

# UNIVERSIDAD DE ALMERÍA



TRABAJO FIN DE GRADO  
BIOTECNOLOGÍA 2015-2019

**Búsqueda de portadores de *Staphylococcus coagulasa* positivos en fosas nasales y piel de una población de estudiantes de la Universidad de Almería y su relación con factores endógenos.**

**Autora:**

Irene Molina Panadero

**Director:**

José Joaquín Moreno Casco

**Codirectora:**

Francisca Suárez Estrella

**Área de Microbiología. Departamento de Biología y Geología**



Facultad Ciencias Experimentales

Almería Julio de 2019

## AGRADECIMIENTOS

Quería dar las gracias en primer lugar, a mi director Joaquín Moreno Casco por ser un pilar fundamental en la elaboración de este trabajo ya que, gracias a él, comencé a realizar este proyecto en el área de microbiología. Todavía recuerdo el primer día que fui al laboratorio ‘hecha un flan’ para pedirle a Joaquín si podía llevar a cabo el proyecto bajo su tutela. Yo había estado un año fuera, y la idea de realizar mi TFG en Microbiología era algo inalcanzable, pero Joaquín no dudo ni un momento en recibirme con los brazos abiertos. Muchas gracias por acogerme y brindarme esta oportunidad tan grande.

Por supuesto quiero darle las gracias a mi codirectora Paqui Suarez Estrella, por estar siempre conmigo, ayudándome en todo lo que necesitaba, aunque esto fuera la mayor tontería que uno se pudiera imaginar. Han sido muchas horas de trabajo en el laboratorio y de momentos de agobio, pero gracias a ella he podido seguir adelante y no solo en el ámbito del laboratorio, sino con el último tramo de la carrera. Muchas gracias, de corazón. Espero que ambos estéis orgullosos de lo que he conseguido, y de lo que me quede por conseguir gracias a lo que me habéis enseñado.

En segundo lugar, le quería dar las gracias a Juan Antonio López González y Macarena Jurado Rodríguez. Han sido muchos buenos momentos los que he podido vivir con ellos, y pasar de tener un mal día a tener un buen día. Tampoco sé cómo hubiera podido terminar el TFG a tiempo sin esos días de quedarme hasta tarde en el laboratorio con Juan o Macarena, esperándome a que terminara lo que tenía que hacer, o ayudándome para poder ir más rápido. Aunque en el laboratorio, todas las personas que lo componen, como María José López, Ana Siles, Ana Toribio o María Rosa, me han ayudado en todo lo que han podido y más, quiero destacar en concreto la labor de María José Estrella, por empezar siendo la persona que me regañaba por todo lo que se me olvidaba hacer. Ella ha terminado siendo un apoyo para mí, la persona a la que le podía pedir consejos cuando estaba perdida sobre temas personales, o simplemente echar unas risas cuando la habíamos liado. Por todo esto y más, dar las gracias al área de microbiología que se ha convertido, como decimos en el laboratorio, en mi “microfamilia”.

Esto no hubiera sido posible sin mi familia, mis padres y mi hermano. Gracias por estar conmigo desde el primer día apoyándome cuando más lo necesitaba; desde esos momentos de agobio en los que no sabía si iba a poder entrar en la carrera que quería, hasta los últimos días de la carrera, cuando no sabía si iba a poder ser capaz de terminarla. Gracias a todas esas llamadas, que al principio pensaba, “madre mía, todos los días hablando una o dos veces por teléfono”, y ahora es una de mis vías de escape para desahogarme y contarles todo lo que hago día a día, y si no lo hago, siento que me falta algo. Han sido 4 años fuera de casa. Fue algo nuevo y temeroso para mí el irme a una ciudad tan lejos y separada de mi familia; era la hora de empezar a ser independiente; y no hubiera sido capaz sin el apoyo y la fuerza de voluntad que mis padres me proporcionaron. Son las personas que más me conocen, solo con verme saben si me pasa algo, y hacen lo que esté en su mano para poder ayudarme. Estos últimos meses han sido bastante duros para mí y, no sé cómo hubiera salido adelante si no llega a ser por ellos. Gracias por eso y por enseñarme todo lo que soy. Me gustaría darle las gracias a todas las personas de mi pueblo que me han apoyado durante esta trayectoria, y en concreto a la persona que ha estado conmigo durante estos 4 años; aguantándome en época de exámenes, y siendo mi

punto de apoyo en todo momento, Sobre todo quiero darte las gracias por el año que pasamos en Granada, y por no faltarme nunca cuando más te he necesitado.

Por último, quería dar las gracias a las personas que empezaron siendo compañeros de clase y han terminado siendo como hermanos. No sé qué hubiera sido de mi si el primer día, en esa clase de física, Juanma no me hubiera dicho si me quería poner con él para hacer las practicas. Desde ese momento no ha habido practica o trabajo que no realizáramos juntos, y desde entonces somos como uña y carne. Ha sido mi mayor descubrimiento y la persona que, a pesar de haber estado un año fuera, sabía que cuando volviera me iba a recibir con los brazos abiertos, y deseando estar otra vez juntos en clase. También quiero agradecer a Rosario todo lo que hemos pasado juntas, y aunque la he llegado a conocer realmente este último año, ha sido como si la conociera de toda la vida. No cambiaría por nada todos los momentos vividos durante este año, que no son pocos. Además, debo mencionar a Rebeca, mi murciana favorita. La eché de menos desde el primer momento que se pidió el traslado, aunque eso no ha sido impedimento para que nos hayamos seguido viendo y pasando buenos ratos juntas. Muchas gracias a los demás: Abraham y Dani, estamos juntos desde el primer año de carrera; a Laura López, por toda la ayuda que me ha prestado en el laboratorio; y a Paula y Mar, por todas las risas y buenos momentos que hemos pasado.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN/ABSTRACT</b> .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
1.1. El género <i>Staphylococcus</i> y su papel como agente etiológico de enfermedades en humanos.....	3
1.1.1. <i>Importancia de los estudios de prevalencia de portadores sanos de estafilococos coagulasa positivos</i> .....	5
1.1.2. <i>Problemática actual relacionada con la aparición de resistencia a antibióticos: estafilococos resistentes a la meticilina (MRSA: Methicillin Resistant Staphylococcus aureus)</i> .....	5
1.2. Factores relacionados con la aparición de portadores sanos de estafilococos .....	7
1.2.1. <i>Desórdenes inmunológicos</i> .....	7
1.2.2. <i>Otros factores</i> .....	8
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	9
2.1. Objetivo general.....	9
2.2. Objetivos específicos.....	9
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	10
3.1. Selección de la población de estudio.....	10
3.2. Elaboración de la encuesta en el programa estadístico SPSS.....	10
3.3. Medios de cultivo y reactivos.....	11
3.4. Diseño experimental.....	12
3.5. Toma de muestras, manipulación del material biológico y conservación de los aislados.....	13
3.5.1. <i>Protocolo para la detección de cepas fermentadoras del manitol</i> .....	13
3.5.2. <i>Protocolo para la detección de la capacidad desoxirribonucleasa (DNasa)</i> .....	14
3.5.3. <i>Protocolo para la detección de la capacidad coagulasa</i> .....	14
3.6. Búsqueda de estafilococos meticilin-resistentes (MRSA): antibiograma.....	15
3.7. Análisis de IgA en saliva.....	15
3.8. Análisis estadístico.....	16

<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	17
4.1. Descripción de la población de estudio.....	17
4.2. Caracterización de la población de estudio en función del aislamiento de cepas fermentadoras de manitol, DNasa y coagulasa positivas.....	21
4.3. Prevalencia de portadores sanos nasales y dérmicos de estafilococos coagulasa positivos y su relación con desórdenes en los niveles de IgA en saliva.....	23
4.4. Búsqueda de estafilococos meticilin-resistentes (MRSA).....	26
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	36
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	37

## RESUMEN

El género *Staphylococcus* se caracteriza por su capacidad para colonizar distintos hábitats humanos, como piel y mucosas. Se estima que alrededor del 30% de los individuos sanos están colonizados por este patógeno primario y oportunista, el cual produce alrededor de 240.000 casos de enfermedades de origen alimentario, representando una de las causas más importantes de intoxicación alimentaria de origen bacteriano. La especie *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) se ha convertido en una de las causas más importantes de infección entre pacientes de edad avanzada. Uno de los principales factores de riesgo para desarrollar una infección por cepas MRSA es ser portador crónico de este microorganismo. Este hecho no sólo aumenta el riesgo de infección grave (endocarditis, neumonía o bacteriemia), sino también se ha relacionado con un aumento en la mortalidad asociada a MRSA.

En función de lo indicado anteriormente, el objetivo principal de este trabajo fue investigar la incidencia de portadores sanos asintomáticos nasales y de piel de estafilococos en una población de estudiantes del grado en Biotecnología de la Universidad de Almería y su posible relación con los niveles de IgA y otros factores de riesgo. Se llevó a cabo además la búsqueda de estafilococos MRSA (meticilin-resistentes) a partir de la colección de aislados nasales y dérmicos procedentes de la población de estudio.

Los resultados revelaron que la condición de portador nasal de estafilococos coagulasa positivos estuvo estrechamente vinculada con la detección de anomalías inmunológicas en la IgA de muestras de saliva. Por otro lado, el análisis de la población de estudio reveló la existencia de individuos “atípicos” por presentar un mayor grado de resistencia o sensibilidad a la cefoxitina y la oxacilina. Además, la capacidad de determinadas cepas para coagular el fibrinógeno (actividad coagulasa) se relacionó de forma significativa con una mayor resistencia a dichos antibióticos.

Palabras clave: portador asintomático, estafilococos meticilin-resistentes, coagulasa, desórdenes inmunológicos, Inmunoglobulina A

**ABSTRACT**

The genus *Staphylococcus* is characterized by its ability to colonize different human habitats, such as skin and mucous membranes. It is estimated that around 30% of healthy individuals are colonized by this primary and opportunistic pathogen, which produces around 240.000 cases of foodborne diseases, which represents one of the most important causes of food poisoning. The species of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) has become one of the most important causes of infection among elderly patients. One of the main risk factors for developing an infection with MRSA strains is to be a chronic carrier of this microorganism. This fact not only increases the risk of serious infection (endocarditis, pneumonia or bacteremia), but has also been linked to an increase in mortality associated with MRSA.

Based on the above, the main objective of this work was to investigate the incidence of carriers of asymptomatic nasal and cutaneous staphylococci in a population of biotechnology students, and its possible relationship with IgA levels and other risk factors. In addition, the search for methicillin-resistant staphylococci was carried out from the collection of nasal and dermal isolates.

The results revealed that the nasal carrier condition of coagulase-positive staphylococci was closely related to the detection of IgA immunological disorders in saliva samples. On the other hand, the analysis of the study population revealed the existence of "atypical" individuals due to a greater degree of resistance or sensitivity to cefoxitin and oxacillin. In addition, the ability of certain strains to coagulate fibrinogen (coagulase activity) was significantly associated with greater resistance to such antibiotics.

Keywords: asymptomatic carrier, methicillin-resistant staphylococci, coagulase, immune disorders, immunoglobulin A

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. El género *Staphylococcus* y su papel como agente etiológico de enfermedades en humanos

*Staphylococcus aureus* pertenece al género *Staphylococcus*, de la familia *Micrococcaceae*. Es un coco Gram positivo, aerobio o anaerobio facultativo, que puede tener un diámetro de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$ . Los cocos pueden aparecer como células únicas, o agrupados en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos (Figura 1). Crece bien en medios no selectivos, tolera altas concentraciones de NaCl, es coagulasa, DNAsa y catalasa positivo, y fermenta el manitol. Estas características permiten diferenciarle de otras especies de *Staphylococcus* (Barrios, 2012).

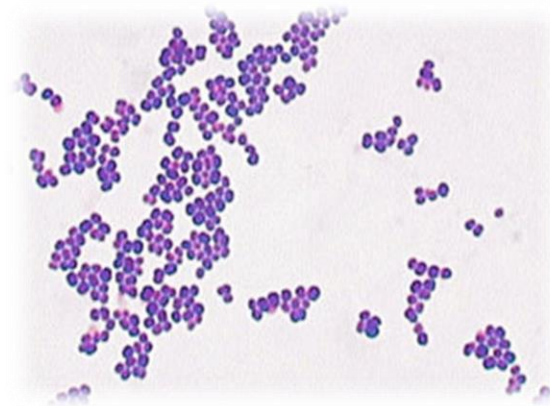


FIGURA 1. *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.

*S. aureus* puede provocar infecciones leves y superficiales en la piel y tejidos blandos, como abscesos o foliculitis, así como infecciones más graves de los tejidos blandos, como fascitis necrotizantes, asociadas a bacteriemia (Neyra et al., 2014). También causa cuadros clínicos producidos por toxinas, como el síndrome del shock tóxico, la intoxicación alimentaria y el síndrome de piel escaldada. *S. aureus* provoca infecciones agudas y superficiales, pero también puede producir infecciones más complejas como osteomielitis, neumonía y endocarditis aguda. Los factores de virulencia de *S. aureus* y su efecto biológico se resumen en la Tabla 1 y se representan esquemáticamente en la Figura 2.

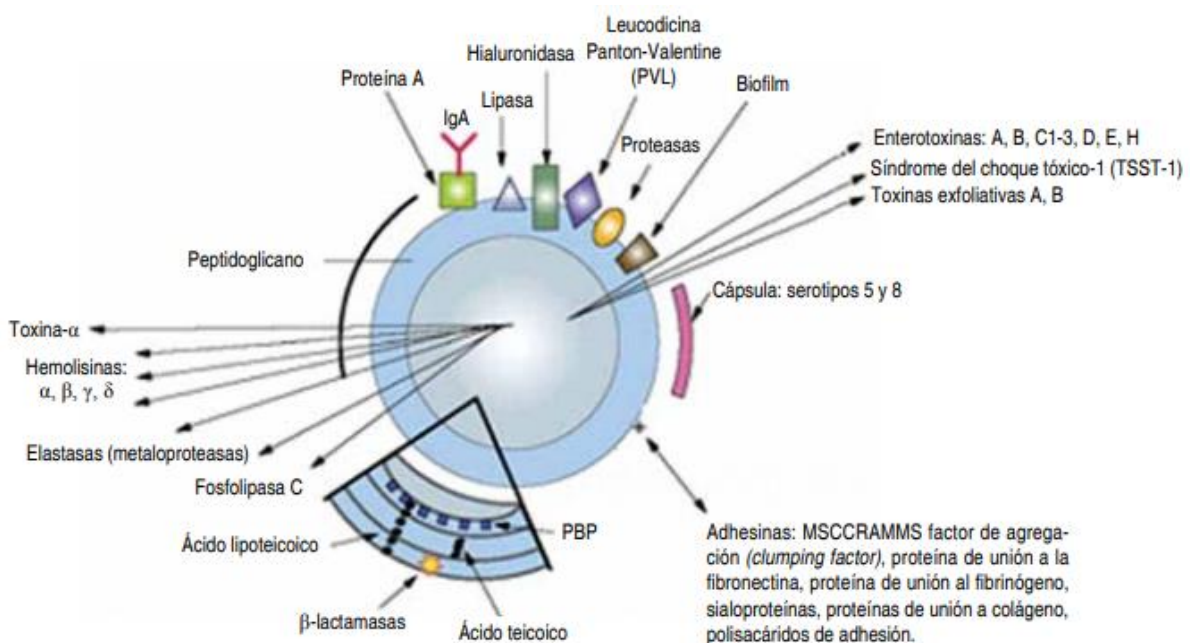


FIGURA 2. ILUSTRACIÓN FACTORES DE VIRULENCIA (FUENTE: CERVANTES-GARCÍA ET AL., 2014).



FACTORES DE VIRULENCIA	EFEECTO BIOLÓGICO
<b>COMPONENTES DE LA ESTRUCTURA</b>	
Cápsula	Impide la quimiotaxis y la fagocitosis, inhibe la proliferación de células mononucleares
Peptidoglicano	Estabilidad osmótica y producción de pirógenos endógenos; quimioatrayente leucocitario
Ácido teicoico	Regula la concentración catiónica de la membrana celular, se une a la fibronectina
<b>Proteína A</b>	Altera la función ciliar, estimula la respuesta inflamatoria, media en el daño tisular con producción de radicales tóxicos de oxígeno
<b>ENZIMAS</b>	
Coagulasa	Convierte el fibrinógeno en fibrina
Catalasa	Cataliza la descomposición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Fibrolisina	Disuelve los coágulos de fibrina
Lipasa	Hidroliza los lípidos
Nucleasa	Hidroliza el DNA
Penicilinasa	Hidroliza la penicilina
<b>TOXINAS</b>	
Hemolisinas	Rotura de membranas celulares
Leucocidinas	Alteración de la permeabilidad celular
Exfoliatinas	Epidermólisis
Toxinas TSST	Shock Tóxico
Enterotoxinas	Intoxicación alimentaria
Bacteriocinas	Muerte de otras bacterias

TABLA 1. FACTORES DE VIRULENCIA DE *S. AUREUS* (FUENTE: BRIZZIO, 2009).

