



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS-ESPE  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

TRABAJO DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

**“Obtención y caracterización de bacteriófagos líticos  
específicos contra *Staphylococcus aureus*”**

**Hernández Quingaiza Shirley Samari**

Directora: Torres Arias, Marbel Ph.D

04 de septiembre del 2023



1	Introducción	
2	Justificación del problema	
3	Objetivos e Hipótesis	
4	Materiales y métodos	
5	Resultados y discusión	
6	Conclusiones	
7	Recomendaciones	

# Staphylococcus aureus (Generalidades)

# Introducción



Alexander Ogston (1880)



Llagas ulceradas



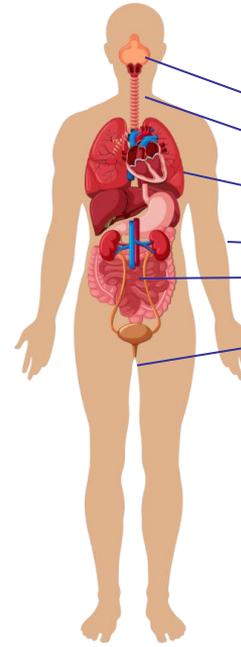
Bacteriemia



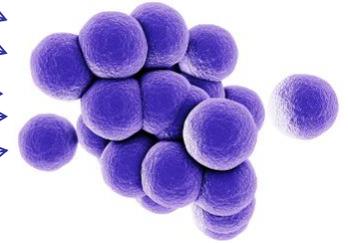
Anton Rosenbach (1884)

*S. aureus*

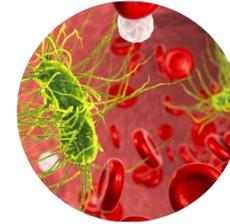
*S. epidermidis*



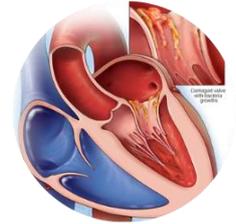
Lugares de colonización de *S. aureus*



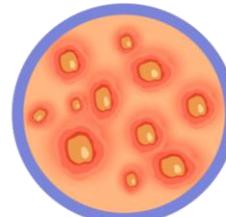
Infecciones causadas por *S. aureus*



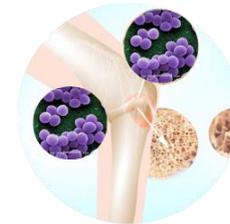
Torrente sanguíneo



Endocarditis



Piel

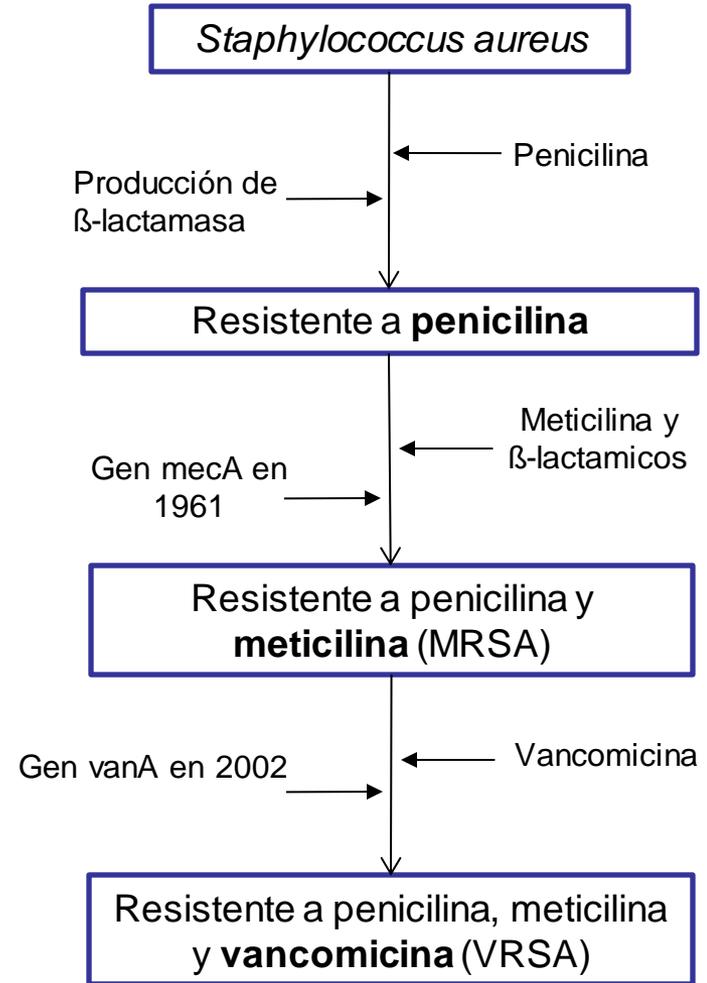
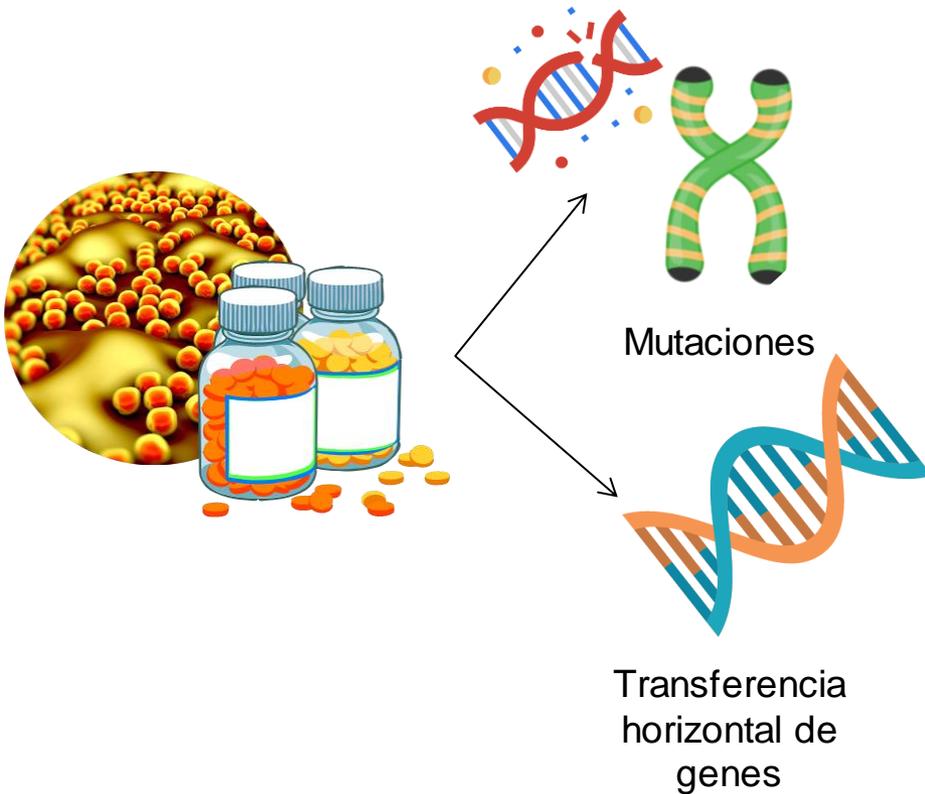


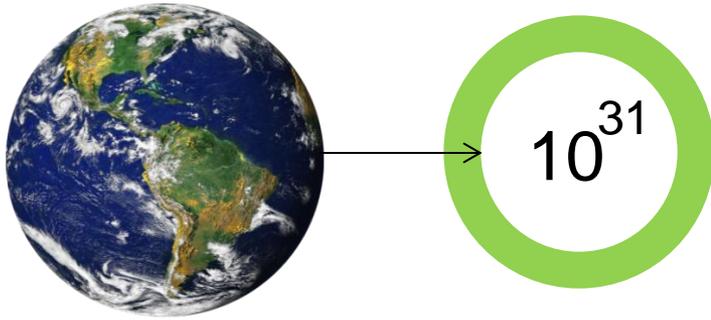
Huesos



Neumonía







Desechos humanos



Aguas residuales

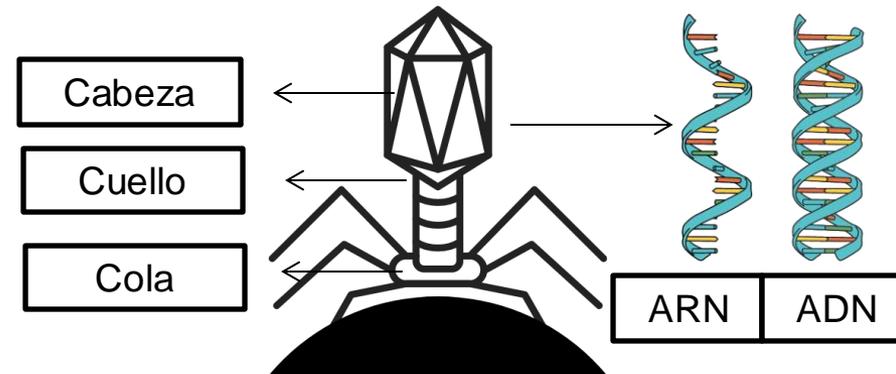
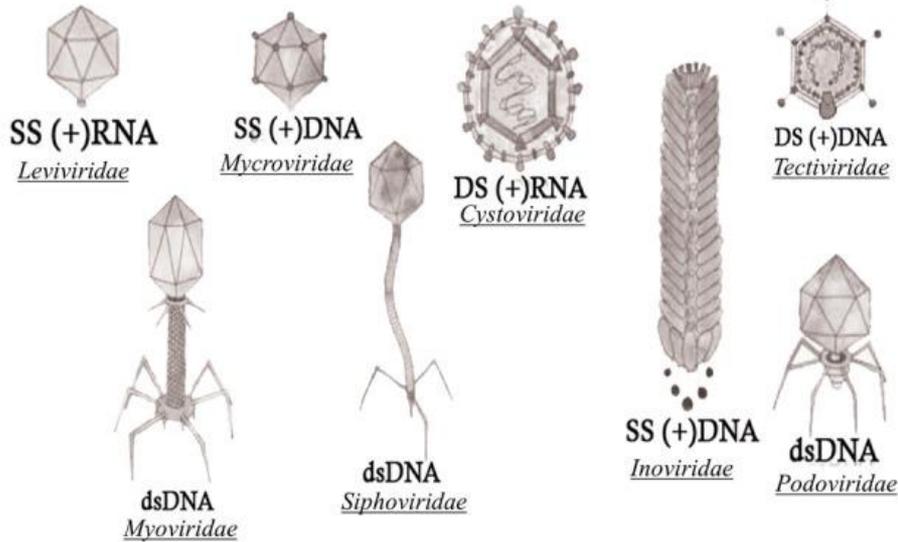


