



**Universidad de Almería**  
**Facultad de Ciencias Experimentales**

Grado en Biotecnología

Trabajo Fin de Grado

**Caracterización de una colección de  
*Staphylococcus* spp. aislada de muestras  
humanas y búsqueda de microorganismos  
antagonistas frente al patógeno *S. aureus***

Curso académico: 2021-2022

Autora: María Lacambra García.

Director: Juan Antonio López González

Codirectora: María Rosa Martínez Gallardo

Departamento de Biología y Geología. Área de Microbiología

## Índice:

Resumen .....	2
Abstract.....	4
1. Introducción .....	5
1.1 Historia del género <i>Staphylococcus</i> spp .....	5
1.2 Características generales .....	6
1.3 Factores patogénicos.....	7
1.4 Manifestaciones clínicas.....	10
1.5 <i>Staphylococcus</i> y la resistencia a antibióticos.....	14
2. Objetivos .....	18
3. Material y métodos .....	19
3.1. Colección de cepas de <i>Staphylococcus</i> spp.....	20
3.2. Caracterización morfológica y bioquímica.....	20
3.2.1. Prueba de manitol salado .....	21
3.2.2. Prueba de DNasa .....	21
3.2.3. Tinción de Gram .....	22
3.3. Identificación molecular .....	23
3.4. Estudio de antagonismo .....	24
3.5. Análisis de datos y estadístico .....	26
4. Resultados.....	27
4.1. Caracterización morfológica y bioquímica.....	27
4.2. Identificación molecular .....	32
4.3. Estudio de antagonismo .....	34
5. Conclusiones. ....	38
6. Bibliografía. ....	39

## AGRADECIMIENTOS

---

Han pasado cuatro años desde que comencé una nueva aventura, el camino ha sido muy duro, no puedo negarlo, pero puedo decir que mereció la pena embarcarse en ella. Y es que “la vida no consiste en ser perfecto, consiste en cumplir tus sueños”.

En este tiempo tuve el placer de conocer a Joaquín Moreno, responsable del Área de Microbiología hasta su fallecimiento en 2020. Gracias a él pude descubrir que la Inmunología es mi pasión y hacia donde quiero encaminar mi vida, por ello le estoy muy agradecida, ya que pude crear un nuevo sueño que cumplir.

Este trabajo he podido realizarlo gracias a María José López López, responsable actual del grupo de Microbiología, sin ella no podría haber tenido un primer contacto con el laboratorio que se acerca más a la realidad. Además, quiero agradecer a Paqui Suárez Estrella que me ha acompañado durante estos cuatro años a través de diferentes asignaturas del Área. Quiero agradecerle haber sido capaz de despertar en mí una inmensa curiosidad hacia la Microbiología y también su dedicación hacia todos nosotros.

También quiero agradecer a Juan Antonio López González y María Rosa Martínez Gallardo por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo con ellos. En este tiempo he podido contar con vuestra ayuda y apoyo, y sin vosotros no podría haber llevado todo esto para adelante. Por ello muchas gracias, de verdad. Por otro lado, quiero agradecer también a todo el Área de Microbiología por haber estado pendientes de mí, dispuestos a prestarme vuestra ayuda en cualquier momento.

Este Grado Académico me ha permitido conocer a personas con las que he compartido los mejores y los peores momentos, y que han estado ahí para todo. “Mis niñas” y, principalmente Alba, a quien conocí por casualidad pero se convirtió muy rápido en una persona muy especial para mí y que sé, a ciencia cierta, que tendré para siempre. Muchas gracias por haber aparecido en mi vida y haber compartido conmigo esta etapa.

Por último, quiero agradecer a mi familia, las personas que más me han apoyado y que han sido capaces de creer en mí cuando ni yo misma lo hacía. Sobre todo, a mi hermana, quien ha aguantado mis agobios, me ha acompañado en las noches de estudio sin dormir y quien ha fantaseado conmigo con coger la maleta y desaparecer cuando todo perdía el sentido y no encontraba una salida.

Han sido cuatro años llenos de emociones de todo tipo, tanto buenas como malas. Sentimientos encontrados. He pasado por momentos muy duros y por otros muy gratificantes. Me quedo con una frase que leí hace tiempo y con la que me identifico: “Se siente como si estuviera corriendo, sin saber dónde se encuentra el final. Es un ciclo en el que tienes el cuerpo cansado y un corazón vacío. Estas a punto de rendirte, pero eres tú quién decide el final. ¿Cuál es tú decisión?”.

Esta etapa finaliza ahora, poniendo un punto y seguido a mi vida. Empecé esta experiencia con una idea muy diferente de lo que quería que fuera mi futuro, siendo conformista y sin salirme de mi zona de confort, pero en este periodo he ido puliéndome a mí misma y encontrando el camino que quiero seguir a partir de ahora. Empecé algo perdida, pero me he encontrado.

## RESUMEN

---

El género *Staphylococcus* spp. engloba un conjunto de bacterias que forman parte de la microbiota nasal y cutánea del ser humano. Dentro de este género, destaca la especie *S. aureus* por su elevada patogenicidad para el ser humano, causando un importante número de muertes por infecciones a nivel pulmonar, cutáneo, e incluso intestinal, debido a la capacidad productora de enterotoxinas de algunas cepas de dicha especie. Un porcentaje considerable de la población es portadora de este patógeno, el cual permanece en latencia hasta que las condiciones son favorables para su colonización. A este riesgo sanitario se le suma la creciente resistencia a antibióticos desarrollada por algunas cepas de *S. aureus*. Esto supone una gran preocupación sanitaria y surge la urgente necesidad de buscar herramientas alternativas para frenar la infección provocada por las cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos.

Así, el objetivo principal de este trabajo fue la caracterización de una colección de bacterias, pertenecientes al género *Staphylococcus* spp., previamente aislada de estudiantes de la Universidad de Almería, para comprobar la predominancia de *S. aureus* entre la población. Además, también se realizó un estudio de antagonismo, con microorganismos procedentes del compostaje, para comprobar el efecto supresor frente a *S. aureus*. La colección de *Staphylococcus* spp. se sometió a un proceso de caracterización bioquímica y morfológica, y posteriormente, las cepas seleccionadas como posibles *S. aureus* se identificaron molecularmente. Finalmente, las cepas identificadas como *S. aureus* se sometieron a enfrentamientos duales con microorganismos procedentes del proceso de compostaje que previamente habían demostrado potencial antagonista.

Los resultados obtenidos revelaron la predominancia en muestras nasales de *S. aureus* mientras que en muestras de piel destaca la presencia de *S. epidermidis*. Las pruebas bioquímicas (Manitol Salado y DNasa) permiten la identificación de cepas de *S. aureus* con un 87% de fiabilidad. Respecto a los estudios de antagonismo, pudimos demostrar que tres de las cepas seleccionadas de procesos de compostaje son capaces de inhibir considerablemente a *S. aureus*, concretamente *Alcaligenes faecalis* 232, *Bacillus aerophilus* 2303 y 4193, un hongo mesófilo de la colección.

Estos resultados demuestran que el proceso de compostaje supone una fuente de microorganismos con capacidad antagonista que se pueden utilizar en la lucha frente a la resistencia a antibióticos desarrollada por bacterias con carácter patogénico como *S. aureus*.

**Palabras clave:** Antagonismo, antibióticos, estafilococos, patógenos.

## ABSTRACT

---

The genus *Staphylococcus* spp. includes a group of bacteria that are part of the human nasal and cutaneous microbiota. Of this genus, the species *S. aureus* stands out for its high pathogenicity for humans, causing a significant number of deaths from pulmonary, cutaneous and even intestinal infections, due to the enterotoxin-producing capacity of some strains of this species. A considerable percentage of the population is a host of this pathogen, which remains latent until favorable conditions for colonization. This health risk is aggravated by the increase of resistance to antibiotics that some strains of *S. aureus* are developing. This is a major health problem and it is urgent to look for alternative tools to curb the infection caused by antibiotic-resistant strains of *S. aureus*.

Thus, the main objective of this work was the characterization of a collection of bacteria belonging to the genus *Staphylococcus* spp., previously isolated from students of the University of Almería, to verify the predominance of *S. aureus* among the population. In addition, an antagonism study was also carried out, with microorganisms from composting, to check the suppressive effect against *S. aureus*. The *Staphylococcus* spp. collection was subjected to a biochemical and morphological characterization process, and subsequently, the strains selected as possible *S. aureus* were molecularly identified. Finally, the strains identified as *S. aureus* were subjected to a dual confrontation assay with microorganisms from the composting process which had previously demonstrated their antagonistic potential.

The results obtained reveal the predominance of *S. aureus* in nasal samples, while in skin samples the presence of *S. epidermidis* stands out. Biochemical tests (salted mannitol and DNase) allow identification of *S. aureus* strains with 87% reliability. As for the antagonism studies, it has been demonstrated that three of the strains selected in the composting processes are able to significantly inhibit *S. aureus*, namely *Alcaligenes faecalis* 232, *Bacillus aerophilus* 2303 and 4193, a mesophilic fungus from the collection.

These results demonstrate that the composting process is a source of microorganisms with antagonistic capacity that can be used in the fight against antibiotic resistance developed by pathogenic bacteria such as *S. aureus*.

**Key words:** Antagonism, antibiotics, staphylococci, pathogens.

## 1. INTRODUCCIÓN

---

### 1.1 Historia del género *Staphylococcus* spp

El primer registro oficial que se puede encontrar sobre el género *Staphylococcus* spp. data de 1880, cuando Alexander Ogston determinó su presencia en muestras humanas tras llevar a cabo un proceso quirúrgico (Somerville, 2016). Tras esta intervención, se desarrolló una infección bacteriana en el paciente y se descubrió que la cepa responsable fue *Staphylococcus aureus*. Posteriormente, se llevaron a cabo estudios con la cepa previamente aislada mediante su inoculación en cerdos y ratones. Los resultados mostraron que *S. aureus* generaba en los hospedadores diferentes abscesos, lo que hacía sospechar sobre su patogenicidad. Además, este estudio fue realizado de nuevo por Louis Pasteur en diferentes organismos mediante la inoculación de pus procedente de humanos infectados con dicha bacteria, y obtuvo los mismos resultados, confirmando su capacidad patogénica en múltiples especies (Myles, 2012). En años posteriores, varios investigadores caracterizaron esta cepa y determinaron el nombre del género, *Staphylococcus* spp., además de realizar estudios a nivel de especie. Estitt y Cowan (1939) realizaron una prueba de coagulasa a una cepa aislada de un paciente infectado con *Staphylococcus* spp. y el resultado fue diferente al obtenido con *S. aureus* (Cowan, 1954). Esto demostraba que, dentro del género *Staphylococcus* spp., la especie *S. aureus* no era la única patogénica. La nueva especie se designó como *Staphylococcus epidermidis*. Este hecho desencadenó una nueva búsqueda de especies patogénicas pertenecientes al género *Staphylococcus* spp., así como la comprobación de patogenicidad, mediante pruebas serológicas, de las cepas estudiadas hasta el momento.

Para facilitar la caracterización de las bacterias pertenecientes a este género, a partir de 1961 comenzaron a desarrollarse métodos de tipificación por fagos, técnica que permite detectar cepas únicas de bacterias (Blair, 1961). Dicha técnica se llevó a cabo mayoritariamente en infecciones que se desarrollaban en hospitales, permitiendo de esta manera describir las cepas involucradas obteniendo una mayor información. Uno de los principales inconvenientes durante la identificación de *Staphylococcus* spp. fue que los microorganismos pertenecientes a dicho género no podían diferenciarse bien de aquellos incluidos en el género *Micrococcus* spp., puesto que ambos géneros presentan características morfológicas similares y actividades enzimáticas comunes, como la presencia de la enzima catalasa. Por consiguiente, a partir de 1965 se implantó la metodología de Baird-Parker (Viçosa et al., 2010) que permite diferenciar las capacidades metabólicas entre ambos géneros bacterianos. Dicha metodología ponía en relevancia la capacidad de *Staphylococcus* spp. de crecer y producir ácido a partir de glucosa, en condiciones de anaerobiosis, y la ausencia de dicha capacidad de *Micrococcus* spp. (Wu et al., 2000). Finalmente, en el año 1999 se estableció una descripción detallada de la especie *Staphylococcus aureus*: “Es una bacteria gram positiva en forma de cocos, catalasa positivos, con un contenido en C+G del 30-40%, capaces de fermentar y oxidar carbohidratos, coagulasa positivos, nucleasa positivos (pueden degradar el ADN) y tienen actividad hemolítica en agar sangre” (Allaouchiche et al., 1999).

Para poder optimizar la detección y estudio de las diferentes cepas de una manera eficiente, fiable y rápida se buscaron nuevas metodologías que sustituyeran la tipificación de fagos. Comenzaron a utilizarse técnicas de electroforesis, secuenciaciones completas del genoma de bacterias o tipificación multilocus de secuencias, entre otras (Liu, 2009). Esto permitió obtener información epidemiológica a nivel mundial, además de asegurar el control de infecciones evitando brotes o epidemias causadas por patógenos de este género microbiano. Gracias a la información obtenida en relación con el metabolismo o genoma de las bacterias, se desarrollaron nuevas metodologías, como pruebas directas, mediante hemocultivos, pruebas de coagulasa, test de aglutinación en látex, etc. Estas técnicas permitieron mejorar la detección eficaz de *S. aureus*. Sin embargo, estas pruebas determinan la caracterización metabólica de la

bacteria y no su identificación molecular. Por lo tanto, para llevar a cabo la identificación molecular de las bacterias se comenzó a aplicar la técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para amplificar el genoma de dichas bacterias, así como la técnica de secuenciación, para determinar la secuencia genética de dicho genoma (Pareyra Vidoni, 2017). La principal desventaja de estas metodologías es su elevado coste, aunque ofrecen mayor fiabilidad.

En la actualidad, una de las técnicas aplicadas para la detección de *S. aureus* se basa en su resistencia a la metilina (un antibiótico) (Lee et al., 2018). Para ello, se utilizan medios de agar cromogénico que llevan incorporado el antibiótico. Si la cepa es capaz de crecer y, además, en forma de colonias de color azul, se trataría de *S. aureus* resistente a metilina (Turner et al., 2019). Los resultados se pueden obtener en unas 12 horas, que es cuando comienza a aparecer la coloración. Esto permite realizar un diagnóstico en menor tiempo (un cultivo tradicional necesita unas 24 horas mínimo) lo que permite salvar una gran cantidad de vidas ya que el tratamiento se aplicaría en una etapa más temprana de la infección, disminuyendo de esta manera su tasa de mortalidad.

## 1.2 Características generales

Los microorganismos pertenecientes al género *Staphylococcus* spp. son bacterias gram positivas que poseen una estructura esférica, de aproximadamente 0,5-1  $\mu\text{m}$  de diámetro, que se denominan cocos y tienden a agruparse generando una forma de racimos irregulares (Pasachova Garzón et al., 2019). Aunque la agrupación mayoritaria es en forma de racimos, también podríamos observar células individuales, tétradas, cadenas o diferentes configuraciones que principalmente aparecen en cultivos líquidos. La coloración que adquieren las colonias típicas cuando crecen en un medio sólido varía desde un color grisáceo hasta amarillo intenso, aunque también pueden llegar a ser de color blanco como *S. epidermidis* (Somerville, 2016). Su metabolismo es aerobio o anaerobio facultativo, y en función de ello puede generar, como producto final del metabolismo de la glucosa, ácido acético (respiración aerobia) o ácido láctico (fermentación de glucosa) (Llop et al., 2001).

Respecto a las condiciones de cultivo, la temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C, aunque la producción óptima de pigmentos, visibles en las colonias microbianas, ocurre preferentemente a temperatura ambiente. Se trata de microorganismos relativamente termorresistentes, pues son capaces de crecer en un rango de temperatura entre 18 y 50 °C (Llop Hernández, 2001). Además, también se consideran microorganismos halotolerantes, ya que pueden crecer en medios de cultivo con concentraciones de cloruro sódico (NaCl) de hasta un 10%, lo cual se considera una característica que permite su selección (Harris y Richards, 2002). Otras características importantes para el cultivo y estudio de *S. aureus* es la susceptibilidad a algunas sustancias, tales como el hexaclorofenol, capaces de inhibir su crecimiento. Además, las bacterias pertenecientes a dicha especie pueden producir enzimas catalasa y coagulasa, característica que permite distinguirlas de otras especies dentro del mismo género (García et al., 2011). Se considera que las cepas productoras de coagulasa son patógenas, ya que cuando las bacterias penetran en una herida tienden a coagular fibrina donde se encuentra la lesión y en los vasos linfáticos. De esta manera, comienza la necrosis de las células de alrededor de la herida formando un absceso, y la extensión de la infección al resto del organismo a través del sistema sanguíneo y linfático (Hanselman et al., 2009).

Estos microorganismos forman parte de la microbiota del ser humano, destacando su presencia en la piel, como en las axilas o zonas inguinales, y en mucosas epiteliales, como la mucosa nasofaríngea. Estos microorganismos pueden habitar dichos ambientes, sin ocasionar ningún daño al hospedador, pero debido a su patogenicidad supone un riesgo para la salud en caso de

heridas o accidentes (Kwok, 2015). Además, algunas cepas de *S. aureus* son capaces de producir toxinas que causan daño a nivel intestinal, conocidas como enterotoxinas. Por lo tanto, se considera un importante contaminante de alimentos. Se han identificado 40 especies pertenecientes a este género, pero solamente 16 de ellas se han encontrado en la microbiota del ser humano, las cuales son de interés para este trabajo. Dentro de las 16 especies, sólo unas pocas son patógenos humanos, siendo la más representativa *Staphylococcus aureus* (Oliveira et al., 2002). Dicho microorganismo posee unos 20 genes de adherencia, que facilitan la infección, junto con más de 30 genes encargados de sintetizar toxinas responsables de su patogenicidad (Portillo y del Pozo, 2018). Las bacterias representativas de este género consideradas patógenas se pueden identificar mediante una serie de características diferenciales como la hemolización de sangre (presencia de hemolisinas), capacidad de coagular plasma (producción de coagulasa) o producción de enzimas y toxinas extracelulares (Fraunholz y Sinha, 2012).

Otro aspecto importante a tener en cuenta es que las bacterias de este género han sido capaces de adquirir resistencias y tolerancias a muchos agentes antimicrobianos, gracias a varios plásmidos portadores de genes de resistencia a penicilinas, tetraciclinas y otros fármacos (Guo et al., 2020). También pueden adquirir resistencias por la deficiencia de proteínas capaces de establecer la fijación en su pared de determinadas sustancias, como son la nafcilina y oxacilina. Por consiguiente, aunque dichos antibióticos se encuentren presentes no van a ocasionar ningún daño a las bacterias patógenas. Este hecho es de vital importancia en la actualidad y debe tenerse en consideración, ya que limita las herramientas que poseemos para luchar contra las infecciones bacterianas.

