

Trabajo Fin de Grado

Detección de factores de virulencia en cepas de *Staphylococcus* spp. de origen nasal y epidérmico: estafilotoxinas, resistencia a antibióticos y fagoterapia.

Detection of virulence factors in strains of *Staphylococcus* spp. of nasal and epidermal origin: staphyllotoxins, resistance to antibiotics and phagotherapy.

Alumna: Irene Herrero Gómez

Tutor: Joaquín Moreno Casco

Cotutora: Francisca Suárez Estrella



Convocatoria julio 2020

Grado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Experimentales

Departamento de Biología y Geología

Área de Microbiología

Índice

Índice de ilustraciones.....	4
Índice de tablas	5
Agradecimientos	6
Resumen.....	7
Abstract	8
1. Introducción	9
1.1 <i>Staphylococcus</i> spp.....	9
1.1.1 Taxonomía y características generales.....	9
1.1.2 Epidemiología de las infecciones estafilocócicas en humanos	10
1.1.3 Principales cuadros clínicos causados por <i>Staphylococcus</i> spp. en humanos	11
1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	13
1.2.1 Determinantes de patogenicidad de <i>Staphylococcus aureus</i>	13
1.2.2 Intoxicación estafilocócica por alimentos	17
1.3 Problemas derivados de la resistencia a antibióticos	18
1.3.1 Resistencia a antibióticos beta-lactámicos y no beta-lactámicos	18
1.3.2 Terapias alternativas para el control de la enfermedad infecciosa provocada por <i>S. aureus</i>	20
1.3.3 El futuro de la fagoterapia aplicada al control de infecciones estafilocócicas.....	21
2. Objetivos	22
2.1 Objetivo general	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3. Material y métodos	23
3.1 Colección de las cepas.....	23
3.2 DSMZ-26857 <i>Staphylococcus</i> fago MRLN (fago K de <i>Staphylococcus</i>).....	23
3.3 Diseño experimental	24
3.4 Caracterización fenotípica de las cepas	25
3.4.1 Protocolo para la tinción Gram	25
3.4.2 Protocolo para la determinación de la actividad catalasa	26
3.4.3 Protocolo para la determinación de la actividad desoxirribonucleasa (DNasa)	26
3.4.4 Protocolo para la determinación de la actividad coagulasa en tubo	27
3.4.5 Protocolo para la determinación de hemólisis	29
3.5 Análisis molecular de las cepas: marcadores de virulencia	30
3.5.1 Extracción de ADN genómico	30
3.5.2 Cebadores	31
3.5.3 Condiciones de PCR y reactivos.....	31

3.5.4	Detección e interpretación de los resultados	33
3.6	Fagotipado del estafilofago K frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	33
3.7	Análisis estadístico	33
4.	Resultados y Discusión	34
4.1	Caracterización bioquímica de la colección de cepas	34
4.1.1	Actividad DNasa.....	34
4.1.2	Actividad coagulasa	35
4.1.3	Actividad hemolítica	35
4.1.4	Relaciones entre las distintas actividades bioquímicas.....	36
4.2	Caracterización molecular de la colección de cepas	38
4.2.1	Identificación de cepas <i>Staphylococcus aureus</i> mediante detección del marcador <i>MH678720</i>	38
4.2.2	Identificación de marcadores de virulencia	38
4.3	Fagotipado preliminar	42
5.	Conclusiones.....	43
6.	Bibliografía.....	44

Índice de ilustraciones

Ilustración 1. Infecciones cutáneas provocadas por <i>S. aureus</i> en función de la estructura anatómica afectada.....	12
Ilustración 2. Principales cuadros clínicos producidos por <i>S. aureus</i>	12
Ilustración 3. Determinantes de patogenicidad.....	14
Ilustración 4. Unión del superantígeno al TCR y MHC II.....	17
Ilustración 5. Síndrome de la piel escaldada.....	17
Ilustración 6. Anillo beta-lactama.....	19
Ilustración 7. Recuperación de cepas criopreservadas.....	23
Ilustración 8. Diseño experimental.....	24
Ilustración 9. Protocolo tinción de Gram.....	25
Ilustración 10. <i>Staphylococcus aureus</i> observado bajo microscopio.....	25
Ilustración 11. Protocolo de actividad catalasa.....	26
Ilustración 12. Portaobjetos con muestras catalasa positivo.....	26
Ilustración 13. Protocolo para la detección de actividad DNasa.....	27
Ilustración 14. Placa DNasa positivo.....	27
Ilustración 15. Placa DNasa negativo.....	27
Ilustración 16. Protocolo para determinación de la actividad coagulasa.....	28
Ilustración 17. Vial plasma de conejo liofilizado tras hidratarlo.....	29
Ilustración 18. Tubo con el medio coagulado completamente.....	29
Ilustración 19. Sangre desfibrinada de oveja.....	29
Ilustración 20. Protocolo determinación actividad hemolítica.....	30
Ilustración 21. Beta - hemolisis.....	30
Ilustración 22. Alfa - hemolisis.....	30
Ilustración 23. Gamma - hemolisis.....	30
Ilustración 24. Termobloque con suspensiones bacterianas.....	31
Ilustración 25. Suspensiones bacterianas a partir de tubos de agar inclinado.....	31
Ilustración 26. Caracterización DNasa.....	34
Ilustración 27. Caracterización coagulasa.....	35
Ilustración 28. Caracterización hemolisis.....	35
Ilustración 29. Diagrama de barras para hemolisis según coagulasa.....	36
Ilustración 30. Diagrama de barras para DNasa según coagulasa.....	37
Ilustración 31. Diagrama de barras para DNasa según hemolisis.....	37
Ilustración 32. Dendrograma de actividades bioquímicas.....	38
Ilustración 33. Gel de agarosa con los productos amplificados por PCR del gen <i>tsst-1</i>	41
Ilustración 34. Correlación de Spearman entre los distintos genes.....	41
Ilustración 35. Calvas de lisis producidas por estafilofago K en medio TSA.....	42

Índice de tablas

Tabla 1. Composición del medio de cultivo para métodos estándar APHA.....	23
Tabla 2. Clasificación taxonómica del fago K.....	24
Tabla 3. Componentes del medio de cultivo Agar DNasa	26
Tabla 4. Componentes del medio Brain Heart Infussion (BHI).....	28
Tabla 5. Composición del plasma de conejo liofilizado.....	28
Tabla 6. Medio de cultivo base para Agar Sangre	29
Tabla 7. Componentes de la mezcla de PCR	31
Tabla 8. Información de los cebadores utilizados	32
Tabla 9. Composición del medio TSA	33
Tabla 10. Listado de cepas <i>S. aureus</i>	38
Tabla 11. Resultados PCR	39
Tabla 12. Cepas seleccionadas por su carácter virulento.....	42

Agradecimientos

El Trabajo Fin de Grado, bajo mi punto de vista, resulta ser la llave de las puertas de la investigación, ya que supone un primer contacto directo y constante con el laboratorio. He tenido la gran oportunidad de realizarlo en el área de Microbiología. Quiero agradecer a mi tutor, Joaquín Moreno Casco por brindarme la ocasión de poder realizarlo en su laboratorio bajo su tutela. Fue en el primer curso del grado cuando conocí a Joaquín y a su pasión por enseñar, y por la Microbiología, lo que me suscitó un gran interés y curiosidad de la vida a pequeña escala. Aparte de todo lo que me ha enseñado, tanto en la asignatura de Microbiología, como en la de Inmunología o Biotecnología Ambiental, Joaquín ha supuesto una persona en la que he podido confiar los cuatro años de carrera, ayudándome y dándome su opinión hasta en el tema más insignificante que tuviese duda. Es por tanto, que gracias a él, mis esperanzas académicas nunca han decaído y he sentido mucha ilusión por aprender. Otra de las personas que me han enseñado a amar la ciencia con ilusión, es mi cotutora Paqui Suárez Estrella. Muchísimas gracias por tu carisma y motivación por enseñar. En todo momento has estado predispuesta a ayudarme y darme ánimos. Siempre me ha sorprendido todo lo que eres capaz de sacar adelante y de encontrar un ratito al día, tanto con otras personas del laboratorio como conmigo, para preocuparte por cómo nos ha ido el día.

Gracias también a Juan Antonio López y a Macarena Jurado, profesores del área que en todo momento me han enseñado y ayudado, tanto en la realización del TFG como en las prácticas de distintas asignaturas. Me han hecho pasar los cuatro años de carrera de una forma más amena, donde sus clases mostraban motivación, risas y cercanía con los alumnos, pero siempre con profesionalidad. Durante la realización del TFG, hemos convivido en el laboratorio multitud de personas a las que quiero agradecer, ya que siempre me ayudaron en cualquiera de mis inquietudes. Concretamente, a Ana Toribio, por hacer que el tiempo entre experimentos se me pasase volando, por amenizarme las comidas, por ayudarme y por confiar en mí. Gracias también a Ana Siles y María Rosa, por ayudarme también desde el primer momento.

Quiero agradecer a mis padres, ya que sin su apoyo diario no podría conseguir lo que me propongo. Aunque estos años no he podido estar todo lo que he querido cerca de ellos y tampoco me entienden mucho cuando les hablo de cosas científicas, siempre han depositado su confianza en mí. A mis hermanos, Carlitos y Laura, a Pedro, a Fuencis y a mi abuela, por estar siempre orgullosos de mí.

Por último, y no por ello menos importante, gracias a mis amigos, tanto los de toda la vida como los que he conocido en Almería, por apoyarme siempre y hacerme muy feliz. Son muchos a los que tengo que agradecer, pero especialmente a MJ, Javi, Alicia, Inma, José, y por supuesto, David, por estar siempre a mi lado y cuidar de mí. A Nerea, Sofía, Juanma, Nacho, Bea y Puri, por amenizarme las horas en el laboratorio y ayudarme a terminar alguna cosa antes de ir a clase. A todos ellos que habéis hecho que estos cuatro años hayan sido muy divertidos y emocionantes. Es una pena que no nos hayamos podido despedir por culpa del Coronavirus.

Hace un tiempo leí en el libro “La solución de los telómeros” de E. Blackburn y E. Epel, una frase que me ha marcado mucho: “La ciencia es un deporte en equipo”. Y, a fin de cuentas, lleva mucha razón, ya que hay que tener un buen equipo, que por suerte he tenido, para llevar a cabo la ciencia.

Resumen

Los miembros del género *Staphylococcus* se caracterizan por ser colonizadores de diversos hábitats, como animales, aguas y alimentos. Es muy común, encontrarlos en mucosas y piel de humanos sanos, sin causar ninguna patología aparente, aunque en ocasiones pueden comportarse como patógenos oportunistas. La capacidad para producir la enzima coagulasa (conversión del fibrinógeno en fibrina), permite agrupar este género en estafilococos coagulasa negativos (CoNS) y estafilococos coagulasa positivos (CoPS). *Staphylococcus aureus*, es la especie más importante del grupo de los CoPS. Puede causar infecciones cutáneas, intoxicaciones alimentarias, neumonía, síndrome del shock tóxico y sepsis, entre otros. En las últimas décadas, se han descrito multitud de casos de aparición de resistencias a antibióticos en cepas de *Staphylococcus aureus* de origen nosocomial. Por tanto, es imprescindible la búsqueda de otras terapias alternativas para el tratamiento de este tipo de infecciones. En este sentido, el uso de bacteriófagos se ha convertido en una de las principales líneas de investigación en los últimos años.

En este trabajo, se llevó a cabo la caracterización bioquímica de 61 cepas presuntivas de pertenecer al género *Staphylococcus*, cuya procedencia era fosas nasales y epidermis de humanos. Posteriormente, mediante técnicas moleculares, se identificaron las cepas de *S. aureus*, las cuales se sometieron a un cribado con marcadores de virulencia relacionados con la producción de enterotoxinas causantes de intoxicaciones alimentarias, así como toxinas causantes del síndrome del shock tóxico y del síndrome de la piel escaldada. También se detectó la presencia de genes implicados en la resistencia al antibiótico metilicina. Por último, se realizó un fagotipado de las cepas de *S. aureus* que mostraron una mayor virulencia, frente al estafilofago K.

Los resultados mostraron que, en conjunto, la combinación de las pruebas coagulasa y hemolisis constituyen un método rápido para la identificación presuntiva de cepas *S. aureus*, mientras que la prueba de la DNasa, de forma aislada, puede ocasionar falsos negativos. A partir de la colección inicial de cepas, tan solo 18 mostraron el marcador de la terminasa estafilocócica, el cual es exclusivo de la especie de *S. aureus*. La caracterización molecular de estas cepas reveló la presencia de los genes que codifican para la Enterotoxina A y la toxina TSST-1 en una alta proporción. El 33,3% de las cepas de *S. aureus* analizadas dieron positivo para el gen de resistencia a la metilicina. Finalmente, el fagotipado realizado con las seis cepas seleccionadas como más virulentas mostró resultados prometedores con dos de ellas, pudiéndose apreciar aparentes calvas de lisis causadas por el fago. Tales resultados, aunque preliminares, permiten seguir avanzando en esta línea de investigación.

Palabras clave: *Staphylococcus*, enterotoxinas, bacteriófago, MRSA, intoxicación alimentaria.

Abstract

Staphylococcus spp. colonize various habitats such as animals, water and food. In addition, they can be found in mucosa and skin of healthy humans without causing any pathology, but several times they behave as an opportunistic pathogen. The capacity to produce the coagulase enzyme (it converts fibrinogen to fibrin), is what makes it possible to group this genus into coagulase negative staphylococci (CoNS) and coagulase positive staphylococci (CoPS). *S. aureus*, the most important specie belonging to the CoPS, can cause skin infections, food poisoning, pneumonia, toxic shock syndrome and sepsis, among others. In the last decades, strains of *Staphylococcus* genus have become the main nosocomial pathogens, especially those strains that show resistance to antibiotics. Therefore, it is necessary to search alternative therapies to treat such infections. The use of bacteriophages to selectively kill pathogenic bacteria has become a major investigation in recent years.

In this work, the biochemical characterization of 61 presumptive strains belonging to the *Staphylococcus* genus was carried out, which were isolated from the nostrils and epidermis. Subsequently, using molecular techniques, *S. aureus* strains were identified, and after characterized according to their virulence markers, such as enterotoxins that cause food poisoning and toxins that cause toxic shock syndrome and scalded skin. Those strains resistant to the antibiotic methicillin were also molecularly identified. Finally, the most virulent *S. aureus* strains were selected, based on the characterization carried out, to confront them against the staphylophage K.

Results showed that the combined use of the coagulase and hemolysis test was found to be a rapid method of identifying *S. aureus* strains as presumptive way, while DNase test was not reliable since it caused false negatives. From the initial strain collection, only 18 of them were shown to have the staphylococcal terminase marker, which is exclusive to *S. aureus* species. The toxin markers most common in these strains were Enterotoxin A and TSST-1 toxin. 33.3% of the strains analyzed were found to be resistant to methicillin. Finally, phagotyping performed with the six strains selected as the most virulent showed promising results with two of them, showing apparent lysis plaques caused by the staphylophage K. Such results, although preliminary, allow further progress in this line of research.

Keywords: *Staphylococcus*, enterotoxins, bacteriophage, MRSA, food poisoning

1. Introducción

1.1 *Staphylococcus* spp.

1.1.1 Taxonomía y características generales

La clasificación actual del género *Staphylococcus* según el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes*, es la siguiente:

- Dominio: Bacteria
- Filo: Firmicutes
- Clase: Bacilli
- Orden: Bacillales
- Familia: *Staphylococcaceae*

El género *Staphylococcus* se ha incluido tradicionalmente dentro de la familia *Micrococaceae*, pero recientes estudios genéticos han demostrado que tiene más similitud con el orden *Bacillales*, el cual comprende familias como *Listeriaceae*, *Staphylococceae* o *Pasteuriaceae*, entre otros (<https://lpsn.dsmz.de/order/bacillales>). La familia *Staphylococceae*, incluye al género *Staphylococcus* (de Cueto y Pascual, 2009), que cuenta con 58 especies (<https://lpsn.dsmz.de/search?word=staphylococcus>), de las cuales 17 pueden ser aisladas de muestras de origen humano (Rocchetti *et al.*, 2018). Otras especies se pueden encontrar en la epidermis y mucosas de otros mamíferos y aves (Grace y Fetsch, 2018). En general, cada especie se localiza en un lugar anatómico específico del huésped que coloniza (de Cueto y Pascual, 2009). Muchas especies estafilocócicas son oportunistas, colonizan membranas mucosas y piel, pero pueden convertirse en especies patogénicas cuando se rompe el epitelio cutáneo por trauma o por intervenciones médicas (Becker *et al.*, 2015).

El género *Staphylococcus* es muy ubicuo, ya que no sólo puede aislarse a partir de animales, sino también a partir de agua, aire, alimentos y suelo. Además, se puede encontrar en partículas de polvo, vertederos y aguas residuales. Algunas especies pueden, incluso, sobrevivir a condiciones extremas de temperatura y pH durante un tiempo determinado (Kosecka-Strojek *et al.*, 2018).

Las bacterias de este género son gram positivas con morfología esférica, presentando un diámetro de 0,5 a 1,5 μm (Becker *et al.*, 2015). Se agrupan de forma irregular, y bajo el microscopio recuerdan a la forma de un racimo de uvas. Sin embargo, los estafilococos también pueden observarse a microscopio como células aisladas o agrupadas en parejas, tétradas o cadenas cortas. Son inmóviles, no forman esporas y poseen un metabolismo aerobio o anaerobio facultativo. Las especies del género *Staphylococcus* son catalasa positivo, es decir, mediante esta enzima son capaces de romper el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular (de Cueto y Pascual, 2009), carácter que los distingue del género *Streptococcus*. La pigmentación de las colonias en medios no selectivos, como agar tripton de soja (TSA) puede variar de un color blanco cremoso a un naranja brillante (Gillaspy e Landolo, 2014).

Los estafilococos crecen en presencia de altas concentraciones salinas (incluso superiores al 10% de NaCl), a temperaturas que pueden oscilar entre 18 °C y 40 °C. Presentan una pared celular con peptidoglicano y ácido teicoico (Becker *et al.*, 2015). Además, pueden usar una gran variedad de carbohidratos para obtener energía, principalmente mediante vía glicólisis y ciclo de los ácidos tricarboxílicos, pero también en ocasiones mediante la vía de las pentosas fosfato (Gillaspy e landolo, 2014).

