin cola incluyen a phiX174 y QBeta³⁷.

C. Fagos Filamentosos (Inoviridae)

Corresponden a partículas alargadas y flexibles que contienen ADN de cadena sencilla y, por lo general, provocan infecciones crónicas. Un ejemplo relevante es el fago M13³⁸.

D. Fagos Geminados (Microviridae)

Poseen una cápside doble con una morfología bilobulada, conteniendo ADN circular de cadena sencilla. El fago phiX174 es un ejemplo representativo³⁹.

B.1.2. Desafíos y Avances en la Clasificación Morfológica

Si bien la MET es una herramienta de gran potencia, la calidad de la muestra y la inconsistencia en las técnicas de tinción pueden resultar en imágenes de baja resolución, dificultando una clasificación precisa. No obstante, técnicas avanzadas como la MET criogénica de mayor resolución y el análisis bioquímico de viriones purificados pueden revelar la naturaleza de las capas internas de un virión y otros detalles estructurales finos³⁷.

Las mediciones físicas del virión mediante MET no solo determinan la simetría, la arquitectura molecular y el tamaño máximo del genoma, sino que también la presencia o ausencia y el tipo de cola pueden sugerir el mecanismo de infección. Es imperativo señalar que la morfología por sí sola no siempre establece una relación filogenética, dado que fagos con morfologías similares pueden encontrarse en entornos dispares e infectar bacterias hospedadoras muy diferentes. Por lo tanto, ni el receptor específico de un fago ni la identidad de las bacterias hospedadoras susceptibles pueden determinarse exclusivamente a partir de su morfología. Mientras que el ciclo de infección de los fagos filamentosos puede predecirse a partir de la morfología del virión, este no es el caso para los fagos con cola. Las inferencias derivadas de la microscopía del virión deben ser validadas y complementadas mediante estudios experimentales adicionales. En este marco, la clasificación viral contemporánea tiende crecientemente hacia la integración de enfoques genómicos y bioinformáticos^{37,40,41}.

En numerosos casos, la secuencia genómica provee información suficiente para la asignación morfológica. Los avances en herramientas bioinformáticas para la identificación de genes estructurales, como aquellos que codifican proteínas de la cola, son cruciales para predecir la morfología de profagos y virus no cultivados. Por ejemplo, se predijo correctamente que los fagos similares a crAss serían podófagos basándose en la similitud con las estructuras de la cola clave en el podófago P22. Las bases de datos de proteínas estructurales de fagos bien

caracterizados, curadas a partir de anotaciones funcionales fiables, permiten identificar genes estructurales en un genoma y predecir el morfotipo. La evidencia bioquímica puede confirmar la presencia de una envoltura o detalles estructurales finos que de otro modo solo podrían revelarse mediante estudios estructurales de mayor resolución^{37,42}. En síntesis, la morfología continúa siendo una agrupación práctica y de gran utilidad para la descripción de nuevos fagos. Aunque los cambios recientes en las directrices de taxonomía de fagos generaron cierta confusión, los taxónomos enfatizan que las clasificaciones morfológicas de sífago, podófago y miófago siguen siendo válidas y valiosas, a pesar de que ya no constituyen la base principal de los esquemas de clasificación taxonómica³⁷. La morfología, en combinación con la genómica y la bioinformática, ofrece una comprensión integral de la diversidad y las características de los bacteriófagos (Figuras 1 y 2).

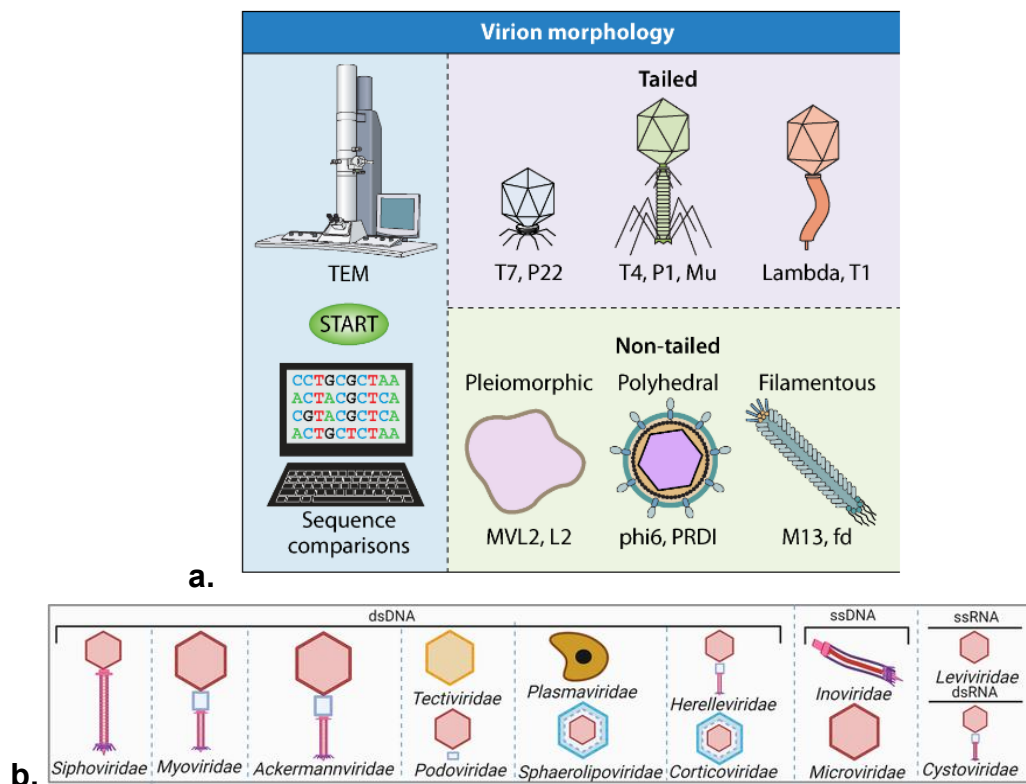


Figura 1. a. Morfología del virión. El análisis del fago visualmente mediante MET o mediante comparaciones de secuencias permite la clasificación entre los grupos generales de fagos con cola (por ejemplo, podófago, miófago y sífago) o sin cola (por ejemplo, pleomórfico, filamentoso y poliédrico) tomado de Valencia-Toxqui & Ramsey, 2024³⁷. **b.** Representación esquemática de las principales familias de fagos según su clasificación en función de la morfología y el tipo de genoma. Modificado de Bragg et al., 2014⁴³.

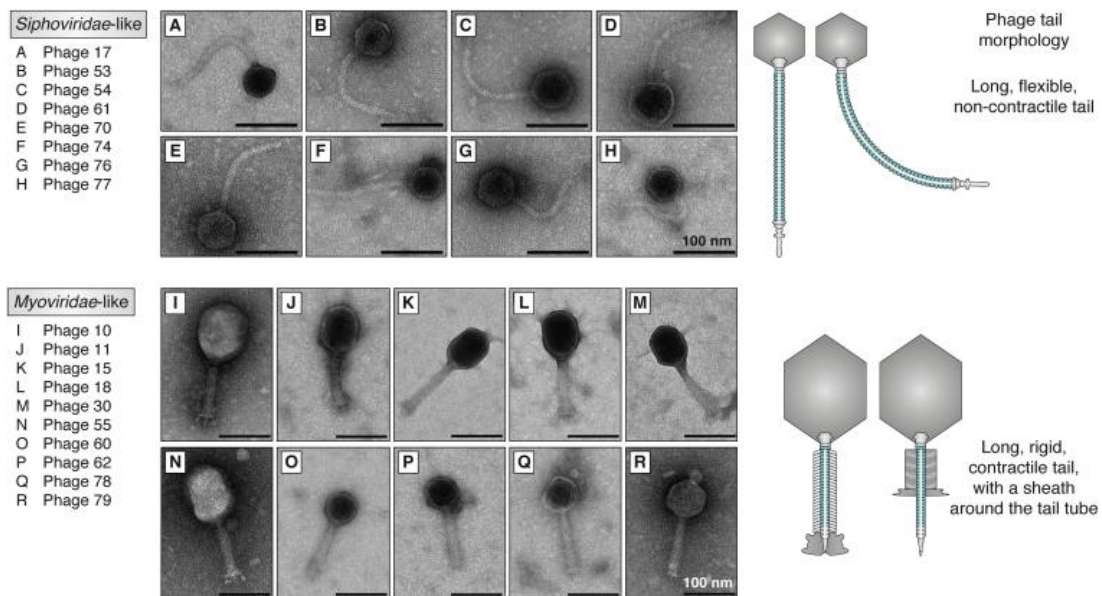


Figura 2. Comparación de las morfologías de la cola de los fagos similares a Siphoviridae y Myoviridae. A–H: los fagos similares a Siphoviridae tienen una cola larga, flexible y no contráctil. I–R: los fagos similares a Myoviridae tienen una cola larga, rígida y contráctil con una vaina alrededor del tubo de la cola. La barra de escala representa 100 nm. Tomada de Zinke et al., 2022.⁴⁴.

B.1.3. Características generales de la estructura de los bacteriófagos

La estructura del bacteriófago consiste en el ácido nucleico rodeado por una capa proteica (llamada cápside) y, en algunos casos, las cápsides pueden contener capas lipídicas o incluso estar rodeadas por una envoltura lipídica. El ácido nucleico consiste más comúnmente en ADN de doble cadena, pero algunos fagos tienen genomas de ADN de cadena sencilla. Otros tienen genomas de ARN y se han identificado fagos con ARN monocatenario y ARN de doble cadena^{45,46}.

Algunos bacteriófagos presentan una estructura de cola compleja que participa en el reconocimiento de la superficie de la célula huésped y la entrega del ácido nucleico a la célula huésped durante la primera etapa de la infección, los fagos de las tres antiguas familias suelen tener largas fibras en la cola que ayudan a mediar el reconocimiento y la adsorción del hospedador. Sin embargo, la longitud y la complejidad de la estructura de la cola son variables y algunos fagos no poseen estructuras de cola en absoluto. Estas tres características (estructura de la cápside, estructura/presencia de la cola y tipo de ácido nucleico) se utilizan como base para la caracterización morfológica del fago^{45,47}.

La estructura de los fagos con cola se puede dividir en dos regiones, la región de la cabeza, que contiene el genoma del fago. Es una estructura poliédrica que se compone de subunidades proteicas. Se puede decir que la región de la cabeza está conformada por: la cápside es una cubierta proteica que encierra el genoma del fago. Además, protege al genoma del daño del medio ambiente y del sistema inmunológico de la célula huésped. El cuello con collar es una estructura corta que conecta la región de la cabeza con la región de la cola. Contiene proteínas que ayudan a controlar la inyección del genoma del fago en la célula huésped. El material genético contiene los genes del fago, que codifican las proteínas que el fago necesita para replicarse e infectar las células huésped. El material genético puede ser ADN o ARN⁴⁸.

La región de la cola contiene el eje de la cola, la placa base, la vaina de la cola y las fibras de la cola. Es una estructura larga y delgada que está unida a la región de la cabeza. La vaina de la cola es una vaina contráctil que rodea el núcleo de la cola. Cuando la placa base se une a los receptores de la célula huésped, la vaina de la cola se contrae, inyectando el genoma del fago en la célula huésped. La placa base es una estructura hexagonal que contiene receptores que reconocen moléculas específicas de la superficie de la célula huésped. Una vez que la punta de la cola se ha unido a la superficie de la célula huésped, la placa base se une a los receptores de la célula huésped. La punta o punta de la cola es una proteína larga y delgada que sobresale de la placa base del fago. Es la primera parte del fago que entra en contacto con la superficie de la célula huésped. Las fibras de la cola son proteínas largas y delgadas que sobresalen de la placa base. Ayudan a guiar al fago a la superficie de la célula huésped y a posicionar la placa base de modo que pueda unirse a los receptores de la célula huésped (Figura 3)⁴⁸.

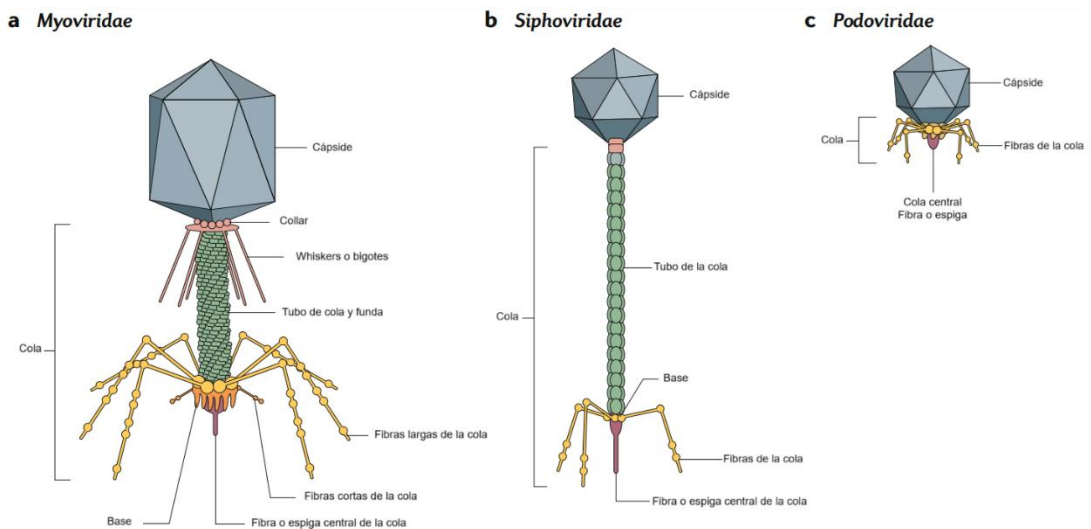


Figura 3. Estructuras representativas de fagos con cola. Todos los fagos con cola tienen una cápside que encierra y protege el genoma, y se conecta a la cola. **a.** Los fagos de la antigua familia Myoviridae son los únicos fagos con cola con una vaina de cola contráctil. **b.** Ambos fagos que pertenecen a las antiguas familias Myoviridae y Siphoviridae tienen una placa base en el extremo distal de la cola a la que se unen proteínas de unión a receptores (RBPs), como fibras y púas de la cola. **c.** Debido a que los miembros de Podoviridae no tienen placa base, los RBPs se adhieren directamente a la cola. Además, Siphoviridae y Podoviridae tienen una fibra o púa central en la cola que sobresale del extremo distal de la cola o placa base.

B.2. Clasificación de fagos por ciclo de infección

La biología de los fagos ha sido objeto de intensos estudios desde sus primeros descubrimientos, y a lo largo de las décadas, los investigadores han identificado distintos ciclos de vida que estos virus pueden seguir al interactuar con sus células huésped. En términos generales, los fagos pueden seguir cuatro ciclos de vida principales: lítico, lisogénico, pseudo lisogénico e infección crónica (Figura 4)^{14,37,49}.

B.2.1 Ciclo Lítico

El ciclo lítico es el más estudiado y se caracteriza por la rápida infección y destrucción de la célula huésped. En este ciclo, el fago inyecta su material genético en la célula bacteriana, y a partir de ahí, comienza a replicarse inmediatamente, utilizando la maquinaria celular para producir nuevas partículas virales. Esta replicación culmina con la lisis de la célula bacteriana, liberando una gran cantidad de nuevos fagos que pueden infectar otras células. Este ciclo es típico de los fagos virulentos, como los fagos T4 y T7³⁷, y se observa con

frecuencia en los estudios de placas de lisis, donde la destrucción de las bacterias forma zonas claras en el medio de cultivo. La lisis resulta en la muerte de la célula huésped, lo que también se puede visualizar como un fenómeno patológico importante en la biología viral^{43,50,51}.

B.2.2. Ciclo Lisogénico

En contraste con el ciclo lítico, el ciclo lisogénico es más duradero y menos destructivo para la célula huésped en el corto plazo. En este ciclo, el fago no destruye la célula inmediatamente. En cambio, su material genético se integra en el genoma bacteriano y se replica junto con él durante las divisiones celulares sucesivas. Este fago integrado se conoce como profago, y en este estado puede permanecer inactivo durante generaciones, sin causar daño directo a la célula huésped²⁵. Sin embargo, bajo ciertas condiciones, como estrés ambiental o daño en el ADN bacteriano, el profago puede reactivarse y entrar en el ciclo lítico, iniciando nuevamente la destrucción de la célula huésped. Los fagos templados, como el fago lambda, Mu, y P22, son ejemplos clásicos que siguen este ciclo^{37,52}.

B.2.3. Ciclo Pseudo Lisogénico

Un ciclo menos comprendido, pero igualmente importante, es el ciclo pseudo lisogénico. En este caso, el fago entra en la célula bacteriana y se establece en una fase latente sin integrar su material genético de manera estable en el genoma del huésped. A diferencia del ciclo lisogénico, el fago no forma un profago permanente, sino que permanece en este estado latente hasta que las condiciones sean propicias para activar el ciclo lítico o lisogénico. Este tipo de comportamiento puede verse como un "modo de espera" hasta que factores ambientales, como un cambio en el estado de la célula huésped, favorezcan la transición hacia una fase activa⁵³.

B.2.4. Infección Crónica

Además de los tres ciclos anteriores, ciertos fagos, especialmente en virus que infectan arqueas, fagos filamentosos o plasmavirus que infectan a *Mycoplasma*, pueden seguir un ciclo de infección crónica. En este ciclo, el fago se libera lentamente de la célula huésped sin provocar su muerte inmediata ni la lisis celular rápida⁵⁴. En lugar de producir una gran cantidad de viriones en un solo

episodio de lisis, estos fagos se replican y liberan continuamente nuevas partículas virales de manera gradual. Este proceso puede durar un largo período sin una evidente destrucción celular, lo que permite una relación más prolongada entre el fago y su huésped. Los fagos que siguen este ciclo presentan una replicación más controlada y pueden evadir algunas de las respuestas inmunológicas del huésped³⁷.

B.3 Importancia de los ciclos de vida de los fagos

La terminología y la complejidad de los ciclos de vida de los fagos son aspectos cruciales en la investigación. El uso de términos como "fagos virulentos" para los que siguen un ciclo lítico y "fagos templados" para los que adoptan un ciclo lisogénico, es esencial para evitar confusiones. Sin embargo, la clasificación no siempre es sencilla, y puede variar según los estudios y el contexto específico. Por lo tanto, es fundamental ser precisos y claros al definir qué ciclo de vida está siguiendo un fago en particular y cuáles son las características específicas que los distinguen. En términos de aplicaciones prácticas, la comprensión de estos ciclos tiene un impacto profundo en áreas como la biotecnología y la medicina. Los fagos líticos, por ejemplo, se están explorando como una herramienta para el tratamiento de infecciones bacterianas, especialmente en el contexto de la resistencia a los antibióticos. Al comprender cómo manipular los ciclos de vida de los fagos, es posible desarrollar terapias fágicas más efectivas y específicas. Los fagos templados, al tener la capacidad de entrar en un estado latente, podrían ofrecer estrategias terapéuticas basadas en la modulación de su ciclo para evitar daños colaterales a las bacterias beneficiosas en el microbioma^{15,43,55}.

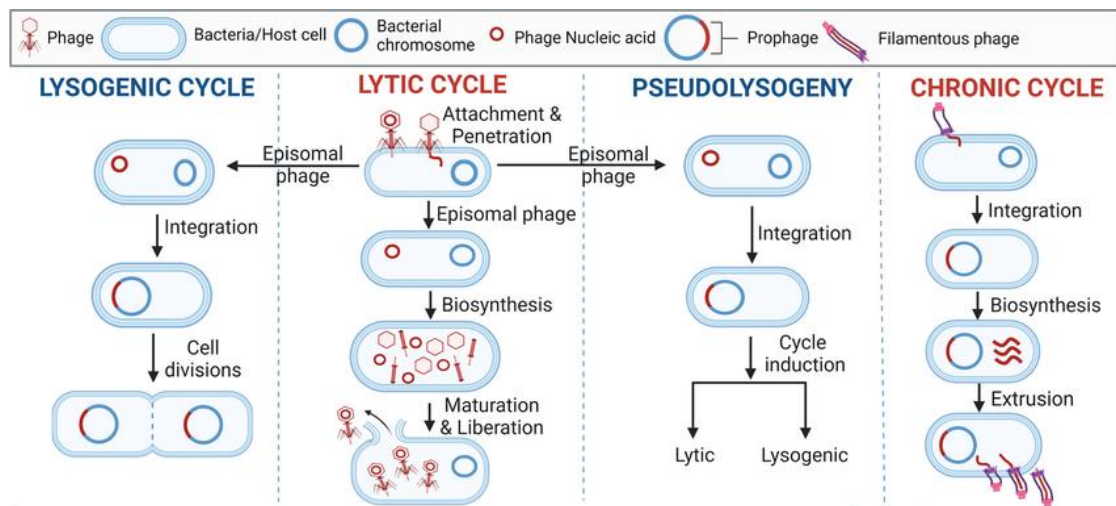


Figura 4. Ciclos de replicación postinfecciosos de fagos con cola: (i) ciclo lítico, la unión del fago y la penetración del genoma en la célula huésped es seguida por la biosíntesis de los componentes del fago y la liberación de viriones causada por la lisis celular; (ii) ciclo lisogénico, el genoma del fago se integra en el cromosoma del huésped y se replica como profago, hasta que hay un cambio al ciclo lítico; (iii) pseudo lisogénico, el genoma del fago continúa existiendo en estado episomal en una célula huésped hambrienta hasta que se segrega en un ciclo lítico o lisogénico, respaldado por un entorno rico en nutrientes. Modo de replicación de fagos filamentosos: (iv) ciclo crónico, los fagos filamentosos (familia Inoviridae) exhiben un ciclo crónico de replicación donde los viriones se producen y liberan continuamente a través de la extrusión en lugar de la lisis celular.

B.4 Clasificación de fagos utilizando taxonomía filogenética

La clasificación de los fagos ha experimentado una transformación profunda, que ha pasado de basarse principalmente en la morfología del virión a centrarse en su genética. En 2022, el Subcomité de Virus Bacterianos del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) actualizó sus directrices, reemplazando las antiguas familias morfológicas como Podoviridae, Myoviridae y Siphoviridae por una clasificación filogenética basada en secuencias genéticas^{41,56}. Este cambio responde a la necesidad de reflejar mejor las relaciones evolutivas entre los fagos, ya que la morfología ya no es suficiente para determinar su clasificación taxonómica. Actualmente, la clasificación se realiza mediante secuenciación de genomas, análisis de nucleótidos y estudios filogenéticos³⁷.

Antes de la actualización, por ejemplo, el género Lambdavirus incluía fagos con una identidad nucleotídica variable entre el 15% y el 70%. Sin embargo, con la nueva organización, los fagos de este género deben compartir al menos un 70%

de identidad genética. Asimismo, el fago Goslar de *E. coli*, que inicialmente se clasificó en la familia Myoviridae, fue reclasificado en la familia Chimalliviridae después de un análisis más profundo, dada su similitud con el fago gigante PhiKZ de *Pseudomonas*^{37,40,56}.

En el sistema actual, los fagos se agrupan según su relación filogenética, lo que puede situarlos en ramas cercanas o distantes del árbol filogenético. Estas agrupaciones dependen de características comunes, como la morfología del virión, el tipo de genoma y el huésped. Sin embargo, las diferencias en los métodos de secuenciación, como la secuenciación completa del genoma o el análisis de genes conservados, pueden variar los resultados. La transferencia horizontal de genes y la recombinación genética entre los fagos complican aún más su clasificación, generando genomas mosaicos. Para abordar estos desafíos, el ICTV utiliza herramientas como BLAST, VIRIDIC, VipTree y GRAViTy, que permiten realizar alineamientos de nucleótidos y proteínas, y sugerir clasificaciones a nivel de especie y género, facilitando una mayor precisión en la clasificación taxonómica⁵⁷. Además, el uso de datos metagenómicos ha permitido ampliar considerablemente el conocimiento sobre la filogenia de los fagos, lo que ha impulsado una actualización continua de la taxonomía. A pesar de los avances, este proceso puede resultar confuso para los nuevos investigadores. No obstante, el análisis taxonómico sigue siendo fundamental para comprender el lugar de un fago dentro del mundo viral y seguir las mejores prácticas y herramientas actuales es crucial para avanzar en este campo⁵⁷.

En este contexto, se propone la abolición de las clasificaciones tradicionales basadas en la morfología, como el orden Caudovirales y las familias Myoviridae, Podoviridae y Siphoviridae, en favor de un sistema que se enfoque en la diversidad genética de los fagos. Se sugieren nuevos criterios para definir rangos taxonómicos a nivel de especie, género, subfamilia y familia, estableciendo similitudes nucleotídicas como referencia principal. Además, se ha propuesto la creación de la clase Caudoviricetes, que agrupa a los fagos con cola de acuerdo con sus relaciones evolutivas, y la validación de nuevas familias, como Ackermannviridae y Chaseviridae, basadas en evidencia genómica. Este

enfoque permite una agrupación más coherente y precisa de los fagos, reflejando mejor su diversidad⁵⁸.

Entre los cambios más importantes aprobados entre marzo de 2021 y marzo de 2022, destacan la eliminación de las antiguas familias morfológicas, reemplazadas por la clase Caudoviricetes, que agrupa a los virus con cola y cápsides icosaédricas, y la adopción de la nomenclatura binomial para nombrar las especies de virus bacterianos. Este sistema de nomenclatura, similar al utilizado en biología general, se aplicó a más de 2500 especies de fagos. Además, se introdujeron 22 nuevas familias, 30 subfamilias, 321 géneros y 862 especies, lo que refleja un avance hacia una taxonomía más precisa basada en la genómica. La creación de nuevos órdenes, como Crassvirales (centrado en los virus detectados en microbiomas intestinales), y la elevación de ciertos grupos, como la familia Peduoviridae, refuerzan este cambio hacia una clasificación más coherente y adaptada a los avances científicos actuales^{57,58}.

B.5. Clasificación de Fagos en Supergrupos

La clasificación de fagos en supergrupos, también conocidos como clústeres o superfamilias, es una estrategia utilizada para agrupar la diversidad génica de los fagos. Esta clasificación se basa en la similitud de secuencias ($ANI \geq 95\%$) y perfiles proteicos, permitiendo descubrir relaciones más amplias entre ellos y predecir comportamientos o propiedades específicas. A diferencia de la megataxonomía formal del ICTV, esta aproximación es menos rígida, pero ampliamente adoptada por biólogos experimentados⁵⁹.

Identificar un fago como parte de un supergrupo facilita un punto de referencia para comparaciones filogenómicas y la detección de módulos funcionales compartidos con fagos ya estudiados. Por ejemplo, los miófagos grandes con genomas de aproximadamente 170 kilobases (Kb), como el fago T4 y sus genes centrales compartidos, pueden clasificarse juntos sin importar su hospedador³⁷.

Herramientas bioinformáticas como Phamerator y vContact2 son esenciales en este proceso. vContact visualiza estas relaciones al representar fagos y sus proteínas similares en redes, agrupando los genomas según sus conexiones intergenómicas. Esto ha permitido la identificación de supergrupos

representativos como Tevenvirinae (T4-like), Lambda-like y Felixounalike, así como otros linajes emergentes^{59,60}.

Dentro de los supergrupos más reconocidos, el grupo similar a lambda incluye fagos lambdoides, conocidos por su mosaicismo y tradiciones genómicas compartidas. Otro grupo notable son los fagos similares a T4, caracterizados por ser líticos y compartir rasgos morfológicos y genómicos, infectando a diversas especies bacterianas^{61,62}.

El proceso de clasificación en supergrupos no está centralizado y puede fundamentarse en características genéticas, vías regulatorias u otros elementos comunes. A medida que se profundiza en el estudio de los fagos, se revelan nuevas conexiones y relaciones, aunque la "materia oscura" de los fagos aún encierra muchas incógnitas. Al clasificar los fagos en supergrupos, los investigadores pueden realizar inferencias significativas sobre su función y características, contribuyendo a una mejor comprensión de estos organismos menos explorados⁶³.

C. Los antibióticos

Los antibióticos son medicamentos para tratar las infecciones causadas por bacterias en humanos y animales, ellos matan a las bacterias o limitan su crecimiento y multiplicación para permitir que las defensas naturales del organismo las elimine^{64,65}.

