



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

Facultad de  
**MEDICINA**

**EVALUACIÓN DE LA FAGOTERAPIA FRENTE A INFECCIONES  
PRODUCIDAS POR *Klebsiella pneumoniae* PRODUCTORA DE  
CARBAPENEMASAS EN UN MODELO DE *Galleria mellonella***

**EVALUATION OF PHAGE THERAPY AGAINST INFECTIONS  
CAUSED BY CARBAPENEMASE-PRODUCING *Klebsiella pneumoniae*  
IN A *Galleria mellonella* MODEL**

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO  
CIRUJANO**

**AUTORES**

GABRIELA IVETT ALCANTARA LOZANO

GUSTAVO ALONSO QUISPE VILLEGAS

**ASESOR**

JESUS HUMBERTO TAMARIZ ORTIZ

**LIMA – PERÚ**

**2024**



## **JURADO**

Presidente: Dra. Coralith Marlinda Garcia Apac  
Vocal: Dra. Fiorella del Carmen Krapp Lopez  
Secretario: MSc. Lidio Edgar Neyra Valdez

Fecha de Sustentación: 01 de Febrero de 2024

Calificación: Aprobado con Honores

**ASESORES DE TESIS**

**ASESOR**

Dr. Jesus Humberto Tamariz Ortiz

Facultad de Medicina /Departamento Académico de Tecnología Médica

ORCID: 0000-0002-0827-8117

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo está dedicado a nuestros padres, familiares y seres queridos por su guía y apoyo durante el desarrollo del mismo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecimiento especial a nuestro asesor, el doctor Jesus Tamariz Ortiz por sus enseñanzas y apoyo constante. Asimismo, agradecer al Laboratorio de Resistencia a Antimicrobianos e Inmunopatología – LID – UPCH por habernos dado las facilidades para desarrollar este estudio.

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO**

El presente trabajo de investigación fue autofinanciado.

## **DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS**

Los autores declaran la ausencia de conflictos de interés que puedan influir en los resultados o conclusiones del presente trabajo de investigación.

## RESULTADO DEL INFORME DE SIMILITUD

### EVALUACIÓN DE LA FAGOTERAPIA FRENTE A INFECCIONES PRODUCIDAS POR KLEBSIELLA PNEUMONIAE PRODUCTORA DE CARBAPENEMASAS EN UN MODELO DE GALLERIA MELLONELLA

#### INFORME DE ORIGINALIDAD

<b>5</b> %	<b>5</b> %	<b>1</b> %	<b>0</b> %
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

#### FUENTES PRIMARIAS

<b>1</b>	<b>www.researchgate.net</b> Fuente de Internet	<b>1</b> %
<b>2</b>	<b>hdl.handle.net</b> Fuente de Internet	<b>1</b> %
<b>3</b>	<b>doczz.net</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1</b> %
<b>4</b>	<b>repositorio.upch.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1</b> %
<b>5</b>	<b>cybertesis.unmsm.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1</b> %
<b>6</b>	<b>scielo.isciii.es</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1</b> %
<b>7</b>	<b>1library.co</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1</b> %
<b>8</b>	<b>patents.google.com</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1</b> %

## TABLA DE CONTENIDO

I.	Introducción	1
II.	Objetivos	7
III.	Materiales y métodos	8
IV.	Resultados	17
V.	Discusión	19
VI.	Conclusiones	25
VII.	Referencias bibliográficas	26

Anexos

## RESUMEN

**Antecedente:** La emergencia de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas y la reducción de alternativas terapéuticas constituye un serio problema de salud pública. Debido a ello, la fagoterapia resulta una alternativa para ser evaluada frente a la amenaza de la multidrogorresistencia del patógeno.

**Objetivo:** Evaluar la actividad terapéutica de bacteriófagos de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas, empleando como modelo *in vivo* larvas de *Galleria mellonella* aplicando una terapia de rescate de bacteriófagos líticos obtenidos a partir de aguas servidas, en un hospital público de nivel III.

**Materiales y Métodos:** se realizó un estudio experimental. Se aisló un bacteriófago denominado GA23 de aguas residuales hospitalarias y se determinó su capacidad lítica frente a cepas de *Klebsiella pneumoniae* de origen clínico. La optimización de la multiplicidad de infección permitió elaborar ensayos de supervivencia con el modelo de *Galleria mellonella*; evaluada mediante una curva de Kaplan-Meier.

**Resultados:** De la totalidad de cepas bacterianas evaluadas, sólo la C25 permitió generar bacteriófagos líticos (1/12, 8.3%); en la curva de un solo paso, la fase exponencial corresponde a 30 minutos, y el tamaño de explosión a 164 PFU/bacteria. El 100% de larvas sobrevivieron al inóculo conjunto del fago GA23 y la cepa C25 a las 96 horas. **Conclusiones:** El fago GA23 en el modelo de *Galleria mellonella* carece de actividad lítica *in vitro* hacia *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas, pero prolonga la sobrevida frente a la infección por *Klebsiella pneumoniae* C25.

**Palabras clave:** Bacteriófagos, *Klebsiella pneumoniae*, Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae, *Galleria mellonella*

## ABSTRACT

**Background:** The emergence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and the drastic decrease of therapeutic alternatives to treat them constitutes a significant public health challenge. Consequently, phage therapy stands out as a potential alternative to be evaluated against the threat of multidrug resistance of this pathogen. **Objective:** To assess the therapeutic activity of bacteriophages targeting carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, using *Galleria mellonella* larvae as an in vivo model and applying a rescue therapy with lytic bacteriophages obtained from hospital wastewater in a level III public hospital. **Materials and Methods:** An experimental study was conducted. A bacteriophage named GA23 was isolated from hospital wastewater, and its lytic capacity against clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* was determined. Optimization of the multiplicity of infection allowed for survival assays using the *Galleria mellonella* model, assessed through a Kaplan-Meier curve. **Results:** Among all strains, only strain C25 allowed the generation of lytic bacteriophages (1/12, 8.3%); the exponential phase corresponds to 30 minutes, and the burst size to 164 PFU/bacteria. Up to 100% of larvae survived the combined inoculum of the GA23 phage and the C25 strain at 96 hours. **Conclusions:** In the *Galleria mellonella* model, phage GA23 lacks in vitro lytic activity against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* but extends survival against *Klebsiella pneumoniae* C25 infection. **Keywords:** Bacteriophages, *Klebsiella pneumoniae*, Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae, *Galleria mellonella*

## I. INTRODUCCIÓN

*Klebsiella pneumoniae*, en adelante *K.pneumoniae*, es una bacteria gramnegativa de la familia *Enterobacteriaceae* y es reconocida como uno de los patógenos oportunistas más importantes, responsable de infecciones nosocomiales, entre ellas, infección de tejidos blandos, infección del tracto urinario, infección intraabdominal, neumonía, bacteriemia, septicemia y shock séptico (1–3). Por su recurrencia hospitalaria, el uso de antibióticos a lo largo de varias décadas resultó en la emergencia de cepas de *K. pneumoniae* multidrogo resistentes, hasta el grado de perder la susceptibilidad hacia los fármacos carbapenémicos (4,5). Esto resultó en la génesis de *K. pneumoniae* productoras de Carbapenemasas (CP-Kp), enzimas que rompen la estructura del anillo  $\beta$ -lactámico de los carbapenémicos (5).

Las infecciones por CP-Kp contribuyen a un aumento de la mortalidad, peores resultados clínicos, aumento del periodo hospitalario, sobreuso inapropiado de antibióticos y una amenaza perenne hacia los sistemas de salud (2,5,6). Se estima que en el año 2019 se produjeron 4.95 millones de muertes asociadas a bacterias resistentes a nivel mundial, incluyendo a *K. pneumoniae* en la lista de patógenos (7). Asimismo, según el banco mundial, se proyecta que la resistencia a los antimicrobianos podría costar hasta 6.1 billones de dólares anuales en 2050 en todo el mundo (8).

En Latinoamérica las CP-Kp fueron identificadas por primera vez en Brasil en el año 2003 y desde esa fecha, su prevalencia ha aumentado rápidamente en toda la región (9). Esta tendencia es notable también en el Perú, en donde se confirmó la

presencia de CP-Kp por primera vez en el año 2013 y la tasa de resistencia nacional alcanzó alrededor de 8% de todos los aislamientos de *K. pneumoniae* en 2016 (10). En el año 2022, en el Hospital Nacional Cayetano Heredia, se identificaron 150 aislamientos de enterobacterias resistentes, siendo CP-Kp la bacteria más aislada con un 44% (11).

Actualmente la estrategia terapéutica óptima para el tratamiento de infecciones por CP-Kp no es del todo clara (12). Fármacos como colistina, aminoglucósidos, fosfomicina y tigeciclina han sido considerados los antibióticos de último recurso en las décadas recientes (13). Sin embargo, el resultado clínico no es favorable debido a problemas de eficacia, altos niveles de nefrotoxicidad y elevada mortalidad según la Sociedad Estadounidense de Enfermedades Infecciosas (IDSA) (14). Frente a este escenario, la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó en 2016, a las bacterias resistentes como prioridades para la investigación y el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas; en la que CP-Kp se encuentra como prioridad uno (crítica) (15). Como resultado, han surgido nuevos antibióticos, en su mayoría agentes modificados de fármacos previamente descritos (16).