El género *Staphylococcus* puede dividirse en dos grupos: el grupo de los estafilococos coagulasa positivo (**CoPS**), cuyo miembro principal es la especie *S. aureus*, y el grupo de los estafilococos coagulasa negativo (**CoNS**), donde se ubican las especies *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* (Rocchetti *et al.*, 2018; Heilmann *et al.*, 2019). La coagulasa es una enzima que permite la conversión del fibrinógeno, el cual se encuentra en el plasma, en fibrina. Esta enzima se considera un determinante de virulencia de las especies de *Staphylococcus* (Padmajakshi *et al.*, 2014). Concretamente, la coagulasa activa la protrombina, que cataliza la conversión del fibrinógeno en fibrina (Gillaspy e landolo, 2014). Las especies pertenecientes al grupo CoPS se consideran patógenas, mientras que los CoNS son en general menos virulentos. Se ha sugerido que la coagulasa facilita la patogenicidad del estafilococo, de tal modo que el coágulo formado por la fibrina impide que el sistema inmune del huésped fagocite o entre en contacto con la bacteria. Sin embargo, la importancia de esta barrera en la infección no está del todo clara, ya que los estafilococos coagulasa negativo también pueden ser patógenos (Gillaspy e landolo, 2014). Los CoNS representan una gran parte de la microbiota de la piel y de las mucosas de humanos y otros animales. Algunas de las zonas de las que se pueden aislar son las axilas, las regiones inguinales, el ombligo y la región plantar del pie, entre otras (Becker *et al.*, 2014).

En términos generales, el contenido en GC (guanina+citosina) del genoma estafilocócico es bajo (30-39%) (Becker *et al.*, 2015) y el tamaño de éste oscila entre 2,3 y 3,2 Mb. El amplio rango del tamaño del genoma indica la compleja diversidad de elementos móviles, entre los que se encuentran los transposones y casetes de resistencia a antibióticos (Krute y Bose, 2016).

1.1.2 Epidemiología de las infecciones estafilocócicas en humanos

Las bacterias que desencadenan infecciones en humanos o animales pueden ser patogénicas o potencialmente patogénicas (oportunistas). Los estafilococos colonizan la piel y membranas mucosas de individuos sanos. Según Kosecka-Strojek *et al.*, (2018), el riesgo de la infección aumenta en pacientes que se han sometido a cirugía, sufren quemaduras, reciben implantación de dispositivos médicos (catéteres o prótesis) o que llevan a cabo tratamientos antibióticos o antifúngicos a largo plazo. En las últimas décadas, las bacterias pertenecientes a este género se han convertido en los principales patógenos nosocomiales (entornos hospitalarios), especialmente aquellas cepas que presentan resistencias a la meticilina y la vancomicina.

Los agentes etiológicos de origen estafilocócico más frecuentes en España, han sido identificados como *Staphylococcus aureus*, en el 9,47% de las infecciones, y en el 6,21% de los casos, el grupo de los CoNS, siendo las infecciones producidas por cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) las que ocasionan más problemas clínicos (Cercenado, 2016). Más del 80% de las enfermedades producidas por *S. aureus* adquiridas en el entorno hospitalario son infecciones endógenas originadas por cepas

que se encontraban en las cavidades nasales de pacientes portadores (von Eiff *et al.*, 2001), por lo que este grupo de individuos, juega un papel importante en la epidemiología y patogénesis de las infecciones estafilocócicas (van Belkum *et al.*, 2009). Sorprendentemente, se ha descrito que los portadores persistentes o permanentes de *S. aureus* constituyen hasta un 30-40% de la población mundial (Köck *et al.*, 2015).

1.1.3 Principales cuadros clínicos causados por *Staphylococcus* spp. en humanos

Los **CoNS** normalmente se consideran comensales de la piel y de la mucosa, pero también son reconocidos por ser patógenos aislados de infecciones adquiridas en hospitales (Fontana y Favaro, 2014). Los más destacados son *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* y *S. saprophyticus*. Los CoNS pueden causar una amplia variedad de infecciones, normalmente en neonatos, pacientes que portan catéteres o prótesis y huéspedes neutropénicos o dializados. Las enfermedades causadas por CoNS afectan al sistema nervioso central, el corazón, huesos y articulaciones. Son la causa más común de sepsis neonatal de aparición tardía en las unidades de cuidados intensivos neonatales, lo que está relacionado con la capacidad de los CoNS para formar biopelículas, así como con el sistema inmune aún inmaduro de los recién nacidos (Kosecka-Strojek *et al.*, 2018). Estos estafilococos son la causa más común de infecciones nosocomiales sistémicas típicamente asociadas con catéteres intravasculares centrales y periféricos (Becker *et al.*, 2015). La capacidad de estas cepas para formar biopelículas les confiere una menor susceptibilidad a los antibióticos y una defensa contra el sistema inmunitario del huésped. No obstante, en términos generales, los CoNS expresan menos factores de virulencia que los CoPS (Fontana y Favaro, 2014).

Dentro del grupo de los CoNS, *S. lugdunensis* provoca infecciones similares a las causadas por *S. aureus*. Puede originar endocarditis de válvula nativa además de endocarditis de válvula protésica (Anguera *et al.*, 2005). Además, origina abscesos, infecciones en heridas abiertas (Böcher *et al.*, 2009) e infecciones en huesos y articulaciones (Argemi *et al.*, 2017), entre otras afecciones. Por su parte, *S. epidermidis* coloniza la superficie del cuerpo y se encuentra mayoritariamente en áreas axilares, inguinales, perianales, conjuntivas y en narinas anteriores (Schelifer y Kloos, 1975). Esta especie es el miembro más conocido del grupo CoNS. Aunque es un saprófito de la piel de mamíferos, también es un patógeno clave en pacientes hospitalizados (Kosecka-Strojek *et al.*, 2018). Puede causar bacteriemias, endocarditis, infecciones derivadas de cateterismos intravenosos o prótesis articulares, e infecciones del tracto gastrourinario, normalmente en sujetos inmunocomprometidos (Gillaspy e Iandolo, 2014). Normalmente, *S. epidermidis* produce biopelículas, lo que dificulta el tratamiento de las superficies infectadas (Kosecka-Strojek *et al.*, 2018). Esta especie presenta una gran diversidad genética, lo que explica su capacidad patogénica y su amplia ubicuidad (Becker *et al.*, 2014). Al igual que *S. epidermidis*, otros miembros del grupo de los CoNS, como es el caso de *S. haemolyticus*, también producen biopelículas y provocan graves problemas en neonatos.

Dentro del grupo de los **CoPS**, la especie más comúnmente aislada en infecciones de origen humano es *Staphylococcus aureus*. La patología más típica producida por esta especie es el absceso o excreción purulenta. No obstante, *S. aureus* presenta un cuadro clínico muy amplio y variado, que incluye desde infecciones superficiales (Ilustración 1), como por ejemplo forúnculos (infección del folículo piloso,

dermis y tejido subcutáneo) o impétigo (infección epidermis), hasta infecciones graves como el síndrome del shock tóxico (Pigrau, 2009). *S. aureus* puede difundir a nivel local o pasar a la sangre y, a partir de ahí, propagarse a órganos distantes, y provocar diversas infecciones (Castañón-Sánchez, 2012). Otros cuadros clínicos provocados por *S. aureus* son celulitis y miositis, aunque ambos problemas pueden ser también originados por *Streptococcus pyogenes* (Adamski *et al.*, 1980; Jimeno *et al.*, 2008; Karakonstantis, 2020).

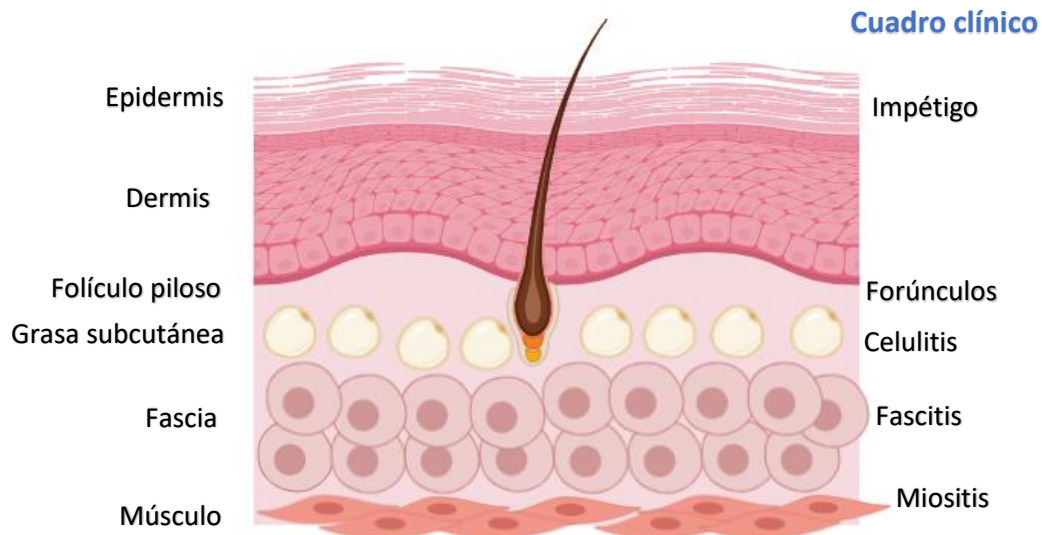


Ilustración 1. Infecciones cutáneas provocadas por *S. aureus* en función de la estructura anatómica afectada

Muchas de las enfermedades causadas por *S. aureus* se asocian con elevada morbilidad. Esta especie puede atacar prácticamente a cualquier tejido del cuerpo y provocar afecciones (Ilustración 2), como endocarditis, osteomielitis, meningitis, neumonía, síndrome del shock tóxico o síndrome de la piel escaldada (Gillaspy e Iandolo, 2014), en muchos casos relacionadas con la producción de potentes toxinas alimentarias.

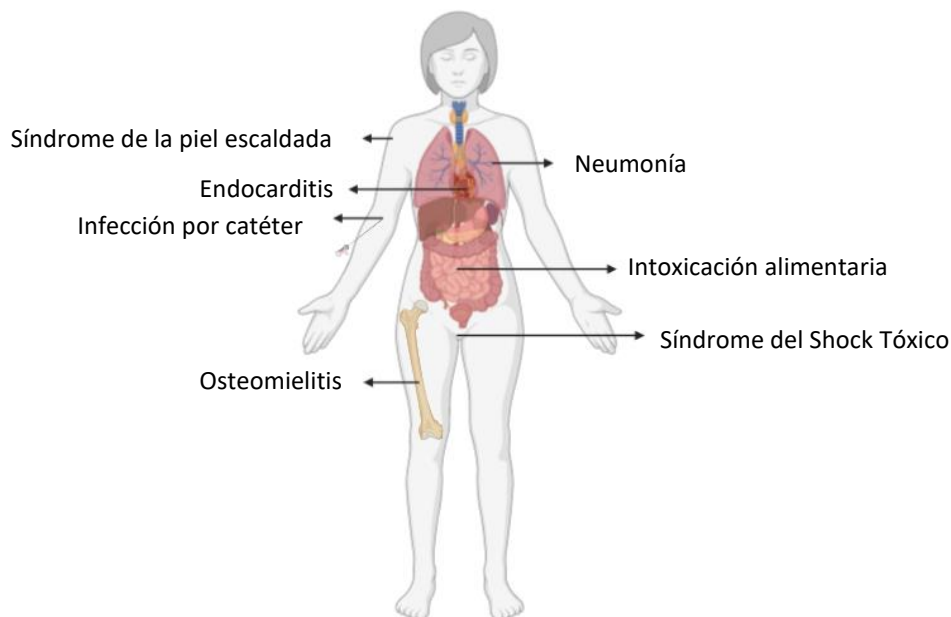


Ilustración 2. Principales cuadros clínicos producidos por *S. aureus*

El síndrome del shock tóxico y el síndrome de la piel escaldada son afecciones graves producidas por *S. aureus* productor de toxinas. El síndrome del shock tóxico cobró relevancia en la década de los 80 cuando se describió un brote en mujeres sanas que habían usado tampones de alta absorción en la menstruación. El cuadro clínico que presentaron se caracteriza por fiebres elevadas, hipotensión, vómitos, diarreas, dolor abdominal, mialgias, descamación de la piel y afectación de las mucosas, pudiendo derivar en síntomas aún más graves. Este síndrome es consecuencia de la presencia de la enterotoxina estafilocócica TSST-1. Por otra parte, el síndrome de la piel escaldada aparece por la producción de dos toxinas exfoliativas, denominadas ETA y ETB. Dichas toxinas son capaces de destruir los desmosomas cutáneos provocando que la epidermis se separe. El cuadro clínico que presenta esta afección cutánea varía desde una lesión de tipo ampolla a una exfoliación cutánea generalizada, sin que se vean afectadas las mucosas (Pigrau, 2009).

1.2 *Staphylococcus aureus*

Tal y como se ha indicado previamente, *S. aureus* es un importante patógeno oportunista que coloniza piel y mucosas de humanos y otros animales. Además de los problemas ya mencionados en humanos, cabe resaltar que también provoca mastitis en animales lecheros y lesiones óseas y articulares en aves de corral, así como infecciones ocasionales en la piel de ganado (Grace y Fetsch, 2018). Las mayores tasas de crecimiento ocurren en condiciones de aerobiosis aunque también puede crecer como anaerobio facultativo. Puede sobrevivir en presencia de hasta un 15% de NaCl. Su temperatura óptima de crecimiento es de 35 °C, aunque puede crecer en un rango de 7-48 °C. Su pH óptimo se encuentra entre 7 y 7,5, aunque tolera valores entre 4,5 y 9,3 (Gillaspy e landolo, 2014).

Al igual que otras especies del género *Staphylococcus*, *S. aureus* se encuentra típicamente en las fosas nasales de humanos, así como en la mucosa genital y digestiva y en la piel (región perianal y axilas) (Pujol, 2009). Además, *S. aureus* coloniza la nasofaringe y la piel que rodea la línea del cabello (Kosecka-Strojek *et al.*, 2018).

1.2.1 Determinantes de patogenicidad de *Staphylococcus aureus*

La patogenicidad de *S. aureus* es debida, principalmente, a su capacidad para evadir la respuesta inmune del huésped, así como a su plasticidad genética, lo que le permite adaptarse a múltiples condiciones. Los factores de virulencia estafilocócicos (Ilustración 3) se caracterizan por su capacidad para adherirse y destruir moléculas o estructuras vitales para el huésped que colonizan, facilitando así la invasión de la célula y tejidos del huésped. La patogenicidad de este organismo se ve agravada por la adquisición de múltiples resistencias a antibióticos (Becker, 2018). Los factores de patogenicidad de *S. aureus* se pueden clasificar en dos grandes grupos: componentes estructurales y productos secretados.

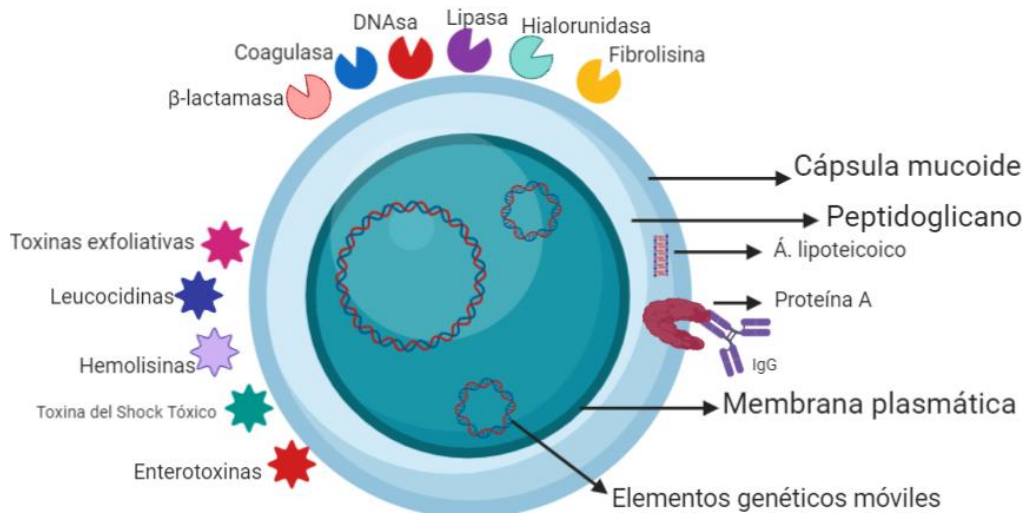


Ilustración 3. Determinantes de patogenicidad

1.2.1.1 Componentes estructurales de la pared celular

Entre los factores patogénicos que se encuentran por fuera de o en la pared celular de la bacteria, destacan los siguientes:

- La **cápsula mucoide**: constituye la capa más externa y rígida, situada en el exterior celular cuya función es proteger a las bacterias inhibiendo la fagocitosis mediada por los leucocitos polimorfonucleares. Está recubierta por una matriz polisacáridica que incluye polialcoholes y aminoazúcares, formando una biopelícula que permite la adherencia a tejidos y superficies como catéteres o prótesis, además de proporcionar resistencia a la desecación (Murray *et al.*, 2017).
- El **peptidoglicano**: es un polímero polisacáridico formado por cadenas con uniones tipo β (1 \rightarrow 4) de N-acetil murámico y N-acetil glucosamina cuya función es aportar rigidez a la pared bacteriana y resistencia osmótica. Cuando *S. aureus* coloniza una célula, este polímero activa al sistema del complemento de la célula huésped, atrayendo a leucocitos polimorfonucleares y estimulando la generación de anticuerpos opsonizantes. Todo ello desencadena un proceso inflamatorio típico (Algorta, 2008; Murray *et al.*, 2017).
- Los **ácidos teicoicos**: son polímeros de ribitol fosfato unidos por enlaces fosfodiéster que a su vez se unen a residuos del ácido N-acetilmurámico del peptidoglicano o a la membrana plasmática. Presentan un papel importante en el mantenimiento de la pared celular, colonización y susceptibilidad ante agentes antimicrobianos. Actúan como receptores de bacteriófagos específicos de *S. aureus* (Murray *et al.*, 2017; Weidenmaier y Lee, 2017).
- La **proteína A**: es una proteína de adhesión a superficies que está acoplada a la pared celular bacteriana. Es capaz de unirse a la fracción Fc de las inmunoglobulinas IgG, evitando de este modo ser opsonizadas y fagocitadas (Algorta, 2008).