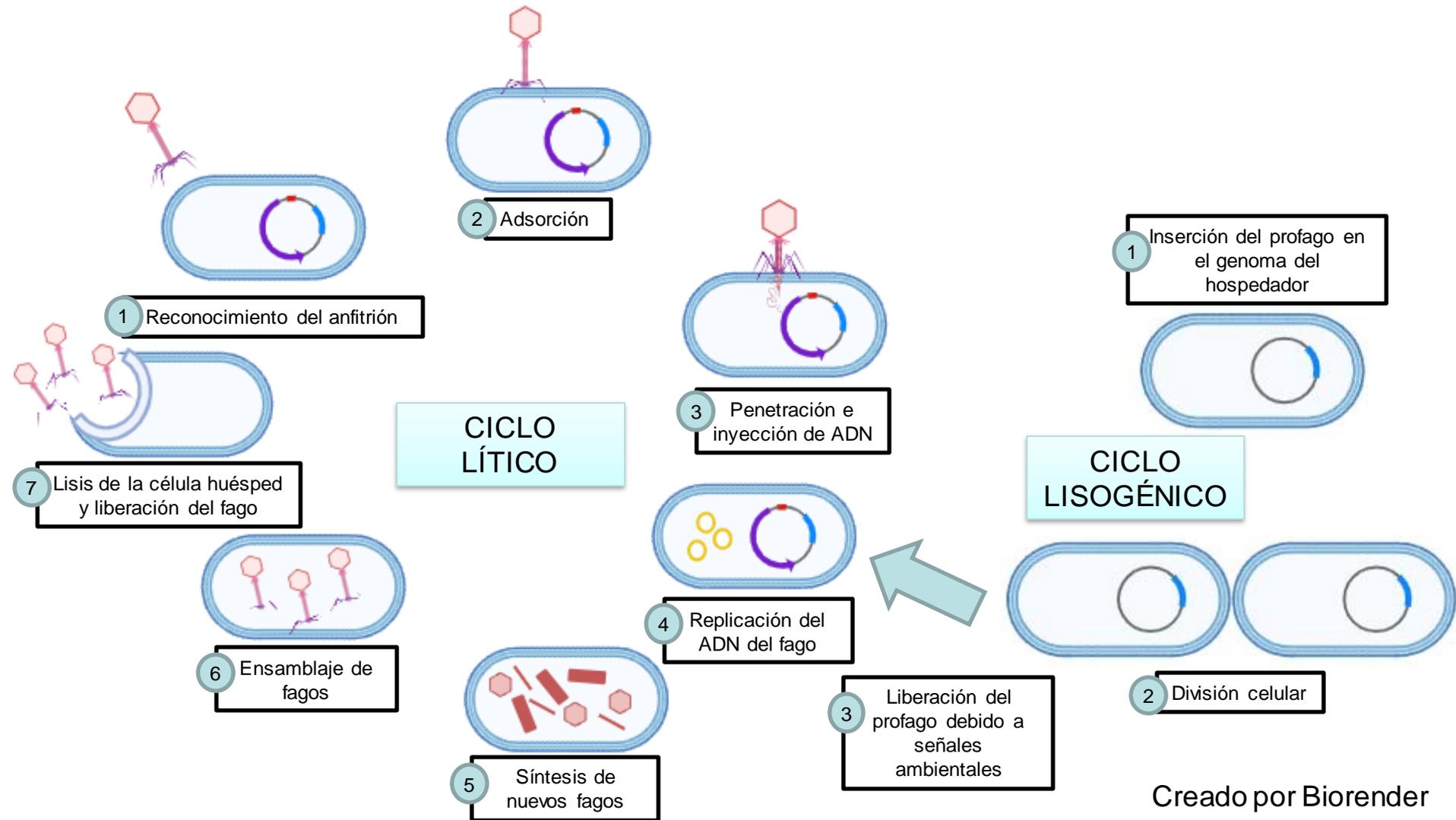
Productos alimenticios



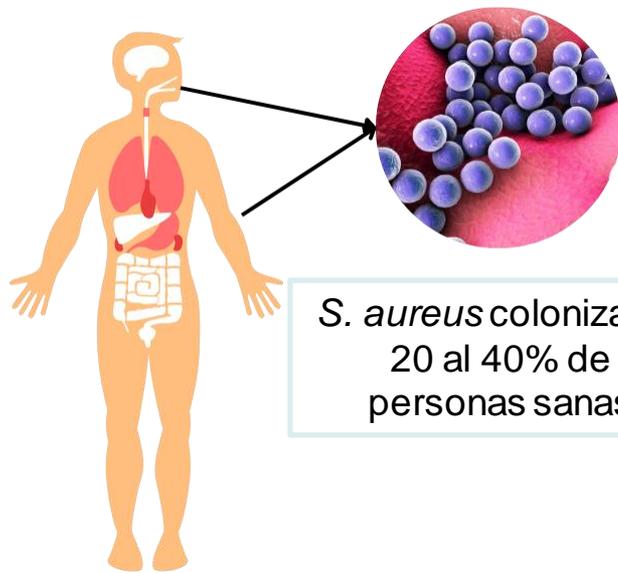
Cubierta forestal

## Clasificación





# Justificación del problema



*S. aureus* coloniza del 20 al 40% de personas sanas



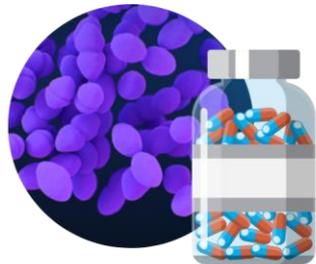
87 %

Penicilina

60 %

Cefazolina

De 132 aislados de *S. aureus* el 47% son MRSA



Aparición de bacterias resistentes



Amenazas en la salud pública



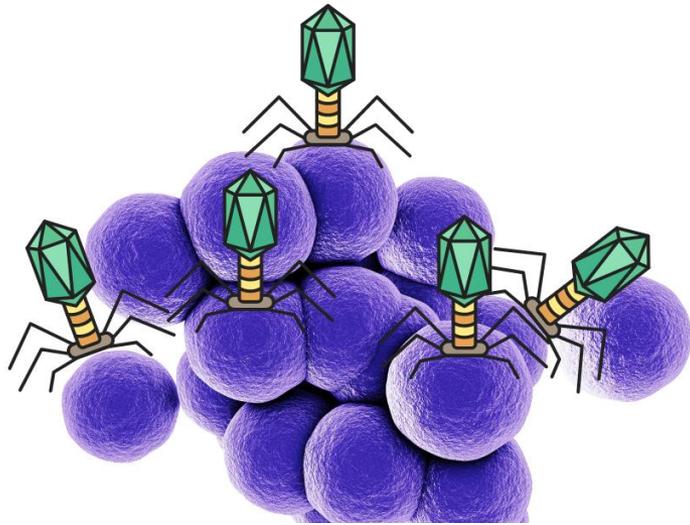
Antibióticos



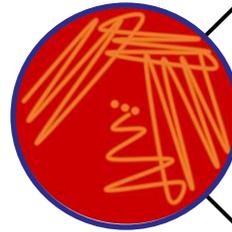
Terapia con fagos

## Objetivo general

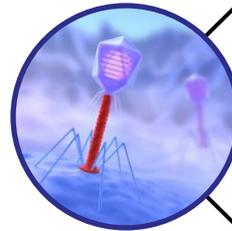
Obtener y caracterizar bacteriófagos líticos específicos contra *Staphylococcus aureus*.



## Objetivo específicos



Obtener bacteriófagos líticos a partir de mucosas mediante el uso de medios específicos, pruebas fenotípicas y bioquímicas para su purificación.



Purificar bacteriófagos líticos contra *Staphylococcus aureus* mediante la infección con fagos en las bacterias huésped para su caracterización.