Sir John Scott Burden-Sanderson en el siglo XIX observó que el moho en un cultivo líquido inhibió el crecimiento bacteriano. Joseph Lister en 1871 curó las lecciones de una enfermera con la actividad sobre el crecimiento bacteriano que demostró el *Penicillium glaucum*. En 1877 Louis Pasteur y Jules François Joubert, realizaban experimentos con *Bacillus anthracis* y su crecimiento en muestras de orina, donde Pasteur observó que su crecimiento era inhibido cuando se cultivaba conjuntamente con otras bacterias. En 1897, en los trabajos de tesis de Ernest Duchesne, se demostraron varios antagonismos entre microorganismos. Ninguna molécula antimicrobiana fue purificada a pesar de los mecanismos de antagonismos descritos^{3,4}.

Los primeros antibióticos sintetizados fueron compuestos basados en químicos existentes como la arsfenamina, un derivado del arsénico descubierto en 1909 por Paul Ehrlich, activo contra *Treponema pallidum*, fue comercializado en 1911 con Salvarsan y posteriormente, como Mapharsen, la sulfanilamida cuyas propiedades como antibiótico fueron descubiertas por Gerhard Domagk en 1930 y sintetizada en 1935 por Paul Gelmo, su uso fue generalizado por los soldados en la Segunda Guerra Mundial⁴.

Alexander Fleming descubrió accidentalmente en 1928 que el crecimiento de sus colonias de *Staphylococcus aureus* estaba siendo inhibido por un hongo. Se trataba del *Penicillium notatum* del cual se purificó la molécula de penicilina. Su industrialización y comercialización inició en 1940 por Howard Florey y Ernst Chain, utilizando *Penicillium chrysogenum* como base para la producción^{3,66,67}. En 1930, René Dubos descubrió una enzima de un *Bacillus* derivado del suelo que degrada el polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* tipo III, años después, luego de centrar esfuerzos en la búsqueda de una opción más amigable y suave aislado de *Bacillus brevis* el oligopéptido gramicidina que inhibe ampliamente las especies bacterianas Gram-positivas, desafortunadamente, demostró demasiada toxicidad para su uso intravenoso en humanos, su uso tópico al contrario demostró alta eficacia^{3,68}.

Selman Waksman en 1940, realizó por primera vez una investigación sistemática de la actividad antimicrobiana de las bacterias del suelo, principalmente de *Streptomyces*. Desarrolló varias técnicas y estrategias de cultivo ("plataforma Waksman") que le permitió explotar la capacidad de las bacterias para producir sus propios antibióticos (que utilizan para competir entre sí, antagonismo), de esta manera pudo descubrir varios antibióticos y antifúngicos importantes, como actinomicina (de *Streptomyces* spp.), estreptomicina (de *Streptomyces griseus*), neomicina (de *Streptomyces fradiae*), fumigacina (de *Aspergillus fumigatus*) y clavacina (de *Aspergillus clavatus*)^{3,4,67,69}.

Los estudios de Waksman y sus técnicas iniciaron la era de oro de los antibióticos, entre 1940 a 1970 se descubrieron más de 20 clases de antibióticos, algunos antibióticos de importancia descubiertos en esta época son el nitrofurano en 1953; quinolonas en 1960; sulfonamidas en 1961; y oxazolidinonas en 1987 de la década de 1980, en la que se descubrieron las

últimas clases de antibióticos. Después de 50 años, escasos antibióticos han sido descubiertos, posiblemente por su rápido descubrimiento basados en productos naturales y su uso excesivo^{3,4,70}.

a. Clases de antibióticos según su estructura química:

- Aminoglucósidos
- Fármacos carbapenémicos
- Cefalosporinas
- Fluoroquinolonas
- Glicopéptidos y lipoglicopéptidos (como la vancomicina)
- Macrólidos (como la eritromicina y la azitromicina)
- Monobactámicos (aztreonam)
- Oxazolidinonas (como linezolid y tedizolid)
- Penicilinas
- Polipéptidos
- Rifamicinas
- Sulfamidas
- Estreptograminas (como quinupristina y dalfopristina)
- Tetraciclinas
- Los betalactámicos y sus subclases; carbapenémicos, cefalosporinas, monobactámicos y las penicilinas; antibióticos que se caracterizan por una estructura química llamada anillo betalactámico.

Otros antibióticos que no se ajustan a las clases enumeradas anteriormente son cloranfenicol, clindamicina, daptomicina, fosfomicina, lefamulina, metronidazol, mupirocina, nitrofurantoína y tigeciclina⁶⁵.

b. Clases de antibióticos según su modo de acción:

1. Inhibición de la síntesis de la pared celular (vancomicina, cefalosporinas, β -lactámicos, bacitracina).
2. Inhibición de la síntesis de proteínas (aminoglucósidos, cloranfenicol, tetraciclina, linezolid).
3. Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos (rifampicina, metronidazol, quinolonas, fluoroquinolonas).

4. Antimetabolitos (trimetoprima, dapsona, sulfonamida).
5. Desintegración de la membrana celular (polimixina, daptomicina).

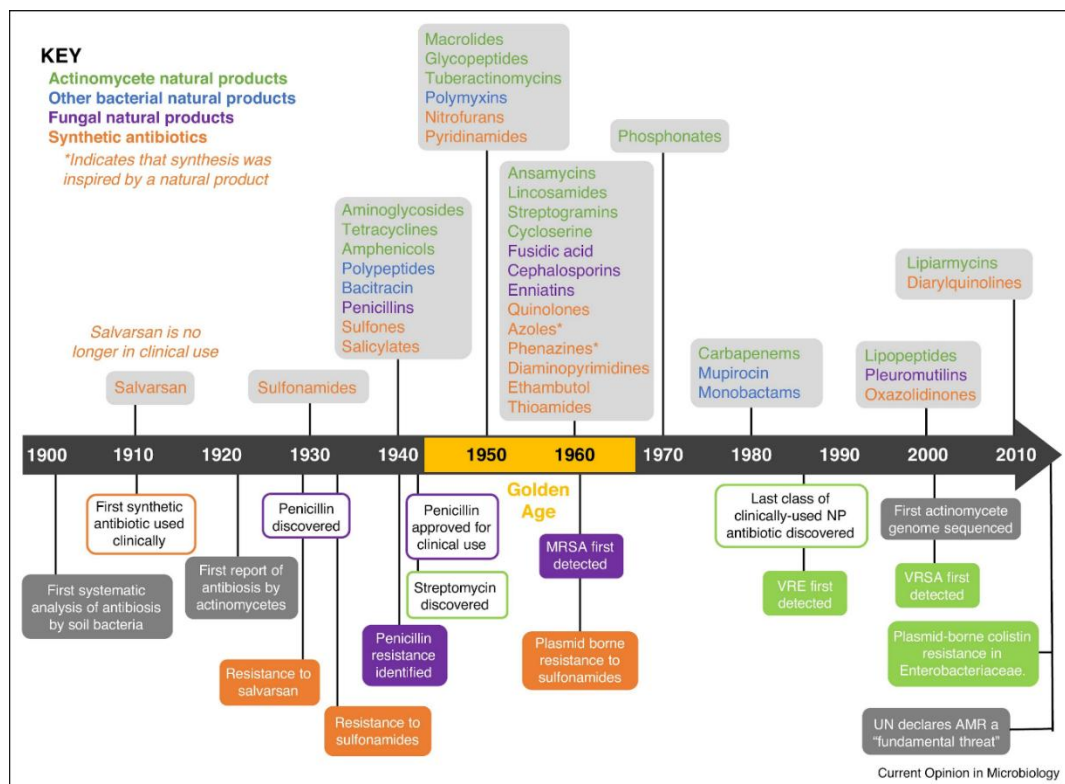


Figura 5. Cronología que muestra la década en que llegaron a la clínica nuevas clases de antibióticos. Los antibióticos se colorean según su origen: verde = actinomicetos, azul = otras bacterias, púrpura = hongos y naranja = sintético. En la parte inferior de la línea de tiempo, se encuentran las fechas clave relacionadas con el descubrimiento de antibióticos y la resistencia a los antimicrobianos, incluidos los primeros informes de cepas resistentes a fármacos de *S. aureus* resistente a metilina (MRSA), *Enterococos* resistentes a vancomicina (VRE), *S. aureus* resistente a vancomicina (VRSA) y Enterobacteriaceae resistencia a colistina transmitida por plásmidos⁴.

D. Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares procariotas increíblemente diversos y abundantes, adaptadas a casi cualquier entorno imaginable⁷¹. Su morfología varía, desde esferas hasta bastones y espirales⁷², y se distinguen por su respuesta a la tinción de Gram, que revela diferencias en la estructura de su pared celular⁷³.

El metabolismo bacteriano es también muy diverso, abarcando desde la fotosíntesis hasta la quimiosíntesis y la descomposición de materia orgánica⁷⁴.

Algunas son aeróbicas, necesitando oxígeno, mientras que otras son anaeróbicas, prosperando en su ausencia⁷⁵.

La filogenia bacteriana, ahora definida por el análisis del ADN, revela complejas relaciones evolutivas⁷⁶. Su impacto es inmenso: descomponen materia orgánica, fijan nitrógeno, y algunas causan enfermedades⁷⁷. Un desafío creciente es la resistencia a los antibióticos, donde las bacterias desarrollan mecanismos para evadir o inactivar estos fármacos, representando una amenaza global para la salud⁷⁸. La resistencia puede surgir por mutación genética o por la adquisición de genes de resistencia a través de transferencia horizontal⁷⁹. Sin embargo, muchas bacterias son esenciales para la salud humana y el funcionamiento de los ecosistemas. Además, sus propiedades bioquímicas se explotan en biotecnología, agricultura y medicina.

D.1. Morfología bacteriana

La morfología es una de las características distintivas y fundamentales de las bacterias. Estas pueden presentar formas variadas como esferoidales, bacilares, elipsoidales, y a veces incluso formas irregulares o pleomórficas (Cuadro 2). En diversas investigaciones se ha observado que la forma bacteriana está estrechamente relacionada con funciones celulares esenciales, como la optimización en el transporte de nutrientes y la correcta división celular⁷². Cada forma contribuye a la eficacia en la absorción de nutrientes debido a la relación superficie/volumen, lo cual representa una adaptación evolutiva que permite a las bacterias competir en ambientes tan diversos como el suelo, el agua y los hospedadores de origen animal o vegetal⁷².

Cuadro 2. Comparativa de formas bacterianas y sus implicancias funcionales.

Forma Celular	Características Principales	Implicaciones Funcionales
Esferocitos	Redondeados, de tamaño reducido	Optimización en la difusión de nutrientes
Bacilos	Alargados, varianza en tamaño	Mejor adaptación en espacios restringidos
Elipsoidales	Forma ovalada, resultado de variaciones genéticas	Variabilidad en la respuesta a estímulos ambientales
Pleomórficas	Formas irregulares, cambio de tamaño notable	Adaptación a condiciones de estrés y cambios en el entorno

Información tomada de K. D. Young, 2006⁷².

D.2 Requerimientos de Oxígeno y Respuesta a Factores Ambientales

Las bacterias pueden ser aeróbicas, anaeróbicas o facultativas, diferenciándose según sus requerimientos de oxígeno. Esta diversidad funcional permite la coexistencia en ecosistemas con diferentes niveles de oxígeno como tapetes microbianos. Estos tapetes microbianos presentan una estructura estratificada, donde las capas superiores suelen contener microorganismos fotosintéticos que liberan oxígeno, mientras que en capas inferiores se desarrollan microorganismos anaerobios debido a la ausencia de oxígeno, generando una zonificación definida por gradientes ambientales⁷¹. Las comunidades microbianas como biofilms, especialmente en infecciones periodontales, desarrollan microambientes con gradientes de oxígeno, favoreciendo la coexistencia de diferentes tipos bacterianos⁸⁰. Factores externos como temperatura y disponibilidad de nutrientes también condicionan la adaptación bacteriana⁸¹.

D.3. Respuesta a la Tinción de Gram y Características de la Pared Celular

La tinción de Gram divide bacterias en Gram positivas y negativas según la estructura y composición de su pared celular. Las Gram positivas tienen una pared gruesa rica en peptidoglicano que retiene el cristal violeta, mientras que las Gram negativas tienen una membrana externa lipídica que facilita la pérdida del colorante⁸². Las interacciones fisicoquímicas entre el colorante y los

componentes de la pared celular están fuertemente determinadas por la composición y el contenido de péptidoglicano, así como por la presencia de cromóforos y auxocromos. En estudios realizados se ha evidenciado que la diferencia en la carga eléctrica y en la densidad molecular de las bacterias influye significativamente en su respuesta a la tinción, lo que a su vez está ligado a la estructura del muro celular y a la distribución de macromoléculas en la superficie bacteriana⁸³.

Cuadro 3. Comparativa de características y respuesta a la tinción de Gram entre bacterias Gram positivas y Gram negativas⁸³.

Característica	Bacterias Gram Positivas	Bacterias Gram Negativas
Espesor del Peptidoglicano	Alto, capa gruesa	Bajo, capa delgada
Membrana Externa	Ausente	Presente
Coloración en Tinción Gram	Azul-violáceo, retiene cristal violeta	Rojo/rosado
Sensibilidad a Antibióticos	Mayor sensibilidad a agentes que atacan la pared celular	Mayor resistencia a algunos antibióticos debido a la barrera lipídica.

D.4. Nutrición, Metabolismo y Estrategias Energéticas

Las bacterias presentan diversas estrategias metabólicas: autotróficas (como cianobacterias que realizan fotosíntesis oxigénica mediante ciclo de Calvin-Benson), heterotróficas (dependientes de compuestos orgánicos), y mixtas, demostrando una gran flexibilidad adaptativa⁸¹. La regulación metabólica, a través de señales ambientales, permite respuestas rápidas y eficientes, optimizando recursos y rutas enzimáticas⁸⁴.

D.5. Filogenia y Clasificación Taxonómica

La filogenia molecular revolucionó la clasificación bacteriana tradicional. El uso de secuencias de ADN, particularmente del ARN ribosomal 16S, permite establecer relaciones evolutivas precisas. La propuesta de tres dominios (Bacteria, Archaea, Eucarya) destaca las profundas divergencias

moleculares^{85,86}. La combinación de datos fenotípicos y genotípicos refleja mejor las relaciones evolutivas reales⁸⁷.

D.6. Patógenos de importancia médica según la OMS, bacterias del grupo ESKAPE

El grupo ESKAPE está conformado por seis patógenos nosocomiales destacados por su capacidad de desarrollar resistencia a múltiples antibióticos: *E. faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.⁸⁸. Estas bacterias oportunistas son causas principales de infecciones asociadas a la atención sanitaria (IAAS) a nivel mundial y representan una amenaza crítica para la salud pública⁸⁹.

En febrero de 2017, la OMS en colaboración con la División de Enfermedades Infecciosas de la Universidad de Tübingen (Alemania), publicó por primera vez la lista de “patógenos prioritarios” resistentes a los antibióticos. La lista incluye 12 familias de bacterias peligrosas para la salud humana, agrupadas en 3 categorías determinadas por la urgencia de nuevos antibióticos: prioridad crítica, alta o media. Dentro de esta lista se incluyen: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y varias enterobacteriáceas como *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia* y *Proteus*, que son bacterias que pueden provocar infecciones graves y a menudo letales, como infecciones en sangre y neumonías, y que han adquirido resistencia a un elevado número de antibióticos, como los carbapenémicos y las cefalosporinas de tercera generación (los mejores antibióticos disponibles para tratar las bacterias multirresistentes)^{1,90}.

La elaboración de esta lista tiene como objetivo orientar y promover las investigaciones I+D en miras del desarrollo de nuevos antibióticos o productos que contrarresten la creciente problemática de la resistencia antimicrobiana^{91–93}. Colectivamente, los patógenos ESKAPE contribuyen de forma importante a la carga global de resistencia antimicrobiana⁹⁴. A continuación, se resumen para cada uno de estos microorganismos, sus características generales, los mecanismos de resistencia natural más relevantes y los tratamientos actuales disponibles. En el apartado final se discute su impacto en la salud pública global y la situación epidemiológica en Panamá, con énfasis en la resistencia antimicrobiana.

Según un informe elaborado en el marco del Seminario sobre Ciencia y Salud, realizado en 2016 en Boston, EEUU, en la actualidad, las infecciones por bacterias son la segunda causa de muertes humanas en el mundo y se estima que, para 2050, esa cifra ascendería a 10 millones de personas⁹⁵.

Lista de patógenos según criterios:

Prioridad crítica:

A. baumannii, resistente a los carbapenémicos.

P. aeruginosa, resistente a los carbapenémicos.

Enterobacteriaceae, resistentes a los carbapenémicos, productoras de ESBL.

Prioridad elevada:

E. faecium, resistente a la vancomicina.

S. aureus, resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina.

Helicobacter pylori, resistente a la claritromicina.

Campylobacter spp., resistente a las fluoroquinolonas.

Salmonellae, resistentes a las fluoroquinolonas.

Neisseria gonorrhoeae, resistente a la cefalosporina y resistente a las fluoroquinolonas.

Prioridad media:

S. pneumoniae, sin sensibilidad a la penicilina.

Haemophilus influenzae, resistente a la ampicilina.

Shigella spp., resistente a las fluoroquinolonas.

D.6.1. *P. aeruginosa*

Características generales: *P. aeruginosa* es un bacilo Gram-negativo móvil (con flagelos polares) y no fermentador, ubicuo en medios acuáticos y húmedos. Es un patógeno oportunista por excelencia: raramente infecta a individuos sanos, pero causa infecciones graves en pacientes con inmunosupresión o con barreras epiteliales comprometidas (quemaduras extensas, traumatismos), así como en aquellos con enfermedades crónicas (fibrosis quística, EPOC)⁹³. *P.*

aeruginosa es responsable de **neumonías hospitalarias** (especialmente asociadas a ventilación mecánica), infecciones urinarias asociadas a catéter, infecciones de heridas quirúrgicas y sepsis en unidades de cuidados intensivos. También, es una causa principal de infecciones crónicas pulmonares en pacientes con fibrosis quística y de otitis externas malignas en diabéticos. Su éxito como patógeno nosocomial se debe en parte a su notable **versatilidad metabólica** y capacidad de persistir en ambientes adversos: *P. aeruginosa* tolera desinfectantes débiles, puede crecer en soluciones antisépticas y formar **biopelículas** robustas en superficies médicas (por ejemplo, en tubos endotraqueales y catéteres). Además, produce pigmentos característicos (piocianina, pioverdina) que contribuyen a su patogenicidad al causar daño tisular y adquirir hierro, respectivamente. Debido a su prevalencia en hospitales y a la dificultad de su tratamiento cuando es resistente, *P. aeruginosa* ha sido incluida entre los patógenos prioritarios en las estrategias de vigilancia y control de infecciones.

Resistencia natural: *P. aeruginosa* exhibe **resistencia intrínseca elevada** a múltiples clases de antibióticos, aun sin necesidad de adquirir genes externos⁹⁶. Su membrana externa es altamente impermeable a muchas moléculas hidrofílicas, lo que dificulta la entrada de antibióticos como algunos β -lactámicos de espectro reducido y tetraciclinas⁹⁷. Además, *P. aeruginosa* posee un arsenal de **bombas de eflujo multidrogas** (por ejemplo, el sistema MexAB-OprM) que expulsan activamente diversos antibióticos del espacio periplásmico, confiriendo resistencia constitutiva a macrólidos, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol y parcialmente, a fluoroquinolonas^{89,98}. También, produce naturalmente una cefalosporinasa AmpC cromosómica que le otorga resistencia basal a muchas penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación. Cabe destacar que *P. aeruginosa* es intrínsecamente resistente a antibióticos Gram-positivos como las rifamicinas y ciertos glucopéptidos, y muestra tolerancia a colistina en condiciones de crecimiento determinadas (aunque generalmente es susceptible a polimixinas, a diferencia de Gram positivos). En suma, la estructura celular y la maquinaria de *P. aeruginosa* le confieren una línea de defensa intrínseca poderosa contra numerosos antimicrobianos, haciendo que este patógeno sea famoso por su “*resistencia innata*”.

Tratamientos actuales: Debido a su resistencia intrínseca, el tratamiento de *P. aeruginosa* requiere antibióticos específicos con actividad antipseudomónica. Para infecciones por cepas susceptibles, las opciones de primera línea incluyen β -lactámicos antipseudomónicos como piperacilina/tazobactam, cefalosporinas de tercera/cuarta generación (ceftazidima, cefepime) y carbapenémicos como meropenem o imipenem (excepto ertapenem, al que *Pseudomonas* es intrínsecamente resistente)⁹⁹. También, pueden utilizarse fluoroquinolonas (ciprofloxacina o levofloxacina) en infecciones moderadas, y aminoglucósidos (amikacina, tobramicina) en terapia combinada para sepsis graves. No obstante, *P. aeruginosa* tiene una notable capacidad de desarrollar resistencias adquiridas durante la terapia, por mutaciones en porinas (que disminuyen entrada de carbapenémicos), sobreexpresión de bombas de eflujo o producción de enzimas (BLEE o carbapenemasas tipo VIM, IMP, NDM)⁹⁹. Las cepas MDR de *P. aeruginosa* (resistentes a ≥ 3 clases) y XDR (casi todas las clases) se han vuelto cada vez más comunes en hospitales de todo el mundo. Frente a estas cepas, históricamente se recurre a colistina como último recurso; sin embargo, el desarrollo reciente de nuevos antibióticos ha mejorado el panorama terapéutico. Destaca la combinación ceftolozano/tazobactam, específicamente diseñada para *P. aeruginosa*, que ha demostrado alta eficacia contra cepas resistentes a otros β -lactámicos⁹⁹. Asimismo, ceftazidima/avibactam amplía la cobertura frente a algunas *Pseudomonas* con AmpC hiper producida o BLEE (aunque no inhibe metalo- β -lactamasas). Otra opción es imipenem/cilastatina/relebactam, útil contra cepas con resistencia por pérdida de porinas y AmpC. Y para *P. aeruginosa* metalo- β -lactamasa productora (ej. NDM o VIM), el nuevo cefalosporina-sideróforo cefiderocol ofrece actividad incluso contra cepas pan-resistentes. En resumen, el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa* requiere seleccionar terapia dirigida según antibiograma; frecuentemente se emplean combinaciones (por ejemplo, un β -lactámico + aminoglucósido) en infecciones severas para prevenir la emergencia de resistencia durante el tratamiento⁹⁶. El manejo exitoso incluye además medidas de soporte (retiro de dispositivos infectados, drenaje de abscesos) y control de infecciones, dado el alto potencial de *Pseudomonas* para causar brotes en UCI si no se siguen prácticas estrictas de asepsia¹⁰⁰.

D.6.2. *E. coli*

Características generales: es un bacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Constituye un habitante comensal del intestino humano y animal, donde participa en la producción de vitaminas y el mantenimiento de la microbiota intestinal. Sin embargo, ciertas cepas patógenas poseen factores de virulencia adquiridos, que les permiten causar infecciones intestinales y extraintestinales, incluyendo infecciones del tracto urinario, meningitis neonatal, septicemias y diarreas¹⁰¹.

Desde el punto de vista genético, *E. coli* es un microorganismo altamente versátil y dinámico, con una gran capacidad de intercambio horizontal de genes. Esta plasticidad genómica le ha permitido adaptarse a diversos nichos ecológicos y adquirir islas de patogenicidad y plásmidos de resistencia, contribuyendo a su éxito como patógeno oportunista y nosocomial¹⁰². En el contexto hospitalario, cepas como las *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) o las productoras de carbapenemasas (*E. coli* CRE) representan un desafío terapéutico creciente¹⁰³.

Resistencia natural: *E. coli* presenta resistencia intrínseca a antibióticos que actúan principalmente sobre bacterias Gram-positivas, debido a la barrera de permeabilidad de su membrana externa. No obstante, su relevancia clínica proviene de la resistencia adquirida, mediada por plásmidos, integrones y transposones, que portan genes como bla_CTX-M, bla_TEM, bla_SHV o bla_NDM. Estas enzimas confieren resistencia a penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos¹⁰¹.

La adquisición de mecanismos de eflujo activo, modificación de dianas ribosomales y reducción de la permeabilidad por pérdida de porinas, también contribuyen a su multirresistencia. La diseminación global de *E. coli* multirresistente ha convertido a este microorganismo en un reservorio genético clave de resistencia antimicrobiana¹⁰³.

Tratamientos actuales: El tratamiento de infecciones por *E. coli* depende de la cepa y su perfil de susceptibilidad. Para cepas sensibles, los antibióticos de elección incluyen cefalosporinas de tercera generación, fluoroquinolonas y carbapenémicos. Sin embargo, la expansión de cepas BLEE y CRE ha limitado

estas opciones, requiriendo el uso de antibióticos de último recurso como colistina, tigeciclina o ceftazidima-avibactam¹⁰².

D.6.3. *Salmonella* spp.

Características generales: *Salmonella* spp. es un bacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Comprende más de 2,600 serotipos agrupados principalmente en los subgéneros *S. enterica* y *S. bongori*. Constituye un importante patógeno entérico implicado en infecciones transmitidas por alimentos y agua contaminada. Las infecciones por *Salmonella* varían desde gastroenteritis autolimitadas hasta fiebres entéricas sistémicas (typhi y paratyphi)¹⁰⁴.

Salmonella posee múltiples factores de virulencia, incluyendo sistemas de secreción tipo III, islotes de patogenicidad (SPI-1 y SPI-2) y mecanismos de invasión y supervivencia intracelular, lo que le permite persistir en células fagocíticas y diseminarse sistémicamente¹⁰⁵. Estas propiedades explican su relevancia en salud pública y su inclusión dentro de las bacterias prioritarias por la OMS debido a la emergencia de cepas multirresistentes.

Resistencia natural: Aunque *Salmonella* presenta una resistencia intrínseca moderada a ciertos antibióticos como macrólidos y algunas penicilinas, su importancia radica en la resistencia adquirida plasmídica y cromosómica. Se han identificado cepas resistentes a fluoroquinolonas, cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos, mediadas por genes como bla_{CTX-M}, qnrA/B/S y mcr-1¹⁰⁵.

La diseminación zoonótica y la presión selectiva por uso de antibióticos en animales de producción han favorecido la emergencia de cepas resistentes, que se transmiten fácilmente al ser humano a través de la cadena alimentaria. Esta situación ha motivado la búsqueda de estrategias alternativas, entre ellas la fagoterapia, como vía de control biológico de *Salmonella* en alimentos y en infecciones clínicas¹⁰⁵.

Tratamientos actuales: El tratamiento convencional de las infecciones por *Salmonella* no tifoidea suele ser sintomático; sin embargo, en casos graves o sistémicos se emplean fluoroquinolonas (ciprofloxacina) o cefalosporinas de

tercera generación (ceftriaxona, cefotaxima). Las cepas multirresistentes, sin embargo, requieren alternativas como azitromicina o carbapenémicos¹⁰⁴.

Los bacteriófagos específicos contra *Salmonella* han demostrado efectividad para lisar bacterias multirresistentes y reducir su carga en matrices alimentarias y entornos clínicos, ofreciendo una alternativa sostenible y altamente específica a los antibióticos convencionales¹⁴.

D.7. Impacto de las bacterias del grupo ESKAPE en la salud pública global y la situación en Panamá

Las bacterias del grupo ESKAPE representan un desafío enorme para la salud pública debido a su asociación con infecciones difíciles de tratar, altas tasas de morbilidad y mortalidad, y mayor costo sanitario. A nivel global, se estima que las infecciones por patógenos resistentes contribuyeron a 5 millones de muertes en 2019, de las cuales 1.27 millones fueron directamente atribuibles a la resistencia antimicrobiana¹⁰⁶. Un porcentaje significativo de esa carga corresponde a infecciones causadas por miembros de ESKAPE – particularmente *S. aureus* resistente (MRSA) y bacilos Gram negativos como *Klebsiella* y *Pseudomonas* resistentes a carbapenémicos^{93,107}. Diversos estudios evidencian que las infecciones por estas bacterias prolongan la hospitalización y elevan considerablemente los costos médicos^{108,109}. Por ejemplo, los pacientes con bacteriemias por patógenos ESKAPE multirresistentes presentan mayor riesgo de evolucionar a shock séptico y de requerir terapias antibióticas tóxicas o de menor eficacia, lo que se traduce en peores desenlaces clínicos^{96,110}. Adicionalmente, la propagación de estas cepas resistentes compromete avances médicos modernos: procedimientos como trasplantes de órganos, cirugías mayores o quimioterapias dependen de antibióticos efectivos para prevenir y tratar infecciones, y la OMS advierte que muchas de estas intervenciones podrían volverse inseguras en la era post-antibiótica¹¹¹. De hecho, ya se han reportado “panresistencias” para las cuales ningún antibiótico disponible resulta eficaz, como algunas cepas de *A. baumannii* y *K. pneumoniae* XDR, constituyendo verdaderas amenazas a nivel mundial^{93,112}. Por todo ello, organismos internacionales (OMS, CDC) han declarado a los patógenos ESKAPE como **prioritarios** en la investigación y desarrollo de nuevos

antimicrobianos, así como en la implementación de programas de uso prudente de antibióticos ⁸⁹.

