



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

Hernández Quingaiza, Shirley Samari

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga

Torres Arias Marbel, Ph.D.

26 de septiembre de 2023

Resultados del Software Copyleaks Plagiarism report



MARBEL TORRES ARIAS

Hernandez Shirley_Avances de tesis....

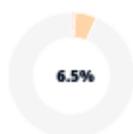
Scan details

Scan time:
August 28th, 2023 at 13:14 UTC

Total Pages:
31

Total Words:
7736

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	0.5%	38
Minor Changes	0.5%	38
Paraphrased	5.5%	427
Omitted Words	0%	0

AI Content Detection



Text coverage
 AI text
 Human text

Plagiarism Results: (8)

T-ESPE-049432.pdf	4%
http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/11240/1/t-es...	
hp	
I DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA...	
FMVZ-M-2016-0322.pdf	1.2%
http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/jspui/bitstream/d...	
bren	
UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN D...	
rtner	0.9%
https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/03/880314/actividad-...	
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL cusca FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, FÍSICAS, MATEMÁTICAS, FARMACIA E INFORMÁTICA.	

Torres Arias, Marbel Ph D.

C.C: 1802949154



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo Integración curricular, “**Obtención y caracterización de bacteriófagos líticos específicos contra *Staphylococcus aureus***”, fue realizado por la señorita Hernández Quingaiza, Shirley Samari, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 26 de septiembre 2023

Torres Arias, Marbel Ph D.

C.C: 1802949154



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Hernández Quingaiza Shirley Samari**, con cédula de ciudadanía N°1725908154, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **"Obtención y caracterización de bacteriófagos líticos específicos contra *Staphylococcus aureus*"**, es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 26 de septiembre 2023

Hernández Quingaiza, Shirley Samari

C.C: 1725908154



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, Hernández Quingalza Shirley Samari, con cédula de ciudadanía N°1725908154, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: "Obtención y caracterización de bacteriófagos líticos específicos contra *Staphylococcus aureus*" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Sangolquí, 26 septiembre 2023

Hernández Quingalza, Shirley Samari

C.C: 1725908154

Dedicatoria

Dedico el presente trabajo a mis padres, quienes me han brindado amor, guía y apoyo incondicional a lo largo de mi vida.

A mis queridos hermanos, por su amistad, aliento y comprensión en todo momento. Este proyecto es un reflejo de la influencia positiva que han tenido en mi camino. Les dedico con gratitud este logro, sabiendo que, sin su presencia, nada de esto sería posible.

Shirley Samari Hernández Quingaiza

Agradecimientos

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a mi madre, Karina Quingaiza, cuyo amor inquebrantable, paciencia y apoyo constante han sido la fuerza impulsora detrás de este proyecto. Su sabiduría, aliento y sacrificio han sido mi mayor fuente de inspiración. Gracias, mamá, por ser mi roca y mi guía a lo largo de este camino.

A mí padre, Oscar Hernández, quién ha sido mi pilar en los momentos difíciles, cuya dedicación, sabiduría y apoyo incondicional han sido fundamentales para el éxito de este proyecto. Siempre has sido un modelo a seguir y una fuente constante de inspiración en mi vida. Tu orientación y apoyo me han guiado a lo largo de este camino y han hecho posible este logro. Gracias, papá, por ser mi fuente de fortaleza y sabiduría.

A mis hermanos, Jennifer y Martin, cuyo apoyo, aliento y comprensión han sido invaluable durante todo el proceso de este proyecto. Siempre estuvieron ahí para escuchar mis ideas y ofrecer su ánimo inquebrantable. Gracias por ser mi fuente constante de inspiración y motivación.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dr. Marbel Torres Arias, mi tutora de proyecto, por su orientación experta, paciencia y apoyo continuo a lo largo de este proceso. Sus conocimientos y guía han sido fundamentales para dar forma a este proyecto y llevarlo a buen término.

A Fernanda Toscano, por ser mi guía de laboratorio, por compartir su experiencia y dedicar su tiempo y esfuerzo para ayudarme a alcanzar este logro, por su increíble buen humor y su predisposición por ayudar a las personas.

A Andrea Aluisa por sus consejos y guía en el laboratorio, por su paciencia, compromiso y apoyo incansable.

Shirley Samari Hernández Quingaiza

Índices de Contenidos

Resultados del Software Copyleaks Plagiarism report	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Listado de Abreviaturas	12
Resumen	14
Abstract	15
Capítulo I: Introducción	16
Formulación del problema	16
Justificación del problema	18
Hipótesis	19
Objetivos	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos	19
Capítulo II. Revisión literaria	20
Marco teórico	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	20
Infecciones causadas por <i>Staphylococcus aureus</i>	20
Resistencia de <i>Staphylococcus aureus</i> a fármacos antimicrobianos	21
Bacteriófagos	23
Estructura de los bacteriófagos	23
Ciclo de vida de lo fagos	24
Ciclo lítico	25
Ciclo lisogénico	25
Ciclo pseudo lisogénico	25
Clasificación de los bacteriófagos	25
Aplicación de bacteriófagos líticos	26
Capítulo III. Materiales y métodos	29
Participantes y zona de estudio	29
Período de Investigación	29
Procedimiento	29

Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	29
Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> mediante medios de cultivos selectivos	29
Identificación bioquímica de <i>Staphylococcus aureus</i>	29
Caracterización de <i>S.aureus</i> por tinción Gram.....	30
Tinción	30
Prueba de catalasa.....	31
Prueba de coagulasa.....	31
Identificación molecular de <i>Staphylococcus aureus</i>	32
Extracción de ADN de <i>Staphylococcus aureus</i>	32
Reacción en cadena de la polimerasa del fragmento 16S y NUC	33
Aislamiento de Bacteriófagos	35
Curva de crecimiento bacteriano de <i>Staphylococcus aureus</i>	35
Aislamiento de bacteriófagos líticos de aguas residuales.....	36
Preparación de cultivos bacterianos iniciales para <i>Staphylococcus aureus</i>	36
Primer pre enriquecimiento de muestras de agua residual	36
Clarificación y segundo pre enriquecimiento de muestras de agua residual.....	36
Enriquecimiento de los filtrados de las muestras	37
Evaluación de la capacidad lítica del bacteriófago mediante ensayo Spot Test	37
Caracterización de bacteriófagos líticos contra <i>Staphylococcus aureus</i>	38
Identificación de bacteriófagos líticos por microscopía electrónica	38
Titulación viral por ensayo de Doble Capa.....	38
Capítulo IV. Resultados	40
Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	40
Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> mediante pruebas dependiente de cultivo	40
Identificación bioquímica de <i>Staphylococcus aureus</i>	41
Identificación molecular de <i>Staphylococcus aureus</i>	43
Extracción y cuantificación de ADN genómico bacteriano	43
Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	44
Aislamiento de Bacteriófagos	46
Curva de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	46
Aislamiento de bacteriófagos.....	48
Caracterización de bacteriófagos líticos contra <i>Staphylococcus aureus</i>	51
Capítulo VII. Conclusiones	59
Capitulo VIII. Recomendaciones	60
Capitulo IX. Bibliografía	61

Índice de Tablas

Tabla 1. Pruebas empleadas para la identificación bioquímica de las cepas aisladas	30
Tabla 2. Composición para un volumen de reacción de 25µL para las muestras de ADN de <i>S.aureus</i>	33
Tabla 3. Primers empleados para la identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	34
Tabla 4. Condiciones para la amplificación del gen NUC para <i>S. aureus</i>	34
Tabla 5. Condiciones para la amplificación de la región 16S para <i>S. aureus</i>	34
Tabla 6. Características fenotípicas y bioquímicas para la bacteria del individuo 2 y 3 aislada a partir de muestras biológicas.....	42
Tabla 7. Cuantificación de la concentración del ADN genómico y su pureza de <i>Staphylococcus aureus</i>	44
Tabla 8. Valores de absorbancia a 600nm del crecimiento bacteriano tras cada enriquecimiento (E) para <i>Staphylococcus aureus</i> de los diferentes tipos de muestras	49
Tabla 9. Valores obtenidos en la determinación viral de los bacteriófagos contra <i>S. aureus</i>	52

Índice de Figuras

Figura 1. Evolución de los fármacos utilizados para las diferentes cepas de <i>S.aureus</i> resistentes a los antibióticos.....	22
Figura 2. Representación de la estructura de los bacteriófagos dependiendo de las familias ..	24
Figura 3. Ciclo de vida del fago	24
Figura 4. Clasificación de los fagos según su morfología, material genético y principales características.....	26
Figura 5. Principales aplicaciones de los bacteriófagos	28
Figura 6. Crecimiento de aislado de mucosa en Agar sangre	40
Figura 7. Crecimiento de bacteria aislada en Agar manitol salado	41
Figura 8. Tinción Gram del aislamiento de bacteria.....	42
Figura 9. Integridad de ADN de <i>Staphylococcus aureus</i>	43
Figura 10. Amplificación del fragmento 16S.....	45
Figura 11. Amplificación del gen NUC.....	46
Figura 12. Curva de crecimiento para <i>Staphylococcus aureus</i> aislada de narinas a 37°C y 150rpm. Absorbancia a 600nm vs Tiempo	47
Figura 13. Curva de crecimiento para <i>Staphylococcus aureus</i> aislada de narinas a 37°C y 150rpm. UFC/ml vs Tiempo.....	48
Figura 14. Enriquecimientos de fagos líticos aislados de muestras de agua y saliva contra <i>Staphylococcus aureus</i>	50
Figura 15. Ensayo Spot Test	51
Figura 16. Micrografías de microscopía electrónica de transmisión de bacteriófagos líticos	52
Figura 17. Determinación del título viral en las diluciones 10^{-4} y 10^{-5}	53
Figura 18. Determinación del título viral	54

Listado de Abreviaturas

NUC: Gen codificador de termo nucleasas.

16S: Secuencia altamente conservada usada para la identificación de bacterias.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

S.aureus: *Staphylococcus aureus*

S.epidermidis: *Staphylococcus epidermidis*

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina.

VRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes a la vancomicina.

NaCl: Cloruro de sodio.

ssRNA: Virus de ARN monocatenario.

ssDNA: Virus de ADN monocatenario.

dsRNA: Virus de ARN bicatenario.

dsDNA: Virus de ADN bicatenario.

FDA: Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo.

MgCl₂: Cloruro de Magnesio

dNTPs: Trifosfato de desoxirribonucleótidos.

DEPC: Dietilo policarbonato.

TSA: Agar Triptona-Soja.

TSB: Caldo Soja Trypticaseína.

OD: Densidad óptica.

MgSO₄: Sulfato de magnesio.

UFP: Unidades formadoras de placa

Resumen

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva que se agrupa en forma de racimo de uvas. Es capaz de colonizar las mucosas del 20 al 40% de seres humanos sanos. Al ser una bacteria oportunista y encontrarse en el medio ambiente es un agente causal de infecciones nosocomiales en piel, huesos, articulaciones y sangre. Además de ser la responsable de enfermedades como neumonía, endocarditis y osteomielitis que pueden llevar a la muerte. El continuo incremento de bacterias resistentes a múltiples antibióticos ha llevado a la necesidad de buscar nuevos enfoques para su tratamiento; uno de ellos es el uso de bacteriófagos, el cual es conocido como fagoterapia. Los bacteriófagos fueron descubiertos por Felix d'Herelle en 1917. Estos son virus capaces de lisar las células bacterianas causando así su muerte, siendo estos inocuos para el ser humano, por lo tanto, el objetivo de la siguiente investigación fue el aislamiento y la caracterización de fagos líticos específicos contra *Staphylococcus aureus* de muestras de mucosa y aguas residuales. Iniciando con el aislamiento del hospedador (*Staphylococcus aureus*). Se logró aislar fagos de muestras de agua residual. Estos fueron visualizados por microscopía electrónica de transmisión, la cual ayudo para determinar que los bacteriófagos era parte del orden Caudovirales de la familia Myoviridae. Finalmente se determinó la concentración del coctel de fagos mediante la determinación del título viral, teniendo así un total de $5,4 \times 10^6$ UFP/mL del fago de interés.

Palabras claves: *Staphylococcus aureus*, bacteriófagos, Caudovirales, Myoviridae.

Abstract

Staphylococcus aureus is a Gram positive bacterium that clusters in the shape of a bunch of grapes. It is capable of colonizing the mucous membranes of 20 to 40% of healthy human beings. Being an opportunistic bacterium and found in the environment, it is a causative agent of nosocomial infections in skin, bones, joints and blood. It is also responsible for diseases such as pneumonia, endocarditis and osteomyelitis that can lead to death. The continuous increase of bacteria resistant to multiple antibiotics has led to the need to seek new approaches for their treatment; one of them is the use of bacteriophages, which is known as phage therapy. Bacteriophages were discovered by Felix d'Herelle in 1917. These are viruses capable of lysing bacterial cells causing their death, being harmless to humans, therefore, the objective of the following research was the isolation and characterization of specific lytic phages against *Staphylococcus aureus* from mucosal and sewage samples. Starting with the isolation of the host (*Staphylococcus aureus*). Phages were isolated from wastewater samples. These were visualized by transmission electron microscopy, which helped to determine that the bacteriophages were part of the order Caudovirales of the family Myoviridae. Finally, the concentration of the phage cocktail was determined by determining the viral titer, thus having a total of 5.4×10^6 PFU/mL of the phage of interest.