En Estados Unidos y Europa, ceftazidima-avibactam, meropenem-vaborbactam y cefiderocol son recomendados como tratamiento de elección para infecciones severas por CP-Kp actualmente (12,14). No obstante, la evidencia para su uso es limitada y se deriva principalmente de estudios observacionales retrospectivos (17); por otro lado, todos los antibióticos recientemente aprobados han sido diseñados en Estados Unidos centrándose en los determinantes de resistencia más prevalentes a

nivel local (16). Asimismo, su distribución no es óptima y la mayoría no están disponibles en todos los países (13), a la fecha, en el Perú, solo disponemos de ceftazidima-avibactam, con muchas limitaciones para su aplicación terapéutica (18). Más aún, recientes estudios han descrito la aparición de resistencia durante el tratamiento con los nuevos antibióticos: un estudio observacional evidenció resistencia a ceftazidima-avibactam en un 8.1% (3/37) en pacientes críticamente enfermos con infección por CP-Kp (19); mientras que otro estudio observacional reportó fracaso terapéutico en el 5% de casos tratados con meropenem-vaborbactam (20).

Debido a la morbimortalidad que producen las CP-Kp, existe la necesidad de alternativas para contribuir a la erradicación tanto de las cepas resistentes como las persistentes (21). En los últimos años, los bacteriófagos (fagos) han retomado la atención por representar un tratamiento alternativo para tratar enfermedades infecciosas por bacterias multidrogo resistentes (22). La fagoterapia consiste en el uso terapéutico de los fagos, que son virus específicos de bacterias (22,23). Su capacidad bactericida es el resultado de la lisis del patógeno, tras el uso de la “maquinaria” del hospedero bacteriano para la producción de más viriones (24).

En varios estudios se ha informado la aplicación de la fagoterapia en infecciones graves causadas por bacterias resistentes a los antimicrobianos (25). Por ejemplo, en el año 2019, Bao y cols. reportaron la combinación de fagos con trimetoprima-sulfametoxazol como tratamiento curativo para una paciente con infección de tracto urinario recurrente por CP-Kp (26). Ese mismo año, Cano y cols. realizaron un

reporte de caso de un paciente de 62 años con infección de prótesis articular causada por *K. pneumoniae* (cepa KpJH46), que fue tratado con éxito con el fago KpJH46Φ2 en combinación con minociclina (27).

Sin embargo, no todos los fagos son aptos para propósitos terapéuticos; por lo que la identificación y caracterización son etapas iniciales fundamentales en cualquier investigación relacionada con estos virus (24,28). Un ejemplo de este proceso es la obtención de datos sobre su crecimiento poblacional a través de las curvas "one-step", que posibilitan la determinación del número de viriones liberados por bacteria infectada(24). Para ello, resulta esencial comprender la multiplicidad de infección (MOI), un parámetro crucial que garantiza una expansión reproducible y eficiente (24,29). Es vital destacar que estos parámetros varían de un bacteriófago a otro.

Otro aspecto por considerar es el almacenamiento. Actualmente en los bancos de fagos optan por almacenarlos a corto plazo a una temperatura de 4°C, protegidos de la exposición a la luz y en una solución tamponada con un pH entre 5 y 9 (30). A pesar de que estas condiciones son adecuadas para muchos fagos, se requiere una evaluación específica de las condiciones de almacenamiento para cada uno, ya que suelen ser sensibles a la congelación, descongelación y liofilización (28,30).

Por otro lado, se prefieren los fagos con ciclos de replicación líticos, ya que en ellos la lisis celular es indeterminada, reduciendo así el riesgo de transferencia horizontal de genes por transducción hacia los patógenos (28,31). Asimismo, se consideran candidatos ideales aquellos que pueden infectar una amplia gama de cepas

bacterianas (28). No obstante, los fagos con un rango de huésped más limitado podrían ser una opción viable para apuntar a cepas específicas sin los efectos adversos asociados con la disbiosis del microbioma del paciente (32).

Aunque la perspectiva del uso de la fagoterapia contra infecciones bacterianas resistentes es altamente prometedora, aún persisten desafíos significativos para su implementación a gran escala. Uno de ellos es la necesidad de mayor evidencia que respalde su uso en medicina humana (31). En los últimos años se han llevado a cabo estudios que utilizan modelos animales para evaluar la eficacia de la fagoterapia *in vivo*. El insecto *Galleria mellonella*, perteneciente a la orden *Lepidoptera* de la familia *Pyralidae*, ha surgido como un modelo adecuado en este contexto debido a su asequibilidad, facilidad de mantenimiento y prescindencia de equipo de laboratorio especializado (33,34).

*G. mellonella* presenta ventajas notables como alternativa al modelo murino para el estudio de infecciones microbianas, eliminando las desventajas asociadas con los costos de mantenimiento y el tiempo de reproducción. Desde una perspectiva ética, la menor complejidad de *Galleria spp.* lo posiciona como un modelo alternativo valioso para los ensayos *in vivo* de la virulencia de bacterias gramnegativas (35,36). La supervivencia se evalúa al comparar un inóculo bacteriano control, contra diferentes combinaciones de antibióticos, con el objetivo de prolongar la supervivencia de las larvas de *G. mellonella*, visualizando los resultados a través de las curvas de Kaplan-Meier.

En los ensayos de *Nath y cols.*, por ejemplo, se logró prolongar la sobrevivencia del modelo mediante combinaciones de polimixina-B con meropenem, además de la monoterapia con meropenem o amikacina contra cepas de CP-Kp (33). En base a lo expuesto, el presente estudio se realizó con el objetivo de aplicar la terapia de bacteriófagos en el modelo *in vivo* de *G. mellonella* contra cepas de *K. pneumoniae*.

## II. OBJETIVOS

### *Objetivo general*

Evaluar la actividad terapéutica de bacteriófagos de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas, empleando como modelo *in vivo* larvas de *Galleria mellonella*, aplicando una terapia de rescate de bacteriófagos líticos obtenidos a partir de aguas servidas, en un hospital público de nivel III de complejidad.

### *Objetivos específicos*

- Caracterizar la actividad lítica de los bacteriófagos aislados a diferentes rangos de pH y temperatura.
- Determinar el rango de acción y la multiplicidad de infección (MOI) óptima de los bacteriófagos aislados a diferentes concentraciones.
- Determinar el tiempo de latencia y el tamaño de explosión mediante la curva de un solo paso de los fagos aislados.
- Determinar mediante una curva de muerte, la eficacia terapéutica *in vivo* de bacteriófagos de *Klebsiella pneumoniae*.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### ***Diseño de estudio***

Se realizó un estudio de diseño experimental. Se empleó un grupo control consistente en larvas de *G. mellonella* inoculadas con el patógeno, excluyendo cualquier tipo de terapia. Los grupos experimentales fueron constituidos por larvas a las que se inoculó el patógeno bacteriano y, asimismo, diversas presentaciones, dosis y combinaciones del agente terapéutico consistente en bacteriófagos líticos.

#### ***Población y muestra***

La población y unidad de análisis fueron bacteriófagos aislados, identificados como líticos frente a los patógenos bacterianos evaluados. Debido a las características del estudio, no fue necesario un cálculo de tamaño de muestra.

Respecto a los ensayos de *G. mellonella*, se recurrió a experimentación por grupos experimentales y de control, constituidos por 5 individuos por grupo.

#### ***Criterios de inclusión***

- 1) Bacteriófagos de *K. pneumoniae* obtenidos a partir de aguas residuales hospitalarias.
- 2) Bacteriófagos con capacidad lítica frente a *K. pneumoniae*, al generar halos transparentes mayores de 0.3 mm en el test de doble capa de Adams durante el aislamiento inicial.
- 3) Bacteriófagos capaces de superar una concentración  $>10^6$  PFU/ml posterior a dos ensayos de expansión con la cepa de *K. pneumoniae* empleada para el aislamiento inicial.

### ***Criterios de exclusión***

- 1) Bacteriófagos con pérdida de actividad biológica en el *Spot Test* hacia la cepa C25 de *K. pneumoniae*.

### ***Procedimientos y técnicas***

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Resistencia a Antimicrobianos e Inmunopatología – LID – UPCH, el cual es un laboratorio de nivel de bioseguridad tipo 2 que cuenta con el diseño y equipamiento necesario para la contención de gérmenes, como *K. pneumoniae*, pertenecientes al Grupo de Riesgo Biológico 2.

Asimismo, estos experimentos abarcaron el proceso de obtención de los fagos de aguas residuales, la expansión de su concentración, experimentos de caracterización y, finalmente, el ensayo de supervivencia en el modelo de *G. mellonella*. Los experimentos de caracterización incluyeron: el ensayo de multiplicidad de infección (MOI) que determinó la proporción virus-bacteria óptima *in vitro* a utilizar en el ensayo con *G. mellonella*, la determinación del rango de hospedero, la estabilidad a diferentes valores de pH y temperatura que analizará la capacidad del virus de proliferar a distintos microambientes útiles para su almacenamiento y administración terapéutica, y la curva de un solo paso que simulará el escenario del ciclo lítico del bacteriófago desde la primera cohorte bacteriana infectada por el virus en tres diferentes bases (fase de eclipse, donde el virión penetra la célula; la fase exponencial, donde ocurre el ciclo lítico; y la fase de platea, el cual se alcanza la máxima concentración de viriones obtenidos).