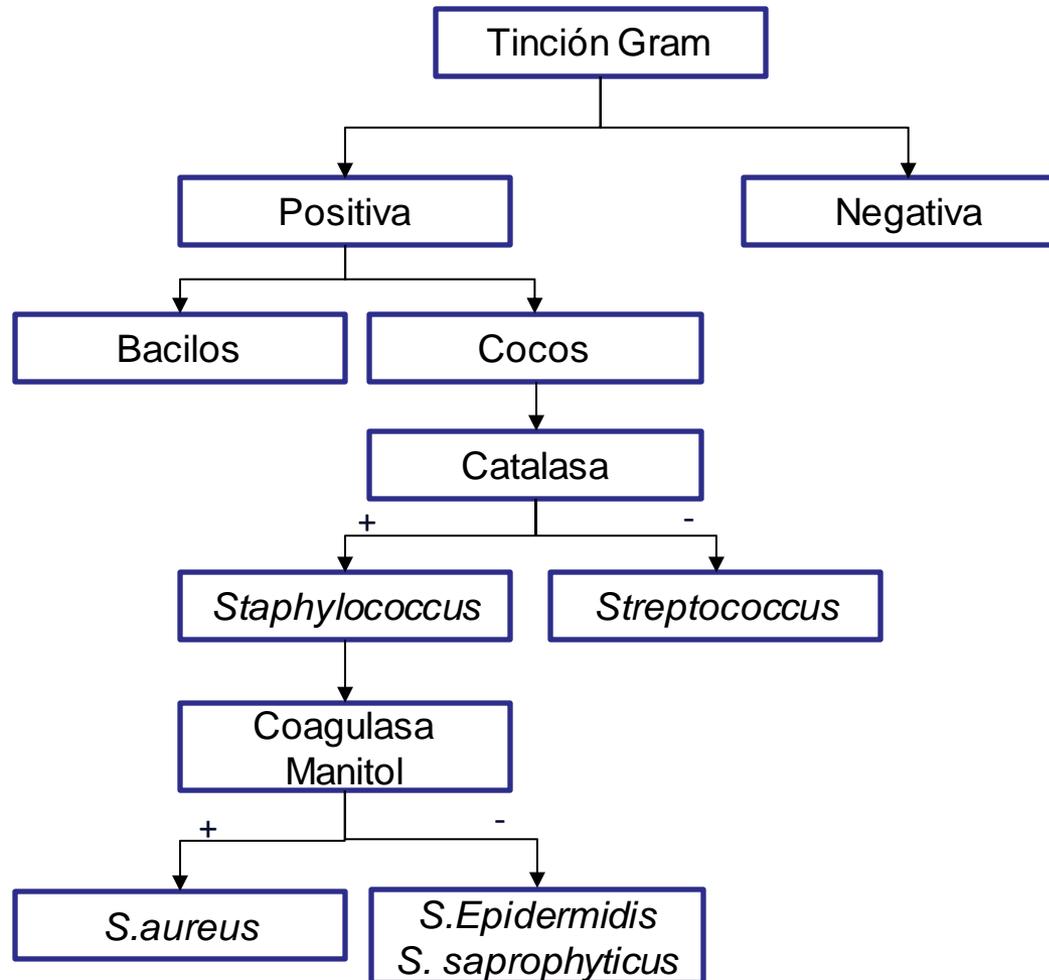
Caracterizar bacteriófagos contra *Staphylococcus aureus* mediante microscopía electrónica y conteo de placas de lisis para su uso como biocontrol contra *Staphylococcus aureus*.

## Hipótesis

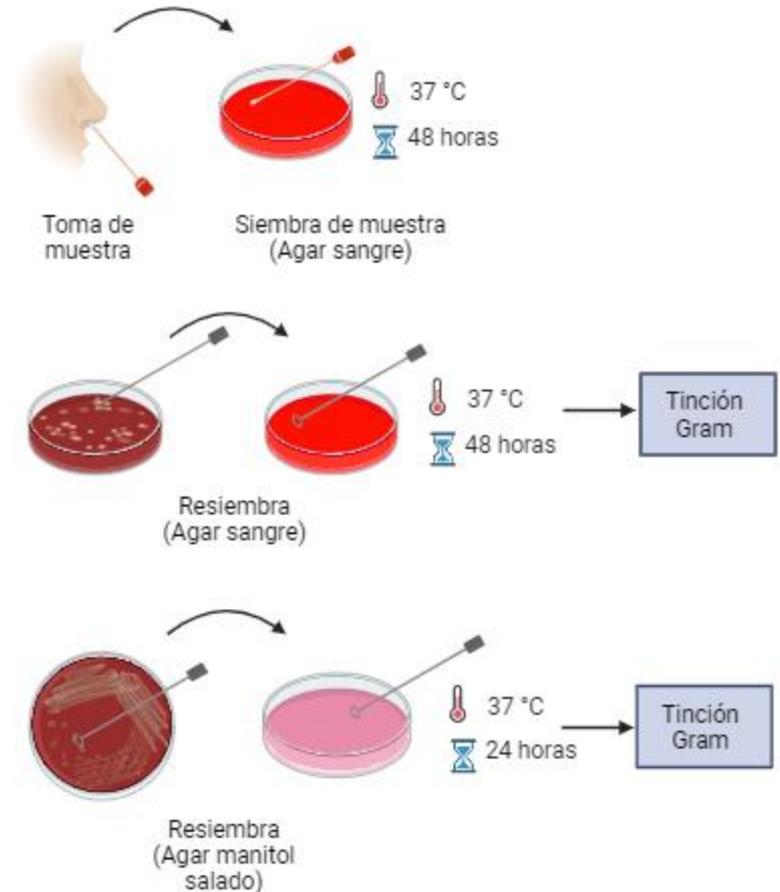
Los bacteriófagos líticos aislados son eficientes contra *Staphylococcus aureus*.

# Materiales y métodos

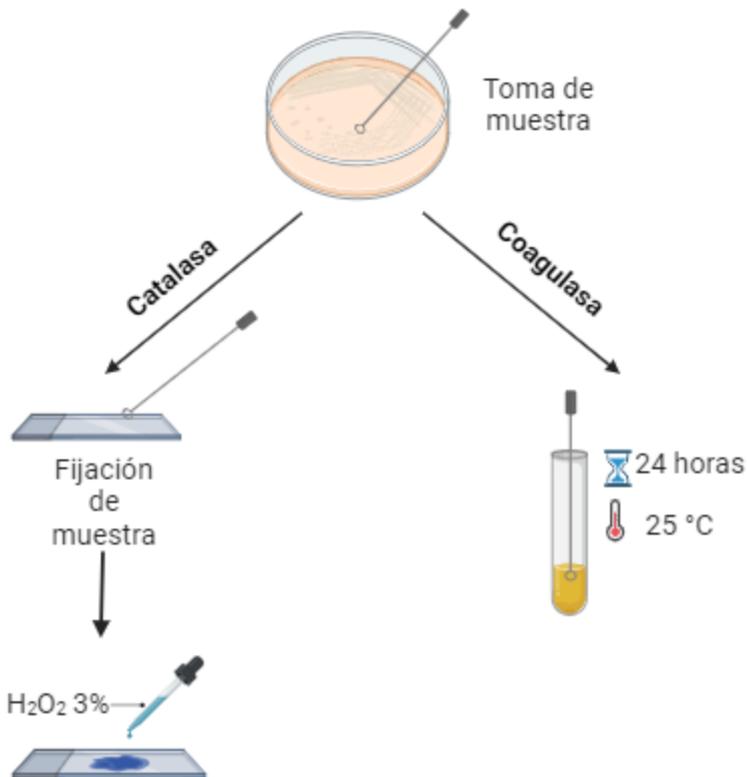
## Clave dicotómica para el aislamiento de *Staphylococcus aureus*



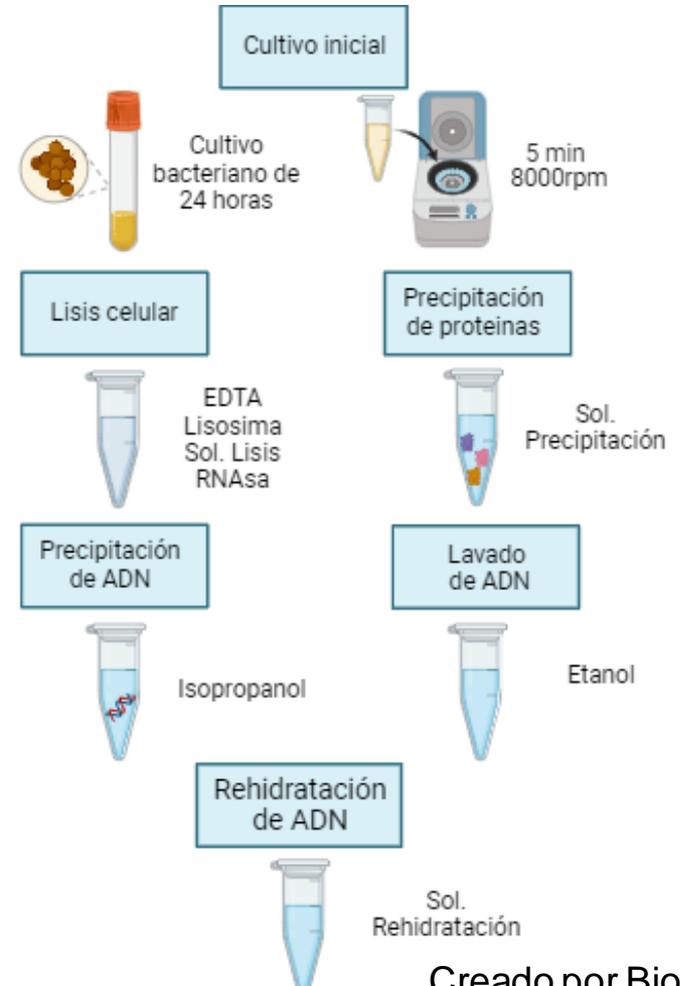
## Aislamiento de *Staphylococcus aureus* mediante medios de cultivos selectivos