En **Panamá**, al igual que en el resto del mundo, la presencia de patógenos ESKAPE multirresistentes es una preocupación creciente. Estudios recientes del Institute for Health Metrics and Evaluation estiman que en 2019 ocurrieron aproximadamente *382 muertes atribuibles directamente a la resistencia antimicrobiana* en Panamá¹¹³. Entre los patógenos con mayor impacto en la mortalidad asociada a RAM en el país figuran *S. aureus* (incluyendo MRSA), *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, responsables conjuntamente de cientos de casos fatales anuales¹¹³. Los hospitales panameños han reportado brotes y aislamientos de cepas resistentes similares a las de otros países, tales como *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas tipo KPC y *A. baumannii* resistente a múltiples fármacos¹¹⁴. En respuesta a esta amenaza, Panamá ha desarrollado un Plan Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos^{114,115}, en consonancia con el enfoque de “Una Salud” promovido por la OPS/OMS. Este plan establece estrategias integrales que incluyen la vigilancia epidemiológica de patógenos resistentes, la regulación en la dispensación de antibióticos (exigiendo receta médica para su venta en farmacias), la formación de comités de uso óptimo de antimicrobianos (PROA) en los hospitales y campañas de concienciación pública sobre el uso adecuado de antibióticos (Caja de Seguro Social, 2024). Asimismo, Panamá participa en redes internacionales de monitoreo de resistencia (Red Latinoamericana de Vigilancia de RAM) para compartir datos y mejores prácticas. Aunque las tasas nacionales de resistencia a ciertos antibióticos aún son relativamente bajas en comparación con otros países de la región, la tendencia ascendente de aislamientos ESKAPE resistentes en los últimos años es clara. Autoridades de salud locales han advertido que si no se toman medidas contundentes, infecciones comunes podrían volverse intratables, comprometiendo logros médicos importantes¹¹¹.

D.8. La resistencia a los antibióticos

“La resistencia a los antibióticos es la capacidad de una bacteria de no responder a la acción de estos fármacos. Actualmente, se reconoce como un fenómeno natural, que antecede a la presión de los antimicrobianos”¹¹⁶.

Con el transcurrir del tiempo y la aparición de enfermedades cada vez más complejas y mortales se dan los primeros descubrimientos de los antibióticos, uno de los avances más trascendentales del siglo XX en materia de salud^{4,70}. Su aporte a la salud no solo impactó en el tratamiento médico salvando gran cantidad de vidas si no también permitiendo un sinnúmero de procedimientos médicos de distintas índoles¹¹⁷. Entre 1960 y 1980 se dio una gran producción de antimicrobianos. Sin embargo, ya desde el uso de la penicilina se anunciaba el futuro desarrollo de resistencia contra este antibiótico y que 10 años después, ya existía resistencia contra gran parte de los antibióticos descubiertos y el riesgo de retroceder en el tiempo al periodo pre-antibióticos es inminente. Actualmente, en la Base de datos de genes de resistencia a los antibióticos (ARDB—Antibiotic Resistance Genes Database) se han recopilado alrededor 20.000 genes de resistencia potencial (genes *r*) de casi 400 tipos diferentes^{79,118}.

Desde hace muchos años se ha emprendido una batalla en contra de los múltiples agentes bacterianos que amenazan la salud y economía mundial. Sus múltiples características adaptativas, bioquímicas y genéticas que determinan en muchos casos múltiples mecanismos de resistencia, han hecho difícil esta batalla¹¹⁹. La resistencia a los antibióticos es hoy, una de las mayores amenazas para la salud mundial, donde el uso generalizado e indiscriminado de los antibióticos en el ser humano, plantas y animales, ha provocado un aumento en la resistencia bacteriana. Así, al inicio de la época de los antibióticos, el *S. pneumoniae* era muy sensible a la penicilina, sin embargo, ahora, en algunas regiones del mundo, el 25% de las cepas de *S. pneumoniae* son ya resistentes. Además, el 70% de las infecciones bacterianas adquiridas en hospitales en los EEUU, son resistentes a uno o más de los principales antibióticos y más del 50% de los aislados clínicos de *S. aureus* en Japón, son ahora resistentes a múltiples fármacos⁹. Según un estudio realizado en Panamá entre 2007-2013, por el Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES), los antibióticos frente a los cuales se presentó mayor resistencia son los del grupo de β -lactámicos, las cefalosporinas y las quinolonas. Las bacterias con mayor resistencia a nivel nacional son *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter* spp. y *P. aeruginosa*. La prevalencia de *S. aureus* resistente a la meticilina osciló entre un

25 a 35%. Este es un comportamiento similar al resto del mundo, de aumento paulatino pero constante¹²⁰.

Cada vez es mayor el número de infecciones como neumonía, tuberculosis y gonorrea, cuyo tratamiento se vuelve más difícil debido a la pérdida de eficacia de los antibióticos. La resistencia a los antibióticos prolonga las estancias hospitalarias, incrementa los costos médicos y aumenta la mortalidad^{1,121}.

D.8.1. Mecanismos de resistencia bacterianos contra los antibióticos:

D.8.1.1. Bombas de eflujo

Las bombas de eflujo son proteínas que excretan eficazmente los antibióticos de la célula. Hay cinco familias de proteínas de eflujo: casete de unión a ATP (ABC), extrusión de compuestos tóxicos y de múltiples fármacos (MATE), facilitadores principales (MF), división celular de modulación de resistencia (RND) y resistencia a múltiples fármacos pequeños (SMR). Es decir que los microorganismos cambian su permeabilidad al fármaco. Ejemplos: las tetraciclinas se acumulan en las bacterias sensibles, pero no en las resistentes. Asimismo, la resistencia a las polimixinas está vinculada con un cambio en la permeabilidad a los fármacos. Los estreptococos poseen una barrera natural de permeabilidad contra los aminoglucósidos. Esta característica se puede vencer de modo parcial por medio de la presencia simultánea de un fármaco activo en la pared celular, por ejemplo, una penicilina. La resistencia a la amikacina y otros aminoglucósidos depende en ocasiones de la falta de permeabilidad a los medicamentos, en apariencia por un cambio de la membrana externa que daña el transporte activo hacia el interior de la célula¹²².

D.8.1.2. La inactivación de los antibióticos

Ocurre cuando la actividad de la sustancia antibiótica se ve obstaculizada directamente por hidrólisis o por conversión de grupos funcionales. Los microorganismos producen enzimas que destruyen al fármaco activo. Ejemplos: el estafilococo resistente a la penicilina G produce β -lactamasa que destruye al medicamento. Los bacilos Gram negativos producen otras β -lactamasas. Las bacterias Gram negativas que son resistentes a los aminoglucósidos (gracias a

un plásmido), producen enzimas adeniladoras, fosforiladoras o acetiladoras que destruyen al fármaco¹²².

D.8.1.3. Desvío del objetivo:

Las estrategias para el desvío del objetivo incluyen la creación de nuevas vías para eludir originalmente la enzima objetivo, la sobreproducción del compuesto objetivo, cambios estructurales en la pared celular, y la prevención de que el antibiótico se una a su objetivo. Los microorganismos forman una vía metabólica modificada que desvía la reacción que es inhibida por el fármaco. Ej.: algunas bacterias resistentes a las sulfonamidas no necesitan p-aminobenzoico (PABA) extracelular, pero, al igual que los mamíferos, pueden utilizar ácido fólico preformado. Los microorganismos producen una enzima modificada que aún puede llevar a cabo su función metabólica, pero resulta mucho menos alterada por el fármaco. Ej.: en las bacterias resistentes al trimetoprim, el ácido dihidrofólico reductasa se inhibe con mucho menos eficacia que en las bacterias sensibles al trimetoprim¹²².

D.8.1.4. Modificación de la diana

Se produce a través de la modificación de las propias dianas de los antibióticos. Múltiples tipos de mecanismos de resistencia pueden conferir resistencia simultáneamente contra la misma familia de antibióticos. Por el contrario, un tipo de mecanismo de resistencia también puede conferir resistencia contra más de un tipo de antibiótico. Los microorganismos forman un sitio de acción estructural modificado para el fármaco. Ej.: los microorganismos resistentes a la eritromicina tienen un receptor modificado en la subunidad 50S del ribosoma, que es resultado de la metilación de un ARN ribosómico 23S. La resistencia a ciertas penicilinas y cefalosporinas puede ser función de la pérdida o la alteración de las proteínas de unión a la penicilina (PBP). La resistencia a la penicilina de *S. pneumoniae* y *Enterococos* es consecutiva a PBP alteradas¹²².

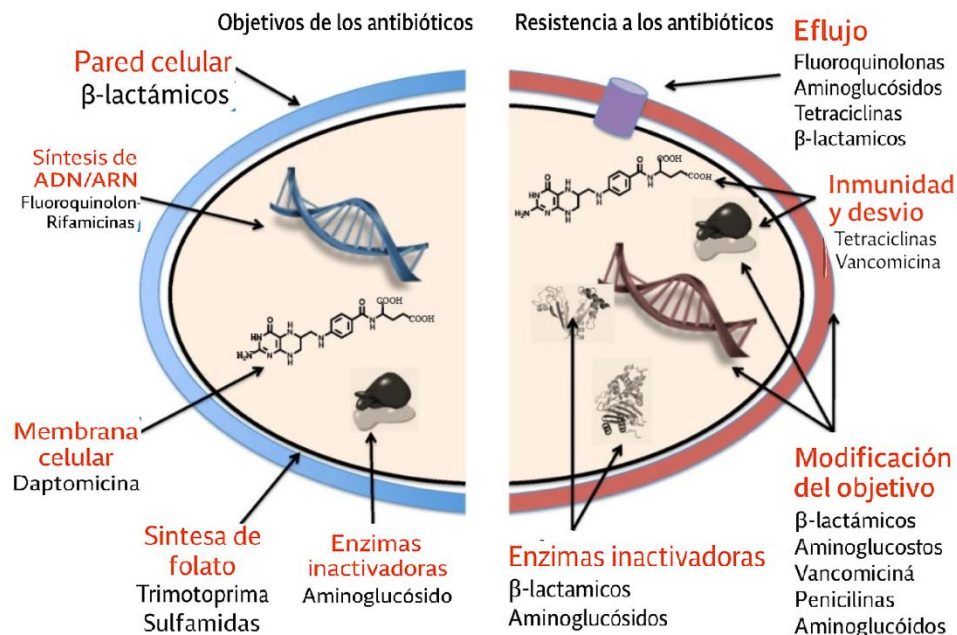


Figura 6. Dianas de los antibióticos y mecanismos de resistencia. La resistencia a los antibióticos ocurre a través de cuatro mecanismos generales: modificación del objetivo; salida; inmunidad y derivación; y destrucción catalizada por enzimas¹²².

E. Fagoterapia y Control de Patógenos Multirresistentes: Avances y Perspectivas.

Las opciones para el tratamiento contra infecciones causadas por bacterias multirresistentes en humanos o el mejoramiento de terapias veterinarias y sistemas de sanitización, son cada vez más limitadas u obsoletas, lo que hace que se requiera evaluar nuevas estrategias que ofrezcan nuevas opciones que ayuden a combatir las infecciones o los procesos que no pueden ser controlados con los medios disponibles actuales¹¹⁹.

En una reciente revisión sobre alternativas al tratamiento con antibióticos, se destacan dentro de los próximos 10 años: anticuerpos, probióticos, lisinas, bacteriófagos de tipo salvaje y de ingeniería, estimulación inmune y péptidos^{123,124}.

En el reporte 2020 realizado por la OMS “2020, agentes antibacterianos en desarrollo clínico y preclínico: descripción general y análisis”¹²⁵, se considera el desarrollo de agentes antibacterianos no tradicionales; en total son 27 antibacterianos no tradicionales en proceso clínico de los cuales 4 son bacteriófagos o algún derivado enzimático de bacteriófago.

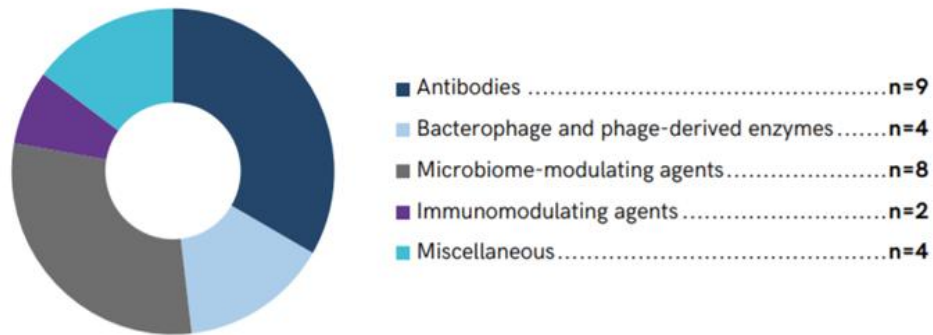


Figura 7. Número de antibacterianos no tradicionales en proceso clínico¹²⁵.

La fagoterapia representa una alternativa con antecedentes que indican la posibilidad de éxito en su utilización para el control y tratamiento de bacterias multirresistentes¹².

Los bacteriófagos son los enemigos naturales de las bacterias y están presentes en todo lugar en donde puedan encontrarse sus hospederos⁵. La actividad bactericida del bacteriófago a través de la lisis del hospedero ha permitido su aplicación en muchas áreas, como tratamiento para infecciones bacterianas resistentes a múltiples fármacos, inactivación de bacterias patógenas en alimentos, agua y plantas^{21,126,127}.

Los bacteriófagos reconocen la superficie de la célula bacteriana con alta especificidad, inyectando su ADN o ARN, multiplicándose y ensamblándose dentro de la bacteria, para finalmente romper la célula y liberar su progenie, que infectará nuevas células bacterianas. El número de bacteriófagos crece de forma exponencial, por lo cual, su mayor efecto es en el sitio de infección¹¹⁹.

Una terapia ideal para curar enfermedades bacterianas debe ser altamente eficaz sin tener efectos tóxicos para el huésped. Los bacteriófagos han demostrado no tener efectos tóxicos en los hospederos, excepto algunas raras reacciones alérgicas reversibles, donde se han reportado altas tasas de éxito⁷.

Los bacteriófagos son específicos para sus huéspedes lo que minimiza la posibilidad de infecciones secundarias, ya que se dirigen únicamente al patógeno y no a la flora normal, contrario a los antibióticos cuya acción se dirige a ambos. Los bacteriófagos se replican en el sitio de la infección donde se necesitan principalmente para lisis los patógenos, pero los antibióticos viajan por

todo el cuerpo y no se concentran en el sitio de la infección. No se han notificado efectos secundarios durante o después de la aplicación de fagos, pero las bacterias resistentes, las alergias (a veces incluso la reacción anafiláctica fatal) y las infecciones secundarias, son los efectos secundarios comunes del tratamiento con antibióticos. Otra cosa importante de los bacteriófagos, es que son respetuosos con el ambiente y aislarlos e identificarlos es un proceso rápido en comparación con el desarrollo de nuevos antibióticos, que puede tomar varios años y puede costar millones de dólares para los ensayos clínicos^{128–130}. Por otro lado, mucho se dice de las resistencias que pueden generarse por parte de las bacterias ante los bacteriófagos, pero esta debería preocuparnos menos que las resistencias a los fármacos pues al igual que las bacterias, los fagos pueden mutar y entonces ser resistentes ante las bacterias^{128,131–133}.

F. Objetivos del proyecto

F.1. Objetivo general

Evaluar el potencial bioterapéutico de bacteriófagos líticos aislados de aguas residuales de la PTAR de la Ciudad de Panamá mediante caracterización biológica y genómica, como estrategia innovadora frente a la resistencia antimicrobiana de *E. coli*, *Salmonella enterica* y *P. aeruginosa*.

F.2. Objetivos específicos

- Aislar y purificar bacteriófagos con actividad lítica específica contra cepas de referencia ATCC de *E. coli*, *S. enterica* y *P. aeruginosa* mediante técnicas de enriquecimiento y doble capa de agar.
- Cuantificar la eficiencia lítica de los bacteriófagos aislados mediante determinación de títulos virales por unidades formadoras de placas (UFP/mL).
- Evaluar la resistencia ambiental y estabilidad térmica de los fagos aislados para determinar su viabilidad terapéutica bajo condiciones fisiológicas (pH 7.4, 37°C) y condiciones de estrés (pH 3.0-9.0, temperaturas 20-70°C, cloroformo y radiación UV-C).
- Caracterizar la morfología viral mediante microscopía electrónica de transmisión y clasificar taxonómicamente los fagos según características morfológicas y de placa.
- Analizar la estructura genómica mediante secuenciación del genoma completo (WGS) y identificar genes funcionales, elementos móviles y marcadores de virulencia.
- Determinar la seguridad bioterapéutica mediante análisis bioinformático de ausencia de genes lisogénicos, factores de virulencia y determinantes de resistencia antimicrobiana.

G. Hipótesis

Ha: Los bacteriófagos aislados de las aguas residuales de la PTAR de la Ciudad de Panamá presentan actividad lítica frente a cepas bacterianas resistentes y multirresistentes de *E. coli*, *Salmonella* spp. y *P. aeruginosa*.

Ho: Los bacteriófagos aislados de las aguas residuales de la PTAR de la Ciudad de Panamá no presentan actividad lítica frente a cepas bacterianas resistentes y multirresistentes de *E. coli*, *Salmonella* spp. y *P. aeruginosa*.

CAPÍTULO II

MARCO

METODOLÓGICO

H. Marco metodológico

H.1. Tipo de estudio

Estudio experimental, transversal y descriptivo. Experimental porque implica la manipulación de variables biológicas (aislamiento y caracterización de bacteriófagos) bajo condiciones controladas; es transversal porque se realiza en un punto o periodo específico de tiempo; y es descriptivo porque busca caracterizar los fagos aislados en términos biológicos y genotípicos.

H.2. Población

Población de estudio: Muestras de aguas residuales recolectadas en la PTAR de la Ciudad de Panamá.

Unidad experimental: Bacteriófagos presentes en las muestras de aguas residuales.

Cepas blanco: Cepas ambientales y clínicas resistentes y multirresistentes de *E. coli*, *Salmonella* spp y *P. aeruginosa*.

H.3. Criterios de inclusión y exclusión

H.3.1. Criterios de inclusión

H.3.1.1. Para las muestras:

- Muestras recolectadas del sistema de tratamiento de aguas residuales (entrada).
- Muestras recogidas en condiciones estériles y transportadas en cadena de frío al laboratorio en menos de 4 h.

H.3.1.2. Para las cepas bacterianas:

- Cepas de referencia tipo ATCC.
- Cepas bacterianas previamente caracterizadas como resistentes o multirresistentes por antibiograma.
- Cepas de origen ambiental o clínico recolectadas en Panamá.

H.3.2. Criterios de exclusión

H.3.2.1. Para las muestras:

- Muestras recolectadas sin las condiciones de esterilidad o con tiempos de transporte superiores a 6 h.
- Muestras que hayan sido almacenadas por más de 24 h antes del enriquecimiento.

H.3.2.2. Para las cepas bacterianas:

- Cepas sensibles a la mayoría de los antibióticos.
- Cepas sin trazabilidad de su origen ni antibiograma confirmado.

H.4. Variables

Cuadro 4. Variables empleadas para el aislamiento de bacteriófagos.

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operativa
Muestra de agua residual	Independiente	Agua recolectada de la PTAR, rica en microbios incluyendo bacteriófagos, provenientes de desechos domésticos e industriales.	Agua recolectada en frascos estériles del punto de entrada de la PTAR de la Ciudad de Panamá; transportada en cadena de frío y procesada en menos de 6 h.
Cepa bacteriana blanco	Independiente	Cepas bacterianas seleccionadas como objetivo de evaluación, previamente caracterizadas como multirresistentes.	Cepas de <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> spp. y <i>P. aeruginosa</i> resistentes a múltiples antibióticos, identificadas por antibiograma y conservadas en medios de cultivo específicos.
Actividad lítica del fago	Dependiente	Capacidad del fago para destruir células bacterianas mediante lisis, lo cual indica su efectividad como agente antibacteriano.	Observación de zonas de lisis (claras) en ensayos de doble capa de agar; presencia/ausencia o grado de formación de Unidades Formadoras de Placas (cuantificadas como PFU).
Título del bacteriófago	Dependiente cuantitativa	Concentración de partículas fágicas infectivas, expresada como unidades formadoras de placa por mililitro (PFU/mL).	Conteo de placas de lisis en diluciones seriadas usando la técnica de doble capa; se registra el resultado en PFU/mL.

Tipo de ácido nucleico	Dependiente cualitativa	Naturaleza del material genético del fago, que puede ser ADN o ARN, lo cual influye en su clasificación y replicación.	Determinado mediante tratamiento con enzimas específicas (DNasas o RNasas) y verificación por electroforesis en gel de agarosa.
Características biológicas	Dependiente cualitativa	Propiedades como estabilidad térmica, tolerancia a pH extremos o resistencia a luz UV/cloro, que definen la utilidad del fago en distintas condiciones.	Ensayos de estabilidad bajo diferentes condiciones (temperatura, pH, UV, cloro); resultados registrados como “estable” o “inestable” según presencia de lisis tras el tratamiento.
Características genéticas	Dependiente cualitativa	Información genética del fago, incluyendo tipo de genoma, genes asociados a funciones estructurales, replicación, y factores de virulencia.	Secuenciación del genoma por Illumina, ensamblaje y anotación bioinformática; análisis de similitud y búsqueda de genes funcionales y de virulencia mediante bases de datos.
Condiciones del cultivo	Variable controlada	Factores experimentales que afectan el aislamiento y propagación de fagos, tales como medio de cultivo, cepa hospedera, temperatura y tiempo de incubación.	Condiciones estandarizadas: medio LB o TSA, incubación a 37°C, cepas específicas, tiempos definidos según protocolo para evitar sesgos entre ensayos.

H.5. Área de muestreo

La PTAR opera bajo un sistema biológico avanzado, caracterizado por la recirculación de lodos activados, la remoción eficiente de nutrientes (nitrógeno y fósforo) y la recuperación de biogás. Su funcionamiento se basa en la actividad metabólica de microorganismos especializados que, en condiciones aeróbicas (con presencia de oxígeno), asimilan los contaminantes presentes en las aguas residuales como fuente de alimento. Este proceso biológico garantiza una depuración integral del efluente.

La capacidad de diseño de esta infraestructura es de 2.2 metros cúbicos por segundo (m³/s), lo que la posiciona como una instalación de gran envergadura. Actualmente, la PTAR procesa la totalidad de las aguas residuales provenientes de los colectores de Matías Hernández y Quebrada Palomo, además de una parte significativa de las que se originan en el colector de Matasnillo. El caudal

total de entrada a la planta es de 2.2 m³/s, lo que indica que opera a su capacidad nominal, gestionando la carga hidráulica de manera óptima.

El punto de descarga del efluente tratado se localiza estratégicamente en la desembocadura del Río Juan Díaz. Es crucial destacar que la calidad del agua descargada cumple rigurosamente con los parámetros establecidos en la normativa DGNTI-COPANIT-35-2000, lo que asegura un impacto ambiental mínimo y la protección de los ecosistemas acuáticos receptores^{134,135}.

H.6. Procedimiento de recolección de datos.

H.6.1. Recolección de muestras

Se efectuaron 15 muestreos, recolectándose 30 muestras de aguas residuales de la PTAR de la Ciudad de Panamá, de 100 mL cada una. Las muestras fueron identificadas como "agua residual PTAR" y se recolectaron el [Fecha de recolección]. Estas fueron depositadas en recipientes estériles para uroanálisis con tapa de rosca de 100 mL, y transportadas bajo cadena de frío desde la PTAR de la Ciudad de Panamá hasta los Laboratorios de Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA) y Microbiología de Aguas (LAMA) de la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado, Universidad de Panamá.

H.6.2. Información de las cepas hospederas

Cuadro 5. Listado de cepas ATCC empleadas como hospederas para el aislamiento de bacteriófagos.

Cepa ATCC	Especie / Serovar
ATCC 12228	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
ATCC 29737	<i>Staphylococcus aureus</i>
ATCC 6538	<i>Staphylococcus aureus</i>
ATCC 29934 / 12325	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>
ATCC 9842	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Bispebjerg</i>
ATCC 14028	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>
ATCC 27853, 9027, 15442	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ATCC 8739, 11229, 10536	<i>Escherichia coli</i>

H.6.3. Cultivo de la bacteria hospedadora

Para el aislamiento de los bacteriófagos, se seleccionaron las cepas ATCC 12228 de *S. epidermidis*, 29737 de *S. aureus*, 6538 de *S. aureus*, 29934 de *Salmonella enterica* subespecie Diarizonae, 9842 de *Salmonella enterica* subespecie Enterica serovar Bispebjerg, 12325 de *Salmonella enterica* subespecie Diarizonae, 14028 de *Salmonella enterica* subespecie Enterica serovar Typhimurium, 27853 de *P. aeruginosa*, 9027 de *P. aeruginosa*, 15442 de *P. aeruginosa*, 8739 de *E. coli*, 11229 de *E. coli*, y 10536 de *E. coli*.

En resumen, según metodología utilizada por Gabriel Gaviria et al. (2012)¹³⁶ con ligeras modificaciones, se utilizará como medio de cultivo para las cepas bacterianas ATCC caldo Luria Bertani (LB). En tubos de cristal con tapa de rosca de 15 mL, que contenían 10 mL de caldo LB se le agregaron 100 µL de la suspensión previamente realizada de la bacteria hospedadora, dejándola crecer entre 18 – 20 h a 37°C.

H.6.4. Enriquecimiento

Se tomaron 2 mL del agua residual filtrada agregándole a un tubo de cristal con tapa de rosca de 10 mL que contendrá 2.5 mL de caldo nutritivo al doble de su concentración y 200 µL de un cultivo de la cepa ATCC seleccionada como hospedera con aproximadamente 18 – 20 h de crecimiento, en presencia de cloruro de calcio (CaCl₂) 10 mM. Seguidamente, se incubaron durante 24 h a 37°C.

H.6.5. Aislamiento y purificación de bacteriófagos.

En resumen, según metodología utilizada por Jamalludeen et al. (2007)¹³⁷ con ligeras modificaciones, cada muestra de agua residual se analizaron para determinar la presencia de bacteriófagos capaces de formar placas de lisis en presencia de cepas hospederas ATCC 12228 de *S. epidermidis*, 29737 de *S. aureus*, 6538 de *S. aureus*, 29934 de *S. enterica* subespecie Diarizonae, 9842 de *S. enterica* subespecie Enterica serovar Bispebjerg, 12325 de *S. enterica* subespecie Diarizonae, 14028 de *S. enterica* subespecie Enterica serovar Typhimurium, 27853 de *P. aeruginosa*, 9027 de *P. aeruginosa*, 15442 de *P. aeruginosa*, 8739 de *E. coli*, 11229 de *E. coli*, y 10536 de *E. coli*, donde las

muestras de aguas residuales se centrifugaron a 8.500 x g durante 15 min en tubos cónicos de 15 mL, y seguidamente, se recuperó el sobrenadante y se filtró con filtros de jeringuilla de acetato de celulosa con poros de 0.45 µm y 0.22 µm.

H.6.6. Prueba de Spot Test para la verificación de presencia de bacteriófagos.

Se dibujarán 3 círculos en la base de un plato Petri con agar nutritivo, luego se mezclará 1 mL de cultivo bacteriano de 20 h en un tubo de ensayo con 3 mL de top-agar (caldo nutritivo + agar-agar 0.7% precalentado a 45°C en baño María), se distribuirá por toda la superficie del plato Petri con agar Nutritivo (13 mL) y se dejará reposar por 10 min hasta que solidifique.