### 1.3 Factores patogénicos

Cuando se hace referencia a la patogenicidad de un organismo, en este caso una bacteria, se trata de la capacidad de multiplicarse en el hospedador de una manera exitosa causándole una infección (invasión en el organismo que puede ocasionar daño al hospedador o no). La fisiopatología del género se debe a diferentes factores causantes de virulencia, entre ellos destacan los polisacáridos que componen su pared celular, la capacidad que poseen para formar biofilms, factores clumping o de agrupamiento y diferentes toxinas que generan respuestas muy diversas (Cheung et al., 2021). Los genes o secuencias génicas que contienen la información necesaria para sintetizar los factores de virulencia aparecen principalmente en islas de patogenicidad (fracción de ADN que porta genes de virulencia) y tienen una elevada capacidad de inserción y traslocación permitiendo conservar dichas secuencias en bacteriófagos o diferentes plásmidos que varían en función de la cepa causante de la infección (Adame-Gómez et al., 2020). Se pueden englobar los factores implicados en la virulencia en los siguientes grupos:

- Composición de la pared celular: Los diferentes polisacáridos o proteínas que aparecen en la pared celular son capaces de desencadenar una respuesta inmune conforme se detecta el contacto con las células del organismo.
- Producción de enzimas: Tras el asentamiento de las bacterias, pueden comenzar a segregar diferentes enzimas que producen diferentes alteraciones relacionadas con la enfermedad.
- Síntesis de toxinas: Estos patógenos pueden producir diferentes toxinas que alteran el crecimiento y desarrollo de las células del organismo, además de destruirlas, lo cual generará una gran respuesta inmune.



## A) Composición de la pared celular

En la pared celular bacteriana podemos encontrar diferentes polisacáridos o proteínas con función antigénica:

- **Peptidoglucano:** Es el principal polímero presente en la pared celular de bacterias Gram +. Confiere rigidez además de resistencia frente a desequilibrios osmóticos. Respecto a su patogenicidad podemos destacar que desencadena en el hospedador la producción de interleuquinas de tipo I por el sistema del complemento, y cuando lo detectan los monocitos generan anticuerpos opsonicos (anticuerpos específicos o inmunoglobulinas diseñadas para unirse específicamente al peptidoglucano y promover la destrucción o fagocitosis de la bacteria) (Liu, 2009). Además, este polímero puede tener acción quimioatrayente de leucocitos polimorfonucleares dentro del organismo y llevar a cabo el “fenómeno de Shwartzman”, en el cual se desencadena necrosis cutánea debido a la infección (Chahin et al., 2018).
- **Ácido teicoico:** Representa el 40% de la composición de la pared bacteriana y se basa en un polímero de glicerol y otros azúcares que se unen al peptidoglucano de manera covalente formando un complejo que representa el sitio de unión de los bacteriófagos (Van Dalen et al., 2020). Si estos ácidos se unen a la membrana plasmática se denominan ácidos lipoteicoicos.
- **Factor coagulante:** Se localiza en la cápsula bacteriana y se encarga de la fijación no enzimática del fibrinógeno para poder formar agregados bacterianos (Kwiecinski y Horswill, 2020). Esto favorece la acumulación de bacterias facilitando la infección del organismo.
- **Proteína A:** Se trata de un componente característico en las cepas de *S. aureus*, muy destacado en la reactividad del sistema inmune ya que tiene la capacidad de unirse a la fracción constante de las inmunoglobulinas del tipo G (IgG) (Somerville, 2016). Se encarga de activar las reacciones de hipersensibilidad a corto y largo plazo, así como al sistema del complemento, y aumenta la formación de leucocitos de tipo neutrófilos, eosinófilos y basófilos (PMNs) que residen en los tejidos y forman parte del Sistema Inmune Natural.

## B) Producción de enzimas

*S. aureus* es capaz de producir diferentes enzimas implicadas en el proceso patogénico y se clasifican, en función de su acción, de la siguiente manera:

- **Catalasa:** Es una hemoproteína que se encarga de transformar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Cuando se secretan en el interior del hospedador pueden inactivar sistemas de ingestión, fagocitosis y opsonización mediados por PMNs (Brøndserud et al., 2019). La presencia de esta enzima permite la diferenciación con el género estreptococos (catalasa negativos).
- **Coagulasa:** Es una enzima que degrada el fibrinógeno transformándolo en fibrina, lo cual origina la formación de coágulos en el plasma sanguíneo (Llop Hernandez, 2001). De esta manera, *S. aureus* consigue evitar la fagocitosis mediante la acumulación de fibrina alrededor de su cápsula, lo que impide la unión del fagocito, aumentando así su capacidad de invasión.
- **Estafiloquinasa:** Proteína implicada en la degradación de coágulos de fibrina, encargada de mantener localizada la infección para que su eliminación sea más efectiva. Por tanto, la producción bacteriana de esta enzima permite que puedan realizar una gran expansión y con mayor libertad (El-Baz et al., 2021).
- **Lipasa:** Permite la hidrólisis de lípidos para generar un mejor acceso a los tejidos cutáneos y sebáceos que mejoran el establecimiento de la infección (Tam y Torres, 2019).

- **DNasa:** Es una enzima capaz de degradar ADN. De esta manera, se destruye el material genético de las células del hospedador impidiendo su desarrollo y causando la muerte celular (Khwen et al., 2021).
- **Fosfolipasa C:** Es una enzima asociada a la sepsis que otorga mayor susceptibilidad a los tejidos afectados para que la reacción inmunológica sea mayor (Nakamura et al., 2020). Además, destruye componentes que intervienen en la respuesta inmune mediada por el sistema del complemento, debilitando la respuesta y propiciando la expansión de la bacteria (Llop Hernandez, 2001).
- **Hialuronidasa:** Tiene la capacidad de romper enlaces presentes en el ácido hialurónico, que forma parte del tejido conectivo, permitiendo, a su vez, la hidrólisis de lípidos y la colonización de las células sebáceas en la piel (Galli et al., 2019). También se denomina factor de difusión, ya que al romper dichas estructuras mejora la expansión de la infección en el interior del organismo.

### C) Síntesis de toxinas

Teniendo en cuenta los efectos biológicos que pueden producir en las células además de su posición en la bacteria, las toxinas se pueden clasificar de la siguiente manera:

- **Citotoxinas:** Su mecanismo de actuación consiste en la perforación de la membrana plasmática de diversos tipos de células como eritrocitos, leucocitos, macrófagos, plaquetas o fibroblastos (Somerville, 2016). Por tanto, este tipo de toxinas afectan principalmente a la membrana y a su estructura natural. Existe una gran diversidad de citotoxinas, entre las cuales destacan:
  - **Leucocidina Panton-Valentine (PVL):** Este tipo de citotoxinas son capaces de alterar las bombas sodio-potasio de leucocitos polimorfonucleares y macrófagos, principalmente (Hodille et al., 2020). Esto conlleva una serie de desequilibrios metabólicos en las células como acumulación de calcio, aumento de la permeabilidad de iones y, síntesis y secreción de proteínas que afectan al balance energético, entre otros (Darboe et al., 2019). Todo esto deriva en la lisis de las células que intervienen en la respuesta inmune, y en el avance de la infección.
  - **$\alpha$ -hemolisina (Hla):** Son proteínas capaces de lisar eritrocitos, aunque también pueden dañar la membrana de las plaquetas (Somerville, 2016). Este último tipo de células se encarga de detectar los factores necróticos que produce la toxina y pueden dañar muy gravemente el músculo liso vascular, pudiendo desembocar en endocarditis infecciosa, entre otras patologías (Gor et al., 2021).
  - **$\beta$ -hemolisina:** Es una toxina capaz de degradar esfingomielina, una clase de fosfolípido que aparece en las membranas de las células animales, principalmente en las vainas de mielina que recubren las células nerviosas. Esta toxina presenta actividad fosfolipasa C que les confiere selectividad a las bacterias para poder degradar esfingomielinas y lisofosfatidilcolina (ácido graso que participa en la señalización celular, es liberado por células apoptóticas para atraer fagocitos que puedan eliminarlas) y además, pueden alterar las propiedades de la membrana de los eritrocitos (Somerville, 2016).
  - **$\gamma$ -hemolisinas:** Esta clase de toxinas inducen principalmente la inflamación (Galli et al., 2019), por lo que las células a las que más afectan son los neutrófilos (primera línea de defensa frente a infecciones bacterianas), macrófagos (especializados en la detección, destrucción y fagocitosis de bacterias y organismos extraños que sean dañinos) y eritrocitos (aumenta el flujo sanguíneo en las zonas afectadas produciendo inflamación junto con los glóbulos blancos específicos).

- **Δ-hemolisinas:** Es una toxina dermonecrótica, es decir, destruye a los diferentes tipos celulares presentes en la piel mediante la disgregación de sus membranas (Divyakolu et al., 2019).
- **Exfoliatinas o toxinas epidermolíticas:** Se trata de una especie de proteasas capaces de descomponer el estrato granuloso de la epidermis del hospedador rompiendo los puentes intercelulares. Podemos encontrar dos tipos de toxinas diferentes en este grupo: exfoliatinas A (ETA) y exfoliatinas B (ETB), ambas con actividad serina proteasa, capaces de disolver la capa mucopolisacárida de la dermis o desmosoma (Del Giudice, 2020). Esto hace que se separen las diferentes capas de la dermis por la desaparición de las uniones al estrato (causa el síndrome de piel escaldada que se describirá posteriormente).
- **Enterotoxinas:** Son una especie de superantígenos que no activan al sistema inmune por el contacto entre células presentadoras de antígeno y linfocitos, sino activando directamente de manera no específica a las células T. Las enterotoxinas estimulan la respuesta del sistema inmune haciendo que produzca una mayor cantidad de células T y citosinas (Willerslev et al., 2020). Además, teniendo en cuenta que su principal función es la participación en señalización y comunicación celular, estas proteínas son capaces de promover la liberación de mediadores químicos por los mastocitos para que la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa, se encuentre más coordinada. Entre el 30-50% de las cepas de *S. aureus* son capaces de producirlas y se han descrito 15 tipos hasta ahora (Somerville, 2016). Son toxinas termostables y muy resistentes, sobre todo a las enzimas digestivas de los animales, por ello son causantes de intoxicaciones alimentarias y enterocolitis infecciosa (inflamación del tracto digestivo) (Tabís et al., 2022).
- **Toxina del shock tóxico (TSST-1):** Estas toxinas suponen otra clase de superantígenos que permiten la destrucción de células del endotelio. Cuando el organismo detecta su presencia comienza a liberar células T junto con citosinas (Moza et al., 2007). Estas últimas envían señales al sistema inmunitario para que puedan desarrollarse rápidamente las células implicadas en la localización y fagocitosis de la toxina dañina (Zhao et al., 2019). Su producción está determinada por genes cromosómicos y su presencia en el organismo genera fiebre elevada, vómitos, diarreas, trombocitopenia, insuficiencia renal y hepática o afecciones sistémicas.

#### 1.4 Manifestaciones clínicas

El género *Staphylococcus* spp. engloba algunas cepas patógenas para el ser humano, las cuales son responsables de una gran cantidad de infecciones clínicas que provocan diferentes síntomas y en diversos grados. Este cuadro sintomático es el fruto de la liberación de los factores patogénicos descritos anteriormente, y las consecuentes respuestas del sistema inmune para luchar contra la infección. *S. aureus* desarrolla dos mecanismos de infección que determinan el tipo de patología que presentará el individuo (Tong et al., 2015):

- A. **Infección por invasión:** La bacteria se adhiere a las células de la mucosa nasofaríngea o a tejidos que presentan algún tipo de herida o traumatismo y serán fácilmente colonizados. Tras atravesar la primera barrera de protección (piel y mucosas), pueden adentrarse en tejidos subcutáneos generando abscesos que permitirán su propagación por el resto del organismo. Consecutivamente tiene lugar la invasión de tejidos circundantes más profundos a través del sistema vascular. De esta manera pueden llegar a todo tipo de tejidos y causar diferentes daños.
- B. **Infecciones por acción de toxinas:** Tras la infección bacteriana, comienzan a liberarse diferentes sustancias virulentas o toxinas que actuarán a distancia del foco de infección.

De esta manera, las cepas de estafilococos pueden generar diferentes enfermedades que se describen a continuación:

- Infecciones de piel y tejidos blandos: Comienza con una proliferación bacteriana en la superficie de la piel que conlleva una invasión y destrucción del tejido (Leung et al., 2018). En respuesta a este proceso, se desencadena una inflamación local y sistémica junto con foliculitis, impétigo o furúnculos. Este tipo de lesiones normalmente tiene lugar por una autoinfección, es decir, por bacterias que forman parte de la microbiota cutánea del hospedador. Si la infección avanza, puede causar una septicemia, debido a la diseminación de las bacterias por vía sanguínea, que puede desencadenar un shock estafilocócico. Dentro de este tipo de infecciones podemos identificar diferentes manifestaciones clínicas:
  - **Síndrome de piel escaldada**: Suele tener origen en la zona nasofaríngea. Posteriormente, la infección se propaga por la sangre y se generan toxinas que desencadenan una eritrodermia dolorosa, es decir, la piel se inflama apareciendo un enrojecimiento generalizado, comienza a descamarse y conlleva picazón y dolor en las zonas afectadas. Si tiene lugar en recién nacidos se denomina síndrome de Ritter (Hong et al., 2021) (Fig. 1).



**Figura 1.** Descamación de la piel como síntoma del Síndrome de piel escaldada de presentación neonatal. Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital materno-infantil “La Paz”, Madrid.

- **Impétigo ampolloso**: Tiene lugar por la generación de exfoliatinas en las lesiones de la piel. Se detecta por la aparición de burbujas con extremos turbios o ampollas, en cuyo interior se encuentran las bacterias, así como las toxinas que producen (Belherouane et al., 2022). En general, las ampollas suelen durar una semana aproximadamente. En ese tiempo las burbujas evolucionan abriéndose, generando úlceras y cicatrizando hasta su desaparición (Fig. 2).



**Figura 2.** Lesiones ampollosas y exudativas eritematosas en niño de 3 años causadas por infección bacteriana.

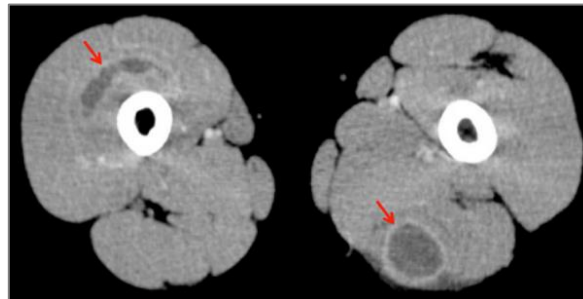
- **Fascitis necrosante**: Consiste en una infección bacteriana típica postoperatoria en las partes blandas de los tejidos. Afecta rápida y progresivamente a los tejidos cutáneos pudiendo originar necrosis hística (fluye poca sangre al tejido haciendo

que este muera), ya que se relaciona con una elevada toxicidad sistémica. Dicha necrosis se debe a la presencia de la toxina leucocidina Pantón-Valentine que agrava la infección (Rué et al., 2009) (Fig. 3).



**Figura 3.** Fascitis necrosante en niña de 4 años. Aspecto de la zona afectada tras resección quirúrgica (Manzani Baldi y Rodríguez, 2011).

- **Piomiositis:** Es una infección localizada en el músculo esquelético que ocurre cuando las bacterias se mueven por el torrente sanguíneo y se depositan en dicho tejido. Aparece como una mionecrosis en la que se generan abscesos, principalmente en la región inferior del cuerpo (Ngor et al., 2021) (Fig. 4).



**Figura 4.** Tomografía computacional con contraste endovenoso que muestra la apariencia de un músculo con biomiositis (D'Antonio et al., 2014).

- **Endocarditis infecciosa:** Esta patología comienza con un daño en el endotelio del tejido cardíaco, lugar que se convertirá en el hábitat de la bacteria patógena. Cuando el patógeno ha colonizado el tejido subendotelial, se generan matrices con depósitos de fibrina y plaquetas que pueden provocar la formación de trombos. Si no se trata a tiempo, se puede generar insuficiencia cardíaca o daño en las válvulas (Kahn et al., 2021).
- **Infecciones osteoarticulares:**
  - **Osteomielitis:** Es un tipo de infección que afecta al tejido óseo y genera inflamación y necrosis. Es una patología poco probable ya que las condiciones que la propician sería una gran carga patogénica o un daño directo en el hueso (traumatismo). Las bacterias patógenas pueden unirse al hueso mediante la producción de proteínas que propician la unión al colágeno o al tejido óseo directamente (proteínas de adherencia) (Gallego-Goyanes y Caeiro-Rey, 2017) (Fig. 5).



**Figura 5.** Tomografía de la tibia en la que se aprecia una osteomielitis con lesión ulcerosa (Gallego-Goyanes y Caeiro-Rey, 2017).

- **Artritis séptica:** Este tipo de infección se detecta cuando tiene lugar un traumatismo o tras una inyección en el espacio intraarticular. El patógeno es capaz de unirse a las membranas sinoviales y extracelulares gracias a las proteínas de adherencia, pero el cuerpo posee varios mecanismos de defensa y eliminación del patógeno en estos casos, lo que contribuye a que esta patología sea muy poco frecuente (Schultz et al., 2022). Se activan macrófagos y células T que inducirán la formación de citosinas e interleuquinas que permiten la eliminación del patógeno y la reparación del daño causado (Tong et al., 2015).
- **Infecciones osteoarticulares en niños:** Se puede detectar por la aparición de síntomas como fiebre, dolor y sensibilidad en la tibia o el fémur que impiden al infante caminar, o por la aparición de una ligera cojera. En general suele tratarse exitosamente con el uso de antibióticos, sin dejar daños o secuelas (Michos, 2018).
- **Infección de prótesis articular:** Puede ocurrir cuando la bacteria patógena se encuentra retenida en las matrices del polímero del material protésico. Se requerirá la extracción de la prótesis para que el individuo pueda eliminar totalmente la infección. Los principales síntomas son fiebre, inflamación de la zona, e incluso un derrame en la articulación. La infección suele detectarse en la etapa postoperatoria (Wildeman et al., 2020).
- **Infecciones de dispositivos protésicos:** Este género bacteriano, debido a la formación de biopelículas, tiene una enorme capacidad de colonizar cuerpos inertes externos, por lo que se debe tener sumo cuidado en las intervenciones hospitalarias, es decir, con la esterilización de dispositivos. En el caso de infección por esta vía, habría que retirar el dispositivo, causando un mayor daño al paciente, así como desperdicio de material y tiempo de los sanitarios (Ricciardi et al., 2018).
- **Infecciones pleuropulmonares:** *S. aureus* es uno de los principales agentes causantes de neumonía. Puede surgir como una infección asintomática que activa la respuesta inmune rápidamente y no afecta al individuo, o, por el contrario, como una enfermedad invasiva que acaba con la vida del paciente rápidamente dependiendo de sus factores de riesgo y del tiempo de diagnóstico (Smiti et al., 2020).
- **Absceso epidural:** Pueden aparecer en la zona espinal o intracraneal a causa de cirugías o traumatismos. Se puede detectar por dolor epidural, fiebre y alteraciones neurológicas (Bai et al., 2021).
- **Meningitis:** Tiene lugar por la diseminación de las bacterias por la sangre acabando en las meninges o por intervenciones quirúrgicas. Los síntomas típicos son dolores de cabeza, rigidez en el cuello y vómitos junto con fiebre (Tong et al., 2015).
- **Síndrome de shock tóxico:** Puede generarse por las cepas productoras de superantígenos, sobre todo por la endotoxina TSST-1 o toxina 1 del síndrome del shock tóxico (Zhao et al., 2019). Esta toxina desencadena la formación de células T y rápida producción de citocinas para generar una respuesta sistémica enorme que ataque la infección a gran escala.