En humanos, el nicho ecológico de esta bacteria se encuentra en la nasofaringe, eventualmente en la piel y de manera escasa, en el recto o el área perineal (Crossley et al., 2009), donde pueden producir importantes infecciones, además de dar paso a infecciones secundarias invasivas (Chen et al., 2011), por lo que es considerado un patógeno con un alto grado de virulencia (Cervantes-García et al., 2014).

*Staphylococcus aureus* se puede considerar una bacteria patógena nosocomial ya que afecta a una gran proporción de pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos. El principal mecanismo de transmisión es el contacto directo (Álvarez-Lam y Ponce-Bittar, 2012) aunque también se transmite en alimentos contaminados provocando graves intoxicaciones alimentarias.

El problema principal de *S. aureus* se debe a su capacidad para resistir el tratamiento con antibióticos, entre los que destaca la Meticilina. El grupo de estafilococos MRSA hace referencia a dicho fenómeno (cepas de *S. aureus* metilicilina-resistentes).

Se pueden encontrar otras especies del género *Staphylococcus* como integrantes de la microbiota normal de la piel, como *Staphylococcus epidermidis*. Sin embargo, en determinados momentos puede producir importantes infecciones complejas en huéspedes inmunocomprometidos. También *Staphylococcus saprophyticus*, a nivel genotourinario, puede provocar importantes infecciones en la mujer.

### **1.1.1. Importancia de los estudios de prevalencia de portadores sanos de estafilococos coagulasa positivos**

La prevalencia se puede definir como el porcentaje de personas de una población que son afectadas por una enfermedad en un momento dado o durante un periodo de tiempo. Junto con la incidencia (rapidez con la que ocurre una enfermedad) permite cuantificar la morbilidad, que es la cantidad de individuos afectados por una enfermedad en un espacio y tiempo determinados. Estos estudios son descriptivos, observacionales, estáticos (no existe seguimiento) y fáciles de realizar.

En Europa, la prevalencia de individuos que padecen infecciones por *S. aureus* ha ido aumentando estos últimos años. González et al., estimaron en 2016, que entre el 5 y el 10% de los pacientes ingresados en los hospitales contraen una infección. Cerca del 50% de las mismas son producidas por *Staphylococcus aureus* que habita en fosas nasales, faringe y piel de portadores sanos, los cuales podrían transmitir el microorganismo a los pacientes y personal sanitario, bien por transmisión aérea a partir de secreciones nasales, tos o estornudos, o bien por contacto directo mediante la interacción médico-paciente o enfermero-paciente.

Rodríguez-Noriega et al. (2014) encontraron una tasa de prevalencia de *Staphylococcus aureus* de un 18,2% en portadores nasales, constituyendo este hecho un factor de riesgo para el desarrollo de infecciones relacionadas con el agente patógeno. Además, ser portador nasal incrementa la probabilidad de dispersión del agente, tanto entre los pacientes como entre el personal sanitario. Hay que tener en cuenta que la tasa de portación nasal puede variar mucho de un país a otro, alcanzando en algunos casos valores hasta del 59%.

Mediaceja et al. (2014) realizaron un estudio sobre factores de riesgo asociados a la colonización de bacterias potencialmente patógenas en la faringe de adultos sanos, encontrando un porcentaje de portadores de *S. aureus* de un 10,7% a nivel faríngeo. Otros estudios internacionales revelan una prevalencia de portación faríngea de hasta un 92,6% en relación con la nasal (63,1%) en unidades de cuidados intensivos (Álvarez-Lam y Ponce-Bittar, 2012), lo que supone un riesgo de infección muy elevado para este grupo de pacientes.

### **1.1.2. Problemática actual relacionada con la aparición de resistencia a antibióticos: estafilococos resistentes a la metilina (MRSA: Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*)**

*Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) se ha convertido en una de las causas más importantes de infección entre pacientes de edad avanzada (Cuevas et al., 2004). Uno de los principales factores de riesgo para desarrollar una infección por cepas MRSA es ser portador crónico de este microorganismo. Este hecho no sólo aumenta el riesgo de infección grave (endocarditis, neumonía o bacteriemia), sino que también se ha relacionado con un aumento en la mortalidad asociada a MRSA (Datta y Huang, 2008).

El género *Staphylococcus* se caracteriza por su capacidad para colonizar distintos hábitats humanos, como piel y mucosas. Se estima que alrededor del 30% de los individuos sanos están colonizados por este patógeno primario y oportunista, el cual produce alrededor de 240.000 casos de enfermedades

de origen alimentario, representando una de las causas más importantes de intoxicación alimentaria de origen bacteriano (Hanson, 2011).

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) publicaron un estudio sobre las tendencias y fuentes de zoonosis, y brotes alimentarios en el año 2015, afirmando que las intoxicaciones causadas por las enterotoxinas estafilocócicas son responsables del 7,4% de todos los brotes informados por la UE (EFSA, 2017). Además, *S. aureus* tiene la capacidad de desarrollar resistencia a determinados antibióticos, problema que complica el tratamiento, aumenta los costes de su control y, a medio-largo plazo, dificulta el tratamiento de este tipo de infecciones.

Algunas cepas de *S. aureus* tienen la capacidad de producir  $\beta$ -lactamasas, enzimas que destruyen el anillo  $\beta$ -lactámico presente en penicilinas, cefalosporinas, etc., e impiden su interacción con las proteínas de unión a la penicilina (PBP). Las PBPs son enzimas localizadas en la membrana bacteriana que están implicadas en la síntesis del peptidoglicano de la pared celular. La resistencia a penicilina condujo al desarrollo de penicilinas semisintéticas, como la meticilina, resistentes a la acción de las  $\beta$ -lactamasas de *S. aureus*, para las que este microorganismo también desarrollaría rápidamente mecanismos de resistencia (Barrios, 2012).

Se ha descrito por algunos autores que la resistencia de ciertas cepas MRSA a la meticilina está mediada por la presencia de los genes *mecA* o *mecC*, los cuales codifican una proteína adicional de unión a la penicilina, denominada PBP2a (Figura 3), que presenta baja afinidad por los antibióticos del grupo de  $\beta$ -lactámicos (García-Álvarez et al., 2011). Otros trabajos relacionan la resistencia a meticilina por parte de *S. aureus*, con la producción de una enzima codificada por plásmidos, que inactiva el antibiótico mediante la abertura de su anillo betalactámico. Estas cepas producen altas cantidades de  $\beta$ -lactamasas, que hacen que la acción de la oxacilina y meticilina sea lenta (Gil, 2000).

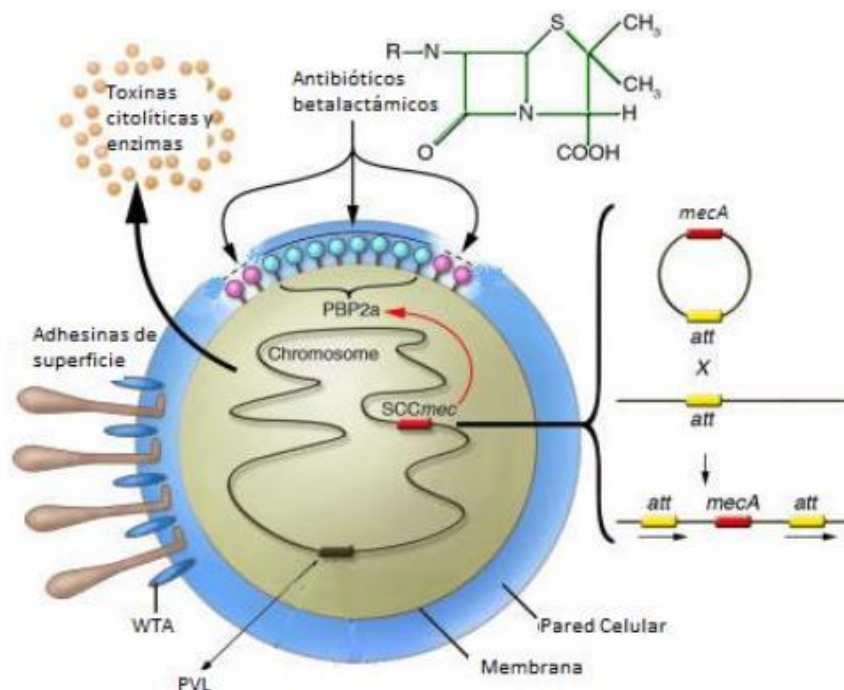


FIGURA 3. *S. AUREUS* RESISTENTE A METICILINA (FUENTE: TORRES-ESCOBAR, 2014).

## 1.2. Factores relacionados con la aparición de portadores sanos de estafilococos

Cuando un individuo nace, se expone de forma inmediata al ambiente externo y en consecuencia a la microbiota típica de ese entorno. Su piel y mucosas son colonizadas por cientos de especies de bacterias, y un pequeño número de hongos, que podrán ser considerados como su propia microbiota comensal, inocua desde un punto de vista sanitario. La presencia de los microorganismos comensales resulta esencial para la vida del ser humano, dado su papel en los procesos digestivos, en la síntesis de vitaminas y en la prevención de la colonización por microorganismos patógenos, gracias en parte a mecanismos de competencia por los nutrientes y el espacio, así como a la producción de bacteriocinas (Parlet et al., 2019).

*S. aureus* es un organismo oportunista, que puede colonizar los objetos con los que comúnmente tenemos contacto, además de los alimentos que consumimos, ocasionando graves estragos en la salud. Esto incluye infecciones epidérmicas, septicemia o shock tóxico, entre otros; es también una de las bacterias más comúnmente aisladas en infecciones adquiridas en la comunidad, así como en los hospitales (infecciones nosocomiales), ya que el microorganismo también presenta una notable capacidad invasiva (Zendejas-Manzo et al, 2014).

### 1.2.1. Desórdenes inmunológicos

*S. aureus* es una bacteria inmunogénica, productora de importantes toxinas. Sin embargo, tras la toxiinfección de origen estafilocócico no se produce “memoria inmunológica”, por lo que no se impide que se puedan desarrollar otras infecciones futuras de la misma naturaleza.

El déficit de inmunoglobulinas (Figura 4), es la causa más frecuente de inmunodeficiencia, y se produce cuando existe un defecto en algún componente del sistema inmune, o cuando éste se ve afectado por factores externos (Duraisingham et al., 2015; Esposito et al., 2015). Las inmunodeficiencias se han relacionado comúnmente con infecciones crónicas, infecciones recurrentes, infecciones por agentes infecciosos raros u oportunistas, o procesos curativos incompletos (Lankisch et al., 2015).

El déficit de IgA se define como la ausencia o disminución de la concentración de IgA sérica por debajo de 5 mg/dL, con niveles séricos normales o aumentados de IgG, IgM, IgD e IgE, y una respuesta normal de tipo IgG a la vacunación. La IgA se produce de forma predominante por las células B en las placas de Peyer, amígdalas y otros tejidos linfoides submucosos, y supone un 15-20% de total de las inmunoglobulinas (Girbés y Cerdá, 2004).

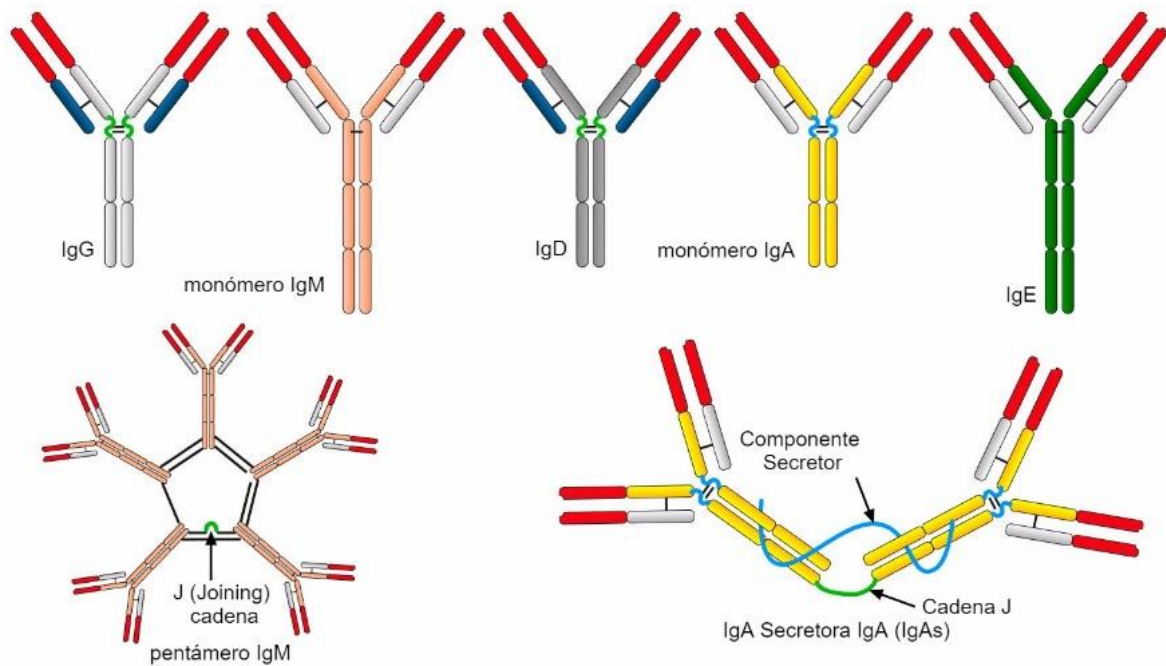


FIGURA 4. TIPOS DE INMUNOGLOBULINAS.

El déficit de IgA combinado con el hecho de ser portador de *S. aureus*, puede derivar en infecciones respiratorias causadas por inmunodeficiencia común variable (IDCV), abscesos cutáneos, retraso ponderoestatural o infecciones oportunistas en pacientes con inmunodeficiencia combinada grave (IDCG) (Girbés y Cerdá, 2004). Pupo-Rodríguez et al., en 2016, llevaron a cabo un estudio sobre la IgA en portadores de *S. aureus*, encontrando valores por debajo de los normales. Esta inmunoglobulina es la más abundante en el suero después de la IgG, y entre sus funciones están la de inhibir la adherencia bacteriana y la neutralización de enzimas, virus y toxinas. La IgA se encuentra en secreciones como el sudor, confiriendo una mayor protección al organismo a nivel de las superficies mucosas y cutáneas, que es donde se encuentra mayoritariamente *S. aureus*. Tales aspectos de la IgA podrían explicar la estrecha relación entre déficit de IgA-enfermedad-portador de *S. aureus*.

### 1.2.2. Otros factores

*Staphylococcus aureus* es un patógeno que puede colonizar las fosas nasales, las mucosas orofaríngeas y la piel de algunas personas, pudiendo establecer una relación con el huésped portador asintomático, siempre que se mantenga un cierto equilibrio entre el microorganismo y el sistema inmune del hospedador. No obstante, las infecciones por *S. aureus* son más prevalentes en los portadores que en los no portadores y, generalmente, son causadas por la cepa colonizadora y dependerá del estado inmunológico del portador, siendo los portadores nasales la principal fuente de transmisión (Hernández et al., 2003). Las hospitalizaciones prolongadas, intervenciones quirúrgicas, estancia en cuidados intensivos, el uso irracional de antibióticos y la proximidad al personal médico u otros pacientes colonizados o infectados por MRSA, son factores que favorecen la portación nasal y dérmica de *S. aureus* de forma asintomática (Leibovici et al., 2000).

Algunos autores han detectado una estrecha relación entre el desarrollo de enfermedad respiratoria de tipo alérgico y la frecuencia de bacterias patógenas en la nasofaringe, destacando la presencia de *S. aureus* (Adegbola et al., 2014).