## Identificación bioquímica de *Staphylococcus aureus*



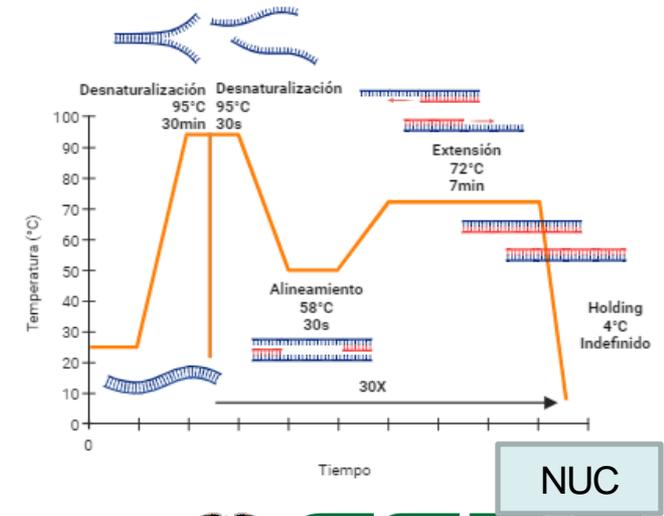
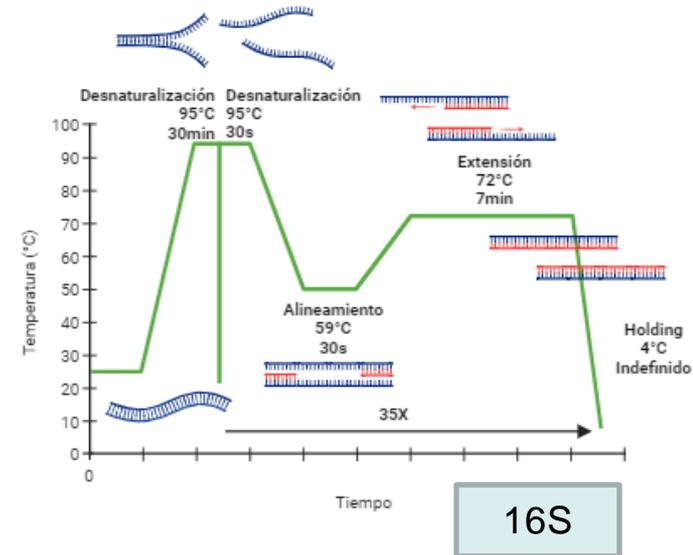
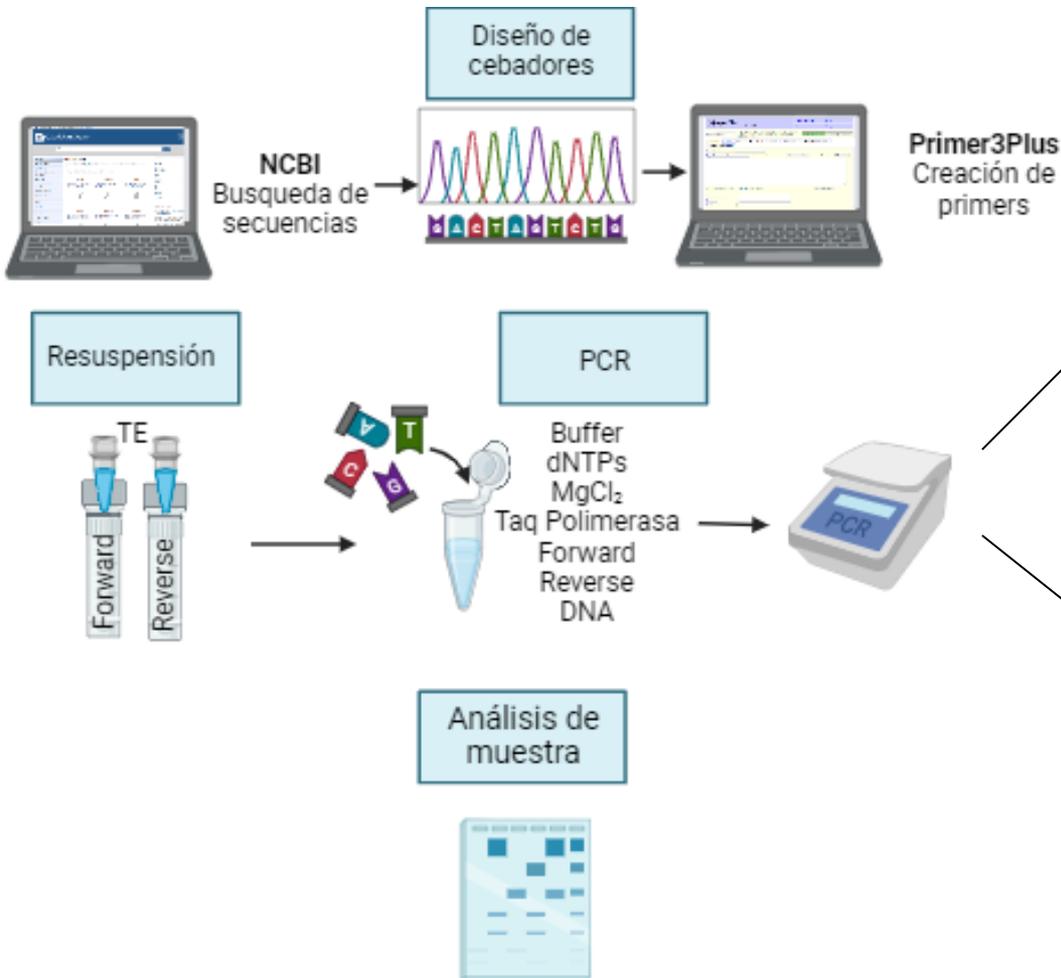
## Extracción de ADN de *Staphylococcus aureus*



Creado por Biorender

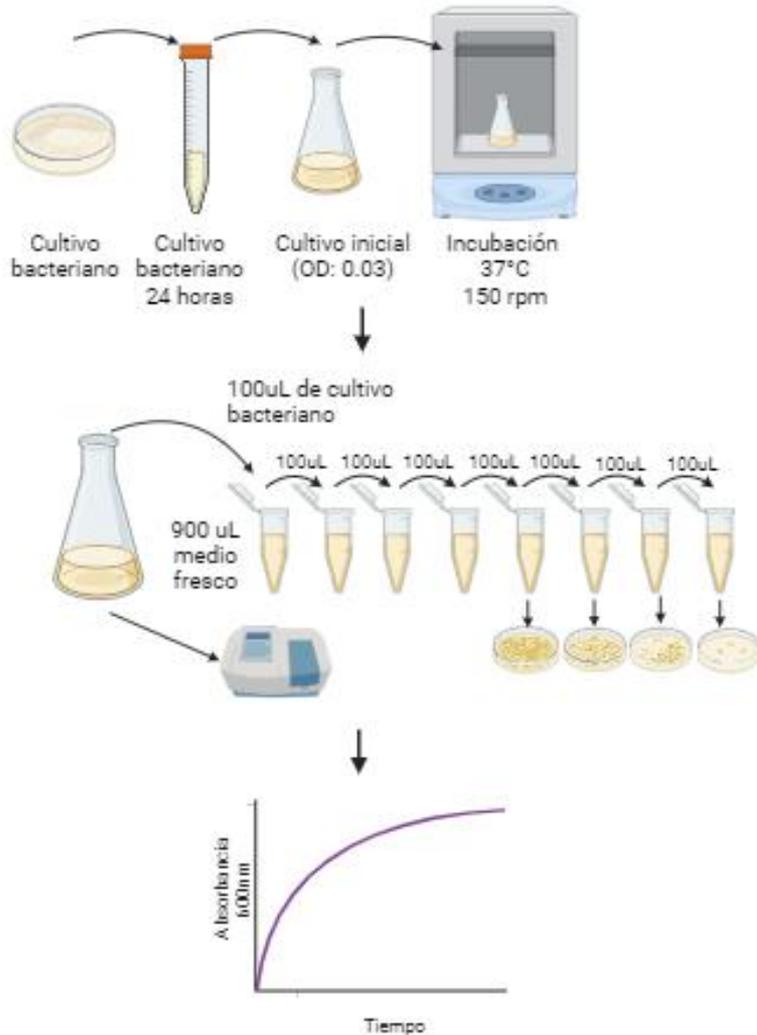
**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