### *Obtención de fagos de aguas residuales*

Se obtuvieron 10 ml de aguas residuales del desagüe hospitalario, y posteriormente fueron sometidas a filtración en poros de 0.45  $\mu\text{m}$ . El aislamiento de fagos y la expansión inicial se realizó con una cepa de *K. pneumoniae* de procedencia clínica, denominada C25 obtenida del cepario del Laboratorio de Resistencia a Antimicrobianos e Inmunopatología, cepa multidrogorresistente (con resistencia a más de tres grupos de antibióticos), y productora de BLEE (Betalactamasas de espectro extendido). Una solución bacteriana de 200  $\mu\text{l}$ , a una turbidez equivalente al tubo 0.5 de la escala de Mc Farland (equivalente a  $1.5 \times 10^8 \text{UFC/ml}$ ), se inoculó al filtrado de aguas residuales en caldo Luria Bertani (LB) a doble concentración. El procedimiento se realizó en un Shaker a 110 rpm, a 37°C, durante 24 horas. Posteriormente, un segundo filtrado en poros de 0.45  $\mu\text{m}$  y cuatro diluciones seriadas en cloruro de sodio al 0.9% permitió realizar el test de doble capa de Adams. Para ello se recurrió a medio semisólido LB con un 0.4% de agar-agar, caldo LB, 100  $\mu\text{l}$  de dilución viral y 200  $\mu\text{l}$  de solución bacteriana a 0.5 Mc Farland. Asimismo, todos los ensayos de capa doble de Adams incluyeron un *Spot Test*, para el cual se inoculó 20  $\mu\text{l}$  de filtrado a una monocapa bacteriana de la cepa C25, incorporada mediante hisopo estéril. Dicho ensayo tuvo la función de control positivo.

### *Aislamiento y expansión de bacteriófagos*

En el aislamiento inicial se obtuvo las “calvas” (regiones sin desarrollo bacteriano producto de la lisis) con mayor halo, medurado en centímetros, tomándose en consideración el diámetro de lisis y el diámetro opaco producido por las

despolimerasas. No se aislaron calvas con colonias dentro del halo, con el propósito de evitar la obtención de fagos lisogénicos.

Las calvas seleccionadas se aislaron mediante piqueteo con tips estériles de 1000 µl, para suspenderse en 1.5 ml de medio infusión cerebro-corazón (BHI). Posteriormente, la solución se incubó a 37°C por 1 hora, para someterse a centrifugación por 2 minutos a 1500 rpm. Se obtuvieron 100 µl de la solución para incubarse junto a 200 µl de la cepa C25 de *K. pneumoniae* a una turbidez de 0.5 según la escala de Mc Farland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/ml) en caldo LB a doble concentración; a 37° por 24 horas y finalmente filtrarse mediante poros de 0.45 µm. De esta manera, se permitió la expansión y aislamiento de los bacteriófagos de las placas de lisis seleccionadas. Asimismo, se realizó el test de doble capa de Adams para determinar la concentración de cada fago obtenido.

#### *Determinación y ampliación de la concentración de fagos*

El cálculo de la concentración de fagos se realizó mediante el conteo de las Unidades Formadoras de Placa (PFU/ml) de la siguiente manera:

$$\text{PFU/ml} = \text{número de calvas} \times 10^{\text{número de diluciones}} \times 10 \text{ ml}$$

Donde, el número de calvas corresponde al conteo total de placas de lisis; mientras que el número de diluciones hace referencia a la cantidad de diluciones en una relación 1/10 en cloruro de sodio al 0.9%. Se aplicó un factor de corrección de 10 por el inóculo de 100 µl de dilución viral al medio semisólido (para corresponder a 1 ml). La cifra obtenida se registró en notación científica.

Posteriormente, se amplió la concentración viral al repetir el co-cultivo con 200 µl de la cepa C25 a una turbidez de 0.5 Mc Farland. Para dicho ensayo, el volumen de

solución viral se calculó para obtener una multiplicidad de infección de 0.1. La PFU/ml final se determinó mediante el test de doble capa de Adams, hasta lograr una concentración de al menos  $10^6$  PFU/ml.

#### *Ensayo de multiplicidad de infección (MOI)*

En tubos con 8 ml de caldo LB estériles, se añadió 1 ml de suspensión bacteriana de la cepa C25 a una concentración de 0.5 de Mc Farland; junto a 1 ml de suspensión viral en concentraciones de  $10^7$ ,  $10^8$  y  $10^9$  PFU/ml para obtener multiplicidades de infección de 0.1, 1 y 10, respectivamente. La obtención de las PFU/ml fue realizada mediante diluciones con cloruro de sodio al 0.9%. Dichos tubos fueron incubados a 37°C por 4 horas, para ser sometidos a centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos. Se extrajo el sobrenadante y se filtró mediante filtros de 0.45  $\mu$ m de porosidad. La obtención de PFU/ml se realizó con el método de capa doble de Adams. Todos los ensayos de MOI se realizaron por duplicado, y se consideró un MOI óptimo a la que presentó un mayor PFU/ml.

#### *Determinación del rango de hospedero mediante Spot Testing*

Para determinar el rango de hospedero se utilizó un total de 12 cepas clínicas de *K. pneumoniae*. Se incluyeron cepas caracterizadas como Cr-KP portadoras de carbapenemasas KPC-2, IMP, NDM-1, VIM y OXA-48 *like*, así como cepas pertenecientes al tipo capsular K70 y K74. El *Spot Testing* se realizó mediante un extendido bacteriano en agar LB de la cepa bacteriana evaluada; donde posteriormente, por goteo simple, se inculó la solución viral a  $1 \times 10^8$  PFU/ml. Se incubó por 24 horas a 37°C y se determinó la presencia de actividad lítica al

formarse calvas claras, sin turbidez.

#### *Estabilidad del bacteriófago a diferentes valores de pH*

Se preparó buffer SM (50mM Tris-HCl, 8mM sulfato de magnesio, 100mM cloruro de sodio, 0.01% gelatina, pH 7.5) y se ajustó a valores de pH de 4, 5, 6, 7 y 8. En tubos de ensayo estériles se añadió una solución viral en proporción 1:10 junto al buffer SM. La mezcla se incubó a 37°C en 210 rpm por 1 hora y se evaluó la actividad lítica mediante la siembra con el método de doble capa de Adams y la determinación de las PFU/ml.

#### *Estabilidad del bacteriófago a diferentes temperaturas*

Con un preparado estéril de cloruro de sodio al 0.9%, se añadió una solución viral en proporción 1:10, y posteriormente se incubó en 8, 35, 36, 37, 38, 39, 40 y 50°C durante 1 hora. Se evaluó la preservación de la actividad lítica mediante el método de doble capa de Adams.

#### *Curva de un solo paso*

La cepa bacteriana C25 se sembró en agar LB por 24 horas. Se suspendió la bacteria en cloruro de sodio al 0.9% para obtener un Mc Farland de 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  UFC/ml), y se añadió un inóculo de 1 ml de bacteria con 1 ml de la MOI óptima del fago en 8 ml de medio LB. Se incubó durante 15 minutos a 37°C en un Shaker a 100 rpm, para someterse a centrifugación a 3000 rpm en 2 ciclos de 10 minutos. La separación del sobrenadante permitió resuspender el pellet en 1 ml de caldo LB; y posteriormente se obtuvo 100 µl de la solución obtenida y se añadió a 15 ml de

caldo LB temperado a 37°C. Este fue considerado el tiempo cero, a partir del cual, se tomó por duplicado muestras de 1 ml de caldo durante 110 minutos, a intervalos de 10 minutos, seguido del método de capa doble de Adams para obtener la concentración vital (PFU/ml), mediante diluciones seriadas entre  $10^2$  y  $10^8$ . El promedio de las PFU/ml obtenidas se consideró como la PFU/ml final.

#### *Ensayos de supervivencia con Galleria mellonella*

Se seleccionaron larvas de *G. mellonella* sin manchas oscuras y con una longitud mayor a los 2.5 cm. La descontaminación se realizó con un hisopo de algodón con etanol al 70%. Todas las inoculaciones bacterianas se realizaron con una jeringa de insulina (300 µL), en la última propata posterior izquierda; y las inoculaciones virales en la última propata posterior derecha. Posteriormente se incubaron las larvas a 35°C en oscuridad. Durante 96 horas se observaron las larvas en placas Petri y se determinó durante el seguimiento la ocurrencia de inmovilidad espontánea o mediante estímulos táctiles con tips estériles de 100 µl. Asimismo, se consideró la melanización de las larvas al momento de evaluar viabilidad, confirmándose la pérdida de esta al co-existir inmovilidad.

Para los experimentos *in vitro* se preparó una solución bacteriana compuesta por  $10^7$  UFC/ml de la cepa C25, y una solución viral del bacteriófago a  $10^6$  UFC/ml. Para titular las concentraciones de ambas soluciones se utilizó Buffer SM como solvente (105.2 ml agua destilada, 1.23 gr de NaCl, 0.15 gr de MgSO<sub>4</sub>, 1.1 gr Tris-HCl).