En 2 de los 3 círculos previamente dibujados, se colocarán 5 µL de filtrado de bacteriófagos, en el tercer círculo se colocarán 5 µL de agua destilada estéril como control negativo y los platos, se incubaron a 37°C durante 24 h.

Después, se verificó la presencia de placa de lisis en los espacios donde se colocaron los 5 µL del filtrado, para confirmar la presencia de bacteriófagos lisando a la bacteria en estudio.

H.6.7. Aislamiento

Pasadas las 24 h, el volumen enriquecido se centrifugó a 8500 x g durante 15 min en tubos cónicos de 15 mL, se recuperará el sobrenadante y se filtró utilizando filtros de jeringuilla de acetato de celulosa de 0.22 µm.

Se inocularon 100 µL de un cultivo de cepas bacterianas ATCC 12228 de *S. epidermidis*, 29737 de *S. aureus*, 6538 de *S. aureus*, 29934 de *S. enterica* subespecie *Diarizonae*, 9842 de *S. enterica* subespecie *Enterica* serovar *Bispebjerg*, 12325 de *S. enterica* subespecie *Diarizonae*, 14028 de *S. enterica* subespecie *Enterica* serovar *Typhimurium*, 27853 de *P. aeruginosa*, 9027 de *P. aeruginosa*, 15442 de *P. aeruginosa*, 8739 de *E. coli*, 11229 de *E. coli*, y 10536 de *E. coli*, con 300 µL del sobrenadante filtrado y en presencia de CaCl₂ a 10 mM, respectivamente. La mezcla se incubó por 30 min a temperatura ambiente (TA) y luego, esta se agregará a 3 mL de Top Agar (caldo nutritivo + agar-agar 0.7% precalentado a 45°C en baño María), mezclando y evitando formar burbujas, para seguidamente, verterla sobre un plato Petri con agar nutritivo (13

mL). Se dejará solidificar el agar, para posteriormente incubar los platos a 30°C durante 24 h, manteniendo los platos Petri invertidos.

H.6.8. Purificación

Pasadas las 24 h, se inspeccionarán los platos para verificar la presencia de placas de lisis. Empleando una punta de micropipeta estéril, se tomará una placa (se asegurará tomar también parte del agar) y se resuspendió en 150 µL de buffer SM-gelatina (NaCl y MgSO₄·7H₂O Tris-Cl y gelatina), se mezclará exhaustivamente con la micropipeta y se dejará incubar a TA durante 30 min. Durante este tiempo, se homogeneizaron cada 10 min utilizando un vortex por 5 s. Después, se prepararon diluciones seriadas de base 10, desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁴ en buffer SM-gelatina.

Se enfrentarán 100 µL de cada dilución con 100 µL del cultivo de las cepas bacterianas seleccionadas como hospedadoras (con un tiempo de crecimiento de aproximadamente 18 – 20 h) a TA durante 30 min en presencia de CaCl₂ a 10 mM. Luego, cada mezcla se agregó a 3 mL de top-agar (caldo nutritivo + agar-agar 0.7% precalentado a 45°C en baño María) en presencia de CaCl₂ a 10 mM y 50 µL de azul de metileno al 40%, se mezcló evitando formar burbujas y se vertió sobre un plato Petri con agar nutritivo (13.0 mL). Se dejó solidificar el agar y se incubó a 30°C durante 24 h, manteniendo los platos de Petri invertidos.

Los platos se examinaron para seleccionar una placa clara. Si se está aislando un nuevo bacteriófago, se repetirá todo el procedimiento de purificación por lo menos 4 a 5 veces hasta que la morfología de las placas sea homogénea, lo que indicaría la presencia de un único bacteriófago.

H.6.9. Determinación del Título Viral

La concentración o título del bacteriófagos se determinó empleando la técnica de doble capa de agar como se describió previamente por Jamalludeen *et al.* (2007)^{137–139} con ligeras modificaciones. Resumiendo, se tomaron 100 µL de filtrado de bacteriófagos y se realizaron diluciones seriadas de los lisados de bacteriófagos desde 10⁻¹ hasta 10⁻¹⁰, en tubos eppendorf con 900 µL de buffer SM-gelatina. Posteriormente, se tomaron 100 µL de cultivo bacteriano con un tiempo de crecimiento de aproximadamente 18 – 20 h y se enfrentarán con 100

μL de cada dilución seriada en presencia de CaCl₂ a 10 mM y se dejarán incubando a TA entre 10 - 30 min. Este enfrentamiento se mezclará con 3 mL de top-agar (caldo nutritivo + agar-agar 0.7% precalentado a 45°C en baño María), y CaCl₂ a 10 mM.

Seguidamente, cada suspensión se vertió sobre platos Petri con agar nutritivo (13 mL) y se extendió uniformemente por toda la superficie con ligeros movimientos circulares. Se mantuvieron a TA hasta que el agar solidificó por completo y se incubaron a 37°C durante 24 h.

Al día siguiente, se contaron los puntos claros donde no hubo crecimiento tomando a cada uno de ellos como 1 UFP. Para realizar el recuento, sólo se tomarán en cuenta aquellos platos que muestren de 30 a 300 UFP.

El título viral se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\text{UFP/mL} = \text{N}^{\circ} \text{ de UFP} \times \text{Factor de dilución} / \text{volumen de la alícuota}$$

La concentración de bacteriófagos se expresa como UFP/mL.

H.6.10. Propagación de Bacteriófagos

A partir de los bacteriófagos purificados, se procedió a su propagación para alcanzar una concentración adecuada para realizar los estudios. Para ello, se mezclaron 1 mL del cultivo bacteriano con 100 μL del bacteriófago purificado en un tubo de ensayo con 3 mL de top-agar (caldo nutritivo + agar-agar 0.7% precalentado a 45°C en baño María), todo en presencia de CaCl₂ 10 mM. La mezcla se vertió en un plato Petri con medio agar nutritivo y se dejó en reposo hasta secar. Se incubaron los platos a 37°C durante 24 h.

Luego, se verificó la presencia de placas de lisis y se le añadieron 6 mL de buffer SM-gelatina (NaCl y MgSO₄ · 7H₂O Tris-Cl y gelatina) a cada plato. Los platos Petri se incubaron toda la noche a 4°C y el líquido sobre el agar se recuperó y centrifugó a 10,000 x g a 4°C durante 10 min. El sobrenadante se filtró con filtros de acetato de celulosa de 0.22 μm. Posteriormente, se calculó la concentración obtenida y los bacteriófagos se almacenaron a 4°C protegidos de la luz.

H.6.11. Concentración de Bacteriófagos

Los lisados que resultaron de la propagación, se utilizaron para sedimentar los bacteriófagos y obtener el título necesario para la extracción de los ácidos nucleicos, microscopía electrónica (aprox. 10^{12} UFP/mL). La sedimentación de las partículas virales se realizó tomando 40 mL del lisado de bacteriófagos, se centrifugó a 24000 x g por 4 h a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 10 mL de buffer SM-gelatina, se resuspendió, se filtró utilizando filtros de acetato de celulosa de 0.22 μ m. y se almacenó a 4°C en tubos cónicos de 15 mL hasta su posterior utilización.

H.6.12. Microscopía Electrónica de Transmisión

Se tomaron 4 μ L de las muestras en tampón base estéril tampón SM sin gelatina pH 7.5 (NaCl y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Tris-Cl)¹⁴⁰ y se colocaron sobre rejillas de cobre de 200 mesh cubiertas con una membrana de Formvar, en la cual se dejaron reposar por 1 min. Posteriormente, cada rejilla se sumergió durante 10 s en tres gotas separadas del agente de tinción Ácido Fosfotúngstico. Seguidamente, se eliminó el exceso de reactivo con papel filtro y se dejaron secar al aire para posteriormente observarlas con el microscopio electrónico de transmisión Hitachi modelo HT 7700.

H.7 Caracterización Biológica

H.7.1 Propagación de bacteriófagos en medio líquido

En un matraz tipo erlenmeyer de 125 mL con 10 mL de caldo LB se inocularon 100 μ L de un cultivo de entre 18 a 20 h de la cepa ATCC seleccionada como hospedera, *E. coli* 15597, 8739, 11229; *P. aeruginosa* 9027; *S. enterica* subespecie *enterica* serovar Bispebjerg 9842, *S. enterica* subespecie *diarizonae* 29934, *S. entérica* subespecie *Enterica* serovar Typhimurium 14028, cada una en su respectivo erlenmeyer y 100 μ L del lisado de bacteriófagos correspondiente para cada cepa, todo en presencia de cloruro de calcio a 10 mM. Se agitaron de 8 h a 100 rpm entre 22 a 24°C. Pasado este tiempo, la mezcla será centrifugada a 10000 rpm durante 25 min, se colectaron el sobrenadante y se filtraron con filtros de jeringuilla de acetato de celulosa con poros de 0.22 μ m. El filtrado se conservará en tubos cónicos de 15 mL a 4°C en la oscuridad hasta su uso.

H.7.2. Sensibilidad al cloroformo

En resumen, según metodología de Wong (1994)¹⁴¹ con ligeras modificaciones, en un tubo tipo eppendorf con 100 µL de cloroformo puro se sirvieran 0.5 mL del lisado del bacteriófago con un título entre 10^6 - 10^8 UFP/mL, se agitaron a TA durante 10 min y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min. Posteriormente, se determinará el título de los sobrenadantes por técnica de doble capa de agar.

Como control negativo en lugar de cloroformo se agregaron buffer SM-gelatina (NaCl y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Tris-Cl y gelatina) a la suspensión de bacteriófagos. Se realizará este ensayo por triplicado.

H.7.3. Efecto de la exposición a la luz UV

En resumen, según metodología de Wong (1994)¹⁴¹ con ligeras modificaciones, en un plato Petri se colocaron 2 mL del lisado fágico con un título de 10^7 UFP/mL y estos serán expuestos a una lámpara de luz UV (onda corta), por diferentes intervalos de tiempo (10, 20, 40, 60 y 90 s) a una distancia de 20 cm. Al cabo de cada intervalo de tiempo, se tomarán 100 µL para la realización de las correspondientes diluciones en buffer SM-gelatina y se determinará la infectividad del bacteriófago sobre la cepa indicadora por el método de doble capa de agar.

Como control negativo se empleó el lisado fágico sin exponerlo a la luz UV. Se realizaron los ensayos por triplicado.

H.7.4. Resistencia del fago al pH

La evaluación de la sensibilidad de los bacteriófagos a diferentes concentraciones de pH fue realizada de acuerdo con la metodología utilizada por Ul-Haq *et al.* (2012)¹⁴², 500 µL de bacteriófagos en solución buffer PBS estéril (0.1 M) con un título de 10^7 UFP/mL, serán dispensados en tubos de ensayo de tapa con rosca de 10 mL los cuales contendrán 5 mL de buffer PBS ajustado en intervalos de 2 unidades de pH, desde 3 hasta 8, utilizando HCl o NaOH a 25°C durante 1 h. Culminado el tiempo, se determinará el título final de los bacteriófagos mediante la técnica de la doble capa. Los tratamientos serán realizados por triplicado.

H.7.5. Efecto de la temperatura

Según Ul-Haq *et al.* (2012)¹⁴², se preparará una dilución de 1 mL del buffer PBS estéril (0.1 M) que contendrá bacteriófagos con un título de 10^7 UFP/mL, la misma será dispensada en tubos eppendorf de 1.5 mL y sometidos a temperaturas de 20, 30, 40, 50 y 60°C en baño María, durante 1 h. Concluido este tiempo, se determinará el título final de los bacteriófagos mediante la técnica de la doble capa. Los tratamientos fueron realizados por triplicado.

H.8. Caracterización Molecular

H.8.1. Extracción de ADN de bacteriófagos.

Para la extracción de ADN se utilizó el kit QIAamp MinElute Virus Spin Kit. según protocolo descrito por la casa fabricante (casa fabricante).

H.8.2. Secuenciación y preparación de librería

La secuenciación realizada en este estudio se basó en la tecnología de Illumina que utiliza amplificación clonal y secuenciación por síntesis (MiSeq Illumina ThermoFisher Scientific Waltham, Massachusetts EUA).

Para la preparación de librerías, se utilizó Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina), que consta de varios procesos: inicialmente todas las muestras se cuantifican y se diluyen a una concentración de 0.2 ng/μL. El material genético es posteriormente fragmentado. Luego, se añadieron los adaptadores Nextera XT Index Kit v2 (Illumina) seguido de un proceso de amplificación y purificación.

Las librerías se normalizaron a 4 nM como concentración de inicio, se realizó la agrupación de las librerías y luego, esta agrupación fue diluida a 10 pM. Como control para la secuenciación se utilizó PhiX Sequencing Control V3 (Illumina). Para la secuenciación se utilizó MiSeq Reagent Kit v2, 500 ciclos de lecturas en ambas direcciones.

H.8.3. Análisis Bioinformáticos

La calidad de las secuencias obtenidas fue evaluada con FastQC versión 0.72^{143,144}, mediante un ensamblaje “de novo” utilizando el software SPAdes versión 3.12.0^{144,145}. La secuencia ensamblada fue anotada utilizando la herramienta RAS kit (RASTtk)¹⁴⁶ y VIGOR4¹⁴⁷ del Centro de Recursos de

Bioinformática Bacteriana y Viral (BV-BRC)¹⁴⁸. Se construyó un árbol filogenético basado en las secuencias más relacionadas con el bacteriófago investigado. Para ello se realizó un BLAST de genomas completos homólogos y se construyó un árbol con la herramienta IQtree^{149,150}.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y

DISCUSIÓN

I. Resultados

I.1. Caracterización biológica

La caracterización biológica de los bacteriófagos determinó la estabilidad y resistencia de bacteriófagos frente a factores físicos y químicos, incluyó ensayos de propagación en medio líquido, sensibilidad al cloroformo, efecto de la radiación UV, estabilidad a distintos valores de pH, tolerancia a diferentes temperaturas y rango de hospederos. Las variables independientes fueron temperatura, pH, tiempo de exposición a UV, presencia de cloroformo, las variables dependientes, título de bacteriófagos (concentración). Estos análisis son fundamentales para determinar las condiciones óptimas de almacenamiento y uso de bacteriófagos en aplicaciones biotecnológicas y terapéuticas

I.1.1. Aislamiento y purificación

Los bacteriófagos demostraron una propagación exitosa en cultivo líquido. Tras 8 h de co-cultivo con sus respectivas cepas bacterianas hospedadoras (ej., *E. coli* ATCC 15597, 8739, 11229 (Figura 8. **Bacteriófagos aislados según cepa ATCC empleada como hospedera:** (1) *E. coli* 15597, (2) *E. coli* 11229, (3) *E. coli* 8739); *P. aeruginosa* ATCC 9027 (Figura 10. **Bacteriófagos aislados según cepa ATCC empleada como hospedera:** *Pseudomona aeruginosa* 9027); *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Bispebjerg ATCC 9842; *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 (Figura 9. **Bacteriófagos aislados según cepa ATCC empleada como hospedera:** (1) *S. enterica* subespecie *Enterica* serovar Typhimurium 14028, (2) *S. enterica* **subespecie** *Diarizonae* 29934, (3) *S. enterica* subespecie *Enterica* serovar Bispebjerg 9842), se observó la formación de lisados claros. Este fenómeno es indicativo de una lisis bacteriana completa o significativa, lo que confirma la naturaleza lítica de los bacteriófagos y su capacidad para multiplicarse eficientemente en medio líquido, alcanzando títulos virales iguales o superiores a 10^9 UFP/mL. La eficiencia de esta propagación permitió obtener lisados con concentraciones de fagos adecuadas para la realización de ensayos subsiguientes.

Se aislaron 7 bacteriófagos con posible actividad lítica, para las cepas ATCC 29934 *Salmonella enterica* subespecie *diarizonae*, 9842 *S. enterica* subespecie *enterica* serovar bispebjerg, 14028 *S. enterica* subespecie *enterica* serovar

typhimurium, 8739 *E. coli*, 11229 *E. coli*, 15597 *E. coli* y *P. aeruginosa* ATCC 9097 (Cuadro 6. Lista de bacteriófagos aislados empleados en la extracción de ADN y estudios moleculares.).

Se realizaron 5 pasos de purificación y una titulación final por el método de doble capa de agar.

Estos fagos purificados se alicuotaron en crioviales de 2.00 mL a una relación 1:1 con glicerol al 40%.

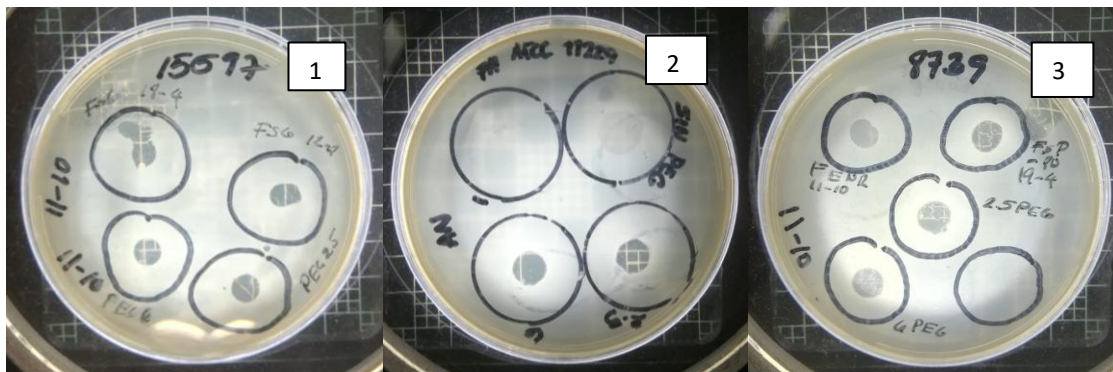


Figura 8. Bacteriófagos aislados según cepa ATCC empleada como hospedera: (1) *E. coli* 15597, (2) *E. coli* 11229, (3) *E. coli* 8739.

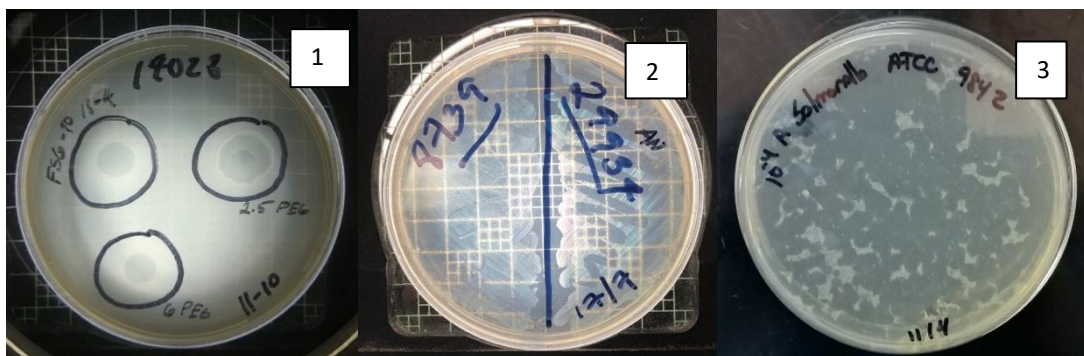


Figura 9. Bacteriófagos aislados según cepa ATCC empleada como hospedera: (1) *S. enterica* subespecie Enterica serovar Typhimurium 14028, (2) *S. enterica* subespecie Diarizonae 29934, (3) *S. enterica* subespecie Enterica serovar Bispebjerg 9842.

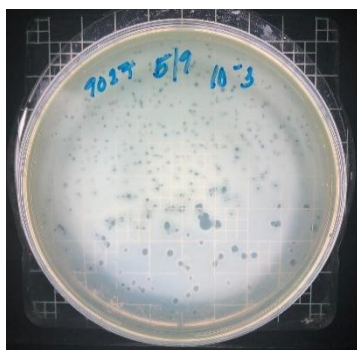


Figura 10. Bacteriófagos aislados según cepa ATCC empleada como hospedera: *Pseudomonas aeruginosa* 9027.

Cuadro 6. Lista de bacteriófagos aislados empleados en la extracción de ADN y estudios moleculares.

Cepa ATCC empleada para el aislamiento de bacteriófagos	Dilución	UFP	Concentración
<i>E. coli</i> 15597	10^{-5}	155	1.55×10^8 UFP/mL
<i>E. coli</i> 11229	10^{-4}	115	1.15×10^7 UFP/mL
<i>E. coli</i> 8739	10^{-5}	80	8.0×10^7 UFP/mL
<i>S. enterica</i> subespecie <i>Diarizonae</i> 29934	10^{-8}	52	5.2×10^{10} UFP/mL
<i>S. enterica</i> subespecie <i>Enterica</i> serovar <i>Bispebjerg</i> 9842	10^{-6}	100	10×10^9 UFP/mL
<i>S. enterica</i> subespecie <i>Enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> 14028	10^{-9}	79	7.9×10^{11} UFP/mL
<i>P. aeruginosa</i> 9027	10^{-7}	150	1.5×10^{10} UFP/mL

I.1.2. Sensibilidad de los fagos al cloroformo

La mayoría de los bacteriófagos analizados, los tres aislados de *E. coli* (15597, 11229 y 8739) y el aislado de *S. enterica* serovar Typhimurium 14028 demostraron resistencia al cloroformo, manteniendo o incluso incrementando su título viral tras la exposición al solvente. El caso más notable fue el del bacteriófago de *E. coli* 11229, cuyo título se incrementó más de tres órdenes de magnitud (de 4.30×10^3 a 5.20×10^6 UFP/mL). Este comportamiento es característico de bacteriófagos sin envoltura lipídica como la mayoría de los pertenecientes a la clase *Caudoviricetes* y el incremento observado podría explicarse por la lisis de agregados bacterianos residuales o por la desagregación de complejos fago-detrito celular presentes en el lisado original,

lo que libera partículas infecciosas previamente subestimadas en el recuento control.

En contraste, el bacteriófago aislado contra *S. enterica* serovar Bispebjerg 9842 mostró un comportamiento claramente distinto, con una reducción de su título superior al 90% tras el tratamiento (de 4.90×10^9 a 4.60×10^8 UFP/mL). Esta susceptibilidad selectiva al cloroformo sugiere la presencia de componentes estructurales sensibles a solventes orgánicos, posiblemente una envoltura lipídica o dominios hidrofóbicos en las proteínas de cápside susceptibles a desnaturalización por el solvente.

Es importante señalar que, para los bacteriófagos aislados contra *S. enterica* subespecie *Diarizonae* 29934 y *P. aeruginosa* 9027, no se generaron datos en este ensayo, por lo que no fue posible incluirlos en el análisis comparativo de sensibilidad al cloroformo (Figura 11).

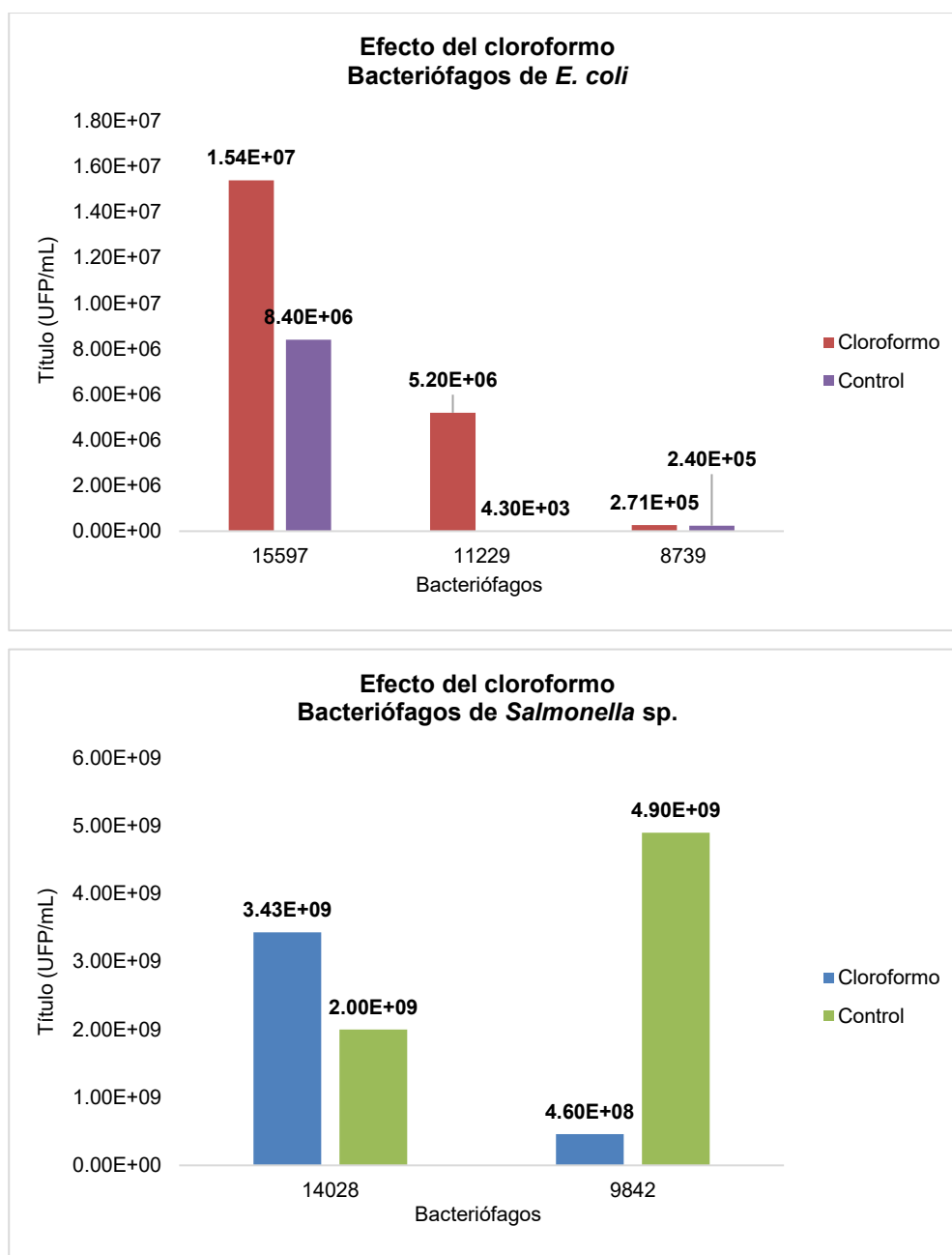


Figura 11. Efectos del cloroformo en bacteriófagos: a. En cepa ATCC de *E. coli* y b. En cepa ATCC de *Salmonella sp*

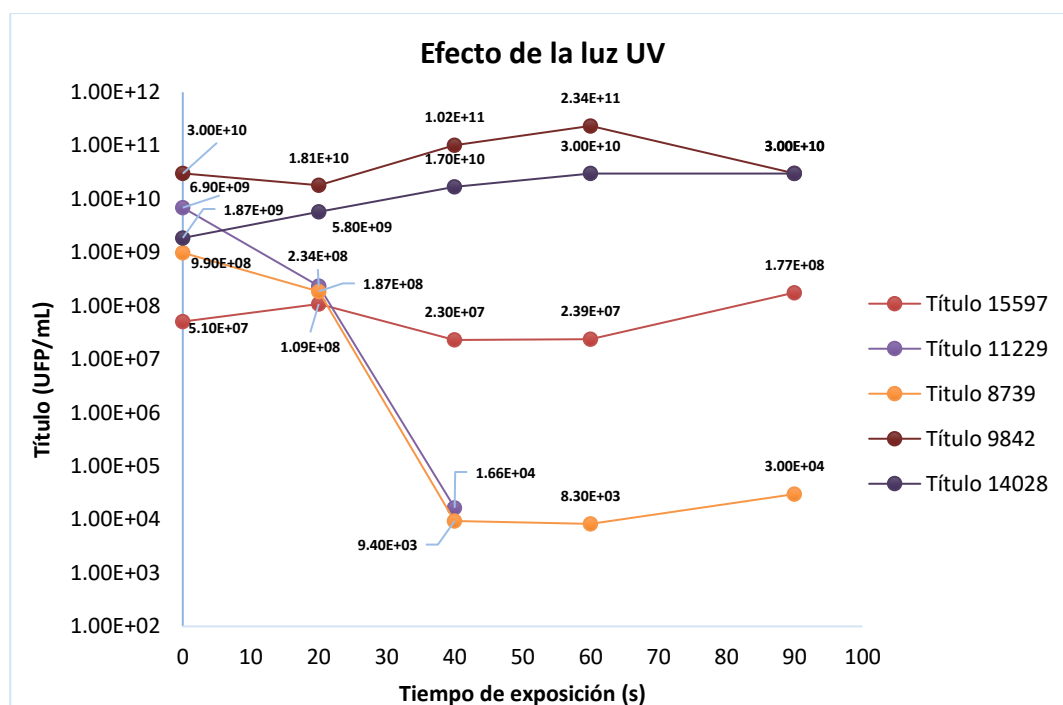
I.1.3. Efecto de la exposición a luz UV

Los bacteriófagos de *E. coli* 11229 y *E. coli* 8739 mostraron el comportamiento esperado frente a la radiación UV: una disminución sostenida y pronunciada del título viral conforme se incrementó el tiempo de exposición. El fago de *E. coli* 11229 fue el más sensible, con una reducción de más de cinco órdenes de magnitud entre 0 s (6.90×10^9 UFP/mL) y 40 s (1.66×10^4 UFP/mL), llegando a

inactivación total (título indetectable) a partir de los 60 s. De forma similar, el fago de *E. coli* 8739 se redujo de 9.90×10^8 UFP/mL en el tiempo inicial a valores cercanos a 10^4 UFP/mL a partir de los 40 s, manteniéndose en niveles residuales hasta los 90 s. Este patrón es consistente con el mecanismo de acción conocido de la radiación UV de onda corta, que induce la formación de dímeros de pirimidina en el ácido nucleico viral, comprometiendo la replicación y, en consecuencia, la capacidad infectiva del fago.