## Diseño de cebadores y PCR

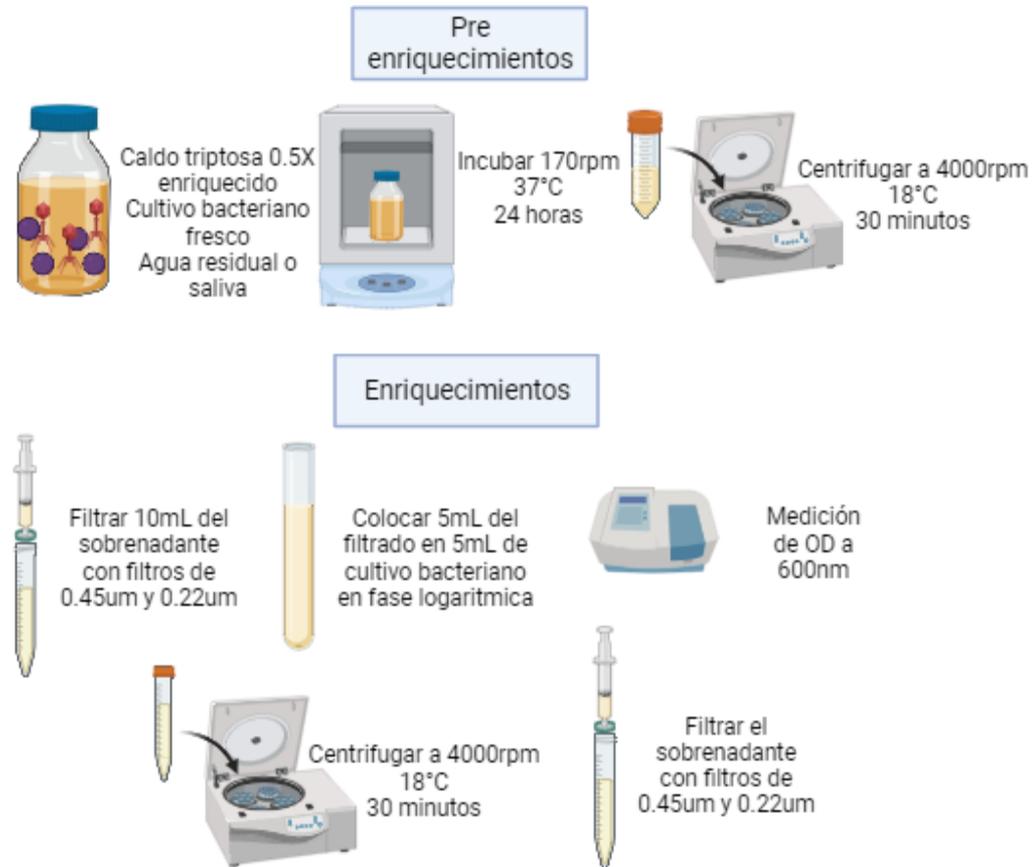


# Materiales y métodos

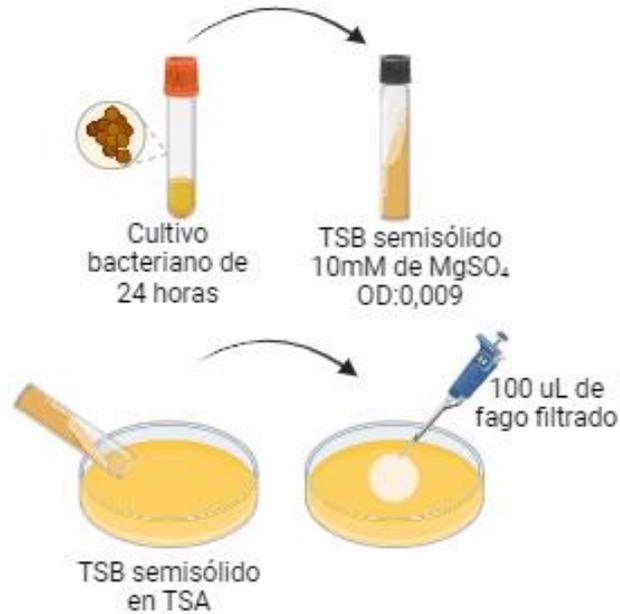
## Curva de crecimiento bacteriano



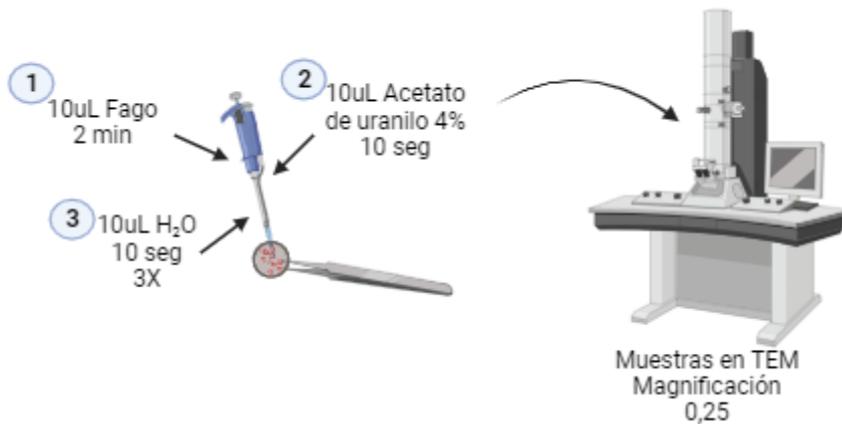
## Aislamiento y enriquecimiento de bacteriófagos



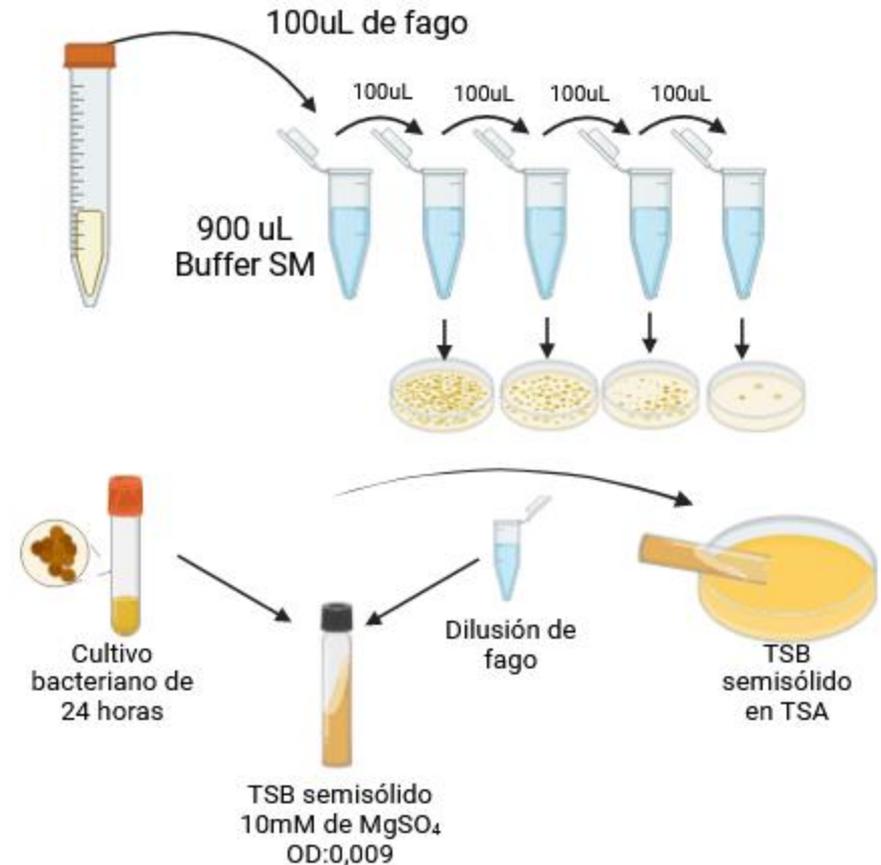
## Spot test



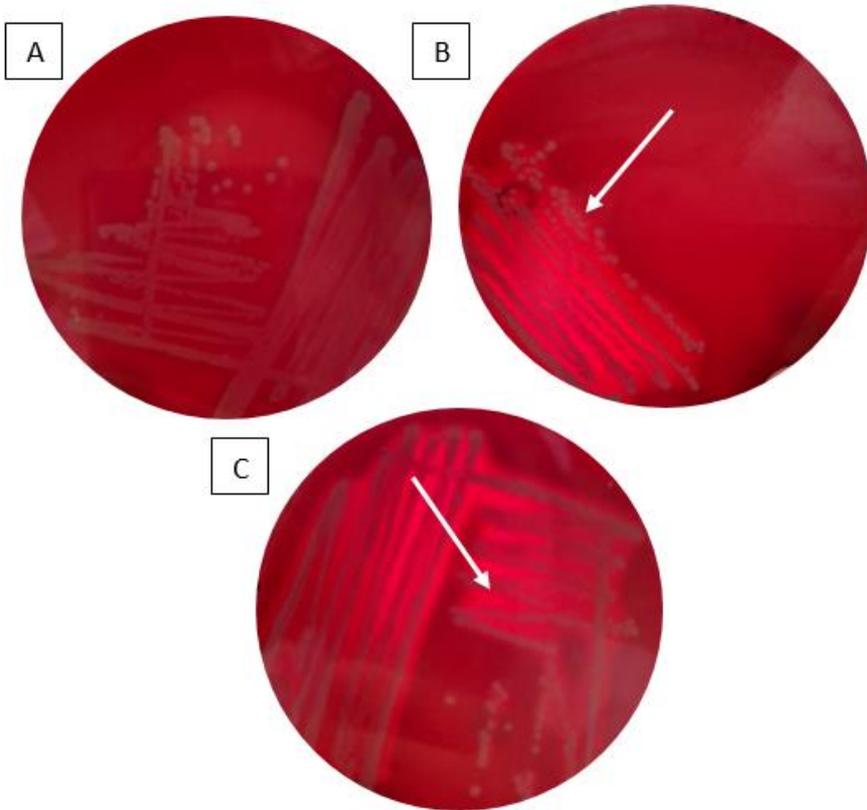
## Caracterización de bacteriófagos por TEM