Por otra parte, las toxinas estafilocócicas se pueden transmitir a las personas a través del consumo de alimentos contaminados por falta de higiene e inadecuadas prácticas de cocinado y conservación. Muchos brotes de intoxicación por enterotoxinas estafilocócicas se producen en el hogar por un inadecuado tratamiento térmico en el cocinado, por lo que es recomendable adoptar buenas prácticas de higiene en la preparación y conservación de los alimentos, especialmente en alimentos que vayan a consumirse crudos (Omwenga et al., 2019). Sin embargo, cabe destacar que la susceptibilidad del huésped al patógeno no solo depende de la cantidad de toxina que se ha ingerido o con la cual se ha tenido contacto, sino también del tipo de cepa que se ha adquirido, ya que diversas especies presentan resistencia contra antibióticos (cepas MRSA). Esto último ocurre debido a la adquisición de plásmidos y a las modificaciones adaptativas que alberga en su genoma (Zendejas-Manzo et al., 2014).

Se han descrito otros hábitos que pueden aumentar la probabilidad de ser portador de *S. aureus* MRSA. La enfermedad respiratoria crónica, el uso frecuente de antibióticos, la higiene personal, el contacto con animales, trabajar en guarderías o practicar deportes de contacto podrían ser factores de riesgo a tener en cuenta en el riesgo de portación de *S. aureus* MRSA (Fritz et al., 2008; Lo et al., 2008).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

En función de lo indicado anteriormente, el objetivo principal de este trabajo fue investigar la incidencia de portadores sanos asintomáticos nasales y de piel de *Staphylococcus* coagulasa positivos en una población de estudiantes del grado en Biotecnología de la Universidad de Almería y su posible relación con los niveles de IgA y otros factores de riesgo.

### 2.2. Objetivos específicos

1. Elaboración de Cuestionario/Entrevista en el programa estadístico SPSS dirigida a la recopilación de datos de los sujetos de la población.
2. Caracterización de la población de estudio.
3. Detección de cepas de *Staphylococcus* DNasa y coagulasa positivas a partir de muestras nasales y de piel.
4. Establecimiento de la relación entre desórdenes en los niveles de IgA salival y presencia de *Staphylococcus* DNasa y coagulasa positivos en los sujetos de la población de estudio.
5. Detección de cepas de *Staphylococcus* MRSA -meticilin-resistentes- procedentes de la población de estudio.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación, se indican los materiales, medios de cultivo, reactivos, protocolos de muestreo, tratamiento de las muestras y diseño experimental, necesarios para la consecución de los objetivos del trabajo.

#### 3.1. Selección de la población de estudio

Para llevar a cabo este Trabajo Fin de Grado, se seleccionó una población de alumnos del grado de Biotecnología de la Universidad de Almería. La población estuvo compuesta por un total de 71 voluntarios que cumplían con una serie de requisitos de forma previa a la toma de muestras. Dichos requisitos fueron no presentar síntomas aparentes de infección y no haber tomado antibióticos con una anterioridad de al menos 48 h. Los datos de la población se recopilaron por medio de la observación, encuesta y registro en un formulario diseñado al efecto (ver apartado 3.2.).

#### 3.2. Elaboración de la encuesta en el programa estadístico SPSS

Mediante un formulario de preguntas elaborado con el programa estadístico SPSS versión 25.0. (*Statistical Package for Social Sciences*), se realizó una investigación observacional, descriptiva y analítica, con objeto de caracterizar los portadores nasales y de piel de *Staphylococcus aureus* meticilin-resistentes, en una población de estudiantes del Grado de Biotecnología de la Universidad de Almería.

Dichas cuestiones se enumeran a continuación:

- Sexo
- Historial de desórdenes digestivos
- Historial de intoxicación alimentaria grave
- Problemas diagnosticados en la piel

El cuestionario elaborado en el programa SPSS sirvió para recopilar, además, la información relacionada con las variables objeto de este estudio, las cuales fueron:

- Detección de portadores de estafilococos fermentadores de manitol
- Detección de portadores de estafilococos DNasa positivos
- Detección de portadores de estafilococos coagulasa positivos
- Cuantificación y rango de IgA mediante inmunodiagnóstico
- Detección de cepas de estafilococos meticilin-resistentes (MRSA)

La organización de los datos de la población en el programa SPSS puede observarse en el Anexo 1, incluido al final de esta memoria.

### 3.3. Medios de cultivo y reactivos

En la Tabla 2 se indica la composición de los medios de cultivo y reactivos utilizados para la consecución de los objetivos del trabajo, así como la función que cumplen en cada caso.

MEDIO	COMPOSICIÓN	CANTIDAD/L	FUNCIÓN
Agar Salado Manitol	Digerido enzimático de caseína	5,0 g	Medio semiselectivo y diferencial para el crecimiento de <i>S. aureus</i> .
	Digerido enzimático de tejido animal	5,0 g	
	Extracto de carne de res	1,0 g	
	D-Manitol	10,0 g	
	Cloruro de sodio	75,0 g	
	Rojo de fenol	0,025 g	
	Agar bacteriológico	15,0 g	
APHA	Extracto de Levadura	2,0 g	Medio nutritivo general para el crecimiento de bacterias.
	D (+)-Glucosa (Anhidro)	1,0 g	
	Digerido Enzimático de Caseína	5,0 g	
	Agar Bacteriológico	15,0 g	
DNAsa	Digerido enzimático de caseína	15,0 g	Detección de actividad desoxirribonucleasa.
	Digerido enzimático de tejido animal	5,0 g	
	Cloruro de sodio	5,0 g	
	Ácido desoxirribonucleico	2,0 g	
	Agar bacteriológico	15,0 g	
Caldo BHI	Infusión de cerebro y corazón	8,0 g	Medio líquido enriquecido para el cultivo de patógenos, incluyendo bacterias aerobias y anaerobias.
	Digerido péptico de tejido animal	5,0 g	
	Digerido pancreático de caseína	16,0 g	
	Cloruro sódico	5,0 g	
	Glucosa	2,0 g	
	Fosfato disódico de hidrógeno	2,5 g	
Agar Mueller Hinton	Extracto de carne bovina	2,0 g	Medio estándar para determinar la sensibilidad de bacterias a antibióticos y otros agentes quimioterapéuticos.
	Hidrolizado ácido de caseína	17,5 g	
	Almidón	1,5 g	
	Agar bacteriológico	17,0 g	
Plasma de conejo	Plasma de conejo liofilizado	Vial 10 mL	Detección de la actividad coagulasa.
HCl 1 N	HCl al 98% 12N		Revelado de la actividad DNasa.
Glicerol	Glicerol al 20%		Agente crioprotector para conservación de cepas y otras muestras biológicas a -80 °C.
Discos de antibióticos	Oxacilina (OX). Oxoid	1 µg	Discos de Antibiograma para detección de cepas MRSA.
	Cefoxitina (FOX). Oxoid	30 µg	

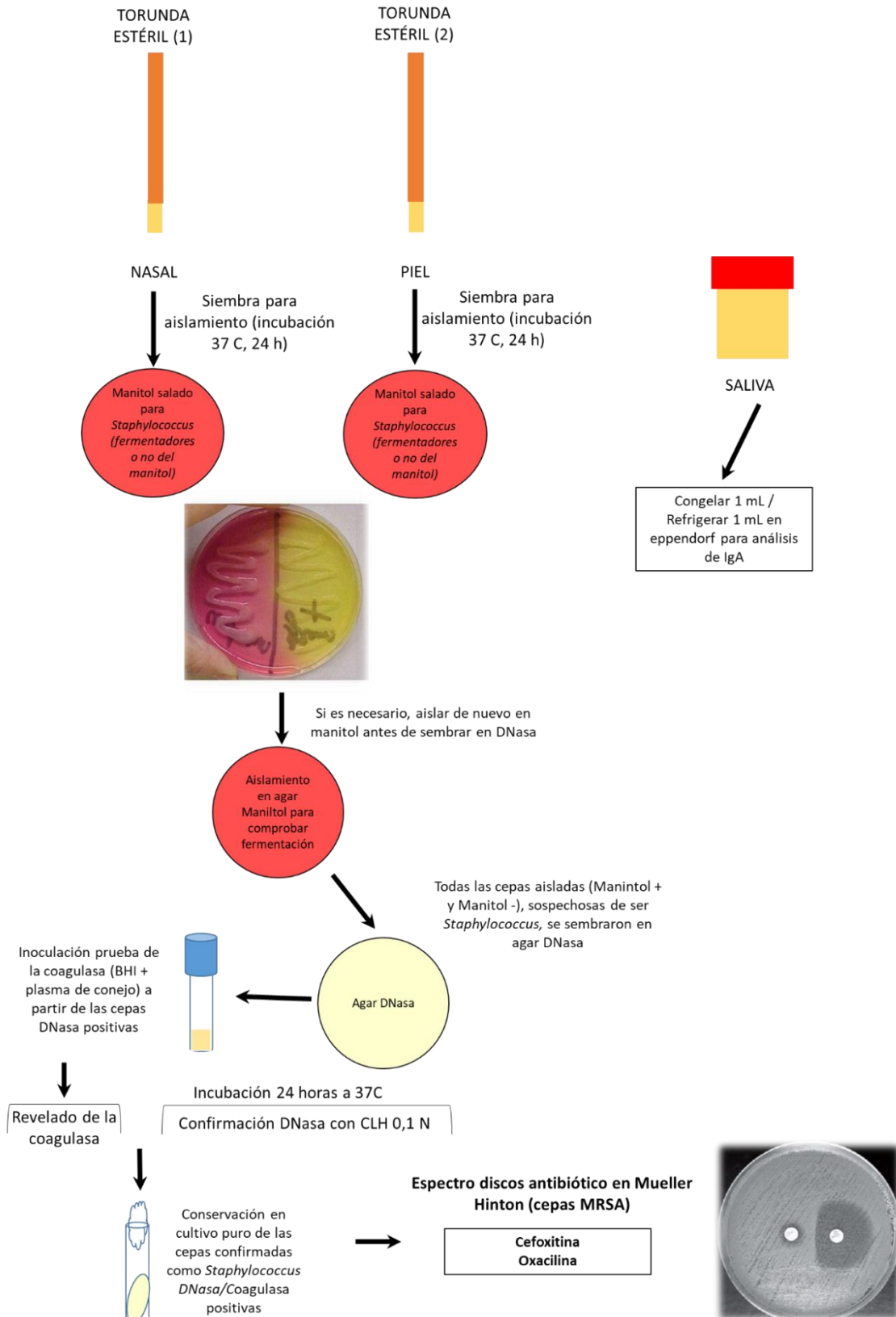
TABLA 2. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS UTILIZADOS.



### 3.4. Diseño Experimental

En el Esquema 1 se muestra el diseño experimental relacionado con el desarrollo del trabajo, desde el momento en el que se realizaron los muestreos hasta la fase final de antibiograma.

#### PROTOCOLO DE MUESTREO Y ACTUACIÓN PARA ANÁLISIS DE STAPHYLOCOCCUS DNASA/COAGULASA +



ESQUEMA 1. DISEÑO EXPERIMENTAL.

### 3.5. Toma de muestras, manipulación del material biológico y conservación de los aislados.

Para llevar a cabo la toma de muestras biológicas, se utilizó un escobillón estéril para el exudado nasal, así como para el muestreo de la zona de piel localizada en torno a nariz, boca y barbilla. La siembra inicial de las muestras biológicas se llevó a cabo en medios semiselectivos para el crecimiento de *Staphylococcus* spp. fermentadores o no de manitol (Tabla 2). Posteriormente, se comprobó la capacidad DNasa de todas las cepas sospechosas, tanto de las fermentadoras de manitol como de las no fermentadoras. Sólo a partir de aquellas que fueron DNasa positivas se evaluó la actividad coagulasa de las mismas; a estas últimas se les realizó, finalmente, un antibiograma frente a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos cefoxitina y oxacilina, con objeto de determinar si se podían catalogar como cepas MRSA.

La incubación de los cultivos se realizó siempre en las mismas condiciones, a 37 °C, y en oscuridad durante 24 horas. Todas las cepas sospechosas de pertenecer al género *Staphylococcus* fueron confirmadas mediante visualización a microscopio óptico.

La colección de cepas se conservó en tubos con agar APHA refrigerados a 4 °C, los cuales se resembraron mensualmente. Para su conservación a largo plazo se mantuvieron congelados a -80 °C en glicerol al 20%.

En paralelo, se tomaron muestras de aproximadamente 5 mL de saliva a partir de cada individuo, en condiciones de ayuno de un mínimo de 8 horas. La mitad de este volumen fue mantenido a 4 °C y el resto se congeló a -20 °C y se reservó para realizar el inmunoensayo de detección de IgA en saliva.

#### 3.5.1. Protocolo para la detección de cepas fermentadoras del manitol

Este protocolo permite la detección de cepas de *Staphylococcus* fermentadoras o no del manitol. Dicho sustrato, así como el carácter salino del medio lo convierten en un medio prácticamente selectivo para el aislamiento de *Staphylococcus aureus* (Figura 5).

Tras realizar los muestreos de fosas nasales y piel a partir de cada individuo, se sembraron las placas de manitol y se incubaron durante 24-48 horas a 37 °C. Transcurrido el periodo de incubación, se procedió a la selección de colonias sospechosas de ser *Staphylococcus*, las cuales se volvieron a sembrar en manitol salado, para confirmar su capacidad para fermentar dicho sustrato. Se seleccionaron tanto colonias fermentadoras del manitol (color amarillo)

como no fermentadoras (color rosa), ya que existen especies no fermentadoras con relevancia clínica, como es el caso de *S. epidermidis*. Una vez realizados los aislamientos se realizó el pase de las cepas de interés a APHA y de ahí a tubos de agar inclinado para su conservación en frío a 4 °C.

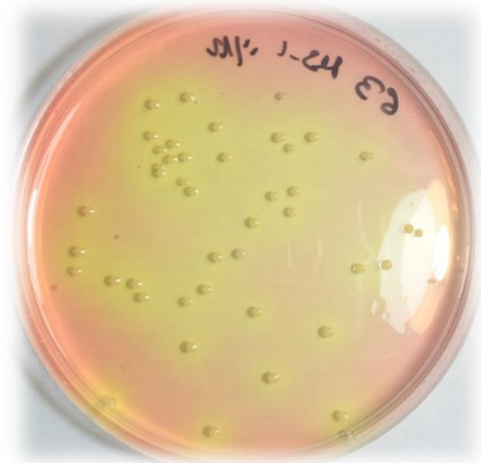


FIGURA 5. PRUEBA DE FERMENTACIÓN DE MANITOL.

### 3.5.2. Protocolo para la detección de la capacidad desoxirribonucleasa (DNasa)

Gracias a esta prueba es posible detectar cepas de *S. aureus* que poseen actividad DNasa. La enzima desoxirribonucleasa (DNasa) es capaz de romper los enlaces fosfodiéster internos de la molécula de ADN. En el medio de cultivo agar DNasa sin indicador, la hidrólisis de ADN se observa por la aparición de un halo tras el periodo de incubación y adición de HCl 0,1 N. El ácido hace que precipite el ADN sin hidrolizar haciendo que el medio se opaque. Por lo tanto, colonias productoras de DNasa, que hidrolizan el ADN, se observan con una zona clara alrededor del crecimiento tras la adición del HCl 0,1 N (Figura 6).



FIGURA 6. PRUEBA DE DETECCIÓN DE ACTIVIDAD DNASA

### 3.5.3. Protocolo para la detección de la capacidad coagulasa

Este protocolo permite diferenciar entre cepas de *S. aureus*, que tienen actividad coagulasa, de otras cepas que genéricamente se las denomina estafilococos coagulasa negativos (ScoN). Mediante la capacidad coagulasa determinadas cepas son capaces de producir la coagulación del fibrinógeno presente en el plasma sanguíneo, lo que supone un importante indicador de patogenicidad.

Para llevar a cabo este procedimiento, las cepas seleccionadas como DNasa positivas se sembraron en caldo BHI, y se incubaron durante 24 horas en agitación a 120 rpm y 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, por cada mL de cultivo bacteriano se añadió 0,5 mL de plasma de conejo y se dejó incubar 4 horas a 37 °C. El revelado de la prueba consistió en observar la formación del coágulo. Se estableció para ello 3 niveles de coagulación: negativa (sin coágulo), débil (formación de fibras débiles y dispersas en el medio que permanece líquido), intermedia (se observan coágulos más densos y el medio se espesa), y fuerte (el medio se observa totalmente coagulado) (Figura 7).