- Infección del tracto urinario: Puede generar alteración de la conducta, presencia de hematíes en la orina y dolor suprapúbico. Únicamente se detecta tras un cultivo de orina y se trata con antibióticos específicos en función de la susceptibilidad (Tong et al., 2015).
- Intoxicaciones alimenticias: Este tipo de bacterias también pueden colonizar alimentos provocando su contaminación por las incorrectas prácticas de conservación o refrigeración. Este tipo de bacterias contaminantes suelen producir enterotoxinas en un periodo corto de tiempo originando la intoxicación. Los síntomas principales son diarrea y vómitos, que pueden complicarse por deshidratación, pero en la mayoría de los casos tiene lugar una rápida recuperación del individuo (Somerville, 2016).

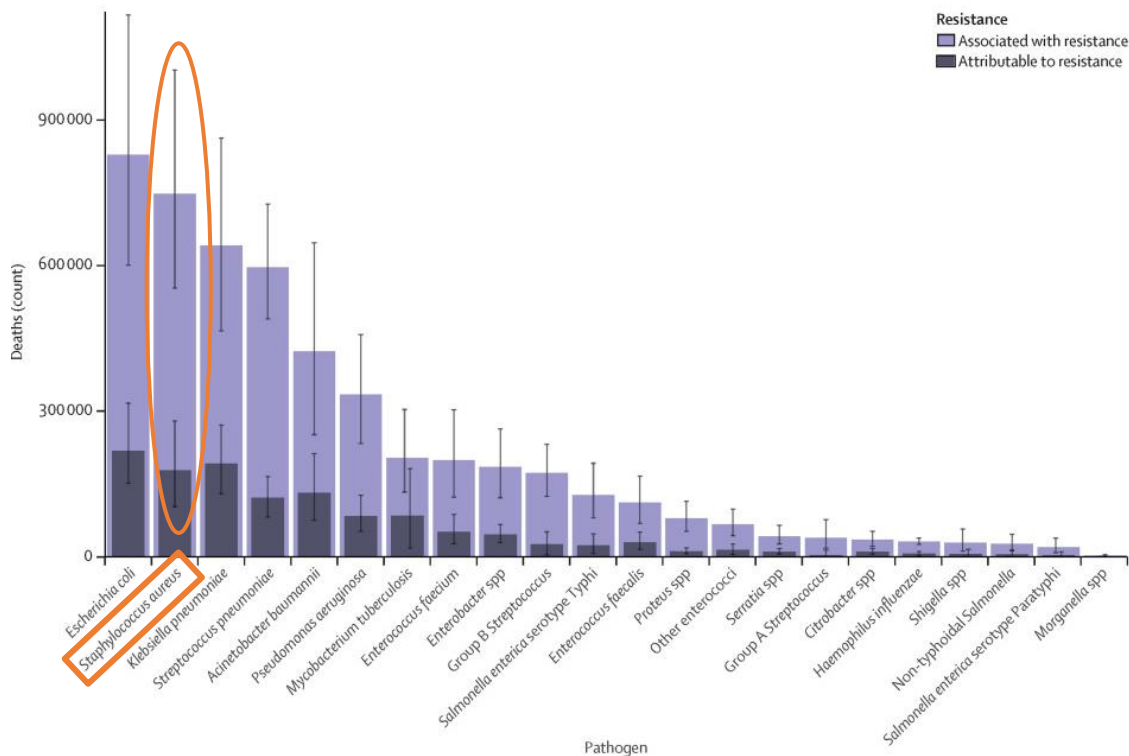
### 1.5 *Staphylococcus* y la resistencia a antibióticos

Actualmente, se considera que la tercera causa de muertes en el mundo son las enfermedades infecciosas (Fig. 6), destacando como agentes infecciosos los microorganismos pertenecientes al género *Staphylococcus spp.* Como se ha mencionado anteriormente, se trata de un género que engloba patógenos oportunistas capaces de ocasionar diferentes patologías al infectar al ser humano, que pueden implicar mayor o menor gravedad en función del tipo y foco de infección, así como la cepa patógena (Abdolmaleki et al., 2019).



**Figura 6.** Principales causas de defunciones en el año 2020 en España. Datos expresados mediante tasas brutas por cada 100.000 habitantes (Instituto Nacional de Estadística, 2020). Por otro lado, la resistencia a antibióticos supone un problema serio que afecta a nivel mundial derivado de la falta de herramientas suficientes y necesarias para luchar contra los patógenos resistentes a antibióticos. *S. aureus* es la segunda bacteria patógena que más muertes causa en

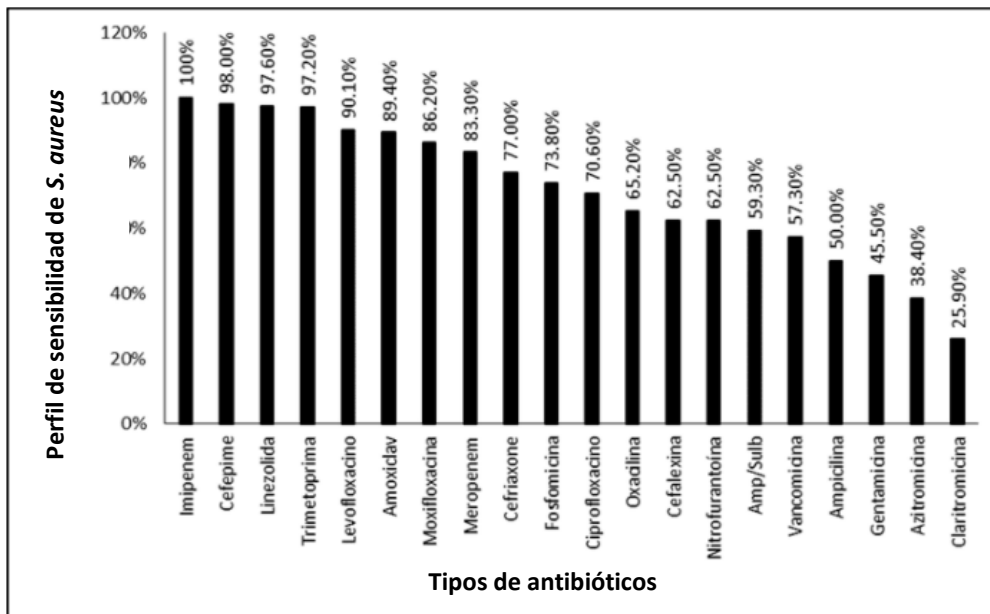
el mundo a causa de las resistencias adquiridas (Fig. 7), por ello es muy importante realizar estudios que permitan enfrentarse a ella en la actualidad y de cara al futuro (Murray et al., 2022).



**Figura 7.** Bacterias patógenas que causaron mayores defunciones en el año 2021 (Murray et al., 2022).

En 1940, Fleming descubrió la penicilina, primer antibiótico utilizado para luchar contra infecciones. El uso de este antibiótico se generalizó provocando que microorganismos patógenos, como *S. aureus*, desarrollaran mecanismos de resistencia, tales como la síntesis de la enzima penicilinas (MacLean y San Millan, 2019). Los científicos lograron crear un nuevo antibiótico basado en la penicilina, pero resistente a dicha enzima: la meticilina. Sin embargo, este nuevo antibiótico también ejerció una eficacia limitada en el tiempo por la aparición de una cepa de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) (Guo et al., 2020). En la actualidad, dicha cepa resistente se identifica con mucha frecuencia, tanto en hospitales como entre la comunidad. Además, su tasa de mortalidad, por escasez de armas para luchar contra ella, ha provocado que se posicione por encima de enfermedades como el SIDA o el Párkinson. Estos datos revelan la preocupación actual entre la comunidad científica, ya que se necesitan nuevas herramientas para poder frenar el crecimiento de estos microorganismos resistentes y disminuir el número de muertes. En la Figura 8 se observa el nivel de resistencia que presenta *Staphylococcus aureus* frente a diferentes antibióticos. Según estos datos, muchos de los antibióticos de uso actual son poco efectivos por lo que es una situación alarmante.





**Figura 8.** Perfil de sensibilidad de *S. aureus* frente a diferentes antibióticos (muestras de urocultivos) (Silva et al., 2020).

Esta escalofriante situación incentivó la investigación y producción de antibióticos de nueva generación, teniendo en cuenta las nuevas resistencias. Se desarrollaron alrededor de 90 antibióticos que se sometieron a una serie de estudios, siendo más de un tercio específicos para *Staphylococcus* spp. Este género microbiano es uno de los que más resistencia presenta frente antibióticos y, por consiguiente, supone un importante riesgo para el ser humano por su extendida presencia en piel y mucosas.

La MRSA es considerada actualmente como una “súper bacteria”, ya que a lo largo del tiempo ha ido adquiriendo resistencias a muchos antibióticos, entre los que destacan: penicilina, cefalosporinas, cloranfenicol, tetraciclinas, sulfanoamidas, entre otros (Algammal et al., 2020). La búsqueda de nuevos antibióticos es un proceso lento y costoso, que requiere de muchos estudios y comprobaciones antes de su aprobación por lo que no se puede obtener con la rapidez que se necesita (Guo et al., 2020). Por ello, es necesario elaborar nuevas estrategias que permitan hacer frente de una forma rápida y eficaz a estas cepas patógenas resistentes. Entre las principales estrategias que se proponen actualmente para inhibir el crecimiento de cepas resistentes a antibióticos destacan:

- **Inhibición por la detección del quorum:** El quorum permite establecer comunicaciones entre comunidades bacterianas y regularse entre ellas (Whiteley et al., 2017). Por ello, se están estudiando moléculas de señalización que sean inductoras del crecimiento bacteriano para poder inhibir su actuación, reduciendo de este modo el desarrollo, la virulencia o los mecanismos de resistencia de las bacterias.
- **Inhibición de la lectina:** La lectina es una proteína bacteriana que participa en la aglutinación celular y adhesión a las células receptoras del hospedador que les permiten desarrollar su mecanismo de infección. Por tanto, desarrollar nuevos fármacos basados en la estructura de estas proteínas es una alternativa para evitar la adhesión del patógeno con las células del hospedador y prevenir así la aparición de infecciones (Breitenbach et al., 2018).
- **Terapia de fagos:** Se basa en el uso de virus para tratar infecciones. Los virus detectan la presencia de la bacteria, se adhieren a ella y se replican en su interior, adueñándose de su maquinaria y lisando finalmente al patógeno (Gordillo Altamirano y Barr, 2019).
- **Búsqueda de nuevos antibióticos:** Esta estrategia supone un gran reto a la comunidad científica actual ya que la aparición de bacterias resistentes y su gran propagación está

limitando el tratamiento de enfermedades infecciosas. Para poder llevarla a cabo se necesitan nuevas estrategias de búsqueda de microorganismos que produzcan sustancias antibacterianas. Por otro lado, tanto la secuenciación masiva como el desarrollo de programas informáticos permiten obtener resultados muy prometedores para el futuro, ya que facilitan la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas junto con la detección de posibles genes que sinteticen sustancias de interés (Stokes et al, 2020).

- Uso de herramientas de edición genética: Otra manera de actuar es de forma inversa, en lugar de buscar compuestos o microorganismos que puedan actuar contra el patógeno cada vez que desarrollen una resistencia, podrían silenciarse los genes adquiridos que confieren dicha resistencia (Sun et al., 2020). De esta manera, evitamos la aparición de nuevas resistencias ya que no interviene ningún compuesto antimicrobiano, únicamente se altera la secuencia genómica mediante silenciamiento.
- Antagonismo microbiano: Utiliza la capacidad antagonista de un determinado microorganismo para inhibir el crecimiento y desarrollo de otros (Selwyn, 2018). Esta estrategia se basa en diferentes mecanismos para inhibir el crecimiento del patógeno. Los mecanismos desarrollados con este fin pueden ser la competencia por nutrientes, antibiosis (producción de antibióticos que inhiben a la bacteria patógena), depredación o parasitismo, etc. Consiste en enfrentar ambos microorganismos y que el agente de biocontrol sea capaz de controlar la infección impidiendo que el microorganismo patógeno se desarrolle.

## 2. OBJETIVOS

---

El objetivo principal de este trabajo consistió en la caracterización de una colección de cepas pertenecientes al género *Staphylococcus* spp., aisladas previamente de fosas nasales y zonas cutáneas de estudiantes de la Universidad de Almería, para comprobar la predominancia de *S. aureus* entre la población. Además, como herramienta alternativa de lucha en la resistencia a antibióticos, se realizó un estudio de antagonismo utilizando cepas procedentes del proceso de compostaje para comprobar su efecto supresor frente a las distintas cepas patógenas de *S. aureus*. Para abordar este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Caracterización bioquímica y morfológica de la colección de cepas de *Staphylococcus* spp. para identificar preliminarmente a las cepas patogénicas pertenecientes a la especie *S. aureus*.
- Selección e identificación molecular de las posibles cepas de *S. aureus*, según la caracterización preliminar.
- Evaluación de la eficacia antagonista frente a las cepas de *S. aureus* de microorganismos aislados del proceso de compostaje y que han demostrado previamente una potencial supresión del crecimiento bacteriano.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

Este Trabajo Fin de Grado se realizó acorde a un diseño experimental dividido en tres fases:

- **Fase 1: Caracterización morfológica y bioquímica.** Esta fase se corresponde con el primer objetivo específico planteado en este trabajo. Dicha fase consistió en someter a la colección de cepas de *Staphylococcus* spp., previamente aisladas de muestras nasales y cutáneas, a un estudio de las capacidades metabólicas características de la especie *S. aureus*, como son la capacidad de fermentar manitol y de producir DNasa. Por otro lado, se llevó a cabo un análisis morfológico de las cepas mediante Tinción de Gram para comprobar si realmente pertenecían al género *Staphylococcus* spp. (Fig. 9). Como se ha comentado en el apartado 1 (Introducción), la especie *S. aureus* es considerada patogénica por su capacidad infectiva en el ser humano. Además, algunas cepas de dicha especie son enteropatógenas, es decir que son capaces de provocar cuadros clínicos graves a nivel intestinal. Por ello, el interés de este trabajo reside en la identificación, mediante técnicas bioquímicas y morfológicas, de dicho microorganismo entre la colección de *Staphylococcus* spp. aislados de muestras nasales y cutáneas.

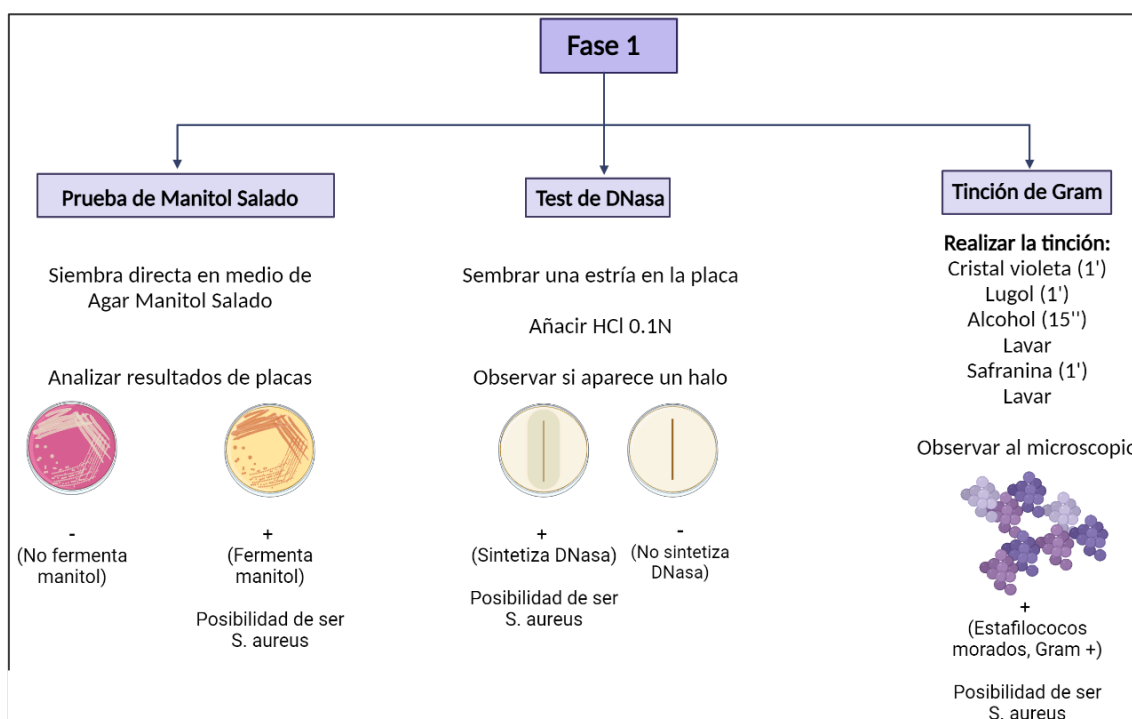
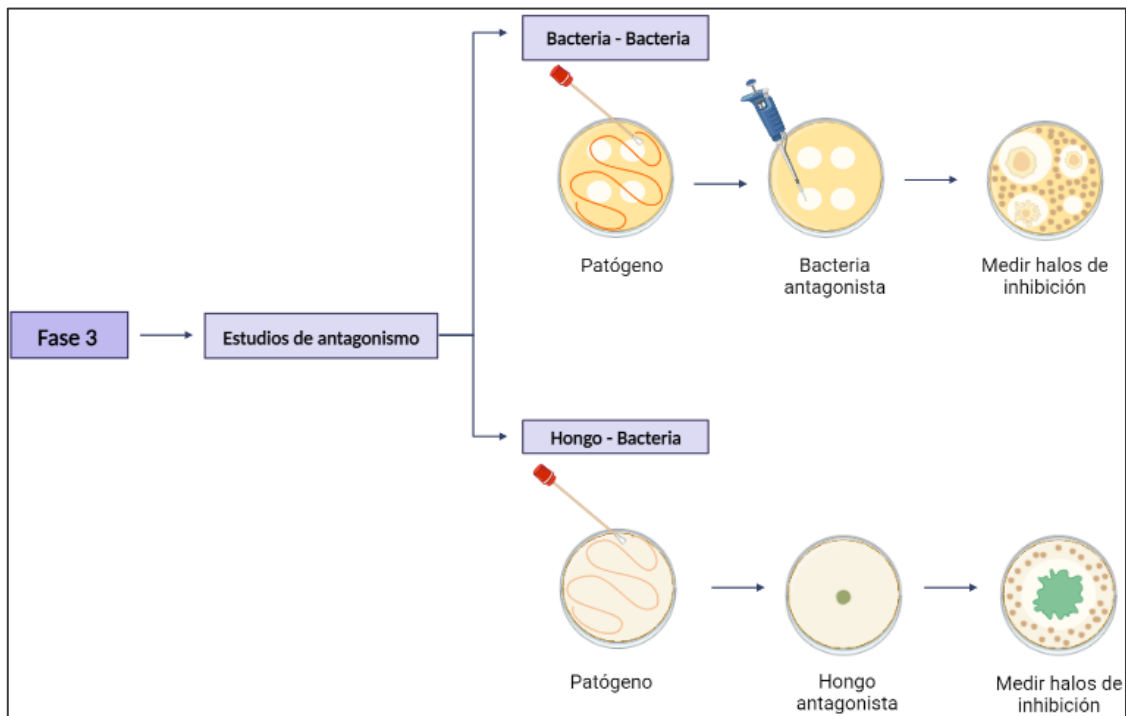


Figura 9. Fase 1 del diseño experimental.