1.2.1.2 Productos secretados

Se distinguen toxinas y enzimas entre los productos secretados por *S. aureus*.

1.2.1.2.1 Enzimas

Las enzimas más relacionadas con el carácter virulento de las cepas de *S. aureus* son aquellas que degradan algunas moléculas vitales para el huésped o que afectan a sus mecanismos de defensa. Entre las más importantes se encuentran las siguientes:

- La **desoxirribonucleasa o DNasa**: es una enzima extracelular de tipo nucleasa, que lleva a cabo la hidrólisis del ADN de doble cadena por un mecanismo de rotura en una de las hebras, concretamente en un enlace fosfodiéster (Subathra-Devi *et al.*, 2016). Se considera factor de virulencia porque hidroliza el ADN del huésped.
- La **coagulasa**: es una enzima que permite la conversión del fibrinógeno, el cual se encuentra en el plasma, en fibrina, dando lugar a la formación de coágulos. Estos rodean a *S. aureus* impidiendo que las células del sistema inmune del huésped se pongan en contacto con la bacteria e inicien la fagocitosis.
- La **lipasa**: hidroliza los lípidos permitiendo a *S. aureus* diseminarse por los tejidos cutáneo y subcutáneo.
- La **hialonuridasa**: hidroliza el ácido hialurónico de los tejidos conectivos facilitando la propagación de la bacteria a áreas adyacentes.
- La **fibrinolisisina o estafiloquinasa**: tiene la función de degradar la fibrina, y de este modo, se produce la invasión de los tejidos circundantes (Algorta, 2008).
- La **penicilinasa**: es producida por casi todas las cepas de *S. aureus*. Tiene función β -lactamasa, capaz de hidrolizar el anillo β -lactámico de la penicilina (Cervantes *et al.*, 2014).

1.2.1.2.2 Toxinas

Las **toxinas** que excreta *S. aureus* provocan graves daños celulares en su huésped. Entre ellas, se distinguen aquellas que dañan la membrana celular y otras toxinas que presentan actividad de tipo “superantígeno”. La mayoría de estas toxinas se localizan en elementos móviles genéticos, lo que genera una gran heterogeneidad fenotípica de *S. aureus* a la hora de producirlas.

1.2.1.2.2.1 Toxinas que dañan la membrana

Se denominan toxinas citolíticas, las cuales se unen a receptores de la membrana del huésped, formando un poro de alrededor de 25 Å, compuesto por varios monómeros de toxina. La formación del poro desencadena la muerte celular por desequilibrio osmótico, ya que se altera el flujo de iones como Ca^{+2} , K^+ , o el transporte de ATP y otras moléculas. *S. aureus* es capaz de producir cinco toxinas formadoras de poros, entre las que se encuentran la α -hemolisina (Hla), β -hemolisina (Hlb), δ -hemolisina (Hld), γ -hemolisina (Hlg) y leucocidina de Panton-Valentine (PVL). A continuación, se describe la función de cada uno de estos tipos de toxinas estafilocócicas.

- **α -hemolisina (Hla)** ataca a células epiteliales y endoteliales, incluyendo las células del linaje hematopoyético de un amplio rango de mamíferos. Puede estar codificada en el cromosoma bacteriano y en plásmidos. Además, esta toxina es lítica contra los eritrocitos, hepatocitos y leucocitos, excluyendo los neutrófilos (Murray *et al.*, 2017; Becker, 2018). Aunque tiene una actividad muy potente sobre los eritrocitos murinos y de conejo, la actividad que tiene contra los eritrocitos humanos es bastante pobre debido a la baja expresión del receptor de la toxina (Murray *et al.*, 2017) pero puede causar necrosis en la piel, infección letal, y acción neurotóxica, aunque su manifestación clínica depende de la cantidad de toxina y del tipo de célula en la que se hospeda (Pontieri, 2018). La toxina produce una liberación de prostaglandinas y leucotrienos que contribuyen al efecto vasoactivo. Además, las citoquinas proinflamatorias producidas por monocitos infectados por Hla contribuyen a la toxicidad sistémica (Lee y Bohach, 2004).
- **β -hemolisina (Hlb)** es una proteína termolábil producida por muchas cepas estafilocócicas. Presenta actividad esfingomielinasa, es decir, es capaz de hidrolizar esfingolípidos de la membrana plasmática de las células animales en presencia de distintos cationes divalentes, como Mg^{+2} , Co^{+2} o Mn^{+2} . La hidrólisis da como producto fosfatidilcolina y ceramida (Lee y Bohach, 2004). Además, presenta actividad liso-fosfatidilcolina (Pontieri, 2018). Después de hidrolizar esos lípidos presentes en la membrana, ésta se rompe físicamente y se produce apoptosis. La sensibilidad de los eritrocitos depende de la concentración de esfingomielina que presenten, al igual que la sensibilidad de los leucocitos. También afecta a los fibroblastos y macrófagos. El efecto de la toxina sobre los eritrocitos sucede a temperaturas bajas, lo que sugiere que la actividad lítica de esta toxina no es tan eficiente como otras hemolisinas, al menos en eritrocitos (Vandenesch *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2017).
- **δ -toxina (Hld)** afecta a la viabilidad de los monocitos (Lee y Bohach, 2004). Se produce en casi todas las cepas de *Staphylococcus aureus* y en otras especies de estafilococos (Murray *et al.*, 2017). Se han propuesto tres mecanismos de acción distintos para explicar su actividad hemolítica, revisados por Vandenesch *et al.* en 2012. Esta toxina puede (1) unirse a la superficie de la célula huésped y formar un poro transmembrana, (2) unirse a la superficie celular afectando su curvatura y desestabilizar la membrana plasmática o (3) actuar como detergente a altas concentraciones solubilizando la membrana.
- **γ -hemolisina (Hlg)** lisa eritrocitos, neutrófilos y macrófagos. Se piensa que induce procesos inflamatorios (Cervantes *et al.*, 2014).
- **Leucocidina de Pantón Valentine (PVL)** es una potente citotoxina específica de muchos leucocitos. Está presente en un 5% de los aislamientos clínicos de *S. aureus*. Esta toxina se asocia a afecciones epidérmicas y pulmonares (Cervantes *et al.*, 2014).

1.2.1.2.2.2 Toxinas que actúan como superantígenos

Las toxinas que actúan como superantígenos son las denominadas enterotoxinas estafilocócicas, la toxina del shock tóxico y las toxinas exfoliativas.

Las **enterotoxinas estafilocócicas (SEs)** son las responsables de las manifestaciones clínicas de la intoxicación alimentaria. Ingerir una de estas toxinas puede causar gastroenteritis severa con diarrea,

náuseas y vómitos (Gillaspy e Iandolo, 2014). Las principales SEs son las conocidas como SEA, SEB, SEC, SED y SEE, aunque se han descrito hasta 24 distintas. Son capaces de resistir a condiciones adversas (congelación, pH bajo y altas temperaturas) así como la actividad de enzimas proteolíticas (Hennekinne y Le Loir, 2014).

Las toxinas descritas como superantígenos evitan la interacción específica del antígeno unido al complejo principal de histocompatibilidad (MHC) presente en las células presentadoras de antígenos (APC), con el receptor de células T (TCR) de los linfocitos T. Concretamente, los superantígenos interactúan con el complejo MHCII de las APCs, uniéndose a la cadena α o a un residuo de histidina conservada en el dominio β , y a la vez, se unen a la región variable de la cadena β del TCR (Ilustración 4) (Grumann *et al.*, 2014). De este modo, los linfocitos T activados proliferan y liberan citocinas, linfocinas, interferón-gamma e interleucinas, suprimiendo la respuesta del huésped a los antígenos estafilocócicos (Gillaspy e Iandolo, 2014).

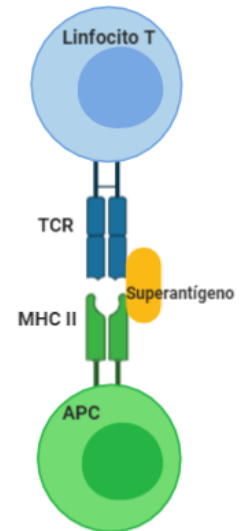


Ilustración 4. Unión del superantígeno al TCR y MHC II.

La localización génica de las enterotoxinas se encuentra en plásmidos (*seb*), fagos (*sea*) o islas genómicas de patogenicidad (*sec*). Esta localización en elementos móviles genéticos puede ser resultado de la transferencia horizontal de genes entre distintas cepas de *S. aureus* (Le Loir y Hennekinne, 2014). La enterotoxina A (SEA) es la toxina más asociada a intoxicaciones alimentarias, siendo SED la segunda enterotoxina más común (Balbana y Rasooly, 2000).

La **toxina del shock tóxico (TSST-1)** está implicada en la patogenia del síndrome del shock tóxico, que se caracteriza por presentar un cuadro clínico típico con fiebre alta, vómitos, diarrea, erupciones, hipotensión y descamación. TSST-1 normalmente se localiza en abscesos o en zonas mucosas, como la vagina o zona nasofaríngea. Como superantígeno que es, actúa sistemáticamente activando un gran número de linfocitos T y produciendo grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias.



Ilustración 5. Síndrome de la piel escaldada.

Las **toxinas exfoliativas (ETA y ETB)** causan el síndrome de la piel escaldada (Ilustración 5). La exfoliatina A es el producto del gen cromosómico *eta*, mientras la exfoliatina B, codificada por el gen *etb*, es de origen plasmídico. Ambas muestran actividad proteolítica, actúan como superantígenos y son capaces de disolver la matriz mucosa de la epidermis dando lugar a la división de los desmosomas en el estrato granuloso intraepitelial de las uniones. Tienen actividad serín-proteasa, lo que desencadena la exfoliación (Murray *et al.*, 2017).

1.2.2 Intoxicación estafilocócica por alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos causan graves problemas, tanto en países desarrollados como en aquellos que están en vías de desarrollo. Normalmente, se asocian con agentes biológicos (hongos, virus, bacterias...) o químicos que contaminan el agua o los alimentos. Según la Organización Mundial de la Salud (2015), *Staphylococcus aureus* pertenece a uno de los agentes que causa más

intoxicaciones alimentarias en todo el mundo. Aunque la mayoría de intoxicaciones alimentarias estafilocócicas son debidas a *S. aureus*, existen otros estafilococos que las pueden ocasionar, como la especie descrita por Khambaty *et al.* (1994): *S. intermedius*.

El periodo de incubación y los síntomas de intoxicación estafilocócica dependen de la cantidad de enterotoxinas ingeridas y de la susceptibilidad de la persona. Los síntomas más comunes son náuseas y vómitos. Se requieren cinco condiciones para que se produzca intoxicación alimentaria causada por estafilococos: una fuente de estafilococo productor de enterotoxinas (1), transmisión al alimento (2), condiciones favorables para el crecimiento del microorganismo en el alimento (3), una temperatura permisiva durante un periodo de tiempo suficiente para la multiplicación bacteriana y la toxinogénesis (4) e ingestión de una cantidad de toxina suficiente para desencadenar los síntomas (5). Las vías de contaminación son dos: contaminación primaria de alimentos crudos provenientes de animales, y contaminación de origen humano durante la manufactura de los productos alimenticios (Hennekinne y Le Loir, 2014).

Si un manipulador de alimentos porta una cepa productora de enterotoxinas, puede contaminar el alimento y causar un brote de intoxicación alimentaria por estafilococos (Dagnew *et al.*, 2012). Cocinar los alimentos a altas temperaturas destruye a la bacteria. Sin embargo, sus toxinas son muy resistentes al calor y no se ven afectadas por las temperaturas de cocinado. La intoxicación alimentaria puede ocurrir tan solo 30 minutos después de haber consumido alimentos contaminados, aunque lo normal es que ocurra cuando haya pasado de 1 a 6 horas después de la ingestión. En general, el malestar ocasionado dura unas 24-72h, y en el caso de los pacientes inmunocomprometidos, se requiere la hospitalización. En este caso los antibióticos no tienen efecto, puesto que lo que causa la intoxicación alimentaria es la toxina (Gillaspy e landolo, 2014).

1.3 Problemas derivados de la resistencia a antibióticos

1.3.1 Resistencia a antibióticos beta-lactámicos y no beta-lactámicos

Las bacterias resistentes a antibióticos se han convertido en una de las principales causas de infección hospitalaria en todo el mundo, provocando que se incremente la mortalidad y la morbilidad por esta causa (Patridge *et al.*, 2018). *Staphylococcus aureus* tiene la capacidad de adquirir multitud de mecanismos de resistencia frente a antibióticos gracias a que la presencia de elementos genéticos móviles constituye más de un 15% del genoma de esta especie (Athliamai *et al.*, 2018).

Durante la Segunda Guerra Mundial, la penicilina fue ampliamente utilizada para combatir infecciones provocadas por *S. aureus* (Aslam *et al.*, 2018). El mecanismo de acción del grupo de antibióticos β -lactámicos, el cual incluye penicilinas, oxacilinas, cefalosporinas y meticilinas, se basa en su capacidad para inhibir la síntesis del peptidoglicano, bloqueando la actuación de las proteínas PBP (proteínas de unión a la penicilina). Las PBP poseen actividad transglucosidasa, carboxipeptidasa y transpeptidasa, lo que permite enlazar los componentes del peptidoglicano. La estructura espacial de los antibióticos β -lactámicos es similar a la del sustrato de las enzimas mencionadas (residuo acil-D-alanin-D-alanina), lo que impide su actividad normal a nivel de la síntesis de la pared celular bacteriana.

Los estafilococos resultaron inicialmente muy susceptibles a la penicilina. Sin embargo, alrededor de la década de 1950, la penicilina se empezó a usar en mayor medida en los hospitales, produciéndose los primeros casos de resistencia a este β -lactámico (Calvo y Martínez-Martínez, 2008; Grace y Fetsch, 2018). La resistencia se debía a la adquisición de plásmidos que contenían el gen *blaZ*, el cual codifica la enzima extracelular β -lactamasa. Dicha enzima hidroliza el anillo beta-lactámico presente en los antibióticos beta-lactámicos (Ilustración 6), reduciendo así el efecto de la penicilina (Athliamai *et al.*, 2018).

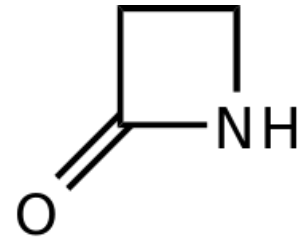


Ilustración 6. Anillo beta-lactama

A partir de 1960 se empezó a usar la meticilina como tratamiento a la infección provocada por *S. aureus*. Este antibiótico, homólogo a la penicilina, se diseñó con el objeto de resistir las enzimas β -lactamasas, aunque hace ya algunos años, se empezaron a reportar casos de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) (Palavecino, 2020). La resistencia a meticilina se debe a la adquisición de un elemento genético móvil denominado casete móvil cromosómico (SCC*mec*) que facilita la transferencia de determinantes de resistencia. El gen *mecA* localizado en el casete cromosómico mencionado, codifica la proteína de unión a penicilina (PBP2a), una transpeptidasa que interviene en la síntesis de la pared celular cuando otras proteínas con la misma función son inhibidas. Por tanto, esta transpeptidasa asegura la integridad de la bacteria en presencia de antibióticos β -lactámicos (Rocchetti *et al.*, 2018). Sin embargo, la resistencia a los β -lactámicos depende en parte de varios elementos adicionales que se denominan genes *fem* (factor esencial para la resistencia a la meticilina) y *aux* (auxiliar). Los genes *fem* se encuentran en el cromosoma bacteriano y juegan un papel importante en el entrecruzamiento de las cadenas del peptidoglicano, elevando de este modo la resistencia a la meticilina. Cuando ocurre una mutación en uno de estos genes, la cepa estafilocócica muestra una reducción progresiva en la resistencia a los antibióticos β -lactámicos. El gen *femA* es esencial para la adición de residuos de glicina en las cadenas del peptidoglicano. Ciertamente es que aún no se conoce la relación exacta entre *femA* y la alta resistencia a la meticilina (Li *et al.*, 2012).

Además de la resistencia ocasionada por los antibióticos β -lactámicos, *S. aureus* ha desarrollado mecanismos de resistencia frente a otros antibióticos, causando que muchas de las cepas de *S. aureus* sean multirresistentes. La vancomicina es un antibiótico del grupo de los glicopéptidos, cuya diana es la subunidad D-Ala-D-Ala de los monómeros del peptidoglicano. Se empezó a usar después de conocer que la mayoría de las cepas de *S. aureus* eran meticilin resistentes, y ha sido considerado uno de los fármacos más exitosos frente a *S. aureus*. Al principio, la vancomicina era capaz de acabar con las infecciones provocadas por MRSA (*S. aureus* resistente a la meticilina). Sin embargo, *S. aureus* también ha desarrollado resistencia frente a este antibiótico. Dicha resistencia está mediada por el gen *vanA*, el cual codifica una proteína que sustituye el extremo D-Ala-D-Ala por D-Ala-D-Lactato, cuya afinidad por la vancomicina es mil veces menor que la del monómero *wild-type* (Rodríguez y Vesga, 2005). Actualmente, en los casos donde las cepas son resistentes a la vancomicina, se recurre a antibióticos como linezolid y clindamicina. Sin embargo, linezolid es muy caro y presenta toxicidad, y la resistencia a clindamicina se ha visto incrementada en los últimos años (Murray *et al.*, 2017).

1.3.2 Terapias alternativas para el control de la enfermedad infecciosa provocada por *S. aureus*

Debido a la gran cantidad de resistencias frente a antibióticos detectadas en cepas de *S. aureus* aisladas de muestras de origen humano, se están desarrollando diversas terapias alternativas para combatir este agente infeccioso. Destacan, entre ellas, las autovacunas, la nanomedicina, los enzibióticos y la fagoterapia. Esta última se comentará de forma más detallada en el siguiente apartado.