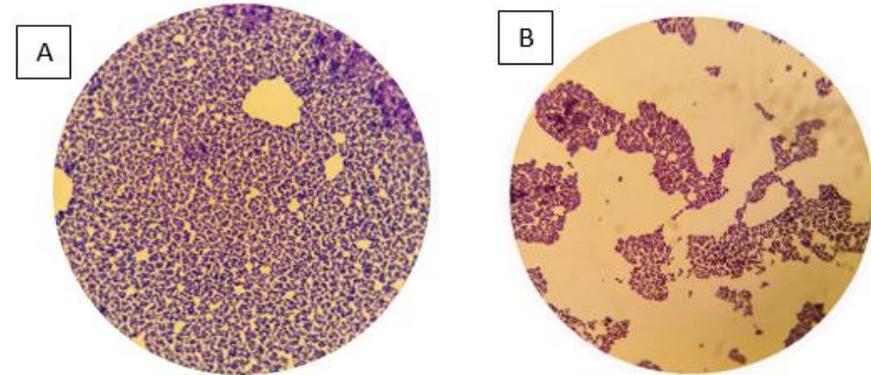
## Determinación del título viral



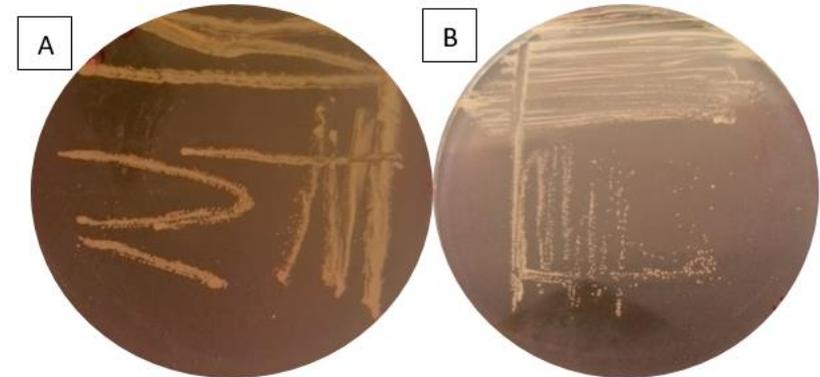
## Muestra de mucosa en Agar sangre



## Tinción Gram de colonias aisladas

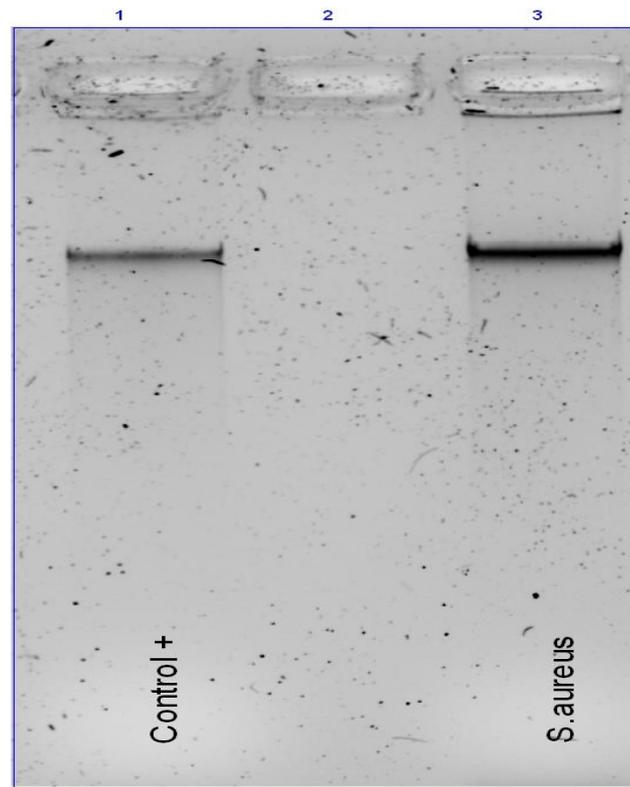
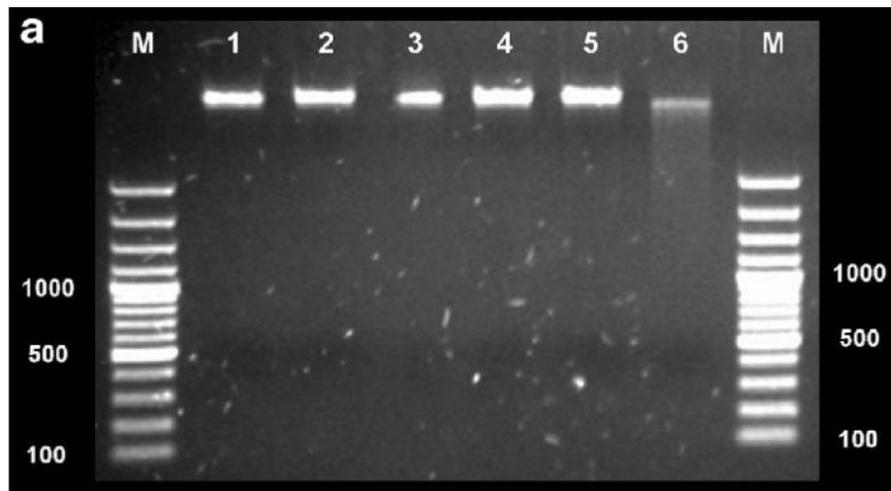


## Cocos Gram positivos en Agar manitol salado



Prueba/Características	#2	#3
Color	Blanco	Blanco
Forma	Convexas	Convexas
Bordes	Redondeados	Redondeados
Crecimiento a 37°C	+	+
Crecimiento en medios salados	+	+
Fermentación del manitol	+	+
Tinción Gram	+	+
Morfología	Cocos	Cocos
Catalasa	+	+
Coagulasa	+	+

Integridad del ADN genómico de *Staphylococcus aureus* en gel de agarosa al 1.5%



Concentración del ADN genómico y pureza de *Staphylococcus aureus*

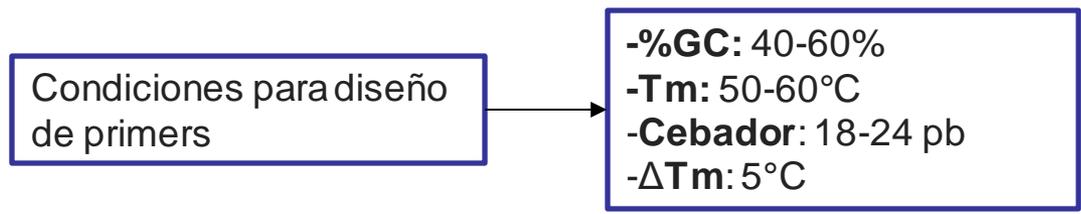
Muestra	Concentración ácido nucleico (ng/μL)	260/280	260/230
Control	130.4	2.22	2.45
<i>S. aureus</i>	127.1	2.17	2.43

## Primers empleados para la identificación de *Staphylococcus aureus*

Gen	Producto	Longitud		Secuencia 5'-3'	Tm	GC (%)
Nuc	154 pb	20	F	ACACCTGAAACAAAGCAT CC	57.7	45.00
		20	R	TATACGCTAAGCCACGTC CA	59.3	50.00
16S	744 pb	17	F	TCCTACGGGAGGCAGCA	59.6	64.71
		17	R	TCACGGCACGAGCTGAC	59.7	64.71

## Reacción de PCR

Componentes	Concentración
PCR Buffer, minus Mg	10X
MgCl2	50mM
dNTPs mix	10mM
Taq ADN Polimerasa	5U/μL
Primer Forward	10μM
Primer Reverse	10μM
Muestra de ADN	100ng
Agua DEPC	



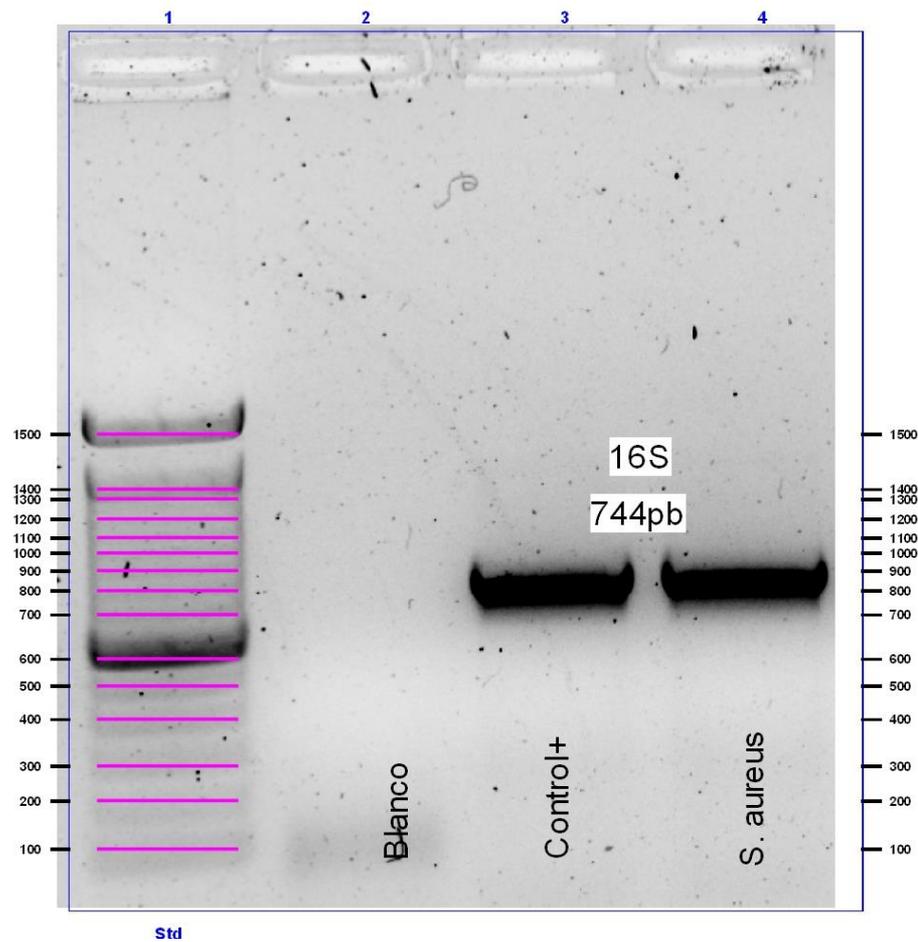
(Ebertz, 2022)



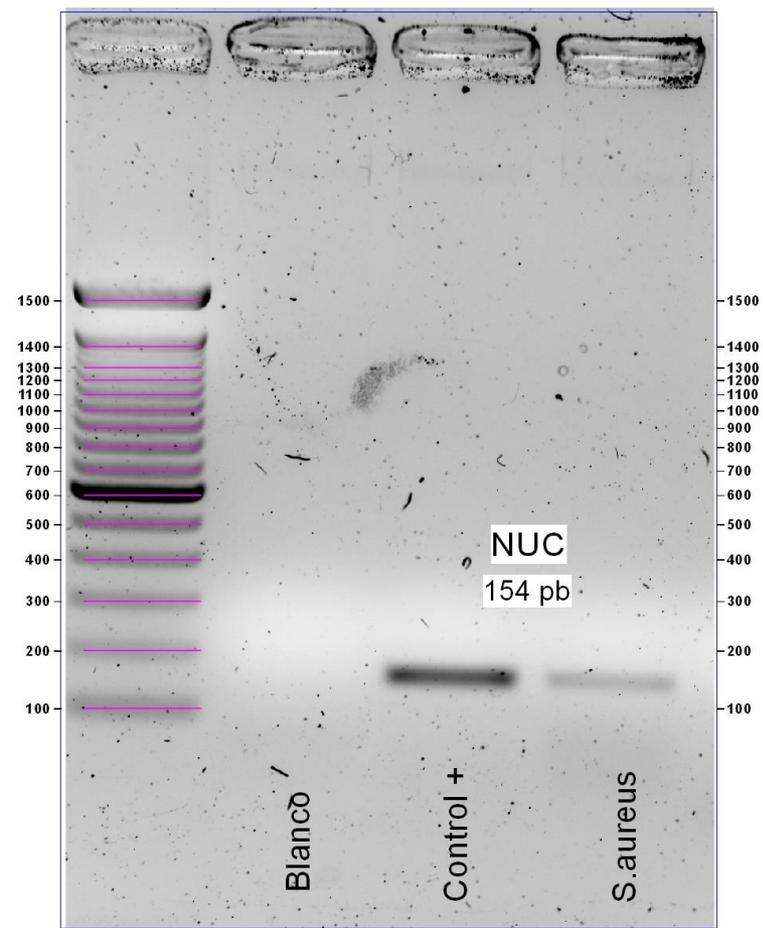
# Identificación molecular de *Staphylococcus aureus*

# Resultados y discusión

Productos amplificados por PCR de la región conservada de la secuencia 16S rRNA.