Key words: *Staphylococcus aureus*, bacteriophages, Caudovirales, Myoviridae.

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

Staphylococcus aureus es uno de los patógenos comunes en el ser humano (Chen et al., 2022), es una bacteria comensal grampositiva y oportunista. Los principales lugares de colonización son las mucosas y la piel (Jenul & Horswill, 2018), por lo que este microorganismo se puede aislar de múltiples sitios del cuerpo humano (Park & Ronholm, 2021). Sin embargo *S.aureus* coloniza alrededor del 30% de las fosas nasales de la población humana (Wertheim et al., 2005).

La colonización por *Staphylococcus aureus* no significa que la persona este enferma; sin embargo, un procedimiento quirúrgico o lesión, puede provocar una infección oportunista en la herida o en la piel (Tamayo & Quiceno, 2015). Las infecciones causadas por este microorganismo pueden ser leves o potencialmente mortales (Rungelrath & DeLeo, 2021). *S. aureus* es capaz de producir infecciones del torrente sanguíneo, hueso y articulaciones, así como endocarditis, neumonía, entre otros (Enkelmann et al., 2020; Kollef et al., 2011; Tong et al., 2015)

Staphylococcus aureus tiende a ser resistente a los antibióticos. Esta resistencia a menudo se adquiere por transferencia horizontal de genes o por mutaciones cromosómicas (Chambers & DeLeo, 2009). Esta creciente ola de bacterias resistentes a los antibióticos como a la penicilina, metilina y vancomicina es debido al uso de antibióticos tanto en la producción avícola como en la medicina humana (Cheung et al., 2021; Park & Ronholm, 2021).

El continuo aumento de la resistencia por parte de patógenos bacterianos a múltiples fármacos ha llevado a la necesidad de buscar nuevos enfoques para combatir enfermedades infecciosas (Szafranski et al., 2021). La terapia con fagos se basa en el uso de virus bacterianos naturales para la infección y lisado de bacterias (Rakhuba et al., 2010). Las

investigaciones actuales acerca del uso de fagos y sus proteínas líticas contra infecciones bacterianas multirresistentes, sugieren que los bacteriófagos pueden ser utilizados como una alternativa o un complemento a los tratamientos con antibióticos (Lin et al., 2017).

Los bacteriófagos fueron descubiertos en 1915 por Twort y en 1917 por Félix d'Herelle (Ackermann, 2008). Este último descubrió los fagos en muestras diarreicas y especuló que estos eran los responsables de la recuperación de estas enfermedades (Summers, 2012) . La Unión Soviética presento un gran desarrollo de terapia con bacteriófagos, esto debido a la colaboración d'Herelle, el cual probó la eficiencia de estos virus contra infecciones bacterianas en las áreas de pediatría, oftalmología, dermatología, urología cirugía, entre otras (Chanishvili, 2012).

A pesar de que los bacteriófagos han presentado resultados positivos en el tratamiento de bacterias multirresistentes, aún se desconoce las interacciones entre los fagos y las bacterias; es por ello que la presente investigación se basa en la obtención de fagos líticos presentes en las mucosas y su relación con *Staphylococcus aureus*.

Justificación del problema

Una de las principales preocupaciones en el área de la salud pública es la continua aparición de bacterias resistentes a múltiples fármacos, lo cual lleva a la limitar las opciones de tratamiento (Zhong et al., 2021). *Staphylococcus aureus* es un patógeno de interés, debido a que se ha convertido en una de las principales causas de infecciones bacterianas tanto en la comunidad como en las atenciones hospitalarias (Lee et al., 2018).

Existe un aproximado del 20 al 40% de personas colonizadas o portadoras de *S aureus* (Becker et al., 2017). Estas personas son una fuente de contagio, además de poseer un mayor riesgo de infección (Lee et al., 2018). Este organismo es capaz de producir infecciones de tejidos blandos, sangre, piel superficial, heridas quirúrgicas y pulmones (Okwu et al., 2019).

En Ecuador, la vigilancia activa para portadores de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) es casi inexistente, realizándose solo en pocos hospitales (Baroja et al., 2021). Según el estudio realizado por Zurita et al. (2016) de 132 aislados de *S. aureus* en Ecuador el 47% son MRSA.

La resistencia a los antibióticos debido al aumento del uso y abuso de los mismos es una de las amenazas más graves para la salud pública, por lo que en la actualidad se requiere nuevos enfoques de tratamiento (Ventola, 2015). Los bacteriófagos tienen un rango de acción restringido, lo cual le permite atacar a las bacterias patógenas sin afectar la microbiota propia, logrando superar la aparición de resistencia (Furfaro et al., 2018).

Hipótesis

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

Objetivos**Objetivo general**

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

Objetivos 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*.

Capítulo II. Revisión literaria

Marco teórico

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus es una bacteria grampositiva, cuya morfología característica es de cocos de aproximadamente 0.5 a 1.0µm que tiende a agruparse en forma de racimos de uvas (Taylor & Unakal, 2022). Este organismo es anaerobio facultativo, lo que quiere decir que crece tanto en medios aeróbicos como anaeróbicos (Gorwitz et al., 2008). Sus condiciones de cultivo son con un 15% de NaCl y a temperaturas entre los 18°C y 40°C (Missiakas & Schneewind, 2013).

S. aureus fue descubierta por primera vez por Alexander Ogston en pacientes con llagas ulceradas en 1880 (Guo et al., 2020). Sin embargo fue identificada por el cirujano alemán, Anton Rosenbach en 1884 (Orenstein, 2006), el cual reconoció dos cepas de *Staphylococcus* (*S. aureus* y *S. epidermidis*) las cuales fueron nombradas según la pigmentación de sus colonias (Licitra, 2013). Aproximadamente el 82% de los pacientes infectados por *S. aureus* morían por bacteriemia en el siglo XIX (Skinner & Keefer, 1941). Este índice de mortalidad disminuyó con la aparición de la penicilina (Ladhani & Garbash, 2005). No obstante, desde el uso de diferentes antibióticos, a lo largo del tiempo han ido apareciendo cepas resistentes a los diferentes fármacos de primera y segunda generación como la penicilina, metilina y vancomicina (Oliveira et al., 2018).

Infecciones causadas por *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es un importante patógeno humano que se encuentra en la piel y mucosas (Taylor & Unakal, 2022), siendo el ser humano el principal reservorio de esta bacteria. Son causantes de infecciones quirúrgicas y de la piel, intoxicación alimentaria y enfermedades respiratorias (Licitra, 2013). *S aureus* coloniza aproximadamente del 20 al 40%

de los seres humanos de manera persistente en la nariz, sin embargo, se pueden encontrar en otras ubicaciones como la piel, garganta, axilas, ingles e intestino (Howden et al., 2023). El ser portador de este patógeno aumenta considerablemente las posibilidades de infecciones (Lakhundi & Zhang, 2018).

Las infecciones causadas por *S. aureus* llega a ser el causante de varias muertes. En 2019, este patógeno fue considerado como el principal agente causal de muerte bacteriana en 135 países y se asoció con 1´105.000 muertes en este mismo año (GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022).

Según Linz et al., (2023) las principales presentaciones clínicas causadas por *S. aureus* son: Foliculitis, forúnculos, carbuncos, impétigo, erisipela, mastitis, endocarditis, entre otros.

Resistencia de *Staphylococcus aureus* a fármacos antimicrobianos

Staphylococcus aureus es conocida por su capacidad de volverse resistente a los antibióticos (Chambers & DeLeo, 2009). Esta resistencia puede ser adquirida por mutaciones cromosómicas o por la adquisición de elementos genéticos móviles (Howden et al., 2023).

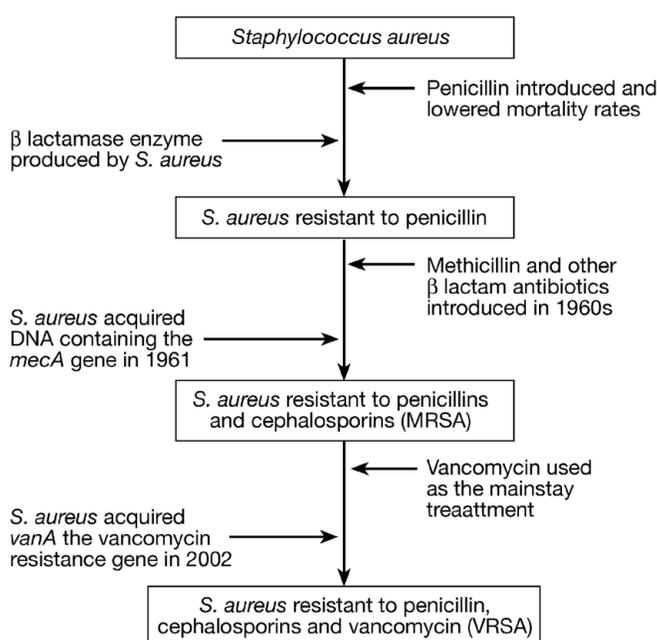
La terapia con antibióticos ha resultado ser una manera efectiva de tratar infecciones causadas por las diferentes bacterias. Sin embargo, el uso excesivo de estos medicamentos ha llevado al desarrollo de cepas resistente (Gan et al., 2021). En la actualidad se ha observado resistencia para todos los fármacos utilizados contra *S aureus*, no ha aparecido cepas individuales resistentes a todos los fármacos. Sin embargo, al presentar resistencia a ciertos medicamentos presenta desafíos al momento de plantear un tratamiento (Vestergaard et al., 2019).

Los aislados de *S. aureus* tanto de origen humano como animal presentan una amplia gama de genes de resistencia. En la actualidad se han logrado identificar al menos 60 genes de resistencia en diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* (Fessler et al., 2018). Estos

genes confieren resistencia a todas las clases de agentes antimicrobianos, entre los que se encuentran: tetraciclinas, macrólidos, fenicoles, sulfonamidas, β lactámicos, entre otros como se muestran en la Figura 1 (Deyno et al., 2017).

Figura 1

Evolución de los fármacos utilizados para las diferentes cepas de S.aureus resistentes a los antibióticos.



Nota. La figura representa la evolución de los antibióticos utilizados contra *Staphylococcus aureus*. Tomado de *Antimicrobial resistance profile of Staphylococcus aureus*, Deyno et al., 2017. *BMC Pharmacology & Toxicology* (2017)

La resistencia a los antibióticos desarrollados por las bacterias ha llevado a la búsqueda de nuevos enfoques de tratamiento, entre los que se encuentran el uso de bacteriófagos. El estudio de la aplicación de fagos para el tratamiento de infecciones ocasionadas por bacterias es prometedora (Plumet et al., 2022).

Bacteriófagos

Los bacteriófagos son virus que infectan y se replican solo en células bacterianas (Alexyuk et al., 2022), provocando la muerte y la lisis de las células bacterianas infectadas (Moineau, 2013). Se encuentran distribuidos en todo el medio ambiente, razón por la cual es considerado como el agente biológico más abundante en la tierra (Kasman & Porter, 2022).

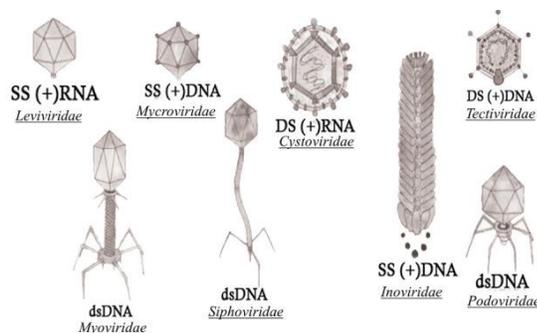
Los fagos son capaces de prevalecer en cualquier entorno, como por ejemplo; el agua, productos alimenticios, aguas residuales, cubierta forestal, desechos humanos y animales (Alomari et al., 2021).

Estructura de los bacteriófagos

Los bacteriófagos están conformados por un solo tipo de ácido nucleico (ADN o ARN) y una cápside proteica (Moineau, 2013). La morfología de los bacteriófagos llega a ser diversa, pero comúnmente consiste en una cabeza con el ácido nucleico y una cola que facilita la adhesión del virus con la bacteria (Rifkind & Freeman, 2005). Los fagos poseen una estructura adecuada para lograr cumplir con sus objetivos, los cuales son: identificar una bacteria huésped adecuada, aprovechar el metabolismo del huésped y crear varios fagos de progenie. Las formas básicas estructurales del fago incluyen una cabeza icosaédrica con cola, cabeza icosaédrica sin cola y una forma filamentosa como se observa en la Figura 2.

Figura 2

Representación de la estructura de los bacteriófagos dependiendo de las familias.