La vacuna autógena o **autovacuna** constituye una vacuna terapéutica preparada exclusivamente para un paciente que sufre infecciones crónicas o recurrentes, aunque también puede ser usada para tratar infecciones producidas en granjas o en animales de compañía. Es usada solo en ocasiones excepcionales, donde la resistencia a antibióticos es muy alta y se han probado otros tratamientos sin resultados. Las infecciones crónicas causadas por *S. aureus*, entre las que se encuentran forunculosis, osteomielitis, bronquitis, o infecciones causadas por el implante de catéteres, entre otras, se pueden tratar mediante esta terapia. Con ella, se persigue obtener el agente infeccioso a partir de las zonas de infección (pus del forúnculo, esputo, flujo vaginal...), lo que se utilizará posteriormente como autovacuna. El objetivo de este tratamiento es estimular o modular el sistema inmune innato o adquirido para que responda frente a las cepas específicas causantes de la infección, de tal modo, que el sistema inmune del paciente sea capaz de prevenir los episodios recurrentes de la enfermedad o detener los procesos de inflamación crónica. Los lugares de inyección del antígeno son alcanzados por las células fagocíticas, las cuales digieren a los estafilococos y presentan partes de ellos a los linfocitos *T helper*. Esto desencadena la producción de moléculas como el γ -interferón o las citocinas que, a su vez, ayudan a los linfocitos B a producir inmunoglobulinas frente a los antígenos bacterianos, los cuales acaban siendo procesados por las células dendríticas (Giedrys-Kalemba *et al.*, 2018).

La **nanomedicina** para combatir infecciones provocadas por *S. aureus*, está resultando una terapia exitosa en los últimos años. Gracias a la nanomedicina se consigue (i) la inhibición de la formación de la biopelícula bacteriana, (ii) un mejor acceso al interior de la célula o (iii) la mejora de la actividad antimicrobiana, combinada con otros agentes antimicrobianos. Las nanopartículas se pueden acumular pasivamente en ciertos órganos debido a su pequeño tamaño, a la carga de la superficie o a su gran superficie específica. Muchos agentes antimicrobianos son conjugados con nanotransportadores para reducir el tiempo de actividad farmacológica (Zhou *et al.*, 2018). Baelo *et al.* en 2015, describieron el uso de nanopartículas dirigido al tratamiento de infecciones bacterianas en las que se forman biopelículas. Para ello conjugaron las nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) cargadas con el antibiótico ciprofloxacina junto a la enzima DNasa I, la cual es capaz de digerir el ADN, reduciendo así considerablemente el tamaño de la biopelícula.

Los **enzibióticos** son enzimas líticas capaces de lisar bacterias con una farmacocinética predecible. Dichas enzimas provienen de virus, bacterias u hongos, las cuales son capaces de degradar bacterias. Hasta el momento, se han usado para tratar sepsis, infecciones pulmonares y mastitis provocadas por *S. aureus* (Marqus *et al.*, 2020).

1.3.3 El futuro de la fagoterapia aplicada al control de infecciones estafilocócicas

La fagoterapia es un tratamiento que se basa en el uso de virus, denominados bacteriófagos, que lisan bacterias específicas. Estos virus al ser específicos de ciertas bacterias, no tienen efecto sobre la microbiota beneficiosa del individuo ni sobre células eucariotas. Además, el uso de bacteriófagos *in vivo* no incrementa la respuesta innata inflamatoria en comparación con lo observado en el tratamiento con antibióticos (Bouchart, 2020).

Los bacteriófagos o fagos están formados por una cápsida proteica que contiene en su interior al ácido nucleico viral. La mayoría poseen una cabeza icosaédrica y una cola. Algunas de las familias de fagos más importantes son *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*, las cuales se caracterizan por poseer una cola contráctil, no contráctil larga o no contráctil corta, respectivamente. En el caso de la terapia con fagos, interesa que los virus realicen el ciclo lítico con el objetivo de lisar las bacterias que causan la infección. Durante este ciclo, las bacterias huéspedes redirigen su metabolismo hacia la producción de moléculas víricas. Después, estas partículas víricas salen de la bacteria, ensamblándose y formando nuevos fagos, a la vez que la célula bacteriana es lisada. Sorprendentemente, la fagoterapia se empezó a usar como tratamiento frente a infecciones bacterianas en la década de los treinta (Kwiatk et al., 2019). Sin embargo, con la introducción de los antibióticos, el uso de la terapia con virus disminuyó. La emergencia sanitaria actual ocasionada por la resistencia a antibióticos ha permitido que se desarrollen, en estos últimos años, múltiples investigaciones relativas a tratamientos alternativos al uso de estos fármacos.

El bacteriófago ideal para usar en terapia debe ser capaz de realizar, exclusivamente, un ciclo lítico en su célula huésped, con el objetivo de evitar la transducción especializada de genes bacterianos, y maximizar las posibilidades de lisis bacteriana. Además, debe estar completamente secuenciado para evitar la inducción de resistencias a antibióticos o de genes de virulencia bacteriana mediante la integración de material genético viral en el cromosoma bacteriano. Asimismo, debe mostrar una amplia actividad frente al patógeno determinado y no frente a otras especies (Lehman et al., 2019).

Sin embargo, la principal desventaja que muestra la fagoterapia es la necesidad de conocer, en el menor tiempo posible, el agente etiológico causante de la infección, con el objeto de poder escoger de forma específica el fago más efectivo contra el patógeno. Por el contrario, esta desventaja puede resolverse, en parte, con la aplicación combinada de distintos fagos (Reina y Reina, 2018).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

El objetivo principal de este trabajo fue caracterizar fenotípica y molecularmente una colección de cepas presuntamente pertenecientes al género *Staphylococcus* y seleccionar aquellas que potencialmente presentaran un mayor grado de virulencia. Se trató, además, de visualizar el efecto del estafilofago K sobre las cepas más virulentas. No obstante, este último aspecto se llevó a cabo de forma preliminar, como paso previo al diseño de otros experimentos a corto-medio plazo.

Este objetivo principal se puede desglosar en los siguientes objetivos específicos:

2.2 Objetivos específicos

- Caracterización fenotípica de una colección de cepas de origen humano presuntivas de pertenecer al género *Staphylococcus*, así como identificación de la especie *S. aureus* entre los individuos pertenecientes a la colección mediante marcadores moleculares específicos.
- Detección de los genes implicados en la producción de enterotoxinas A, C, D y E y toxinas del síndrome del shock tóxico y de la piel escaldada, así como de los genes responsables de la resistencia a la meticilina, en las cepas identificadas como *S. aureus*.
- Exposición de las cepas de *S. aureus* más virulentas a la infección con el estafilofago K, como tratamiento alternativo al uso de antibióticos.

3. Material y métodos

3.1 Colección de las cepas

La colección de cepas utilizada para la realización de este trabajo forma parte del cepario perteneciente al grupo de investigación BIO-175 (*Desarrollo de tecnologías microbiológicas para la mejora de suelos de interés agrícola*). Dichas cepas habían sido previamente aisladas en medio de Agar Manitol Salado (MSA), a partir de fosas nasales y piel de personas sanas. Las características específicas de este medio (7,5% de NaCl) lo convierten en extremadamente específico para el crecimiento de *Staphylococcus*, por lo que todas las cepas de la colección fueron presuntamente consideradas de tipo estafilocócico. Un total de 28 cepas fueron de origen epidérmico, mientras que otras 33 lo fueron de origen nasal. La recuperación de las cepas criopreservadas a -80 °C se realizó mediante la siembra en placa con medio de cultivo estándar APHA (Referencia 413799.1210, PanReac AppliChem, España) (Tabla 1). Tras incubar la placa durante 24-48 horas a 30 °C, se realizó una siembra en estrías dirigida al aislamiento de cada cepa también en placas con medio estándar APHA (Ilustración 7). Las condiciones de incubación fueron idénticas a las descritas anteriormente.

Tabla 1. Composición del medio de cultivo para métodos estándar APHA

Composición	Cantidades	Función	Preparación
Extracto de Levadura	2,5 g/L	Recuperación cepas a partir de vial criopreservados. Medio general para el crecimiento de bacterias	Añadir 23,5 g de APHA cada L de agua destilada. Calentar en el microondas hasta completa disolución. Esterilizar en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Repartir en placa.
D (+)-Glucosa (Anhidra)	1,0 g/L		
Digerido Enzimático de Caseína	5,0 g/L		
Agar Bacteriológico	15,0 g/L		

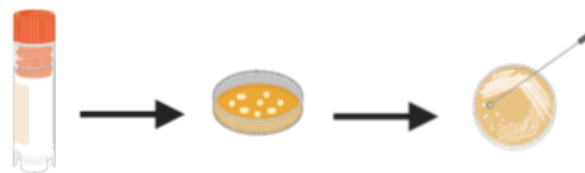


Ilustración 7. Recuperación de cepas criopreservadas

3.2 DSMZ-26857 *Staphylococcus* fago MRLN (fago K de *Staphylococcus*)

El estafilofago K es un virus de ciclo lítico, de ADN bicatenario, que presenta una cabeza icosaédrica unida a una cola larga y contráctil. Su clasificación taxonomía se muestra en la Tabla 2. El huésped de este fago es *Staphylococcus aureus*.

La colección alemana de cultivos tipo (DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) proporcionó la muestra del estafilofago en una suspensión estéril concentrada de partículas fágicas, que fueron conservadas a 4 °C.

Tabla 2. Clasificación taxonómica del fago K

Taxonomía	
Orden	<i>Caudovirales</i>
Familia	<i>Myoviridae</i>
Subfamilia	<i>Spounavirinae</i>
Género	<i>Twortlikevirus</i>

3.3 Diseño experimental

En la Ilustración 8 se muestra el diseño experimental relacionado con el desarrollo del trabajo, el cual muestra tres bloques experimentales independientes: (i) Caracterización fenotípica de la colección de cepas, (ii) caracterización molecular y (iii) fagotipado de las cepas seleccionadas.

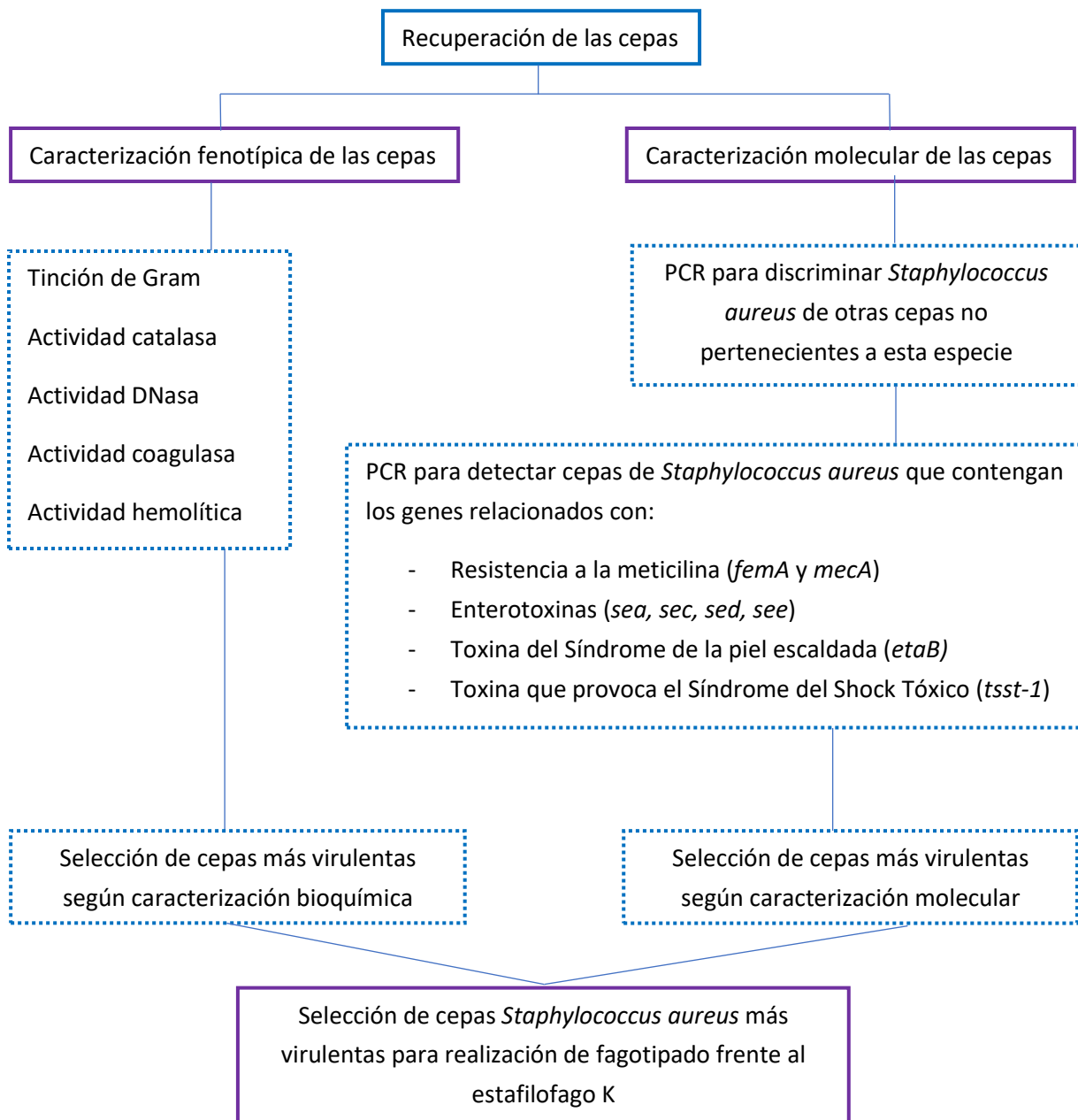


Ilustración 8. Diseño experimental

3.4 Caracterización fenotípica de las cepas

3.4.1 Protocolo para la tinción Gram

Se trata de una tinción diferencial a partir de la cual se puede diferenciar la pared celular de las bacterias en función del mayor o menor grosor de la capa de peptidoglicano. A continuación, se describe un protocolo estándar para tinción de Gram (Ilustración 9):

- i. Extensión de cada una de las cepas con el asa de platino en un portaobjetos
- ii. Dejar secar al aire y fijar a la llama del mechero bunsen
- iii. Cubrir la muestra con el colorante cristal violeta durante un minuto
- iv. Posteriormente, se cubre la muestra con lugol durante un minuto, el cual actúa como mordiente para que el cristal violeta se fije con mayor intensidad a la pared celular; transcurrido ese tiempo, se retira el volumen sobrante.
- v. Se agrega a continuación alcohol 96° sobre la muestra, y transcurridos 5-10 segundos, lavar en abundancia con agua destilada. Este paso constituye el paso crítico, ya que se decoloran las bacterias gramnegativas exclusivamente, quedándose las bacterias grampositivas de color violeta.
- vi. Para teñir las bacterias gramnegativas, se utiliza una coloración de contraste, usando safranina que aporta color rosa-fucsia. Se cubre la muestra durante un minuto, y después se retira el volumen sobrante y se lava el portaobjetos con agua destilada.
- vii. Observación a microscopio con el objetivo de inmersión (x 100). Dado que *Staphylococcus aureus* es una bacteria grampositiva, y tiene una morfología cocoide, se deben observar al microscopio cocos de color violeta (Ilustración 10).



Ilustración 9. Protocolo tinción de Gram

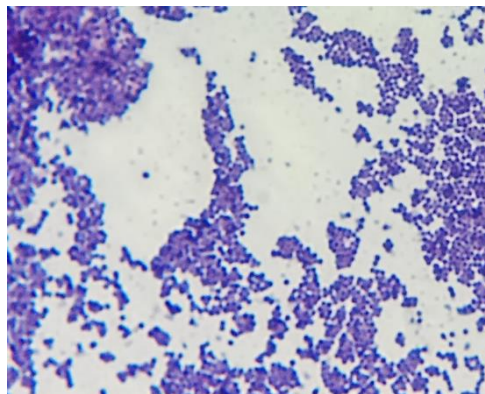
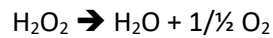


Ilustración 10. *Staphylococcus aureus* observado bajo microscopio

3.4.2 Protocolo para la determinación de la actividad catalasa

La actividad catalasa se basa en la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno según la siguiente reacción:



Para la determinación de la actividad catalasa de las cepas de la colección, se realizó una extensión del cultivo a analizar con el asa de platino en un portaobjetos y se adicionó una gota de agua oxigenada al 3,3 % (p/v) (Ilustración 11). La prueba fue positiva cuando se observó el desprendimiento de burbujas a partir de la extensión del microorganismo en el portaobjetos (oxígeno) (Ilustración 12).

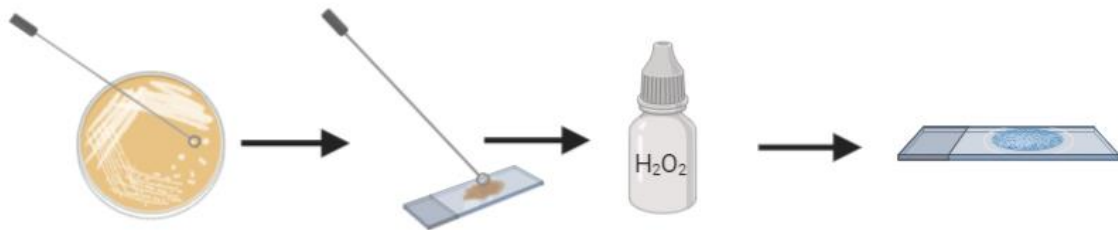


Ilustración 11. Protocolo de actividad catalasa.

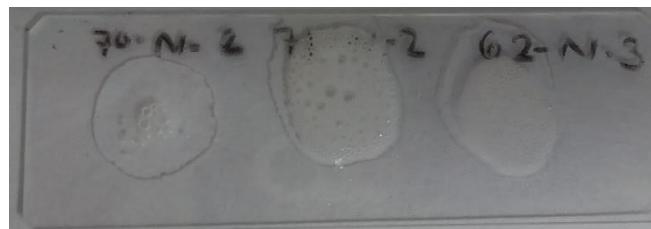


Ilustración 12. Portaobjetos con muestras catalasa positivo.