El bacteriófago de *E. coli* 15597 mostró un comportamiento más irregular, con fluctuaciones del título a lo largo del tiempo de exposición (incremento inicial a los 20 s, seguido de una caída a los 40–60 s y un repunte marcado a los 90 s, hasta 1.77×10^8 UFP/mL), sin una tendencia de inactivación clara dentro del rango de tiempo evaluado. Esta variabilidad podría atribuirse a heterogeneidad en la disposición del lisado durante la exposición (por ejemplo, diferencias en la profundidad de la columna de líquido irradiada) o a errores de recuento en placa entre réplicas, y amerita repetición del ensayo para confirmar la tendencia real. De manera notable, los bacteriófagos de *S. enterica* serovar Bispebjerg 9842 y *S. enterica* serovar Typhimurium 14028 no mostraron inactivación por UV; por el contrario, ambos presentaron un incremento progresivo y sostenido del título viral conforme aumentó el tiempo de exposición, alcanzando valores hasta un orden de magnitud superiores a los del control sin exposición (9842: de 3.00×10^{10} a 2.34×10^{11} UFP/mL a los 60 s; 14028: de 1.87×10^9 a 3.00×10^{10} UFP/mL a los 60–90 s). Este resultado es contrario al efecto biológico esperado de la radiación UV y no es atribuible a un mecanismo de fotorreactivación conocido, dado que los lisados no fueron expuestos a luz visible posteriormente. Resulta más probable que este incremento aparente refleje un artefacto experimental como la desagregación de complejos fago-bacteria residuales por efecto térmico o fotolítico de la lámpara UV, liberando partículas infecciosas previamente no contabilizadas o bien un error de dilución o recuento en estos puntos específicos.

No se generaron datos de fotosensibilidad UV para los bacteriófagos aislados contra *S. enterica* subespecie *Diarizonae* 29934 ni *P. aeruginosa* 9027 (Figura 12).



Exposición en segundos	Título 15597	Título 11229	Título 8739	Título 9842	Título 14028
0	5.10E+07	6.90E+09	9.90E+08	3.00E+10	1.87E+09
20	1.09E+08	2.34E+08	1.87E+08	1.81E+10	5.80E+09
40	2.30E+07	1.66E+04	9.40E+03	1.02E+11	1.70E+10
60	2.39E+07	0.00E+00	8.30E+03	2.34E+11	3.00E+10
90	1.77E+08	0.00E+00	3.00E+04	3.00E+10	3.00E+10

Figura 12. Efectos de la luz UV en bacteriófagos aislados.

I.1.4. Estabilidad del fago a diferentes pH

La mayoría de los aislados bacteriófagos de *E. coli* 15597, *E. coli* 11229 y *S. enterica* serovar Bispebjerg 9842 mostró un incremento progresivo y monótonico del título viral conforme el pH del medio aumentó de ácido a alcalino, alcanzando en los tres casos su valor máximo en pH 9 y su valor mínimo en pH 3. La magnitud de esta variación fue considerable: el bacteriófago de *E. coli* 11229, por ejemplo, incrementó su título en aproximadamente dos órdenes de magnitud entre pH 3 (3.00×10^6 UFP/mL) y pH 9 (4.90×10^8 UFP/mL).

Este comportamiento indica que la infectividad de estos tres aislados no responde a un óptimo puntual en condiciones neutras, sino a una mayor estabilidad estructural en medios neutros a alcalinos, con una marcada sensibilidad a la acidez extrema. La pérdida de infectividad en pH 3 es consistente con la desnaturalización de proteínas de la cápside y de las fibras de cola, así como con la posible desestabilización de las interacciones entre la

cápside y el ácido nucleico viral bajo condiciones de acidez pronunciada, mecanismo descrito ampliamente en la literatura como causa de inactivación fágica¹⁵¹.

Los aislados correspondientes a *S. enterica* serovar Typhimurium 14028 y *E. coli* 8739 no siguieron esta tendencia. El bacteriófago 14028 mostró su título máximo en pH 5 (3.00×10^{10} UFP/mL), con valores decrecientes hacia pH 7 y pH 9, mientras que el bacteriófago de *E. coli* 8739 presentó una caída abrupta de varios órdenes de magnitud en pH 7 (4.10×10^3 UFP/mL) respecto a los valores registrados en pH 3 y pH 9. Estas discrepancias podrían atribuirse a particularidades fisiológicas propias de cada aislado, por ejemplo, una posible adaptación del fago 14028 a microambientes de menor pH o bien a la variabilidad inherente al diseño experimental empleado, por lo que estos resultados fueron interpretados con cautela porque además es posible que sea necesario corroborarlos mediante ensayos adicionales.

En conjunto, los resultados sugieren que los bacteriófagos aislados presentan una infectividad estable en el rango de pH 5 a 9, con una inactivación sustancial en condiciones de acidez extrema (pH 3) (Figura 13).

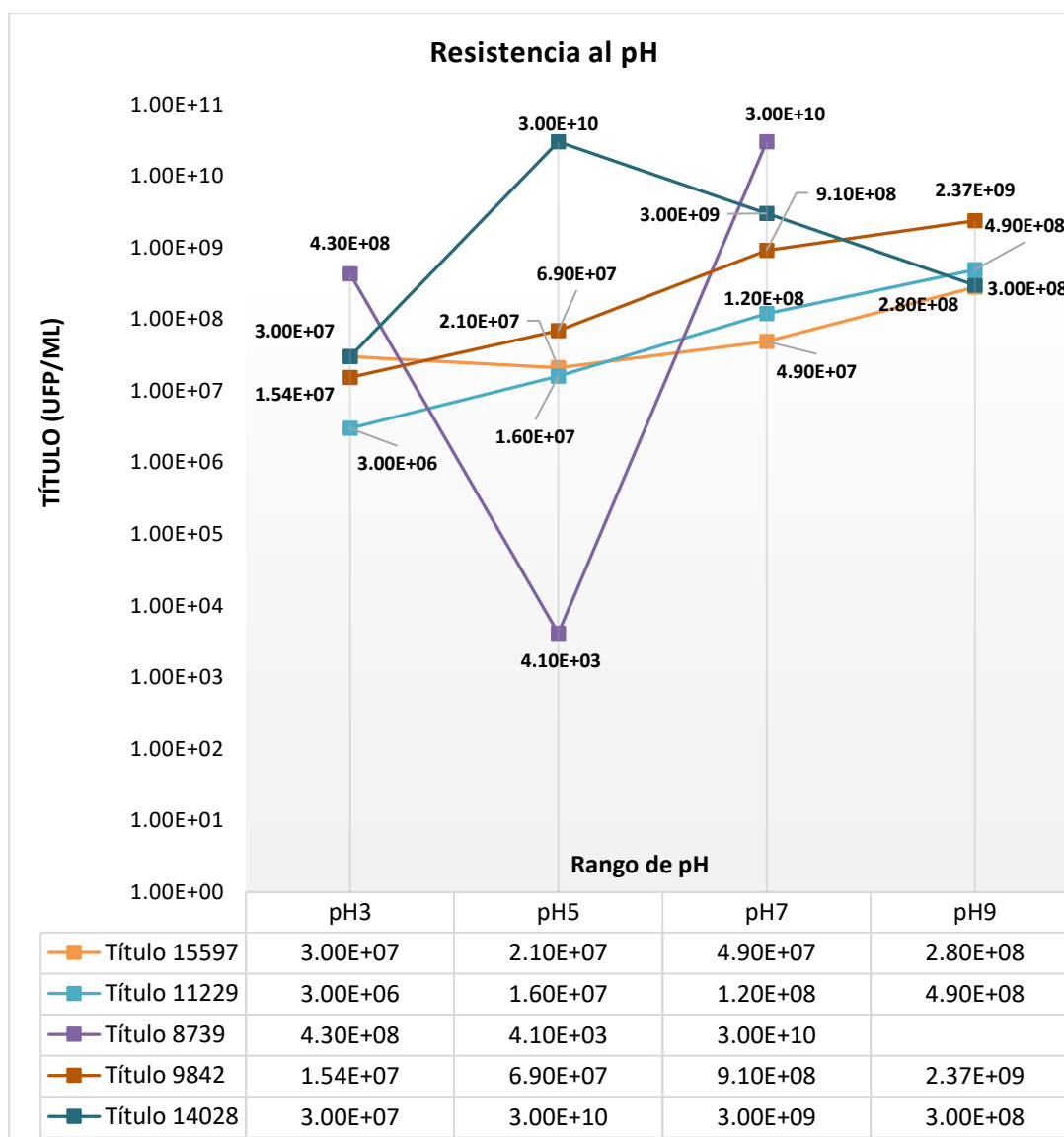


Figura 13. Efectos del pH en bacteriófagos aislados.

1.1.5. Efecto de la temperatura en la viabilidad del fago

La mayoría de los bacteriófagos evaluados *E. coli* 11229, *E. coli* 8739, *S. enterica* serovar Bispebjerg 9842 y *S. enterica* serovar Typhimurium 14028 mostraron su título máximo a 37°C, manteniendo una viabilidad elevada a 25°C y una reducción moderada a 50°C, sin pérdida drástica de infectividad en este último punto. Este patrón es consistente con una adaptación fisiológica de los fagos a la temperatura corporal de sus hospederos bacterianos naturales, dado que 37°C corresponde a la temperatura óptima de crecimiento de enterobacterias como *E. coli* y *Salmonella* spp.

En contraste, los cuatro aislados mencionados presentaron una inactivación marcada a 70°C, con reducciones de entre 3 y 6 órdenes de magnitud respecto

a sus valores máximos. El caso más pronunciado correspondió al bacteriófago de *S. enterica* serovar Typhimurium 14028, cuyo título disminuyó de 3.00×10^{10} UFP/mL a 37°C hasta 8.20×10^3 UFP/mL a 70°C, equivalente a una pérdida de aproximadamente seis órdenes de magnitud. Esta inactivación térmica severa es atribuible a la desnaturalización de proteínas estructurales de la cápside y/o al daño del ácido nucleico viral inducido por las altas temperaturas.

El bacteriófago de *E. coli* 15597 constituyó una excepción a este patrón general: su título viral fue máximo a 25°C (6.20×10^{10} UFP/mL), casi dos órdenes de magnitud superior al registrado a 37°C (5.70×10^8 UFP/mL), con una disminución progresiva hacia 50°C y 70°C. Esta inversión respecto a la temperatura óptima observada en los demás aislados sugiere que este bacteriófago podría poseer una mayor sensibilidad térmica basal o una estabilidad estructural diferencial que favorece su conservación a temperatura ambiente por encima de la temperatura fisiológica de su hospedero, aspecto que podría profundizarse en estudios posteriores de estabilidad estructural.

En conjunto, los resultados indican que los bacteriófagos aislados con la notable excepción de *E. coli* 15597 presentan viabilidad óptima entre 25°C y 37°C, tolerancia razonable hasta 50°C e inactivación severa por encima de este umbral. Estos hallazgos son relevantes para definir las condiciones de almacenamiento y manipulación de los lisados fágicos en aplicaciones posteriores, como la terapia fágica o la bioconservación de alimentos, recomendándose mantener las preparaciones entre 4°C y 37°C para preservar su infectividad. Al igual que en el ensayo de sensibilidad al cloroformo, no se generaron datos de termoestabilidad para los bacteriófagos aislados contra *S. enterica* subespecie *Diarizonae* 29934 ni *P. aeruginosa* 9027 (Figura 14).

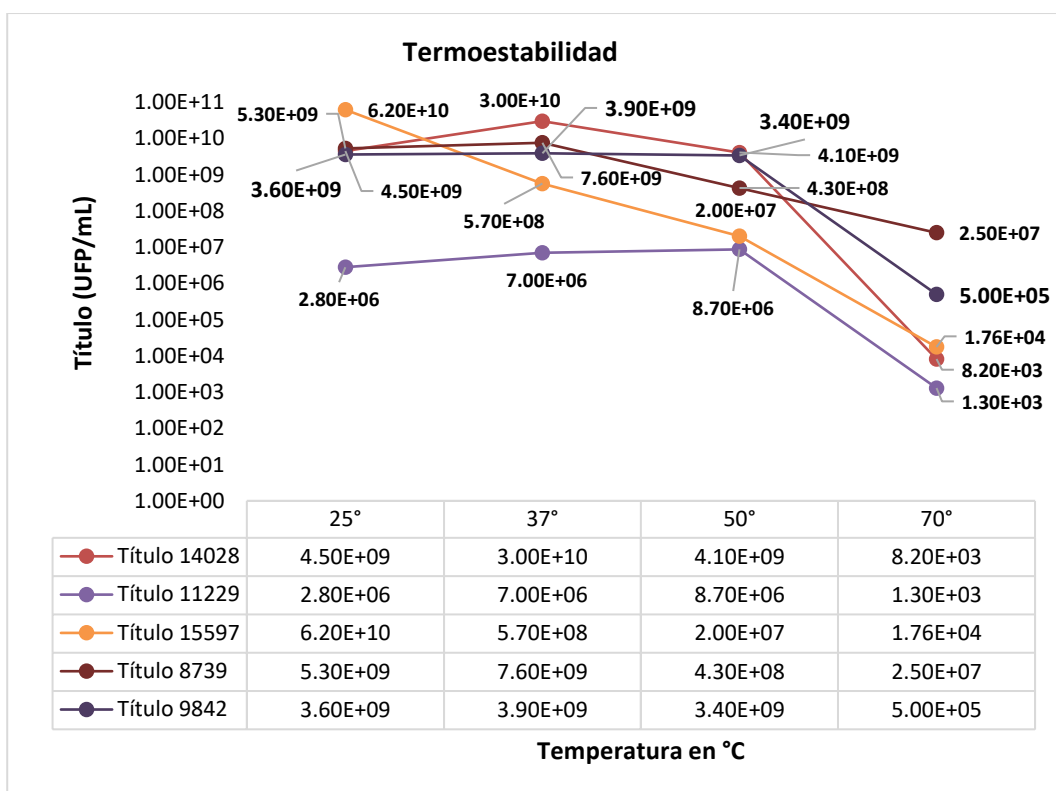


Figura 14. Efectos de la temperatura en bacteriófagos aislados.

I.2. Resultado de análisis de secuencias de fagos, genoma completo: ensamblaje, anotación de proteínas.

I.2.1 Ensamblaje del genoma completo, de *novo*

El ensamblaje de novo permite reconstruir el genoma completo de un organismo sin una secuencia de referencia previa. En estudios de fagos, este método es esencial porque sus genomas suelen presentar alta variabilidad y recombinación genética. Los valores de cobertura (depth) altos garantizan la confiabilidad del ensamblaje y reducen errores de secuenciación^{145,152}.

Cuadro 7. Resumen de los resultados de ensamblaje de las secuencias obtenidas para los genomas de los fagos aislados.

Muestra	Fago similar	Taxonomía	Longitud (pb)	%G C	Profundidad de secuenciación
11229B	Enterobacteria phage vB_EcoM_VR20	Gaprivervirus	171,406	40.4	158x
	Escherichia phage vB_EcoM_G2469	Mosigvirus	169,937	37.7	934x
14028B	Salmonella phage Siskin	Chivirus	59,198	56.5	3493x
15597B	Escherichia phage LH01	Mosigvirus	169,937	37.7	1537x
8739B	Escherichia phage vB_EfeM_pEP20	Caudoviricetes	87,679	39.0	455x
9027B	Pseudomonas phage debbie	Pbunavirus	66,636	55.6	1507x
9842B	Salmonella phage Siskin	Chivirus	58,693	56.5	3833x

El ensamblaje genómico *de novo* permitió la obtención de secuencias completas y de alta calidad para los fagos aislados. Las longitudes genómicas oscilaron entre 58,693 pb y 171,406 pb, con un contenido de GC entre 37.7% y 56.5%, reflejando la diversidad estructural y taxonómica entre los aislamientos (Cuadro 7).

Las muestras 11229B y 15597B mostraron similitud con *Escherichia phage* vB_EcoM_VR20 y *Escherichia phage* LH01, respectivamente, ambos pertenecientes al género *Mosigvirus*, caracterizados por genomas lineales de ADN de doble cadena y bajo contenido GC (~38 %) ²².

Por su parte, las muestras 14028B y 9842B presentaron homología con *Salmonella phage* Siskin, con un contenido GC elevado (56.5 %) y longitud cercana a 59 kb, características típicas de fagos del género *Chivirus* ¹⁵³.

La muestra 9027B mostró un genoma de 66,636 pb y GC = 55.6 %,

correspondiente al *Pseudomonas phage debbie*, del género *Pbunavirus*, descrito como un grupo con alto potencial lítico y aplicaciones terapéuticas¹⁵⁴.

Finalmente, la muestra 8739B se agrupó dentro de *Caudoviricetes*, con un genoma de 87,679 pb y un GC de 39 %, concordante con fagos tipo *Myoviridae*, que presentan colas contráctiles y genomas medianos¹⁴.

La profundidad de secuenciación varió entre 158x y 3833x, asegurando una adecuada cobertura genómica y confiabilidad en los ensamblajes. Coberturas superiores a 100x permiten una reconstrucción precisa de genomas virales, garantizando la identificación completa de regiones codificantes y no codificantes¹⁵⁵.

1.2.2. Anotación de proteínas utilizando Pharokka

Pharokka es una herramienta rápida y escalable para la anotación estandarizada de genomas y metagenomas de bacteriófagos, diseñada para facilitar la asignación de funciones proteicas y la generación de salidas listas para análisis downstream¹⁵⁶.

Fago *E. coli* ATCC 15597 (15597B): El análisis del genoma de este bacteriófago reveló un total de 286 secuencias codificantes (CDS) predichas. Estas CDS abarcan diversas categorías funcionales: se identificaron genes que codifican componentes estructurales del virión (cabeza, cola y conector), enzimas involucradas en el metabolismo de ácidos nucleicos (replicación, reparación y modificación de DNA/RNA), proteínas asociadas a la lisis bacteriana (p. ej., endolisinas y holinas) y varios posibles factores de regulación transcripcional viral. Sin embargo, una fracción considerable del genoma (149 CDS, ~52%) corresponde a proteínas de función desconocida, quedando anotadas como genes hipotéticos. El genoma de 15597B codifica 2 ARNt y carece de genes de integración/excisión (no se detectó integrasa ni sitios att), lo que indica la ausencia de un ciclo lisogénico; tampoco se hallaron secuencias CRISPR ni ARNtm codificadas por el fago. Asimismo, no se identificaron genes asociados a factores de virulencia (VFDB) ni genes de resistencia antimicrobiana (CARD) en su genoma, un atributo deseable para fines terapéuticos. La herramienta BACPHLIP clasificó a 15597B como un fago **virulento** de ciclo lítico

Figura 15. Mapa genómico del bacteriófago para la cepa 15597B.



Cuadro 8. Resumen de las funciones de las proteínas del fago de la ATCC *E. coli* 15597B.

Descripción	Conteo
CDS	286
connector	3
DNA, RNA and nucleotide metabolism	49
head and packaging	18
integration and excision	0
lysis	8
moron, auxiliary metabolic gene and host takeover	11
other	10
tail	29
transcription regulation	9
unknown function	149
tRNAs	2
CRISPRs	0
tmRNAs	0
VFDB_Virulence_Factors	0
CARD_AMR_Genes	0

Cuadro 9. Herramienta BACPHLIP para la clasificación del tipo del fago de la ATCC *E. coli* 15597B.

Virulento	Temperado
1.0	0.0

Fago *E. coli* ATCC 11229B- Gaprivervirus.: El genoma del bacteriófago 11229B- Gaprivervirus. (aislado de *E. coli* ATCC 11229) contiene 312 CDS en total, según la anotación funcional de Pharokka. Estas CDS codifican predominantemente proteínas estructurales (capsómeros de cabeza, componentes de cola y del conector), numerosas enzimas dedicadas a la replicación viral y al metabolismo de ácidos nucleicos, un conjunto típico de proteínas de lisis del hospedero (holina, endolisina) y varios posibles reguladores de la expresión génica viral; también se identificaron algunos genes de función accesorio ("morones" o de *host takeover*). No obstante, la mayor parte de los genes (172 CDS, ~55%) carece de asignación funcional específica y se clasifica como hipotética. El genoma de 11229G incluye 2 genes de ARNt y no contiene ninguna integrasa ni otros elementos asociados a la lisogenia (CDS de integración/excisión = 0; sin secuencias CRISPR ni ARNtm propias). Igualmente, no se detectaron genes de factor de virulencia bacteriana ni de resistencia a antibióticos en su contenido génico. El clasificador BACPHLIP sugiere para 11229G un ciclo lítico (virulento), coherente con la ausencia de integrasa, aunque con un leve puntaje que indicaría rasgos atípicos (75% probabilidad de virulento vs 25% temperado). En resumen, 11229G es un fago de genoma amplio y naturaleza predominantemente lítica, provisto de los módulos génicos necesarios para la replicación y liberación de nuevos viriones en *E. coli* y desprovisto de genes perjudiciales, lo que respalda su posible uso terapéutico (Figura 16; Cuadros 10 y 11).

Ecoli phage 11229B_Gaprivervirus.fasta

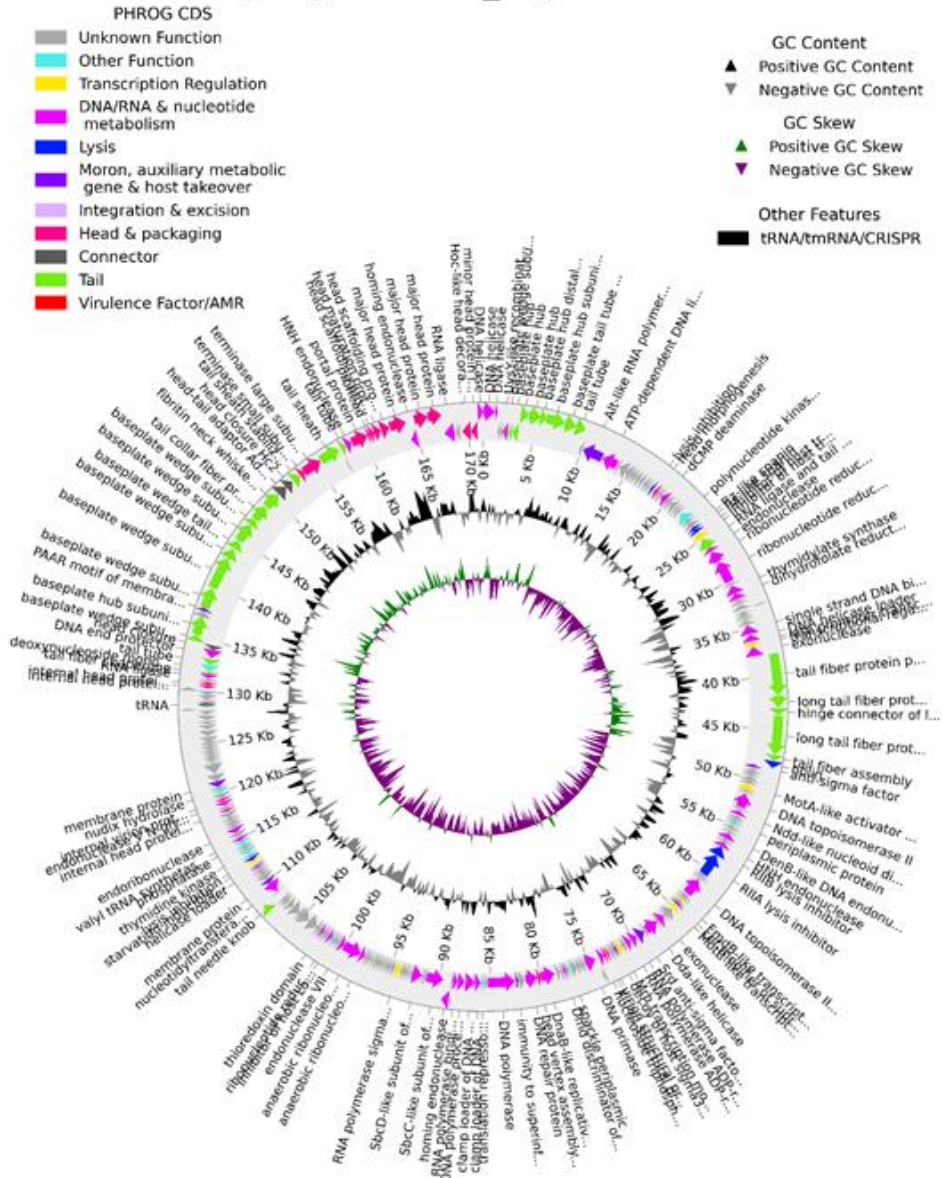


Figura 16. Mapa genómico del bacteriófago para la cepa 11229B-Gaprivervirus.

Cuadro 10. Resumen de funciones de las proteínas del fago de la *E. coli* ATCC 11229B- Gaprivervirus.

Descripción	Conteo
CDS	312
connector	3
DNA, RNA and nucleotide metabolism	51
head and packaging	20
integration and excision	0
lysis	7
moron, auxiliary metabolic gene and host takeover	9
other	10
tail	30
transcription regulation	10
unknown function	172
tRNAs	2
CRISPRs	0
tmRNAs	0
VFDB_Virulence_Factors	0
CARD_AMR_Genes	0

Cuadro 11. Herramienta BACPHLIP: para la clasificación del tipo del fago de la *E. coli* ATCC 11229B- Gaprivervirus.

Virulento	Temperado
0.75	0.25

Fago *E. coli* ATCC 11229B_ Mosigvirus.: Este segundo fago aislado de *E. coli* 11229, denominado 11229M, presenta un genoma de 286 CDS. Su composición funcional es similar a la de otros colífagos de gran tamaño: se identificaron múltiples genes estructurales (de cabeza, cola y conector), junto a una variedad de genes para la replicación y el metabolismo de nucleótidos virales, además de genes implicados en la lisis celular del huésped y en la regulación transcripcional viral. Un total de 148 CDS ($\approx 52\%$) permanecen sin función conocida, anotadas como proteínas hipotéticas. El genoma de 11229M codifica 2 ARNt y no contiene integrasas ni señales genómicas de lisogenia (no se detectaron genes de integración/excisión, secuencias CRISPR ni ARNtm), reflejando un ciclo lítico estricto. Tampoco porta genes asociados a virulencia bacteriana ni resistencia antimicrobial. De acuerdo con BACPHLIP, 11229M se clasifica como fago virulento de ciclo lítico (probabilidad 1.0 de virulencia), en plena concordancia con la ausencia de cualquier gen de integrasa. En consecuencia, el fago 11229M se caracteriza por un ciclo lítico obligado y un arsenal genético enfocado en la infección productiva de su hospedero *E. coli*, sin presencia de genes indeseables, lo que indica un perfil favorable para aplicaciones terapéuticas (Figura 17; Cuadros 12 y 13).