- **Fase 2: Selección e identificación molecular.** Esta fase se corresponde con el segundo objetivo específico del presente Trabajo Fin de Grado. Tras la caracterización bioquímica y morfológica de la colección de bacterias supuestamente pertenecientes al género *Staphylococcus* spp., se seleccionaron aquellas que cumplían las características asociadas a la especie *S. aureus*, es decir aquellas capaces de fermentar manitol y producir DNasa, siempre y cuando microscópicamente se corroborase que presentan morfología y agrupación celular típicas del género en estudio. Las cepas seleccionadas se sometieron a identificación molecular para corroborar que se trataba de *S. aureus* y que, por tanto, las pruebas bioquímicas y morfológicas utilizadas son efectivas para una identificación precoz de dicho patógeno.

- **Fase 3: Estudio de antagonismo.** Esta última fase corresponde con el tercer objetivo del trabajo. Esta fase se basó en la búsqueda de microorganismos capaces de inhibir el crecimiento de *S. aureus*, como herramienta alternativa al uso de antibióticos actuales hacia los cuales dicha bacteria ha desarrollado resistencia. Para ello, se seleccionaron ocho microorganismos, previamente aislados del proceso de compostaje, por su potencial supresor frente a bacterias. A continuación, se evaluó la capacidad de dichos microorganismos para inhibir el crecimiento de *S. aureus* mediante enfrentamientos duales en placa Petri (Fig. 10).



**Figura 10.** Fase 3 del diseño experimental.

### 3.1. Colección de cepas de *Staphylococcus* spp.

Para la realización de este trabajo se dispone de una colección de 61 cepas de *Staphylococcus* spp. previamente aisladas de piel y mucosas de voluntarios sanos (portadores del patógeno) de estudiantes de la Universidad de Almería. Dicha colección pertenece al grupo de investigación BIO-175 de la Universidad de Almería y se mantiene mediante crioconservación en un congelador de -80 °C.

En primer lugar, se llevó a cabo la recuperación de las cepas crioconservadas mediante la siembra en un medio sólido general, en este caso APHA (Panreac), y la posterior incubación a 30 °C durante 24-48 h. Tras asegurar que los cultivos de cada cepa eran axénicos, se procedió a la siembra por extensión en tubos de agar inclinado para intentar mantener la colección fácilmente accesible y conservada en refrigeración a lo largo del experimento.

### 3.2. Caracterización morfológica y bioquímica

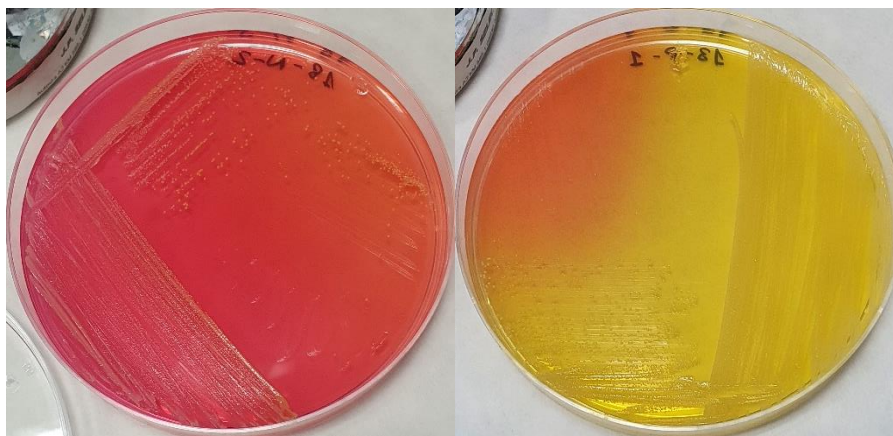
Tras recuperar las cepas de trabajo del proyecto, se realizó una identificación fenotípica de las mismas basada en sus características metabólicas y estructurales. Por lo tanto, las cepas se sometieron a tres pruebas, tales como el estudio de la capacidad fermentativa de manitol en el medio Agar Manitol Salado (OXOID) (3.2.1.) y de hidrólisis de ácidos nucleicos mediante la

siembra en el medio Agar DNasa (Panreac) (3.2.2.), así como la tinción de Gram (3.2.3.). Las cepas de *Staphylococcus aureus* son capaces de fermentar manitol, hidrolizar ADN (DNasa +) y coagular fibrina (coagulasa +). Con estas pruebas positivas la cepa se identifica como posiblemente *S. aureus*, aunque para confirmarlo con rotundidad se llevó a cabo la identificación molecular. La tercera prueba mencionada anteriormente (coagulasa) no se realizó en este trabajo, pero se lleva a cabo la identificación molecular que es totalmente decisiva.

### 3.2.1. Prueba de manitol salado

Esta metodología permitió identificar las posibles cepas de *Staphylococcus aureus* de la colección, puesto que dicha especie tiene la capacidad de fermentar el manitol. Esta prueba no es absoluta porque existen otras especies del género *Staphylococcus* spp. capaces de fermentar el manitol, por ello se debe complementar con otras pruebas que se describen a continuación. El medio de cultivo aplicado en esta prueba es el Agar Manitol Salado y se compone principalmente de extracto de carne, peptona cárnica, tripteína, manitol (un carbohidrato fermentable por este tipo de bacterias), cloruro sódico (NaCl) en alta concentración y rojo fenol, como indicador de pH. Este medio es selectivo ya que contiene una elevada concentración de NaCl lo que permite inhibir el crecimiento de bacterias que no sean halotolerantes, como *Staphylococcus* spp. Además, este medio también es diferencial ya que la fermentación de manitol provoca un cambio en el pH (por la liberación de ácidos al medio) y consecuentemente, debido a la presencia de un indicador de pH, se produce el viraje de color de rosa a amarillo (Fig. 11).

Para realizar esta prueba, se llevó a cabo la siembra por aislamiento de cada cepa en placas de Agar Manitol Salado y se incubaron durante 24-48 horas a 30 °C. Tras este tiempo se realizó la interpretación de los resultados según lo comentado anteriormente: cepas fermentativas (manitol +) o no fermentativas (manitol -).



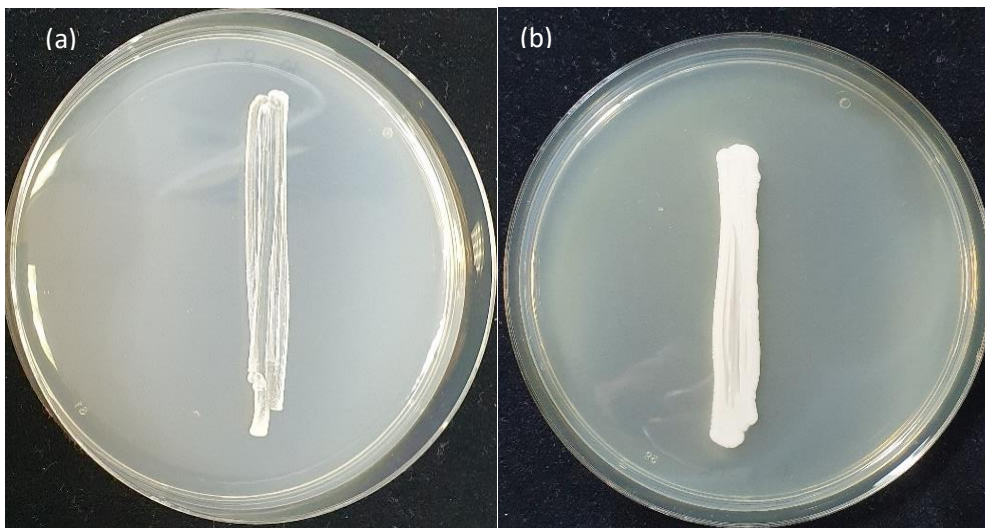
**Figura 11.** En la imagen de la izquierda se muestra la siembra en placa de Agar Manitol Salado de una cepa no fermentativa del manitol (color rosa) mientras que en la imagen de la derecha se observa el cambio de color originado por la presencia de una cepa manitol +.

### 3.2.2. Prueba de DNasa

Esta prueba pone de manifiesto la capacidad de algunas bacterias de producir DNasa (desoxirribonucleasas), enzima hidrolítica que despolimeriza el ácido desoxirribonucleico rompiendo los enlaces fosfodiéster entre las bases nitrogenadas que componen dicha molécula. Las cepas patógenas de género *Staphylococcus* spp., como *S. aureus*, son capaces de nutrirse a partir de las bases nitrogenadas que componen el material genético, y esta habilidad está

relacionada con su patogenicidad. El medio empleado en esta prueba es el Agar DNasa y está compuesto por triptona, NaCl y una elevada concentración de ácido desoxirribonucleico.

Para realizar esta prueba, las cepas se sembraron mediante una estría central en la placa de DNasa y se incubaron a 36 °C durante 24-48 horas. Trascurrido este tiempo, tras el crecimiento microbiano, se adicionó ácido clorhídrico (HCl) 0,1 N sobre la placa mediante una pipeta Pasteur hasta cubrir toda la superficie. Este reactivo precipita el ADN que aún está polimerizado y el medio se enturbia y se observa opaco (Fig. 12). Las cepas de *Staphylococcus* spp. sembradas en este medio y que sean capaces de sintetizar la DNasa mostrarán una zona de aclaramiento en el medio (Fig. 12a) correspondiente a la ausencia de ácidos nucleicos por la acción de la enzima, mientras que en aquellas que no produzcan DNasa se observará toda la placa turbia (Fig. 12b).



**Figura 12. a)** Se aprecia el halo de aclaramiento correspondiente con la siembra en placa de Agar DNasa de una cepa productora de DNasa, tras la precipitación del ADN del medio con HCl. **b)** No se aprecia ningún halo de aclaramiento, por lo que la cepa sembrada en este caso es DNasa -.

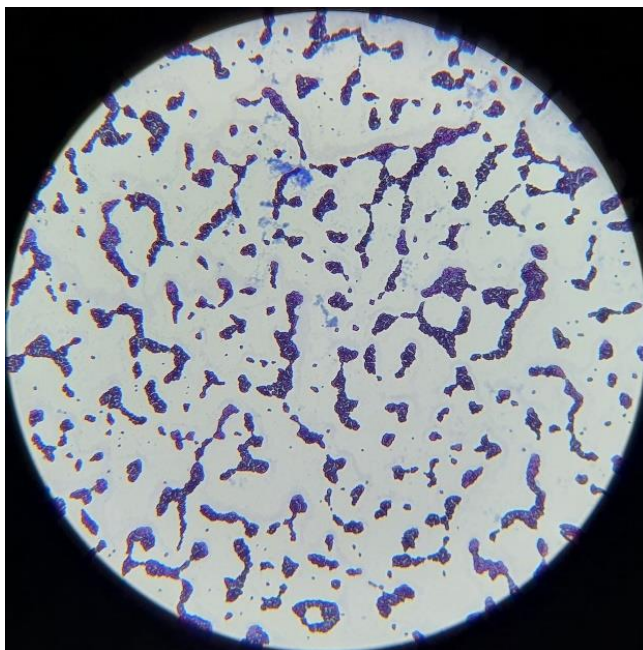
### 3.2.3. Tinción de Gram

Se trata de una tinción diferencial que permite clasificar las bacterias en base a diferencias estructurales presentes en las membranas. La tinción de Gram permite distinguir a las bacterias en dos grupos según su pared celular, las Gram + y Gram -, y establecer su morfología celular y forma de agruparse. Las bacterias pertenecientes al género *Staphylococcus* spp. son Gram +. Por tanto, se realizó la tinción de Gram para determinar, de forma más específica, si las cepas de la colección pertenecían al género objeto de estudio, en base al resultado de la tinción. Además, con esta técnica se observó la morfología celular y agrupación, teniendo en cuenta que las bacterias del género *Staphylococcus* spp. tienen morfología de cocos y agrupación en racimos.

Cada una de las cepas de la colección bacteriana se sometió a tinción de Gram mediante la suspensión de un loop bacteriano sobre una gota de agua en un portaobjetos. A continuación, se efectuó un frotis, que se secó a una distancia apropiada de la llama y luego se fijó, pasándola tres veces a través de esta. Se colocó el portaobjetos sobre unas varillas de tinción encima de un cristalizador, y se cubrió con el colorante cristal violeta. Este colorante es capaz de atravesar las membranas y se acumula en el citoplasma. Tras un minuto de actuación, se añadió de la misma manera Lugol, reactivo fijador capaz de formar un complejo con el cristal violeta y facilitar su fijación. Posteriormente, se lavó con etanol al 95% durante 15 segundos para decolorar las células Gram -, a las cuáles por la estructura de su pared celular no se une fuertemente el cristal



violeta. Las bacterias Gram positivas poseen una capa más gruesa de mureína que favorece una unión más fuerte del cristal violeta y, por tanto, mayor resistencia a la decoloración con etanol. Consecutivamente se lavaron las muestras con abundante agua para eliminar el alcohol y se añadió Safranina, colorante de contraste, que se une a las células decoloradas o no teñidas. Por último, se lavaron las muestras con agua y se dejaron secar antes de observarlas en el microscopio. Se pudo observar según si el color de los microorganismos era azul intenso o violeta, que se trataba de bacterias Gram +, o si el color era rosado o rosa, estas eran Gram – (Fig. 13).



**Figura 13.** Tinción de Gram de la cepa 44-MSPIEL-2, perteneciente a la colección de *Staphylococcus* spp., vista al microscopio.

### 3.3. Identificación molecular

Para la identificación molecular de los aislados se siguió el protocolo establecido por Jurado et al. (2014). La extracción de ADN debe realizarse preferentemente con biomasa celular procedente de un cultivo fresco (24h), por lo que se hizo primero una resiembra de las placas con los aislados. De esas placas, con un asa de siembra se cogió una cantidad considerable de biomasa, y se llevó a un tubo Eppendorf con 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O destilada estéril, en la que se realizó una suspensión homogénea con ayuda del agitador vórtex. A continuación, se realizó la extracción mediante choque térmico, para ello se introdujeron los eppendorf con las suspensiones bacterianas en un termo-bloque a 95 °C durante 10 minutos. Pasado ese tiempo, se dispusieron en hielo durante otros 10 minutos.

Para la identificación molecular de las cepas bacterianas aisladas se amplificó el gen 16S ADNr mediante PCR. Para ello se preparó una mezcla constituida por los componentes indicados en la Tabla 1. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador MyCycler (Bioraid, California, EEUU) en las condiciones especificadas en la Tabla 2. Tras la amplificación, la longitud de los fragmentos obtenidos se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (1%) (Sigma-Aldrich) adicionado de 0,002% de GelRed (Biotium, Hayward, EEUU) que permite la visualización de las bandas con luz ultravioleta en transiluminador y comparados con marcador DNA Ladder (50-10.000pb DirectLoad TM Wide Range DNA Marker, Sigma-Aldrich, EEUU). El último paso fue la purificación del ADN, que se realizó con el kit de purificación de fragmentos de ADN MEGAquick-spin™ plus (Intron Biotechnology).



**Tabla 1.** Reactivos utilizados para la amplificación de ADN bacteriano.

Reactivos	Volumen por muestra
Mix PCR 2X BioMix Red (Bioline)	12,5 µL
Cebador 27 Forward (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') (10 mM)	0,5 µL
Cebador 907 Reverse (5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3'; donde R = A o G) (10 mM)	0,5 µL
H <sub>2</sub> O	9,5 µL
ADN genómico	2 µL

La secuenciación fue llevada a cabo por los Servicios Centrales de Investigación de la Universidad de Almería y las secuencias fueron analizadas empleando los siguientes programas informáticos: Sequence scanner v1.0 (disponible en [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)) para visualizar y copiar las secuencias Forward y Reverse; Reverse complement (disponible en [www.bioinformatics.org](http://www.bioinformatics.org)) para obtener el reverso complementario del fragmento antisentido; ClustalX v2.0.11 (disponible en [www.clustal.org](http://www.clustal.org)) con el objetivo de alinear la secuencia Forward y el reverso complementario; Mega 5.05 ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)) para editar las secuencias alineadas y construir el fragmento completo y la base de datos online del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para comparar los fragmentos obtenidos con secuencias depositadas en la base de datos.

**Tabla 2.** Programa para la amplificación del gen 16 ADNr en bacterias.

Programa de identificación	Tª y tiempo	Nº de ciclos
<b>Desnaturalización inicial</b>	95 °C – 2 min	
<b>Desnaturalización</b>	94 °C – 1 min	35
<b>Anillamiento</b>	55 °C – 1 min	
<b>Elongación</b>	72 °C – 1,5 min	
<b>Elongación final</b>	72 °C- 10 min	

#### 3.4. Estudio de antagonismo

En función de las pruebas realizadas anteriormente, se pudieron determinar las cepas más patogénicas de la colección de *Staphylococcus* spp. para someterlas a un estudio de inhibición de su crecimiento con microorganismos que presentasen capacidad supresiva. De esta manera, se seleccionaron 13 bacterias y se procedió a la obtención de una elevada concentración celular de dichos microorganismos para el estudio de antagonismo. Para ello, las bacterias patógenas se sembraron en Caldo Nutritivo (Panreac)(CN) y se incubaron a 37 °C en agitación durante 24-48 horas.

Por otro lado, se llevó a cabo la búsqueda selectiva de microorganismos con capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano. La búsqueda se efectuó sobre una colección de cepas pertenecientes al grupo de investigación BIO-175 del Área de Microbiología de la Universidad de Almería y que fueron aisladas previamente durante el proceso de compostaje. Estas cepas se sometieron previamente a enfrentamientos duales contra bacterias y hongos fitopatógenos (Jurado et al., 2019; San Fulgencio et al., 2018), y en función de estos resultados se seleccionaron 8 microorganismos para estudiar su efecto antagónico frente a las posibles cepas de *S. aureus*, 6 bacterias y 2 hongos. Estos microorganismos con capacidad antagonista se seleccionaron

siguiendo los siguientes criterios: amplio espectro de inhibición preferentemente contra bacterias y efecto inhibitorio superior al 50% frente a Gram +, ya que *S. aureus* pertenece a este grupo. Los microorganismos seleccionados se muestran en la Tabla 3. Para poder realizar el estudio antagónico de estos microorganismos frente a las cepas seleccionadas por su patogenicidad, las bacterias con capacidad antagonista se sembraron en CN, como en el caso anterior, para aumentar sus niveles poblacionales, y se incubaron en condiciones de agitación durante 24-48h a 37 °C. Por otro lado, los hongos con capacidad antagonista se sembraron en el medio sólido Patata Dextrosa Agar (Panreac) (PDA), mediante la inoculación de un plug de agar con crecimiento micelial del hongo en cuestión, y se incubaron entre 5-7 días a 30 C.