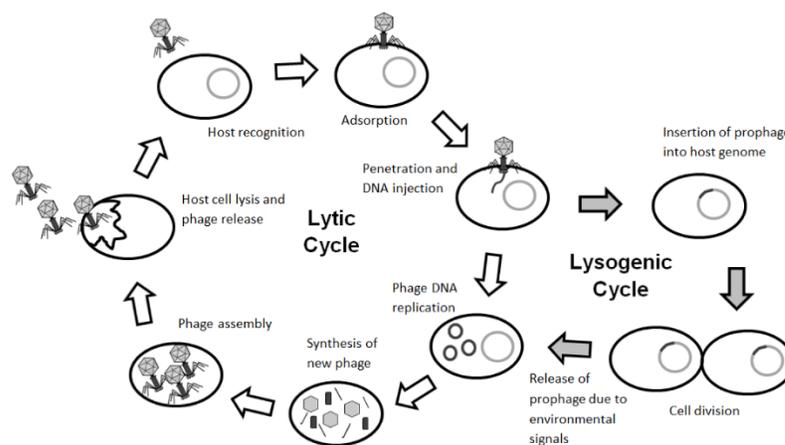
Nota. Tomado de *Bacteriophages presence in nature and their role in the natural selection of bacterial populations*, Naureen et al., 2020, *Acta Bio Medica : Atenei Parmensis* (2020).

Ciclo de vida de lo fagos

Los fagos se pueden clasificar según su ciclo de vida en líticos, lisogénicos y pseudo lisogénicos (Naureen et al., 2020).

Figura 3

Ciclo de vida del fago.



Nota. Tomado de *A Review of Phage Therapy against Bacterial Pathogens of Aquatic and Terrestrial Organisms*, Doss et al., 2017, *Viruses* (2017).

Ciclo lítico

La fase de infección o ciclo lítico empieza cuando el fago se adjunta al exterior de una célula bacteriana, esto es posible gracias a la cola de proteínas del fago que se une a receptores específicos de la superficie externa de la bacteria (Doss et al., 2017). La cola inyecta el genoma del virus en el citoplasma bacteriano, haciendo uso de la maquinaria celular para su replicación y dispersión para finalmente liberarse causando la lisis de la célula bacteriana (Naureen et al., 2020).

Ciclo lisogénico

En el ciclo lisogénico, los fagos no lisan inmediatamente la célula bacteriana, sino, el profago (genoma del fago) se inserta en sitios específicos del cromosoma de la célula huésped, replicándose así junto con el ADN del huésped, estableciendo una relación estable (Naureen et al., 2020). Los profagos salen del estado lisogénico y entran en el ciclo lítico, seguido de una explosión de viriones en condiciones de estrés (M. Zhang et al., 2022).

Ciclo pseudo lisogénico

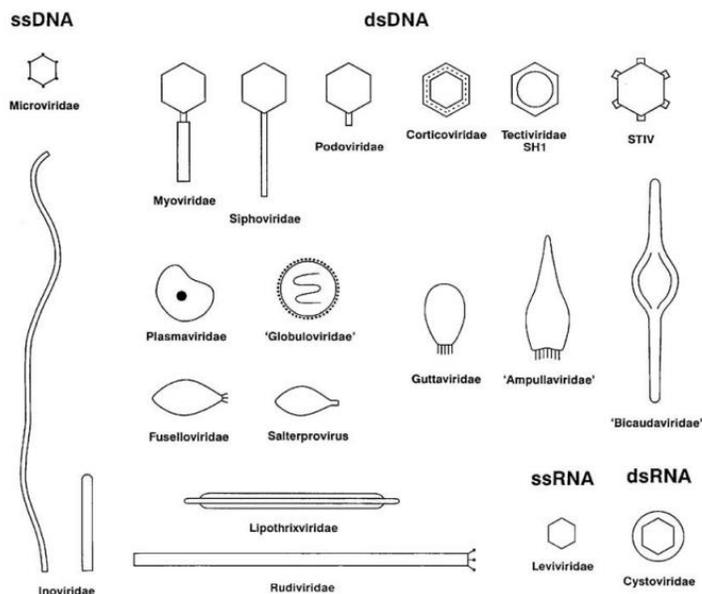
El ciclo pseudo lisogénico ocurre cuando la célula del huésped se encuentra bajo condiciones de estrés, por lo que el fago no se integra en el genoma del huésped para establecer una relación estable a largo plazo ni lisa las células, por lo que es considerado como un ciclo de vida no clásico (Mäntynen et al., 2021).

Clasificación de los bacteriófagos

Los fagos se pueden clasificar de diversas maneras, una de ellas es en relación del tipo de material genético que incorpora dentro del núcleo de la cápside, dividiéndose así en cuatro grupos principales entre los que se encuentran: fagos de ADN bicatenario (dsDNA), de ADN monocatenario (ssDNA), fagos de RNA monocatenario (ssRNA) y de RNA de doble cadena (dsRNA) (Harada et al., 2018).

Figura 4

Clasificación de los fagos según su morfología, material genético y principales características.



Nota. Tomado de *Phage Classification and Characterization*, Ackermann, 2009, *Bacteriophages: Methods and Protocols* (2009)

La cantidad de fagos de morfología conocida supera los 5500, siendo los más abundantes los de ADN bicatenario (Ackermann, 2009). La mayoría de estos bacteriófagos, aproximadamente el 96% poseen cola. Además existen los viriones cúbicos, filamentosos o pleomórficos que representan el 4% del número total de fagos (Haq et al., 2012).

Aplicación de bacteriófagos líticos

El uso de bacteriófagos como terapia contra bacterias nació hace aproximadamente un siglo. Sin embargo, la aparición de antibióticos llevó a que el tratamiento con fagos sea ignorada en su mayoría (Chanishvili, 2012). Con la aparición de bacterias multirresistentes a los antibióticos ha renacido el interés por el estudio de cócteles de fagos, esto debido a que esta

terapia no involucra el uso de antibióticos y sirve para tratar infecciones bacterianas (Plumet et al., 2022).

Los fagos líticos resultan ser una alternativa viable para el tratamiento de infecciones humanas. Esto debido a su capacidad para eliminar de manera rápida las bacterias del huésped sin afectar la microbiota natural del mismo (Chhibber et al., 2013).

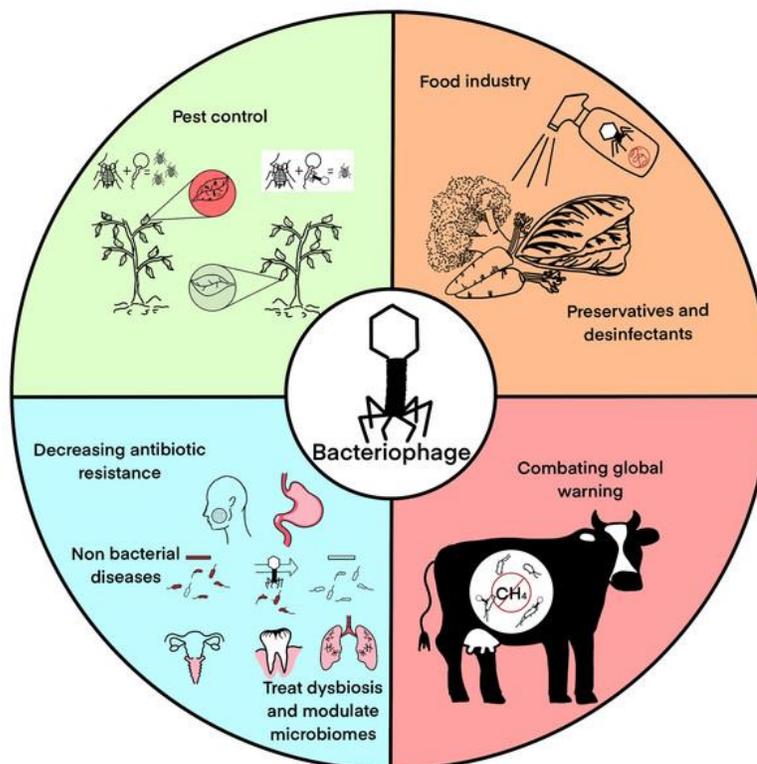
En la industria alimentaria los bacteriófagos han sido utilizados para el control de bacterias patógenas presentes en los alimentos. Los fagos son aplicados después de la cosecha o antes del envasado de alimentos (Endersen & Coffey, 2020). En la actualidad ya existen varios productos comerciales derivados de fagos que ya han sido aprobados por la FDA como SalmoFresh, usado para el control de *Salmonella* en aves, mariscos, frutas y vegetales. Otro producto que se encuentra en el mercado es EcoShield usado para el control de *E.coli* O157:H7 en carne roja (García et al., 2023).

Otra aplicación de los bacteriófagos es el control del microbioma de los seres humanos. Esto debido a que los bacteriófagos influyen en la homeostasis ejerciendo una presión de selección sobre las comunidades bacterianas. Un ejemplo de ello es el aumento de enfermedades gastrointestinales debido a la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos, la terapia con fagos se ha propuesto como una alternativa para restaurar la eubiosis intestinal, gracias a los efectos bactericidas e inmunomoduladores contra patógenos bacterianos (Gutiérrez & Domingo, 2020).

El uso de bacteriófagos líticos han sido propuestos para la reducción de la emisión de metano producido por el ganado bovino. Esta idea nació debido a que gran parte del metano es producido por arqueas metanogénicas presente en el microbioma de animales criados para el consumo humano. Las arqueas pueden ser infectadas por virus como los fagos, lo que llevaría a la disminución de su población (Boadi et al., 2004).

Figura 5

Principales aplicaciones de los bacteriófagos.



Nota. Tomado de *Myriad applications of bacteriophages beyond phage therapy*. García, 2023.

Capítulo III. Materiales y métodos

Participantes y zona de estudio

El proyecto fue financiado por el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE”.

Período de Investigación

El proyecto será realizado en un periodo de 4 meses, comenzando con el aislamiento de la bacteria hospedera seguido del aislamiento y enriquecimiento del fago.

Procedimiento

Aislamiento de *Staphylococcus aureus*

Aislamiento de *Staphylococcus aureus* mediante medios de cultivos selectivos

Se tomaron muestras de narinas para el aislamiento de *Staphylococcus aureus*, las cuales fueron sembradas por estriado en medio Agar sangre e incubadas a 37°C durante 48 horas. Las colonias que presentaron una beta hemólisis fueron sembradas en Agar sangre hasta la obtención de cultivos puros.

Los cultivos puros fueron subcultivados en manitol salado e incubados a 37°C durante 24 horas, esto debido a que *S. aureus* aparece de color amarillo por la fermentación del manitol.

Identificación bioquímica de *Staphylococcus aureus*

Las cepas bacterianas que fueron aisladas de manitol salado por su coloración amarilla fueron analizadas mediante pruebas bioquímicas especificadas en la Tabla 1.

Tabla 1

Pruebas empleadas para la identificación bioquímica de las cepas aisladas

PRUEBA	MEDIO DE CULTIVO/REACTIVO	RESULTADO	
		POSITIVO	NEGATIVO
Gram	Cristal de violeta, Safranina, lugol y alcohol-acetona	Violeta o azul bajo el microscopio	Rojo bajo el microscopio
Catalasa	Peróxido de hidrógeno H ₂ O ₂	Formación de burbujas	Permanece igual
Coagulasa	Plasma	Formación de coágulos	Permanece igual

Nota. Pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de *Staphylococcus aureus* aisladas de muestras de narinas.

Caracterización de *S.aureus* por tinción Gram

La tinción de la bacteria se realizó en todas las colonias con presencia de beta hemolisis en el Agar sangre y las de coloración amarilla en manitol salado. Se siguió el protocolo de (Tripathi & Sapra, 2022)

Preparación del frotis

La preparación de frotis se llevó a cabo tomando una colonia aislada del agar manitol salado con la ayuda de un asa de inoculación. El cultivo se extendió en un portaobjetos con ayuda del asa hasta obtener una película fina y uniforme y se dejó secar haciendo movimientos circulares sobre una llama del mechero.

Tinción

A la muestra ya fijada se añadió cristal de violeta durante 60 segundos, el colorante fue lavado con agua destilada, posteriormente se añadió la solución de yodo durante 60 segundos y se enjuago con agua destilada. La decoloración de la muestra se realizó con una gota del mix

de acetona y etanol y se lavó durante 5 segundos con agua destilada. Finalmente se colocó una solución básica de safranina durante 60 segundos y se lavó con agua. El exceso de agua se dejó secar al aire. El portaobjetos fue visualizado en el microscopio con ayuda de aceite de inmersión con el objetivo 100x.

Prueba de catalasa

La prueba de la catalasa permite la detección de la enzima catalasa que descompone el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno (Shangari & O'Brien, 2006). La prueba de la catalasa se realizó en las colonias con una tinción Gram positiva, siguiendo el protocolo de (Reiner, 2010).

En un portaobjetos se colocó una pequeña cantidad de la colonia aislada de 24 horas con la ayuda de un asa estéril, con un gotero se colocó una gota de H₂O₂ al 3% sobre el organismo en el portaobjetos y se observó la formación de burbujas en caso de que el organismo sea catalasa positiva.

El control negativo se realizó haciendo uso de agua en lugar de una colonia bacteriana.

Prueba de coagulasa

Se realizó la prueba de coagulasa en tubo para las colonias aisladas anteriormente. Se siguió el procedimiento descrito por (Katz, 2010).