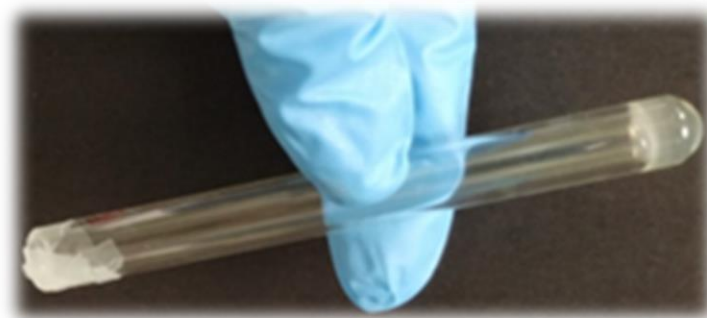


FIGURA 7. PRUEBA PARA DETECCIÓN DE ACTIVIDAD COAGULASA

### 3.6. Búsqueda de estafilococos meticilin-resistentes (MRSA): antibiograma

Para la detección de cepas de estafilococos resistentes a meticilina se suelen utilizar dos antibióticos, oxacilina y cefoxitina (Swenson et al., 2005).

Este procedimiento se llevó a cabo en placas con medio agar Mueller Hinton. A partir de una placa de cultivo reciente del microorganismo, se tomaron 2-3 colonias con un asa de siembra y se resuspendieron en un tubo con solución salina al 0,9%. El inóculo se ajustó a una turbidez equivalente al 0,5 de la escala de MacFarland. Dicha suspensión se sembró en masa sobre el medio de cultivo con ayuda de un escobillón estéril y, tras dejar secar 5 minutos, sobre la placa inoculada se depositaron los discos impregnados con los dos tipos de antibióticos seleccionados. Los discos se colocaron con la ayuda de unas pinzas estériles, a una distancia no inferior a 15 mm del borde de la placa, y separados al menos 30 mm entre sí. Transcurridas 24 horas de incubación a 35-37 °C, se observó la aparición de halos de inhibición alrededor de la zona de crecimiento bacteriano (Figura 8).



FIGURA 8. ANTIBIOGRAMA

Se consideró sensibilidad a la oxacilina cuando el halo de inhibición fue mayor de 13 mm para un disco de oxacilina de 1 µg, mientras que se consideró sensibilidad a la cefoxitina cuando el halo de inhibición fue superior a 20 mm para un disco de 30 µg (Anand et al., 2009).

### 3.7. Análisis de IgA en saliva

La cuantificación de IgA en muestras de saliva se llevó a cabo mediante un kit de inmunodiagnóstico espectrofotométrico proporcionado por la empresa Monlab (Monlabtest, MO-165037). El ensayo se llevó a cabo a una longitud de onda de 600 nm. Se mezclaron 10 µL de muestra con 800 µL de tampón Tris (R1 de Monlab), e inmediatamente se midió la absorbancia (A1). Posteriormente, se pipeteó en la cubeta 200 µL de anti-IgA (R2 de Monlab). Se volvió a mezclar y se midió la absorbancia (A2) exactamente 2 minutos después de añadir la anti-IgA. En paralelo, se preparó una recta de calibración con un multicalibrador de proteínas séricas proporcionado por Monlab (MO-16504). La concentración de IgA en la muestra se calculó por interpolación de su diferencia (A2-A1) en la curva de calibración.

Valores de IgA de referencia en adulto: 80-310 mg/dL.

### 3.8. Análisis estadístico

Tras la realización de las encuestas y los experimentos asociados a la población de estudio, los datos se recopilaron y fueron sometidos a un análisis estadístico mediante el programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versión 25.0. Se llevó a cabo un primer análisis descriptivo dirigido a la caracterización de la población de estudio en función de variables poblacionales endógenas, como son sexo, tendencia a padecer desórdenes digestivos, frecuencia de toxiinfección alimentaria, afecciones dérmicas y rango detectable de IgA en saliva. Posteriormente, se estableció un análisis mediante tablas cruzadas, con objeto de establecer la relación entre parejas de variables, incluyendo en este caso los resultados derivados del carácter portador de los individuos. Por otro lado, con objeto de detectar posibles cepas de *Staphylococcus* MRSA (meticilin-resistentes), los resultados derivados del antibiograma fueron analizados mediante un análisis de varianza unifactorial ANOVA y test de la mínima diferencia de Fisher ( $p < 0,05$ ) con el paquete estadístico Statgraphic Centurion XVII.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

A continuación, se describirán los resultados derivados del estudio realizado en una población de estudiantes de la Universidad de Almería, con relación a su papel como portadores nasales o dérmicos de estafilococos coagulasa positivos. Los resultados describirán inicialmente las características básicas de la población de estudio, en función de algunos factores de riesgo que pudieran estar relacionados con el hecho de ser portadores de estafilococos como es el caso de posibles afecciones de la piel, problemas digestivos o deficiencias en IgA.

En una segunda parte de los resultados, se describirá la colección de cepas aisladas a partir de los individuos de la población, en función de su capacidad para fermentar el manitol, degradar ácidos nucleicos (actividad DNasa) y producir enzimas de tipo coagulasa. La presentación de tales resultados se realizará de forma independiente en función del origen de las cepas (nasal o piel).

Una vez establecida la presencia en la población de portadores de estafilococos coagulasa positivos, se tratará de establecer la existencia de relaciones causales entre este problema y el resto de los factores poblacionales, así como con posibles anomalías inmunológicas relacionadas con la concentración de IgA en saliva.

Finalmente, teniendo en cuenta el interés sanitario que despierta la aparición de cepas de estafilococos meticilin-resistentes, se mostrará en un último apartado de resultados, el amplio espectro de sensibilidad-resistencia a los antibióticos de las distintas cepas aisladas de la población de estudio, a los antibióticos oxacilina y cefoxitina, ambos utilizados para determinar la aparición de cepas resistentes.

### **4.1. Descripción de la población de estudio**

La población de estudio estuvo formada por 71 individuos, de los cuales 26 fueron hombres y 45 fueron mujeres. Como se ha indicado en el apartado 3.2. del Material y Métodos, a los individuos de la población se les realizó una entrevista en orden de caracterizar la población respecto a una serie de variables de interés sanitario. En las Figuras 9, 10 y 11 se muestra la descripción de la población de estudio en función de la frecuencia y tipo de afecciones de la piel, así como en función de la frecuencia con la que padecen desórdenes digestivos (Figuras 9, 10 y 11). En sendas Figuras, se refleja tanto el recuento absoluto de individuos correspondientes a cada categoría, como el porcentaje que supone dicho recuento en la población total de estudio.

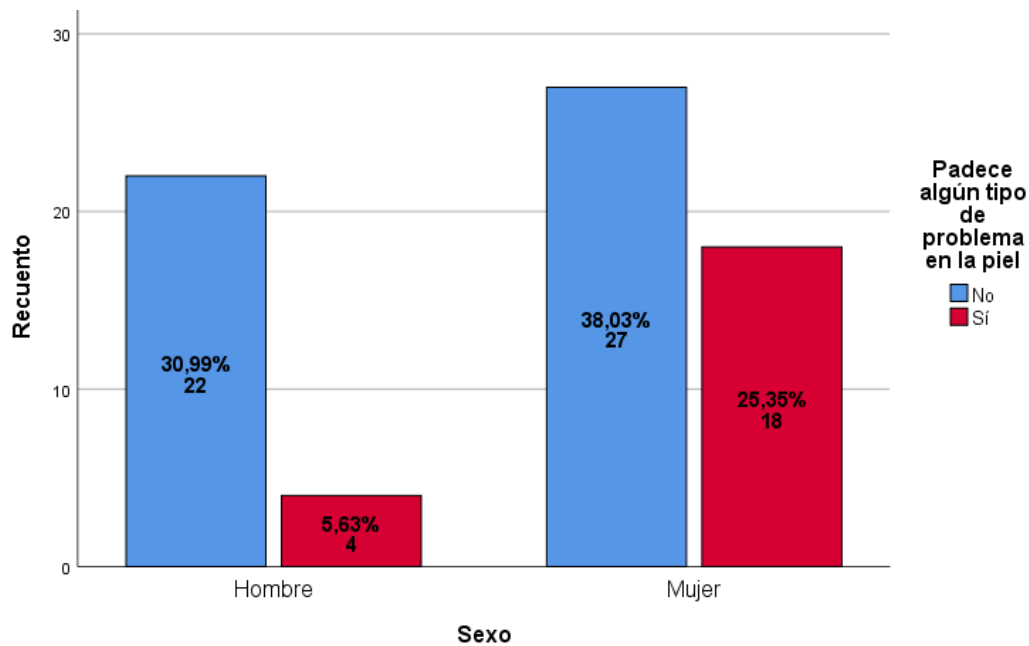


FIGURA 9. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN EN FUNCIÓN DEL SEXO Y PRESENCIA DE AFECCIONES DÉRMICAS

Si se tienen cuenta las características de la población en función del sexo, se observa que, en el total de la población, 22 individuos manifestaron tener frecuentemente problemas en la piel (en torno al 30% de la población), siendo 18 de ellos correspondientes al grupo de las mujeres (aproximadamente el 25% del total de la población). Si esta proporción la trasladamos a los datos de subpoblaciones, con objeto de diferenciar los resultados en función del sexo, resulta que en torno al 40% de las mujeres alegaron tener problemas dérmicos en algún momento de su vida, mientras que sólo el 15% de los hombres manifestaron padecer este tipo de problemas. En esta fase inicial de la entrevista, no se hizo hincapié en determinar si el tipo de afección dérmica manifestado era de origen infeccioso.

Cuando estos porcentajes se trasladaron a la población total, se obtuvo en torno a un 25% de afectados que fueron mujeres, frente a menos del 6 % de afectados que fueron hombres. Por tanto, aunque podría resultar precipitado determinar una posible relación causa-efecto entre el factor endógeno "sexo" y la variable "afecciones dérmicas", cabe destacar la mayor prevalencia de problemas en la piel en el grupo de mujeres con respecto al de hombres en la población de estudio.

Entre los diferentes tipos de problemas dérmicos que manifestaron los individuos de la población de estudio (Figura 10), se incluyeron piel atópica, acné, infección de origen fúngico, dermatitis seborreica, y psoriasis, entre otros. Cabe destacar que, en el grupo de mujeres, se detectaron casos de todas las afecciones dérmicas indicadas anteriormente, mientras que, en el grupo de los hombres, sólo se describieron 3 casos de piel atópica y uno de acné. No fue objeto de este estudio establecer la posible relación estadística entre género y predisposición a padecer distintas afecciones de la piel (de origen infeccioso o no), para lo cual hubiera sido imprescindible incrementar el tamaño poblacional. Obviando este hecho, y teniendo en cuenta la temática principal de este Trabajo fin de Grado, diversos autores describen la relación entre distintos problemas de la piel y la detección o aislamiento de *Staphylococcus aureus* en los individuos afectados. Así, en 2009, Balci et al. realizaron un estudio a

pacientes con psoriasis y concluyeron que la mayoría de los individuos fueron positivos para enterotoxinas producidas por *S. aureus*. Por su parte, Totté et al. (2016a), encontraron que pacientes con psoriasis parecían estar colonizados con *S. aureus* con más frecuencia que otros individuos sanos. Según indican estos autores, es posible que la sobreabundancia de *S. aureus* en el microbioma de pacientes con psoriasis pueda estar implicada en la perpetuación de la inflamación crónica. Por otro lado, en el caso de los pacientes con acné, la relación entre la colonización y la enfermedad fue menos evidente.

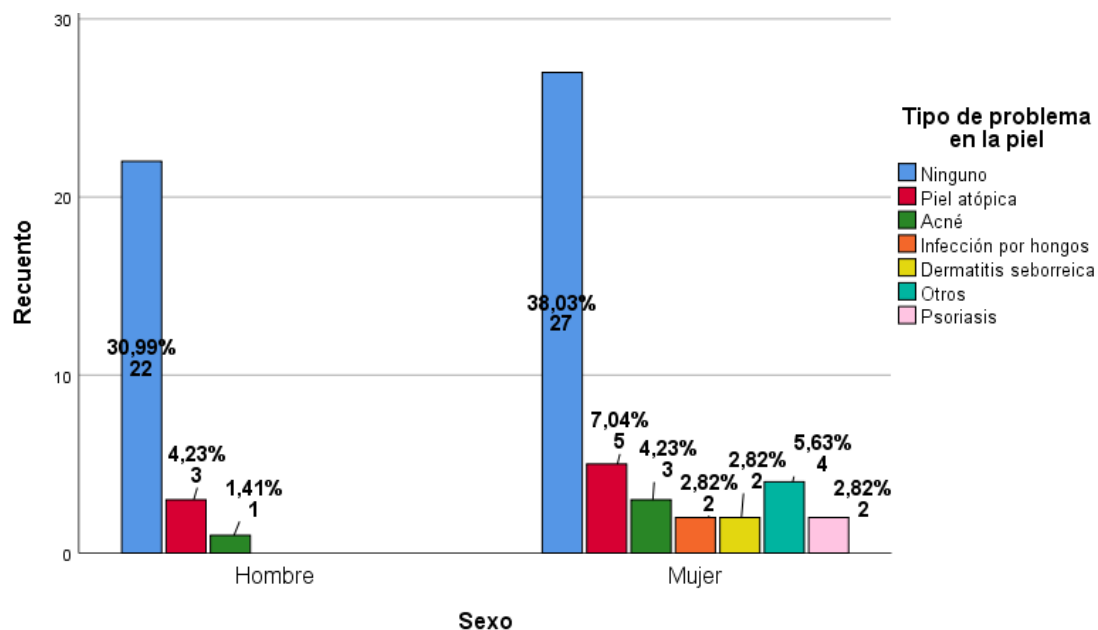


FIGURA 10. DISTRIBUCIÓN DE LA POBLACIÓN EN FUNCIÓN DEL SEXO Y TIPO DE AFECCIONES DÉRMICAS

De igual modo, según el estudio de Totté et al. (2016 b), la aparición de dermatitis y piel atópica podría estar relacionada con una colonización excesiva de *S. aureus*. Por el contrario, trabajos recientes defienden que la presencia de un grupo de estafilococos coagulasa negativos pertenecientes a la microbiota comensal de la piel, podrían estar implicados en incrementar los mecanismos de defensa naturales de la piel. Sin embargo, no descarta que otras cepas altamente patógenas de *S. aureus* interfieran con dicho grupo, causando un desequilibrio a nivel de la piel del hospedador (Parlet et al., 2019).

Los resultados obtenidos con respecto a la frecuencia de desórdenes digestivos (Figura 11) en la población de estudio mostraron que el 38% de los individuos manifestaron padecer algún tipo de problema digestivo al menos una vez al año. Entiéndase por desórdenes digestivos, aquellos trastornos de salud que ocurren en el aparato digestivo, que pueden suponer una gravedad de leve a seria, y que puede ser de origen microbiológico o abiótico. De entre los individuos que indicaron padecer este tipo de problemas, en torno al 70% fueron mujeres. Si se describe la población en función de la mayor o menor frecuencia de padecer desórdenes digestivos, 14 individuos del total alegaron una frecuencia superior a tres veces por año, siendo 10 de ellos mujeres. No hay que olvidar que, en esta fase del trabajo, los resultados son meramente descriptivos, y que el establecimiento de relaciones entre ambos parámetros necesitaría una revisión exhaustiva del tamaño de la población. A pesar de que no se consideró este punto como uno de los objetivos del trabajo, si se detectó una mayor proporción



mujeres que padecían desórdenes digestivos con mayor frecuencia que los hombres (13,3% frente al 3,8%, respectivamente, para frecuencias superiores a 4 veces al año).

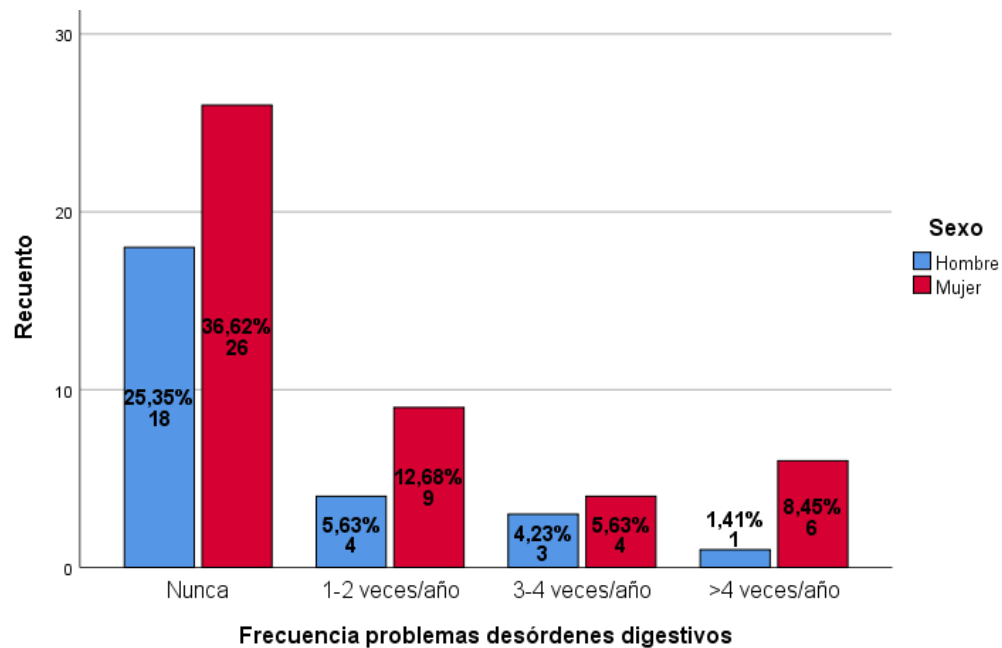


FIGURA 11. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN EN FUNCIÓN DEL SEXO Y DE LA FRECUENCIA DE APARICIÓN DE DESÓRDENES DIGESTIVOS

Las toxiinfecciones alimentarias constituyen un grupo de enfermedades que se producen como consecuencia de la ingestión de alimentos contaminados, bien por el propio microorganismo patógeno, o bien por toxinas producidas por él.