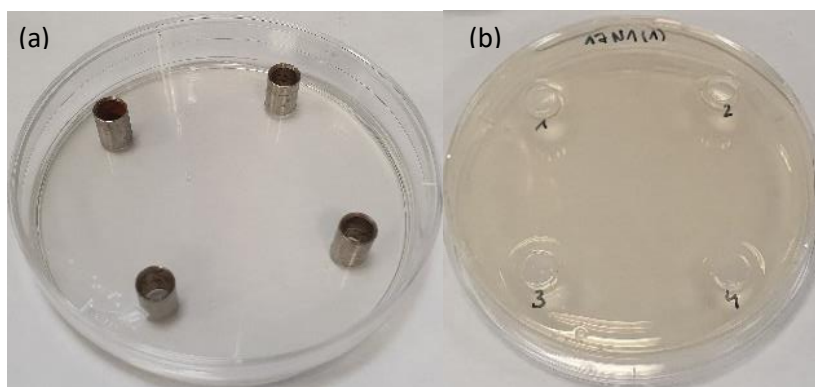
**Tabla 3.** Microorganismos seleccionados para el estudio de antagonismo frente a las posibles cepas de *S. aureus*.

Identificación general	Clase de microorganismo	Identificación molecular
232	Actinobacteria	<i>Alcaligenes faecalis</i>
1272	Actinobacteria	<i>Bacillus tequilensis</i>
2167	Bacteria	<i>Bacillus subtilis</i>
2298	Bacteria	<i>Bacillus megaterium</i>
2303	Bacteria	<i>Bacillus aerophilus</i>
2929	Bacteria	<i>Bacillus subtilis</i>
4193	Hongo	NO IDENTIFICADA
4199	Hongo	NO IDENTIFICADA

El enfrentamiento de los hongos y bacterias con capacidad supresiva frente a las posibles bacterias patógenas se realizó en placas Petri adicionadas con el medio de cultivo APHA. Las siembras pertinentes para los enfrentamientos duales se realizaron de distinta manera dependiendo del tipo de enfrentamiento.

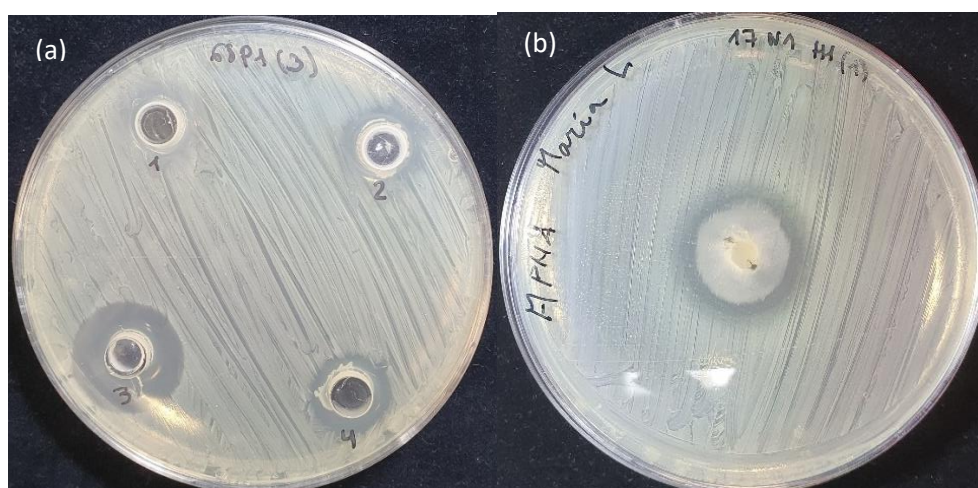
El enfrentamiento de los hongos antagonistas vs. bacterias patógenas (Fig. 15b) se llevó a cabo mediante la siembra de la bacteria patógena (cultivo líquido) por toda la superficie del medio de cultivo (APHA) contenido en la placa Petri con un escobillón estéril. A continuación, con la ayuda de un sacabocados estéril, se depositó un plug del cultivo fresco en PDA del hongo antagonista sobre la superficie sembrada con la bacteria.

El enfrentamiento de las bacterias antagonistas frente a las bacterias patógenas se llevó a cabo en placas Petri con medio de cultivo bicapa con pocillos. Para la preparación de dicho medio se adicionaron las placas Petri con una fina base de agar-agua al 2% (p/v) (AA), encima de la cual se colocaron cuatro Torrecillas de Oxford estériles de acero inoxidable (8 mm de diámetro y 10 mm de altura), a una distancia de 10 mm del borde de la placa y equidistantes al centro de la misma (Fig. 14a). Posteriormente se incorporó una segunda capa de medio APHA sobre la base de AA. El medio vertido en las placas Petri se dejó enfriar y solidificar, para poder retirar las torrecillas, en condiciones de asepsia, quedando un pocillo en el medio de cultivo (Fig. 14b). El enfrentamiento bacterias antagonistas vs. bacterias patógenas se llevó a cabo mediante la siembra de la bacteria patógena (cultivo líquido) por toda la superficie del medio APHA+AA mediante el uso de un escobillón estéril. A continuación, se incorporan 70 µL de cada extracto en los pocillos de dicho medio (Fig. 15a).



**Figura 14. a)** Placa Petri con Torrecillas Oxford estériles dispuestas equidistantemente para preparar los pocillos. **b)** Placa Petri con medio APHA y pocillos para realizar los enfrentamientos duales bacteria antagonista-bacteria patógena.

En todos los enfrentamientos se prepararon paralelamente placas control con las bacterias patógenas en ausencia de microorganismos potencialmente antagonistas. Se prepararon triplicados para cada enfrentamiento. Todos los enfrentamientos se incubaron a 37°C durante 48 horas. Tras el tiempo de incubación, se midió el halo de inhibición (mm) de la bacteria patógena en torno al pocillo con extracto o al plug de hongo antagonista (Fig. 15b).



**Figura 15. Enfrentamiento dual entre bacteria antagonista y bacteria patógena (a), y entre hongo antagonista y bacteria patógena (b) tras 72 horas de incubación.**

### 3.5. Análisis de datos y estadístico

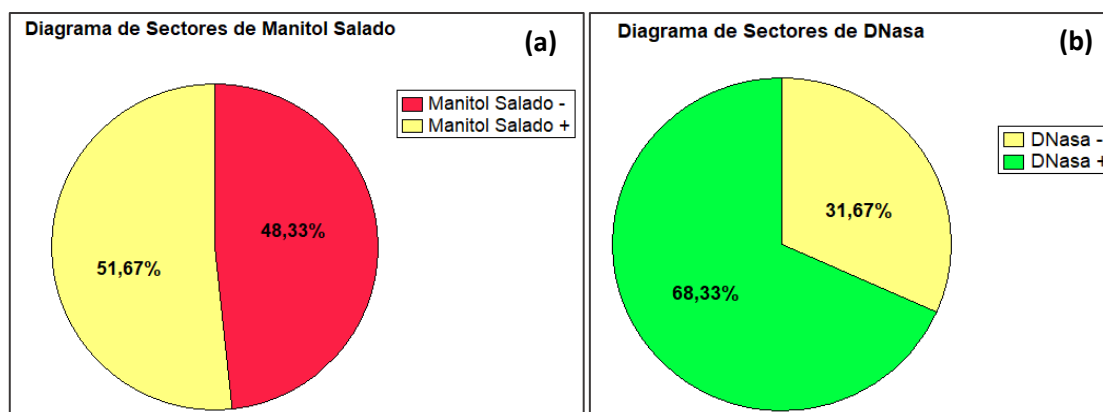
Todos los resultados obtenidos se procesaron en Microsoft Office Excel 365 para Windows, así como la obtención de las gráficas correspondientes al análisis. Por otra parte, con el programa Statgraphics Centurion XVIII se hizo un Análisis Factorial de Varianza (ANOVA Simple) para comparar los grupos de homogeneidad y analizar las diferencias significativas entre las medias mediante el Test de Mínima Diferencia de Fisher (LSD), utilizando un intervalo de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ). Además, algunas representaciones gráficas se elaboraron con el programa BioRender.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterización morfológica y bioquímica

La primera fase de este trabajo fin de grado consistió en la caracterización fenotípica de la colección de cepas de *Staphylococcus* spp., objeto de estudio de dicho trabajo. Para ello, las cepas se sometieron a dos pruebas cualitativas como son las pruebas de Manitol Salado y DNasa, donde se pone de manifiesto la presencia de capacidades metabólicas que caracterizan a las bacterias como patógenas y corroboran su pertenencia al género en estudio, y concretamente a la especie *S. aureus*. Además, con objeto de caracterizar morfológicamente las bacterias y su agrupación celular, se llevó a cabo la tinción de Gram para poder comprobar microscópicamente que cumplen las características fenotípicas del género en estudio.

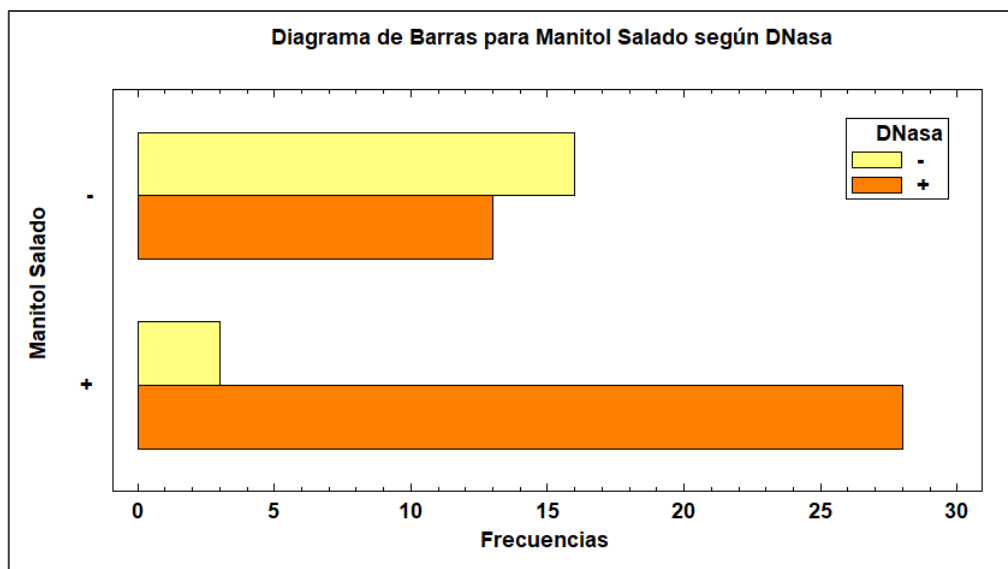
La colección de cepas de *Staphylococcus* spp., sujeto de estudio, estaba constituida por 60 bacterias. Los resultados obtenidos tras el desarrollo de las pruebas Manitol Salado y DNasa se muestran en la Figura 16. Aproximadamente el 60% de las cepas de la colección fueron capaces de fermentar el manitol en el medio Agar Manitol Salado (Manitol +), mientras que el 68% presentaron actividad DNasa (DNasa +). Las cepas capaces de crecer en Manitol Salado son capaces de tolerar condiciones de elevada concentración salina, característica que presentan las bacterias componentes de la microbiota de piel y mucosas (Kateete et al., 2010). Estas dos pruebas, junto con la presencia de enzima coagulasa, se realizan de forma específica, rápida y rentable para detectar posibles portadores de *S. aureus* en la población humana. Estas características bioquímicas han sido previamente estudiadas por otros autores y ha sido comprobado que todas las cepas de la especie *S. aureus* deben manifestar resultados positivos para las 3 pruebas. En caso de que alguna prueba no de resultado positivo, automáticamente se descarta la posibilidad de que la cepa sea *S. aureus*.



**Figura 16.** Gráfico de sectores con los porcentajes de cepas degradadoras de manitol salado (a) y con actividad DNasa (b).

*S. aureus* es positiva para las tres pruebas anteriormente mencionadas, demostrando con ellas su capacidad patógena (De Visscher et al., 2013), pero existen algunas cepas que también pueden ser positivas para una o varias pruebas. Un ejemplo de ello sería el caso de *S. epidermidis* o, incluso *Serratia marcescens*, las cuales son productoras de DNasa (Waste, 2014) y, por consiguiente, también pueden dar positivo en dicha prueba. En el caso de *S. marcescens*, se descartaría rápidamente tras la tinción de Gram, puesto que demostraría que no se trata de un estafilococo. Sin embargo, en el caso de *S. epidermidis* sería necesario confirmar con el resto de pruebas, o directamente mediante identificación molecular.

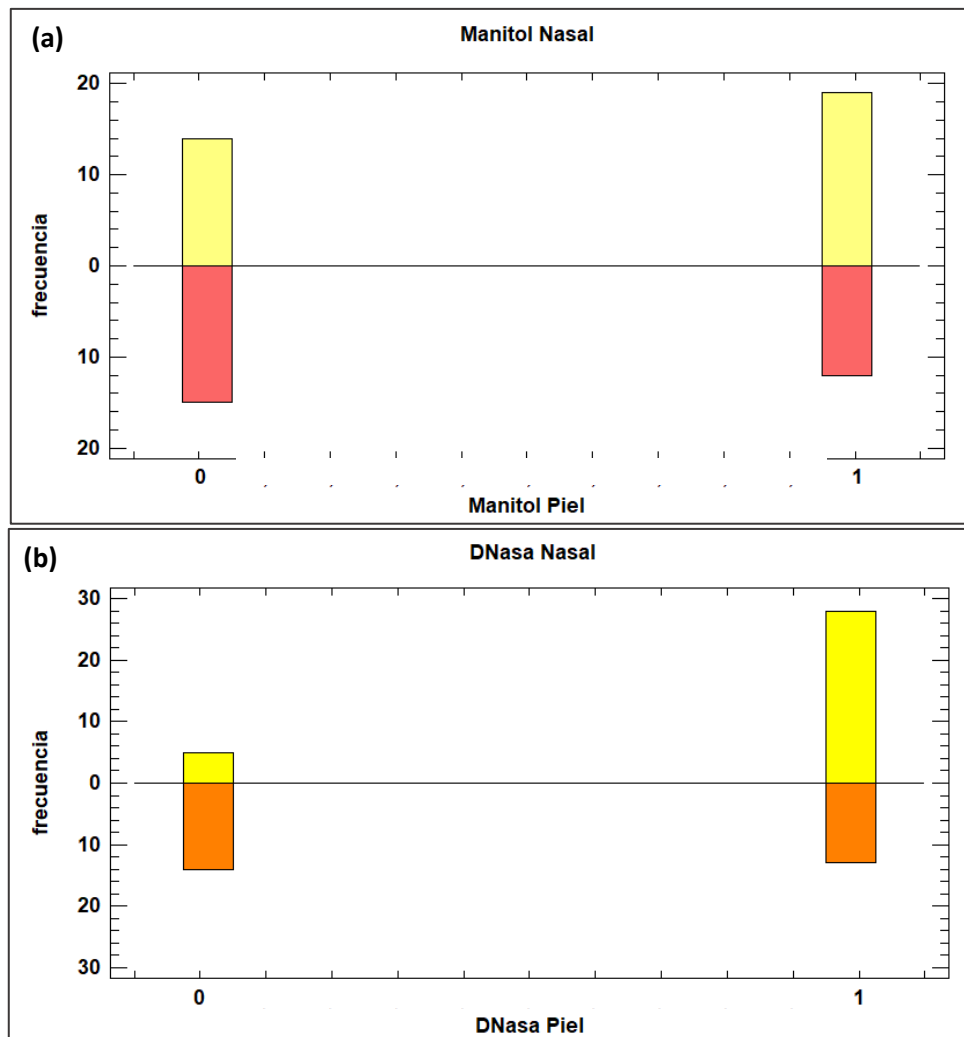
Según lo discutido anteriormente y teniendo en cuenta que el objetivo principal se basó en la búsqueda de *S. aureus* entre la colección de cepas para estudiar posteriormente antagonistas frente a dicho patógeno, se tuvo en cuenta aquellas cepas que mostraron resultados positivos para las pruebas bioquímicas: fermentadoras de manitol (Manitol +) y productoras de DNasa (DNasa +). De esta manera, se pueden descartar aquellas bacterias de la colección que no puedan ser *S. aureus*. En la Figura 17 se muestran los resultados concernientes al número de cepas, del total (60) de la colección de *Staphylococcus* spp., que son positivas para una prueba bioquímica, para las dos o para ninguna. Por lo tanto, según estos resultados, es posible descartar una gran cantidad de cepas, ya que tan solo 28 de ellas dieron resultados positivos en ambas pruebas bioquímicas. Las cepas que mostraron resultados negativos para la DNasa, pero eran capaces de fermentar manitol podrían pertenecer al género *Staphylococcus* spp. o *Enterococcus* spp., ya que muchos microorganismos pertenecientes a dichos géneros también poseen la capacidad de usarlo mediante la vía fermentativa (Bannerman y Peacock, 2006). Por otro lado, 15 cepas mostraron resultados positivos para la actividad DNasa, pero negativos para la prueba del Manitol Salado. En este caso, las cepas podrían pertenecer probablemente al género *Staphylococcus* spp. por su capacidad para producir DNasa (Waste, 2014), como se ha comentado anteriormente. Esto tiene sentido ya que las muestras han sido aisladas de piel y mucosas (Flowers y Grice, 2020).



**Figura 17.** Diagrama de barras que representa las cepas de la colección de *Staphylococcus* spp. con capacidad o no de fermentar manitol, así como con actividad DNasa y sin ella.

Como se ha comentado anteriormente, la colección de cepas de *Staphylococcus* spp. se aisló a partir de muestras de origen nasal (33/61) y epidérmico (28/61). La Figura 18 representa la frecuencia de cepas positivas y negativas para las pruebas bioquímicas estudiadas (Manitol Salado y DNasa) en función de la procedencia de las mismas (nasal o epidérmica). Los resultados muestran que las cepas capaces de fermentar manitol (Fig. 19a) y de producir enzima DNasa (Fig. 19b) proceden mayoritariamente de las muestras nasales. Esto indica que la presencia de cepas posiblemente pertenecientes a la especie *S. aureus*, considerada patogénica, es mayor en fosas nasales que en la epidermis. Estos resultados coinciden con aquellos obtenidos en el proyecto de investigación “Proyecto del Microbioma Humano” (Turnbaugh et al., 2007) desarrollado con objeto de caracterizar e identificar a los microorganismos asociados al ser humano. Los resultados obtenidos revelaron que una de las bacterias presentes en el microbioma era *S. aureus*, nuestra bacteria patógena de estudio, y determinaron que tenía una prevalencia del

29% en la zona nasal y solamente un 4% en zonas cutáneas. Por otro lado, al estudiar la presencia de *S. epidermidis* determinaron que era una bacteria que aparecía en todas las muestras cutáneas por lo que se consideró una cepa universal en el microbioma de los humanos.



**Figura 18.** Representación de las cepas de la colección de *Staphylococcus* spp. en función de su origen y del resultado obtenido en la prueba de Manitol Salado (a) y DNasa (b) mediante un diagrama de barras. Resultados negativos se corresponden con 0 y positivos con 1.