Ecoli phage 11229B_Mosigvirus.fasta

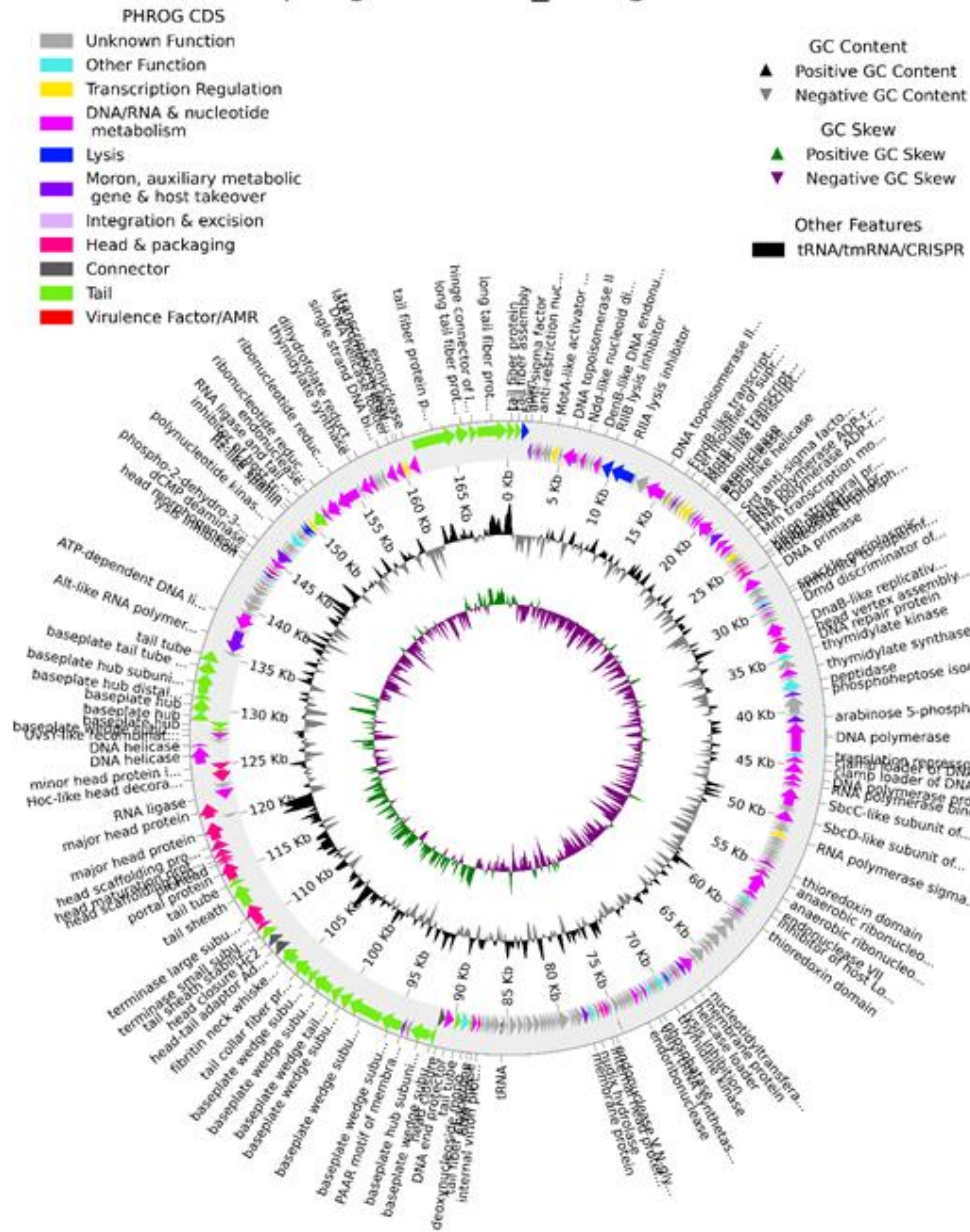


Figura 17. Mapa genómico del bacteriófago para la cepa 11229B-Mosigvirus.

Cuadro 12. Resumen de funciones de las proteínas del fago de *E. coli* ATCC 11229B_ Mosigvirus.

Descripción	Conteo
CDS	286
connector	3
DNA, RNA and nucleotide metabolism	49
head and packaging	18
integration and excision	0
lysis	8
moron, auxiliary metabolic gene and host takeover	11
other	10
tail	30
transcription regulation	9
unknown function	148
tRNAs	2
CRISPRs	0
tmRNAs	0
VFDB_Virulence_Factors	0
CARD_AMR_Genes	0

Cuadro 13. Herramienta BACPHLIP: para la clasificación del tipo del fago de la *E. coli* ATCC 11229B_ Mosigvirus.

Virulento	Temperado
1.0	0.0

Fago *E. coli* ATCC 8739B: La secuenciación y anotación del fago 8739B (aislado de *E. coli* ATCC 8739) permitió identificar 146 CDS en su genoma. Los genes funcionales abarcan los módulos esperados: unos 20 CDS corresponden a proteínas estructurales del virión (cabeza, cola y un conector), 12 CDS codifican enzimas de DNA/RNA involucradas en la replicación y metabolismo nucleotídico, 4 CDS conforman el módulo de lisis (incluyendo la endolisina y su holina) y se detectó un único gen putativo de regulación transcripcional viral, acorde con el menor tamaño del genoma. El resto de las CDS (99, ~68%) no poseen homologías conocidas y se clasifican como hipotéticas. Un rasgo distintivo de 8739B es la presencia de **24 genes de ARNt**, un número inusualmente alto que podría mejorar la eficiencia de traducción de las proteínas virales durante la infección. En línea con su carácter virulento, no se detectó ninguna integrasa ni otros indicios de lisogenia (ausencia de genes de integración, secuencias CRISPR y ARNtm). Asimismo, el genoma está libre de genes de virulencia bacteriana y de resistencia a fármacos. El algoritmo BACPHLIP confirmó que 8739B es un fago **virulento** (estrictamente lítico). En suma, el fago 8739B exhibe un perfil genómico orientado a la infección lítica de *E. coli*, dotado de múltiples ARNt que sugieren adaptación para optimizar su replicación, y carente de genes indeseables, lo que refuerza su potencial como agente terapéutico antibacteriano (Figura 18; Cuadros 14 y 15).

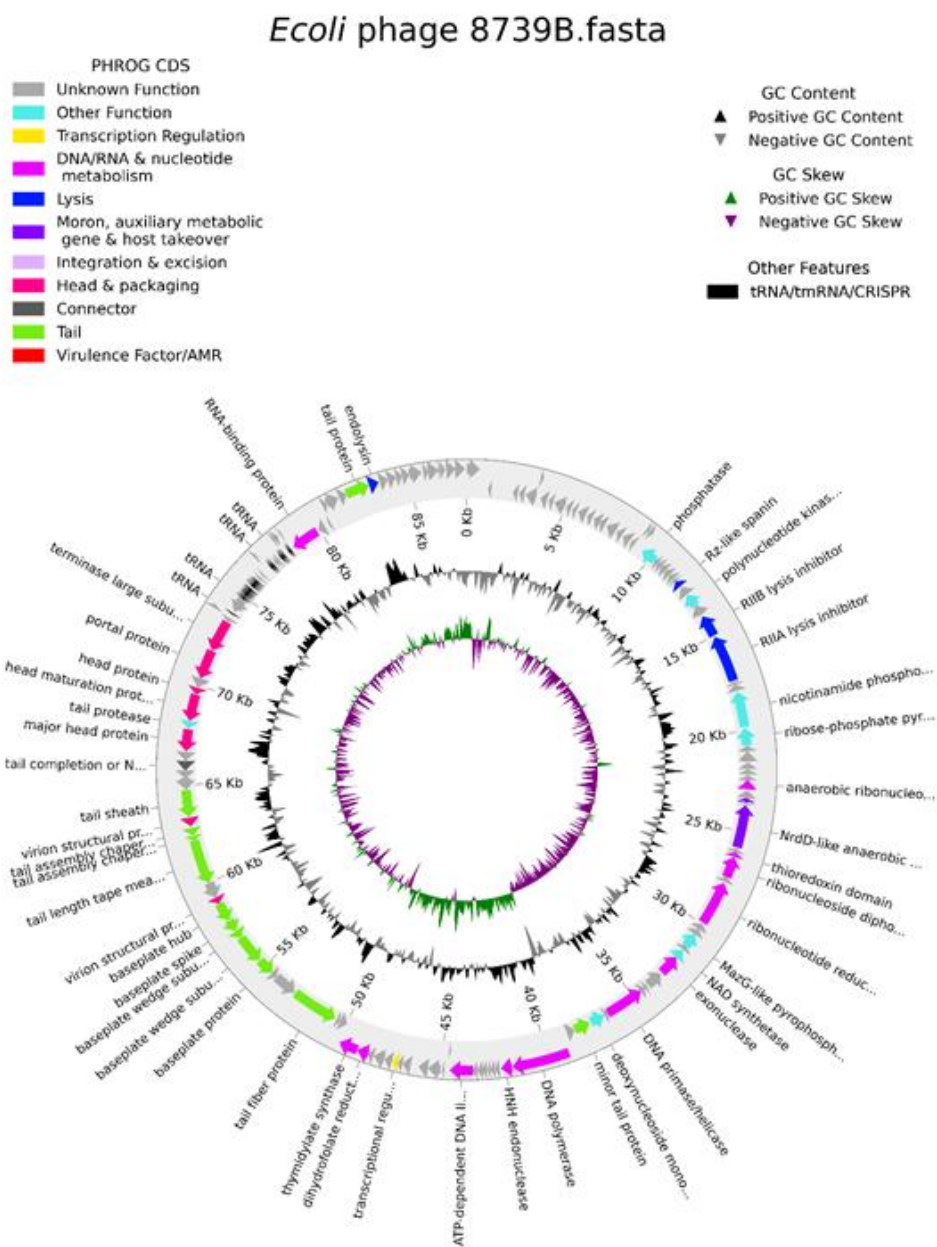


Figura 18. Mapa genómico del bacteriófago para la cepa 8739B.

Cuadro 14. Resumen de las funciones de las proteínas del bacteriófago 8739B.

descripción	Conteo
CDS	146
connector	1
DNA, RNA and nucleotide metabolism	12
head and packaging	7
integration and excision	0
lysis	4
moron, auxiliary metabolic gene and host takeover	2
other	8
tail	12
transcription regulation	1
unknown function	99
tRNAs	24
CRISPRs	0
tmRNAs	0
VFDB_Virulence_Factors	0
CARD_AMR_Genes	0

Cuadro 15. Herramienta BACPHLIP: para la clasificación del tipo del fago de la *E. coli* ATCC 8739.

Virulento	Temperado
1.0	0.0

Fago *S. enterica* ATCC 9842B: El bacteriófago 9842B, aislado de la *S. enterica* subespecie enterica serovar Bispebjerg (ATCC 9842), posee un genoma relativamente compacto con aproximadamente 57 CDS. Dentro de estas se identificó el conjunto típico de genes para la formación de la cápside y la cola del virión, los genes necesarios para la replicación del ADN fágico, así como los componentes de lisis del hospedero (incluyendo la endolisina y su proteína asociada para la liberación viral). Solo un número reducido de CDS parece involucrado en la regulación de la expresión génica, acorde con el tamaño moderado del genoma, mientras que una proporción considerable de genes permanece sin función caracterizada (anotados como hipotéticos). Este fago **no** codifica ninguna integrasa ni presenta otros elementos de lisogenia en su genoma (CDS de integración/excisión = 0; sin rastros de secuencias CRISPR ni ARNtm), y carece de genes asociados a virulencia o resistencia. El análisis con BACPHLIP lo clasificó como un fago **virulento** de ciclo lítico, en concordancia con la ausencia de maquinaria lisogénica. En conjunto, el fago 9842B se perfila como un virus estrictamente lítico contra *Salmonella*, con un genoma sencillo enfocado en la producción de nuevos viriones y libre de genes potencialmente perjudiciales, lo que resulta prometedor para su uso terapéutico específico (Figura 19; Cuadros 16 y 17).

Salmonella phage 9842B.fasta

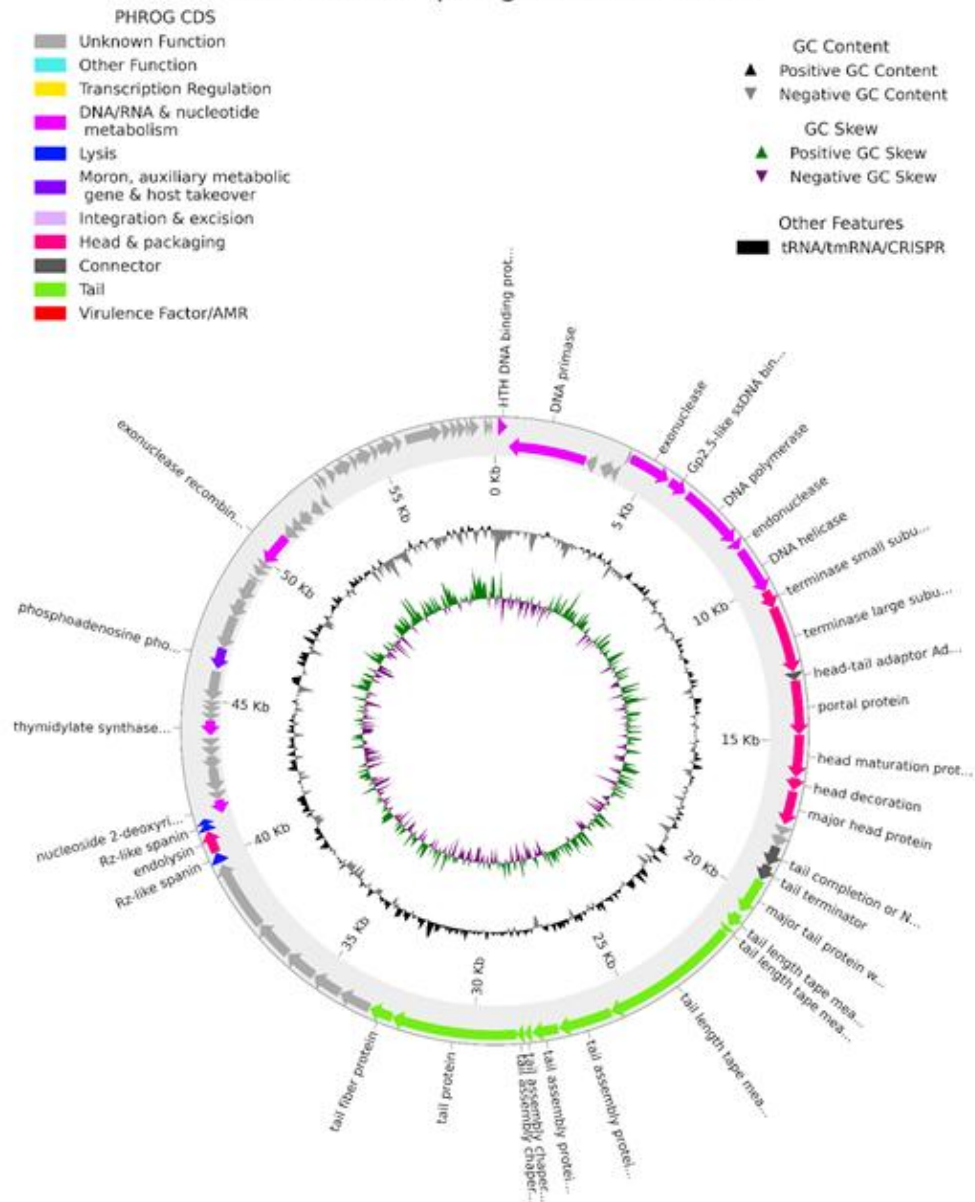


Figura 19. Mapa genómico del bacteriófago para la cepa de *Salmonella* 9842B.

Cuadro 16. Resumen de las funciones de las proteínas del fago de *Salmonella* ATCC 9842B.

Descripción	Conteo
CDS	82
connector	3
DNA, RNA and nucleotide metabolism	10
head and packaging	7
integration and excision	0
lysis	3
moron, auxiliary metabolic gene and host takeover	1
other	0
tail	10
transcription regulation	0
unknown function	48
tRNAs	0
CRISPRs	0
tmRNAs	0
VFDB_Virulence_Factors	0
CARD_AMR_Genes	0

Cuadro 17. Herramienta BACPHLIP: para la clasificación del tipo del fago de la *Salmonella* ATCC 9842B.

Virulento	Temperado
0.9625	0.0375

Fago *S. enterica* ATCC 14028B: La caracterización genómica del fago 14028B (aislado de *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028) reveló un genoma de ~59 kb que codifica cerca de 57 CDS. Este repertorio génico incluye los determinantes para las estructuras del virión (formación de cápside y cola), las enzimas involucradas en la replicación del ADN viral y las proteínas efectoras de la lisis celular del huésped, con muy pocos genes dedicados a la regulación transcripcional. Más de la mitad de las CDS carecen de una función conocida y quedaron asignadas como hipotéticas. Al igual que otros fagos virulentos, 14028B no presenta integrasas ni otros genes de lisogenia, ni codifica sistemas CRISPR o ARNtm; además, está libre de genes de virulencia bacteriana y de resistencia a antibióticos. BACPHLIP confirmó su naturaleza lítica (fago virulento), sin indicios de un ciclo temperado. En resumen, el fago 14028B es un bacteriófago de perfil genómico compacto y estrictamente lítico contra *S. Typhimurium*, provisto de los genes esenciales para la infección productiva y desprovisto de elementos génicos indeseables, lo que respalda su posible aprovechamiento terapéutico (Figura 20; Cuadros 18 y 19).

PHROG CDS

- Unknown Function
- Other Function
- Transcription Regulation
- DNA/RNA & nucleotide metabolism
- Lysis
- Morons, auxiliary metabolic gene & host takeover
- Integration & excision
- Head & packaging
- Connector
- Tail
- Virulence Factor/AMR

GC Content

- ▲ Positive GC Content
- ▼ Negative GC Content

GC Skew

- ▲ Positive GC Skew
- ▼ Negative GC Skew

Other Features

- tRNA/tmRNA/CRISPR

Genome map labels (clockwise from top):

- HTH DNA binding prot...
- DNA primase
- exonuclease
- Gp2.5-like ssDNA bin...
- DNA polymerase
- endonuclease
- DNA helicase
- terminase small subu...
- terminase large subu...
- head-tail adaptor Ad...
- portal protein
- head maturation prot...
- head decoration
- major head protein
- tail completion or N...
- tail terminator
- major tail protein w...
- tail length tape mea...
- tail length tape mea...
- tail assembly prot...
- tail assembly chaper...
- tail assembly chaper...
- tail protein
- tail fiber protein
- exonuclease recomb...
- phosphoadenosine pho...
- thymidylate synthase...
- nucleoside 2-deoxyri...
- Rz-like spanin
- endolysin
- Rz-like spanin

90

Cuadro 18. Resumen de las funciones de las proteínas del fago de la cepa de *Salmonella* ATCC 14028B.

Descripción	Conteo
CDS	85
connector	3
DNA, RNA and nucleotide metabolism	10
head and packaging	7
integration and excision	0
lysis	3
moron, auxiliary metabolic gene and host takeover	1
other	0
tail	10
transcription regulation	0
unknown function	51
tRNAs	0
CRISPRs	0
tmRNAs	0
VFDB_Virulence_Factors	0
CARD_AMR_Genes	0

Cuadro 19. Herramienta BACPHLIP para la clasificación del tipo del fago de la *Salmonella* ATCC 14028B.

Virulento	Temperado
0.9625	0.0375

Cuadro 20. Resumen del análisis taxonómico

Genoma	Realm	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Subfamily	Genus	Species	Full_taxonomy
11229B_Gaprivivirus	Duplodnaviria	Heunggongvirae	Uroviricota	Caudoviricetes	Not Defined Yet	Straboviridae	Tevenvirinae	Gaprivivirus	Gaprivivirus new_name	r_Duplodnaviria;k_Heunggongvirae;p__Uroviricota;c_Caudoviricetes;o_No t Defined Yet;f_Straboviridae;sf_Tevenvirinae;g__Gaprivivirus;s_Gaprivivirus new_name
11229B_Mosivirus	Duplodnaviria	Heunggongvirae	Uroviricota	Caudoviricetes	Not Defined Yet	Straboviridae	Tevenvirinae	Mosivirus	Mosivirus mar005p1	r_Duplodnaviria;k_Heunggongvirae;p__Uroviricota;c_Caudoviricetes;o_No t Defined Yet;f_Straboviridae;sf_Tevenvirinae;g__Mosivirus;s_Mosivirus mar005p1
14028B	Duplodnaviria	Heunggongvirae	Uroviricota	Caudoviricetes	Not Defined Yet	Casjensviridae	Not Defined Yet	Chivirus	Chivirus new_name	r_Duplodnaviria;k_Heunggongvirae;p__Uroviricota;c_Caudoviricetes;o_No t Defined Yet;f_Casjensviridae;sf_Not Defined Yet;g_Chivirus;s_Chivirus new_name
15597B	Duplodnaviria	Heunggongvirae	Uroviricota	Caudoviricetes	Not Defined Yet	Straboviridae	Tevenvirinae	Mosivirus	Mosivirus mar005p1	r_Duplodnaviria;k_Heunggongvirae;p__Uroviricota;c_Caudoviricetes;o_No t Defined Yet;f_Straboviridae;sf_Tevenvirinae;g__Mosivirus;s_Mosivirus mar005p1
8739B	Duplodnaviria	Heunggongvirae	Uroviricota	Caudoviricetes	Not Defined Yet	Not Defined Yet	Ounavirinae	Felixounavirus	Felixounavirus new_name	r_Duplodnaviria;k_Heunggongvirae;p__Uroviricota;c_Caudoviricetes;o_No t Defined Yet;f_Not Defined Yet;sf_Ounavirinae;g_Felixounavirus;s_Felixounavirus new_name
9027B	Duplodnaviria	Heunggongvirae	Uroviricota	Caudoviricetes	Not Defined Yet	Not Defined Yet	Not Defined Yet	Pbunavirus	Pbunavirus LS1	r_Duplodnaviria;k_Heunggongvirae;p__Uroviricota;c_Caudoviricetes;o_No t Defined Yet;f_Not Defined Yet;sf_Not Defined Yet;g_Pbunavirus;s_Pbunavirus LS1
9842B	Duplodnaviria	Heunggongvirae	Uroviricota	Caudoviricetes	Not Defined Yet	Casjensviridae	Not Defined Yet	Chivirus	Chivirus new_name	r_Duplodnaviria;k_Heunggongvirae;p__Uroviricota;c_Caudoviricetes;o_No t Defined Yet;f_Casjensviridae;sf_Not Defined Yet;g_Chivirus;s_Chivirus new_name

Nota: La taxonomía actual de ICTV y el agrupamiento en la salida del algoritmo de similitud genómica parecen ser consistentes a nivel de género.

F.2.3. Análisis de homología de las secuencias de fagos

Con base en los análisis de identidad nucleotídica promedio (ANI), se observa que los fagos Phage-11229B_Gaprivervirus, Phage-14028B, Phage-87339 y Phage-9842B presentan valores máximos de ANI inferiores al umbral aceptado para la definición de especie (95%) frente a los representantes descritos de sus respectivos géneros, lo que evidencia que cada uno corresponde a una posible nueva especie de fago dentro de los géneros Gaprivervirus, Chivirus y Felixounavirus. En particular, Phage-11229B_Gaprivervirus muestra una identidad máxima de 86.6% con Gaprivervirus de referencia, mientras que Phage-14028B y Phage-9842B se ubican entre 92.4% y 94.4% respecto a otros Chivirus, valores todos ellos claramente por debajo del límite de especie. Por su parte, Phage-87339, aunque muestra alta similitud con otros Felixounavirus, no supera el umbral de ANI exigido para considerarlo la misma especie, confirmando así su estatus de especie novedosa. Estos datos, reflejando niveles de homología insuficientes para considerarse la misma especie que los fagos previamente reportados, constituyen un fundamento robusto para proponer la designación de estos aislados como nuevas especies dentro de sus géneros y abren la puerta a discutir su diversidad genómica, potenciales diferencias biológicas y relevancia evolutiva en trabajos posteriores.

J. Discusión

La resistencia antimicrobiana (RAM) es uno de los problemas más preocupantes para la salud pública global, agravado por el uso indiscriminado de antibióticos en la medicina humana, veterinaria y la agricultura, así como por la disminución en el desarrollo de nuevos fármacos eficaces frente a bacterias multirresistentes¹⁵⁷. En este escenario, los bacteriófagos han resurgido como herramientas prometedoras debido a su elevada especificidad, capacidad lítica, y coevolución con bacterias patógenas. Sin embargo, pese al incremento de publicaciones sobre aislamiento y caracterización, el número de fagos aplicados comercialmente sigue siendo muy reducido, en gran parte por la insuficiente caracterización requerida para la aprobación regulatoria y uso terapéutico^{158,159}.

En 2017, la OMS publicó una lista prioritaria de bacterias resistentes para orientar la I+D de nuevos antibióticos, destacando como Prioridad 1 crítica: a *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos y a *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos o productoras de ESBL, entre otras^{90,160}. Esta lista subraya la urgencia de alternativas frente a infecciones causadas por estas bacterias, lo que refuerza la relevancia de explorar la fagoterapia en contextos con alta carga de agentes multirresistentes¹⁶¹

En Panamá, estudios de vigilancia hospitalaria han documentado la presencia de bacterias multirresistentes clínicamente relevantes, incluyendo *E. coli* y *K. pneumoniae*, las cuales presentan perfiles genéticos asociados a resistencia a múltiples antibióticos de uso común^{162,163}. En particular, la detección del clon emergente *K. pneumoniae* ST307 en hospitales de la región central evidencia la circulación de linajes de alto riesgo capaces de causar infecciones severas en Unidades de Cuidados Intensivos. Estos hallazgos se alinean con los reportes de magnitud regional de la resistencia antimicrobiana en América Latina, que destacan a las enterobacterias como uno de los grupos con mayor impacto clínico y carga sanitaria^{164,165}. En conjunto, *E. coli*, *Enterobacter* spp. y otras enterobacterias constituyen causas frecuentes de infecciones extraintestinales difíciles de tratar debido a sus múltiples mecanismos de resistencia, lo cual justifica su selección como hospedadores para el aislamiento y caracterización de bacteriófagos. Este contexto local y regional, aporta relevancia directa a los

hallazgos de este estudio y sitúa los resultados dentro de una necesidad sanitaria real y prioritaria.

El lugar seleccionado para el muestreo, recoge principalmente aguas residuales urbanas, así como efluentes acuáticos contaminados, características que coinciden con ambientes ampliamente descritos en la literatura como reservorios ricos en bacteriófagos activos, debido a la elevada densidad bacteriana y a la intensa interacción virus-huésped que ocurre en estos ecosistemas. Estudios de ecología fágica han demostrado que la probabilidad de aislar fagos con potencial terapéutico aumenta cuando el muestreo se realiza en entornos con alta carga microbiana y diversidad genética, como las aguas residuales, donde coexisten bacterias multirresistentes y sus fagos específicos¹⁶⁶. Asimismo, investigaciones orientadas al aislamiento dirigido de fagos han resaltado que la recolección de muestras en ambientes acuáticos contaminados favorece la recuperación exitosa de fagos activos contra bacterias clínicamente relevantes, al maximizar el contacto natural entre el hospedero bacteriano y su virus correspondientes¹⁶⁷. De manera complementaria, análisis metagenómicos y estudios de diversidad viral han confirmado que los ecosistemas acuáticos, incluidos ríos impactados por descargas urbanas o industriales, albergan comunidades virales altamente diversas y funcionales, lo que respalda su uso como fuentes estratégicas para el aislamiento de fagos con aplicaciones en biocontrol y fagoterapia^{168,169}.

Se empleó la técnica clásica de doble capa de agar para el aislamiento y purificación de fagos, siguiendo referencias estándar^{137,139} y realizando rondas sucesivas para asegurar homogeneidad clonal. Esta estrategia permite minimizar mezclas poblacionales, condición indispensable para posteriores análisis genómicos y biológicos¹⁷⁰.