Se extrajo 4mL de sangre humana en un tubo con EDTA como anticoagulante y se centrifugó por 2000 rpm por 10 minutos para la obtención del plasma. La prueba se realizó en tubos de vidrio de 10mL que contenía 0.5mL de plasma humana., se seleccionó tres colonias aisladas con la ayuda de un asa estéril. Se mezcló el plasma con las tres colonias y se los incubó a temperatura ambiente durante 24 horas para la observación de coágulos.

Identificación molecular de *Staphylococcus aureus*

Extracción de ADN de *Staphylococcus aureus*

La extracción de ADN se la realizó siguiendo las instrucciones del Kit de extracción de ADN de la marca Promega.

Se colocó 1mL del medio de cultivo bacteriano de 24 horas de *Staphylococcus aureus* aislado en tubos de 1.5mL y se centrifugó por 5 minutos a 8000rpm y se desechó el sobrenadante (este pasó se repitió por 3 veces). El pellet obtenido fue resuspendido con 480µL de EDTA 50mM con ayuda del vortex. Posteriormente se añadió 60 µL de lisozima en una concentración de 20mg/mL y se homogenizó por inversión para posteriormente incubarla a 37°C por 40 minutos. Finalmente se centrifugó a 13000rpm por 3 minutos y se desechó el sobrenadante.

Al pellet obtenido en el paso anterior se añadió 600µL de la solución de lisis nucleica y se homogenizó por pipeteo para incubarlo a 80°C por 5 minutos. Posteriormente, se añadió 3µL de RNasa y se mezcló por inversión para finalmente incubar durante 30 minutos a 37°C.

Se colocó 200µL de la solución de precipitación de proteínas sobre el producto obtenido de la lisis celular y se homogenizó por 20 segundo en el vortex. Esta mezcla se incubo en hielo durante 5 minutos para finalmente centrifugar durante 4 minutos a 13000rpm.

El sobrenadante obtenido de la centrifugación anterior se pasó a un nuevo tubo de 2mL el cual contenía 600µL de isopropanol y se mezcló por inversión hasta observar un hilo blanco. Posteriormente se centrifugó a 13000rpm por 3 minutos y se descartó el sobrenadante.

Los residuos de isopropanol fueron eliminados con la ayuda de tiras de papel filtro y posteriormente se lavó el pellet con 600µL de etanol al 70%.

El excedente de etanol fue retirado con tiras de papel filtro y se dejó secar en hielo dentro de la Sorbona durante 15 minutos.

Se añadió 50µL de la solución de rehidratación y se cuantificó en el espectrofotómetro Thermofisher NanoDrop 2000.

Reacción en cadena de la polimerasa del fragmento 16S y NUC

Se realizó una PCR para la detección de *Staphylococcus aureus* en el ADN obtenido de las colonias puras. Para los ensayos de PCR se utilizó la enzima Taq polimerasa. La composición de la reacción de 25 µL se muestra en la Tabla 2. Para la amplificación se utilizó como control positivo ADN de *S.aureus* de la cepa ATCC y como control negativo agua.

Para el ensayo se utilizó dos tipos de primers los cuales se detallan en la Tabla 3. El protocolo del termociclador se muestra en la Tabla 4 y 5.

Tabla 2

Composición para un volumen de reacción de 25µL para las muestras de ADN de S.aureus.

Componentes	Concentración	25µL rxn
PCR Buffer, minus Mg	10X	2.5
MgCl ₂	50mM	0.75
dNTPs mix	10mM	0.5
Taq ADN Polimerasa	5U/µL	1
Primer Forward	10µM	1
Primer Reverse	10µM	0.1
Muestra de ADN	100ng	2
Agua DEPC		To 25µL

Tabla 3

Primers empleados para la identificación de Staphylococcus aureus.

Gen	Producto	Longitud		Secuencia 5'-3'	Tm	GC (%)
Nuc	154 pb	20	Forward	ACACCTGAAACAAAGCATCC	57.7	45.00
		20	Reverse	TATACGCTAAGCCACGTCCA	59.3	50.00
16S	744 pb	17	Forward	TCCTACGGGAGGCAGCA	59.6	64.71
		17	Reverse	TCACGGCACGAGCTGAC	59.7	64.71

Tabla 4

Condiciones para la amplificación del gen NUC para S. aureus.

Estado	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 minutos	1
Desnaturalización	95	30 segundos	35 ciclos
Alineamiento	59	30 segundos	
Extensión	72	7 minutos	
Holding	4	Indefinido	

Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% para la región del gen NUC.

Tabla 5

Condiciones para la amplificación de la región 16S para S. aureus.

Estado	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 minutos	1
Desnaturalización	95	30 segundos	30 ciclos
Alineamiento	58	30 segundos	
Extensión	72	7 minutos	
 Holding	4	Indefinido	

Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5% para la región 16S de *Staphylococcus aureus*.

Aislamiento de Bacteriófagos

Curva de crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus*

Se partió de un stock congelado de la bacteria *Staphylococcus aureus* para lo cual se tomó una muestra con la ayuda de un asa bacteriológica estéril y se sembró por estriado en placas con medio TSA y se incubó a 37°C por 24 horas.

Una colonia aislada fue depositada en 3mL de medio TSB en un tubo de 15mL e incubado a 37°C, 150 rpm por 18 horas.

Se midió la densidad óptica (OD) en un espectrofotómetro a 600 nm. Con dicho cultivo se ajusta el matraz de 250mL con 25mL de medio TSB a una absorbancia de 0.03, con la siguiente fórmula:

$$V_1 = \frac{OD_2 \times V_2}{OD_1}$$

Donde:

OD₁: Absorbancia del cultivo bacteriano de 18h.

OD₂: Absorbancia a ser ajustada.

V₂: Volumen de trabajo.

Se tomó una alícuota de 1mL del matraz cada 1.5 horas y se colocó en un tubo de 1.5 mL y con 100 µL del volumen tomado se realiza diluciones seriadas desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁸ en 900 µL de medio TSB. Posteriormente se midió la absorbancia de los 900 µL del cultivo restante del To (Dilución 0). Durante este procedimiento el matraz se siguió incubando a 37°C y 150 rpm.

Se sembró 5 diluciones de cada tiempo tomado en placas con TSA mediante la siembra por inversión y se incubó durante 24 horas a 37°C, posteriormente se contabilizaron el número de colonias por caja Petri.

Aislamiento de bacteriófagos líticos de aguas residuales

Preparación de cultivos bacterianos iniciales para *Staphylococcus aureus*

Se partió del cultivo aislado de una colonia bacteriana de *Staphylococcus aureus* la cual fue transferida a un tubo de 15mL con 5mL de caldo triptosa 0.5X enriquecido con 10mM de MgSO₄ e incubada a 170rpm, 37°C durante 24 horas.

Primer pre enriquecimiento de muestras de agua residual

En un boeco de vidrio de 100mL estéril se colocaron 22.5mL de muestra de agua residual conjuntamente con 2.5mL de caldo triptosa 0.5X enriquecido con 10mM de MgSO₄ y 1mL de cultivo bacteriano de *Staphylococcus aureus* fresco. Los recipientes fueron incubados en agitación de 170rpm a 37°C durante 24 horas.

Se iniciaron cultivos bacterianos fresco de *Staphylococcus aureus* inoculando 2uL del cultivo bacteriano en caldo triptosa 0.5X enriquecido e incubando a 170rpm a 37°C durante 24 horas.

Clarificación y segundo pre enriquecimiento de muestras de agua residual

El contenido obtenido del primer pre enriquecimiento fue transvaso a tubos de 50mL y centrifugado a 4000rpm durante 30 minutos a 18°C. En un boeco estéril de 100mL se colocaron 25mL de caldo triptosa 0.5X enriquecido, 5mL del sobrenadante colectado y 1mL de cultivo bacteriano de 24 horas. El recipiente fue incubado a 170rpm a 37°C durante 24 horas.

Enriquecimiento de los filtrados de las muestras

El contenido del boeco fue transferido a tubos de 50mL y centrifugado a 4000rpm durante 30 minutos a 18°C. Se recolectó 10mL del sobrenadante de la muestra y se pasó a través de filtros de 0.45 y 0.20µm.

Se inoculó 2µL de cultivo bacteriano fresco en 5mL de caldo triptosa 0.5X enriquecido y se incubo en agitación a 170rpm, 37°C durante 3 horas. Después de 3 horas de incubación se tomó una alícuota de 1mL del cultivo bacteriano y se midió la densidad óptica a 600nm en el espectrofotómetro. A cada tubo de 3 horas de crecimiento bacteriano se adicionaron 5mL del filtrado. A los controles negativos se adicionaron 5mL de agua destilada estéril en lugar del filtrado. Los tubos fueron incubados a 37°C a 1700rpm por 24 horas.

Se tomó 1mL del contenido de cada tubo después de 24 horas de incubación y se midió la densidad óptica a 600nm en el espectrofotómetro. El restante de cada tubo se transvaso a tubos de 15mL y se centrifugó a 4000rpm durante 30 minutos a 18°C. El sobrenadante obtenido se pasó a través de filtros de 0.45 y 0.20µm. El enriquecimiento se realizó hasta obtener una concentración aproximada de 10^6 UFP/ml del filtrado.

Evaluación de la capacidad lítica del bacteriófago mediante ensayo Spot Test

Se realizó una prueba de Spot Test para confirmar la presencia de bacteriófagos.

Se colocó cultivo bacteriano de 24 horas de *S. aureus* hasta alcanzar un OD de 0.008 en 4mL de medio semisólido de TSA enriquecido con MgSO₄ 10mM y se homogenizó por vortex. El contenido fue vertido sobre cajas Petri con medio TSA enriquecido con MgSO₄ 10mM.

Se colocó 100 µL del filtrado de fagos en el centro de la caja Petri y se incubó a 37°C por 24 horas.

Caracterización de bacteriófagos líticos contra *Staphylococcus aureus*

Identificación de bacteriófagos líticos por microscopía electrónica

La morfología de los bacteriófagos fue analizada por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se colocó 10µL del fago sobre el mesh de cobre durante dos minutos y se absorbe la muestra con papel filtro. Se procedió a realizar una tinción negativa con 10 µL de acetato de uranilo al 4% durante 10 segundos y se realizó 3 lavados con agua destilada estéril. Se observó la muestra en el microscopio electrónico de transmisión (TEM) con 2048 pixeles de ancho, 2115 pixeles de alto y un tamaño de 4.1MB con una magnificación de 0.25.

Titulación viral por ensayo de Doble Capa

Se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-9} con 100 µL del filtrado del fago y 900 µL de buffer SM. Posteriormente se tomó cultivo bacteriano para llegar a un OD de 0.04 en 4 mL de medio semisólido TSA enriquecido y 100µL de cada dilución y se homogenizó por vortex.

Las diferentes suspensiones fueron vertidas sobre cajas Petri con medio TSA y se extiende uniformemente sobre toda la superficie con movimientos circulares. Se dejó solidificar el agar por completo a temperatura ambiente y se lleva a incubación a 37°C por 24 horas.

Se realizó el conteo de placa de lisis, contando los puntos claros en donde no existió crecimiento bacteriano después de 24 horas. Se contó hasta las 100 placas de lisis, un número mayor a ese valor. Se consideró incontable. Las diluciones empleadas fueron desde 10^{-3} hasta 10^{-5} .

El título viral se calculó con la siguiente fórmula

$$\frac{UFP}{mL} = \frac{\text{Número de placas}}{d \times v}$$

Donde

d: Dilución

v: volumen de fago diluido añadido a la caja.

Capítulo IV. Resultados

Aislamiento de *Staphylococcus aureus*

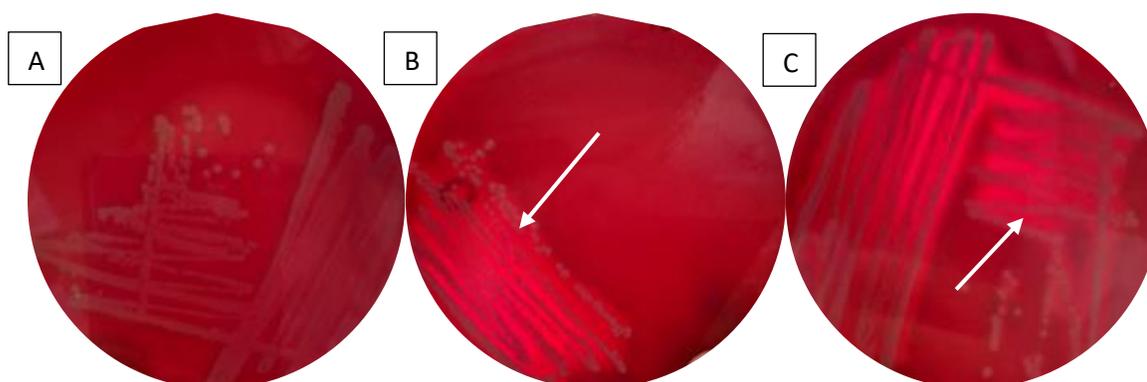
Aislamiento de *Staphylococcus aureus* mediante pruebas dependiente de cultivo

Las muestras fueron sembradas en Agar sangre. Se aisló colonias bacterianas con presencia de beta hemolisis como se muestra en la

Figura 6..