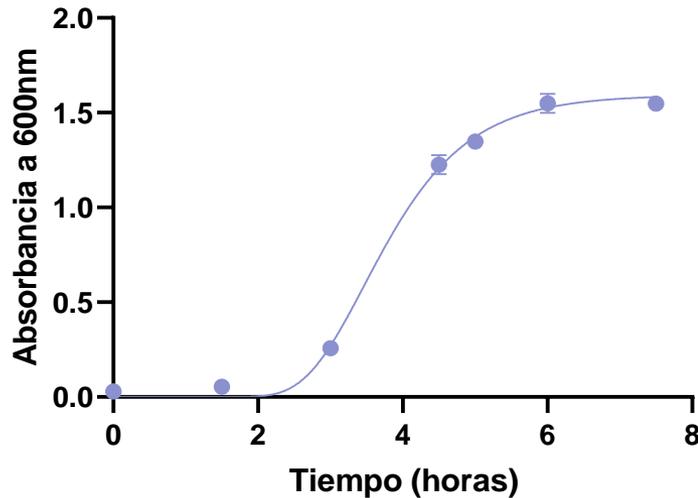


Productos amplificados por PCR del gen NUC para la especie *Staphylococcus aureus*.



(Janda & Abbott, 2007) (Hamdan et al., 2015)

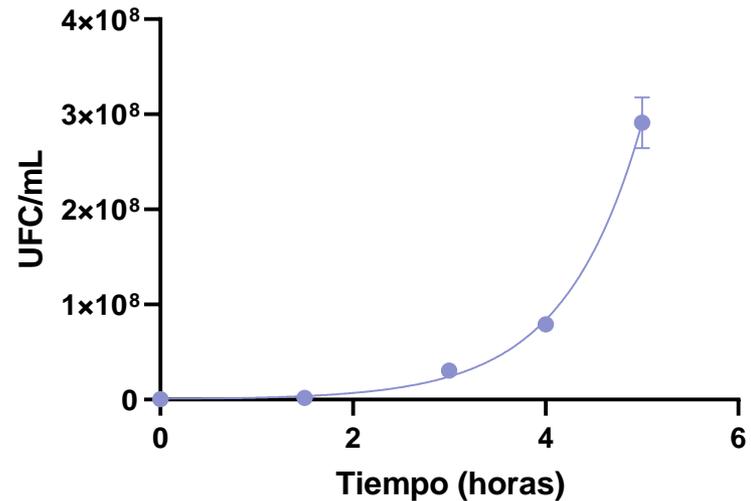
## Curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus*



Gompertz growth  $R^2$  de 0.9963

$$Y = 1.593 * (4.93010^{32} / 1.593)^{\exp(-1.237 * X)}$$

Tasa de crecimiento decae exponencialmente cuando se acerca a su población máxima

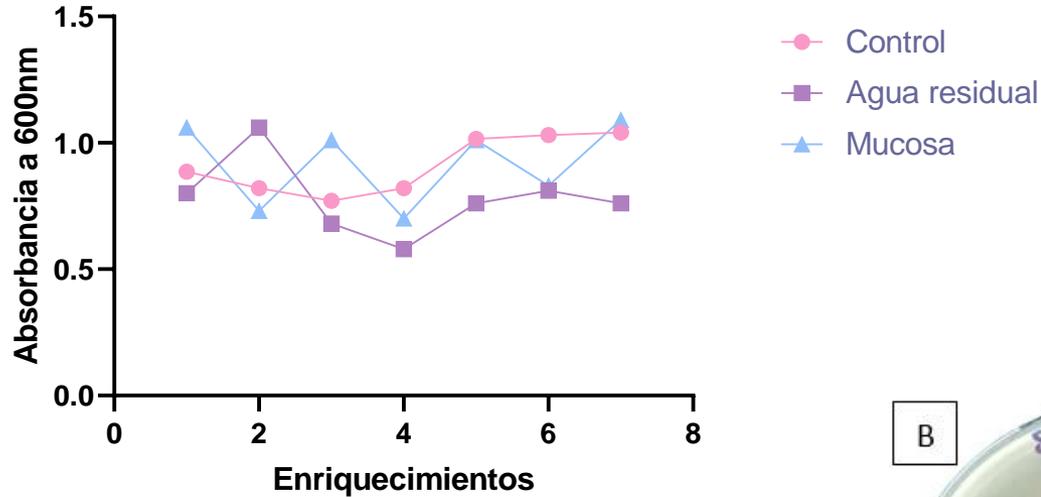


Logistic growth  $R^2$  de 0.9923

$$Y = 3.276 \times 10^{104} * 585539 / ((3.276 \times 10^{104} - 585539) * \exp(-1.241 * x) + 585539)$$

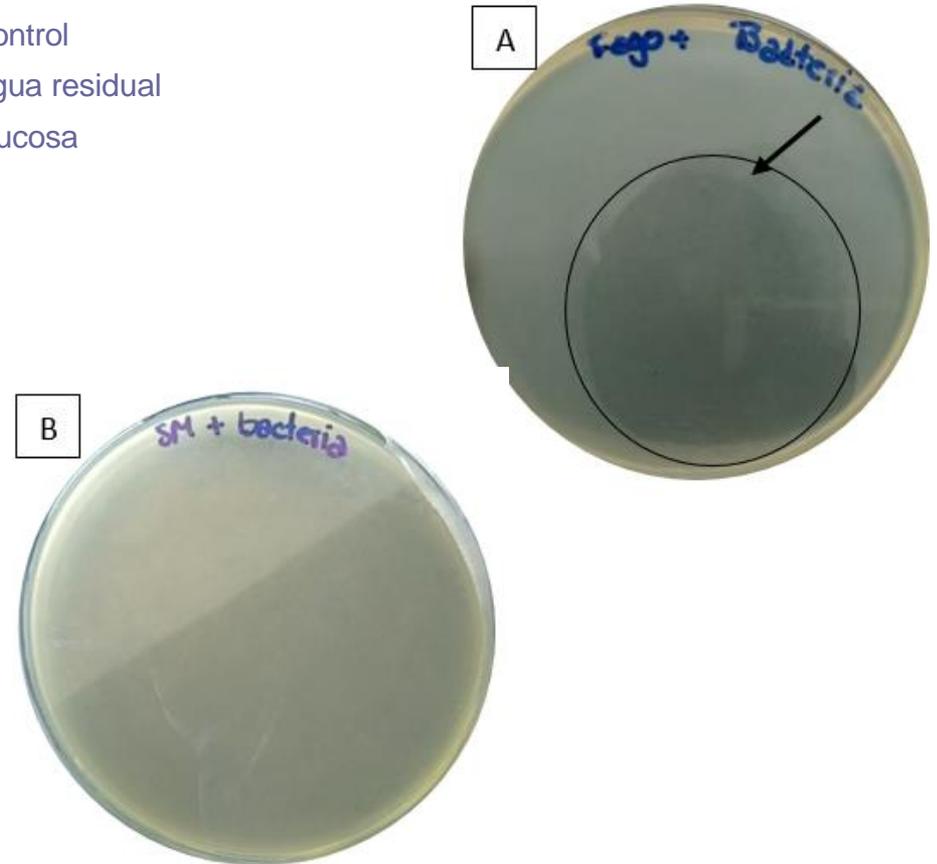
Comienza de manera exponencial y desacelera cuando alcanza la población máxima