La experimentación con *G. mellonella* consistió en una cohorte de 20 larvas; distribuidas en 4 grupos de 5 larvas cada uno: un grupo control, que se inoculó con 200 µl de Buffer SM; un grupo con un inóculo de 200 µl de suspensión bacteriana de la cepa C25 a  $1 \times 10^7$  UFC/ml; un tercer grupo con 200 µl de inóculo de concentrado viral a  $10^6$  PFU/ml; y un cuarto grupo inoculado con la suspensión bacteriana y viral en una proporción de 1:1 (100 µl y 100 µl). Para este último se inoculó primero la suspensión bacteriana; y posterior a los 60 minutos se añadió la suspensión del bacteriófago.

El ensayo en total duró 96 horas, y se evaluó el estado de cada larva cada 24 horas. De esta manera se obtuvo 4 puntos, iniciando con un 100% de larvas viables y en cada evaluación se determinó el porcentaje de larvas supervivientes. Se registró el estado de cada larva y se consideró el desenlace si se presentaba (a) inmovilidad frente a estímulos táctiles con un tip estéril, (b) melanización, o (c) conclusión de las 96 horas.

### **Aspectos éticos del estudio**

El proyecto fue aprobado para su ejecución por el Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Por otro lado, el proyecto no requirió un consentimiento informado para la selección del marco muestral y su inclusión en el estudio. Asimismo, *G. mellonella* no está incluida en la legislación de bienestar animal (7 U.S.C. 2131) al no categorizarse como “animal de sangre caliente”, “aves”, “ratas del género *Rattus*” ni “ratones del género *Mus*” (32–34).

## **Plan de análisis**

Toda la información obtenida se clasificó según el tipo de variable, siendo cualitativa o cuantitativa para el bacteriófago. La base de datos se administró mediante el programa Access 2013. Se contempló como variable cualitativa la formación de halo transluciente, la temperatura mínima y máxima de actividad lítica, el pH mínimo y máximo de actividad lítica y la multiplicidad de infección óptima. Asimismo, se consideró a las variables cuantitativas la concentración total del bacteriófago en PFU/ml y el diámetro de placa en cm. Todas las variables, excepto la última, se consideraron en una tabla descriptiva para el bacteriófago (Anexo 1).

Para la curva de un solo paso se realizó un gráfico que contempla los 10 puntos de tiempo a lo largo de los 110 minutos del experimento. Cada punto fue el promedio de ambos PFU/ml de los ensayos por duplicado en cada intervalo de tiempo. El gráfico se realizó con el software R-Studio y el paquete estadístico ggplot2 v3.3.4.

La variable de la supervivencia larvaria en horas se consideró en el ensayo de supervivencia de las larvas de *G. mellonella*. Se registró el estado de cada larva en intervalos de 24 horas; y con el porcentaje de larvas viables se realizó la curva de Kaplan-Meier y la prueba de longitud de Wilcoxon, donde se consideró un 95% de confianza y determinó si existen diferencias significativas entre los cuatro grupos.

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el software R-Studio, y los paquetes estadísticos ggplot2 v3.3.4, survival v3.5-7 y dplyr v.1.1.4

## IV.RESULTADOS

### *Aislamiento y expansión de los bacteriófagos*

Se obtuvieron tres bacteriófagos, para los cuales se aplicaron los criterios de inclusión descritos previamente (Anexo 2). Dos de los bacteriófagos fueron aislados; sin embargo, solo el fago denominado GA23 cumplió con todos los criterios de inclusión (Anexo 2) este formó, en la cepa C25 de *K. pneumoniae*, placas de lisis uniformes de 0.9 cm de diámetro, con una evidente actividad de despolimerasas al observarse la formación de halos alrededor de las placas (Anexo 3). Por otro lado, luego del proceso de expansión se logró una concentración final de  $2 \times 10^8$  PFU/ml.

### *Ensayo de multiplicidad de infección (MOI)*

La MOI óptima del fago GA23 fue de 0.1 (la proporción de fagos a bacterias fue de 1:10), lo que resultó en el título de fagos más alto *in vitro*.

### *Determinación del rango de hospedero*

El fago GA23 solo mostró actividad lítica frente a la cepa C25 utilizada como control positivo y empleada para el aislamiento del fago. No se observó actividad lítica frente a las otras cepas bacterianas evaluadas en este estudio (Anexo 4).

### *Estabilidad del bacteriófago a diferentes valores de temperatura y pH*

El fago GA23 mostró actividad lítica desde pH 4.0 hasta pH 8.0 (Anexo 58). Asimismo, mantuvo un título constante a siete de las ocho temperaturas evaluadas: 8°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C y 40°C; mientras que a los 50°C se observó

una drástica disminución de la PFU/ml (Anexo 6).

#### *Curva de un solo paso*

Se determinó para el bacteriófago GA23 un periodo de latencia mínimo (menor de 5 minutos) y una fase exponencial que duró aproximadamente 30 minutos con un *burst size* de 161 partículas virales por célula (Anexo 7).

#### *Ensayos de supervivencia con Galleria mellonella*

Durante los ensayos con *G. mellonella*, a las 24 horas se observó la viabilidad de solo el 53% de larvas (8/15) del grupo control con la cepa de *K. pneumoniae* C25, y el 26.7% (4/15) a las 96 horas. No obstante, no se evidenció mortalidad entre los individuos tratados con Buffer SM o lisado viral. Al realizar el inóculo de GA23 a los 60 minutos posteriores de la inyección con C25, la totalidad de larvas de *G. mellonella* preservaron su viabilidad a las 96 horas. Mediante la prueba de longitud de Wilcoxon, se ha determinado que la diferencia entre el grupo control y el grupo tratado con GA23 son estadísticamente significativas, con un  $p=0.007$  (Anexo 8).

## V. DISCUSIÓN

El objetivo principal de nuestro estudio fue evaluar la fagoterapia frente a aislamientos de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas; sin embargo, pese a las características apropiadas y elevada actividad protectora del fago GA23 frente a la cepa C25 de *K. pneumoniae*, (multidrogoresistente, pero no productora de carbapenemasa), el espectro de actividad lítica del fago no incluyó ninguna de la CP-Kp evaluadas. Para comprender la susceptibilidad de las bacterias gramnegativas en general y en el género *Klebsiella* en particular frente a la actividad lítica de los bacteriófagos, es necesario entender el proceso de adsorción viral, cuyo propósito es la integración del genoma viral en el hospedero bacteriano; lo que explicaría la limitada susceptibilidad bacteriana del bacteriófago GA23 hacia cepas productoras de carbapenemasas.

La adsorción comprende tres fases: (i) el contacto inicial con el bacteriófago-huésped mediante mecánica Browniana (37,38); (ii) la interacción reversible que comprende el contacto entre las proteínas receptoras de unión (RBP) del bacteriófago con los receptores de superficie bacterianos (39); (iii) y finalmente la interacción irreversible, donde ocurre la inyección del material genético al huésped (38).

Es relevante resaltar la clasificación de las cepas capsulares de *K. pneumoniae*, definida por los antígenos K, producto de la expresión del clúster génico cromosomal *cps* (40,41). De este último, cobra relevancia el locus *wzi* (*orf4*), responsable de la genotipificación del antígeno K (42,43). De esta manera, la interacción reversible de las cepas capsulares de *K. pneumoniae* y los bacteriófagos implica la especificidad de las RBP hacia el antígeno K. Por consiguiente, la

interacción involucra tanto la especificidad del antígeno capsular, como la presencia de mutantes, los cuáles pueden resultar por presión selectiva en entornos fago-hospedero (44).

Debido a que la integridad de componentes no proteicos son críticos para la susceptibilidad bacteriana (45,46), impedir la adsorción constituye el principal mecanismo de resistencia hacia bacteriófagos (47), lo cual suele lograrse mediante mutaciones capsulares y de membrana. De estos últimos, se rescata como ejemplo la insensibilidad hacia la adsorción del fago GH-K3, dependiente de la actividad génica de OmpC (y la porina OmpK36), GT1, GT2 y wcaJ (47–49); además de los bacteriófagos NPat y BMac, impermeables hacia las cepas acapsulares de *K. pneumoniae* producto de las alteraciones de los genes wzb y wzc (49).

Otro factor involucrado en la interacción bacteriófago-huésped es la presencia de despolimerasas virales en las RBP, las cuáles reconocen azúcares a nivel capsular durante la interacción reversible (48). Dichas enzimas tienen la propiedad de ser liberadas como enzimas libres, las cuales retienen el efecto catalítico hacia la cápsula (45). Esto último es responsable del fenómeno macroscópico observado en el fago GA23, y en bacteriófagos poseedores de despolimerasas: la creación macroscópica de un halo que rodea la calva, producto de la denudación de la CPS (41,43–45).

Todos estos factores limitan la aplicación de un solo bacteriófago hacia múltiples cepas del género *Klebsiella*, y permiten explicar el limitado rango de hospederos del fago GA23 (50,51). La diversidad biológica de las membranas de los gramnegativos representa un obstáculo para la fagoterapia hacia *K. pneumoniae* por la diversidad capsular y el costo de lograr el aislamiento de múltiples bacteriófagos

que permitan la cobertura de cepas clínicas pertenecientes a múltiples genotipos K (43), donde un solo bacteriófago de amplio espectro es insuficiente para la totalidad de tipos capsulares descritos (52). Más aun cuando el presente estudio no ha podido caracterizar mediante Whole Genome Sequencing el genoma viral, por el cuál hubiera sido posible identificar componentes de las RBP como las despolimerasas, además de conjeturar su comportamiento frente a familias previas descritas de dichas moléculas.