Durante la incubación y lectura de UFP, se observó diversidad de morfologías: UFP claras, turbias, ojos de buey y en ocasión con formación de halos. Estas características tienen interpretación funcional. Placas claras: indicativas de fagos líticos eficaces que destruyen la monocapa bacteriana, Placas turbias: podrían sugerir presencia de bacterias sobrevivientes, resistencia emergente, o ciclo temperado parcial, Ojo de buey: asociado a disminución de eficacia lítica debido al envejecimiento de la monocapa bacteriana, como se describe en

literatura técnica sobre ensayos de difusión en agar, Halos: zonas semitransparentes alrededor del centro de la UFP, vinculadas con actividad de enzimas depolimerasas, que degradan polisacáridos de la cápsula o biofilms. Esto se explica porque dichas enzimas, ya sea virion-asociadas o liberadas tras la lisis, difunden y degradan material polisacárido circundante, produciendo el halo característico¹⁷¹.

El tamaño de la UFP también es informativo: fagos con mayor velocidad de difusión o con parámetros de ciclo lítico ajustados (estrictamente lítico, cinética de infección controlada, adaptado al hospedero objetivo), pueden producir UFP más grandes, mientras que viriones físicamente más grandes o con alta tasa de adsorción pueden producir UFP más pequeñas, tal como muestran estudios experimentales controlados sobre relación entre morfología de virión, tasa de adsorción, tiempo de lisis y productividad de UFP¹⁷². Este tipo de observaciones orienta la selección de candidatos para aplicaciones terapéuticas o ambientales, pues permite inferir eficiencia infectiva, posibles mecanismos de difusión y valor diagnóstico o de control de brotes.

La caracterización biológica y la resistencia fisicoquímica, como la estabilidad frente a temperatura, pH, UV y solventes son ensayos clásicos en fagos que permite definir en primera instancia el posible tipo de fago que estamos aislando, así como su comportamiento frente a estos agentes y poder así, continuar con los ensayos como candidatos para su empleo en fagoterapia o aplicaciones ambientales¹⁵¹.

Los ensayos de estabilidad frente a factores físico-químicos mostraron que los fagos aislados poseen robustez estructural adecuada para condiciones ambientales variables. Para la temperatura se documentó tolerancia en rangos intermedios (25 – 45°C en algunos casos) con disminución de viabilidad a temperaturas superiores, similar a observaciones en fagos tipo Mosigvirus⁵². Estas características sugieren estructuras de cápside estables, pero no indefinidamente resistentes al calor extremo, lo cual es consistente con otras investigaciones donde altas temperaturas inactivan fagos por desnaturalización de proteínas y ácidos nucleicos, con variaciones según familia y diseño estructural^{173–175}. A diferentes concentraciones de pH, los fagos mantuvieron actividad en un rango amplio de pH (5–9), mostrando tolerancia a condiciones

moderadamente ácidas o básicas. Este rango es comparable con reportes previos de fagos de *E. coli* y *Pseudomonas*, y sugiere viabilidad tanto para aplicaciones ambientales como potenciales usos clínicos, donde fluctuaciones de pH pueden ser frecuentes^{176,177}.

El rango de temperatura y pH tienen implicaciones importantes en aplicaciones de los bacteriófagos. Las variaciones térmicas y de pH pueden influir en adherencia, penetración, multiplicación y duración del ciclo lítico. Temperaturas inferiores a la óptima pueden retardar penetración o prolongar periodo de latencia, y temperaturas muy altas pueden prolongar latencia o reducir infectividad. Esto implica que la selección del fago para almacenamiento y aplicación debe ser cuidadosa según la temperatura del entorno o del alimento/sustrato objetivo, corroborando hallazgos previos en que diferentes fagos muestran rangos óptimos distintos, dependiendo del modelo vegetal u orgánico al cual se aplican^{176,178–180}

La exposición a luz UV produjo reducción gradual de viabilidad, algo esperado al dañar ADN y proteínas; no obstante, se observó persistencia de UFP tras múltiples segundos de exposición, indicando cierta estabilidad estructural frente a radiación. Con todo, la UV es reconocida como causa importante de mortalidad fágica en ambientes naturales expuestos al sol^{176,179}.

La resistencia parcial o sensibilidad a solventes orgánicos como el cloroformo explicó la ausencia o presencia de lípidos en la envoltura, y refuerza la necesidad de evaluar concentraciones específicas y tiempo de exposición. En algunos fagos, la sensibilidad es mediada por la estructura de proteínas de cápside, lo que obliga a definir protocolos de esterilización y conservación afines al uso del fago^{176,179}.

Estas pruebas sustentan la posibilidad de almacenamiento, uso en biocontrol y formulaciones de cócteles fágicos para aplicaciones clínicas o ambientales. Además, la comparación con la literatura, brinda contexto cuantitativo útil para planificar conservación térmica (refrigeración, liofilización, crioprotectores) y para estimar eficacia ante tratamientos ambientales^{176,181–183}.

En la caracterización genética, taxonómica y molecular de los fagos, el ensamblaje y métricas genómicas de los fagos, reveló coberturas altas (158x–

3833x), genomas de 58,7 a 171,4 kb y porcentajes de GC entre 37,7% y 56,5%, valores alineados con características de géneros como *Gaprivivirus*, *Mosigvirus*, *Chivirus* y *Pbunavirus*. Estas métricas coinciden con datos previos para fagos de estos grupos y sirven para ubicar los aislamientos dentro de clados genómicos conocidos.

La clasificación y coherencia taxonómica con base en clasificación del International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV, 2023) y algoritmos de similitud genómica ($ANI \geq 95\%$), confirman la pertenencia al reino Duplodnaviria, filo Uroviricota y clase Caudoviricetes, lo que corresponde a fagos de cola doble. Esta coherencia da soporte a la calidad de los ensamblajes y a la precisión de asignaciones taxonómicas. Además, el análisis de relaciones filogenéticas permite detectar linajes cercanos o divergencias marcadas, fenómeno útil cuando se trata de identificar potenciales nuevas especies o géneros, tal como se ha reportado en estudios de fagos T4-like o de familias Myoviridae donde la divergencia genética sugiere ámbito taxonómico novedoso en evaluación^{41,56–58,184,185}.

Para la evidencia de liticidad y ausencia de genes indeseables, y aspirar a aplicaciones terapéuticas, es esencial comprobar que los fagos son estrictamente líticos y carecen de genes de virulencia, resistencia o de lisogenia.

Los fagos estrictamente líticos se caracterizan por la presencia de genes de lisis, principalmente holinas y endolisinas, que coordinan la permeabilización de la membrana citoplasmática y la degradación del peptidoglicano para la liberación de nuevos viriones^{186–188}. De forma complementaria, los fagos temperados poseen genes asociados a lisogenia, como integrasas, represores y recombinasas, responsables de la integración y mantenimiento del genoma fágico en la bacteria hospedera¹⁸⁹. Por ello, la detección de holinas y endolisinas junto con la ausencia de genes de integrasas, transposasas u otros marcadores de temperancia, es un criterio ampliamente aceptado para identificar fagos líticos seguros y biológicamente activos, especialmente en estudios orientados a fagoterapia^{189,190}. Este enfoque ha sido aplicado de manera consistente en análisis genómicos de fagos candidatos, reforzando su selección al minimizar el riesgo de transferencia horizontal de genes o conversión lisogénica¹⁹¹.

En los análisis moleculares de fagos aislados se han encontrado genes candidatos a holinas y endolisinas sin presencia de integrasas, transposasas u otros elementos típicos de temperados, lo que fortalece la selección de estos fagos. La incorporación de herramientas bioinformáticas para la anotación genómica mediante Pharokka permitió identificar y organizar los Marcos de Lectura Abiertos (ORFs) en módulos funcionales coherentes con los fagos de la clase Caudoviricetes, reduciendo significativamente la proporción de proteínas hipotéticas y facilitando la comparación filogenómica. De forma complementaria, el análisis del estilo de vida mediante BacPHIP predijo un comportamiento estrictamente lítico, basado en perfiles globales de dominios proteicos. La concordancia entre la arquitectura genómica y la predicción del ciclo lítico refuerza la idoneidad de estos fagos para aplicaciones en fagoterapia, alineándose con enfoques recientes que priorizan análisis integrados para evaluar seguridad y eficacia. Este enfoque complementa la evidencia experimental con un cribado de seguridad más robusto, alineado con criterios internacionales de selección para fagos terapéuticos.

El análisis comparativo de genomas permitió investigar la sintenia, re-arreglos de módulos funcionales y divergencia respecto a fagos previamente descritos. En casos reportados, fagos con diferencias en secuencia han sido propuestos como nuevas especies o géneros, sometiéndose a evaluación ante ICTV. Detectar patrones de divergencia, homología parcial o reordenaciones da soporte a la hipótesis de linajes emergentes y contribuye a expandir el conocimiento taxonómico. Además, comprender la historia evolutiva ayuda a prever potenciales mecanismos de adaptación y respuesta frente a cambios en hospedero o ambiente.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y

RECOMENDACIONES

K. CONCLUSIONES

1. Se logró aislar 7 Fagos (3 contra *E. coli*, 3 contra *Salmonella* spp. y 1 contra *P. aeruginosa*) con potencial para fagoterapia y control biológico. Se conoce que los ambientes contaminados constituyen reservorios efectivos de fagos terapéuticos. El aislamiento exitoso de bacteriófagos líticos a partir de muestras ambientales confirma que ecosistemas impactados por aguas residuales e industriales, albergan una alta diversidad de fagos activos contra bacterias multirresistentes. Esto refuerza el valor del muestreo ambiental como estrategia primaria para la identificación de fagos con potencial en fagoterapia y control biológico.
2. La combinación de ensayos de estabilidad (temperatura, pH, radiación UV y solventes) con análisis genómicos, permitió discriminar fagos estrictamente líticos, descartando aquellos con potencial lisogénico o con genes indeseables. Este enfoque integral es esencial para minimizar riesgos asociados a transferencia horizontal de genes y para cumplir criterios regulatorios emergentes en fagoterapia.
3. La identificación de fagos líticos contra *E. coli*, *Salmonella* y *P. aeruginosa* abre oportunidades para diseñar cócteles fágicos dirigidos de alto valor en contextos clínicos, donde estas bacterias figuran entre las más problemáticas de la lista prioritaria y en brotes hospitalarios locales.
4. La tolerancia observada a rangos amplios de temperatura y pH sugiere que los fagos aislados y purificados, pueden mantener viabilidad en condiciones variables, tanto en entornos ambientales como en potenciales aplicaciones clínicas o agroalimentarias, lo cual amplía su campo de uso como herramientas biotecnológicas.
5. La coherencia entre métricas genómicas, análisis de similitud nucleotídica y clasificación taxonómica según criterios del ICTV respalda la calidad de los ensamblajes y permite identificar divergencias genéticas significativas. Estos hallazgos sugieren la posible existencia de nuevas especies o géneros fágicos, contribuyendo al conocimiento de la diversidad viral.

L. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda evaluar los fagos aislados frente a un mayor número de cepas clínicas y ambientales, incluyendo aislamientos multirresistentes recientes, para definir con mayor precisión su rango real de hospedero y su aplicabilidad en escenarios terapéuticos diversos.
2. Desarrollar y evaluar cócteles fágicos multicepas.
3. Mejorar y ampliar los conocimientos técnicos en tinciones para microscopia electrónica en bacteriófagos. Utilizar cepas bacterianas hospederas aisladas de los sitios de muestreos para el muestreo de bacteriófagos, que además estén debidamente identificadas tanto por técnicas bioquímicas como genotípicamente.
4. Profundizar en métodos de conservación como refrigeración, liofilización y uso de crioprotectores, evaluando su impacto en la infectividad y estabilidad a largo plazo, con miras a la producción y almacenamiento de preparados fágicos estandarizados.
5. Integrar análisis funcionales de proteínas fágicas y la anotación genómica con técnicas como espectrometría de masas y microscopía electrónica.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Organizacion Mundial de la Salud. OMS | Resistencia a los antibióticos. *WHO* (2017).
2. Pećanac, M. *et al.* Burns treatment in ancient times. *Med. Pregl.* **66**, 263-267 (2013).
3. Durand, G. A., Raoult, D. & Dubourg, G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *Int. J. Antimicrob. Agents* **53**, 371-382 (2019).
4. Hutchings, M. I., Truman, A. W. & Wilkinson, B. Antibiotics: past, present and future. *Curr. Opin. Microbiol.* **51**, 72-80 (2019).
5. Kittler, S. *et al.* The use of bacteriophages as One-Health approach to reduce multidrug-resistant bacteria. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* **5**, 80-83 (2017).
6. Adhikari, R. *Infectious Diseases and Nanomedicine I: First International Conference (ICIDN – 2012), Dec. 15-18, 2012, Kathmandu, Nepal.* vol. 807 (Springer, New Delhi, 2014).
7. Tenover, F. C. & Hughes, J. M. The challenges of emerging infectious diseases. Development and spread of multiply-resistant bacterial pathogens. *JAMA* **275**, 300-304 (1996).
8. Dublanchet, A. & Bourne, S. The epic of phage therapy. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **18**, 15-18 (2007).
9. Merril, C. R., Scholl, D. & Adhya, S. L. The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 489-497 (2003).
10. Sulakvelidze, A., Alavidze, Z. & Morris, J. G., Jr. Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 649-659 (2001).

11. Cooper, C. J., Khan Mirzaei, M. & Nilsson, A. S. Adapting Drug Approval Pathways for Bacteriophage-Based Therapeutics. *Front. Microbiol.* **7**, 1209 (2016).
12. Górski, A. *et al.* Phage Therapy: Combating Infections with Potential for Evolving from Merely a Treatment for Complications to Targeting Diseases. *Front. Microbiol.* **7**, 1515 (2016).
13. Lopardo, H. A. [Fagotherapy: Multi-drug resistance compel us to review the past]. *Rev. Argent. Microbiol.* **49**, 1-2 (2017).
14. Clokie, M. R., Millard, A. D., Letarov, A. V. & Heaphy, S. Phages in nature. *Bacteriophage* **1**, 31-45 (2011).
15. Gordillo Altamirano, F. L. & Barr, J. J. Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clin. Microbiol. Rev.* **32**, (2019).
16. Bergh, Ø., Børsheim, K. Y., Bratbak, G. & Haldal, M. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* **340**, 467-468 (1989).
17. Danovaro, R. *et al.* Marine viruses and global climate change. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 817-843 (2014).
18. Nallelyt, S. A., Efrén, H. B., Oliver, L. V. & Oscar, T. A. Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas (fagoterapia). *Rev. Mex. Cienc. Farm.* **41**, 17-26 (2010).
19. d'Herelle, F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences* **165**, 373-375 (1917).
20. Morange, M. What history tells us XLIII Bacteriophage: The contexts in which it was discovered. *J. Biosci.* **42**, 359-362 (2017).

21. Pimienta-Rodríguez, E. T. Tratamiento con bacteriófagos como una alternativa antimicrobiana potencial. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* **44**, (2013).
22. Salmond, G. P. C. & Fineran, P. C. A century of the phage: past, present and future. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 777-786 (2015).
23. Morozova, V. V., Vlassov, V. V. & Tikunova, N. V. Applications of Bacteriophages in the Treatment of Localized Infections in Humans. *Front. Microbiol.* **9**, 1696 (2018).
24. Ofir, G. & Sorek, R. Contemporary Phage Biology: From Classic Models to New Insights. *Cell* **172**, 1260-1270 (2018).
25. Olszak, T., Latka, A., Roszniowski, B., Valvano, M. A. & Drulis-Kawa, Z. Phage Life Cycles Behind Bacterial Biodiversity. *Curr. Med. Chem.* **24**, 3987-4001 (2017).
26. Hankin, E. H. The bactericidal action of the waters of the Jumna and Ganges on the cholera microbe. *Ann. Inst. Pasteur* **10**, 511-523 (1896).
27. Silva, Y., Bernal, C., Contreras, A. & Rodríguez, I. The History and Applications of Phage Therapy in *Pseudomonas aeruginosa*: A Narrative Review. *Pathogens* **11**, 2 (2022).
28. d'Herelle, F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysenteriques. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* **165**, 373-375 (1917).
29. Ruska, H. Die Sichtbarmachung von Bakterien und Viren mittels Elektronenmikroskopie. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **65**, 1800-1802 (1939).
30. Luria, S. E. & Delbrück, M. Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics* **28**, 491-511 (1943).

31. Hershey, A. D. & Chase, M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* **36**, 39-56 (1952).
32. Benzer, S. Fine structure of a genetic region in bacteriophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **41**, 344-354 (1955).
33. Fiers, W. *et al.* Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene. *Nature* **260**, 500-507 (1976).
34. Sanger, F. *et al.* Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature* **265**, 687-695 (1977).
35. Smith, G. P. & Petrenko, V. A. Phage Display. *Chem. Rev.* **97**, 391-410 (1997).
36. Waldor, M. K. & Mekalanos, J. J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* **272**, 1910-1914 (1996).
37. Valencia-Toxqui, G. & Ramsey, J. How to introduce a new bacteriophage on the block: a short guide to phage classification. *J. Virol.* e0182123 (2024).
38. Vispo, N. S. & Dueñas, M. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS BACTERIÓFAGOS FILAMENTOSOS. Preprint en <https://elfosscientiae.cigb.edu.cu/PDFs/Muestras/chapter04.pdf>.
39. Ackermann, H.-W. Classification of bacteriophages. *The bacteriophages* **2**, 8-16 (2006).
40. Turner, D., Kropinski, A. M. & Adriaenssens, E. M. A roadmap for genome-based phage taxonomy. *Viruses* **13**, 506 (2021).
41. Turner, D., Adriaenssens, E. M., Lehman, S. M., Moraru, C. & Kropinski, A. M. Bacteriophage taxonomy: A continually evolving discipline. *Methods Mol. Biol.* **2734**, 27-45 (2024).

42. Nobrega, F. L. *et al.* Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 760-773 (2018).
43. Bragg, R., van der Westhuizen, W., Lee, J.-Y., Coetsee, E. & Boucher, C. Bacteriophages as potential treatment option for antibiotic resistant bacteria. *Adv. Exp. Med. Biol.* **807**, 97-110 (2014).
44. Zinke, M., Schröder, G. F. & Lange, A. Major tail proteins of bacteriophages of the order Caudovirales. *J. Biol. Chem.* **298**, 101472 (2022).
45. Rees, C. E. D., Swift, B. M. C. & Botsaris, G. Bacteriophage-based techniques for detection of foodborne pathogens. en *Encyclopedia of Food Microbiology* 194-202 (Elsevier, 2014).
46. Moineau, S. & Tremblay, D. M. Bacteriophage ☆. en *Reference Module in Life Sciences* (Elsevier, 2017).
47. Campbell, P. L. Assembly and Structure of Bacteriophage Capsids and Tails. (University of Pittsburgh, 2019).
48. Kochunni, D. T. Bacteriophage Structure and Function Table and Animation. *Blogger* <https://www.biologyexams4u.com/2023/10/bacteriophage-structure-and-function.html> (2023).
49. Fernández, L., Gutiérrez, D., Rodríguez, A. & García, P. *Los bacteriófagos: los virus que combaten infecciones.* (2020).
50. Dewanggana, M. N. *et al.* Isolation, characterization, molecular analysis and application of bacteriophage DW-EC to control Enterotoxigenic Escherichia coli on various foods. *Sci. Rep.* **12**, 495 (2022).
51. 10.7A: El ciclo de vida lítico de los bacteriófagos. *Biology LibreTexts* [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_\(Kaiser\)/Unit_4%3A_Eukaryotic_Microorganisms_and_Viruses/10%3A_Viruses/10.0](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_(Kaiser)/Unit_4%3A_Eukaryotic_Microorganisms_and_Viruses/10%3A_Viruses/10.0)

- 7%3A_Bacteriophage_Life_Cycles%3A_An_Overview/10.7A%3A_The_Lytic_Life_Cycle_of_Bacteriophages (2016).
52. Sharma, S. *et al.* Bacteriophages and its applications: an overview. *Folia Microbiol.* **62**, 17-55 (2017).
 53. Makky, S. *et al.* The bacteriophage decides own tracks: When they are with or against the bacteria. *Curr. Res. Microb. Sci.* **2**, 100050 (2021).
 54. Herridge, W. P., Shibu, P., O'Shea, J., Brook, T. C. & Hoyles, L. Bacteriophages of *Klebsiella* spp., their diversity and potential therapeutic uses. *J. Med. Microbiol.* **69**, 176-194 (2020).
 55. Han, P., Lin, W., Fan, H. & Tong, Y. Characterization of phage evolution and phage resistance in drug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Virol.* **98**, e0124923 (2024).
 56. ICTV. https://ictv.global/report_9th/dsDNA/Caudovirales.
 57. Zhu, Y., Shang, J., Peng, C. & Sun, Y. Phage family classification under Caudoviricetes: A review of current tools using the latest ICTV classification framework. *Front. Microbiol.* **13**, 1032186 (2022).
 58. Turner, D. *et al.* Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee. *Arch. Virol.* **168**, 74 (2023).
 59. Cresawn, S. G. *et al.* Phamerator: a bioinformatic tool for comparative bacteriophage genomics. *BMC Bioinformatics* **12**, 395 (2011).
 60. Bin Jang, H. *et al.* Taxonomic assignment of uncultivated prokaryotic virus genomes is enabled by gene-sharing networks. *Nat. Biotechnol.* **37**, 632-639 (2019).

61. Grose, J. H., Jensen, G. L., Burnett, S. H. & Breakwell, D. P. Genomic comparison of 93 *Bacillus* phages reveals 12 clusters, 14 singletons and remarkable diversity. *BMC Genomics* **15**, 855 (2014).
62. Sharma, R. *et al.* A novel, highly related jumbo family of bacteriophages that were isolated against *Erwinia*. *Front. Microbiol.* **10**, 1533 (2019).
63. Roux, S. *et al.* Ecology and molecular targets of hypermutation in the global microbiome. *Nat. Commun.* **12**, 3076 (2021).
64. CDC. Antibiotic Use Questions and Answers. *Centers for Disease Control and Prevention* <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/q-a.html> (2022).
65. Introducción a los antibióticos. *Manual MSD versión para público general* <https://www.msdmanuals.com/es/hogar/infecciones/antibi%C3%B3ticos/introducci%C3%B3n-a-los-antibi%C3%B3ticos>.
66. Alexander Fleming - Nobel Lecture.
67. Lewis, K. Antibiotics: Recover the lost art of drug discovery. *Nature* **485**, 439-440 (2012).
68. Van Epps, H. L. René Dubos: unearthing antibiotics. *J. Exp. Med.* **203**, 259 (2006).
69. Waksman, S. A., Geiger, W. B. & Reynolds, D. M. Strain Specificity and Production of Antibiotic Substances: VII. Production of Actinomycin by Different Actinomycetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **32**, 117-120 (1946).
70. Katz, L. & Baltz, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 155-176 (2016).
71. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H. & Stahl, D. A. *Brock biology of microorganisms*. (Pearson, Upper Saddle River, NJ, 2018).

72. Young, K. D. The selective value of bacterial shape. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 660-703 (2006).
73. Beveridge, T. J. Mechanism of Gram variability in select bacteria. *J. Bacteriol.* **172**, 1609-1620 (1990).
74. Falkowski, P. G., Fenchel, T. & Delong, E. F. The Microbial Engines That Drive Earth's Biogeochemical Cycles. *Science* **320**, 1034-1039 (2008).
75. Morris, J. G. The physiology of obligate anaerobiosis. *Adv. Microb. Physiol.* **12**, 169-246 (1975).
76. Woese, C. R. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271 (1987).
77. Prescott, L. M., Harley, J. P. & Klein, D. A. *Microbiology*. (McGraw-Hill, New York, NY, 2005).
78. 2021 antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240047655> (2022).
79. Davies, J. & Davies, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 417-433 (2010).
80. Vieira Colombo, A. P., Magalhães, C. B., Hartenbach, F. A. R. R., Martins do Souto, R. & Maciel da Silva-Boghossian, C. Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. *Microb. Pathog.* **94**, 27-34 (2016).
81. Brown, T., Le May, H., Bursten, B. & Burdge, J. *Química la ciencia central*. (Editorial Pearson, 2004).
82. Rodríguez, P. A. & Arenas, R. Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica* **16**, 166-167 (2018).

83. Corrales Ramírez, L. C. & Caycedo Lozano, L. Principios físicoquímicos de los colorantes utilizados en microbiología Principios físicoquímicos de los colorantes. *Nova* **18**, 73-100 (2020).
84. Cordero, P. & Verdugo, L. *Apuntes de Bioquímica Humana. Metabolismo Intermedio*. (Facultad de Ciencias Médicas. Universidad de Cuenca, 2006).
85. Corrales, L., González, A. & Ávila, S. *Conceptos Básicos de Microbiología*. (Editorial Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá, 2008).
86. Corrales, L. & Caycedo Lozano, L. Principios físicoquímicos de los colorantes utilizados en microbiología. *Nova* **18**, (2020).
87. Brock, M. T., Martinka, J. M. & Parker, J. *Biología de los microorganismos*. (Pearson Prentice Hall, 2009).
88. Díaz, J. A. G. Resistencia bacteriana: organismos del grupo ESKAPE. *Enferm. Infecc. Microbiol.* **41**, 111-117 (2021).
89. Santajit, S. & Indrawattana, N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Biomed Res. Int.* **2016**, Article 2475067 (2016).
90. Oms. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. 27 de febrero <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/> (2017).
91. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
92. Boucher, H. W. *et al.* Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **48**, 1-12 (2009).

93. Biondo, C., Mancuso, G., Midiri, A. & Gerace, E. Bacterial antibiotic resistance: The most critical pathogens. *Pathogens* **10**, 1310 (2021).
94. Arias, C. A. & Murray, B. E. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 266-278 (2012).
95. Esperbent, C. & Migliorati, M. Bacterias multirresistentes : una amenaza oculta que crece. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* **43**, 6-10 (2017).
96. Horcajada, J. P. *et al.* Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **32**, e00031-19 (2019).
97. Espinoza Pesantez, D. I. & Esparza Sanchez, G. F. Resistencia enzimática en *Pseudomonas aeruginosa*, aspectos clínicos y de laboratorio. *Rev. Chilena Infectol.* **38**, 69-80 (2021).
98. Lister, P. D., Wolter, D. J. & Hanson, N. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 582-610 (2009).
99. Horcajada, J. P., Montero, M. & Oliver, A. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **32**, (2019).
100. Cango Castillo, K. A., Loaiza Maldonado, C. A. & Salazar Calva, E. A. Sepsis Asociada a Dispositivos Médicos Invasivos en la Unidad de Cuidados Intensivos: Evaluación de Protocolos Frente a Infecciones. *Ciencia Latina* **9**, 5836-5851 (2025).
101. Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **19**, 1-15 (2021).

102. García, P., Rodríguez-Rojas, A. & Blázquez, J. *Escherichia coli* como modelo de evolución bacteriana bajo presión antibiótica. *Rev. Esp. Quimioter.* **33**, 435-445 (2020).
103. Rojas, J., Rodríguez, M. & Pérez, D. Resistencia antimicrobiana en *Escherichia coli*: situación actual y perspectivas terapéuticas. *Rev. Panam. Salud Publica* **46**, e85 (2022).
104. Eng, S. K. *et al.* Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Front. Life Sci.* **9**, 1-15 (2022).
105. Nguyen, S., Baker, K., Padman, B. & Turnbull, L. Bacteriophage therapy for *Salmonella* infections: Current status and future prospects. *Microb. Biotechnol.* **14**, 1359-1372 (2021).
106. Murray, C. J. L. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* **399**, 629-655 (2022).
107. Díaz, G. J. A., Maldonado, M. R., Valadez, D. E., Muro, R. & Matsumoto, I. R. Resistencia bacteriana: organismos del grupo ESKAPE. *Enferm. Infecc. Microbiol.* **41**, 111-117 (2021).
108. Fernández, A., Roca, B. & Mendoza, C. Impacto económico de la sobreprescripción de antibióticos. *Salud y Economía* **12**, 89-96 (2021).
109. García, T., Castillo, A. & Salazar, D. Mecanismos de resistencia a betalactámicos en bacterias gram negativas. *Rev. Cub. Salud Publica* **40**, 8 (2014).
110. Echeverri-Toro, L. M., Rueda, Z. V., Maya, W., Agudelo, Y. & Ospina, S. *Klebsiella pneumoniae* multirresistente: factores predisponentes y mortalidad asociada en un hospital universitario en Colombia. *Rev. Chilena Infectol.* **29**, 175-182 (2012).