3.4.3 Protocolo para la determinación de la actividad desoxirribonucleasa (DNasa)

El medio de cultivo agar DNasa (Referencia 413759.1210, PanReac AppliChem, España) (Tabla 3), además de otros componentes, contiene ácido desoxirribonucleico (ADN), el cual se encuentra altamente polimerizado y representa el sustrato de la desoxirribonucleasa (DNasa). La DNasa es una enzima extracelular cuya función es degradar los enlaces fosfodiéster internos del ADN, liberando nucleótidos. Por tanto, este medio nos permite diferenciar entre bacterias que muestran actividad DNasa de las que no.

Tabla 3. Componentes del medio de cultivo Agar DNasa

Composición	Cantidades	Función	Preparación
Peptona de caseína	15,0 g/L	Determinación de actividad desoxirribonucleasa	Adicionar 42 g de Agar DNasa en cada L de agua destilada. Calentar en el microondas y agitar hasta llegar a ebullición. Esterilizar a 121 °C durante 20 minutos. Repartir en placa.
Peptona de soja	5,0 g/L		
Cloruro de sodio	5,0 g/L		
Ácido desoxirribonucleico	2,0 g/L		
Agar	15,0 g/L		

Para determinar la capacidad DNasa de las cepas de la colección, estas se sembraron en forma de doble estría en placas con este medio de cultivo. Las placas se incubaron durante 48 horas a 30 °C, y tras observar crecimiento bacteriano, se procedió al revelado de la prueba adicionando HCl 0,1 N sobre el cultivo microbiano (Ilustración 13), lo que provocó el precipitado del ADN no degradado. La actividad DNasa positiva se visualiza con un halo de aclaramiento alrededor del crecimiento microbiano (Ilustración 14), debido a que en esta zona el ADN se habrá degradado. Por el contrario, el ADN no degradado, precipita mostrando opacidad en el medio de cultivo (Ilustración 15).

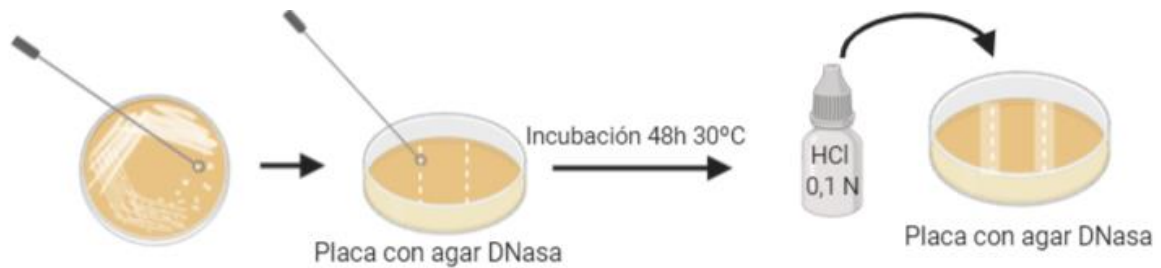


Ilustración 13. Protocolo para la detección de actividad DNasa



Ilustración 14. Placa DNasa positivo



Ilustración 15. Placa DNasa negativo

Además, se realizó un análisis de eficiencia de la actividad DNasa donde la sensibilidad y especificidad se calcularon mediante el uso de las fórmulas descritas a continuación, tomando como verdadero positivo aquella cepa que presentó actividad DNasa y resultó ser positiva para *S. aureus* mediante el uso de marcadores moleculares específicos (ver apartado 3.5 más adelante):

- Sensibilidad (%) = $[\text{Verdaderos positivos} / (\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos})] \times 100$
- Especificidad (%) = $[\text{Verdaderos negativos} / (\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos positivos})] \times 100$

3.4.4 Protocolo para la determinación de la actividad coagulasa en tubo

La prueba de la coagulasa nos indica la capacidad del microorganismo para producir o no esta enzima extracelular, la cual es un importante indicador de patogenicidad en el grupo de los estafilococos, pues provoca la coagulación del fibrinógeno presente en el plasma, en fibrina. A partir de este criterio se pueden clasificar las cepas en CoNS y CoPS.

Para la determinación de dicha actividad, todas las cepas de la colección se sembraron en tubos que contenían 3 mL caldo Brain Heart Infusion (BHI, Referencia 413777.1210, PanReac AppliChem, España) (Tabla 4), y se incubaron a 37 °C durante 24 h (Ilustración 16).

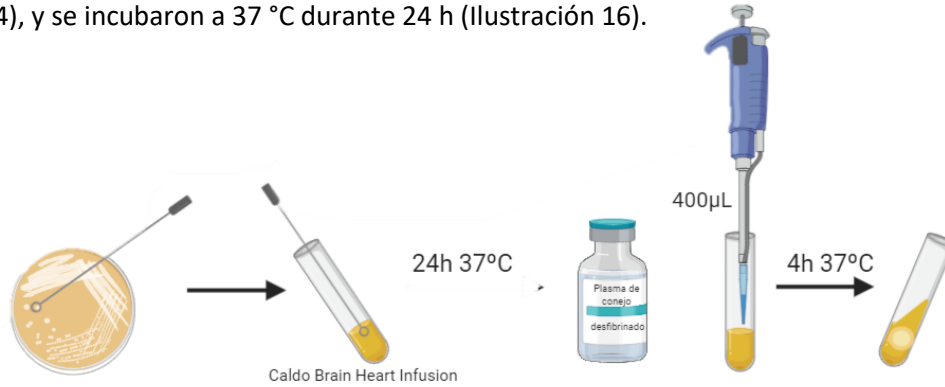


Ilustración 16. Protocolo para determinación de la actividad coagulasa

Tabla 4. Componentes del medio Brain Heart Infusion (BHI)

Composición	Cantidades	Función	Preparación
Infusión de cerebro de Ternera	7,5 g/L	Medio de enriquecimiento	Adicionar 37g del medio de cultivo en cada L en agua destilada. Verter en tubos cortos de 3mL y poner tapón. Esterilizar en el autoclave a 121 °C durante 20 min.
Infusión de corazón de Res	10,0 g/L		
D(+)-Glucosa	2,0 g/L		
Cloruro sódico	5,0 g/L		
Peptona de gelatina	10,0 g/L		
di-Sodio Hidrógeno Fosfato	2,5 g/L		

Pasado el tiempo de incubación, se adicionó 400 µL de plasma de conejo desfibrinado (Referencia BD BBL™ 240658, Becton, Dickinson and Company, USA) (Tabla 5, Ilustración 17) a cada tubo y se dejó incubar 4 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se reveló la formación del coágulo en cada tubo, clasificándose la coagulación como negativa (sin coágulo), débil (coágulo muy ligero), media (coagulación evidente) o fuerte (coagulación completa, Ilustración 18).

Tabla 5. Composición del plasma de conejo liofilizado

Composición	Cantidades	Función	Preparación
Plasma de conejo con etilendiamintetracetato (0,15%) y cloruro sódico (85%)	Vial de 3 mL	Determinación de actividad coagulasa	Añadir 3 mL de agua destilada autoclavada a cada vial.

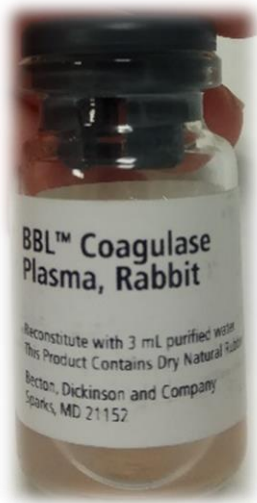


Ilustración 17. Vial plasma de conejo liofilizado tras hidratarlo

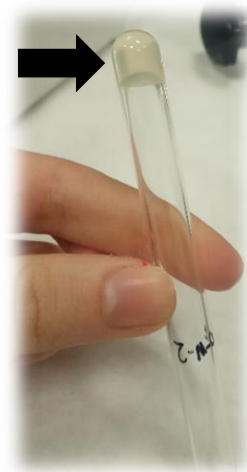


Ilustración 18. Tubo con el medio coagulado completamente

3.4.5 Protocolo para la determinación de hemolisis

El medio de agar sangre se utiliza para estudiar la actividad hemolítica que presentan algunos microorganismos. Sus componentes, como el extracto de corazón y agar-agar y NaCl, indicados en la Tabla 6, proporcionan los elementos necesarios para el crecimiento. La sangre desfibrinada de oveja (Referencia SR0051C, Thermo Scientific, España) (Ilustración 19) que se adiciona después de haber autoclavado el medio base (Referencia 1.10886.0500, Merck, Alemania) (Tabla 6), proporciona factores de crecimiento esenciales para el microorganismo y constituye la base para determinar las distintas reacciones de hemolisis.



Ilustración 19. Sangre desfibrinada de oveja

Tabla 6. Medio de cultivo base para Agar Sangre

Composición	Cantidades	Función	Preparación
Extracto de corazón y peptonas	20 g/L	Determinación de actividad hemolítica.	Añadir 40 g de Agar Sangre en 1 L de agua destilada. Autoclavar a 121 °C durante 20 minutos. Antes de verter en placa, adicionar sangre estéril desfibrinada al 5%
Cloruro sódico	5 g/L		
Agar-agar	15 g/L		

Para la determinación de la actividad hemolítica, se realizó una siembra de todas las cepas de la colección en placas de agar sangre, las cuales se incubaron durante 24 h a una temperatura de 30 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se observó la capacidad hemolítica de las cepas en función de la formación de halos de aclaramiento del medio (Ilustración 20).

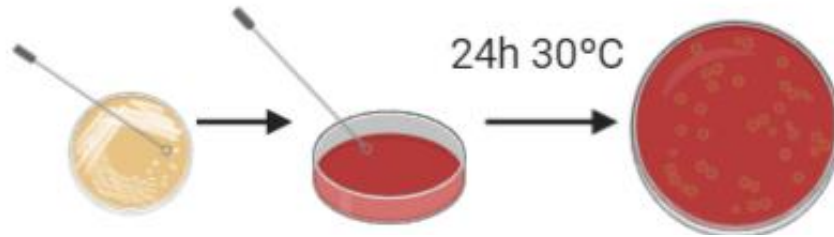


Ilustración 20. Protocolo determinación actividad hemolítica

Se considera β -hemolisis cuando el halo de aclaramiento se muestra claro y completo alrededor de las colonias (Ilustración 21); α -hemolisis cuando la decoloración no es tan obvia como la observada en β -hemolisis, y se observa un color verdoso alrededor de las colonias (Ilustración 22) y gamma-hemolisis cuando no se aprecian zonas de aclaramiento alrededor de las colonias (Ilustración 23).

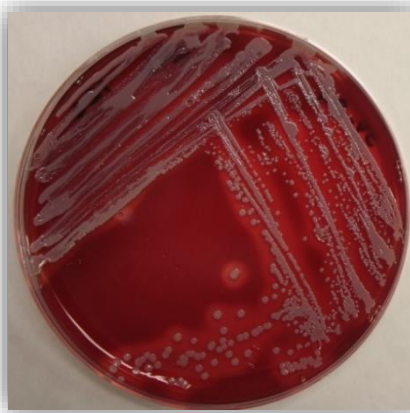


Ilustración 21. Beta - hemolisis

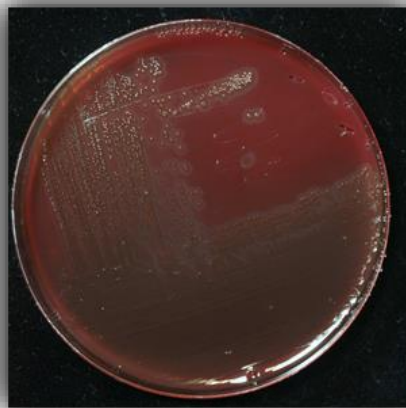


Ilustración 22. Alfa - hemolisis

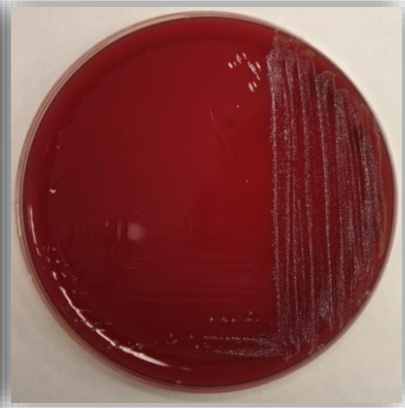


Ilustración 23. Gamma - hemolisis

3.5 Análisis molecular de las cepas: marcadores de virulencia

Tras la caracterización fenotípica de la colección de cepas, se prosiguió con la caracterización molecular para detectar aquellas que podrían ser identificadas como *S. aureus*, así como aquellas que podrían ser consideradas de mayor patogenicidad por resultar positivas para determinados genes relacionados con la virulencia. Tanto la identificación de la especie *Staphylococcus aureus*, como la detección de marcadores moleculares de virulencia se llevó a cabo mediante la técnica de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR).

3.5.1 Extracción de ADN genómico

Se realizaron suspensiones de biomasa de cada cepa con la ayuda del asa de platino en microtubos que contenían 500 μ L de agua destilada estéril (Ilustración 24). Posteriormente, se realizó un choque térmico a las suspensiones bacterianas, sometiéndolas a 95,5 $^{\circ}$ C en un bloque térmico durante 5 minutos (Marca: Cole Parmer™, Modelo: Stuart) (Ilustración 25) y seguidamente, se introdujeron en hielo durante el mismo periodo. Una vez realizado el choque térmico, el material se centrifugó y el sobrenadante se congeló hasta el momento de ser utilizado.

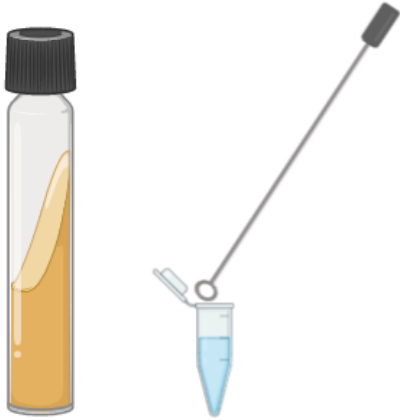


Ilustración 24. Suspensiones bacterianas a partir de tubos de agar inclinado



Ilustración 25. Termobloque con suspensiones bacterianas

3.5.2 Cebadores

Las secuencias de los primers relativos al gen de la terminasa estafilocócica (*MH678720*) utilizados para la identificación de *Staphylococcus aureus* se tomaron del trabajo de Omwenga *et al.* (2019). Las secuencias de oligonucleótidos de los diversos marcadores de virulencia fueron seleccionadas a partir del trabajo publicado por Mehrotra *et al.* (2000). La temperatura de anillamiento usada en la PCR, la secuencia de cada cebador, el tamaño de fragmento amplificado por la pareja de cebadores y el gen relacionado se muestran en la Tabla 8. Los cebadores fueron proporcionados por la empresa Sigma-Aldrich en formato liofilizado. Tras la suspensión del material en agua ultrapura a una concentración stock de 100 mM, se prepararon alícuotas de trabajo de cada cebador a una concentración de 10 mM.

3.5.3 Condiciones de PCR y reactivos

La técnica PCR permite amplificar un fragmento de ADN alrededor de un millón de copias en unos 20-30 ciclos. Esta técnica se llevó a cabo en el termociclador (BIO-RAD T100, Thermal Cycler). En la Tabla 7 se muestran los componentes y las cantidades que se han utilizado en cada mezcla de PCR (Ref. BIO25012, BioMix™ Bioline, USA). Las condiciones aplicadas para la amplificación del ADN fueron: 1 ciclo de 3 minutos a 95 °C, 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 ciclo de 1 minuto a la temperatura de anillamiento determinada para cada pareja de cebadores (Tabla 8), 1 ciclo a 72 °C durante 1 minuto y, finalmente, 72 °C durante 10 minutos, para la extensión final.

Tabla 7. Componentes de la mezcla de PCR

Componentes	Volumen (μL)
Cebador 10mM Forward	0,4
Cebador 10mM Reverse	0,4
ADN	9,2 (10-15ng ADN/muestra)
BioMix 2x (dNTPs, Taq polimerasa, MgCl₂)	10

Tabla 8. Información de los cebadores utilizados

Nombre de cebador	Secuencia (5'→3')	Gen o región que amplifica	Proteína codificada	Tamaño del amplicón (pb)	Tª de anillamiento (°C)
SAUF	TAACCCCTCATCACCTCCGT	MH678720	Terminasa <i>S. aureus</i>	500	57
SAUR	ACTGCAAAGCAAGCACGTTT				
GSEAR-1	GGTTATCAATGTGCGGGTGG	<i>sea</i>	Enterotoxina A	102	57
GSEAR-2	CGGCACTTTTTTCTCTTCGG				
GSECR-1	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG	<i>sec</i>	Enterotoxina C	451	59
GSECR-2	CACACTTTTAGAATCAACCG				
GSEDR-1	CCAATAATAGGAGAAAATAAAAG	<i>sed</i>	Enterotoxina D	278	55
GSEDR-2	ATTGGTATTTTTTTTCGTTT				
GSEER-1	AGGTTTTTTCACAGGTCATCC	<i>see</i>	Enterotoxina E	209	60
GSEER-2	CTTTTTTTCTTCGGTCAATC				
GFEMAR-1	AAAAAAGCACATAACAAGCG	<i>femA</i>	Factor esencial de resistencia a meticilina	132	57
GFEMAR-2	GATAAAGAAGAAACCAGCAG				
GMECAR-1	ACTGCTATCCACCCTCAAAC	<i>mecA</i>	PBP2a (Resistencia a meticilina)	163	57
GMECAR-2	CTGGTGAAGTTGTAATCTGG				
GETBR-1	ACAAGCAAAAGAATACAGCG	<i>etb</i>	Exfoliatina B	226	60
GETBR-2	GTTTTTGGCTGCTTCTCTTG				
GTSSTR-1	ACCCCTGTCCCTTATCATC	<i>tsst-1</i>	Toxina Síndrome Shock Tóxico 1	326	60
GTSSTR-2	TTTTCAGTATTTGTAACGCC				

3.5.4 Detección e interpretación de los resultados

Los fragmentos de ADN amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Referencia A8963, PanReac AppliChem, España) al 1,5% en tampón TAE 1X (40mM Tris, 20mM ácido acético y 1mM EDTA pH 8,4) a 120 V durante 1 h. Se adicionó 10 µL del producto de PCR en cada pocillo y se utilizó el marcador de ADN 1kb HyperLadder™ para comparar el tamaño de las bandas en el gel (Referencia BIO-33025, Bionline). La visualización de los productos amplificados se realizó con ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta (BUIO-RAD ChemiDoc XRS+System).