Se debe rescatar que, además de las limitaciones biológicas para desarrollar viriones de amplio espectro de actividad lítica; las condiciones del microambiente que permiten la proliferación del fago juegan un rol que posibilita el éxito del modelo a nivel *in vitro* e *in vivo*, en la aplicabilidad médica e industrial de los bacteriófagos (53). Se han reportado bacteriófagos que retienen actividad lítica desde temperaturas de  $-20^{\circ}\text{C}$  (54,55), hasta los  $60-70^{\circ}\text{C}$  (25,56–58), lo cual cobra relevancia para el almacenamiento de bacteriófagos mediante refrigeración, y su posterior aplicabilidad hacia modelos *in vivo* endotermos o ectotermos, siendo este último el caso de *G. mellonella* (59), empleado en nuestro estudio. El fago GA23 preserva la formación de partículas virales a las temperaturas de  $8^{\circ}\text{C}$  hasta  $40^{\circ}\text{C}$ , dicho rango no limitaría su aplicación en el tratamiento de infecciones en seres humanos y mamíferos de sangre caliente.

De forma paralela, el pH del microambiente cobra relevancia en modelos *in vivo* al considerar los diferentes compartimentos de un organismo y las rutas de administración de los bacteriófagos (60): la piel humana posee un pH alcalino

secundario a la colonización bacteriana; mientras que el parénquima renal y el tracto urinario poseen drásticos entornos ácido-base tanto en condiciones fisiológicas como mórbidas (53). El fago GA23 muestra estabilidad en el rango de pH 4-8, mientras que en otros estudios se han reportado fagos como IME268, el cual preserva su actividad biológica a pH de 2 hasta 14 (61). Otros bacteriófagos reportados que retienen la funcionalidad a pH de 4-12 incluyen a Kp vB\_Kpn\_ZCKp20p (55), vB\_KpnP\_k3\_ULINTkp1 (57), BUCT610 (25) y vB\_KpnS\_SXFY507 (58); mientras que vB\_KpnP\_Klvazma tiene la limitación de generar partículas virales líticas a pH de 4-5 (62). Consecuente a los ejemplos escritos, existe la dificultad de suministrar fagoterapia mediante la vía oral, dado que el pH gástrico llega hasta 1 (53)

Respecto a la multiplicidad de infección (MOI), su relevancia radica en optimizar la génesis de nuevos viriones durante cada ciclo lítico. Dicho valor varía entre cepas virales, y esta influenciada por el tamaño del virión, el tamaño bacteriano, la disponibilidad de receptores, y de forma paralela la división celular bacteriana que presenta nuevos hospederos frente a la creciente carga viral (56). Teóricamente, un MOI más elevado conduce a una mayor reducción de la concentración bacteriana (54); pero se describen fagos optimizados a un MOI de 1000 (57), como a 0.001 (53,61). Los ensayos *in vivo* realizados frente a *G. mellonella* deben realizarse a un MOI óptimo, con influencia directa hacia la tasa de supervivencia del modelo: por ejemplo, a un MOI de 100, vB\_KpnP\_k3\_ULINTkp1 rescata al 53% de las larvas en 72 horas, frente a vB\_KpnP\_k3\_ULINTkp2 que solo logra la supervivencia del 27% (57). En este estudio, la MOI óptima fue de 0.1, ese hallazgo permitió

desarrollar el ensayo de supervivencia garantizando teóricamente la mayor producción de viriones.

La curva de un solo paso ha permitido identificar el periodo de latencia y el tamaño de explosión, describiéndose este último como las partículas virales generadas de la lisis de una bacteria al término de la fase logarítmica; el fago GA23 empieza a generar viriones antes de los 10 minutos de su ciclo, y logra producir hasta 161 fagos por bacteria. Comparativamente, los periodos de latencia pueden durar entre los 5 minutos (56,57) hasta la hora (63); mientras que el tamaño de explosión puede llegar a las 650 UFC/ml por bacteria (54). Un menor tiempo de latencia y mayor tamaño de explosión conducen a una mayor probabilidad de permitirse la proliferación viral, pero de la mano con el MOI, la estabilidad térmica y ácido-base, dichas características cinéticas son exclusivas de cada bacteriófago(56,63) .

Un modelo *in vivo*, por su parte, depende de la cinética viral y permite medir la eficacia del bacteriófago como terapia (22). El fago GA23 ha logrado un drástico aumento de la supervivencia en *G. mellonella* al inocularse a la hora de la infección de la cepa C25, lográndose la viabilidad del 100% de larvas a las 96 horas. Esto último suma al argumento que, mientras los tiempos entre el inóculo viral y bacteriano sean menores, mayor es la supervivencia del modelo (42). La eficiencia del fago GA23 destaca al compararse con SRD2021 (42), que permite la supervivencia del 60% de larvas a las 24 horas; SXFY507, con una supervivencia del 60% a las 72 horas (58), y la mencionada BUCT610, de hasta el 83% a las 72 horas (25). Vuelve a tomar relevancia que la eficiencia del modelo *in vivo* puede optimizarse mediante

el MOI (57). En el presente estudio no se pudo evaluar la combinación de GA23 con otros fagos mediante "cóctel" terapéutico debido a que no se logró aislar otro fago que cumpliera los criterios de inclusión y exclusión para el estudio.

Los resultados ya mencionados proponen que, a pesar de las limitaciones respecto a la especificidad de los fagos hacia el género *Klebsiella*, la fagoterapia retiene una aplicabilidad terapéutica que puede ensayarse sin necesidad de modelos murinos, para posteriormente explotarse de la mano con la antibioticoterapia en el tratamiento de morbilidades infecciosas (25).

Asimismo, el presente estudio mediante los experimentos de supervivencia en *G. mellonella* frente a la infección de *K. pneumoniae* ha logrado validar la aplicación del bacteriófago GA23 in vivo, siendo este el primer reporte en nuestro medio en lo que respecta a fagoterapia hacia el género *Klebsiella*.

## VI. CONCLUSIONES

El fago GA23 no posee actividad lítica *in vitro* hacia las cepas de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas; mientras que posee un espectro de acción reducido al solo producir lisis hacia la cepa de *Klebsiella pneumoniae* C25.

El fago GA23 en el modelo de *Galleria mellonella* prolonga la sobrevivencia frente a la infección por *Klebsiella pneumoniae*; lo que permite un 100% de la supervivencia de las larvas al inocularlas en conjunto con la bacteria.

La actividad lítica del fago GA23 se mantiene en todos los valores de pH evaluados (4-8) y en el rango de temperatura 8°C-40°C.

La actividad lítica del fago GA23 es superior *in vitro* cuando la multiplicidad de infección corresponde a 0.1 (1 virus frente a 10 bacterias).

El fago GA23 tiene una curva de crecimiento óptima ya que empieza a generar viriones a menos de 10 minutos de su ciclo, y logra producir hasta 161 fagos por bacteria.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Li M, Li P, Chen L, Guo G, Xiao Y, Chen L, et al. Identification of a phage-derived depolymerase specific for KL64 capsule of *Klebsiella pneumoniae* and its anti-biofilm effect. *Virus Genes*. 2021 Oct 1;57(5):434–42.
2. Feng J, Gao L, Li L, Zhang Z, Wu C, Li F, et al. Characterization and genome analysis of novel *Klebsiella* phage BUCT556A with lytic activity against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Virus Res*. 2021 Oct 2;303.
3. Wintachai P, Naknaen A, Thammaphet J, Pomwised R, Phaonakrop N, Roytrakul S, et al. Characterization of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* phage KP1801 and evaluation of therapeutic efficacy in vitro and in vivo. *Sci Rep*. 2020 Dec 1;10(1).
4. Venturini C, Ben Zakour NL, Bowring B, Morales S, Cole R, Kovach Z, et al. Fine capsule variation affects bacteriophage susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* ST258. *FASEB Journal*. 2020 Aug 1;34(8):10801–17.
5. Li N, Zeng Y, Bao R, Zhu T, Tan D, Hu B. Isolation and Characterization of Novel Phages Targeting Pathogenic *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Dec 3;11.
6. Walther-Rasmussen J, Høiby N. Class A carbapenemases. Vol. 60, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007. p. 470–82.
7. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*. 2022 Feb 12;399(10325):629–55.