Para poder ser más exhaustivos en la caracterización de las cepas de la colección de *Staphylococcus* spp., se llevó a cabo, junto con las dos pruebas bioquímicas, la caracterización morfológica de dichas cepas mediante la realización de una Tinción de Gram. De esta manera, se comprobó si la morfología y agrupación bacteriana era típica de estafilococos. Los resultados de la tinción de Gram de cada cepa de la colección se muestran en las Tablas 4 y 5, junto con los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas.

Entre las cepas de la colección, se observaron dos bacterias con morfología bacilar, lo que podría deberse a una contaminación cruzada posiblemente en la recuperación de las cepas. Estas dos bacterias se descartaron de la selección. Finalmente, fueron 26 las cepas seleccionadas, en función de las pruebas bioquímicas y caracterización morfológica, como posibles *S. aureus* (Tablas 4 y 5, resaltado con color).

**Tabla 4.** Caracterización bioquímica y morfológica de la colección de cepas pertenecientes a *Staphylococcus* spp. procedentes de muestras nasales, mediante el estudio de la capacidad de fermentar manitol y desarrollar actividad DNasa, así como la tinción de Gram. Resultados positivos se expresan con el número 1 y negativos con 0. Las cepas seleccionadas por cumplir los requisitos específicos de la especie *S. aureus* se destacan con color rosa en la tabla.

Cepas	Manitol salado	DNasa	Tinción de Gram	Morfología
04-MSNASAL-1	1	1	Positiva	Estafilococos
07-MSNASAL-1	1	1	Positiva	Estafilococos
08-MSNASAL-2	0	0	Positiva	Estafilococos
09-MSNASAL-1	1	1	Positiva	Estafilococos
09-MSNASAL-2	0	0	Positiva	Estafilococos
10-MSNASAL-1	1	1	Positiva	Estafilococos
11-MSNASAL-1	1	1	Positiva	Estafilococos
13-MSNASAL-1	1	1	Positiva	Estafilococos
14-MSNASAL-1	1	1	Positiva	Estafilococos
16-MSNASAL-1	1	1	Positiva	Estafilococos
17-MSNASAL-1	1	1	Positiva	Estafilococos
18-MSNASAL-1	0	1	Positiva	Estafilococos
18-MSNASAL-2	1	1	Positiva	Estafilococos
21-MSNASAL-1	0	0	Positivo	Estafilococos
24-MSNASAL-1	0	1	Positivo	Estafilococos
28-MSNASAL-2	1	1	Positivo	Estafilococos
30-MSNASAL-1	0	1	Positivo	Estafilococos
32-MSNASAL-2	1	1	Positivo	Estafilococos
35-MSNASAL-1	1	1	Positivo	Estafilococos
41-MSNASAL-1	0	1	Positiva	Estafilococos
44-MSNASAL-1	0	0	Positiva	Estafilococos
45-MSNASAL-1	1	1	Positiva	Estafilococos
46-MSNASAL-1	0	1	Positivo	Estafilococos
49-MSNASAL-1	0	1	Positivo	Estafilococos
51-MSNASAL-1	0	1	Positiva	Estafilococos
60-MSNASAL-1	0	0	Positiva	Estafilococos
60-MSNASAL-2	1	1	Positiva	Estafilococos
62-MSNASAL-1	0	1	Positiva	Estafilococos
62-MSNASAL-3	0	1	Positiva	Estafilococos
66-MSNASAL-1	1	1	Positiva	Estafilococos
68-MSNASAL-1	1	1	Positiva	Estafilococos
70-MSNASAL-2	1	1	Positiva	Estafilococos
71-MSNASAL-2	1	1	Positiva	Estafilococos



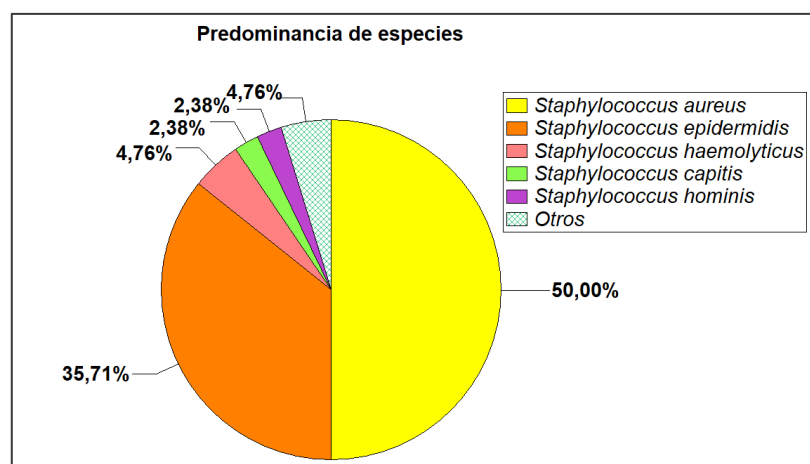
**Tabla 5.** Caracterización bioquímica y morfológica de la colección de cepas pertenecientes a *Staphylococcus* spp. procedentes de muestras cutáneas, mediante el estudio de la capacidad de fermentar manitol y desarrollar actividad DNasa, así como la tinción de Gram. Resultados positivos se expresan con el número 1 y negativos con 0. Las cepas seleccionadas por cumplir los requisitos específicos de la especie *S. aureus* se destacan con color en la tabla.

Cepas	Manitol salado	DNasa	Tinción de Gram	Morfología
10-MSPIEL-1	1	1	Positiva	Estafilococos
11-MSPIEL-2	1	1	Positiva	Estafilococos
12-MSPIEL-1	1	0	Positiva	Estafilococos
13-MSPIEL-1	1	1	Positiva	Estafilococos
25-MSPIEL-1	1	0	Positiva	Estafilococos
26-MSPIEL-1	1	0	Positiva	Bacilos
28-MSPIEL-1	1	1	Positiva	Estafilococos
28-MSPIEL-2	1	1	Positiva	Bacilos
30-MSPIEL-2	0	0	Positiva	Estafilococos
33-MSPIEL-2	0	0	Positiva	Estafilococos
36-MSPIEL-1	0	0	Positiva	Estafilococos
36-MSPIEL-2	1	1	Positiva	Bacilos
37-MSPIEL-1	0	0	Positiva	Estafilococos
39-MSPIEL-1	0	1	Positiva	Estafilococos
42-MSPIEL-1	1	1	Positiva	Estafilococos
42-MSPIEL-2	0	1	Positiva	Estafilococos
43-MSPIEL-1	0	0	Positiva	Estafilococos
44-MSPIEL-2	0	0	Positiva	Estafilococos
54-MSPIEL-1	1	1	Positiva	Estafilococos
55-MSPIEL-2	0	0	Positiva	Estafilococos
56-MSPIEL-1	0	0	Positiva	Estafilococos
58-MSPIEL-1	0	1	Positiva	Estafilococos
61-MSPIEL-2	0	0	Positiva	Estafilococos
62-MSPIEL-2	0	1	Positiva	Estafilococos
63-MSPIEL-2	0	0	Positiva	Estafilococos
68-MSPIEL-1	1	1	Positiva	Estafilococos
71-MSPIEL-1	0	0	Positiva	Estafilococos



#### 4.2. Identificación molecular

Anteriormente se ha llevado a cabo la caracterización bioquímica y morfológica de toda la colección para poder determinar de forma tentativa la predominancia del género *Staphylococcus* en la población, y concretamente del patógeno *S. aureus*. Sin embargo, para poder confirmar con rotundidad que las cepas seleccionadas bajo estos criterios corresponden genéticamente con la especie *S. aureus*, se llevó a cabo la identificación molecular. De esta manera, se podría comprobar la fiabilidad de la metodología aplicada para la determinación bioquímica de posibles *S. aureus*. Se pudo amplificar y secuenciar correctamente el ADN genómico de 42 cepas de las 60 que constituyen la colección. Según los resultados obtenidos de la secuenciación de las cepas se pudo hacer una estimación de la diversidad taxonómica de la colección (Fig. 19). Los resultados obtenidos permiten destacar que únicamente alrededor del 5% de las cepas de la colección pertenecen a géneros diferentes del sujeto de estudio, mayoritariamente *Bacillus* spp. El resto de cepas secuenciadas correspondieron al género *Staphylococcus* spp., donde la especie predominante fue *S. aureus*, representando el 50% de las cepas de la colección, seguido de *S. epidermidis* que representó el 36% aproximadamente. Tanto *S. aureus* como *S. epidermidis* son bacterias cuyo hábitat suele residir en las pieles y mucosas. La especie *S. aureus* suele colonizar preferentemente la zona nasofaríngea, mientras que las cepas de *S. epidermidis* suelen predominar en zonas epidérmicas. Este hecho coincide con los resultados obtenidos por Kwiecinski y Horswill (2020), cuya investigación se focalizó en la infección desarrollada por *S. epidermidis* en la piel. Pudieron determinar que este tipo de bacterias es capaz de colonizar diferentes ambientes y adaptarse rápidamente a ellos pudiendo competir con diferentes patógenos oportunistas para preservar su hábitat. La excepción la encontraron cuando interactuaba con *S. aureus*, ya que podía desaparecer por la supremacía del patógeno o interactuar con él para contribuir en la formación de biopelículas que faciliten una futura infección. La razón por la que *S. aureus* tiende a establecerse en la zona nasal la demostraron Sakr et al. (2018) en un experimento basado en el estudio de la colonización desarrollada por *S. aureus*. En primer lugar, el patógeno se establece en la zona nasal al poseer ligandos de unión con las células epiteliales, concretamente loricrina y citoqueratina 10. Además de la formación de moléculas adhesivas que le permiten crear biopelículas para colonizar el epitelio escamoso no ciliado que se encuentra en una zona más interna. Esto promueve su permanencia en el huésped sin causar enfermedad hasta que es capaz de atravesar las barreras naturales para continuar con la infección.



**Figura 19.** Representación de las especies bacterianas a las que pertenecen las 42 cepas identificadas del total de la colección mediante un diagrama de sectores.

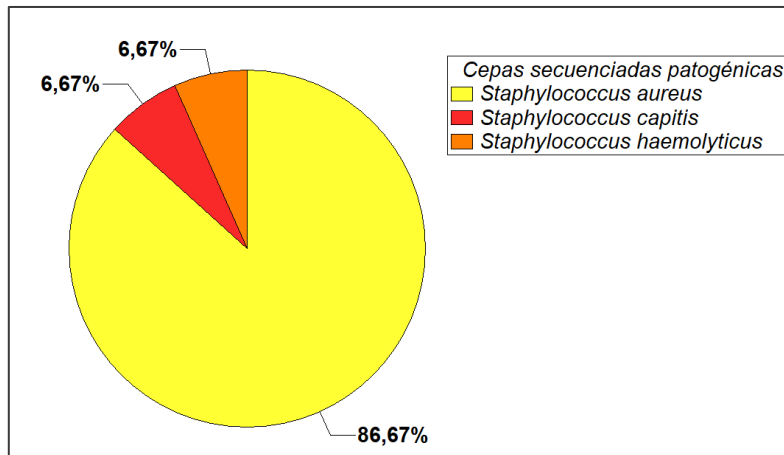
Por otro lado, de las 26 cepas seleccionadas por sus pruebas bioquímicas y morfológicas como posibles *Staphylococcus aureus*, se pudieron identificar molecularmente 15 (Tabla 6). Mediante la identificación molecular se pudo demostrar que la mayoría de las cepas seleccionadas como posibles *S. aureus*, correspondían con cepas pertenecientes a dicha especie.

**Tabla 6.** Identificación molecular de las cepas seleccionadas como posibles *Staphylococcus aureus* por sus características bioquímicas y morfológicas.

Cepa	Identificación molecular	Número de acceso	PB	Similitud (%)
04-MSNASAL-1	<i>Staphylococcus aureus</i>	<a href="#">CP076359.1</a>	903	99,89
07-MSNASAL-1	<i>Staphylococcus aureus</i>	<a href="#">CP092825.1</a>	914	99,67
10-MSNASAL-1	<i>Staphylococcus aureus</i>	<a href="#">CP060141.1</a>	912	99,89
11-MSNASAL-1	<i>Staphylococcus aureus</i>	<a href="#">CP060141.1</a>	853	100
13-MSNASAL-1	<i>Staphylococcus aureus</i>	<a href="#">CP076359.1</a>	912	99,67
17-MSNASAL-1	<i>Staphylococcus aureus</i>	<a href="#">CP092825.1</a>	904	99
45-MSNASAL-1	<i>Staphylococcus aureus</i>	<a href="#">CP076359.1</a>	897	100
60-MSNASAL-2	<i>Staphylococcus aureus</i>	<a href="#">CP076359.1</a>	899	100
68-MSNASAL-1	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<a href="#">CP052055.1</a>	897	100
70-MSNASAL-2	<i>Staphylococcus aureus</i>	<a href="#">CP076359.1</a>	856	99,88
71-MSNASAL-2	<i>Staphylococcus aureus</i>	<a href="#">CP076359.1</a>	900	100
10-MSPIEL-1	<i>Staphylococcus capitis</i>	<a href="#">CP053957.1</a>	899	100
11-MSPIEL-2	<i>Staphylococcus aureus</i>	<a href="#">CP094443.1</a>	800	100
54-MSPIEL-1	<i>Staphylococcus aureus</i>	<a href="#">CP094443.1</a>	900	100
68-MSPIEL-1	<i>Staphylococcus aureus</i>	<a href="#">CP094443.1</a>	883	100

\*PB: número de pares de bases de la secuencia de ADN genómico analizada.

Según los resultados mencionados anteriormente sobre la identificación de las cepas pertenecientes a la colección de *Staphylococcus* spp., se realizó un estudio de predominancia de especies en dicha colección. La Figura 20 muestra el porcentaje representativo de cada especie hallada en la colección de cepas de *Staphylococcus* spp. Estos datos demuestran que aplicando el protocolo de identificación de posibles *S. aureus*, previamente descrito en este trabajo y basado en las pruebas bioquímicas y morfológicas, la fiabilidad ronda el 87%. Esto se puede afirmar puesto que 13 de las 15 cepas seleccionadas por ser positivas para Manitol Salado y DNasa, además de poseer una morfología celular acorde con el grupo sujeto de búsqueda, fueron identificadas como *S. aureus*.



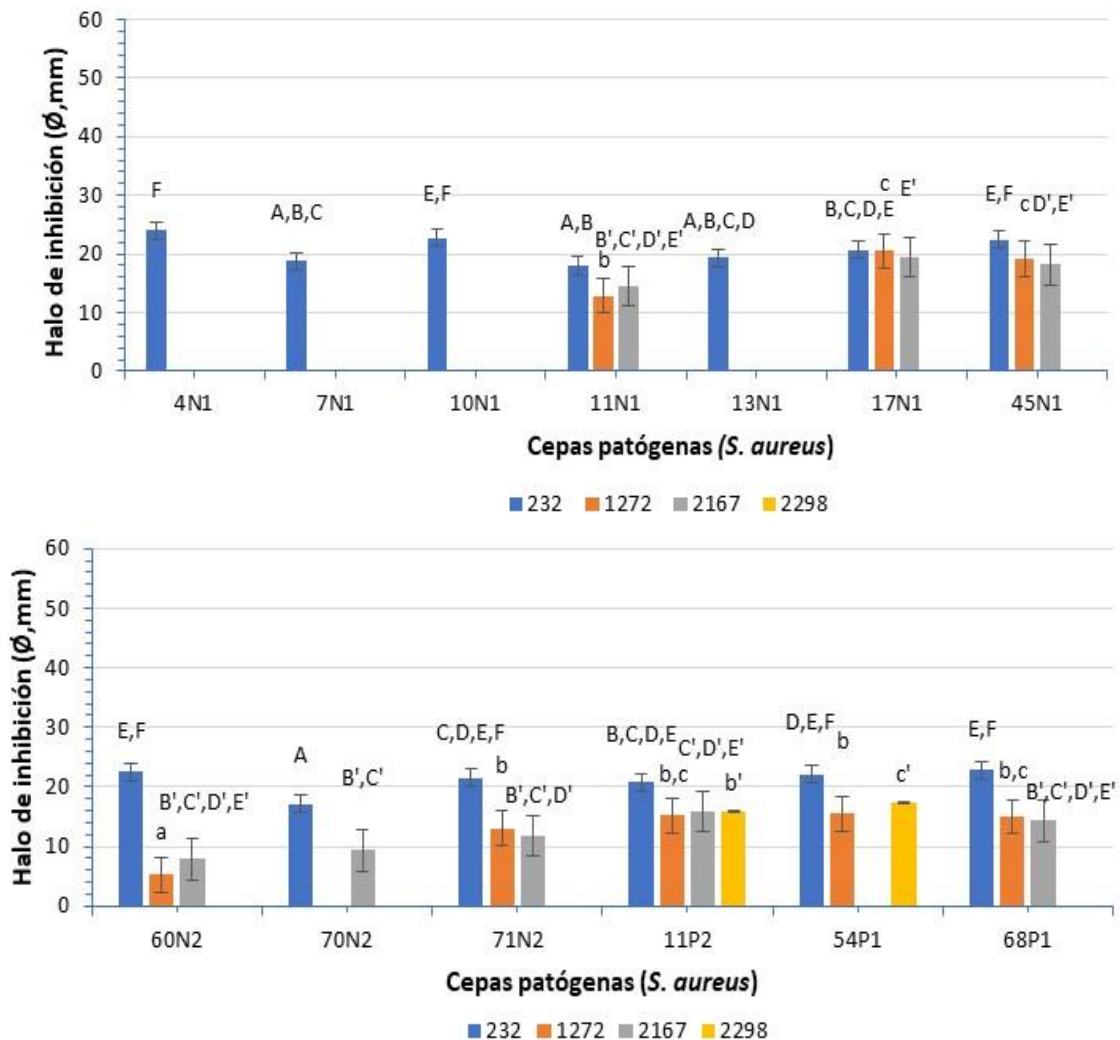
**Figura 20.** Representación de las especies determinadas entre las 15 cepas seleccionadas como posibles *S. aureus* por sus características bioquímicas y morfológicas, mediante un diagrama de sectores.

#### 4.3. Estudio de antagonismo

Como se ha comentado a lo largo de este trabajo, *S. aureus* es una especie patógena que supone un riesgo para los portadores sanos por su capacidad infectiva. Además, muchas cepas de esta especie producen enterotoxinas que originan graves cuadros clínicos a nivel intestinal. Sin embargo, el problema más temerario con este microorganismo surge por la resistencia a antibióticos que vienen desarrollando en los últimos años (Algammal et al., 2020). Por lo tanto, se justifica de esta manera la necesidad de buscar herramientas alternativas a los antibióticos tradicionales para poder hacer frente a este problema y frenar la infección originada por *S. aureus*. En la tercera fase de estudio de este Trabajo Fin de Grado se realizó la evaluación de la eficacia supresiva de 8 microorganismos, previamente seleccionados por su potencial antagonista, frente a las 13 cepas de *S. aureus* anteriormente identificadas. Los 8 microorganismos con potencial antagonista fueron 4 bacterias, 2 actinobacterias y 2 hongos (ver apartado 3.4). Dentro de los antagonistas seleccionados para realizar los enfrentamientos, podemos destacar que ya hay estudios realizados que establecen alguna relación negativa hacia el patógeno *S. aureus*.