3.6 Fagotipado del estafilofago K frente a *Staphylococcus aureus*

Aquellas cepas que mostraron un mayor potencial de virulencia, tanto desde el punto de vista bioquímico como molecular, fueron seleccionadas como candidatas para llevar a cabo el experimento de fagotipificación con el estafilofago K MRLN DSMZ 26857, siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

En primer lugar, se llevó a cabo una siembra en masa de las cepas seleccionadas como más virulentas en placas de Petri con medio Agar Triptona de Soja (TSA, Referencia 413819.1210, PanReac AppliChem, España) (Tabla 9), las cuales se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Tabla 9. Composición del medio TSA

Composición	Cantidades	Función	Preparación
Digerido papaínico de soja	5 g/L	Medio general para el crecimiento de bacterias	Añadir 40 g de TSA en 1 L de agua destilada. Autoclavar a 121 °C durante 20 minutos.
Digerido pancreático de caseína	15 g/L		
NaCl	5 g/L		
Agar	15 g/L		

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, y obtenido el crecimiento en masa de las cepas, se adicionó 10 µL de una suspensión concentrada del virus sobre el cultivo bacteriano. A continuación, se dejaron secar las placas durante al menos 10 minutos y se incubaron durante 12 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se procedió a la visualización de la presencia de calvas (halos de aclaramiento) derivadas del proceso lítico viral.

3.7 Análisis estadístico

Tras obtener los resultados a partir de los distintos bloques experimentales, se llevó a cabo un primer análisis descriptivo y posteriormente, un análisis de independencia mediante el cálculo de la Chi-cuadrado, así como un análisis de conglomerados y un estudio de correlación de Spearman. Todo ello con el fin de determinar relaciones estadísticas entre las distintas variables cualitativas analizadas. Se usó el programa Statgraphics Centurion 18 y un nivel de significación (p) menor de 0,05.

4. Resultados y Discusión

Los resultados derivados de los distintos experimentos realizados se expondrán y analizarán a continuación. En primer lugar, se mostrará un análisis descriptivo de los datos dirigido a la caracterización fenotípica de la colección de cepas, en función de la capacidad DNasa, coagulasa y hemolítica de cada una de ellas, buscando la posible relación entre dichas capacidades mediante pruebas de independencia estadística y análisis de conglomerados. Posteriormente, se describirán los resultados obtenidos a partir de los marcadores moleculares de patogenicidad y se mostrarán las posibles relaciones estadísticas entre ellos mediante análisis de correlación de Spearman. Por último, se describirán los resultados obtenidos en el experimento preliminar de fagotipificación.

4.1 Caracterización bioquímica de la colección de cepas

A partir de la tinción de Gram, se descartaron aquellas cepas de la colección Gram negativas así como aquellas que no presentaron una morfología cocácea. Finalmente, el estudio se centró en un total de 58 cepas. Todas las cepas de la colección presentaron actividad catalasa, como era de esperar. A continuación, se describirán los resultados obtenidos con respecto a actividad DNasa, coagulasa y hemólisis, y se estudiarán las posibles relaciones entre ellas.

4.1.1 Actividad DNasa

La Ilustración 26 muestra que el 69% (40/58) de las cepas presentaron actividad desoxirribonucleasa ya que mostraron una zona de hidrólisis alrededor del crecimiento bacteriano en placas de agar DNasa tras el revelado con HCl 0,1N. A este grupo se le denominó como DNasa+, frente al 31% (18/58) que no mostraron actividad desoxirribonucleasa. La actividad DNasa se ha considerado tradicionalmente como un test bioquímico de rutina para apoyar la identificación de cepas de *S. aureus* (Aryee y Edgeworth, 2017). Sin embargo, Pumipuntu *et al.* (2017) comprobaron que la prueba de la DNasa puede dar lugar a falsos negativos. Más adelante (apartado 4.2.1), se mostrarán los valores de Sensibilidad y Especificidad con respecto a la detección de marcadores moleculares específicos de *S. aureus*.

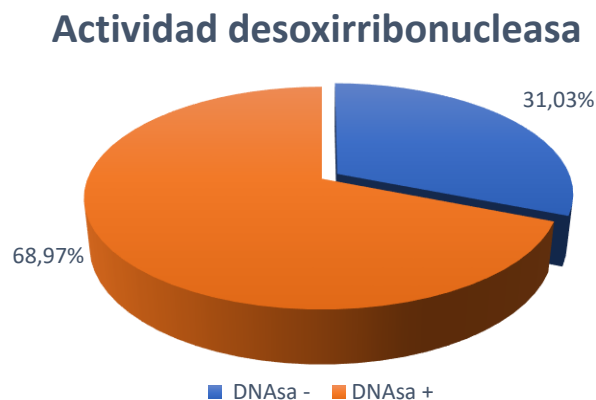


Ilustración 26. Caracterización DNasa

4.1.2 Actividad coagulasa

La prueba de la coagulasa se utiliza de manera rutinaria en los laboratorios para distinguir cepas *Staphylococcus aureus* (CoPS) de otras cepas CoNS (Subramanian *et al.*, 2017). Alrededor del 3% de las cepas totales analizadas (2/58) no presentaron actividad coagulasa. El 43,1% de las cepas mostraron actividad coagulasa débil o fuerte (se obtuvieron porcentajes similares en cada caso). Aquellas clasificadas con una actividad coagulasa media constituyeron alrededor del 10% de las cepas analizadas (6/58) (Ilustración 27). Sin embargo, no se puede afirmar solo con la presencia de la enzima coagulasa que las cepas pertenezcan a la especie *S. aureus* ya que se han reportado casos donde cepas pertenecientes a las especies *S. hyicus* o *S. epidermidis* también han mostrado esta actividad, aun perteneciendo al grupo CoNS (Puig *et al.*, 2015). Por tanto, la actividad coagulasa, a pesar de estar muy vinculada a la identificación de *S. aureus*, no puede considerarse una característica exclusiva de esta especie.

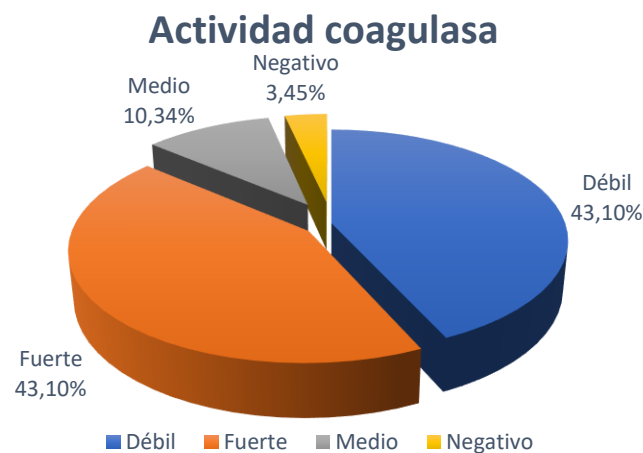


Ilustración 27. Caracterización coagulasa

4.1.3 Actividad hemolítica

El test para la detección de actividad hemolítica en placas de agar sangre constituye un método simple y rápido para identificar *S. aureus*. Sin embargo, esta prueba no es demasiado específica (Boerlin *et al.*, 2003). En el estudio de la actividad hemolítica, se obtuvo que, alrededor de un 47% (27/58) de las cepas no presentaron hemolisis, clasificándose como γ -hemolíticas. Un 29% (18/58) presentó α -hemolisis y un 23% fueron clasificadas como β -hemolíticas (13/58) (Ilustración 28).

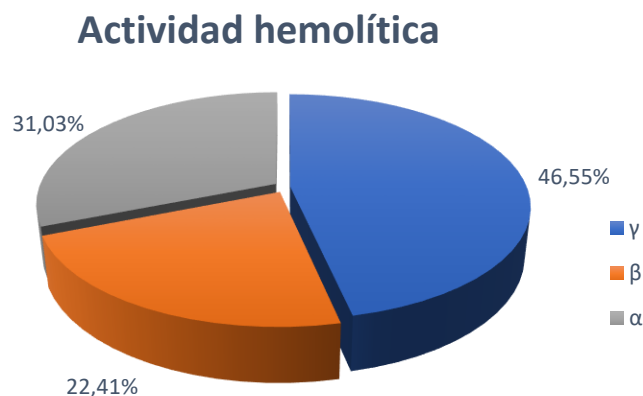


Ilustración 28. Caracterización hemolisis

4.1.4 Relaciones entre las distintas actividades bioquímicas

Con el objetivo de establecer relaciones entre las distintas actividades bioquímicas determinadas previamente (DNasa, coagulasa y hemolisis) se aplicaron pruebas de independencia estadística basadas en el cálculo de la Chi-cuadrado a un intervalo de confianza del 95% (Anexo 1).

El análisis estadístico reveló una importante relación de dependencia entre la **actividad hemolítica y la actividad coagulasa** a un intervalo de confianza del 95% (Grados de libertad = 6; Chi-cuadrado experimental = 40,686; Chi-cuadrado teórica = 12,592). En la Ilustración 29 se muestra la relación entre estas actividades. Todas las cepas que no presentaron actividad coagulasa, tampoco presentaron actividad hemolítica, clasificándose entonces como gamma-hemolíticas. Por otra parte, aquellas cepas que presentaron una actividad coagulasa débil o media, mostraron en su mayoría gamma-hemolisis, o en menor medida alfa-hemolisis. Sin embargo, todas las cepas que presentaron beta-hemolisis exhibieron actividad coagulasa fuerte, hecho que podría hacer sospechar de su carácter más virulento. Algunos autores defienden que la combinación de las pruebas coagulasa y hemolisis podría servir como criterio adecuado para la identificación de cepas de *S. aureus* (Boerlin *et al.*, 2003; Bautista, 2013).

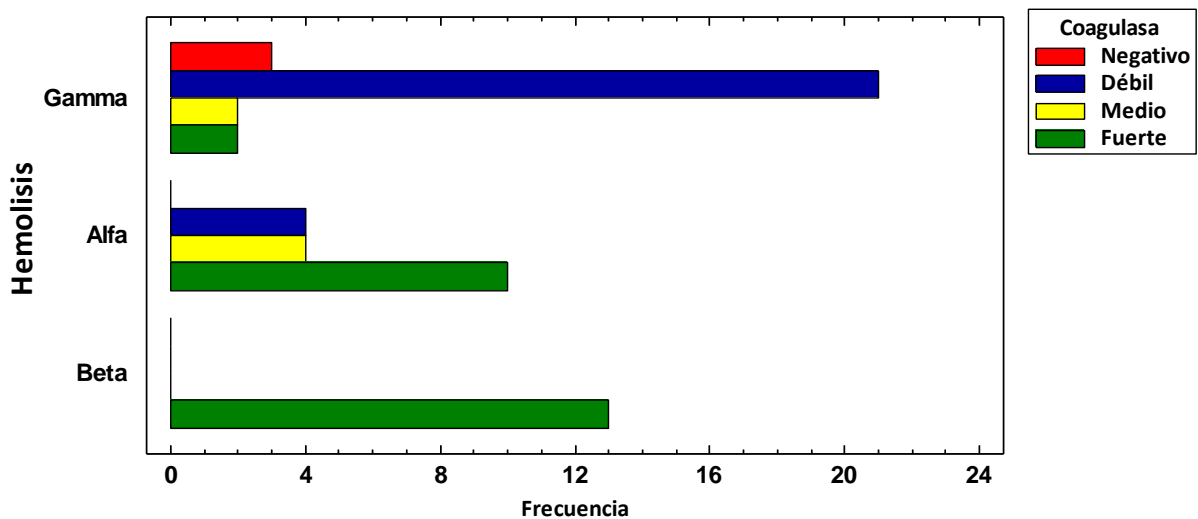


Ilustración 29. Diagrama de barras para hemolisis según coagulasa

Por otra parte, el análisis de Chi-cuadrado para las variables **actividad DNasa y coagulasa** a un nivel de confianza del 95%, reveló una fuerte dependencia estadística entre ambas variables (Grados de libertad = 3; Chi-Cuadrado experimental = 19,915; Chi-Cuadrado teórica = 7,815). El diagrama de barras mostrado en la Ilustración 30 pone de manifiesto dicha relación. Así, las cepas que no mostraron actividad coagulasa, tampoco presentaron actividad DNasa, mientras que la mayoría de las cepas que exhibieron una actividad coagulasa fuerte, también mostraron actividad DNasa. A pesar de esta estrecha relación, Boerlin *et al.* (2003) reportaron que cepas identificadas como *S. chromogenes* también presentan una actividad DNasa muy clara, por lo que la prueba de la DNasa no puede considerarse específica de la especie *S. aureus*. Sin embargo, estos mismos autores consideran que esta prueba puede resultar de utilidad para complementar la identificación de estafilococos coagulasa positivos.

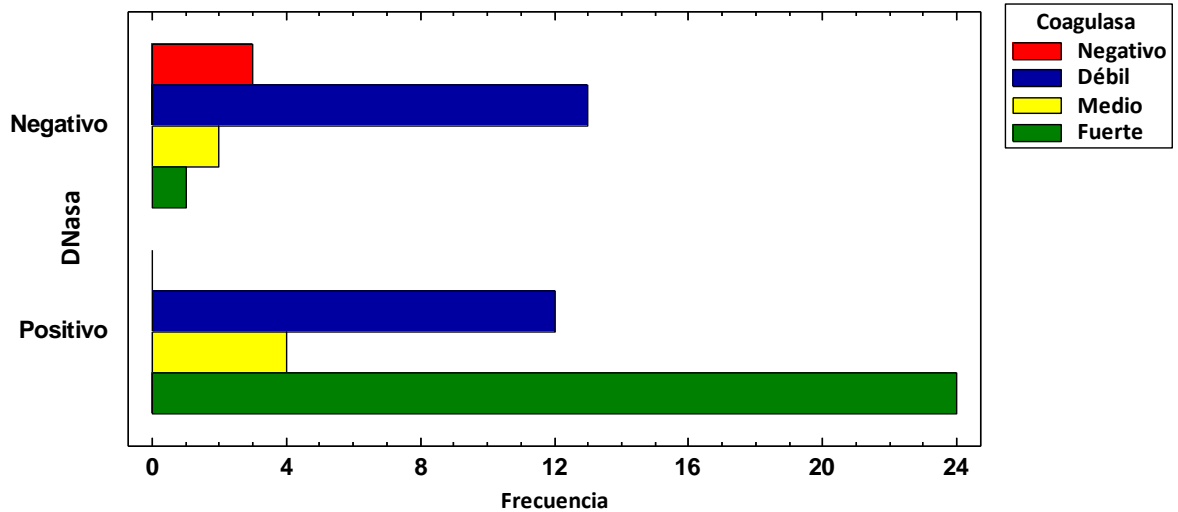


Ilustración 30. Diagrama de barras para DNasa según coagulasa

La prueba de independencia de Chi-Cuadrado entre las variables actividad **DNasa** y actividad **hemolítica**, revela que estas variables están relacionadas a un intervalo de confianza del 95% (Grados de libertad = 2; Chi-Cuadrado experimental = 19,857; Chi-Cuadrado teórica = 5,991). En el diagrama de barras mostrado en la Ilustración 31 se observa que prácticamente todas las cepas DNasa negativas tampoco mostraron actividad hemolítica, mientras que todas las cepas que mostraron algún tipo de actividad hemolítica (alfa o beta) fueron caracterizadas como DNasa positivas.

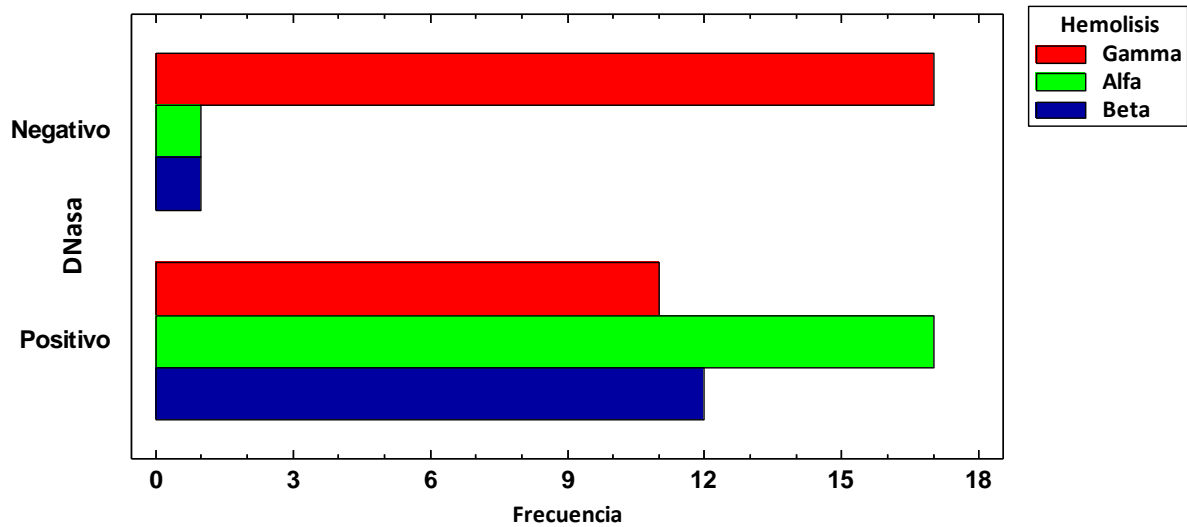


Ilustración 31. Diagrama de barras para DNasa según hemolisis

Las relaciones descritas anteriormente se pusieron de manifiesto de forma conjunta mediante el análisis de conglomerados mostrado en la Ilustración 32. Dicho análisis muestra un vínculo más

estrecho entre la actividad hemolítica y coagulasa, actividades que pueden estar muy relacionadas con la mayor virulencia mostrada por parte de cepas de *S. aureus*.