8. World Bank. Drug-Resistant Infections: A Threat to Our Economic Future [Internet]. Washington, DC; 2017. Available from: [www.worldbank.org](http://www.worldbank.org)
9. Lincopan N, McCulloch JA, Reinert C, Cassettari VC, Gales AC, Mamizuka EM. First isolation of metallo- $\beta$ -lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *J Clin Microbiol*. 2005 Jan;43(1):516–9.
10. Roach D, Waalkes A, Abanto J, Zunt J, Cucho C, Soria J, et al. Whole genome sequencing of peruvian *Klebsiella pneumoniae* identifies novel plasmid vectors bearing carbapenem resistance gene NDM-1. *Open Forum Infect Dis*. 2020 Aug 1;7(8).
11. Plan para la prevención y el control de la transmisión de Bacilos Gram Negativos Resistentes a Carbapenémicos del Hospital Nacional Cayetano Heredia 2023-2025 [Internet]. LIMA: MINISTERIO DE SALUD; 2023 [cited 2023 Oct 7]. p. 1–26. Available from: <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/5106550/RD%20N%C2%B0%20297-2023-HNCH-DG.pdf>
12. Paul M, Carrara E, Retamar P, Tängdén T, Bitterman R, Bonomo RA, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) guidelines for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli (endorsed by European society of intensive care medicine). Vol. 28, *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier B.V.; 2022. p. 521–47.
13. Karaiskos I, Galani I, Papoutsaki V, Galani L, Giamarellou H. Carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*: implication on future

- therapeutic strategies. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2022;20(1):53–69.
14. Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, Mathers AJ, Van Duin D, Clancy CJ. Infectious Diseases Society of America 2022 Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase Producing Enterobacterales (ESBL-E), Carbapenem-Resistant Enterobacterales (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with Difficult-to-Treat Resistance (DTR-P. *aeruginosa*). *Clinical Infectious Diseases.* 2022 Jul 15;75(2):187–212.
  15. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2018 Mar 1;18(3):318–27.
  16. Theuretzbacher U, Carrara E, Conti M, Tacconelli E. Role of new antibiotics for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2021 Jan 1;76:I47–54.
  17. Spaziante M, Oliva A, Ceccarelli G, Venditti M. What are the treatment options for resistant *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing bacteria? Vol. 21, *Expert Opinion on Pharmacotherapy.* Taylor and Francis Ltd.; 2020. p. 1781–7.
  18. De Evaluación De Tecnologías I, Salud EN. DICTAMEN PRELIMINAR DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍA SANITARIA N.º 011-DETS-IETSI-2021 EFICACIA Y SEGURIDAD DE CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM PARA EL TRATAMIENTO DE PACIENTES ADULTOS CON NEUMONÍA INTRAHOSPITALARIA ASOCIADA A VENTILACIÓN MECÁNICA CAUSADA POR BACTERIAS GRAM

NEGATIVAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS Y  
RESISTENTES A COLISTINA DIRECCIÓN DE EVALUACIÓN DE  
TECNOLOGÍAS SANITARIAS-DETS. 2021.

19. Both A, Büttner H, Huang J, Perbandt M, Campos CB, Christner M, et al. Emergence of ceftazidime/avibactam non-susceptibility in an MDR *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017 Sep 1;72(9):2483–8.
20. Both A, Büttner H, Huang J, Perbandt M, Campos CB, Christner M, et al. Emergence of ceftazidime/avibactam non-susceptibility in an MDR *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017 Sep 1;72(9):2483–8.
21. Corbellino M, Kieffer N, Kutateladze M, Balarjishvili N, Leshkasheli L, Askilashvili L, et al. Eradication of a multi-drug resistant, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate following oral and intra-rectal therapy with a custom-made, lytic bacteriophage preparation. Available from: <https://academic.oup.com/cid/advance-article-abstract/doi/10.1093/cid/ciz782/5550234>
22. Roach DR, Debarbieux L. Phage therapy: Awakening a sleeping giant. Vol. 1, *Emerging Topics in Life Sciences*. Portland Press Ltd; 2017. p. 93–103.
23. Brown R, Lengeling A, Wang B. Phage engineering: how advances in molecular biology and synthetic biology are being utilized to enhance the therapeutic potential of bacteriophages. Vol. 5, *Quantitative Biology*. Higher Education Press; 2017. p. 42–54.
24. Catalina PP, Angela-Victoria HM, Andrés-Fernando GB, Martha-Josefina

- VF. Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. *Perspectivas en Colombia*. Vol. 20, Universitas Scientiarum. Pontificia Universidad Javeriana; 2015. p. 43–60.
25. Pu M, Han P, Zhang G, Liu Y, Li Y, Li F, et al. Characterization and Comparative Genomics Analysis of a New Bacteriophage BUCT610 against *Klebsiella pneumoniae* and Efficacy Assessment in *Galleria mellonella* Larvae. *Int J Mol Sci*. 2022 Jul 1;23(14).
  26. Bao J, Wu N, Zeng Y, Chen L, Li L, Yang L, et al. Non-active antibiotic and bacteriophage synergism to successfully treat recurrent urinary tract infection caused by extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Vol. 9, *Emerging Microbes and Infections*. Taylor and Francis Ltd.; 2020. p. 771–4.
  27. Cano EJ, Caflisch KM, Bollyky PL, Van Belleghem JD, Patel R, Fackler J, et al. Phage Therapy for Limb-threatening Prosthetic Knee *Klebsiella pneumoniae* Infection: Case Report and in Vitro Characterization of Anti-biofilm Activity. *Clinical Infectious Diseases*. 2021 Jul 1;73(1):E144–51.
  28. Luong T, Salabarria AC, Roach DR. Phage Therapy in the Resistance Era: Where Do We Stand and Where Are We Going? Vol. 42, *Clinical Therapeutics*. Excerpta Medica Inc.; 2020. p. 1659–80.
  29. Pelzek AJ, Schuch R, Schmitz JE, Fischetti VA. Isolation, Culture, and Characterization of Bacteriophages. *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques*. 2013;2013(SUPPL.7).
  30. Bonilla N, Rojas MI, Cruz GNF, Hung SH, Rohwer F, Barr JJ. Phage on tap—a quick and efficient protocol for the preparation of bacteriophage

- laboratory stocks. PeerJ. 2016;2016(7).
31. Hibstu Z, Belew H, Akelew Y, Mengist HM. Phage Therapy: A Different Approach to Fight Bacterial Infections. Vol. 16, *Biologics: Targets and Therapy*. Dove Medical Press Ltd; 2022. p. 173–86.
  32. Casey E, van Sinderen D, Mahony J. In vitro characteristics of phages to guide ‘real life’ phage therapy suitability. Vol. 10, *Viruses*. MDPI AG; 2018.
  33. Nath S, Moussavi F, Abraham D, Landman D, Quale J. In vitro and in vivo activity of single and dual antimicrobial agents against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018 Feb 1;73(2):431–6.
  34. Göttig S, Frank D, Mungo E, Nolte A, Hogardt M, Besier S, et al. Emergence of ceftazidime/avibactam resistance in KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in vivo. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2019 Nov 1;74(11):3211–6.
  35. Tsai CJY, Loh JMS, Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. Vol. 7, *Virulence*. Taylor and Francis Inc.; 2016. p. 214–29.
  36. Ménard G, Rouillon A, Cattoir V, Donnio PY. *Galleria mellonella* as a Suitable Model of Bacterial Infection: Past, Present and Future. Vol. 11, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
  37. Bertozzi Silva J, Storms Z, Sauvageau D. Host receptors for bacteriophage adsorption. Vol. 363, *FEMS Microbiology Letters*. Oxford University

- Press; 2016.
38. Hao G, Yuan C, Shu R, Jia Y, Zhao S, Xie S, et al. O-antigen serves as a two-faced host factor for bacteriophage NJS1 infecting nonmucoid *Klebsiella pneumoniae*: O-antigen is a receptor for nonmucoid *Klebsiella pneumoniae* phage. *Microb Pathog*. 2021 Jun 1;155.
  39. Chaturongakul S, Ounjai P. Phage-host interplay: Examples from tailed phages and Gram-negative bacterial pathogens. Vol. 5, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2014.
  40. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2016 Sep;80(3):629–61.
  41. Fang Q, Zong Z. Lytic Phages against ST11 K47 Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* and the Corresponding Phage Resistance Mechanisms. *mSphere*. 2022 Apr 27;7(2).
  42. Hao G, Shu R, Ding L, Chen X, Miao Y, Wu J, et al. Bacteriophage SRD2021 recognizing capsular polysaccharide shows therapeutic potential in serotype K47 *Klebsiella pneumoniae* infections. *Antibiotics*. 2021 Aug 1;10(8).
  43. Concha-Eloko R, Barberán-Martínez P, Sanjuán R, Domingo-Calap P. Broad-range capsule-dependent lytic *Sugarlandvirus* against *Klebsiella* sp. Babady EN, editor. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2023 Oct 26; Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.04298-22>
  44. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. Vol. 8, *Nature Reviews Microbiology*. 2010. p. 317–27.