Con respecto a nuestra población de estudio, en la Figura 12 se puede observar que hasta 16 individuos (22,5%) manifestaron haber sido afectados por una infección/intoxicación alimentaria que requiriera ingreso hospitalario. De ellos, solo 4 tenían conocimiento de que el agente causante había sido *Salmonella* spp. En ningún caso describieron haber sufrido intoxicación estafilocócica, aunque si describieron un cuadro de síntomas muy característicos, como es náuseas y vómitos, dolor abdominal, diarrea, e incluso fiebre y dolor de cabeza. En los casos en los que no se pudo identificar el origen de la intoxicación, se descartó durante la entrevista a los individuos la posibilidad de que el problema fuera de origen abiótico (contaminación química de los alimentos).

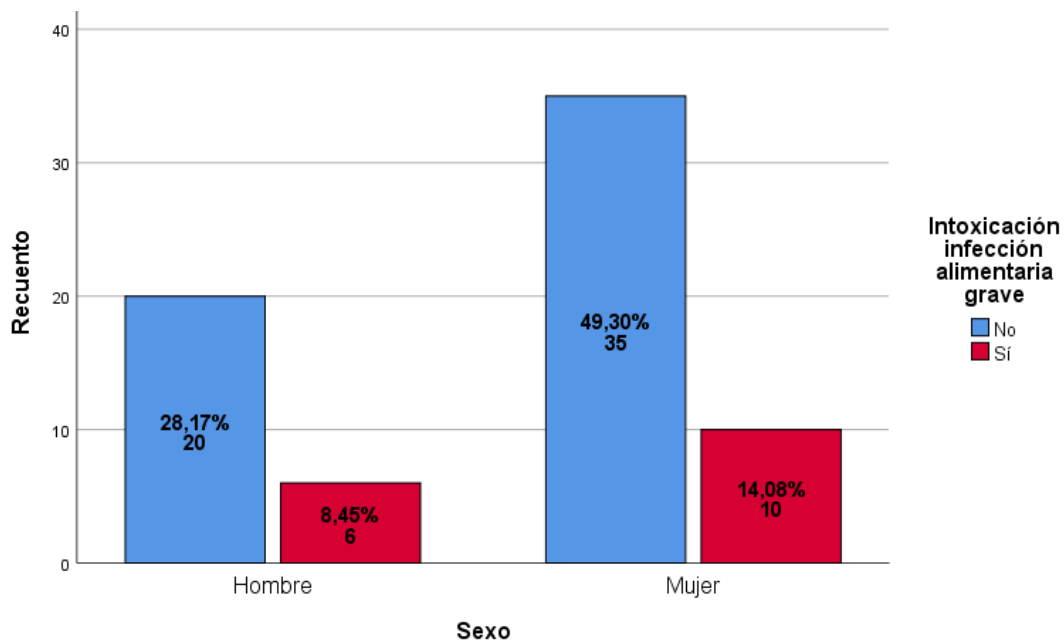


FIGURA 12. DISTRIBUCIÓN DE LA POBLACIÓN EN FUNCIÓN DE INTOXICACIONES GRAVES.

#### 4.2. Caracterización de la población de estudio en función del aislamiento de cepas fermentadoras de manitol, DNasa y coagulasa positivas.

La colección de cepas aisladas de fosas nasales y piel de los individuos de la población fue caracterizada en función de distintas capacidades bioquímicas con objeto de catalogarlas como posibles estafilococos. Para ello se determinó inicialmente su capacidad para fermentar el manitol, en segundo lugar, su capacidad para degradar ácidos nucleicos (actividad DNasa) y finalmente, sólo a las cepas que fueron DNasa positivas, se las caracterizó en función de su capacidad para coagular plasma de conejo (actividad coagulasa). Teniendo en cuenta que algunos autores describen una relación muy estrecha entre cepas DNasa positivas-Coagulasa positivas (hasta el 90%), no se vio necesario realizar la prueba coagulasa a las cepas DNasa negativas (Subramanian et al., 2017). Una vez caracterizadas las cepas en este sentido, dicha información se trasladó a la base de datos de forma que todos los individuos se catalogaron en función de ser o no portadores de cepas fermentadoras de manitol, DNasa positivas y coagulasa positivas a nivel nasal o dérmico.

De este modo, se consideró que cerca del 48% de la población fue portadora de estafilococos fermentadores de manitol en piel (20 mujeres y 14 hombres), mientras que el 42,25% de individuos lo fue a nivel de las fosas nasales (18 mujeres y 12 hombres) (Figura 13).

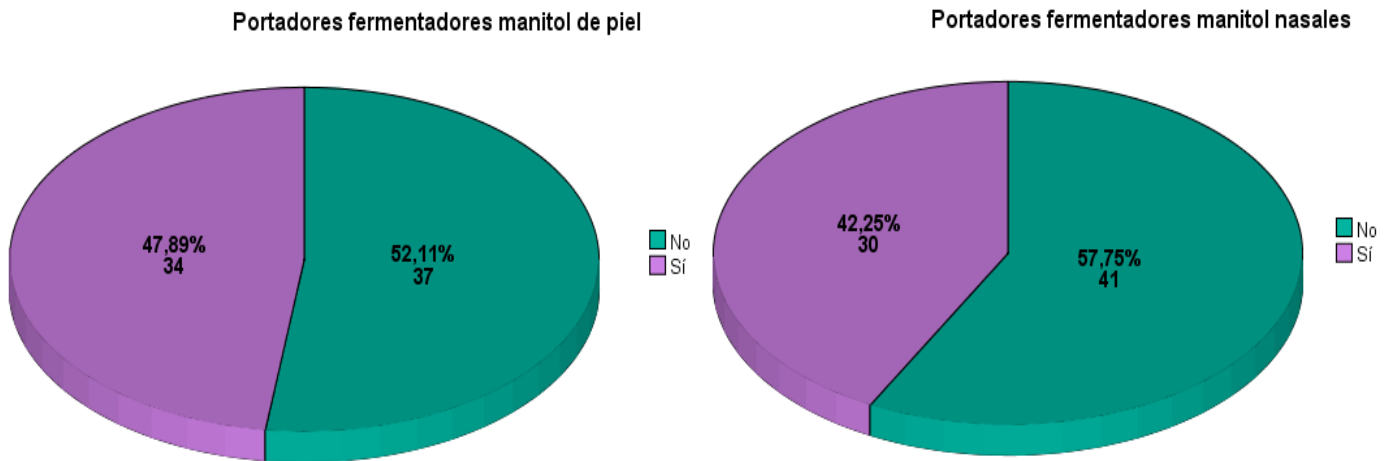


FIGURA 13. PORTADORES DE ESTAFILOCOCOS FERMENTADORES DE MANITOL DE PIEL Y NAsALES

Subramanian et al. (2017) observaron la incidencia de cepas de *S. aureus* fermentadoras de manitol en una población de estudio. Estos autores revelaron que el 81,23% de las cepas aisladas fueron manitol positivas, frente al 18,77% que fueron negativas. En este trabajo, el porcentaje de portadores de cepas fermentadoras de manitol se encuentra alrededor del 42-47%, discrepancia que puede deberse principalmente a las diferencias poblacionales, aunque no se puede descartar la influencia de los métodos de detección utilizados en cada caso.

Tras conocer qué cepas eran capaces de fermentar el manitol en medios de cultivo semiselectivos, éstas fueron caracterizadas en función de su capacidad DNasa. Con relación a la población de estudio, se detectó cerca de un 62% de portadores nasales DNasa positivos (44 individuos), aunque sólo 29 de ellos fueron posteriormente identificados como coagulasa positivos (66%). Por tanto, se puede concluir que el 40,1% de la población total fueron portadores nasales de estafilococos DNasa-Coagulasa positivos (Figura 14).

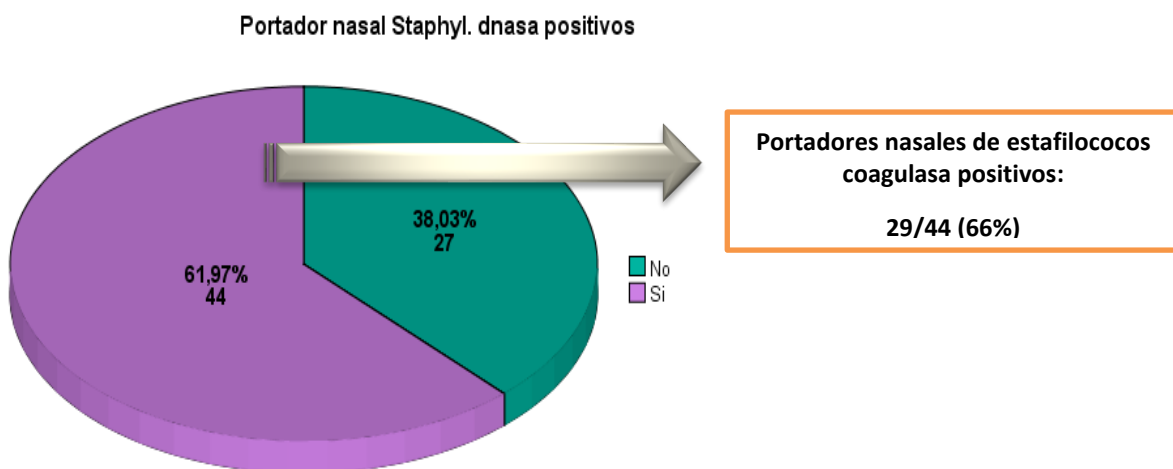
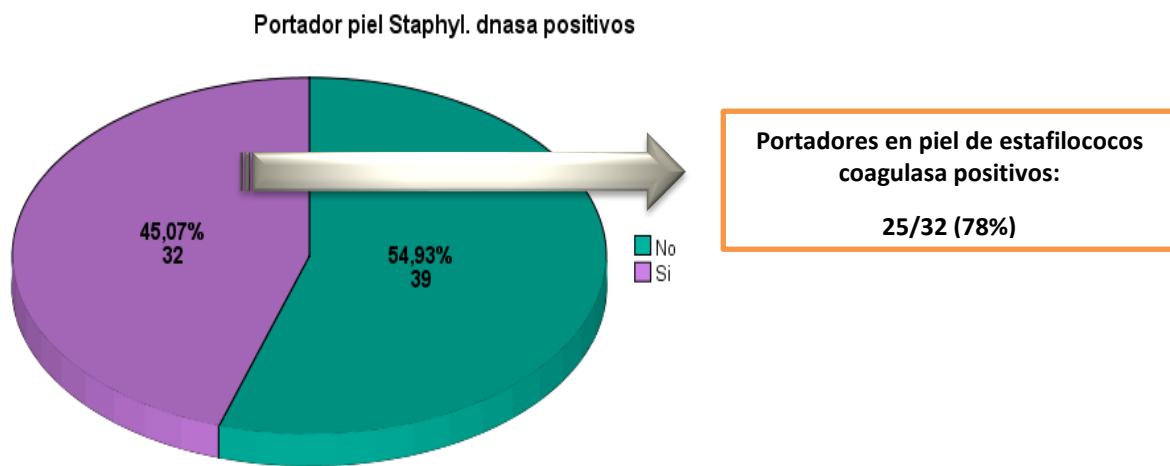


FIGURA 14. CARACTERIZACIÓN DE PORTADORES DE CEPAS NAsALES DNAsA Y COAGULAsA POSITIVAs

En el caso de las muestras procedentes de piel, los resultados revelaron la presencia de 32 individuos fermentadores de manitol (aproximadamente el 45% de la población). Entre estos individuos, 25 resultaron además tener actividad coagulasa, lo que supuso el 78% de los fermentadores de manitol. Cuando estas cifras se trasladaron a la población total, se concluyó que en torno al 35% de la población total fueron portadores dérmicos de estafilococos DNasa-Coagulasa positivos (Figura 15)



**FIGURA 15. CARACTERIZACIÓN DE PORTADORES EN PIEL DE CEPAS DNASA Y COAGULASA POSITIVAS**

Estudios recientes han puesto de manifiesto el grave problema de los falsos negativos con respecto a la detección de cepas patógenas de *S. aureus*. Este problema hace especialmente referencia a las pruebas diagnósticas aplicadas en este trabajo, es decir, fermentación de manitol, así como actividades DNasa y coagulasa. Según lo indicado por Subramanian et al. (2017), el diagnóstico de *S. aureus* teniendo en cuenta sólo la actividad coagulasa puede ser insuficiente, ya que se pueden detectar hasta el 10-15% de falsos negativos, a causa del encubrimiento del factor de aglomeración por parte de polisacáridos capsulares. Tampoco las pruebas de fermentación de manitol o actividad DNasa son concluyentes a la hora de identificar una posible cepa de *S. aureus*. Por tanto, la aplicación de un protocolo combinado parece lo más adecuado a la hora de determinar la mayor o menor patogenicidad de un aislado sospechoso procedente de muestras dérmicas o nasales, así como de incrementar la probabilidad de encontrar cepas de estafilococos resistentes a antibióticos (MRSA), tal como describen algunos autores (Mama et al., 2019).

#### **4.3 Prevalencia de portadores sanos nasales y dérmicos de estafilococos coagulasa positivos y su relación con desórdenes en los niveles de IgA en saliva**

En epidemiología, se denomina prevalencia a la proporción de individuos de un grupo o una población que presentan una característica determinada en un momento concreto. Como se ha indicado en el apartado anterior, la prevalencia de portadores de estafilococos coagulasa positivo nasales y dérmicos en la población total de estudio, ha resultado ser aproximadamente del 40% y del 35%, respectivamente.

Con objeto de establecer una posible relación entre la condición de portador de estafilococos coagulasa positivos, y padecer desórdenes en la concentración de IgA, se cuantificó dicha inmunoglobulina en saliva en todos los individuos de la población, estableciéndose una serie de rangos de concentración que fueron desde el más bajo, a concentraciones menores a 2 mg/dL, hasta el más elevado, superando los 20 mg/dL (Figura 16).

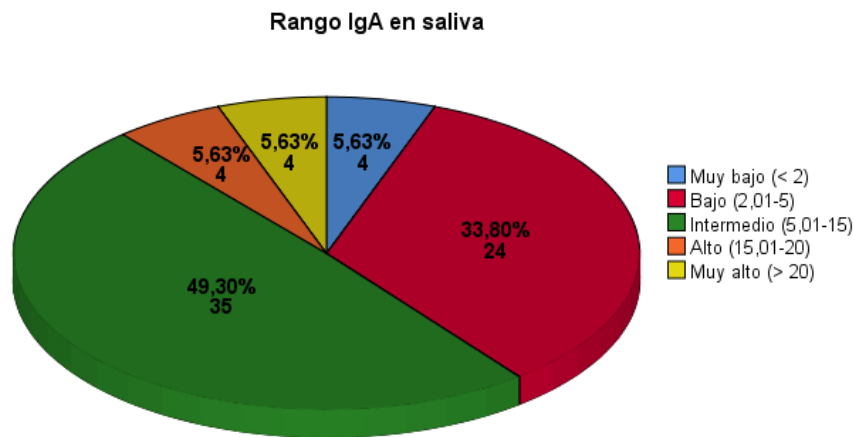


FIGURA 16. RANGO DE INMUNOGLOBULINA A EN MG/DL

A la vista del diagrama de sectores mostrado en la Figura 16, prácticamente el 50% de la población de estudio se situó en el rango intermedio de IgA en saliva (5,01-15 mg/dL), mientras que el 10% de la misma se localizó en torno a los valores más extremos, por debajo de 2 mg/dL y por encima de 20 mg/dL. Con objeto de establecer una relación entre los niveles de IgA y la condición de portador de estafilococos coagulasa positivos se realizó el análisis estadístico de los datos en el programa SPSS, de modo que se confirmó la existencia de una evidente relación significativa entre el hecho de ser portador nasal de estafilococos coagulasa positivos y la concentración de IgA en saliva ( $p < 0,05$ ; grados de libertad = 4; chi-cuadrado experimental= 9,61; ver chi-cuadrado teórica en ANEXO 2) (Figura 17).