Figura 6

Crecimiento de aislado de mucosa en Agar sangre.

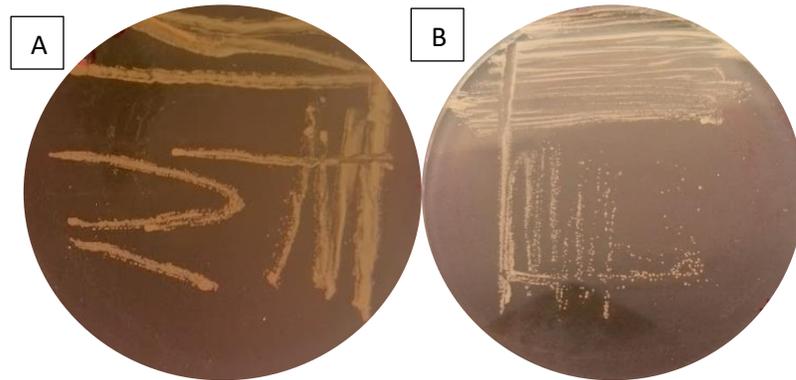


Nota. Visualización de beta hemolisis en agar sangre de las muestras de narinas del individuo 1 (A), 2 (B) y 3 (C).

Las muestras que presentaron una beta hemolisis Figura 4 (B y C) fueron sembradas en manitol salado, esto debido a que *Staphylococcus aureus* es capaz de crecer en medios con alta concentración de sal, además del cambio de coloración rosado a amarillo del medio debido al cambio de pH por la producción de ácido como se muestra en la Nota. Visualización de las colonias aisladas en agar manitol salado (A) y (B).

Figura 7

Crecimiento de bacteria aislada en Agar manitol salado.



Nota. Visualización de las colonias aisladas en agar manitol salado (A) y (B)

Identificación bioquímica de *Staphylococcus aureus*

Se observó un crecimiento bacteriano óptimo a las 24 horas de incubación a 37° del cultivo puro aislado. Las características morfológicas y bioquímicas obtenidas se observan en la Tabla 6.

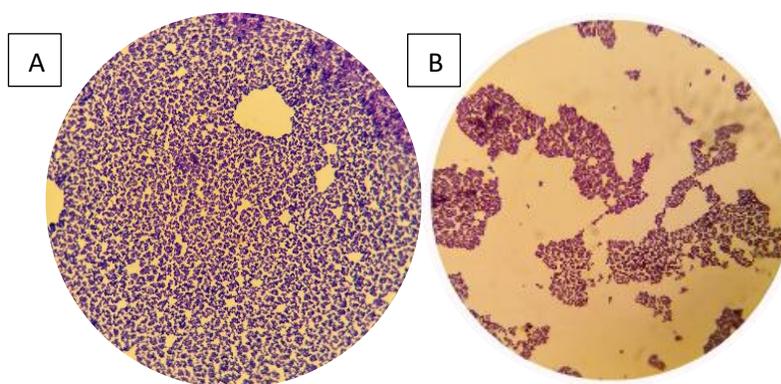
Tabla 6

Características fenotípicas y bioquímicas para la bacteria del individuo 2 y 3 aislada a partir de muestras biológicas.

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	+	+

Figura 8

Tinción Gram del aislamiento de bacteria



Nota. Tinción Gram de los cultivos puros del #2 (A) y #3 (B).

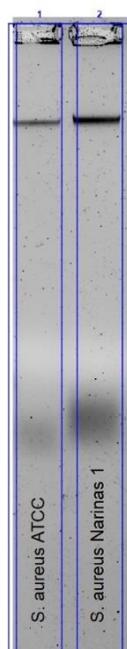
Identificación molecular de *Staphylococcus aureus*

Extracción y cuantificación de ADN genómico bacteriano

Se obtuvieron 2 diferentes muestras de ADN con las que se trabajó, la primera es de una cepa ATCC de *Staphylococcus aureus* y la segunda de la bacteria aislada de las muestras. Los resultados de la cuantificación de la cantidad de DNA y su pureza se detallan en la tabla 7 y su integridad e la **Figura 9**.

Figura 9

Integridad de ADN de Staphylococcus aureus



Nota. Gel de agarosa al 1.5%. Muestras: *S.aureus* ATCC y *S.aureus* aislado

Tabla 7

Cuantificación de la concentración del ADN genómico y su pureza de Staphylococcus aureus

Muestra	Concentración ácido nucleico (ng/μL)	260/280	260/230
S. aureus ATCC	130.4	2.22	2.45
S. aureus narinas	127.1	2.17	2.43

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

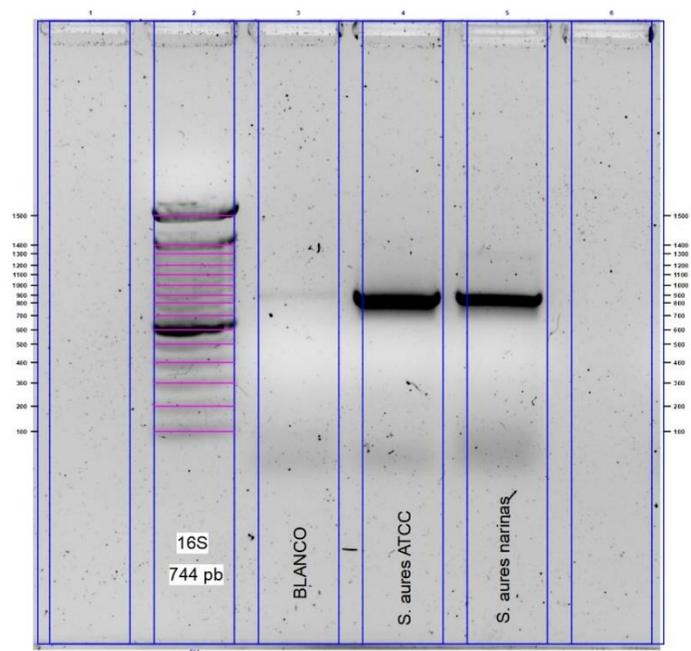
Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) para el fragmento 16S rRNA.

Los productos de PCR obtenidos de la amplificación de las muestras fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% para el fragmento 16S rRNA. La presencia de bandas del tamaño de 744 pb confirmar el género *Staphylococcus* como se observa en la

Figura 10. Este fragmento se encuentra en todas las bacterias debido a su papel fundamental en la formación de ribosomas. Las partes que no son conservadas de este fragmento son útiles para la identificación, comparación y clasificación filogenética de las bacterias (Santos et al., 2019).

Figura 10

Amplificación del fragmento 16S



Nota. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos amplificados por PCR de la región conservada de la secuencia 16S rRNA para el género *Staphylococcus* con el par de

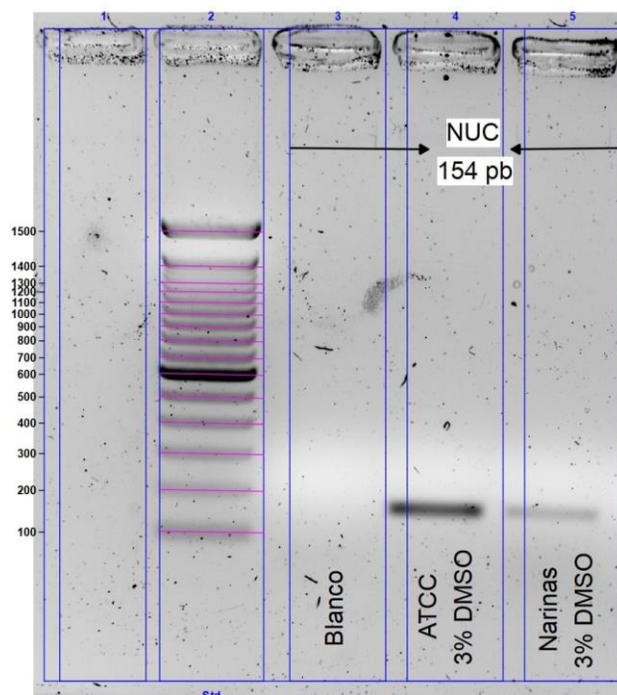
primers 16Sf/16Sr. Muestras: ADN bacteriano de *Staphylococcus aureus* ATCC y *Staphylococcus aureus* de las muestras.

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) para el gen NUC

Los productos de PCR obtenidos de la amplificación de las muestras fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% para el fragmento del gen NUC. La presencia de bandas del tamaño de 154 pb confirmar la especie *Staphylococcus aureus* como se observa en la Figura 11. El gen nuc es el responsable de la producción de la termonucleasa presentes en *S.aureus*, el cual está presente en la mayoría de las cepas existentes de esta bacteria, siendo este fragmento un marcador molecular específico para su identificación.

Figura 11

Amplificación del gen NUC



Nota. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos amplificados por PCR del gen NUC para la especie *Staphylococcus aureus* con el par de primers NUCf/NUCr. Muestras: ADN bacteriano de *Staphylococcus aureus* ATCC y *Staphylococcus aureus* de muestras.

Aislamiento de Bacteriófagos

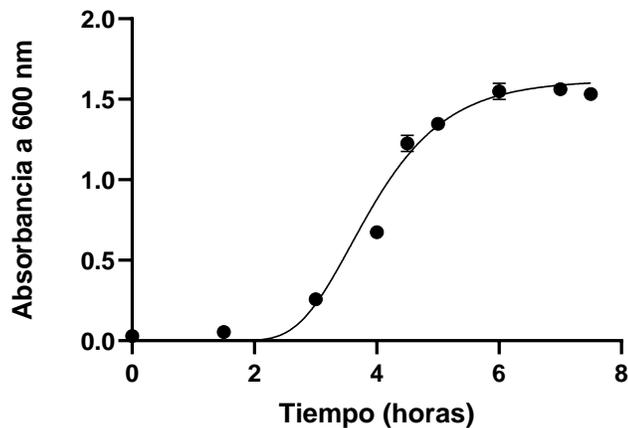
Curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus*

Se partió de un OD inicial de 0.03 a 600nm, se obtuvo una curva de crecimiento hasta las 7.5 horas de incubación a 37°C y 150rpm de agitación. *Staphylococcus aureus* aislada tiene una fase de latencia hasta aproximadamente 2 horas de incubación, a partir de este tiempo se presenta un crecimiento exponencial hasta aproximadamente 5 horas tal y como se observa en la Figura 12.

Figura 12

Curva de crecimiento para *Staphylococcus aureus* aislada de narinas a 37°C y 150rpm.

Absorbancia a 600nm vs Tiempo.



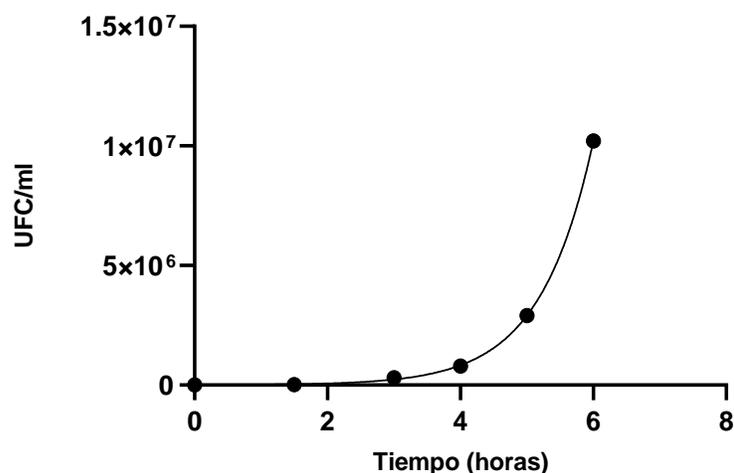
Nota. Realizado en *GraphPad* con un ajuste Gompertz growth.

La curva de crecimiento fue realizada con el programa estadístico GraphPad Prism. El ajuste de los datos fue realizado con una regresión no lineal (Gompertz growth) obteniendo un R^2 de 0.9890. La curva fue realizada con tres repeticiones.

La realización de la curva de crecimiento en base a las unidades formadoras de colonia UFC/mL se lo realizó durante 6 horas, en las cuales se puede observar una fase de latencia hasta las 3 horas aproximadamente y hasta la hora 6 se puede ver una fase exponencial como se observa en la Figura 13.

Figura 13

Curva de crecimiento para *Staphylococcus aureus* aislada de narinas a 37°C y 150rpm. UFC/ml vs Tiempo.



Nota. Realizado en *GraphPad* con un ajuste Logistic growth.

La curva de crecimiento fue realizada con el programa estadístico GraphPad Prism. El ajuste de los datos fue realizado con una regresión no lineal (Logistic growth) obteniendo un R^2 de 0.9999.

Aislamiento de bacteriófagos

El aislamiento de bacteriófagos se realizó con cultivos bacterianos de 3 horas de incubación, tiempo en el que la bacteria se encontraban en fase exponencial.

Pasadas las 24 horas de incubación del filtrado del fago con la bacteria, los valores de absorbancia disminuyeron en 0.10 a partir del tercer enriquecimiento hasta un 0.43 en el sexto enriquecimiento en comparación con el control sin fago en muestras de agua como se observa en la Tabla 8 y en la Figura 14.