Enriquecimientos de fagos aislados de muestras de agua y mucosa

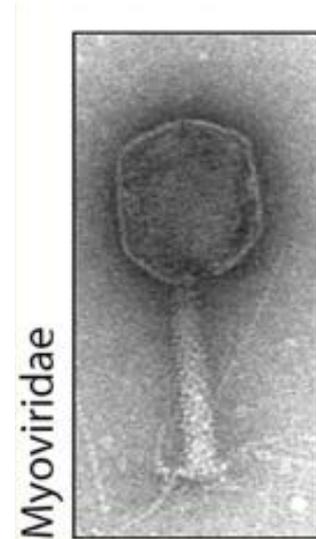
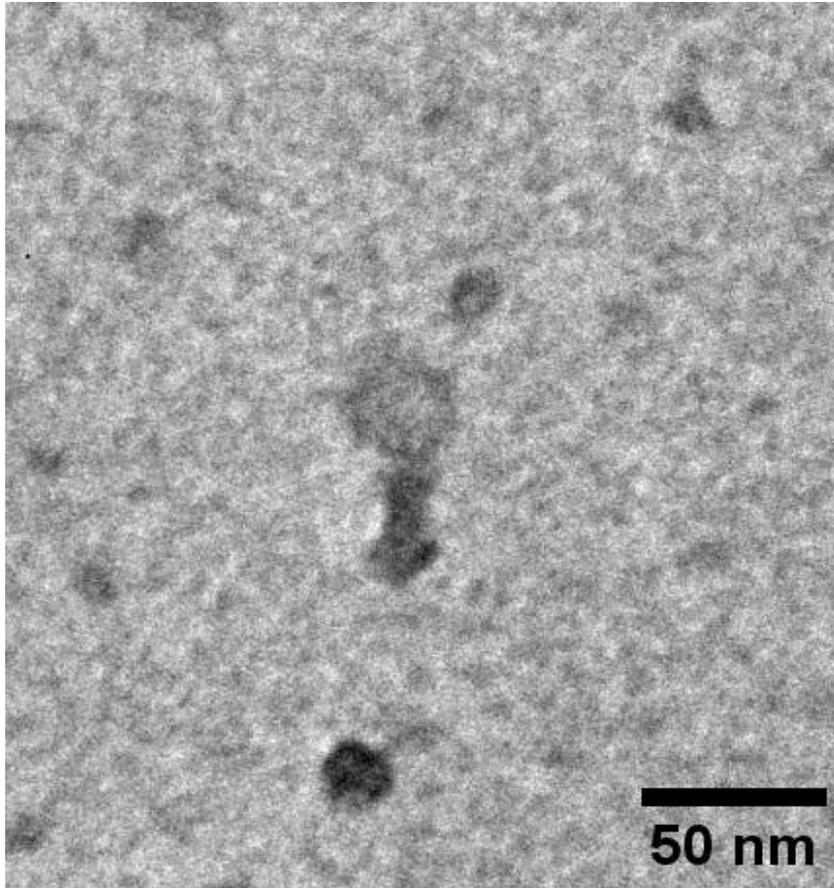


Abundantes en medios acuáticos.  
Se encuentran en donde habite su hospedero.

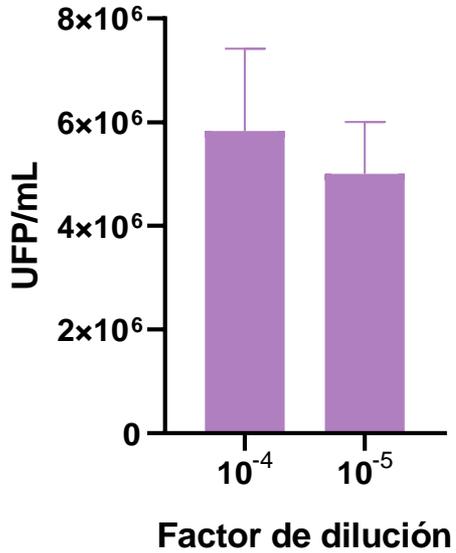
Ensayo Spot Test para determinar la presencia de bacteriófagos contra *Staphylococcus aureus*



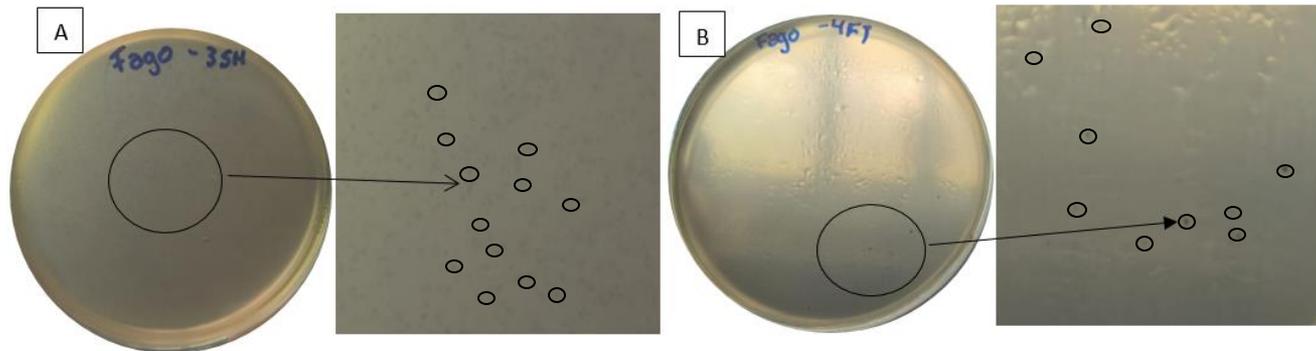
## Micrografías de microscopía electrónica de transmisión de bacteriófagos contra *Staphylococcus aureus*



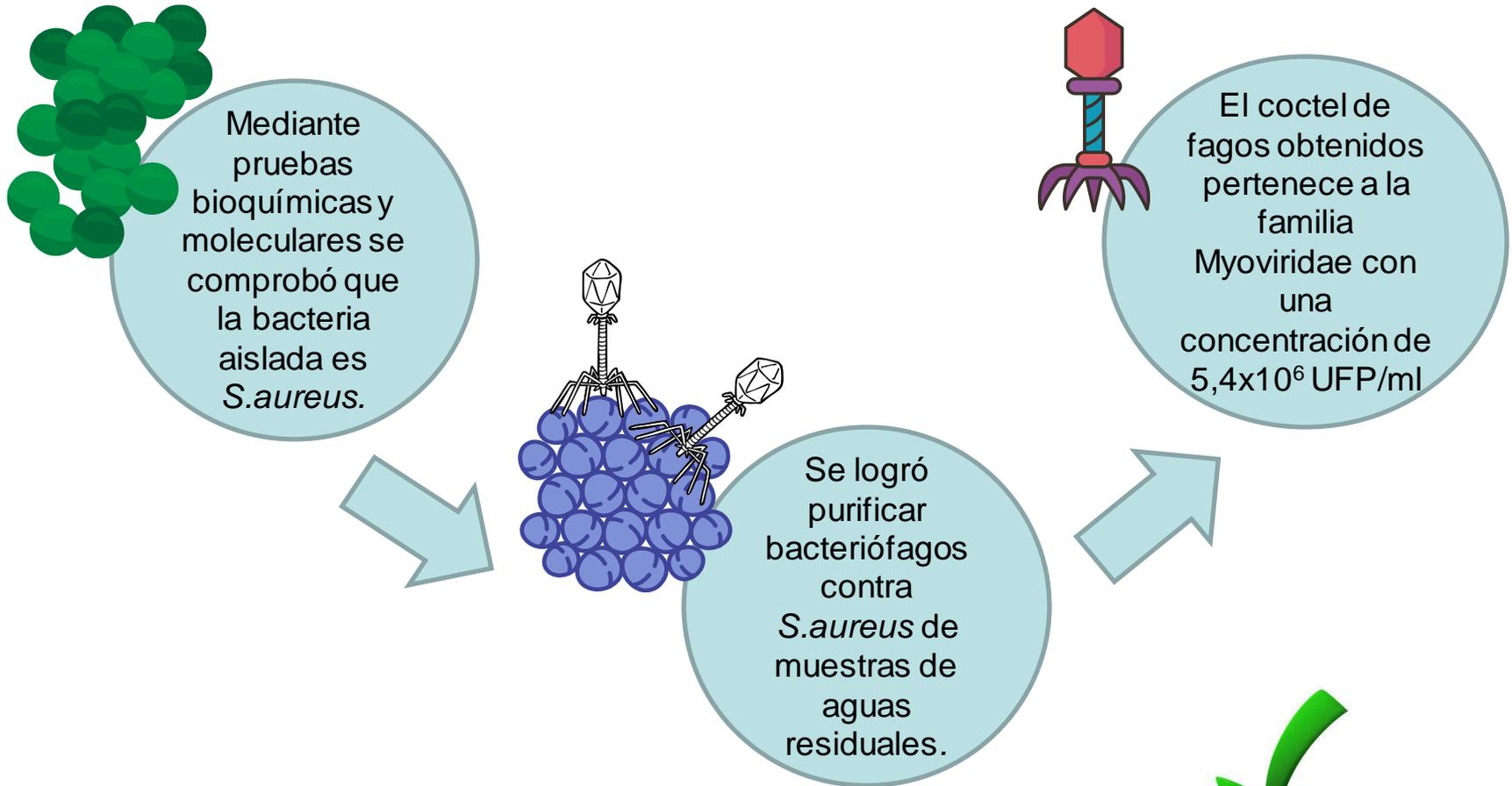
ADN bicatenario  
Cabeza icosaédrica  
Cabeza-Cola  
No poseen envoltura vírica.



Dilución	Placas/caja			UFP/mL	CV (%)
	R1	R2	R3		
$10^{-3}$	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	
$10^{-4}$	62	41	72	$5 \times 10^6$	13.32
$10^{-5}$	5	4	6	$5.8 \times 10^6$	27.12
$10^{-6}$	-	-	-	-	-
$10^{-7}$	-	-	-	-	-
$10^{-8}$	-	-	-	-	-



Placas de lisis  
de 1 a 2mm  
de diámetro.



Hipótesis

Se logró aislar bacteriófagos líticos específicos contra *S.aures*

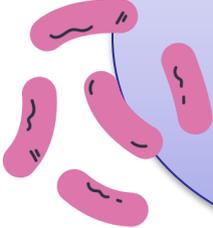




Almacenamiento  
a 4°C y en  
oscuridad a los  
bacteriófagos  
aislados

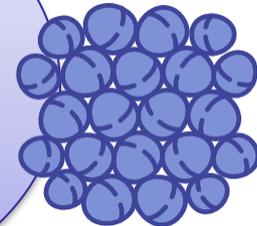
Caracterizar de  
manera  
molecular a los  
fagos líticos

Crear un banco  
de fagos contra  
diferentes  
patógenos



Evaluar el  
potencial como  
bio controlador  
contra otros  
patógenos

Realizar ensayos  
*in vitro* del  
potencial  
bactericida del  
fago.



# Agradecimientos