Se pudo observar una mayor proporción de portadores nasales cuando el rango de IgA se encontró en los extremos de la distribución (Figura 17). El porcentaje de portadores de estafilococos coagulasa positivos en las categorías extremas (Muy bajo-Muy alto), fue del 60 y del 100%, respectivamente. Se observan, por tanto, dos escenarios muy diferentes. En el caso de aquellos portadores que muestran bajos niveles de IgA en saliva, la condición de portador podría darse a causa de déficit de IgA, estando estos individuos más expuestos a la entrada de este tipo de agentes patógenos. Por otro lado, teniendo en cuenta que fue condición indispensable para formar parte del estudio que los individuos de la población no estuvieran enfermos, resulta interesante el hecho de que todos los individuos pertenecientes a la categoría más alta de IgA, se hayan descrito como portadores nasales de estafilococos coagulasa positivos. En este caso, al contrario que los individuos que presentaban niveles bajos de IgA, estos sujetos muestran una barrera innata a nivel de las mucosas que podría favorecer el equilibrio entre patógeno y hospedador, convirtiendo a este último en un portador asintomático. En cualquiera de los casos, la condición de portador podría aumentar la probabilidad de padecer

infecciones de origen estafilocócico, además de convertir al individuo en un reservorio potencial de infección para individuos sensibles (Joachim et al., 2018).

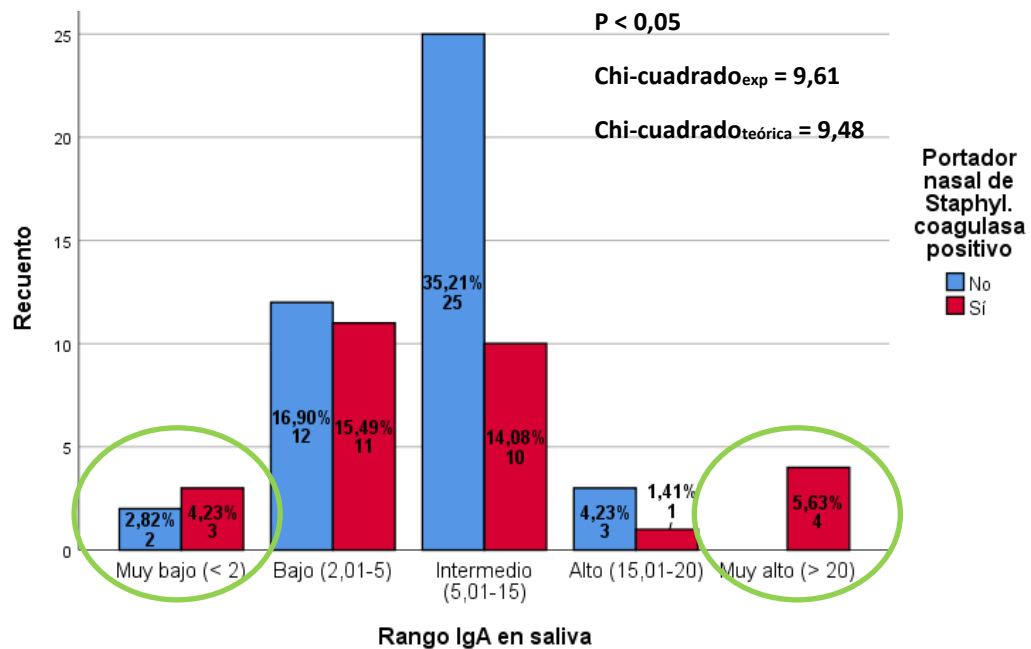


FIGURA 17. RELACIÓN ENTRE RANGO DE IGA Y PORTADOR NASAL DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS

Con objeto de establecer otras posibles interacciones significativas de interés, se analizó la relación entre la condición de ser portador nasal de estafilococos coagulasa positivos, y el hecho de haber padecido algún tipo de toxiinfección alimentaria grave (Figura 18). No se consideró en este caso el tipo concreto de toxiinfección alimentaria declarada por los sujetos de estudio, debido principalmente a la falta de detalle en la sintomatología y diagnóstico. En este caso, el análisis estadístico de los datos reveló la existencia de una relación causa-efecto entre ambas características poblacionales ( $p < 0,05$ ; grados de libertad = 1; chi-cuadrado experimental= 6,65; ver chi-cuadrado teórica en ANEXO 2).

Más del doble de los individuos que manifestaron haber padecido una intoxicación alimentaria grave resultaron ser portadores nasales de estafilococos coagulasa positivos (Figura 18). Por tanto, al igual que se ha indicado anteriormente, el hecho de ser portador crónico de estafilococos coagulasa positivos no implica que el individuo se convierta en inmune frente a un determinado patógeno. Incluso en determinados momentos, la barrera natural de estos individuos podría verse comprometida y, en consecuencia, la bacteria dejaría de ser inofensiva para el huésped desencadenando un típico proceso infeccioso.

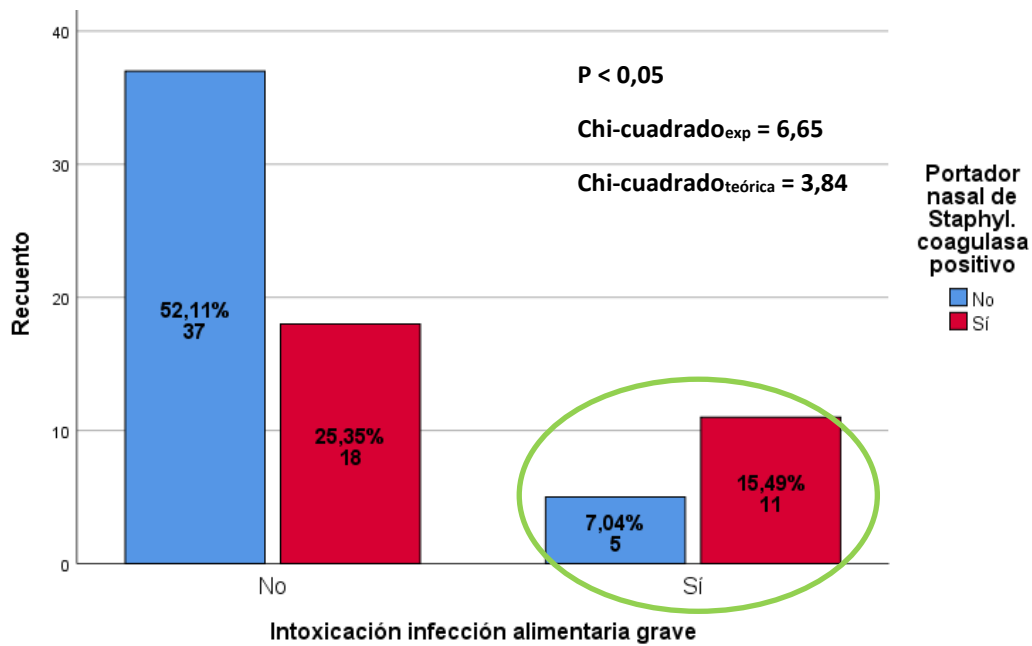


FIGURA 18. RELACIÓN ENTRE PORTADOR NASAL DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS Y HABER PADECIDO TOXIINFECCIÓN ALIMENTARIA GRAVE

#### 4.4. Búsqueda de estafilococos meticilin-resistentes (MRSA)

Las infecciones causadas por cepas de estafilococos resistentes a la meticilina (MRSA) suponen un grave problema clínico y epidemiológico que, a menudo, requiere un tratamiento con antibióticos a largo plazo (Camarena y Sánchez, 2002). Las tasas de aparición de MRSA son muy elevadas en los Estados Unidos, y sureste de Europa, pero relativamente bajas en el norte de Europa. Aunque tradicionalmente se han relacionado las cepas MRSA con la resistencia a penicilina, otros estudios muy relevantes han relacionado también a estas cepas con la aparición de resistencias frente a la oxacilina y la cefoxitina (Balhausen et al., 2014).

Para la búsqueda de cepas de estafilococos resistentes a meticilina se llevó a cabo un antibiograma a partir de todas las cepas de la colección de origen nasal y dérmico que mostraron actividad coagulasa débil, intermedia o fuerte. De un total de 213 cepas aisladas a partir de los 71 individuos de la población, sólo fueron ensayadas mediante antibiograma 56 de ellas. Los resultados de susceptibilidad/resistencia se interpretaron en función de la medida de los halos de inhibición del crecimiento de cada cepa frente a la oxacilina y la cefoxitina (Figura 19). Para cada ensayo realizado entre una cepa y un disco de antibiótico se tomaron dos medidas de halo de inhibición. Los puntos de corte empleados en la interpretación de la sensibilidad fueron los indicados por Anand et al. (2009).

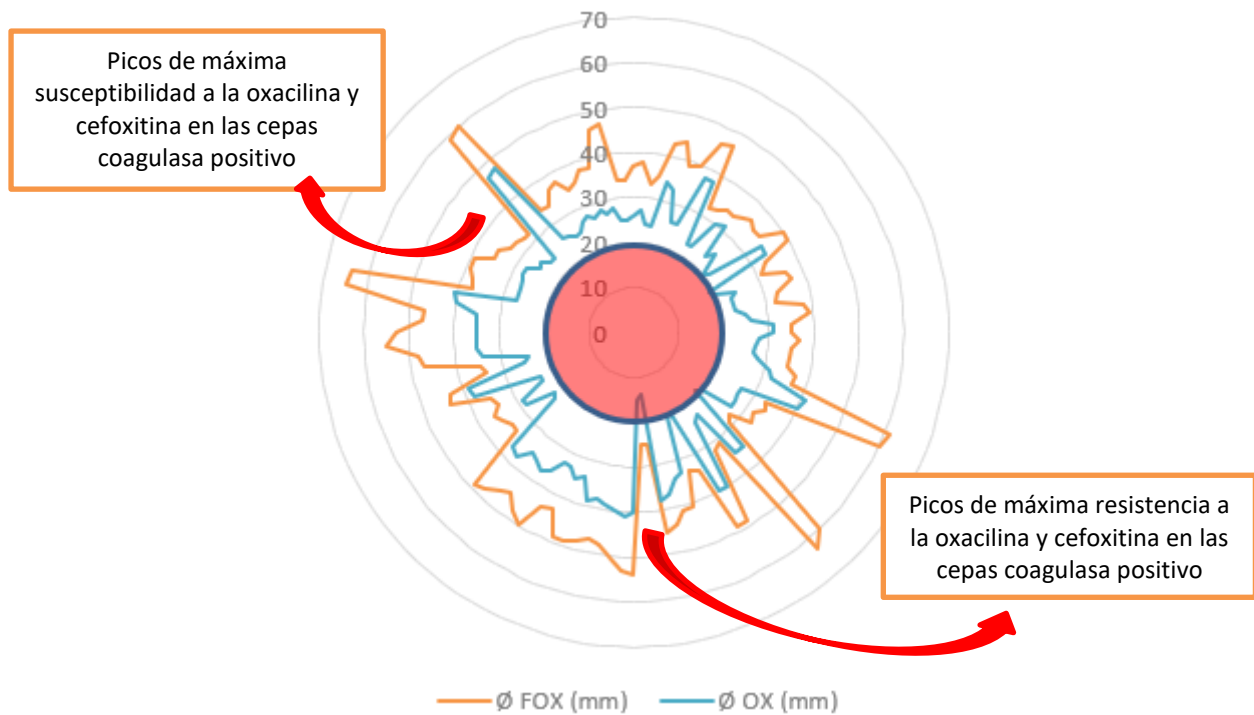


FIGURA 19. DISTRIBUCIÓN HALOS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (MM) FRENTE A CADA UNO DE LOS ANTIBIÓTICOS ENSAYADOS.

En la Figura 19 se muestra un gráfico circular en el que la línea naranja representa el perfil de susceptibilidad/resistencia de todas las cepas ensayadas frente al antibiótico cefoxitina (FOX), mientras que la línea azul representa el de la oxacilina (OX). Estas líneas representan la distribución de los halos de inhibición, en milímetros, observados tras realizar el antibiograma. En el centro de la Figura 19 se ha señalado una zona de color rojo, que correspondería a la zona de máxima resistencia. Algunos autores consideran que una cepa es resistente a la cefoxitina cuando el diámetro del halo es menor de 20 mm, mientras que para la oxacilina el límite descrito está en torno a 13 mm (Anand et al., 2009).

Los diámetros de inhibición de la cefoxitina han llegado a superar en algunos casos los 60 mm de diámetro, mientras que la oxacilina muestra valores máximos en torno a 40 mm. En la Figura 19 los perfiles del antibiograma descritos para cada antibiótico parecen ser paralelos, de hecho, en algunos casos coinciden en una misma cepa los picos de mayor susceptibilidad o resistencia (puntos en color rojo). Aunque hay cepas que están cerca de la zona de riesgo, ninguna de ellas ha mostrado una clara resistencia frente a los dos antibióticos ensayados.

Hay que destacar que el uso de cefoxitina prevalece sobre la oxacilina cuando se buscan resistencias mediadas por el gen *mecA*. Además, la cefoxitina no presenta problemas de estabilidad en su conservación (Ardanuy et al., 2011).

En la Tabla 3, se muestra un resumen de los estadísticos descriptivos relacionados con el antibiograma realizado a la subcolección de cepas coagulasa positivo. Se indican en este caso los valores medios, desviación y coeficiente de variación de los datos, valores mínimos y máximos de los halos detectados



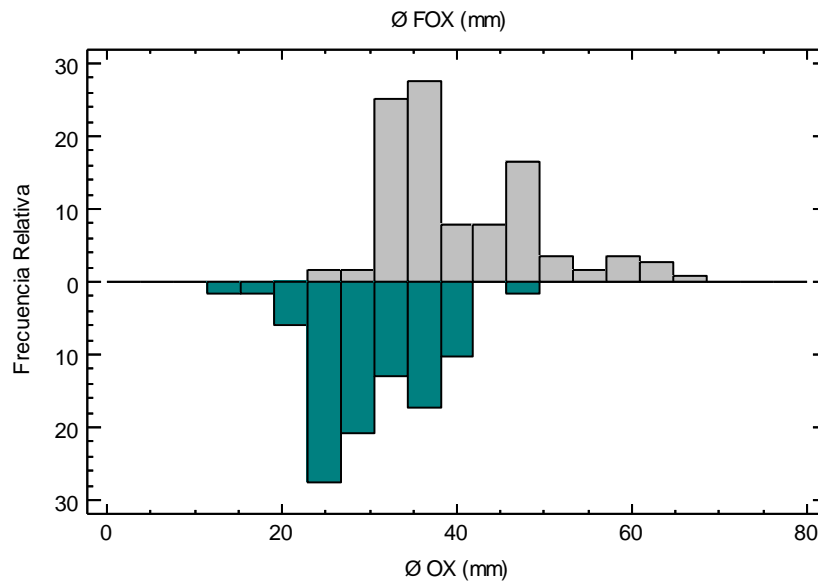
frente a cada antibiótico, así como el coeficiente de curtosis, que hace referencia a la mayor o menor simetría de los datos con respecto a la media.