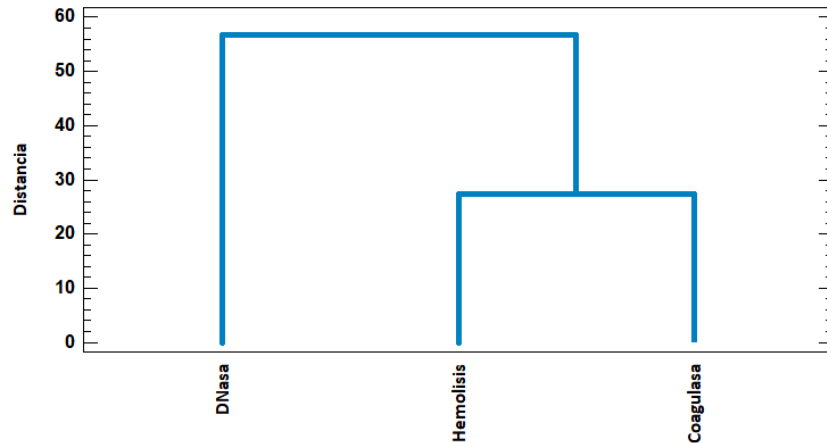


Ilustración 32. Dendrograma de actividades bioquímicas

4.2 Caracterización molecular de la colección de cepas

En los siguientes apartados se describen los resultados obtenidos a partir de la búsqueda de marcadores de virulencia en las cepas de la colección.

4.2.1 Identificación de cepas *Staphylococcus aureus* mediante detección del marcador *MH678720*

Todas las cepas de la colección se sometieron a un cribado inicial para la identificación de cepas de *S. aureus* mediante el marcador de la terminasa estafilocócica, específico de especie (*MH678720*). En la Tabla 10 se indican las 18 cepas que resultaron confirmadas como *S. aureus* mediante PCR.

Tabla 10. Listado de cepas *S. aureus*

7N1	8N2	10N1	11N1	16N1	17N1	18N1	21N1	30N1
32N2	45N1	46N1	51N1	60N2	26E2	29E2	56E2	61E2

A pesar de que, tradicionalmente, las cepas de *S. aureus* se han considerado como DNasa positivas, se detectaron en este estudio, hasta 5 cepas negativas de entre las 18 que fueron identificadas como *S. aureus*. Ante estos datos, resultó de interés el cálculo de indicadores de eficacia de la prueba DNasa en términos de Sensibilidad (%) y Especificidad (%) (apartado 3.7), siendo éstos del 68% y 40%, respectivamente. Dichos valores, fueron muy similares a los descritos en el estudio de Pumipuntu *et al.* (2017), quienes obtuvieron valores de Sensibilidad del 56,13% y de Especificidad del 41,84%. Por tanto, teniendo en cuenta la baja especificidad y sensibilidad mostrada por dicha prueba, la actividad DNasa no debe utilizarse, por sí sola, como un test de diagnóstico de *S. aureus*.

4.2.2 Identificación de marcadores de virulencia

La identificación de genes de virulencia se realizó exclusivamente a partir de las 18 cepas que habían resultado identificadas como *Staphylococcus aureus* en el apartado anterior.

4.2.2.1 Enterotoxinas

Las enterotoxinas estafilocócicas (SEs) son responsables de las principales manifestaciones clínicas de intoxicación alimentaria por cepas de estafilococos. De hecho, la enterotoxina A es considerada como un importante marcador de virulencia, pudiendo resistir altas temperaturas de cocinado, e incluso las temperaturas de esterilización estándar (121 °C durante 20 minutos) (Chang *et al.*, 2005). En la Tabla 11 se indican aquellas cepas que fueron positivas para algunos de los genes que codifican para enterotoxinas SEs. El gen que codifica para la enterotoxina A (*sea*) estuvo presente en cerca del 90% de las cepas, seguido por el que codifica para la enterotoxina C (*sec*, 11,1%) y D (*sed*, 11,1%). En ninguna de las cepas fue detectado el gen para la enterotoxina E (*see*). Las enterotoxinas más detectadas en el estudio de Fooladvand *et al.* (2019), a partir de aislados nasales en humanos, fueron SEA (17,9%), SEI (11,8%), SEG (7%), SEB (2,3%), SEC (1,6%), SED (1,6%) y SEE (0,8%). Como se observa, la enterotoxina E también fue detectada con menor frecuencia en el trabajo de Fooladvand *et al.* (2019). Mehrotra *et al.* (2000) obtuvieron datos de prevalencia para el gen *sea* del 19,6%, valor muy por debajo del obtenido en el presente estudio. En este caso, tampoco fue detectado el gen para la enterotoxina E. Por otra parte, en la investigación realizada por Algammal *et al.* (2020), las enterotoxinas A y C fueron las más prevalentes, aunque en este caso, las muestras estafilocócicas provenían de muestras infectadas de origen bovino. Los valores distintos de prevalencia respecto a los genes de enterotoxinas de *S. aureus* obtenidos a partir de diferentes estudios, son en parte, debidos a la distinta procedencia y origen geográfico de las muestras. De hecho, se ha documentado que las cepas que contienen el gen *sea* y *sed* son las que causan los mayores problemas de intoxicación alimentaria estafilocócica en Francia (Hennekinne y Le Loir, 2014).

Tabla 11. Resultados PCR

Identificador	<i>sea</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	<i>femA</i>	<i>mecA</i>	<i>etb</i>	<i>tsst1</i>
7N1	+				+	+		
8N2						+		
10N1	+				+			
11N1	+	+			+			
16N1	+				+			
17N1	+				+	+		
18N1	+				+			
21N1	+				+			
30N1					+			
32N2	+				+	+		
45N1			+			+		
46N1	+		+		+	+		+
51N1	+				+			+
60N2	+	+			+			+
26E1	+				+	+		
39E1	+							
56E1	+					+		
61E2	+				+			

4.2.2.2 Resistencia a meticilina

El primer caso de resistencia a meticilina se describió en 1960 en Guildford (Inglaterra) por Barber. Desde entonces, se han reportado infinidad de casos de esta índole. Las cepas MRSA son consideradas como tal por producir una proteína de unión a la penicilina (PBP) específica, denominada PBP2a, la cual reduce la afinidad de la unión de los antibióticos β -lactámicos al peptidoglicano de la pared celular bacteriana. PBP2a está codificada por el gen *mecA*. Por otra parte, existen genes constitutivos en cepas *wild-type* de *S. aureus* cuya actividad es crítica para la expresión de la resistencia a la meticilina. Estos genes, denominados *fem* (factor esencial para la resistencia a meticilina) y *aux* (auxiliar) codifican proteínas implicadas directa o indirectamente en la síntesis del peptidoglicano o en su regulación (Berger-Bächi y Rohrer, 2002). El gen *femA* cromosómico codifica una proteína implicada en la adición de la cuarta y quinta glicina al péptido principal del peptidoglicano. Su inactivación elimina la resistencia a la meticilina (Strandén *et al.*, 1997). *femA* puede estar presente en cepas resistentes o susceptibles a la meticilina (Chambers, 1997). En este trabajo, el 83,3% de las cepas analizadas fueron positivas para el gen *femA* (Tabla 11), mientras que el 44,4% lo fueron para el gen *mecA*. Seis de las 18 cepas analizadas fueron positivas para ambos genes (33,3%).

En el año 2000, Mehrotra *et al.* no encontraron resistencia a la meticilina en ninguna de las 154 cepas analizadas de origen nasal humano. Sin embargo, en apenas dos décadas, la prevalencia de cepas MRSA ha aumentado significativamente. El alto número de cepas *S. aureus* que ha mostrado ser MRSA confirma que la resistencia a antibióticos supone un grave problema que va a seguir agravándose si no se hace un uso adecuado de los mismos. Por tanto, es necesaria la adopción de terapias alternativas para el control de la enfermedad estafilocócica.

4.2.2.3 Síndrome de la piel escaldada

En este trabajo no se detectaron cepas positivas para el gen *etb* que codifica para la toxina exfoliativa ETB, causante del síndrome de la piel escaldada. Mehrotra *et al.* (2000) tampoco detectaron ningún gen entre sus muestras de origen nasal que codificasen las toxinas exfoliativas, al igual que en el estudio realizado por Guaca-González *et al.* en 2018, donde el origen de las muestras fue de aislamientos de fosas nasales y yemas de los dedos de individuos sanos. Por tanto, la baja prevalencia de dicho gen en muestras biológicas lo convierte en un gen de carácter altamente subespecífico.

4.2.2.4 Síndrome del Shock Tóxico

En un 16,7% de las cepas (3/18) identificadas como *S. aureus* se detectó la presencia del gen *tsst-1*, el cual codifica para la toxina causante del Síndrome del Shock Tóxico (TSST-1) (Tabla 11, Ilustración 33). Las tres cepas positivas para este gen (46N1, 56N1 y 60N2) fueron de procedencia nasal. Guaca-González *et al.* (2018) reportaron que la prevalencia de este gen en individuos sanos era del 23,2%, valor no muy diferente al obtenido en el presente estudio. Mehrotra *et al.* (2000) obtuvieron resultados similares para el gen *tsst-1* en un estudio en el que aplicaron multiplex-PCR (24,3%).

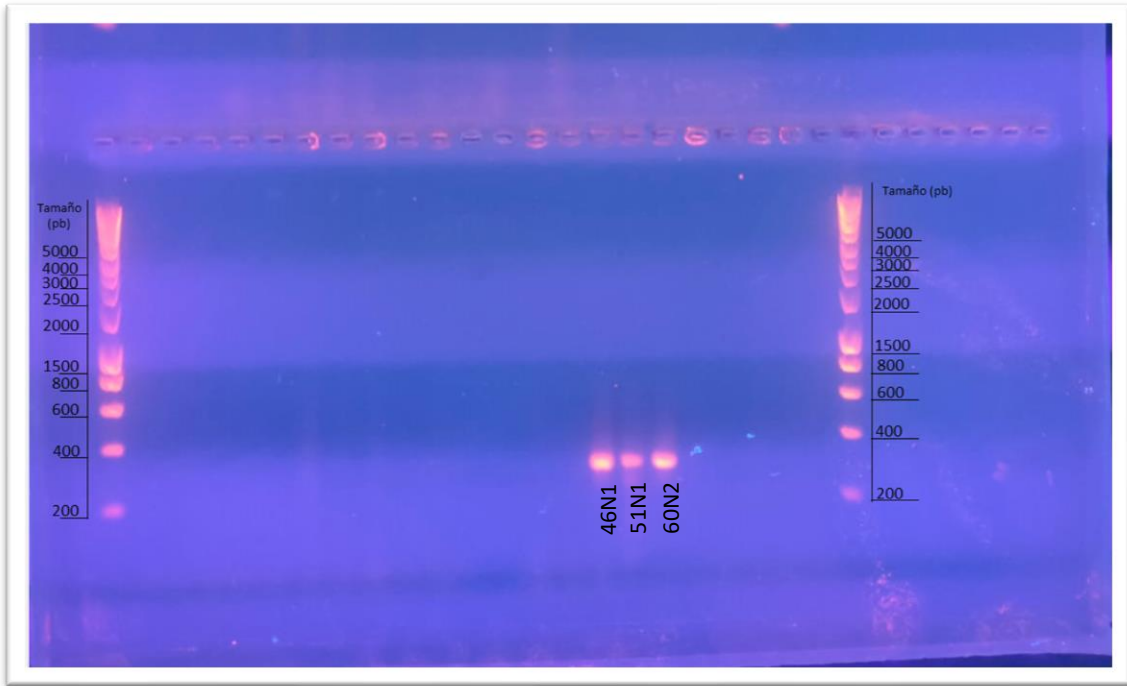


Ilustración 33. Gel de agarosa con los productos amplificados por PCR del gen *tsst-1*.

4.2.2.5 Correlación entre los genes que codifican superantígenos y los genes de resistencia a antibióticos

Se realizó, finalmente, un estudio de correlación de Spearman, donde se analizó la relación entre las distintas variables moleculares dos a dos. El rango de estos coeficientes de correlación va de -1 a +1, y mide la fuerza de la relación lineal entre las variables (Ilustración 34). Solo en el caso de los genes *sed* y *tsst-1* se encontró una correlación estadísticamente significativa, asumiendo un intervalo de confianza del 95% ($p= 0,0201$). Aunque no de forma significativa, se intuyó algún tipo de correlación entre la presencia del gen *femA* con los de las enterotoxinas *sec* y *sed*. También se detectó una ligera interacción (aunque no significativa) entre el gen *tsst-1* y el gen *sec*. Hay que destacar que todas las cepas que se mostraron positivas para el gen *sed* (enterotoxina D), presentaron actividad coagulasa, DNasa y hemólisis. Aunque no se han reportado estudios donde se indique una expresa correlación entre la enterotoxina D y la toxina TSST-1, los resultados obtenidos por Guaca-González *et al.* (2018) describen una importante asociación entre los genes *sea* y *tsst-1*.

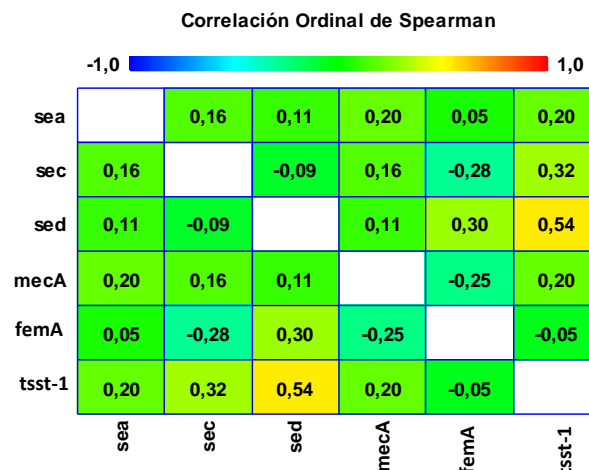


Ilustración 34. Correlación de Spearman entre los distintos genes

4.3 Fagotipado preliminar

Debido a la situación excepcional causada por el Covid-19, el análisis de fagotipado se redujo a un ensayo preliminar entre el estafilofago K y aquellas cepas consideradas de mayor virulencia (Tabla 12). Entre las cepas de mayor interés se seleccionaron las siguientes:

Tabla 12. Cepas seleccionadas por su carácter virulento

Marcador de virulencia	Hemolisis	Coagulasa	DNasa	<i>sea</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>femA</i>	<i>mecA</i>	<i>tsst-1</i>
46N1	Alfa	Fuerte	+	+		+	+	+	+
32N2	Alfa	Fuerte	+	+			+	+	
51N1	Beta	Fuerte	+	+	+		+		+
60N2	Alfa	Fuerte	+	+	+		+		+
26E1	Gamma	Débil	-	+			+	+	

La cepa 26E1, considerada como MRSA por poseer los genes *mecA* y *femA*, y la cepa 60N2, la cual contiene el gen *femA* mostraron ser susceptibles a la actividad lítica del estafilofago K. Como se observa en la Ilustración 35, el estafilofago fago K fue capaz de generar calvas de lisis cuando fue aplicado sobre cultivos frescos de las cepas seleccionadas en placas de TSA, mediante la técnica de la gota de Adam. Dado que las cepas escogidas muestran un alto grado de virulencia y además, se presentan como cepas potencialmente resistentes a la meticilina, los resultados abren la posibilidad al uso de fagoterapia para el control de enfermedades causadas por estafilococos resistentes a antibióticos.

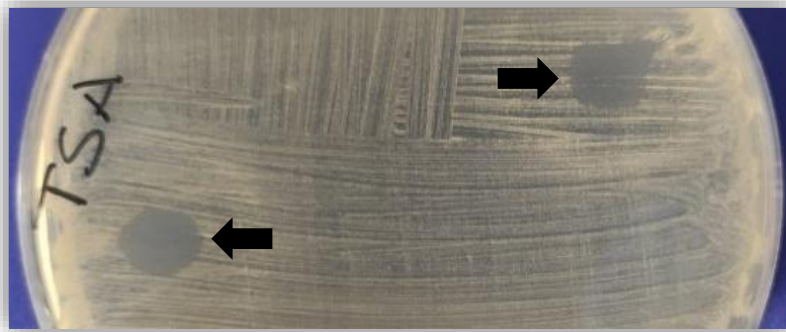


Ilustración 35. Calvas de lisis producidas por estafilofago K en medio TSA

5. Conclusiones

A continuación, se describen las principales conclusiones de este trabajo:

- i. La combinación de los test de DNasa, coagulasa y hemólisis constituyen en su conjunto la forma más adecuada de identificar cepas de *S. aureus* mediante un abordaje fenotípico. Sin embargo, la utilización exclusiva de la prueba DNasa no resulta fiable para la identificación de cepas *S. aureus*, ya que da a lugar a falsos positivos.
- ii. Una elevada proporción de las cepas identificadas molecularmente como *S. aureus*, fueron positivas para enterotoxina A (*sea*), así como para los genes de resistencia a la meticilina (*femA* y *mecA*), lo que confirma la presencia de cepas virulentas y potencialmente resistentes a dicho antibiótico en la colección de estudio.
- iii. A pesar del carácter preliminar del estudio de fagotipia realizado frente al estafilofago K, los resultados obtenidos abren nuevas vías de investigación con respecto a la posibilidad de utilizar este tipo de terapias para el control de cepas patógenas de *S. aureus* meticilin-resistentes.