Los resultados obtenidos se representaron en las Figuras 21 y 22, donde se muestra el halo de inhibición (mm) que provoca cada antagonista frente a cada bacteria patógena. La Figura 21 muestra los resultados concernientes al enfrentamiento de los antagonistas 232, 1272, 2167 y 2298 frente a las bacterias patógenas, mientras que la Figura 22 muestra los resultados obtenidos del enfrentamiento con los antagonistas 2303, 2929, 4193 y 4199. Las bacterias patógenas se agruparon en dos tandas: en la tanda 1 se evaluó la capacidad supresora de los antagonistas frente a las cepas patógenas 4N1, 7N1, 10N1, 11N1, 13N1, 17N1 y 45N1; mientras que en la tanda 2 fueron evaluadas las cepas 60N2, 70N2, 71N2, 11P2, 54P1 y 68P1. De forma general se puede observar que el antagonista 232, cuya identificación molecular es *Alcaligenes faecalis*, presenta un amplio efecto supresor ya que es capaz de inhibir, en mayor o menor grado, a todas las cepas patógenas seleccionadas (Fig. 21). El estudio realizado por Ilham et al. (2013) reveló la actividad antimicrobiana de esta cepa contra bacterias Gram positivas y especularon sobre el origen de dicho efecto antimicrobiano asociándolo a la producción de una sustancia antimicrobiana no proteica que secreta. En dicho estudio, *A. faecalis* fue capaz de inhibir el crecimiento de *S. aureus* generando halos de inhibición de unos 16 mm. Los resultados obtenidos en este Trabajo Fin de Grado concuerdan con los expuestos anteriormente, aunque fueron ligeramente mayores, ya que el promedio de halo de inhibición en este caso fue de 20 mm aproximadamente. Esto podría deberse a que en el estudio realizado por Ilham et al. (2013) no se utilizó a *A. faecalis* directamente, sino que los enfrentamientos se efectuaron con un

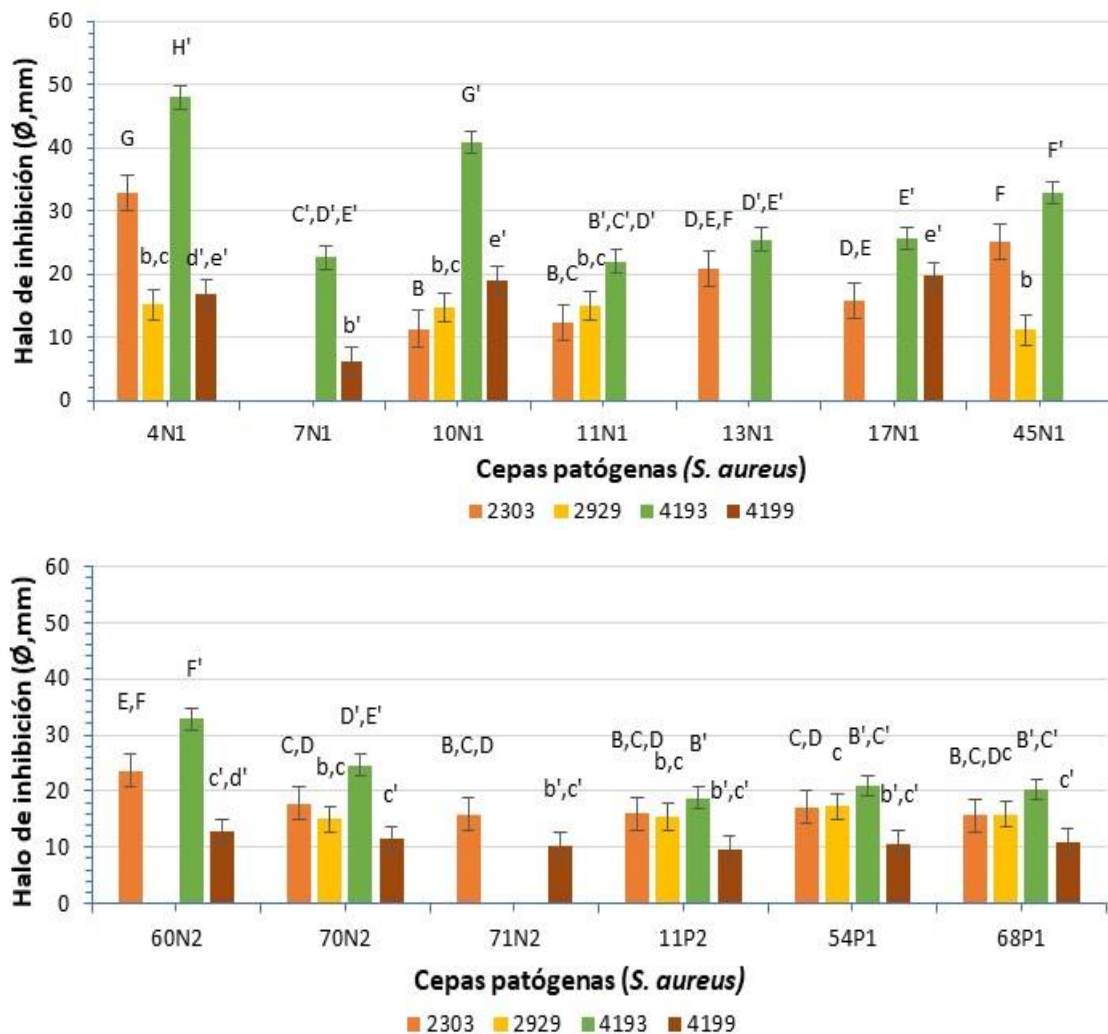
extracto acelar de dicha actinobacteria. Esto revelaría que dicho antagonista es capaz de inhibir al patógeno mediante la liberación de sustancias antimicrobianas como mecanismo supresivo. En el caso opuesto se encuentra el antagonista 2298 (Fig. 21), previamente identificado como *Bacillus megaterium*, que presentó un estrecho efecto supresor mostrando inhibición únicamente frente a dos de las cepas de *S. aureus*, 11P2 y 54P1. *B. megaterium* es una bacteria capaz de producir una gran variedad de compuestos antimicrobianos y por ello, se selecciona como un potencial antagonista (Sun et al., 2020). En cambio, respecto a *S. aureus* no hay estudios que muestren inhibiciones significativas. Por otro lado, Al-Thubiana et al. (2018) realizaron caracterizaron un péptido antimicrobiano secretado por *B. megaterium*, y estudiaron su capacidad de inhibición frente a algunos patógenos, entre ellos *S. aureus*. Los resultados coinciden con los obtenidos en este trabajo mostrando zonas de inhibición muy leves o prácticamente nulas. Por ello, se puede afirmar que *B. megaterium* no presentó actividad antimicrobiana contra los patógenos del presente estudio.



**Figura 21.** Efecto inhibitorio, expresado como halo de inhibición (mm), de los antagonistas 232, 1272, 2167 y 2298 frente a la primera tanda de patógenos constituida por: 4N1, 7N1, 10N1, 11N1, 13N1, 17N1 y 45 N1 (a); y frente a la segunda constituida por: 60N2, 70N2, 71N2, 11P2, 54P1 y 68P1 (b). Se muestra la media de tres repeticiones. Letras distintas indican valores significativamente diferentes según el test de mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) en P < 0,05.

En la segunda tanda de antagonistas enfrentados frente a *S. aureus* se puede observar que el microorganismo con capacidad de inhibición más destacable fue el hongo no identificado 4193,

que ejerció un considerable efecto supresor frente a todas las cepas patógenas, generando en algunos casos halos de inhibición superiores a 30 mm (Fig. 22). Por otro lado, cabe destacar también la acción del antagonista 2303, identificado como *Bacillus aerophilus*, que fue capaz de generar también, en algunos casos, halos de inhibición que rondaron los 30 mm. Respecto a esta cepa no se dispone de estudios previos de antagonismo con patógenos humanos, pero sí se realizaron estudios para su uso como probióticos en peces. En este caso, comprobaron que tenía un gran efecto antimicrobiano contra bacterias gram negativas como *Providencia rettgerio* y *Aeromonas hydrophila* (patógenos destacados en la acuicultura) (Lam et al., 2021). Al igual que *B. aerophilus*, existen otras especies del género *Bacillus* spp. que han sido relacionadas con antibiosis. Una de las cepas recientemente estudiadas es *B. tequilensis*, una bacteria capaz de producir diferentes proteínas y lipopéptidos con acción antibacteriana. Se pudo aislar de muestras humanas y es capaz de inhibir a nuestro patógeno de estudio en el intestino cuando hay una intoxicación alimenticia. Esta bacteria es considerada un probiótico, al igual que *B. subtilis* que utiliza un mecanismo similar al de *B. tequilensis* para impedir la colonización de patógenos como *S. aureus* a nivel intestinal (Nataraj y Mallappa, 2021).



**Figura 22.** Efecto inhibitorio, expresado como halo de inhibición (mm), de los antagonistas 2303, 2929, 4193 y 4199 frente a la primera tanda de patógenos constituida por: 4N1, 7N1, 10N1, 11N1, 13N1, 17N1 y 45 N1 (a); y frente a la segunda constituida por: 60N2, 70N2, 71N2, 11P2, 54P1 y 68P1 (b). Se muestra la media de tres repeticiones. Letras distintas indican valores significativamente diferentes según el test de mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) en  $P < 0,05$ .

Los antagonistas estudiados en este ensayo manifiestan un efecto inhibitorio moderado frente a las cepas patógenas seleccionadas, generando halos de inhibición en torno a 20 mm de diámetro. Abdullah et al. (2018), indicaron que un microorganismo ejerce actividad antimicrobiana cuando el diámetro del halo de inhibición es mayor a 9 mm. Por lo tanto, de forma global se puede determinar que la gran mayoría de antagonistas utilizados en este Trabajo Fin de Grado para frenar el crecimiento de *S. aureus* han mostrado resultados positivos, destacando tres de ellos por su gran efecto supresor: *Alcaligenes faecalis* 232, *Bacillus aerophilus* 2303 y 4193. Este Trabajo pone de manifiesto que el proceso de compostaje es una fuente idónea de recursos microbianos para la búsqueda de microorganismos capaces de inhibir el crecimiento de patógenos tales como *S. aureus*. Esto, permite encontrar una herramienta alternativa al uso de antibióticos para hacer frente al desarrollo de cepas con resistencias a los antibióticos tradicionales, y abre nuevas puertas de investigación al respecto. En esta línea, una posible vía que emplee cromatografía de alta resolución sobre los extractos acelulares de las cepas con potencial antagonista aisladas en el presente estudio podría ahondar en el conocimiento de que sustancias antimicrobianas son las que generan el potente efecto inhibitorio sobre los patógenos humanos.

## 5. CONCLUSIONES

---

En base a los resultados descritos en el presente trabajo, se extrajeron las siguientes conclusiones:

- I. La realización de las pruebas de Manitol Salado y DNasa, para determinar la capacidad de fermentar manitol y de producir enzima DNasa, permitió identificar adecuadamente la presencia de *S. aureus* con un 87% de fiabilidad.
- II. La presencia de bacterias pertenecientes al género *Staphylococcus* spp. en el ser humano es muy elevada, siendo predominante la especie patógena *S. aureus* en la zona nasofaríngea, mientras que en las zonas cutáneas circundantes se predomina mayoritariamente *S. epidermidis*.
- III. La actinobacteria *Alcaligenes faecalis* 232, la bacteria *Bacillus aerophilus* 2303 y el hongo mesófilo 4193, aislados del proceso de compostaje de residuos vegetales, presentan un elevado potencial antagonista frente a *S. aureus*, puesto que son capaces de inhibir considerablemente el crecimiento de las trece cepas de dicha especie estudiadas en este trabajo.
- IV. El proceso de compostaje representa una fuente de recursos microbianos idónea para la búsqueda de antagonistas capaces de inhibir el crecimiento de *S. aureus*, como herramienta alternativa al uso de antibióticos tradicionales frente a los cuales muchas cepas de la especie en cuestión están desarrollando mecanismos de resistencia.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Abdolmaleki, Z., Mashak, Z., y Safarpour Dehkordi, F. 2019. Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic resistance in the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from hospital cockroaches. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1), 1-14.
2. Abdullah S.A. Al-Thubiani, Yahia A. Maher, Adel Fathi, Mohammed A.S. Abourehab, Mohammed Alarjah, Mohd S.A. Khan y Saleh B. Al- Ghamdi. 2018. Identification and characterization of a novel antimicrobial peptide compound produced by *Bacillus megaterium* strain isolated from oral microflora. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26(8), 1089-1097.
3. Adame-Gómez, R., Castro-Alarcón, N., Vences-Velázquez, A., Toribio-Jiménez, J., Pérez-Valdespino, A., Leyva-Vázquez, M.A., y Ramírez-Peralta, A. 2020. Genetic diversity and virulence factors of *S. aureus* isolated from food, humans, and animals. *International journal of Microbiology*, 2020.
4. Algammal, A.M., Hetta, H.F., Elkelish, A., Alkhalifah, D.H.H., Hozzein, W.N., Batiha, G.E.S., El Nahhas, N., y Mabrok, M.A. 2020. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): one health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. *Infection and Drug Resistance*, 13, 3255.
5. Allaouchiche, B., Jaumain, H., Zambardi, G., Chassard, D., y Freney, J. 1999. Clinical impact of rapid oxacillin susceptibility testing using a PCR assay in *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Journal of Infectan*, 39(3), 198-204.
6. Al-Thubiani, A.S., Maher, Y.A., Fathi, A., Abourehab, M.A., Alarjah, M., Khan, M.S., y Al-Ghamdi, S.B. 2018. Identification and characterization of a novel antimicrobial peptide compound produced by *Bacillus megaterium* strain isolated from oral microflora. *Saudi pharmaceutical journal*, 26(8), 1089-1097.
7. Al-Thubiani, A.S., Maher, Y.A., Fathi, A., Abourehab, M.A., Alarjah, M., Khan, M.S., y Al-Ghamdi, S.B. 2018. Identification and characterization of a novel antimicrobial peptide compound produced by *Bacillus megaterium* strain isolated from oral microflora. *Saudi pharmaceutical journal*, 26(8), 1089-1097.
8. Bai, A.D., Findlater, A., Irfan, N., Singhal, N., y Loeb, M. 2021. Cefazolin versus cloxacillin as definitive antibiotic therapy for methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* spinal epidural abscess: a retrospective cohort study. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 58(5), 106429.
9. Bannerman, T.L., y Peacock, S.J. 2006. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci. En: P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry and M.A. Pfaller (Eds), *Manual of clinical microbiology* (Ed. 9). ASM Press, Washington, DC., 1, pp. 390-411.
10. Belheouane, M., Hermes, B.M., Van Beek, N., Benoit, S., Bernard, P., Drenovska, K., Gerdes, S., Gläser, R., Goebeler, M., Günther, C., von Georg, A., Hammers, C.M., Holtsche, M.M., Homey, B., Horváth, O.N., Hübner, F., Linnemann, B., Joly, P, Márton, D., Patsatsi, A., Pföhler, C., Sárdy, M., Huilaja, L., Vassileva, S., Zillikens, D., Ibrahim, S., Sadik, C.D., Schmidt, E. y Baines, J. F. 2022. Characterization of the skin microbiota in bullous pemphigoid patients and controls reveals novel microbial indicators of disease. *Journal of Advanced Research*, In Press.
11. Blair, J.E., y Williams, R.E. 1961. Phage typing of staphylococci. *Bulletin of the World Health Organization*, 24(6), 771–784.
12. Bokarewa, M.I., Jin, T., Tarkowski, A. 2006. *Staphylococcus aureus*: Staphylokinase. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38 (4), 504–509.



13. Bouras, D., Doudoulakakis, A., Tsofia, M., Vaki, I., Giormezis, N., Petropoulou, N., Lebessi, E., Gennimata, V., Tsakris, A., Spiliopoulou, I., y Michos, A. 2018. Staphylococcus aureus osteoarticular infections in children: an 8-year review of molecular microbiology, antibiotic resistance and clinical characteristics. *Journal of medical microbiology*, 67(12), 1753–1760.
14. Breitenbach Barroso Coelho, L.C., Marcelino dos Santos Silva, P., Felix de Oliveira, W., De Moura, M.C., Viana Pontual, E., Soares Gomes, F., Guedes Paiva, P.M., Napoleao, M.T., y dos Santos Correia, M.T. 2018. Lectins as antimicrobial agents. *Journal of applied microbiology*, 125(5), 1238-1252.
15. Brøndserud, M.B., Rosenvinge, F.S., Høilund-Carlsen, P.F., y Hess, S. 2019. Clinical value of FDG-PET/CT in bacteremia of unknown origin with catalase-negative gram-positive cocci or *Staphylococcus aureus*. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 46(6), 1351-1358.
16. Chahin, A.B., Opal, J.M., y Opal, S.M. 2018. Whatever happened to the Shwartzman phenomenon?. *Innate immunity*, 24(8), 466-479.
17. Cheung, G.Y., Bae, J.S., y Otto, M. 2021. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12(1), 547-569.
18. Cisterna, R., y Madriaga, L. 2015. Patogenia de la infección por *Staphylococcus aureus*. *Dep Microbiol e Inmunol Fac Med Univ del País Vasco/EHU Bilbao*, 11(1), 11-7.
19. Cowan, S. T., Shaw, C., y Williams, R.E.O. 1954. Type strain for *Staphylococcus aureus* Rosenbach. *Microbiology*, 10(1), 174-176.
20. D'Antonio, F., Arias, A.P., Jaureguizar, M.D.L.P., Castagnotti, I., Gómez, L., Sapia, E.Y., y Dastugue, M. 2014. Piomiositis bilateral de muslo por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente proveniente de la comunidad. *Archivos argentinos de pediatría*, 112(6), 273-276.
21. Darboe, S., Dobreniecki, S., Jarju, S., Jallow, M., Mohammed, N.I., Wathuo, M., Ceesay, B., Tweed, S., Roy, R.B., Okomo, U., Kwambana-Adams, B., Antonio, M., Bradbury, R.S., de Silva, T.I., Forrest, K., Roca, A., Lawal, B.J., Nwakanma, D., y Secka, O. 2019. Prevalence of Pantón-Valentine leukocidin (PVL) and antimicrobial resistance in community-acquired clinical *Staphylococcus aureus* in an urban Gambian hospital: a 11-year period retrospective pilot study. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 170.
22. De Visscher, A., Haesebrouck, F., Piepers, S., Vanderhaeghen, W., Supré, K., Leroy, F., Van Coillie, E., y De Vliegher, S. 2013. Assessment of the suitability of mannitol salt agar for growing bovine-associated coagulase-negative staphylococci and its use under field conditions. *Research in veterinary science*, 95(2), 347-351.
23. Del Giudice, P. 2020. Skin infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Acta dermatovenereologica*, 100(9), 208-215.
24. Divyakolu, S., Chikkala, R., Ratnakar, K.S., y Sritharan, V. 2019. Hemolysins of *Staphylococcus aureus*—An update on their biology, role in pathogenesis and as targets for anti-virulence therapy. *Advances in Infectious Diseases*, 9(2), 80-104.
25. Djellel, N., y Larous, L. 2018. Biocontrol Activity of *Bacillus megaterium* against the Fungus *Aspergillus flavus* Isolated from Poultry Feeds in Algeria. *Annual Research & Review in Biology*, 23(3), 1-7.
26. El Consorcio del Proyecto del Microbioma Humano. 2012. Estructura, función y diversidad del microbioma humano sano. *Naturaleza* 486, 207–214.
27. El-Baz, E., Elgaml, A., y Barwa, R. 2021. Impact of the global regulator sara on toxins production in *Staphylococcus aureus*: SarA regulation of toxins in *S. aureus*. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 11(2), 4155.
28. Flemming, H.C., y Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, 8(9), 623-633.