	$\varnothing$ FOX (mm)	$\varnothing$ OX (mm)
Recuento	116	116
Promedio	40,40	29,69
Desviación Estándar	8,65	6,82
Coefficiente de Variación	21,40%	22,97%
Mínimo	25,0	14,0
Máximo	65,0	48,0
Rango	40,0	34,0
Curtosis Estandarizada	0,94	-1,09

**TABLA 3. RESUMEN DE ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS PARA LOS RESULTADOS DEL ANTIBIOGRAMA**

El diámetro medio de los halos observados frente a la cefoxitina (FOX) se encuentra en torno a 40 mm y la oxacilina en 29,69 mm. También se aprecia que la desviación estándar en la cefoxitina es mayor, mientras que, en el caso de la oxacilina, el valor promedio no superó los 30 mm. La dispersión de los resultados en ambos casos fue muy similar, observándose un coeficiente de variación en torno al 21-22%. Hay que indicar que la curtosis estandarizada se puede utilizar para comparar si las muestras provienen de distribuciones normales. Miden la mayor o menor concentración de datos alrededor de la media. Si este coeficiente es nulo, la distribución se dice normal (similar a la distribución normal de Gauss) y recibe el nombre de mesocúrtica. Si el coeficiente es positivo, la distribución se llama leptocúrtica, más puntiaguda que la anterior. Hay una mayor concentración de los datos en torno a la media. Si el coeficiente es negativo, la distribución se llama platicúrtica y hay una menor concentración de datos en torno a la media. Sería más achatada que la primera. Valores de estos estadísticos fuera del rango de -2 a +2 indican desviaciones significativas de la normalidad, lo que tendería a invalidar las pruebas que comparan las desviaciones estándar. En este caso, ambas tienen los datos de curtosis estandarizada se encuentran dentro del rango indicado, aunque en el caso de la cefoxitina la distribución fue leptocúrtica, mientras que en el caso de la oxacilina fue platicúrtica (Tabla 3).

La distribución de los datos se ha representado mediante un gráfico de frecuencias relativas, de forma que se puede observar cómo la gráfica de distribución de frecuencias para la cefoxitina (FOX) muestra una ligera asimetría positiva (cola a la derecha del gráfico), mientras que en el caso de la oxacilina (OX) se observa una ligera asimetría negativa (cola a la izquierda del gráfico). A la vista de los resultados indicados en el gráfico de distribución, podría intuirse que en general las cepas son más sensibles a la cefoxitina (cefalosporina de 2ª generación) mientras que parecen ser más resistentes a la oxacilina (Figura 20).



**FIGURA 20. DISTRIBUCIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ANTIBIOGRAMA MEDIANTE UN HISTOGRAMA DE FRECUENCIAS RELATIVAS**

Con objeto de analizar la posible influencia de los factores “Individuo”, “Procedencia”, “Coagulasa”, “Cepa” y “Repetición” sobre la mayor o menor amplitud de los halos de inhibición se llevó a cabo un análisis de varianza multifactorial (ANOVA) y un test de mínima diferencia significativa (LSD test) a un intervalo de confianza del 95%. El factor “Individuo” indica la procedencia de la cepa según el sujeto de estudio. La “Procedencia” se refiere al origen de la cepa (nasal o dérmico). El factor “Cepa” se refiere a cada una de las cepas que se sometieron al antibiograma. El factor “Coagulasa” se refiere a la capacidad de las cepas ensayadas para producir la coagulación del suero de forma débil, moderada o fuerte. Por último, analizando la influencia del factor “Repetición” se trató de confirmar que los resultados eran repetitivos para cada cepa.

Con la realización del test ANOVA se trató de determinar qué factores tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre la medida de los halos de inhibición del crecimiento frente a cefoxitina (FOX) y oxacilina (OX). El valor de P en la tabla ANOVA permite identificar los factores que fueron estadísticamente significativos ( $P < 0,05$ ). Por último, para cada factor significativo, el test de Rangos Múltiples (test LSD) indica qué medias fueron significativamente diferentes de otras, entre los niveles de una misma variable.

Para cada una de las variables de estudio ( $\varnothing$  FOX y  $\varnothing$  OX) se mostrará a continuación una tabla ANOVA, que revelará en cada caso que factores influyeron de forma significativa, así como los gráficos derivados del test de rangos múltiples, que confirmarán las posibles diferencias entre grupos de homogeneidad.

En la Tabla 4 se muestra el análisis de varianza multifactorial ANOVA para la variable diámetro de halo de inhibición frente al antibiótico cefoxitina ( $\varnothing$  FOX):

EFFECTOS PRINCIPALES	VALOR-P (< 0,05)
INDIVIDUO	0,00
PROCEDENCIA	0,75
COAGULASA	0,00
CEPA	0,00
REPETICIÓN	0,73

TABLA 4. ANÁLISIS ANOVA MULTIFACTORIAL PARA LA VARIABLE Ø FOX (MM)

Para llevar a cabo este análisis el programa ha realizado una descomposición de la variabilidad del diámetro de los halos de la cefoxitina en contribuciones debidas a varios factores. Los valores de P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. En este caso, quedó patente la influencia de los factores “Individuo”, “Coagulasa” y “Cepa” sobre la medida de los halos de inhibición del crecimiento frente a los discos de cefoxitina, con un 95% de nivel de confianza. Por el contrario, no se observó influencia significativa de los factores “Procedencia” y “Repetición” sobre dicha variable (P > 0,05).

En la Figura 21 se puede ver la representación del test de mínima diferencia significativa (test LSD) para la variable Ø FOX en función del factor “Individuo”. En dicha Figura se pone de manifiesto la existencia de individuos que podrían catalogarse como más o menos sensibles al efecto de la cefoxitina.

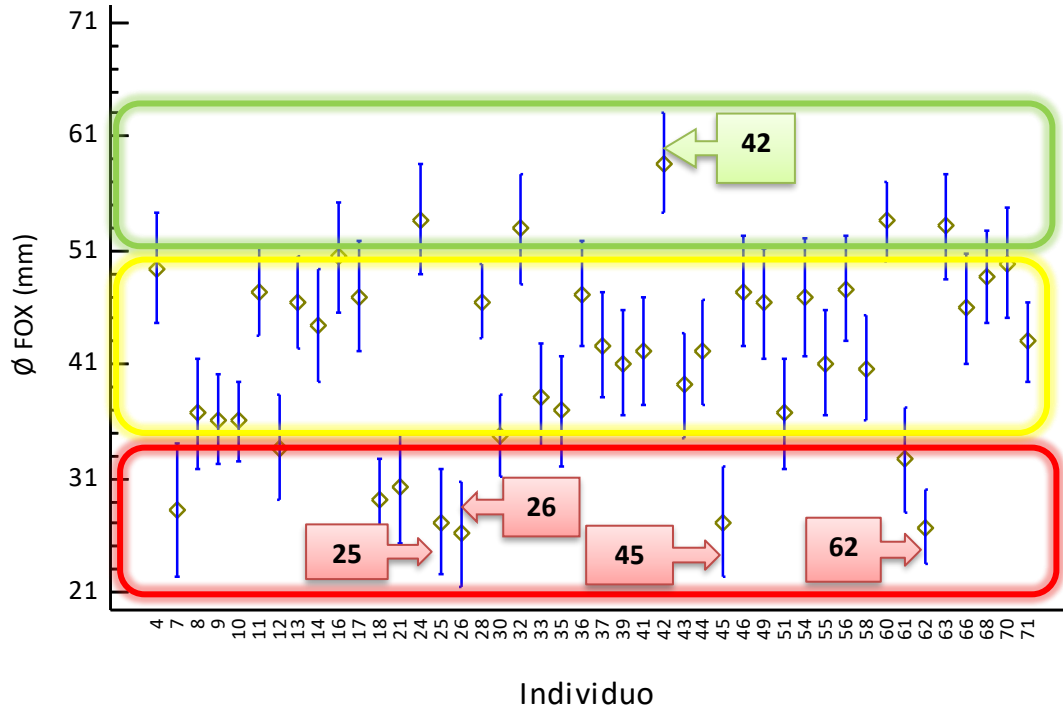


FIGURA 21. REPRESENTACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL FACTOR INDIVIDUO FRENTE A Ø FOX (TEST DE MÍNIMA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA)

Así, todos aquellos localizados dentro de recuadro rojo podrían considerarse más resistentes que aquellos localizados en el recuadro verde, los cuales muestran las medidas de halos de inhibición mayores en el antibiograma. Aun detectándose múltiples solapamientos entre individuos, cabe destacar la mayor susceptibilidad del individuo 42, frente a la de los individuos 25, 26, 45 y 62, que mostraron una mayor resistencia a la cefoxitina (Figura 21).

En la Figura 22 se muestra el análisis de la mínima diferencia significativa para la variable  $\varnothing$  FOX en función del factor "Cepa". Las cepas rodeadas en color rojo (28-MSPIEL-1 y 35-MSNASAL-1) se consideraron como las más resistentes a la cefoxitina en comparación con el resto. Las cepas rodeadas en verde fueron las más susceptibles (24-MSNASAL-1, 28-MSPIEL-2, 60-MSNASAL-1 y 63-MSPIEL-2). En este caso, además, se pudo determinar la procedencia de las cepas más interesantes desde un punto de vista clínico (individuos 28 y 35). Algunos trabajos definen el límite entre resistencia y sensibilidad de una cepa a la cefoxitina en torno a 21 mm de halo de inhibición (Ardanuy et al., 2011). Aunque en este caso, no se puede considerar que ninguna de las cepas ensayadas sea estrictamente resistente, sí se pone de manifiesto la cercanía de al menos dos de ellas a los valores considerados de riesgo.

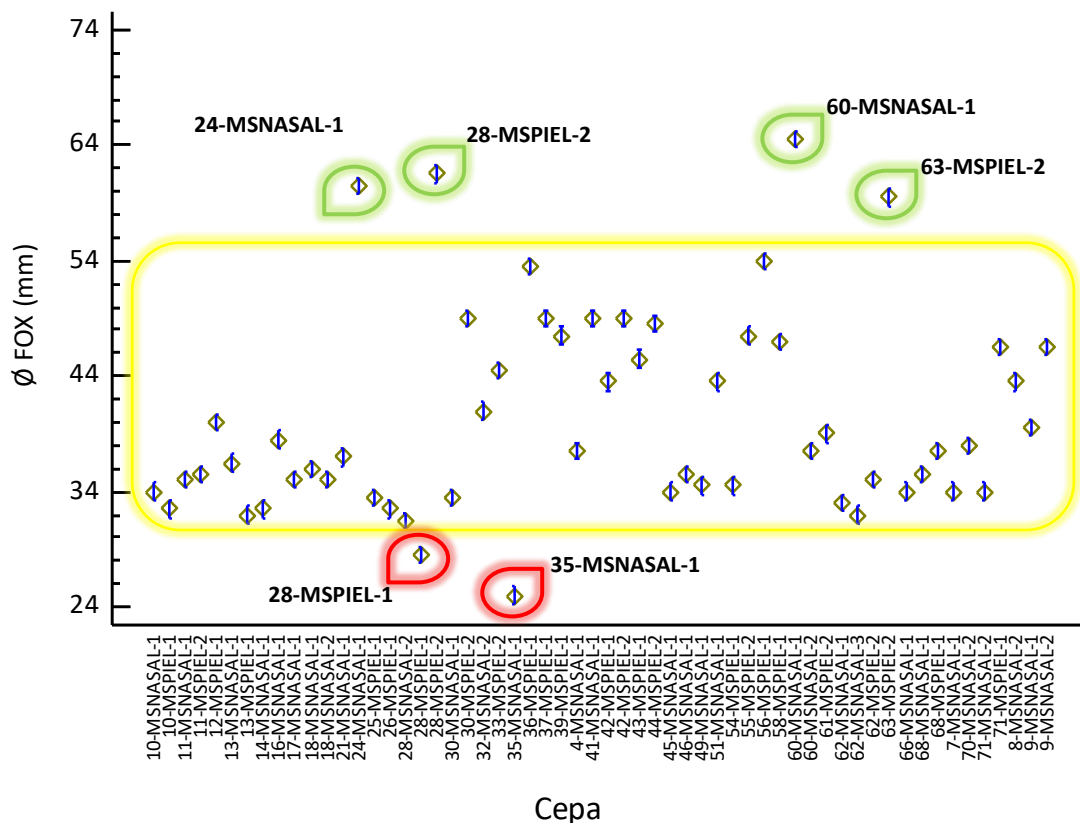


FIGURA 22. REPRESENTACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL FACTOR CEPA FRENTE A  $\varnothing$  FOX (TEST DE MÍNIMA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA)

Cabe destacar la mayor dispersión de los resultados en la Figura 21, lo que puede explicarse por el hecho de que en un mismo individuo se pudieron aislar diferentes cepas, que mostraron sensibilidades diferentes a la cefoxitina.

Con respecto al factor “Coagulasa”, en la Figura 23 se pone de manifiesto la clara influencia del mismo sobre la variable  $\emptyset$  FOX. Así, mediante el test de la mínima diferencia significativa pudieron detectarse dos grupos de homogeneidad diferentes siendo el correspondiente al de la actividad “coagulasa fuerte” el que mostró los resultados de mayor resistencia en el antibiograma frente a cefoxitina. Este hecho podría justificar el mayor interés de las cepas de estafilococos coagulasa positivas en el desarrollo de resistencias frente a este tipo de antibióticos. Adicionalmente, una mayor actividad coagulasa puede ser indicativo de una mayor patogenicidad de la cepa.

En esta figura no se observó solapamiento entre la categoría “coagulasa fuerte” con el resto de las categorías, mientras que los datos correspondientes a la actividad “coagulasa débil y media” no fueron significativamente diferentes entre ellos.

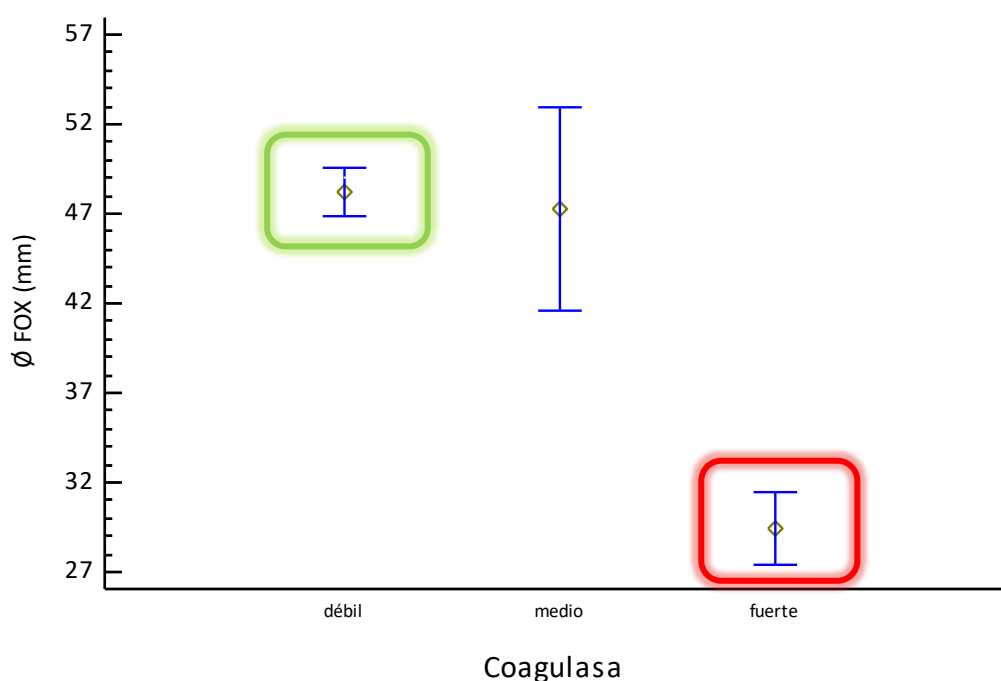


FIGURA 23. REPRESENTACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL FACTOR COAGULASA FRENTE A  $\emptyset$  FOX (TEST DE MÍNIMA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA)

Siguiendo el mismo protocolo de interpretación y discusión de los resultados del antibiograma para la cefoxitina, se muestra a continuación, el análisis de la varianza multifactorial (ANOVA) para la variable  $\emptyset$  OX en función de los factores “Individuo”, “Procedencia”, “Coagulasa”, “Cepa” y “Repetición” (Tabla 5).

EFEKTOS PRINCIPALES	VALOR-P (< 0,05)
INDIVIDUO	0,00
PROCEDENCIA	0,61
COAGULASA	0,00
CEPA	0,00
REPETICIÓN	0,71

TABLA 5. ANÁLISIS ANOVA MULTIFACTORIAL PARA LA VARIABLE  $\emptyset$  OX (MM)

Al igual que en el caso de la variable  $\emptyset$  OX, destacó la influencia de los factores “Individuo”, “Coagulasa” y “Cepa” sobre la medida de los halos de inhibición del crecimiento frente a los discos de oxacilina, con un 95% de nivel de confianza (Tabla 5). De nuevo, los factores “Procedencia” y “Repetición” no influyeron significativamente sobre la variabilidad de variable ( $P > 0,05$ ).