6. Bibliografía

- Adamski, G., Garin, E., Ballinger, W. y Shulman, S. (1980). Generalized non-suppurative myositis with staphylococcal septicemia. *The Journal of Pediatric*, 96(4), 694-697.
- Algammal, A., Enany, M., El-Tarabili, R., Ghobashy, M. y Helmy, Y. (2020). Prevalence, antimicrobial resistance profiles, virulence and enterotoxins-determinant genes of MRSA isolated from subclinical bovine mastitis in egypt. *Pathogens*, 9(5), 1-11.
- Algorta, G. (2008). El género *Staphylococcus*. En Algorta, G., Temas de bacteriología y virología médica (págs. 257-271). Montevideo: Fefmur.
- Anguera, I., Del Río, A., Miró, J., Matínez-Lacasa, X., Marco, F., Guma, J., y Quaglio, G. (2005). *Staphylococcus lugdunensis* infective endocarditis: description of 10 cases and analysis of native valve, and pacemaker lead endocarditis clinical profiles. *Heart*, 91(2), 1-10.
- Argemi, X., Prévost, G., Riegel, P., Provot, C., Badel-Berchoux, S., Jehl, F., Olivares, E. y Hansmann, Y. (2017). Kinetics of biofilm formation by *Staphylococcus lugdunensis* strains in bone and joint infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 88(4), 298–304.
- Aryee, A. y Edgeworth, J. (2017). Carriage, clinical microbiology and transmission of *Staphylococcus aureus*. En Bagnoli, F., Rappuoli, R. y Grandi, G. *Staphylococcus aureus. Microbiology, pathology, immunology, therapy and prophylaxis*. (Vol. 409, págs. 1-20). Springer.
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M., Nisar, M., Alvi, R., Aslam, M., Qamar, M., Salamat, M. y Baloch, Z (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, 11, 1645–1658.
- Athliamai Bitrus, A., Mayowa Peter, O., Adamu Abbas, M., y Dauda Goni, M. (2018). *Staphylococcus aureus*: a review of antimicrobial resistance mechanisms. *Veterinary Sciences: Research and Reviews*, 4(2), 43-54.
- Baelo, A., Levato, R., Julián, E., Crespo, A., Astola, J., Gavaldá, J., Engel, E., Mateos-Timoneda, M. y Torrents, E. (2015). Disassembling bacterial extracellular matrix with DNase-coated nanoparticles to enhance antibiotic delivery in biofilm infections. *Journal of Controlled Release*, 209, 150-158.
- Balabana, N. y Rasooly, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 61(1), 1-10.
- Barber, M. (1961). Methicillin-resistant staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 14(4), 385-393.
- Bautista, G., Solorio, J., Rentería, I., Carranza, S., Bustos, J., Arteaga, R., Baizabal, V., Cajero, M., Bravo, A. y Valdez, J. (2013). Performance of culture media for the isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Journal of Medical Microbiology*, 62(3), 369–376.
- Becker, K. (2018). Pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. En Fetsch, A., *Staphylococcus aureus* (págs. 13-38). Elsevier.
- Becker, K., Heilmann, C. y Peters, G. (2014). Coagulase-Negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 870–926.

- Becker, K., Skov, R. L. y Eiff, C. v. (2015). *Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci*. En Jorgensen, J., Pfaller, M., Carroll, K., American Society for Microbiology, y Warnock, D. (Ed.), *Manual of Clinical Microbiology* (Onceava ed., págs. 354-382). Washington DC: ASM Press.
- Berger-Bächli, B., y Rohrer, S. (2002). Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Archives of microbiology*, 178(3), 165-171.
- Böcher, S., Tønning, B., Skov, R. L. y Prag, J. (2009). *Staphylococcus lugdunensis*, a common cause of skin and soft tissue infections in the community. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(4), 946–950.
- Boerlin, P., Kuhnert, P., Hüssy, D. y Schaellibaum, M. (2003). Methods for identification of *Staphylococcus aureus* isolates in cases of bovine mastitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(2), 767-771.
- Bouchart, F., Vidal, O., Lacroix, J., Spriet, C., Chamary, S., Brutel, A. y Hornez, J. (2020). 3D printed bioceramic for phage therapy against bone nosocomial infections. *Materials Science y Engineering C*, 111, 928-4931.
- Calvo, J. y Martínez-Martínez, L. (2008). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44-52.
- Castañón-Sánchez, C. (2012). Patogenia molecular de *Staphylococcus aureus*. *Evidencia médica e investigación en salud*, 5(3), 79-84.
- Cercenado, E. (2016). Epidemiología de la infección por grampositivos resistentes. *Revista Española Quimioterapia*, 29(1), 6-9.
- Cervantes, E., García, R. y Salazar, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana: Patología Clínica y Medicina de laboratorio*, 61(1), 28-40.
- Chambers, H. (1997). Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implication. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(4), 781-791.
- Chang, B., Bohach, G., Lee, S., Davis, W., Fox, L., Ferens, W., Seo, K., Koo, H. y Kwon, N. (2003). Immunosuppression by T regulatory cells in cows infected with staphylococcal superantigen. *Journal of Veterinary Science*, 6(3), 247–250.
- Dagnew, M., Tiruneh, M., Moges, F. y Tekeste, Z. (2012). Survey of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and intestinal parasites among food handlers working at Gondar University, Northwest Ethiopia. *BMC Public Health*, 12(837), 1-7.
- de Cueto, M. y Pascual, Á. (2009). Microbiología y patogenia de las infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. En Pahissa, A., *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus*. (págs. 15-31). Barcelona: Marge Books.
- Fontana, C. y Favaro, M. (2014). Coagulase-positive and Coagulase-Negative in human disease. En Savini, V. *Pet-to-man travelling staphylococci: a world in progress* (págs. 25-42). Academic Press.
- Fooladvand, S., Sarmadian, H., Habibi, D., van Belkum, A. y Ghaznavi-Rad, E. (2019). High prevalence of methicillin resistant and enterotoxin gene-positive *Staphylococcus aureus* among nasally colonized food handlers in central Iran. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 38(1), 87–92.

- Giedrys-Kalemba, S., Czernomysy-Furowicz, D., Fijałkowski, K. y Jursa-Kulesza, J. (2018). Autovaccines in individual therapy of staphylococcal infections. En Savini, V. *Pet to man travelling staphylococci: a world in progress* (págs. 253-264). Elsevier.
- Gillaspy, A. y Iandolo, J. (2014). *Staphylococcus* | Introduction. En Batt, C., y Tortorello, M., *Encyclopedia of Food Microbiology* (Vol. 3, págs. 482-486). Elsevier.
- Grace, D. y Fetsch, A. (2018). *Staphylococcus aureus*—a foodborne pathogen. Epidemiology, detection, characterization, prevention, and control: an overview. En Fetsch, A., *Staphylococcus aureus* (págs. 3-10). Academic Press, Elsevier Inc. doi:ISBN 9780128096710
- Grumann, D., Nübel, U. y Bröker, B. (2014). *Staphylococcus aureus* toxins – Their functions and genetics. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 583–592.
- Guaca-González, Y., Florez-Restrepo, G., Moncayo-Ortiz, J., Santacruz-Ibarra, J. y Alvarez-Aldana, A. (2018). Detección y expresión de superantígenos y de resistencia antimicrobiana en aislamientos obtenidos de mujeres portadoras de *Staphylococcus aureus* que cuidan y alimentan niños. *Biomédica*, 38(1), 96-104.
- Heilmann, C., Ziebuhr, W. y Becker, K. (2019). Are coagulase-negative staphylococci virulent? *Clinical Microbiology Infections*, 25(9), 1071–1080.
- Hennekinne, J. y Le Loir, Y. (2014). Detection by cultural and modern techniques. En Batt, C. y Tortorello, M., *Encyclopedia of Food Microbiology* (Segunda ed., Vol. 3, págs. 487-493). Elsevier Ltd.
- Jimeno, J., Sancho, J., Grande, L. y Sitges-Serra, A. (2008). ¿Fascitis o miositis? *Cirugía española*, 84(6), 347.
- Karakonstantis, S. (2020). Is coverage of *S. aureus* necessary in cellulitis/erysipelas? *A literature review. Infection*, 48, 183-191.
- Khambaty, F., Bennett, R. y Shah, D. (1994). Application of pulse field gel electrophoresis to the epidemiological characterisation of *Staphylococcus intermedius* implicated in food-related outbreak. *Epidemiology and Infection*, 113(1), 75-81.
- Köck, R., Werner, P., Friedrich, A., Fegeler, C. y Becker, K. (2015). Persistence of nasal colonization with human pathogenic bacteria and associated antimicrobial resistance in the German general population. *New microbes and new infections*, 9, 24-34.
- Kosecka-Strojek, M., Buda, A. y Międzobrodzki, J. (2018). Staphylococcal ecology and epidemiology. En Savini, V. *Pet-to-man Travelling. Staphylococci: a world in progress* (págs. 11-24). Academic Press.
- Krute, C. y Bose, J. (2016). Understanding staphylococcal nomenclature. En Bose, J. *The genetic manipulation of staphylococci: methods and protocols*. (Primera ed., págs. 3-8). New York: Springer New York.
- Kwiatk, M., Parasion, S. y Nakonieczna, A. (2019). Therapeutic bacteriophages as a rescue treatment for drug-resistant infections – an in vivo studies overview. *Journal of Applied Microbiology*, 128(4), 985-1002.
- Le Loir, Y., y Hennekinne, J. (2014). Detection of staphylococcal enterotoxins. En Batt, C. y Tortorello, M., *Encyclopedia of Food Microbiology* (Segunda ed., Vol. 3, págs. 494-500). Elsevier.

- Lee, J. y Bohach, G. (2004). Pathogenesis of disease. En Dlawer, A. y Hiramatsu, K. *Staphylococcus aureus. Molecular and clinical aspects* (págs. 177-236). Chichester: Horwood Publishing.
- Lehman, S., Mearns, G., Rankin, D., Cole, R., Smrekar, F., Branston, S. y Morales, S. (2019). Design and preclinical development of a phage product for the treatment of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Viruses*, 11(88).
- Li, X., Xiong, Y., Fan, x., Feng, P., Tang, H. y Xhou, T. (2012). The role of *femA* regulating gene on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Médecine et maladies infectieuses*, 45(5), 218-225.
- Marqus, S., Lee, L., Istivan, T., Kyung Chang, R., Dekiwadia, C., Chan, H.-K. y Yeo, L. (2020). High frequency acoustic nebulization for pulmonary delivery of antibiotic alternatives against *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 151, 181-188.
- Mehrotra, M., Wang, G. y Johnoson, W. (2000). Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1032-1035.
- Murray, P., Rosenthal, K. y Pfaller, M. (2017). *Staphylococcus* y cocos grampositivos relacionados. En Murray, P., Rosenthal, K. y Pfaller, M., *Microbiología Médica* (Octava ed., págs. 170-182). Elsevier.
- OMS. (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases.
- Omwengaa, I., Abogeb, G. O., Mitema, E. S., Obiero, G., Ngaywaa, C., Ngwilia, N., Wamwere, G., Wainaina, M. y Bett, B. (2019). *Staphylococcus aureus* enterotoxin genes detected in milk from various livestock species in northern pastoral region of Kenya. *Food Control* (103), 126-132.
- Padmajakshi, G., Saini, S., Deorukhkar, S. y Ramana, K. (2014). Coagulase Activity of *Candida* spp isolated from HIV seropositive patients using different animal plasma. *American Journal of Microbiological Research*, 2, 57-59. doi:10.12691/ajidm-3-4-1
- Palavencio, E. (2020). Clinical, epidemiologic, and laboratory aspects of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. En Yinduo, J., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) protocols. Cutting-edge technologies and advancements. Methods in molecular Biology*. (Tercera ed., Vol. 2069, pçags. 1-28). Springer.
- Partridge, S., Kwong, S., Firth, N. y Jensen, S. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4).
- Pigrau, C. (2009). Infecciones de la piel y las partes blandas. En Phaisa, A., *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus* (págs. 81-106). Barcelona: Marge Books.
- Pontieri, E. (2018). The staphylococcal hemolysins. En Savini, V *Pet-to-Man Travelling. Staphylococci: a world in progress*. 103-116. Elsevier.
- Puig, Y., Espino, M., V, L., Apórtela, N., Pérez, Y. y Soto, P. (2015). Resistencia antimicrobiana en cepas de estafilococos coagulasa positiva aisladas en alimentos y manipuladores. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 25(2), 245-260.

- Pujol, M. (2009). Epidemiología clínica y factores de riesgo de la infección producida por *Staphylococcus aureus*. En Phaisa, A., *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus*. 69-80. Marge Books.
- Pumipuntu, N., Kulpeanprasis, S., Santajit, S., Tunyong, W., Hinthong, T. y Indrawattana, N. (2017). Screening method for *Staphylococcus aureus* identification in subclinical bovine mastitis from dairy farms. *Veterinary World*, 721-726.
- Reina, J., y Reina, N. (2018). Fagoterapia ¿una alternativa a la antibioticoterapia? *Revista Española de Quimioterapia*, 31(2), 101-104.
- Rocchetti, T., Martins, K., Martins, P., Oliveira, R., Mondelli, A., Fortaleza, C. y Cunha, M. (2018). Detection of the *mecA* gene and identification of *Staphylococcus* directly from blood culture bottles by multiplex polymerase chain reaction. *The Brazilian Journal of Infection Disease*, 22 (02) 99-105.
- Rodríguez, C. A., y Vesga, O. (2005). *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina. *Biomédica*, 575-587.
- Schelifer, K. y Kloos, W. (1975). Isolation and characterization of staphylococci. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 25(1), 50-61.
- Strandén, A. M., Ehlert, K., Labischinski, H., y Berger-Bächi, B. (1997). Cell wall monoglycine cross-bridges and methicillin hypersusceptibility in a *femAB* null mutant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 1(179), 9-16.
- Subathra-Devi, C., Mohanasrinivasa, V., Subramaniam, V., Parashar, M., Vaishnav, B. y Jemimah, S. (2016). Molecular characterization and potential assessment of extracellular DNase producing *Staphylococcus aureus* VITSV4 isolated from bovine milk. *Iranian Journal of Science Technology Transaction*, 40(3), 191-199.
- Subramanian, A., Chitalia, V., Bangera, K., Vaidya, S., Warke, R., Chowdhary, A. y Deshmukh, R. (2017). Evaluation of hiaureus coagulase confirmation kit in identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Diagnostic Reseach*, 11(2), 8-13.
- van Belkum, A., Verkaik, N., de Vogel, C., Boelens, H., Verveer, Nouwen, J., Verbrugh, H. y Wertheim, H. (2009). Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(12), 1820-6.
- Vandenesch, F., Lina, G. y Henry, T. (2012). *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2(12), 1-15.
- von Eiff, C., Becker, K., Machka, K., Stammer, H. y Peters, G. (2001). Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *The New England Journal of Medicine*, 344, 11-6.
- Weidenmaier, C., y Lee, J. C. (2017). Structure and function of surface polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. En Bagnoli, F., Rappuoli, R. y Grandi, G., *Staphylococcus aureus. Microbiology, pathology, immunology, therapy and prophylaxis*. (págs. 57-77).
- Zhou, K., Li, C., Chen, D., Pan, Y., Taowei, Y., Zhenli, L., Wang, X., y Xie, S. (2018). A review on nanosystems as an effective approach against infections of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 7333-7347.

ANEXO 1. Tabla de distribución de la Chi-cuadrado

<i>df</i>	$\chi^2_{.995}$	$\chi^2_{.990}$	$\chi^2_{.975}$	$\chi^2_{.950}$	$\chi^2_{.900}$	$\chi^2_{.100}$	$\chi^2_{.050}$	$\chi^2_{.025}$	$\chi^2_{.010}$	$\chi^2_{.005}$
1	0.000	0.000	0.001	0.004	0.016	2.706	3.841	5.024	6.635	7.879
2	0.010	0.020	0.051	0.103	0.211	4.605	5.991	7.378	9.210	10.597
3	0.072	0.115	0.216	0.352	0.584	6.251	7.815	9.348	11.345	12.838
4	0.207	0.297	0.484	0.711	1.064	7.779	9.488	11.143	13.277	14.860
5	0.412	0.554	0.831	1.145	1.610	9.236	11.070	12.833	15.086	16.750
6	0.676	0.872	1.237	1.635	2.204	10.645	12.592	14.449	16.812	18.548
7	0.989	1.239	1.690	2.167	2.833	12.017	14.067	16.013	18.475	20.278
8	1.344	1.646	2.180	2.733	3.490	13.362	15.507	17.535	20.090	21.955
9	1.735	2.088	2.700	3.325	4.168	14.684	16.919	19.023	21.666	23.589
10	2.156	2.558	3.247	3.940	4.865	15.987	18.307	20.483	23.209	25.188
11	2.603	3.053	3.816	4.575	5.578	17.275	19.675	21.920	24.725	26.757
12	3.074	3.571	4.404	5.226	6.304	18.549	21.026	23.337	26.217	28.300
13	3.565	4.107	5.009	5.892	7.042	19.812	22.362	24.736	27.688	29.819
14	4.075	4.660	5.629	6.571	7.790	21.064	23.685	26.119	29.141	31.319
15	4.601	5.229	6.262	7.261	8.547	22.307	24.996	27.488	30.578	32.801
16	5.142	5.812	6.908	7.962	9.312	23.542	26.296	28.845	32.000	34.267
17	5.697	6.408	7.564	8.672	10.085	24.769	27.587	30.191	33.409	35.718
18	6.265	7.015	8.231	9.390	10.865	25.989	28.869	31.526	34.805	37.156
19	6.844	7.633	8.907	10.117	11.651	27.204	30.144	32.852	36.191	38.582
20	7.434	8.260	9.591	10.851	12.443	28.412	31.410	34.170	37.566	39.997
21	8.034	8.897	10.283	11.591	13.240	29.615	32.671	35.479	38.932	41.401
22	8.643	9.542	10.982	12.338	14.041	30.813	33.924	36.781	40.289	42.796
23	9.260	10.196	11.689	13.091	14.848	32.007	35.172	38.076	41.638	44.181
24	9.886	10.856	12.401	13.848	15.659	33.196	36.415	39.364	42.980	45.559
25	10.520	11.524	13.120	14.611	16.473	34.382	37.652	40.646	44.314	46.928
26	11.160	12.198	13.844	15.379	17.292	35.563	38.885	41.923	45.642	48.290
27	11.808	12.879	14.573	16.151	18.114	36.741	40.113	43.195	46.963	49.645
28	12.461	13.565	15.308	16.928	18.939	37.916	41.337	44.461	48.278	50.993
29	13.121	14.256	16.047	17.708	19.768	39.087	42.557	45.722	49.588	52.336
30	13.787	14.953	16.791	18.493	20.599	40.256	43.773	46.979	50.892	53.672
40	20.707	22.164	24.433	26.509	29.051	51.805	55.758	59.342	63.691	66.766
50	27.991	29.707	32.357	34.764	37.689	63.167	67.505	71.420	76.154	79.490
60	35.534	37.485	40.482	43.188	46.459	74.397	79.082	83.298	88.379	91.952
70	43.275	45.442	48.758	51.739	55.329	85.527	90.531	95.023	100.425	104.215
80	51.172	53.540	57.153	60.391	64.278	96.578	101.879	106.629	112.329	116.321
90	59.196	61.754	65.647	69.126	73.291	107.565	113.145	118.136	124.116	128.299
100	67.328	70.065	74.222	77.929	82.358	118.498	124.342	129.561	135.807	140.169