45. Knecht LE, Veljkovic M, Fieseler L. Diversity and Function of Phage Encoded Depolymerases. Vol. 10, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
46. Squeglia F, Maciejewska B, Łątka A, Ruggiero A, Briers Y, Drulis-Kawa Z, et al. Structural and Functional Studies of a Klebsiella Phage Capsule Depolymerase Tailspike: Mechanistic Insights into Capsular Degradation. *Structure*. 2020 Jun 2;28(6):613-624.e4.
47. Cai R, Wang G, Le S, Wu M, Cheng M, Guo Z, et al. Three capsular polysaccharide synthesis-related glucosyltransferases, GT-1, GT-2 and WcaJ, are associated with virulence and phage sensitivity of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol*. 2019;10(MAY).
48. Cai R, Wu M, Zhang H, Zhang Y, Cheng M, Guo Z, et al. A smooth-type, phage-resistant *Klebsiella pneumoniae* mutant strain reveals that OmpC is indispensable for infection by phage GH-K3. *Appl Environ Microbiol*. 2018 Nov 1;84(21).
49. Dunstan RA, Bamert RS, Tan KS, Imbulgoda U, Barlow CK, Tairaroa G, et al. Epitopes in the capsular polysaccharide and the porin OmpK36 receptors are required for bacteriophage infection of *Klebsiella pneumoniae*. *Cell Rep*. 2023 Jun 27;42(6).
50. Egado JE, Costa AR, Aparicio-Maldonado C, Haas PJ, Brouns SJJ. Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance. Vol. 46, *FEMS Microbiology Reviews*. Oxford University Press; 2022.
51. Dunstan RA, Bamert RS, Belousoff MJ, Short FL, Barlow CK, Pickard DJ, et al. Mechanistic Insights into the Capsule-Targeting Depolymerase from

- a *Klebsiella pneumoniae* Bacteriophage. *Microbiol Spectr.* 2021 Sep 3;9(1).
52. Lourenço M, Osbelt L, Passet V, Gravey F, Megrian D, Strowig T, et al. Phages against Noncapsulated *Klebsiella pneumoniae*: Broader Host range, Slower Resistance. *Microbiol Spectr.* 2023 Aug 17;11(4).
53. Bai J, Zhang F, Liang S, Chen Q, Wang W, Wang Y, et al. Isolation and Characterization of vB\_kpnM\_17-11, a Novel Phage Efficient Against Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Jul 5;12.
54. Fayed MS, Hakim TA, Zaki BM, Makky S, Abdelmoteleb M, Essam K, et al. Morphological, biological, and genomic characterization of *Klebsiella pneumoniae* phage vB\_Kpn\_ZC2. *Virology J.* 2023 Dec 1;20(1).
55. Zaki BM, Fahmy NA, Aziz RK, Samir R, El-Shibiny A. Characterization and comprehensive genome analysis of novel bacteriophage, vB\_Kpn\_ZCKp20p, with lytic and anti-biofilm potential against clinical multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023 Jan 23;13.
56. Baqer AA, Fang K, Mohd-Assaad N, Adnan SNA, Nor NSM. In Vitro Activity, Stability and Molecular Characterization of Eight Potent Bacteriophages Infecting Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Viruses.* 2023 Jan 1;15(1).
57. Laforêt F, Antoine C, Reuter BB, Detilleux J, Pirnay JP, Brisse S, et al. In Vitro and In Vivo Assessments of Two Newly Isolated Bacteriophages against an ST13 Urinary Tract Infection *Klebsiella pneumoniae*. *Viruses.*

2022 May 1;14(5).

58. Feng J, Li F, Sun L, Dong L, Gao L, Wang H, et al. Characterization and genome analysis of phage vB\_KpnS\_SXFY507 against *Klebsiella pneumoniae* and efficacy assessment in *Galleria mellonella* larvae. *Front Microbiol.* 2023 Jan 30;14.
59. Junqueira JC, Mylonakis E, Borghi E. *Galleria mellonella* experimental model: Advances and future directions. Vol. 79, *Pathogens and Disease*. Oxford University Press; 2021.
60. Przygodzka M. *Galleria mellonella* L. as model organism used in biomedical and other studies [Internet]. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/324604484>
61. Nazir A, Qi C, Shi N, Gao X, Feng Q, Qing H, et al. Characterization and Genomic Analysis of a Novel Drexelviral Bacteriophage IME268 with Lytic Activity Against *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Drug Resist.* 2022;15:1533–46.
62. Gorodnichev RB, Kornienko MA, Malakhova M V., Bespiatykh DA, Manuvera VA, Selezneva O V., et al. Isolation and Characterization of the First Zobellviridae Family Bacteriophage Infecting *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 1;24(4).
63. Liang B, Zhao W, Han B, Barkema HW, Niu YD, Liu Y, et al. Biological and genomic characteristics of two bacteriophages isolated from sewage, using one multidrug-resistant and one non-multidrug-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol.* 2022 Oct 13;13.

## Anexos

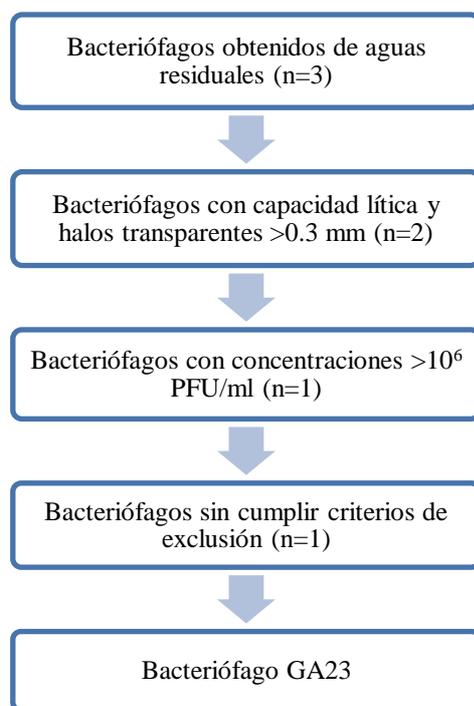
**Anexo 1: Tabla de definición operacional de variables**

<b>Variable</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Rol de variable</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Indicadores</b>	<b>Escala de medición</b>	<b>Forma de registro</b>
Presencia de despolimerasas	Cualitativa dicotómica	Independiente	Formación de un segundo halo alrededor de las calvas de lisis.	Sí No	Nominal	Revisión de placa con capa doble
Temperatura mínima de actividad lítica (°C)	Cualitativa politómica	Independiente	Temperatura mínima en °C la cual permite la formación de placas mediante el método de capa doble de Adams.	4°C, 21°C, 36°C, 38°C, 40°C y 50°C	Ordinal	Revisión de placa con capa doble
Temperatura máxima de actividad lítica (°C)	Cualitativa politómica	Independiente	Temperatura máxima en °C la cual permite la formación de placas mediante el método de capa doble de Adams.	4°C, 21°C, 36°C, 38°C, 40°C y 50°C	Ordinal	Revisión de placa con capa doble
pH mínimo de actividad lítica	Cualitativa politómica	Independiente	pH mínimo el cual permite la formación de placas mediante el método de capa doble de Adams.	pH 2, pH 5, pH 6 y pH 8	Ordinal	Revisión de placa con capa doble
pH máximo de actividad lítica	Cualitativa politómica	Independiente	pH máximo el cual permite la formación de placas mediante el método de capa doble de Adams.	pH 2, pH 5, pH 6 y pH 8	Ordinal	Revisión de placa con capa doble
Multiplicidad de infección (MOI) óptima	Cualitativa politómica	Independiente	Proporción de virus/bacterias maximizan la formación de PFU/ml mediante el método de capa doble de Adams.	MOI 0.1 MOI 1 MOI 10	Ordinal	Revisión de placa con capa doble

Supervivencia larvaria (horas)	Cuantitativa continua	Independiente	Horas transcurridas desde la inoculación inicial en las larvas de <i>Galleria mellonella</i> hasta (1) inmovilidad con falta de reactividad a estímulos y/o (2) melanización.	Conteo de horas desde la inoculación de las larvas de <i>Galleria mellonella</i>	De razón	Inspección visual y táctil de larvas de <i>Galleria mellonella</i>
Nivel de melanización	Cualitativa politómica	Independiente	Grado subjetivo de melanización del espécimen de <i>Galleria mellonella</i> .	Sin melanización, melanización parcial, melanización total	Ordinal	Inspección visual y táctil de larvas de <i>Galleria mellonella</i>
Tipo de carbapenemasa	Cualitativa politómica	Independiente	Carbapenemasa caracterizada mediante WGS en la cepa de <i>K. pneumoniae</i> .	KPC-2 NDM-1 OXA-181	Nominal	Revisión de base de datos de WGS

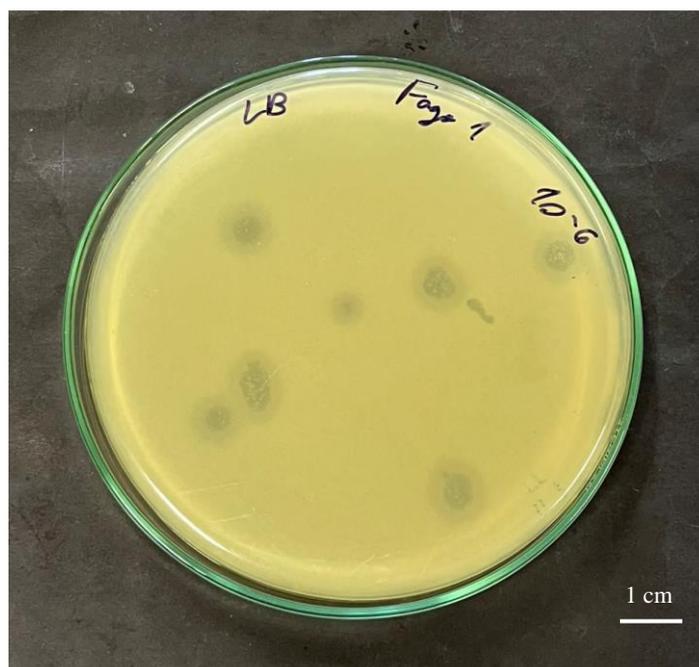
Elaborado por los autores.

## Anexo 2: Población seleccionada bajo los criterios de inclusión y exclusión



Flujograma de selección de bacteriófagos. Elaborado por los autores.