29. Flowers, L., y Grice, E.A. 2020. The skin microbiota: balancing risk and reward. *Cell host & microbe*, 28(2), 190-200.
30. Fraunholz, M., y Sinha, B. 2012. Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 43.
31. Gallego-Goyanes, A., y Caeiro-Rey, J.R. 2017. Tratamiento de la osteomielitis crónica de tibia: a propósito de un caso y revisión bibliográfica. *Revista Colombiana de Ortopedia y Traumatología*, 31(1), 41-45.
32. Gallego-Goyanes, A., y Caeiro-Rey, J.R. 2017. Tratamiento de la osteomielitis crónica de tibia: a propósito de un caso y revisión bibliográfica. *Revista Colombiana de Ortopedia y Traumatología*, 31(1), 41-45.
33. Galli, L., Brusa, V., y Pellicer, K. 2019. *Staphylococcus aureus*.
34. García, F.I.H., Gay, M.D.C.G., Fontanil, M.G., y Nieto, J.A.S. 2011. *Staphylococcus aureus* subespecie aureus catalasa negativa: un nuevo caso en España. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 29(9), 708-709.
35. Ghoreishi, F.S., Roghanian, R., y Emtiazi, G. 2022. Simultaneous Production of Antibacterial Protein and Lipopeptides in *Bacillus tequilensis*, Detected by MALDI-TOF and GC Mass Analyses. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-12.
36. Gor, V., Hoshi, M., Takemura, A.J., Higashide, M., Romero, V.M., Ohniwa, R.L., y Morikawa, K. 2021. Virulence reversion in *Staphylococcus aureus*. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings*, 66(1), 24.
37. Gordillo Altamirano, F.L., y Barr, J.J. 2019. Phage therapy in the postantibiotic era. *Clinical microbiology reviews*, 32(2), 66-18.
38. Gordon, C.P., Olson, S.D., Lister, J.L., Kavanaugh, J.S., y Horswill, A.R. 2016. Truncated autoinducing peptides as antagonists of *Staphylococcus lugdunensis* quorum sensing. *Journal of medicinal chemistry*, 59(19), 8879-8888.
39. Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., y Wang, Y. 2020. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 107.
40. Gupta, K.K., y Rana, D. 2018. Bioactivity of *Alcaligenes* spp. isolated from cow dung against certain human pathogens. *Environment Conservation Journal*, 19(1 y 2), 59-64.
41. Hanselman, B.A., Kruth, S.A., Rousseau, J., y Weese, J.S. 2009. Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets. *The Canadian Veterinary Journal*, 50(9), 954.
42. Harris, L.G., Foster, S. J., y Richards, R. G. 2002. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *European cells & materials*, 4, 39–60.
43. Heim, C.E., Bosch, M.E., Yamada, K.J., Aldrich, A.L., Chaudhari, S.S., Klinkebiel, D., Gries, C.M., Alqarzaee, A.A., Li, Y., Thomas, V.C., Seto, E., Karpf, A.R., y Kielian, T. 2020. Lactate production by *Staphylococcus aureus* biofilm inhibits HDAC11 to reprogramme the host immune response during persistent infection. *Nature Microbiology*, 5, 1271–1284.
44. Hodille, E., Plesa, A., Bourrelly, E., Belmont, L., Badiou, C., Lina, G., y Dumitrescu, O. 2020. Staphylococcal Panton–Valentine leucocidin and gamma haemolysin target and lyse mature bone marrow leucocytes. *Toxins*, 12(11), 725.
45. Hong, C.J., Hyunju, L., y Hwa, C.E. 2021. Antimicrobial Resistance and Molecular Analysis of *Staphylococcus aureus* in Staphylococcal Scalded Skin Syndrome among Children in Korea. *Journal of Korean Medical Science*, 36(3), 1-9.
46. Ilham, Z., Abdellah, H., Wifak, B., Mohammed, I., y Saad, I. 2013. A novel *Alcaligenes faecalis* antibacterial-producing strain isolated from a Moroccan tannery waste. *African Journal of Microbiology Research*, 7(47), 5314-5323.
47. Instituto Nacional de Estadística. 2020. Defunciones según la causa de muerte en 2020.
48. Jurado, M., Lopez M.J., Suarez-Estrella, F., Vargas-Garcia, M.C., Lopez-Gonzalez, J.A. y Moreno, J. 2014. Exploiting composting biodiversity: study of the persistent and

- biotechnologically relevant microorganisms from lignocellulose-based composting. *Bioresource Technology*, 162, 283-293.
49. Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., López, M.J., López-González, J.A., y Moreno, J. 2019. Bioprospecting from plant waste composting: Actinobacteria against phytopathogens producing damping-off. *Biotechnology Reports*, 23, 00354.
  50. Kahn, F., Resman, F., Bergmark, S., Filiptsev, P., Nilson, B., Gilje, P., y Rasmussen, M. 2021. Time to blood culture positivity in *Staphylococcus aureus* bacteraemia to determine risk of infective endocarditis. *Clinical Microbiology and Infection*, ed. 7, 27(9), 1345.
  51. Kateete, D.P., Kimani, C.N., Katabazi, F.A., Okeng, A., Okee, M.S., Nanteza, A., Joloba, M.L., y Najjuka, F.C. 2010. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals of Clinical Microbiology Antimicrobials*, 9, 23.
  52. Khwen, N.N., Authman, S.H., y AL-Marjani, M.F. 2021. Purification and Characterization of Thermo Stable DNase of *Staphylococcus aureus* Isolated from Different Clinical Source. *Medico-Legal Update*, 21(2).
  53. Kimelman, H., y Shemesh, M. 2019. Probiotic bifunctionality of *Bacillus subtilis*—rescuing lactic acid bacteria from desiccation and antagonizing pathogenic *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms*, 7(10), 407.
  54. Kwiecinski, J.M., y Horswill, A.R. 2020. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms. *Current opinion in microbiology*, 53, 51-60.
  55. Kwok, Y.L.A., Gralton, J., y McLaws, M.L. 2015. Face touching: a frequent habit that has implications for hand hygiene. *American journal of infection control*, 43(2), 112-114.
  56. Lam, V.B., Meyer, T., Arias, A.A., Ongena, M., Oni, F.E., y Höfte, M. 2021. Bacillus cyclic lipopeptides iturin and fengycin control rice blast caused by *Pyricularia oryzae* in potting and acid sulfate soils by direct antagonism and induced systemic resistance. *Microorganisms*, 9(7), 1441.
  57. Lam, V.B., Meyer, T., Arias, A.A., Ongena, M., Oni, F.E., y Höfte, M. 2021. Bacillus cyclic lipopeptides iturin and fengycin control rice blast caused by *Pyricularia oryzae* in potting and acid sulfate soils by direct antagonism and induced systemic resistance. *Microorganisms*, 9(7), 1441.
  58. Lee, A.S., De Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., y Harbarth, S. 2018. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature reviews Disease primers*, 4(1), 1-23.
  59. Leung, A.K., Barankin, B., y Leong, K. 2018. Staphylococcal-scalded skin syndrome: evaluation, diagnosis, and management. *World Journal of Pediatrics*, 14(2), 116-120.
  60. Liu, G. 2009. Molecular Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Infection. *Pediatric Research* 65, 71–77.
  61. Llop Hernandez, A. 2001. Microbiología y Parasitología Médicas. En: Martínez Izquierdo, A.M., y Pérez Amarillo, J.I.P., (Eds). *Ciencias médicas*. Habana: Editorial de Ciencias Médica, 168-178.
  62. Llop, V. D. Z., Valdés-Dapena, V., y Zuazo, S. 2001. Microbiología y parasitología médicas Tomo III. En: Pelayo Durán, L., (Eds). *Ciencias médicas*. Habana: Editorial Ciencia Medicas, 76.
  63. MacLean, R.C., y San Millan, A. 2019. The evolution of antibiotic resistance. *Science*, 365(6458), 1082-1083.
  64. Manzani Baldi, J.R., y Rodríguez, G. 2011. Fascitis necrosante bilateral de diseminación hematogena por *Staphylococcus aureus*: Caso pediátrico. *Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana*, 37(2), 171-175.
  65. Moza, B., Varma, A.K., Buonpane, R.A., Zhu, P., Herfst, C. A., Nicholson, M. J., Wilbuer, A.K., Seth, N.P., Wucherpferning, K.W., McCormick, J.K., Kranz, D.M., y Sundberg, E.J.

2007. Structural basis of T-cell specificity and activation by the bacterial superantigen TSST-1. *The EMBO journal*, 26(4), 1187-1197.
66. Murray, C.J., Ikuta, K.S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G.R., Gray, A., y Naghavi, M. 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655.
  67. Myles, I.A., Datta, S.K. 2012. *Staphylococcus aureus*: an introduction. *Semin Immunopathol*, 34, 181-184.
  68. Nakamura, Y., Kanemaru, K., Shoji, M., Totoki, K., Nakamura, K., Nakaminami, H., Nakase, K., Noguiche, N., y Fukami, K. 2020. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C enhances epidermal penetration by *Staphylococcus aureus*. *Scientific reports*, 10(1), 1-11.
  69. Nataraj, B.H., y Mallappa, R.H. 2021. Antibiotic resistance crisis: an update on antagonistic interactions between probiotics and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Current Microbiology*, 78(6), 2194-2211.
  70. Ngor, C., Hall, L., Dean, J.A., y Gilks, C.F. 2021. Factors associated with pyomyositis: A systematic review and meta-analysis. *Tropical Medicine & International Health*, 26(10), 1210-1219.
  71. Niehus, R., Oliveira, N.M., Li, A., Fletcher, A.G., y Foster, K.R. 2021. The evolution of strategy in bacterial warfare via the regulation of bacteriocins and antibiotics. *Elife*, 10, 69756.
  72. Oliveira, D.C., Tomasz, A., y de Lencastre, H. 2002. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet infectious diseases*, 2(3), 180-189.
  73. Pasachova Garzón, J., Ramírez Martínez, S., y Muñoz Molina, L. 2019. *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Nova*, 17(32), 25-38.
  74. Pereyra Vidoni, C.E. 2017. Caracterización molecular de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes adquiridos en la comunidad, mediante la técnica de multilocus sequence typing (mlst).
  75. Pérez, D., y García-Godos, P. 2019. Identificación del agente causal del marchitamiento en *Caesalpinia spinosa* tara y el efecto antagónico de aislados de *Bacillus spp.* y *Trichoderma sp.* *Ecología Aplicada*, 18(1), 51-57.
  76. Portillo, M.E. y del Pozo, J.L. 2018. Infecciones por estafilococo. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(49), 2890-2894.
  77. Ramesh, D., Souissi, S., y Ahamed, T.S. 2017. Effects of the potential probiotics *Bacillus aerophilus* KADR3 in inducing immunity and disease resistance in *Labeo rohita*. *Fish & shellfish immunology*, 70, 408-415.
  78. Ricciardi, B.F., Muthukrishnan, G., Masters, E., Ninomiya, M., Lee, C.C., y Schwarz, E.M. 2018. *Staphylococcus aureus* evasion of host immunity in the setting of prosthetic joint infection: biofilm and beyond. *Current reviews in musculoskeletal medicine*, 11(3), 389-400.
  79. Rué, M.T., Usandizaga, F.C., Fontecha, C.G., Comas, R.B., y Llop, F.M. 2009. Fascitis necrosante por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina adquirido en la comunidad productor de leucocidina de Pantón-Valentine. *Anales de Pediatría*, 70(4), 374-378.
  80. Sakr, A., Brégeon, F., Mège, J.L., Rolain, J.M., y Blin, O. 2018. *Staphylococcus aureus* nasal colonization: an update on mechanisms, epidemiology, risk factors, and subsequent infections. *Frontiers in microbiology*, 9, 2419.
  81. San Fulgencio, N.S., Suarez-Estrella, F., López, M.J., Jurado, M.M., López-González, J.A., y Moreno, J.J.B.C. 2018. Biotic aspects involved in the control of damping-off producing agents: the role of the thermotolerant microbiota isolated from composting of plant waste. *Biological Control*, 124, 82-91.

82. Schultz, M., Mohammad, M., Nguyen, M.T., Hu, Z., Jarneborn, A., Wienken, C. M., Froning, M., Pullerits, R., Ali, A., Hayen, H., Götz, F., y Jin, T. 2022. Lipoproteins cause bone resorption in a mouse model of *Staphylococcus aureus* septic arthritis. *Frontiers in microbiology*, 13.
83. Seija, V. 2006. Género *Staphylococcus*. Temas de Bacteriología y Virología Médica. En: Seija, V., (Ed). FEFMUR, 2 (16), 257–271.
84. Selwyn, S. 2018. Interference And Antagonism Between Skin Microorganisms. *Bacterial interference*, 73-90.
85. Shettigar, K., y Murali, T.S. 2020. Virulence factors and clonal diversity of *Staphylococcus aureus* in colonization and wound infection with emphasis on diabetic foot infection. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 39(12), 2235-2246.
86. Silva, I.F.P., Serruya Júnios, J.M.H., Goés, T.B.G., Noronha, B.G., Días, C.A.G.M., Dendasck, C.V., Oliveira, E., y Fecury, A.A. 2020. Perfil de sensibilidad a los antimicrobianos de uropatógenos en un laboratorio en Macapá, Amapá, Amazonia brasileña. *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento*, 2(4), 81-102.
87. Smiti, Y., Sibbou, K., El Bouti, A., Haimere, Y., El Hadloussi, A., El Haddad, S., Allali, N., Chat, L., Bentalha, A., El Korraichi, A., y Kettani, S.E.C. 2020. Severe pleuropulmonary infection by *S. aureus* in children: case report and review of the literature. *PAMJ-Clinical Medicine*, 3(119).
88. Somerville, Greg A. 2016. *Staphylococcus: Genetics and Physiology*. Caister Academic Press.
89. Stokes, J. M., Yang, K., Swanson, K., Jin, W., Cubillos-Ruiz, A., Donghia, N. M., MacNair, C.R., French, S., Carfrae, L.A., Bloom-Ackermann, Z., Tran, V.M., Chiapino-Pepe, A., Badran, A.H., Andrews, I.W., Chory, E.J., Church, G.M., Brown, E.D., Jaakola, T.S., y Collins, J.J. 2020. A deep learning approach to antibiotic discovery. *Cell*, 180(4), 688-702.
90. Sun, R., Xiao, Y., Guo, B., Li, Z., Wan, K., Yang, L., y Zhao, J. 2020. The Influencing Factors of *Bacillus megaterium* Affect the Growth of the Antagonistic Strain and the Activities of Antibacterial Substances. *In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 914 (1), 012001.
91. Taberner Pazos, B., Devesa Jover, P., García Peris, M. y Escolano Serrano, S. 2022. Lesiones vesiculares, no siempre son varicela. *Revista Pediátrica de Atención Primaria*, 23, 391-395.
92. Tabís, A., Gonet, M., Schubert, J., Miazek, A., Nowak, M., Tomaszek, A., y Bania, J. 2022. Analysis of enterotoxigenic effect of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* enterotoxins C and L on mice. *Microbiological Research*, 258, 126979.
93. Tam, K., y Torres, V. J. 2019. *Staphylococcus aureus* secreted toxins and extracellular enzymes. *Microbiology spectrum*, 7(2), 2-7.
94. Tong, S.Y., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., y Fowler, V.G.Jr. 2015. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*, 28(3), 603–661.
95. Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R., y Gordon, J.I. (2007). *The human microbiome project. Nature*, 449(7164), 804-810.
96. Turner, N.A., Sharma-Kuinkel, B.K., Maskarinec, S.A., Eichenberger, E.M., Shah, P.P., Carugati, M., Holland, T.L., y Fowler, V. G. 2019. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), 203-218.
97. Unidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital materno-infantil «La Paz» Madrid. 2007. Síndrome de escaldadura estafilocócica de presentación neonatal [Fotografía]. *Acta Pediátrica Española*.

98. Urish, K.L., y Cassat, J.E. 2020. *Staphylococcus aureus* osteomyelitis: bone, bugs, and surgery. *Infection and immunity*, 88(7), 932-19.
99. van Dalen, R., Peschel, A., y van Sorge, N.M. 2020. Wall teichoic acid in *Staphylococcus aureus* host interaction. *Trends in microbiology*, 28(12), 985-998.
100. Verdier, I., Lina, G., y Vandenesch, F. 2004. *Staphylococcus*. *Cours de Bactériologie Médicale*.
101. Viçosa, G.N., Moraes, P.M., Yamazi, A.K., y Nero, L.A. 2010. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus spp.* in raw milk and fresh soft cheese: An evaluation of Baird-Parker agar, Rabbit Plasma Fibrinogen agar and the Petrifilm™ Staph Express count system. *Food Microbiology*, 27(4), 447-452.
102. WASTE, D.O. Legionella BCYE Agar w Vancomycin+ Colistin. 2014.
103. Whiteley, M., Diggle, S.P., y Greenberg, E.P. 2017. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature*, 551(7680), 313-320.
104. Wildeman, P., Tevell, S., Eriksson, C., Lagos, A.C., Söderquist, B., y Stenmark, B. 2020. Genomic characterization and outcome of prosthetic joint infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Scientific reports*, 10(1), 1-14.
105. Willerslev-Olsen, A., Buus, T. B., Nastasi, C., Blümel, E., Gluud, M., Bonefeld, C. M., Geisler, C., Lindahl, L.M., Vermeer, M., Wasik, M.A., Iversen, L., Becker, J.C., Andersen, M.H., Gjerdrum, L.M.R, Litvinov, I.V., Litman, T., Krejsgaard, T., Woetmann, A., y Ødum, N. 2020. *Staphylococcus aureus* enterotoxins induce FOXP3 in neoplastic T cells in Sézary syndrome. *Blood cancer journal*, 10(5), 1-11.
106. Wu, Y.C., Kimura, B., y Fujii, T. 2000. Comparison of three culture methods for the differentiation of *Micrococcus* and *Staphylococcus* in fermented squid shiokara. *Fisheries science*, 66(1), 142-146.
107. Zhao, H., Xu, S., Yang, H., He, C., Xu, X., Hu, F., Shu W., Gong, F., Zhang, C., y Liu, Q. 2019. Molecular typing and variations in amount of *tst* gene expression of TSST-1-producing clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Frontiers in microbiology*, 10, 1388.