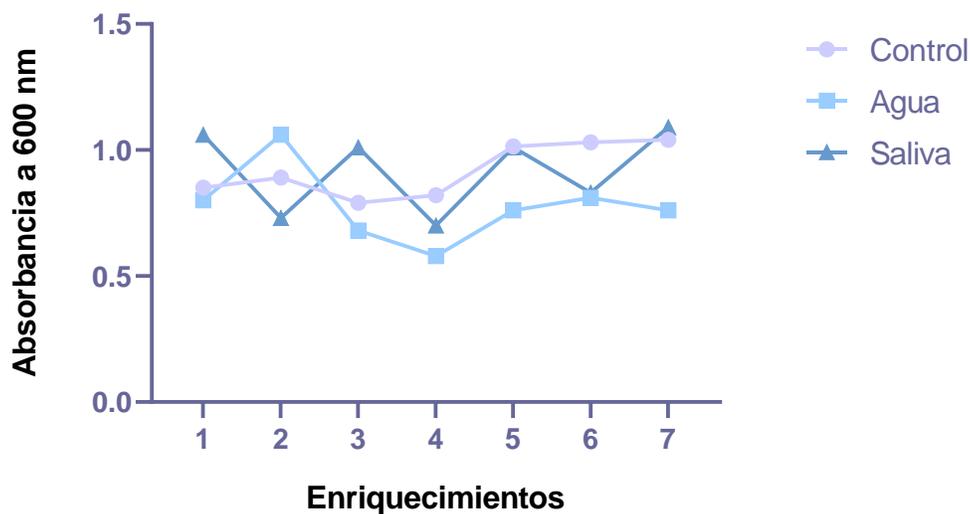
Tabla 8

Valores de absorbancia a 600nm del crecimiento bacteriano tras cada enriquecimiento (E) para *Staphylococcus aureus* de los diferentes tipos de muestras.

E	Tipo de muestra	MUESTRA	A (3 horas incubación)	A (24 horas de incubación)	Diferencia
1	Agua	Control	0,01	0,84	0,83
		Fago	0,02	0,82	0,80
	Mucosa	Control	0,01	0,94	0,93
		Fago	0,01	1,07	1,06
2	Agua	Control	0,04	0,87	0,83
		Fago	0,03	1,09	1,06
	Mucosa	Control	0,04	0,85	0,81
		Fago	0,02	0,77	0,73
3	Agua	Control	0,01	0,78	0,77
		Fago	0,01	0,68	0,68
	Mucosa	Control	0,01	0,78	0,77
		Fago	0,02	1,03	1,01
4	Agua	Control	0,01	1,02	1,01
		Fago	0,02	0,60	0,58
	Mucosa	Control	0,01	0,63	0,62
		Fago	0,01	0,71	0,70
5	Agua	Control	0,05	0,84	0,79
		Fago	0,05	0,81	0,76
	Mucosa	Control	0,06	1,30	1,24
		Fago	0,04	1,06	1,01
6	Agua	Control	0,01	1,25	1,24
		Fago	0,01	0,82	0,81
	Mucosa	Control	0,02	0,84	0,82
		Fago	0,02	0,85	0,83
7	Agua	Control	0,01	1,05	1,04
		Fago	0,01	0,77	0,76
	Mucosa	Control	0,02	1,06	1,04
		Fago	0,001	1,09	1,09

Figura 14

Enriquecimientos de fagos líticos aislados de muestras de agua y saliva contra *Staphylococcus aureus*.



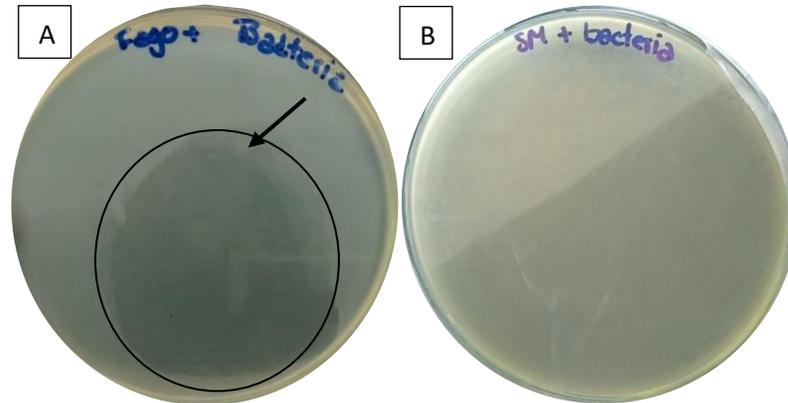
Nota. Realizado en *GraphPad*

Los bacteriófagos líticos aislados de la muestra de agua presentan una disminución del crecimiento bacteriano en contraste con el control ($p=0.0764$) con un nivel de significancia del 0.1. Mientras que los fagos aislados de mucosas no presentan diferencias significativas ($p=0.9923$).

Una vez concluido con los enriquecimientos la presencia de bacteriófagos líticos fue confirmada con la formación de halos de lisis mediante la prueba de spot test como se observa en la Figura 15A.

Figura 15.

Ensayo Spot Test



Nota. Presencia de bacteriófagos contra *Staphylococcus aureus* (A) y control (B).

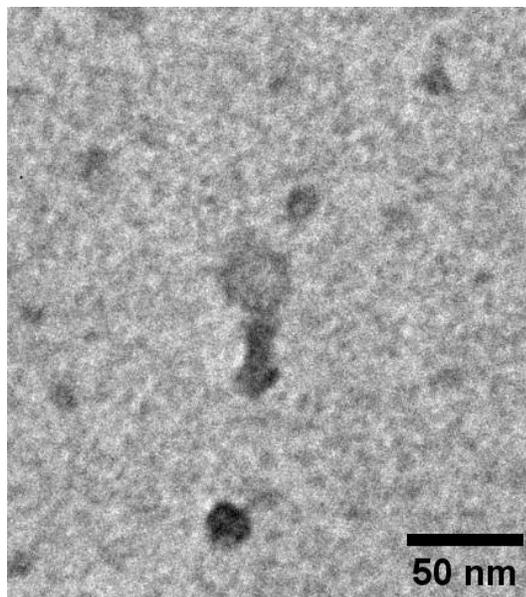
Caracterización de bacteriófagos líticos contra *Staphylococcus aureus*

Identificación de bacteriófagos líticos por microscopía electrónica

En la muestra de bacteriófagos líticos analizados por microscopía electrónica (TEM), se logró visualizar la presencia de fagos, cuya morfología consta de una cabeza icosaédrica, cola y placa basal como se observa en la Figura 16.

Figura 16

Micrografías de microscopía electrónica de transmisión de bacteriófagos líticos



Nota. Bacteriófagos líticos contra *Staphylococcus aureus*, encontrados en muestras de agua residual.

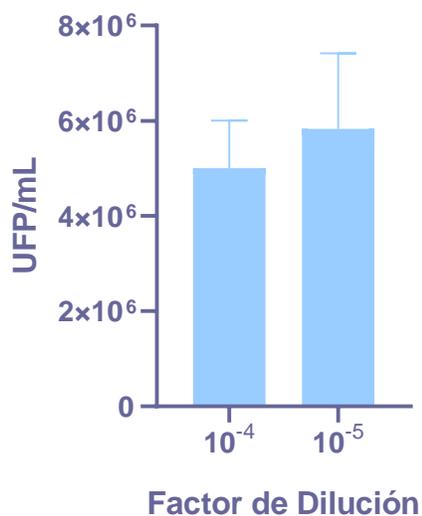
Determinación del título viral**Tabla 9**

Valores obtenidos en la determinación viral de los bacteriófagos contra S. aureus.

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

Figura 17

Determinación del título viral en las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} .

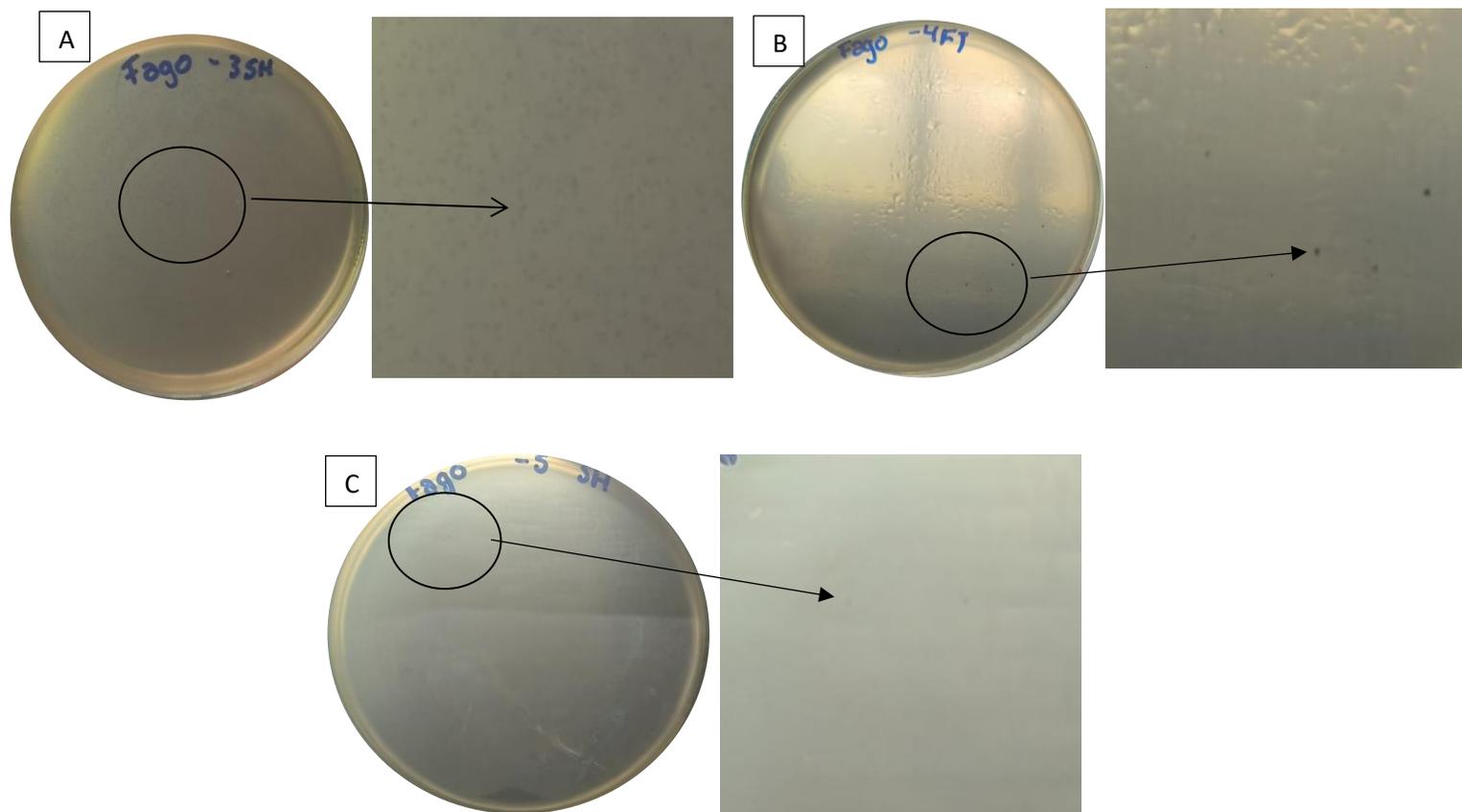


Nota. Realizado en GraphPad

El coeficiente de variación del título viral fue de 20% para la dilución 10^{-4} y 27.12% para la dilución 10^{-5} . Al ser ambos coeficientes de variación menores al 30% significa que la distribución de los datos es homogénea y que la media obtenida es representativa del conjunto de datos.

Figura 18.

Determinación del título viral.



Nota. (A) Dilución 10-3, número de placas incontable. (B) Dilución 10-4, número de placas contable, (C) Dilución 10-5 poco número de placas.

Capítulo VI. Discusión

La infección por *Staphylococcus aureus* de fosas nasales anteriores en personas sanas es del 20 al 30% (Askarian et al., 2014). El aislamiento de esta bacteria se lo suele realizar haciendo uso de diferentes medios de cultivo selectivos y diferenciales; es por ello que uno de los medios utilizados durante esta experimentación fue el Agar sangre. Esto debido a que *S. aureus* posee un factor de virulencia llamado hemolisina, la cual capaz de lisar los eritrocitos de la sangre produciendo anillos hemolíticos (H. Zhang et al., 2016). Las colonias de *Staphylococcus aureus* que presentan una β hemólisis suelen estar rodeadas de una zona clara alrededor y debajo de ellas (Min et al., 2021), como se pueden observar en la

Figura 6.