### Anexo 3: Aislamiento del Fago GA23



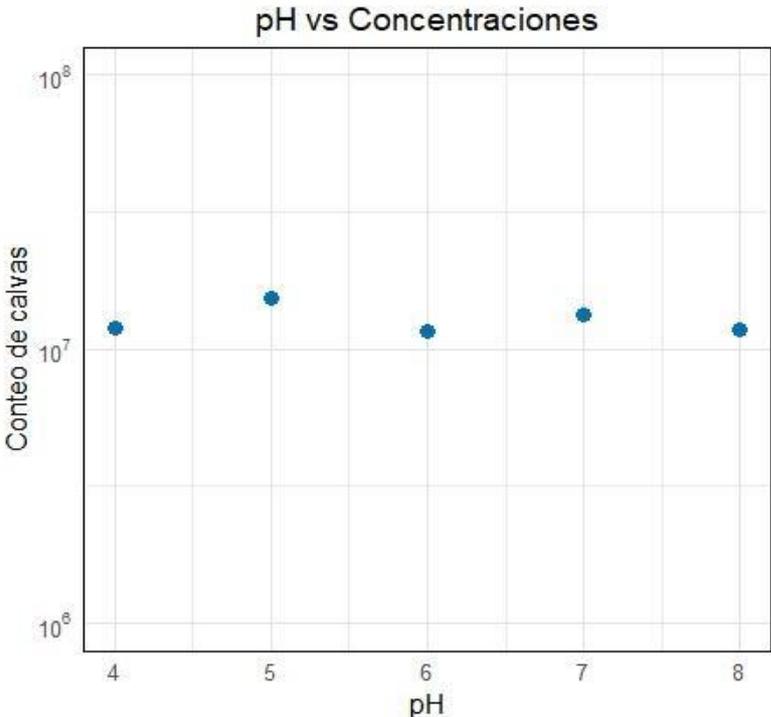
Placas de Lisis formadas por el fago GA23. Foto tomada por los autores

### Anexo 4: Tabla de determinación del rango

Cepa	Spot Test
C25	+
VIM 1	-
KPN 70 A	-
KPN 70 B	-
IMP 8 A	-
IMP 8 B	-
IMP 8 C	-
OXA 48 A	-
OXA 48 B	-
OXA 48 C	-
K74	-
KLEB	-

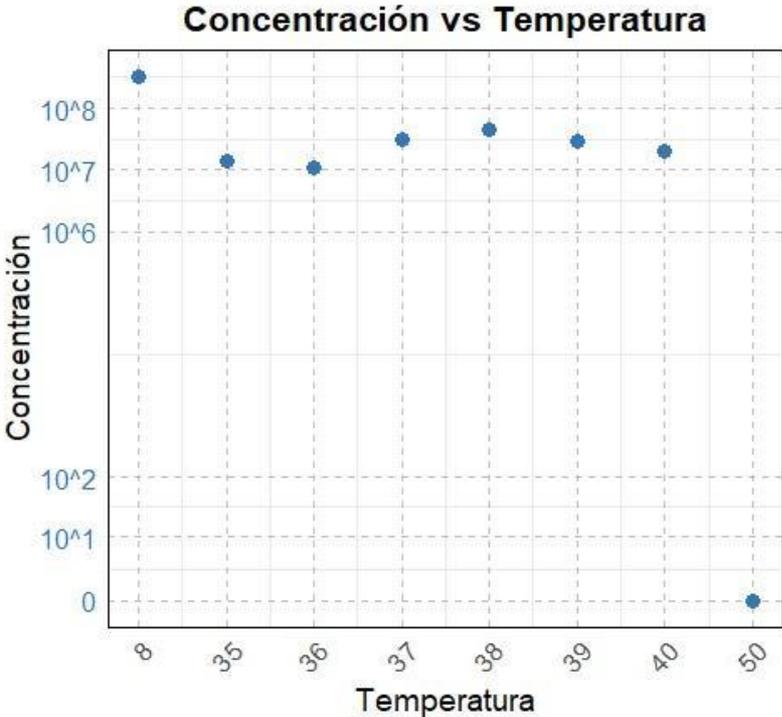
Elaborado por los autores

**Anexo 5: Gráfica de estabilidad frente a diferentes valores de pH**



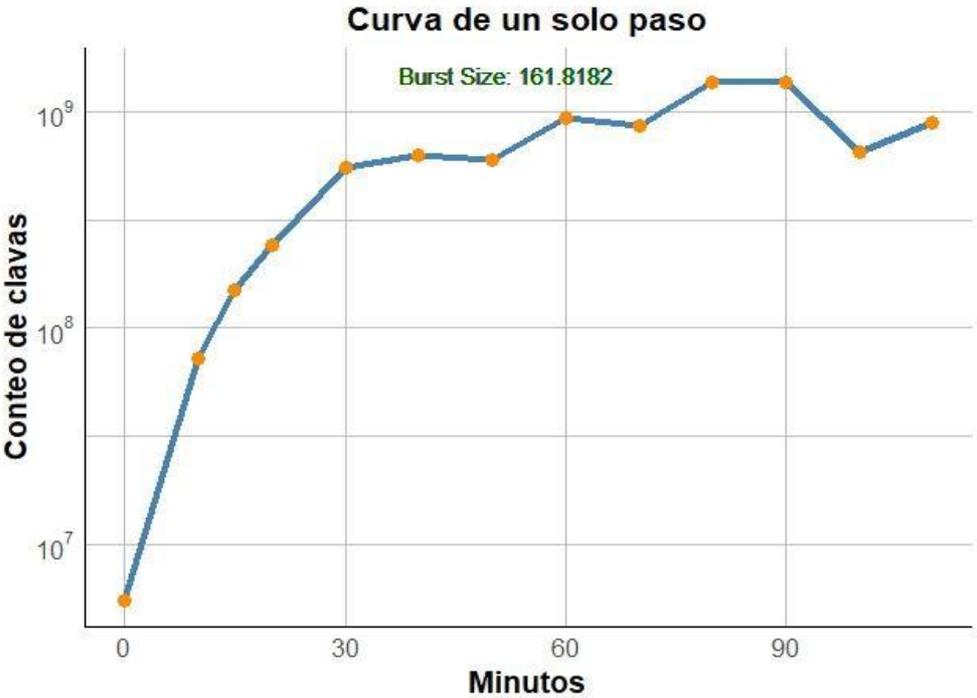
Gráfica de UFP del Fago GA23 a diferentes valores de pH. Elaborado por los autores

**Anexo 6: Gráfica de estabilidad frente a diferentes temperaturas**



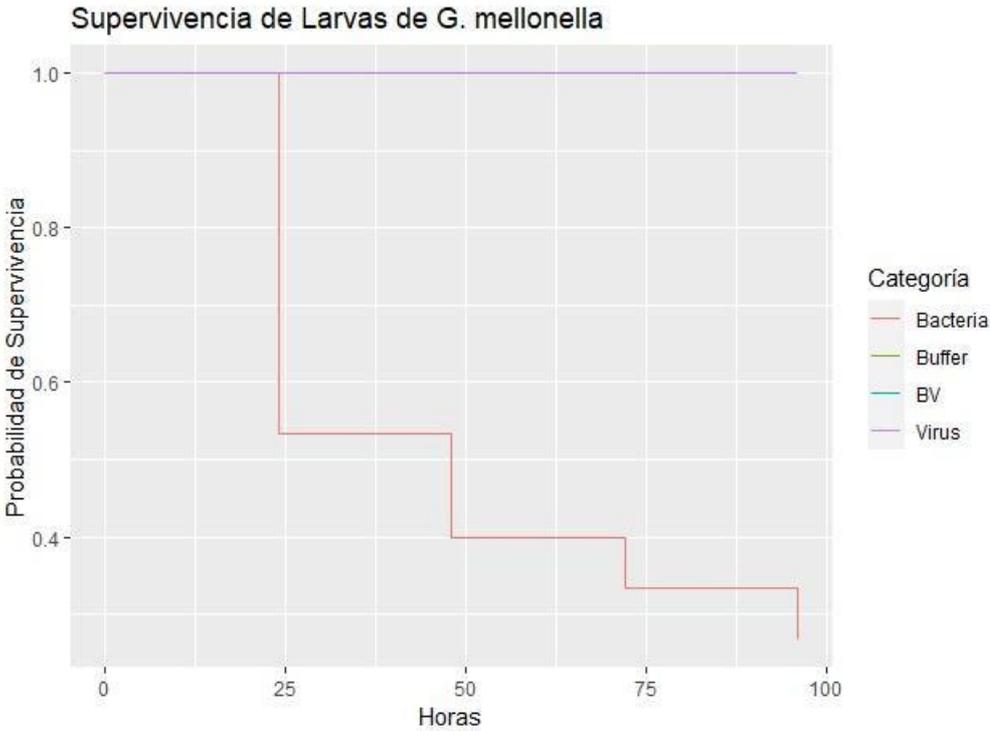
Gráfica de UFP del Fago GA23 a diferentes temperaturas. Elaborado por los autores

**Anexo 7: Gráfica de Curva de un solo paso**



Gráfica de curva de crecimiento del Fago GA23. Elaborado por los autores

**Anexo 7: Gráfica de ensayo de supervivencia in vivo**



Gráfica de supervivencia de larvas de G. mellonella. Elaborado por los autores