- 111.Vega, S. OMS advierte sobre resistencia bacteriana a antibióticos y en Panamá crean estructura. Preprint en (2024).
- 112.Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A. & Sleator, R. D. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence* **3**, 243-250 (2012).
- 113.Institute for Health Metrics and Evaluation. The burden of antimicrobial resistance (AMR) in Panama. Preprint en (2023).
- 114.Ministerio de Salud de Panamá. Informe Nacional de Resistencia Antimicrobiana. Preprint en (2023).
- 115.De la salud, L. W. Panamá presentará su plan nacional de resistencia a los antimicrobianos (RAM). *La Web de la Salud* <https://lawebdelasalud.com/panama-presentara-su-plan-nacional-de-resistencia-a-los-antimicrobianos-ram/> (2024).
- 116.de la Salud, O. P. *Tratamiento de las enfermedades infecciosas 2020-2022. Octava edición*. 2022 (OPS, 2019).
- 117.Paphitou, N. I. Antimicrobial resistance: action to combat the rising microbial challenges. *Int. J. Antimicrob. Agents* **42 Suppl**, S25-8 (2013).
- 118.Liu, B. & Pop, M. ARDB--Antibiotic Resistance Genes Database. *Nucleic Acids Res.* **37**, D443-7 (2009).
- 119.Catalina, P.-P., Angela-Victoria, H.-M., Andrés-Fernando, G.-B. & Martha-Josefina, V.-F. Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. Perspectivas en Colombia. *Phage-therapy, an alternative to control bacterial infections. Perspectives in Colombia.* **20**, 43-59 (2015).
- 120.Minsa, C. “ Estudio sobre r esistencia bacteriana y uso racional de antibióticos en Panamá ” Contenido. (2015).

121. Alós, J.-I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **33**, 692-699 (2015).
122. Wright, G. D. Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? *BMC Biol.* **8**, 123 (2010).
123. O'Neill, J. TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY - FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS. (2016).
124. Lozano, R. *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **380**, 2095-2128 (2012).
125. World Health Organization. 2020 ANTIBACTERIAL AGENTS IN CLINICAL AND PRECLINICAL DEVELOPMENT: an overview and analysis. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/340694> (2021).
126. Liu, W. *et al.* Development of a novel and highly efficient method of isolating bacteriophages from water. *J. Microbiol. Methods* **139**, 143-149 (2017).
127. Knoll, B. M. & Mylonakis, E. Antibacterial bioagents based on principles of bacteriophage biology: an overview. *Clin. Infect. Dis.* **58**, 528-534 (2014).
128. Golkar, Z., Bagasra, O. & Gene Pace, D. Bacteriophage therapy: A potential solution for the antibiotic resistance crisis. *Journal of Infection in Developing Countries* **8**, 129-136 (2014).
129. Jorquera, D., Galarce, N. & Borie, C. El desafío de controlar las enfermedades transmitidas por alimentos: bacteriófagos como una nueva herramienta biotecnológica. *Rev. Chilena Infectol.* **32**, 678-688 (2015).
130. Rubio, J. Las bacterias resistentes se generan por un proceso de selección natural. *Elsevier* <https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/las->

- bacterias-resistentes-se-generan-por-un-proceso-de-seleccion-natural (2017).
131. Matsuzaki, S. *et al.* Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J. Infect. Chemother.* **11**, 211-219 (2005).
132. Castaño-Osorio, J. C. Bacteriófagos: aspectos generales y aplicaciones clínicas. *Hech Microb.* **6**, 36-51 (2019).
133. Naureen, Z. *et al.* Bacteriophages presence in nature and their role in the natural selection of bacterial populations. *Acta Biomed.* **91**, e2020024 (2020).
134. Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de la Ciudad de Panamá. <https://www.saneamientodepanama.gob.pa/index.php/planta-de-tratamiento-de-aguas-residuales-de-la-ciudad-de-panama/>.
135. Reglamento Técnico DGNTI-COPANIT 35-2000: Descarga de Efluentes. *Studocu* <https://www.studocu.com/latam/document/universidad-latina-de-panama/mecanica-de-fluidos/copanit-35-2000-descarga-efluentes/56183274> (2023).
136. Gabriel Gaviria, A., de María González, S. & Jhon Castaño, O. Técnica para aislamiento de bacteriófagos específicos para E.coli DH5α a partir de aguas residuales. *Rev. MVZ Cordoba* **17**, 2852-2860 (2012).
137. Jamalludeen, N. *et al.* Isolation and characterization of nine bacteriophages that lyse O149 enterotoxigenic Escherichia coli. *Vet. Microbiol.* **124**, 47-57 (2007).
138. Ge, F. *et al.* Characterization and genomic analysis of Stutzerimonas stutzeri phage vB_PstS_ZQG1, representing a novel viral genus. *Virus Res.* **336**, 199226 (2023).

- 139.Kropinski, A. M., Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E. & Johnson, R. P. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Methods Mol. Biol.* **501**, 69-76 (2009).
- 140.SM buffer. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2006**, db.rec8111 (2006).
- 141.Wong, A. PURIFICACION Y CARACTERIZACION BIOLOGICA DEL BACTERIOFAGO uB-19 ESPECIFICO DE *Bacillus thuringiensis*.pdf. (Universidad Autonoma de Nuevo Leon , 1994).
- 142.Ul Haq, I., Chaudhry, W. N., Andleeb, S. & Qadri, I. Isolation and partial characterization of a virulent bacteriophage IHQ1 specific for *Aeromonas punctata* from stream water. *Microb. Ecol.* **63**, 954-963 (2012).
- 143.Andrews, S. & Others. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Preprint en (2010).
- 144.Ramsey, J. *et al.* Galaxy and Apollo as a biologist-friendly interface for high-quality cooperative phage genome annotation. *PLoS Comput. Biol.* **16**, e1008214 (2020).
- 145.Bankevich, A. *et al.* SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* **19**, 455-477 (2012).
- 146.Brettin, T. *et al.* RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci. Rep.* **5**, 8365 (2015).
- 147.VIGOR4: VIGOR4. (Github).
- 148.Bacterial and viral bioinformatics resource center. <https://www.bv-brc.org/>.
- 149.Nguyen, L.-T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A. & Minh, B. Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **32**, 268-274 (2015).

150. Miller, M. A., Pfeiffer, W. & Schwartz, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE)* Preprint en <https://doi.org/10.1109/gce.2010.5676129> (2010).
151. Raza, S., Wdowiak, M. & Paczesny, J. An overview of diverse strategies to inactivate Enterobacteriaceae-targeting bacteriophages. *EcoSal Plus* **11**, eesp00192022 (2023).
152. Wick, R. R., Judd, L. M. & Holt, K. E. Performance of neural network basecalling tools for Oxford Nanopore sequencing. *Genome Biol.* **20**, 129 (2019).
153. Cook, R., Brown, N. & Redgwell, T. Salmonella phages and their genomes: an updated view. *Front. Microbiol.* **12**, 643210 (2021).
154. Almeida, G. M., Laanto, E. & Ravaniti, J. Genomic diversity and therapeutic potential of Pseudomonas phages. *Front. Microbiol.* **10**, 1837 (2019).
155. Comentamos y analizamos en nuestro, C. El dilema entre profundidad, cobertura y costo al momento de elegir un estudio genómico. Preprint en <https://www.bitgenia.com/wp-content/uploads/2020/07/dilema-cobertura-costo-articulo-1.pdf>.
156. Bouras, G. *et al.* Pharokka: a fast scalable bacteriophage annotation tool. *Bioinformatics* **39**, btac776 (2023).
157. Ventola, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T* **40**, 277-283 (2015).
158. Abedon, S. T., García, P., Mullany, P. & Aminov, R. Phage therapy: past, present and future. *Front. Microbiol.* **8**, 981 (2017).

159. Hyman, P. Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth. *Pharmaceuticals* **12**, (2019).
160. World Health Organization. *Global antibiotic resistance surveillance report 2025: summary*. <https://iris.who.int/handle/10665/383069> (2025).
161. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
162. Núñez-Samudio, V. *et al.* Molecular genetic epidemiology of an emerging antimicrobial-resistant *Klebsiella pneumoniae* clone (ST307) obtained from clinical isolates in central Panama. *Antibiotics (Basel)* **11**, 1817 (2022).
163. Núñez-Samudio, V. *et al.* Molecular epidemiology of *Escherichia coli* clinical isolates from central Panama. *Antibiotics (Basel)* **10**, 899 (2021).
164. *Magnitude and Trends of Antimicrobial Resistance in Latin America*. https://www.paho.org/sites/default/files/2021-01/2020-cde-magnitude-amr-relavra-report-en-act-oct20-logo.pdf?utm_source=chatgpt.com.
165. Antimicrobial Resistance Collaborators. The burden of antimicrobial resistance in the Americas in 2019: a cross-country systematic analysis. *Lancet Reg. Health Am.* **25**, 100561 (2023).
166. Ross, A., Ward, S. & Hyman, P. More is better: Selecting for broad host range bacteriophages. *Front. Microbiol.* **7**, 1352 (2016).
167. Mattila, S., Ruotsalainen, P. & Jalasvuori, M. On-demand isolation of bacteriophages against drug-resistant bacteria for personalized phage therapy. *Front. Microbiol.* **6**, 1271 (2015).

- 168.Kavagutti, V. S., Andrei, A.-Ş., Mehrshad, M., Salcher, M. M. & Ghai, R. Phage-centric ecological interactions in aquatic ecosystems revealed through ultra-deep metagenomics. *Microbiome* **7**, 135 (2019).
- 169.Ballesté, E. *et al.* Bacteriophages in sewage: abundance, roles, and applications. *FEMS Microbes* **3**, xtac009 (2022).
- 170.Hyman, P. & Abedon, S. T. Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Adv. Appl. Microbiol.* **78**, 23-53 (2012).
- 171.Latka, A., Maciejewska, B., Majkowska-Skrobek, G., Briers, Y. & Drulis-Kawa, Z. Bacteriophage-encoded virion-associated enzymes to overcome the carbohydrate barriers during the infection process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 3103-3119 (2017).
- 172.Gallet, R., Kannoly, S. & Wang, I.-N. Effects of bacteriophage traits on plaque formation. *BMC Microbiol.* **11**, 181 (2011).
- 173.Tom, E. F., Molineux, I. J., Paff, M. L. & Bull, J. J. Experimental evolution of UV resistance in a phage. *PeerJ* **6**, e5190 (2018).
- 174.Pollard, E. C. & Solosko, W. The thermal inactivation of T4 and lambda bacteriophage. *Biophys. J.* **11**, 66-74 (1971).
- 175.Abebe, A. A., Birhanu, A. G. & Tessema, T. S. Isolation, purification, and phenotypic characterization of virulent *Klebsiella pneumoniae* phages from environmental samples in Addis Ababa, Ethiopia: A synergistic approach combining spot assay and streak plating. *PLoS One* **20**, e0331955 (2025).
- 176.Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R. & Górski, A. The influence of external factors on bacteriophages--review. *Folia Microbiol. (Praha)* **56**, 191-200 (2011).

177. Shan, J. *et al.* Temperature dependent bacteriophages of a tropical bacterial pathogen. *Front. Microbiol.* **5**, 599 (2014).
178. Polanco, C. B., Jorquera, D., Galarce, N. & Borie, C. El desafío de controlar las enfermedades transmitidas por alimentos: bacteriófagos como una nueva herramienta biotecnológica. Preprint en <https://www.scielo.cl/pdf/rci/v32n6/art10.pdf>.
179. Sillankorva, S. M., Oliveira, H. & Azeredo, J. Bacteriophages and their role in food safety. *Int. J. Microbiol.* **2012**, 863945 (2012).
180. Jamal, M. *et al.* Bacteriophages: an overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields. *J. Basic Microbiol.* **59**, 123-133 (2019).
181. Duyvejonck, H. *et al.* Evaluation of the stability of bacteriophages in different solutions suitable for the production of magistral preparations in Belgium. *Viruses* **13**, 865 (2021).
182. Balichene Madoshi, P., Pachificus Muhairwa, A., M. A. Mtambo, M. & Forslund, A. Inactivation of *Escherichia coli*, coliforms and coliphages during storage of animal wastes under tropical climatic conditions. *Front. Environ. Microbiol.* **7**, 35 (2021).
183. Fister, S. *et al.* Influence of environmental factors on phage-bacteria interaction and on the efficacy and infectivity of phage P100. *Front. Microbiol.* **7**, 1152 (2016).
184. Tejada, A. J. P. *et al.* Complete genome sequence of bacteriophages infecting *Escherichia*, *Enterobacter*, and *Pseudomonas* isolates. *Microbiol. Resour. Announc.* **14**, e0134524 (2025).

185. Tolstoy, I., Kropinski, A. M. & Brister, J. R. Bacteriophage Taxonomy: An Evolving Discipline. *Methods Mol. Biol.* **1693**, 57-71 (2018).
186. Young, R. Holins: form and function in bacteriophage lysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **17**, 191-205 (1995).
187. Young, R. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol. Rev.* **56**, 430-481 (1992).
188. Young, R. Phage lysis: three steps, three choices, one outcome. *J. Microbiol.* **52**, 243-258 (2014).
189. Badawy, S. *et al.* Identification and Functional Analysis of Temperate Siphoviridae Bacteriophages of *Acinetobacter baumannii*. *Viruses* **12**, 604 (2020).
190. Pirnay, J.-P. *et al.* Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products. *Pharm. Res.* **32**, 2173-2179 (2015).
191. Kortright, K. E., Chan, B. K., Koff, J. L. & Turner, P. E. Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria. *Cell Host Microbe* **25**, 219-232 (2019).

ANEXO

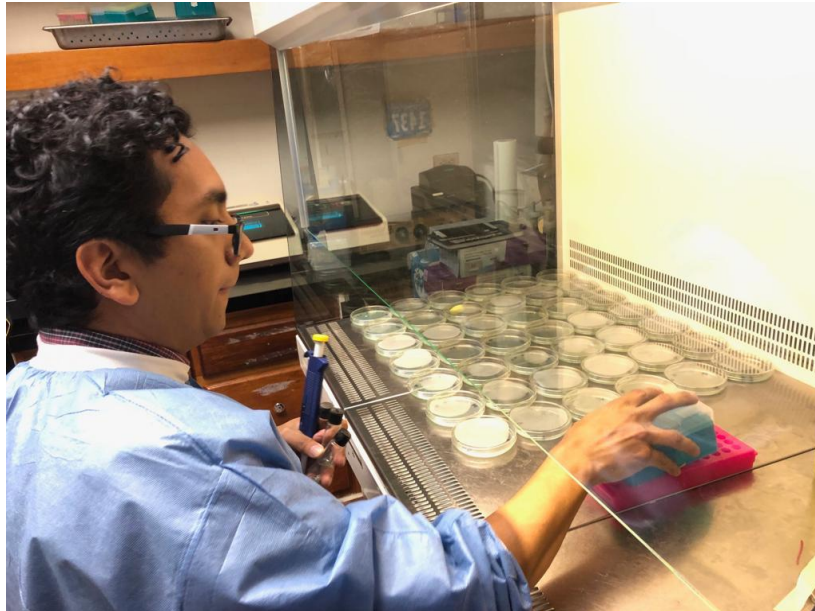


Figura 21. Proceso de preparación de agar para los ensayos de doble capa.

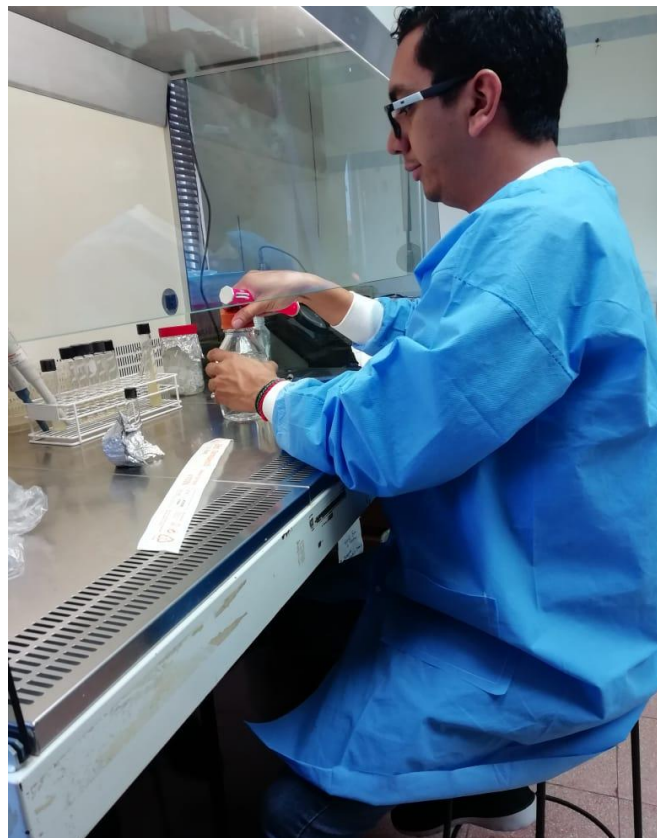


Figura 22. Diluciones y preparación de buffer.



Figura 23. Ensayo de doble capa de agar, fase de enfrentamiento.



Figura 24. Medición de ADN.



Figura 25. Microscopio electrónico de transmisión en el centro de investigación en estructuras microscópicas (CIEMic) de la Universidad de Costa Rica.

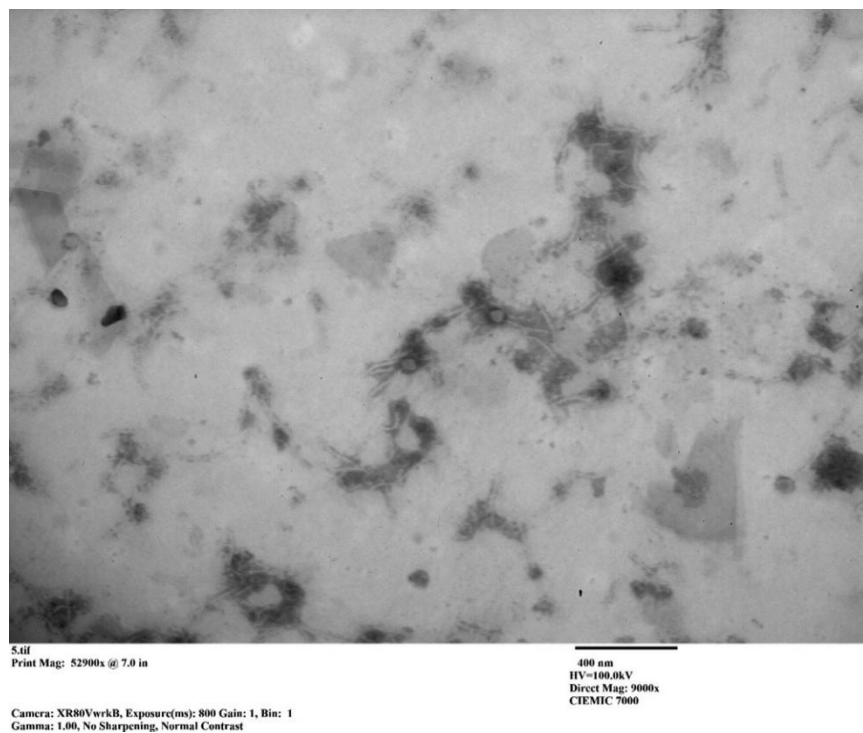


Figura 26. Fotografía por Microscopia electronica de transmision del bacteriofago para la cepa *S. enterica* subespecie Enterica serovar Typhimurium 14028.

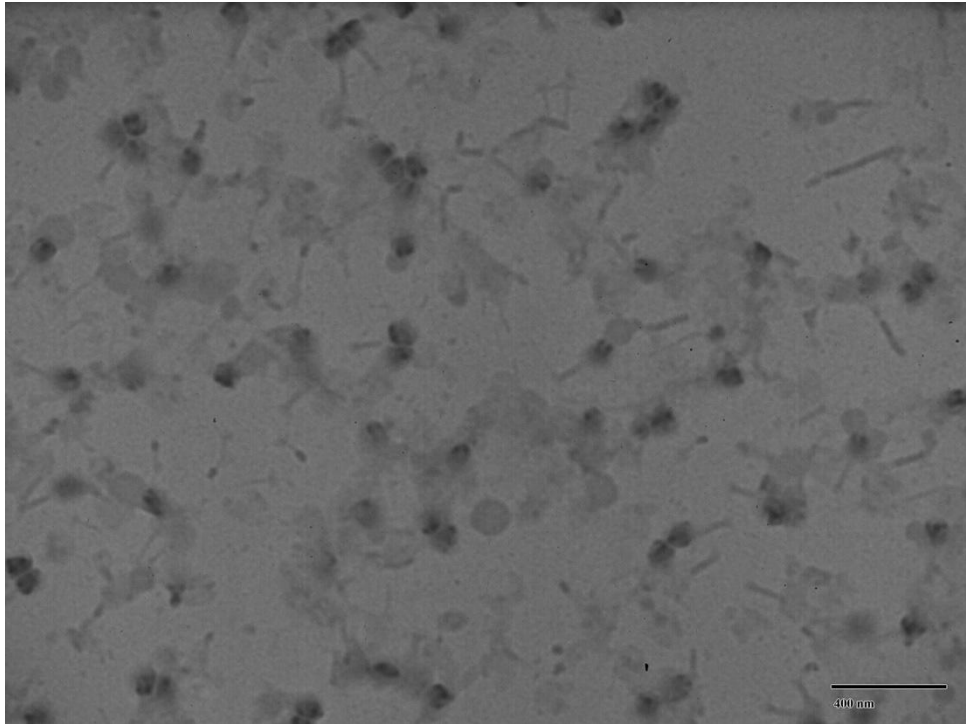


Figura 27. Fotografía por Microscopia electronica de transmision del bacteriofago para la cepa *E. coli* 15597.

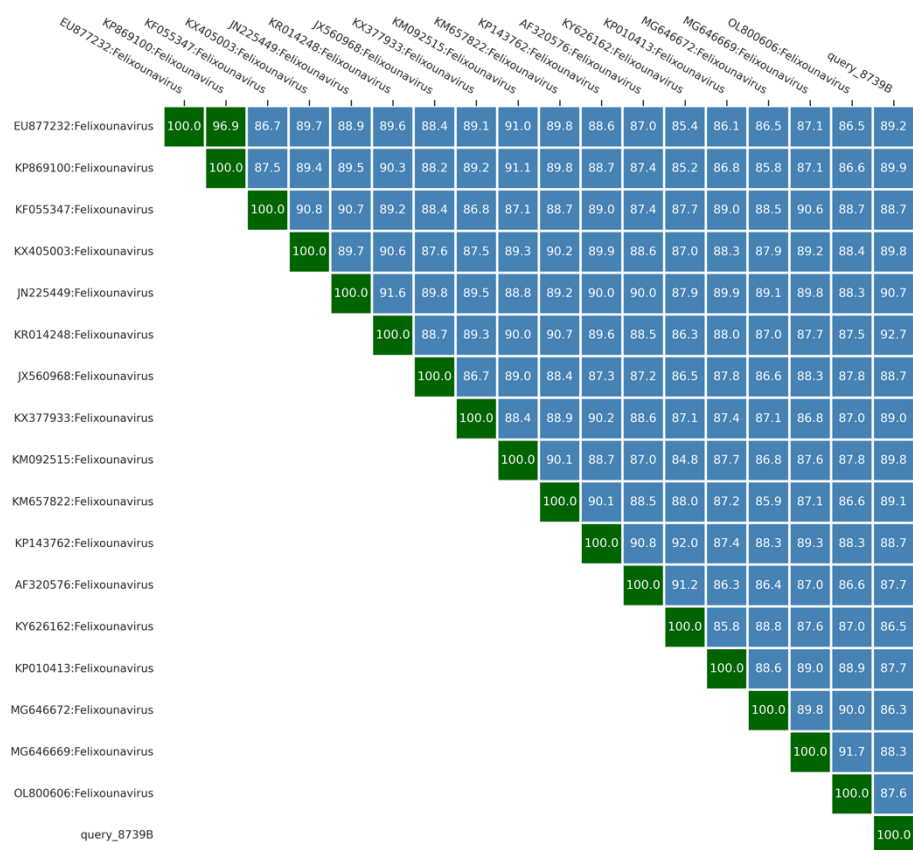


Figura 28. Mapa de calor para el fago de la cepa *E. coli* 8739.

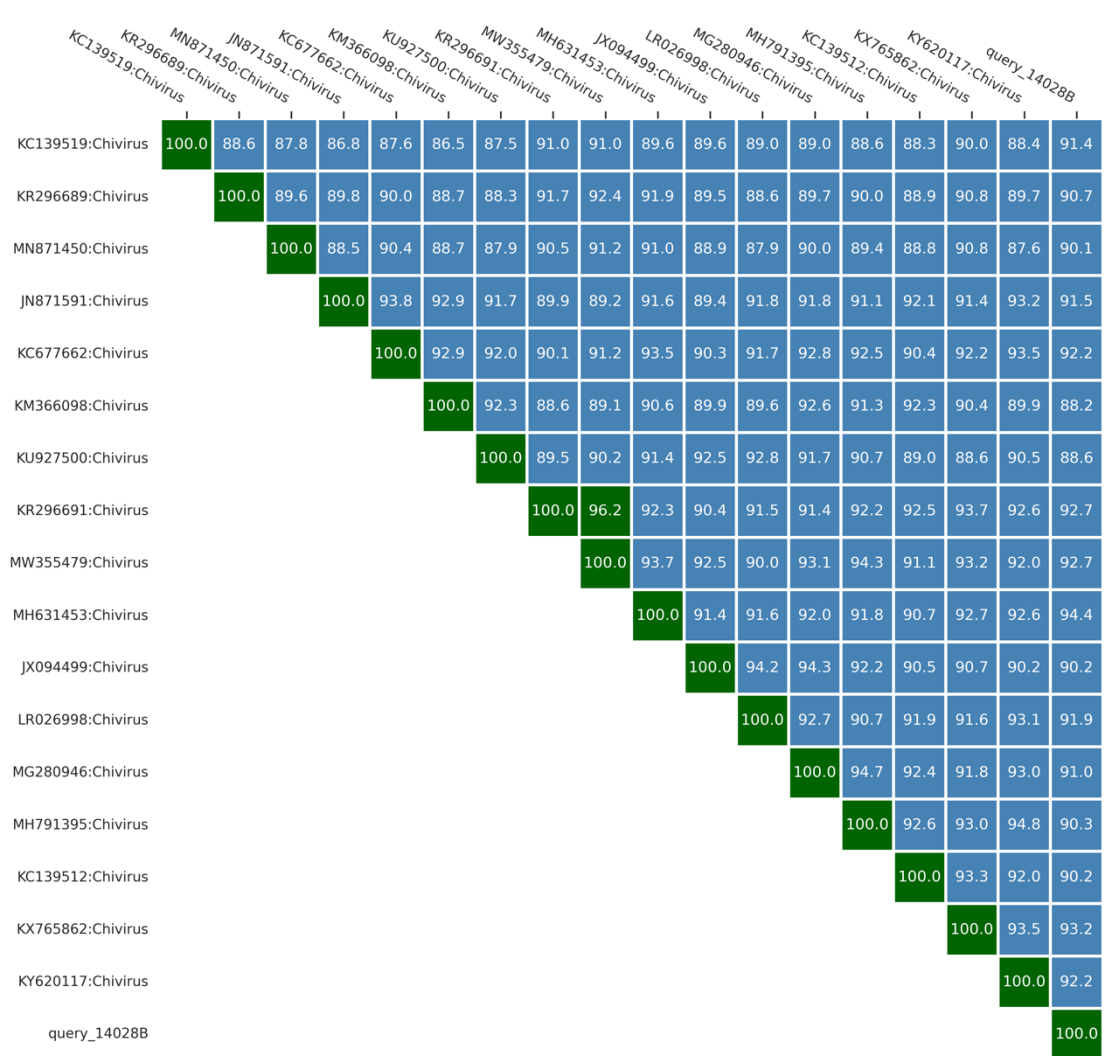


Figura 29. Mapa de calor para el fago de la cepa *S. enterica* subespecie Enterica serovar Typhimurium 14028.