Las colonias bacterianas que presentaron una β hemólisis fueron cultivadas en Agar manitol salado, presentando una coloración amarilla en el medio (

Figura 7). El medio agar manitol salado posee inhibidores que permiten el crecimiento diferencial de las especies de *Staphylococcus* (Pasachova et al., 2019), en el cual las colonias de estafilococos coagulasa positivos como *S. aureus* presenta una coloración amarilla, mientras que los estafilococos que son coagulasa negativa mantendrán el color rojo, propio del medio (Sharp & Searcy, 2006). Uno de estos inhibidores de crecimiento es la concentración del 7,5% de NaCl, esto debido a que *Staphylococcus aureus* es capaz de sobrevivir en medios con alto contenido salino. Esta tolerancia a la sal es debido a la actividad de los antiportadores presentes en la membrana plasmática, los cuales tienen la capacidad de eliminar cationes tóxicos del citoplasma permitiendo así que esta bacteria sobreviva en este tipo de condiciones (Vaish et al., 2018). El manitol es la principal fuente de azúcar del agar manitol salado y es el

componente diferencial del mismo. *Staphylococcus aureus* es conocido por fermentar el manitol, lo cual da como subproducto ácido que hace que el indicador rojo de metilo presente en el medio se vuelva amarillo (Bonnet et al., 2019).

Las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de *Staphylococcus aureus* incluyen catalasa positiva para todas las especies patógenas de *Staphylococcus* y coagulasa positiva para la distinción de *Staphylococcus aureus* de otras especies de estafilococos (Taylor & Unakal, 2022). *S. aureus* es una de las bacterias grampositivas más virulentas, esto debido a la producción de una gran cantidad de toxinas y enzimas, entre las cuales se encuentra la catalasa (Hiba, 2014). La catalasa es una enzima antioxidante que permite la degradación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno lo cual le permite protegerse del peróxido de hidrogeno que es producido por el sistema inmunológico del huésped (Iwase et al., 2013). La prueba de coagulasa se utiliza para diferenciar entre *S. aureus* y otros estafilococos como *S. epidermidis*. En una infección, la coagulasa activa la protrombina, un elemento crucial en la coagulación de la sangre, lo que conduce a la generación de fibrina a partir del fibrinógeno (Cheng et al., 2010). Las colonias aisladas en el medio manitol salado de la presente investigación fueron sometidas a pruebas de catalasa y coagulasa, las cuales resultaron ser positivas para ambas pruebas como se muestran en la Tabla 6.

La identificación molecular de *Staphylococcus aureus* en la presente investigación se realizó mediante la amplificación del fragmento 16S y del gen *nucA*.

La identificación del fragmento del gen 16S del ARN ribosomal permite el reconocimiento distintas cepas de bacterias, incluso de los que son difíciles de cultivar en laboratorio (Woo et al., 2008). El gen 16S rRNA está presente en todas las bacterias, debido a que forma parte del ensamblaje del ribosoma. A pesar de ser un gen altamente conservado también posee regiones variables, las cuales sirven para diferenciar entre especies (Janda & Abbott, 2007). En esta investigación, el producto de la PCR del gen 16S rRNA apareció como

una banda única de ADN con un tamaño de fragmento de 744pb tanto para la cepa ATCC de la bacteria, como el aislado de narinas (

Figura 10).

El gen *nuc* es altamente específico para la detección de *S. aureus*. En el estudio realizado por (Brakstad et al., 1992) el producto de PCR del gen *nuc* identificó 90 de 90 cepas de *S. aureus* aislados de muestras clínicas mientras que no hubo la amplificación de 80 cepas de 16 especies diferentes de estafilococos. Esto debido a que las cepas de *S.aureus* son capaces de producir una termonucleasa extracelular de manera similar a las cepas que producen coagulasa. El gen *nucA*, responsable de la síntesis de la enzima termonucleasa, se encuentra presente en la mayoría de las variantes de *S. aureus* y se emplea como indicador para la identificación de esta especie mediante diagnóstico (Hamdan et al., 2015). En la presente investigación, el producto obtenido de la PCR para el gen *nuc* de 154pb apareció como una sola banda de ADN tanto para *S. aureus* aislado de narinas como de la cepa ATCC (Figura 11).

Los fagos líticos se encuentran en cualquier ambiente en el que habite su hospedero. Sin embargo estos son extremadamente abundantes en ambientes acuáticos, especialmente en aguas residuales sin tratar, esto debido a que la cantidad de bacteriófagos es tan abundante

como el de las bacterias o incluso más (Ballesté et al., 2022). El número elevado de fagos encontrados en aguas dulces ha sido relacionado con el 0,1 al 9% de la mortalidad bacteriana en medios acuáticos (Khan et al., 2002). En la presente investigación se logró el aislamiento de fagos líticos contra *S. aureus* de muestras de agua dulce.

Los bacteriófagos generalmente tienen una longitud de 20 a 200nm (Doss et al., 2017). Los fagos conocidos de *S. aureus* se caracterizan por pertenecer al orden de los Caudovirales. Es decir que poseen una cápside icosaédrica llena de ADN bicatenario y una cola. Según la morfología de la cola, estos se pueden dividir en 3 familias principales: Podoviridae (cola corta), Siphoviridae (cola larga no contractil) y Myoviridae (Cola larga, contractil y de doble vaina) (Xia & Wolz, 2014). Los fagos aislados de aguas residuales de la presente investigación pertenecen al orden Caudovirales, esto debido a la morfología visualizada en la Figura 16.

Las placas de lisis observadas durante la determinación del título viral en la Figura 18 tenían un diámetro de 1mm aproximadamente. Similar a las placas de lisis visualizadas en el estudio realizado por Hsieh et al., (2011), en el cual se aislaron bacteriófagos contra *S. aureus* miembros de la familia Myoviridae que formaban placas de lisis de 1 a 2mm de diámetro.

Capítulo VII. Conclusiones

El análisis bioquímico y molecular de la bacteria aislada de narinas coincidió con *Staphylococcus aureus*, siendo este uno de los principales microorganismos que colonizan las fosas nasales.

Staphylococcus aureus presenta un crecimiento exponencial desde las 3 horas de incubación hasta las 6 horas a 37°C a 150rpm.

El coctel de bacteriófagos líticos aislados de aguas residuales mostro controlar y detener la proliferación de *Staphylococcus aureus* en relación al control en medio líquido con una probabilidad de 0.0764 a un nivel de significancia del 0.1. Además de un control en medio sólido.

Se obtuvo un coctel de bacteriófago lítico con un título viral de $5,4 \times 10^6$ UFP/mL, con placas de diámetro de menos de 1mm con propiedades antibacterianas.

El análisis de microscopía electrónica mostró que los fagos aislados contra *Staphylococcus aureus* de muestras de aguas residuales pertenecen al orden Caudovirales, a la familia Myoviridae debido a la cabeza icosaédrica, cola contráctil y placa basal.

Capítulo VIII. Recomendaciones

Es importante trabajar en condiciones de oscuridad, esto debido a que su supervivencia aumenta cuando se encuentran en condiciones de temperatura baja y oscuridad.

Los bacteriófagos líticos se deben de almacenar a 4°C y en condiciones de oscuridad en caso de ser utilizados en corto plazo. Para la creación de un banco de fagos es necesario optimizar los métodos de almacenamiento para lograr una mayor supervivencia.

Se recomienda la caracterización molecular de los bacteriófagos para su posterior uso como producto biotecnológico.

Los fagos líticos aislados contra *S.aureus* se deben de probar contra otras bacterias patógenos para analizar su rango de hospederos y determinar su potencial alcance como controlador biológico.

Capítulo IX. Bibliografía

- Ackermann, H.-W. (2008). History of Virology: Bacteriophages. En B. W. J. Mahy & M. H. V. Van Regenmortel (Eds.), *Encyclopedia of Virology (Third Edition)* (pp. 442-450). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00590-2>
- Ackermann, H.-W. (2009). Phage Classification and Characterization. En M. R. J. Clokie & A. M. Kropinski (Eds.), *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions* (pp. 127-140). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_13
- Alexyuk, P., Bogoyavlenskiy, A., Alexyuk, M., Akanova, K., Moldakhanov, Y., & Berezin, V. (2022). Isolation and Characterization of Lytic Bacteriophages Active against Clinical Strains of *E. coli* and Development of a Phage Antimicrobial Cocktail. *Viruses*, *14*(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/v14112381>
- Alomari, M. M. M., Dec, M., & Urban-Chmiel, R. (2021). Bacteriophages as an Alternative Method for Control of Zoonotic and Foodborne Pathogens. *Viruses*, *13*(12), 2348. <https://doi.org/10.3390/v13122348>

- Askarian, F., Sangvik, M., Hanssen, A.-M., Snipen, L., Sollid, J. U. E., & Johannessen, M. (2014). Staphylococcus aureus nasal isolates from healthy individuals cause highly variable host cell responses in vitro: The Tromsø Staph and Skin Study. *Pathogens and Disease*, *70*(2), 158-166. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12099>
- Ballesté, E., Blanch, A. R., Muniesa, M., García-Aljaro, C., Rodríguez-Rubio, L., Martín-Díaz, J., Pascual-Benito, M., & Jofre, J. (2022). Bacteriophages in sewage: Abundance, roles, and applications. *FEMS Microbes*, *3*, xtac009. <https://doi.org/10.1093/femsmc/xtac009>
- Baroja, I., Guerra, S., Coral-Almeida, M., Ruíz, A., Galarza, J. M., de Waard, J. H., & Bastidas-Caldes, C. (2021). Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Nasal Colonization Among Health Care Workers of a Tertiary Hospital in Ecuador and Associated Risk Factors. *Infection and Drug Resistance*, *14*, 3433-3440. <https://doi.org/10.2147/IDR.S326148>
- Becker, K., Schaumburg, F., Fegeler, C., Friedrich, A. W., Köck, R., & Prevalence of Multiresistant Microorganisms PMM Study. (2017). Staphylococcus aureus from the German general population is highly diverse. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, *307*(1), 21-27. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.11.007>
- Boadi, D., Benchaar, C., Chiquette, J., & Massé, D. (2004). Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. *Canadian Journal of Animal Science*, *84*(3), 319-335. <https://doi.org/10.4141/A03-109>
- Bonnet, M., Lagier, J. C., Raoult, D., & Khelaifia, S. (2019). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: The evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes and New Infections*, *34*, 100622. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100622>
- Brakstad, O. G., Aasbakk, K., & Maeland, J. A. (1992). Detection of Staphylococcus aureus by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *Journal of Clinical Microbiology*, *30*(7), 1654-1660.

- Chambers, H. F., & DeLeo, F. R. (2009). Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the Antibiotic Era. *Nature reviews. Microbiology*, 7(9), 629-641.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2200>
- Chanishvili, N. (2012). Chapter 1—Phage Therapy—History from Twort and d'Herelle Through Soviet Experience to Current Approaches. En M. Łobocka & W. Szybalski (Eds.), *Advances in Virus Research* (Vol. 83, pp. 3-40). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3>
- Chen, H., Zhang, J., He, Y., Lv, Z., Liang, Z., Chen, J., Li, P., Liu, J., Yang, H., Tao, A., & Liu, X. (2022). Exploring the Role of *Staphylococcus aureus* in Inflammatory Diseases. *Toxins*, 14(7), 464. <https://doi.org/10.3390/toxins14070464>
- Cheng, A. G., McAdow, M., Kim, H. K., Bae, T., Missiakas, D. M., & Schneewind, O. (2010). Contribution of Coagulases towards *Staphylococcus aureus* Disease and Protective Immunity. *PLoS Pathogens*, 6(8), e1001036.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001036>
- Cheung, G. Y. C., Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12(1), 547-569. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>
- Chhibber, S., Kaur, T., & Sandeep Kaur. (2013). Co-Therapy Using Lytic Bacteriophage and Linezolid: Effective Treatment in Eliminating Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Diabetic Foot Infections. *PLoS ONE*, 8(2), e56022.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056022>
- Deyno, S., Toma, A., Worku, M., & Bekele, M. (2017). Antimicrobial resistance profile of *staphylococcus aureus* isolates isolated from ear discharges of patients at University of Hawassa comprehensive specialized hospital. *BMC Pharmacology & Toxicology*, 18, 35.
<https://doi.org/10.1186/s40360-017-0141-x>

- Doss, J., Culbertson, K., Hahn, D., Camacho, J., & Barekzi, N. (2017). A Review of Phage Therapy against Bacterial Pathogens of Aquatic and Terrestrial Organisms. *Viruses*, 9(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/v9030050>
- Endersen, L., & Coffey, A. (2020). The use of bacteriophages for food safety. *Current Opinion in Food Science*, 36, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.006>
- Enkelmann, J., Stark, K., & Faber, M. (2020). Epidemiological trends of notified human brucellosis in Germany, 2006–2018. *International Journal of Infectious Diseases*, 93, 353-358.
- Fessler, A. T., Li, J., Kadlec, K., Wang, Y., & Schwarz, S. (2018). Chapter 4—Antimicrobial Resistance Properties of *Staphylococcus aureus*. En A. Fetsch (Ed.), *Staphylococcus aureus* (pp. 57-85). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809671-0.00004-8>
- Furfaro, L. L., Payne, M. S., & Chang, B. J. (2018). Bacteriophage Therapy: Clinical Trials and Regulatory Hurdles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 376. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00376>
- Gan, T., Shu, G., Fu, H., Yan, Q., Zhang, W., Tang, H., Yin, L., Zhao, L., & Lin, J. (2021). Antimicrobial resistance and genotyping of *Staphylococcus aureus* obtained from food animals in Sichuan Province, China. *BMC Veterinary Research*, 17(1), 177. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02884-z>
- García, J. C., Huelgas, D., Jiménez, J. S., Rebolla, X., Hernández, M., Fernández, A. M., Husain, F. M., Alenazy, R., Alqasmi, M., Albalawi, T., Alam, P., & García, R. (2023). Myriad applications of bacteriophages beyond phage therapy. *PeerJ*, 11, e15272. <https://doi.org/10.7717/peerj.15272>
- GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators. (2022). Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease

- Study 2019. *Lancet (London, England)*, 400(10369), 2221-2248.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)02185-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)02185-7)
- Gorwitz, R. J., Kruszon-Moran, D., McAllister, S. K., McQuillan, G., McDougal, L. K., Fosheim, G. E., Jensen, B. J., Killgore, G., Tenover, F. C., & Kuehnert, M. J. (2008). Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001-2004. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(9), 1226-1234.
<https://doi.org/10.1086/533494>
- Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., & Wang, Y. (2020). Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.00107>
- Gutiérrez, B., & Domingo, P. (2020). Phage Therapy in Gastrointestinal Diseases. *Microorganisms*, 8(9), 1420. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091420>
- Hamdan, A., González, S., & Bustos, J. (2015). Identificación de *Staphylococcus aureus* utilizando como marcadores los genes *nucA* y *femB*. *Ciencias Clínicas*, 16(2), 37-41.
<https://doi.org/10.1016/j.cc.2016.02.002>
- Haq, I. U., Chaudhry, W. N., Akhtar, M. N., Andleeb, S., & Qadri, I. (2012). Bacteriophages and their implications on future biotechnology: A review. *Virology Journal*, 9(1), 9.
<https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-9>
- Harada, L. K., Silva, E. C., Campos, W. F., Del Fiol, F. S., Vila, M., Dąbrowska, K., Krylov, V. N., & Balcão, V. M. (2018). Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiological Research*, 212-213, 38-58.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.007>
- Hiba, M. (2014). *Staphylococcus aureus* Can Produce Catalase Enzyme When Adding to Human WBCs as a Source of H₂O₂ Productions in Human Plasma or Serum in the Laboratory. *Open Journal of Medical Microbiology*, 4(4), Article 4.
<https://doi.org/10.4236/ojmm.2014.44028>

- Howden, B. P., Giulieri, S. G., Wong Fok Lung, T., Baines, S. L., Sharkey, L. K., Lee, J. Y. H., Hachani, A., Monk, I. R., & Stinear, T. P. (2023). Staphylococcus aureus host interactions and adaptation. *Nature Reviews Microbiology*, 21(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00852-y>
- Hsieh, S.-E., Lo, H.-H., Chen, S.-T., Lee, M.-C., & Tseng, Y.-H. (2011). Wide Host Range and Strong Lytic Activity of Staphylococcus aureus Lytic Phage Stau2. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), 756-761. <https://doi.org/10.1128/AEM.01848-10>
- Iwase, T., Tajima, A., Sugimoto, S., Okuda, K., Hironaka, I., Kamata, Y., Takada, K., & Mizunoe, Y. (2013). A Simple Assay for Measuring Catalase Activity: A Visual Approach. *Scientific Reports*, 3, 3081. <https://doi.org/10.1038/srep03081>
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761-2764. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
- Jenul, C., & Horswill, A. R. (2018). Regulation of Staphylococcus aureus virulence. *Microbiology spectrum*, 6(1), 10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018>
- Kasman, L., & Porter, L. D. (2022). Bacteriophages. *StatPearls*. <https://www.statpearls.com/point-of-care/18104>
- Katz, D. S. (2010). Coagulase test protocol. *American Society for Microbiology Laboratory Protocols*. Available online: <https://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol,3220>.
- Khan, M. A., Satoh, H., Katayama, H., Kurisu, F., & Mino, T. (2002). Bacteriophages isolated from activated sludge processes and their polyvalency. *Water Research*, 36(13), 3364-3370. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00029-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00029-5)
- Kollef, M. H., Zilberberg, M. D., Shorr, A. F., Vo, L., Schein, J., Micek, S. T., & Kim, M. (2011). Epidemiology, microbiology and outcomes of healthcare-associated and community-

- acquired bacteremia: A multicenter cohort study. *The Journal of Infection*, 62(2), 130-135. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.12.009>
- Ladhani, S., & Garbush, M. (2005). Staphylococcal Skin Infections in Children. *Pediatric Drugs*, 7(2), 77-102. <https://doi.org/10.2165/00148581-200507020-00002>
- Lakhundi, S., & Zhang, K. (2018). Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), e00020-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18>
- Lee, A. S., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., & Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>
- Licitra, G. (2013). Etymologia: Staphylococcus. *Emerging Infectious Diseases*, 19(9), 1553. <https://doi.org/10.3201/eid1909.ET1909>
- Lin, D. M., Koskella, B., & Lin, H. C. (2017). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 8(3), 162-173. <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v8.i3.162>
- Linz, M. S., Mattappallil, A., Finkel, D., & Parker, D. (2023). Clinical Impact of Staphylococcus aureus Skin and Soft Tissue Infections. *Antibiotics*, 12(3), 557. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030557>
- Mäntynen, S., Laanto, E., Oksanen, H. M., Poranen, M. M., & Díaz-Muñoz, S. L. (2021). Black box of phage–bacterium interactions: Exploring alternative phage infection strategies. *Open Biology*, 11(9), 210188. <https://doi.org/10.1098/rsob.210188>
- Min, C., Wang, H., Xia, F., Tang, M., Li, J., Hu, Y., Dou, Q., & Zou, M. (2021). Characteristics of Staphylococcus aureus small colony variants isolated from wound specimen of a tertiary care hospital in China. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(1), e24121. <https://doi.org/10.1002/jcla.24121>

- Missiakas, D. M., & Schneewind, O. (2013). Growth and Laboratory Maintenance of *Staphylococcus aureus*. *Current protocols in microbiology*, CHAPTER 9, Unit-9C.1. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc09c01s28>
- Moineau, S. (2013). Bacteriophage. En S. Maloy & K. Hughes (Eds.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)* (pp. 280-283). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00131-5>
- Naureen, Z., Dautaj, A., Anpilogov, K., Camilleri, G., Dhuli, K., Tanzi, B., Maltese, P. E., Cristofoli, F., De Antoni, L., Beccari, T., Dundar, M., & Bertelli, M. (2020). Bacteriophages presence in nature and their role in the natural selection of bacterial populations. *Acta Bio Medica : Atenei Parmensis*, 91(Suppl 13), e2020024. <https://doi.org/10.23750/abm.v91i13-S.10819>
- Okwu, M. U., Olley, M., Akpoka, A. O., Izevbuwa, O. E., Okwu, M. U., Olley, M., Akpoka, A. O., & Izevbuwa, O. E. (2019). *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y actividades anti-MRSA de extractos de algunas plantas medicinales: Una breve revisión. *AIMS Microbiology*, 5(2), 117-137. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2019.2.117>
- Oliveira, D., Borges, A., & Simões, M. (2018). *Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. *Toxins*, 10(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/toxins10060252>
- Orenstein, A. (2006). *The Discovery and Naming of Staphylococcus aureus*. <https://www.semanticscholar.org/paper/The-Discovery-and-Naming-of-Staphylococcus-aureus-Orenstein/20b774960eff5caa566bf4134cfaee0606670bbf>
- Park, S., & Ronholm, J. (2021). *Staphylococcus aureus* in Agriculture: Lessons in Evolution from a Multispecies Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(2), e00182-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00182-20>
- Pasachova, J., Ramírez, S., & Muñoz, L. (2019). *Staphylococcus aureus*: Generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Nova*, 17(32), 25-38.

- Plumet, L., Ahmad-Mansour, N., Dunyach-Remy, C., Kissa, K., Sotto, A., Lavigne, J.-P., Costechareyre, D., & Molle, V. (2022). Bacteriophage Therapy for Staphylococcus Aureus Infections: A Review of Animal Models, Treatments, and Clinical Trials. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 907314.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.907314>
- Rakhuba, D. V., Kolomiets, E. I., Dey, E. S., & Novik, G. I. (2010). Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish Journal of Microbiology*, 59(3), 145-155.
- Reiner, K. (2010). *Catalase test protocol. American Society for Microbiology. 2010.* American Society for Microbiology. <https://asm.org/getattachment/72a871fc-ba92-4128-a194-6f1bab5c3ab7/Catalase-Test-Protocol.pdf>
- Rifkind, D., & Freeman, G. L. (2005). 15—BACTERIOPHAGE. En D. Rifkind & G. L. Freeman (Eds.), *The Nobel Prize Winning Discoveries in Infectious Diseases* (pp. 103-105). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012369353-2/50022-9>
- Rungelrath, V., & DeLeo, F. R. (2021). Staphylococcus aureus, Antibiotic Resistance, and the Interaction with Human Neutrophils. *Antioxidants & Redox Signaling*, 34(6), 452-470.
<https://doi.org/10.1089/ars.2020.8127>
- Santos, H. R. M., Argolo, C. S., Argôlo-Filho, R. C., & Loguercio, L. L. (2019). A 16S rDNA PCR-based theoretical to actual delta approach on culturable mock communities revealed severe losses of diversity information. *BMC Microbiology*, 19, 74.
<https://doi.org/10.1186/s12866-019-1446-2>
- Shangari, N., & O'Brien, P. J. (2006). Catalase Activity Assays. *Current Protocols in Toxicology*, 27(1), 7.7.1-7.7.16. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0707s27>
- Sharp, S. E., & Searcy, C. (2006). Comparison of Mannitol Salt Agar and Blood Agar Plates for Identification and Susceptibility Testing of Staphylococcus aureus in Specimens from

- Cystic Fibrosis Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(12), 4545-4546.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01129-06>
- Skinner, D., & Keefer, C. (1941). Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*: A study of one hundred and twenty-two cases and a review of the literature concerned with experimental infection in animals. *Archives of Internal Medicine*, 68(5), 851-875.
<https://doi.org/10.1001/archinte.1941.00200110003001>
- Summers, W. C. (2012). The strange history of phage therapy. *Bacteriophage*, 2(2), 130-133.
<https://doi.org/10.4161/bact.20757>
- Szafrański, S. P., Slots, J., & Stiesch, M. (2021). The human oral phageome. *Periodontology* 2000, 86(1), 79-96. <https://doi.org/10.1111/prd.12363>
- Tamayo, E. A. R., & Quiceno, J. N. J. (2015). Factores relacionados con la colonización por *Staphylococcus aureus*. *Iatreia*, 28(1), 66-77.
- Taylor, T. A., & Unakal, C. G. (2022). *Staphylococcus aureus* Infection. En *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>
- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603-661.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>
- Tripathi, N., & Sapra, A. (2022). Gram Staining. En *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/>
- Vaish, M., Price-Whelan, A., Reyes-Robles, T., Liu, J., Jereen, A., Christie, S., Alonzo, F., Benson, M. A., Torres, V. J., & Krulwich, T. A. (2018). Roles of *Staphylococcus aureus* Mnh1 and Mnh2 Antiporters in Salt Tolerance, Alkali Tolerance, and Pathogenesis. *Journal of Bacteriology*, 200(5), 10.1128/jb.00611-17. <https://doi.org/10.1128/jb.00611-17>

- Ventola, C. L. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277-283.
- Vestergaard, M., Frees, D., & Ingmer, H. (2019). Antibiotic Resistance and the MRSA Problem. *Microbiology Spectrum*, 7(2), 10.1128/microbiolspec.gpp3-0057-2018.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0057-2018>
- Wertheim, H. F. L., Melles, D. C., Vos, M. C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H. A., & Nouwen, J. L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet. Infectious Diseases*, 5(12), 751-762.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70295-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70295-4)
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Teng, J. L. L., Tse, H., & Yuen, K.-Y. (2008). Then and now: Use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(10), 908-934.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02070.x>
- Xia, G., & Wolz, C. (2014). Phages of *Staphylococcus aureus* and their impact on host evolution. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 593-601.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.04.022>
- Zhang, H., Zheng, Y., Gao, H., Xu, P., Wang, M., Li, A., Miao, M., Xie, X., Deng, Y., Zhou, H., & Du, H. (2016). Identification and Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains with an Incomplete Hemolytic Phenotype. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2016.00146>
- Zhang, M., Zhang, T., Yu, M., Chen, Y.-L., & Jin, M. (2022). The Life Cycle Transitions of Temperate Phages: Regulating Factors and Potential Ecological Implications. *Viruses*, 14(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/v14091904>
- Zhong, J., Wang, H., Zhuang, Y., & Shen, Q. (2021). Identification of the antibacterial mechanism of cryptotanshinone on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using

bioinformatics analysis. *Scientific Reports*, 11(1), Article 1.

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-01121-9>

Zurita, J., Barba, P., Ortega-Paredes, D., Mora, M., & Rivadeneira, S. (2016). Local circulating clones of *Staphylococcus aureus* in Ecuador. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 20(6), 525-533. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.08.006>