En la Figura 24 se representa el test de mínima diferencia significativa (test LSD) para la variable  $\emptyset$  OX en función del factor “Individuo”. En dicha Figura se pone de manifiesto la existencia de individuos que son más o menos sensibles al efecto de la cefoxitina. Destacan en este caso dos individuos (63 y 35), que se salen de la zona considerada de respuesta normal (recuadro amarillo). En el recuadro verde se incluye el individuo 63, considerado como el más sensible a la oxacilina, mientras que en recuadro rojo (zona de resistencia) destaca el 35, aunque solapa estadísticamente con otros individuos que también podrían considerarse más resistentes que el resto (el 7 y el 35).

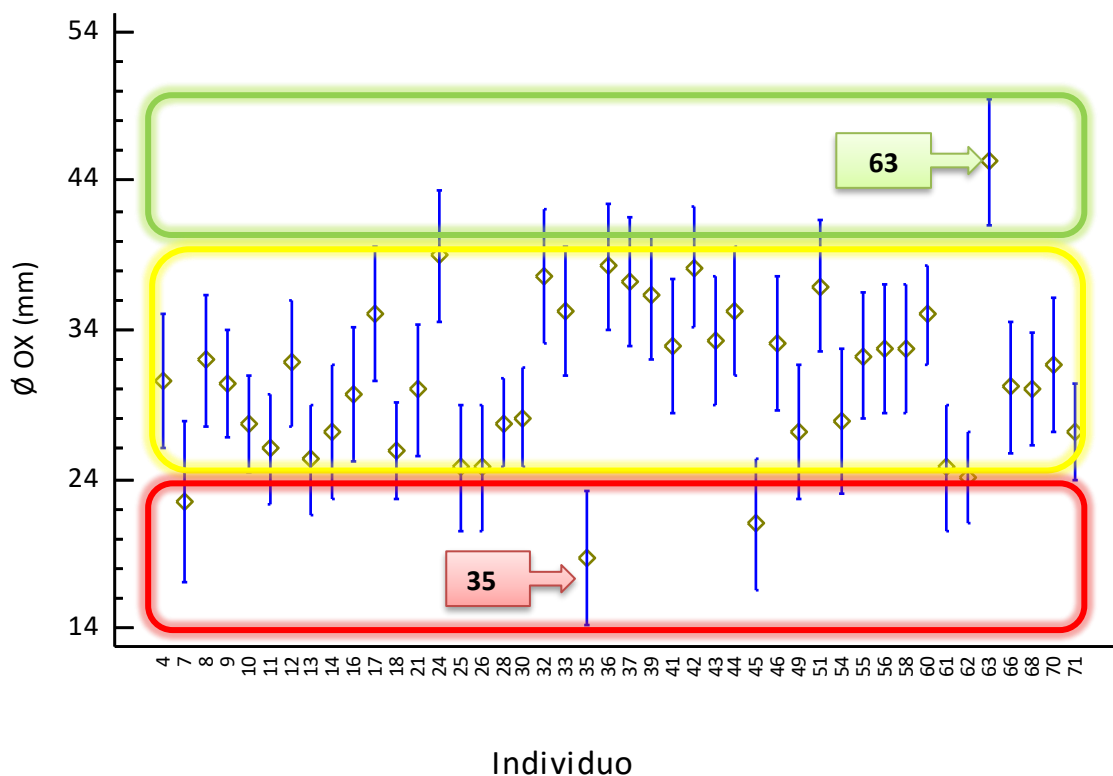


FIGURA 24. REPRESENTACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL FACTOR INDIVIDUO FRENTE A  $\emptyset$  OX (TEST DE MÍNIMA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA)

En la Figura 25, se observa también una enorme diversidad en lo que se refiere a la susceptibilidad de las cepas frente a la oxacilina. En términos generales, la colección de cepas ensayada se concentra en torno a 17 y 41 mm de halo de inhibición frente a la oxacilina (recuadro amarillo). Sólo dos cepas destacaron en cuanto al resto: la que presentó más sensibilidad fue la cepa 63-MSPIEL-2, mientras que la más resistente fue la 35-MSNASAL-1. En este caso, se detectaron sendas coincidencias en los antibiogramas realizados para los dos antibióticos de elección.

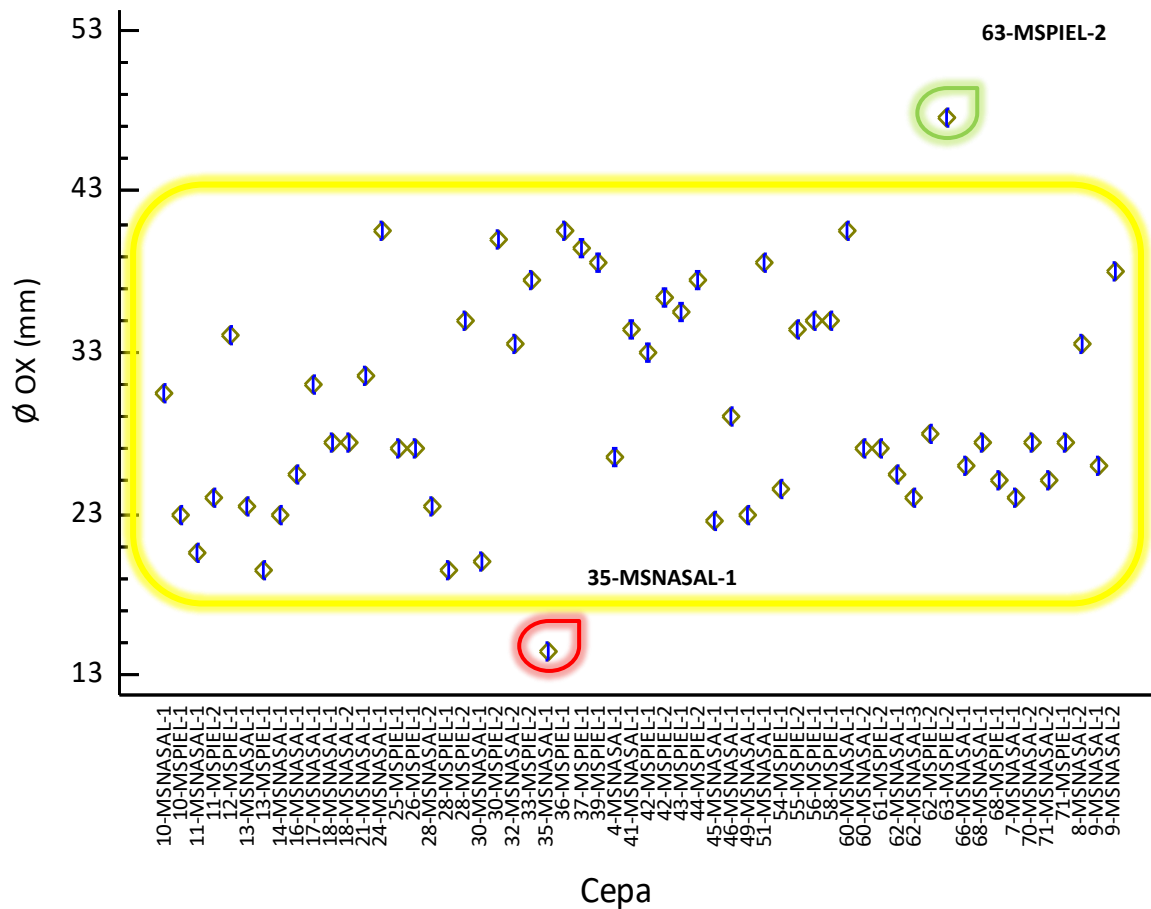


FIGURA 25. REPRESENTACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL FACTOR INDIVIDUO FRENTE A Ø OX (TEST DE MÍNIMA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA)

Por último, en la Figura 26, se pone de manifiesto la influencia significativa del factor “Coagulasa” con relación a la variable Ø OX. Al igual que en el caso de la cefoxitina, el grupo de cepas que mostraron una actividad coagulasa más fuerte se reveló como el grupo más resistente al efecto de la oxacilina (Figura 25). El límite entre resistencia y sensibilidad de una cepa a la cefoxitina se establece en torno a 10 mm de halo de inhibición (Ardanuy et al., 2011). En este caso, no se puede considerar que ninguna de las cepas ensayadas sea estrictamente resistente, aunque es evidente que la cepa 35-MSNASAL-1 se encuentra cercana al límite de lo considerado como resistente.

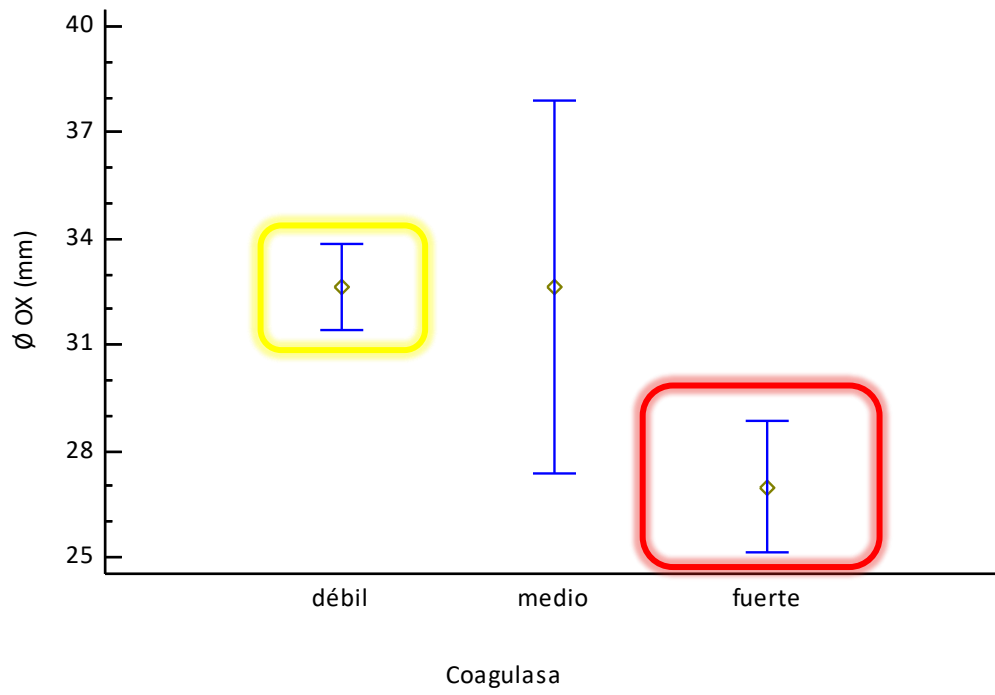


FIGURA 26. REPRESENTACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL FACTOR COAGULASA FRENTE A Ø OX (TEST DE MÍNIMA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA)



## 5. CONCLUSIONES

Tras el anterior análisis de resultados se alcanzaron las siguientes conclusiones:

- i- El protocolo de muestreo y análisis de resultados llevado a cabo en este trabajo puso de manifiesto la existencia de individuos portadores sanos, nasales y dérmicos, de estafilococos coagulasa positivos.
- ii- La condición de portador nasal de estafilococos coagulasa positivos estuvo estrechamente vinculada con la detección de anomalías inmunológicas en la IgA de muestras de saliva, entendiéndose por “anomalía” los valores extremos de concentración que se encuentran fuera del rango considerado como normal para dicha IgA (5-20 mg/dl).
- iii- A pesar de no haberse detectado cepas estrictamente resistentes a los antibióticos cefoxitina y oxacilina, el análisis de la población de estudio reveló la existencia de individuos “atípicos” por presentar un mayor grado de resistencia o sensibilidad a los antibióticos seleccionados, lo que hace sospechar que podría existir una importante influencia endógena en el desarrollo de resistencias frente a estos antibióticos.
- iv- La capacidad de determinadas cepas para coagular el fibrinógeno (actividad coagulasa) se relacionó de forma significativa con una mayor resistencia a los antibióticos cefoxitina y oxacilina, mientras que la procedencia nasal o dérmica de las mismas no pareció influir en el desarrollo de tales resistencias.
- v- Para asegurar la detección de cepas de estafilococos meticilin-resistentes (MRSA), y teniendo en cuenta la variabilidad fenotípica de las cepas de *Staphylococcus* spp. (especialmente *S. aureus*), puede ser adecuado aplicar un protocolo de diagnóstico que combine la detección de las actividades DNasa y coagulasa, de forma previa al antibiograma.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Adegbola, R., De Antonio, R., Hill, P., Roca, A., Usuf, E., Hoet, B. y Greenwood, B. (2014). Carriage of *Streptococcus pneumoniae* and other respiratory bacterial pathogens in low and lower-middle income countries: A systematic review and meta-analysis. PLoS ONE 9(8), e103293.

Álvarez-Lam, I. y Ponce-Bittar, J. (2012). *Staphylococcus aureus*, evolución de un viejo patógeno. Revista Cubana de Pediatría 84(4), 383-391.

Anand, K. B., Agrawal, P., Kumar, S. y Kapila, K. (2009). Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA. Indian Journal of Medical Microbiology 27(1), 27-29.

Ardanuy, C., Cercenado, E., Morosini, M. I. y Torres, C. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gram positivos. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 41 pp.

Balci, D. D., Duran, N., Ozer, B., Gunesacar, R., Onlen, Y. y Yenin, J. Z. (2009). High prevalence of *Staphylococcus aureus* cultivation and superantigen production in patients with psoriasis. European Journal of Dermatology 19(3), 238-242.

Ballhausen, B., Kriegeskorte, A., Schleimer, N., Peters, G. y Becker, K. (2014). The *mecA* homolog *mecC* confers resistance against  $\beta$ -lactams in *Staphylococcus aureus* irrespective of the genetic strain background. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 58(7), 3791-3798.

Barrios, M. (2012). Características epidemiológicas, clínicas y microbiológicas de las infecciones por *Staphylococcus aureus* adquirido en la comunidad en pediatría. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid.

Brizzio, A. A. (2009). Aplicación de una reacción de PCR–multiplex para la identificación de cepas de *Staphylococcus aureus* toxigénicas. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de San Martín, Argentina.

Camarena J. y Sánchez R. (2002). Infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Control de Calidad SEIMC. Departamento de Microbiología. Hospital Universitario Doctor Peset. Valencia, España. 5 pp.

Cervantes-García, E., García-González, R. y Salazar-Schettino, P. M. (2014). General characteristics of *Staphylococcus aureus*. Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio 61(1), 28-40.

Chen, C. J., Hsu, K. H., Lin, T. Y., Hwang, K. P., Chen, P. Y. y Huang, Y. C. (2011). Factors associated with nasal colonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among healthy children in Taiwan. Journal of Clinical Microbiology 49(1), 131-137.

Crossley, K. B., Jefferson, K. K., Archer, G. y Foulter, V.G. (2009). Staphylococci in human disease (2ª Ed.). Wiley-Blackwell, Chichester, UK. 623 pp.

Cuevas, O., Cercenado, E., Vindel, A., Guinea, J., Sánchez-Conde, M., Sánchez-Somolinos, M. y Bouza, E. (2004). Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: five

nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(11), 4240-4245.

Datta, R. y Huang, S. S. (2008). Risk of infection and death due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in long-term carriers. *Clinical Infectious Diseases* 47(2), 176-181.

Duraisingham, S. S, Manson, A., Grigoriadou, S., Buckland, M., Tong, C. Y. W. y Longhurst, H. J (2015). Inmunodeficiencia: cambio de espectro de patógenos. *Inmunología Clínica y Experimental* 181 (2), 267-274.

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). (2017). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. *EFSA Journal* 15(2). 212 pp.

Eposito, S., Prada, E., Lelii, M. y Castellazzi, L. (2015). Immunization of children with secondary immunodeficiency. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* 11(11), 2564-2570.

Fritz, S. A., Garbutt, J., Elward, A. M., Shannon, M. W. y Storch, G. A. (2008). Prevalencia y factores de riesgo de colonización por *Staphylococcus aureus* resistente y sensible a meticilina adquirido en la comunidad en niños visitados en una consulta de pediatría afiliada a una red de investigación basada en consultorios. *Pediatrics* 65(6), 291-299.

García-Álvarez, M., Holden, M. T., Lindsay, H., Webb, C. R., Brown, D. F., Curran, M.D., Walpole, E., Brooks, K., Pickard, D. J., Teale, C., Parkhill, J., Bentley, S. D., Edwards, G. F., Girvan, E. K., Kearns, A. M., Pichon, B., Hill, R. L., Larsen, A. R., Skov, R. L., Peacock, S. J., Maskell, D. J. y Holmes, M. A. (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA*. *Lancet Infectious Diseases* 11(8), 595-603.

Gil, M. (2000). *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. *Revista Chilena de Infectología* 17, 145-152.

Girbés, M. T. y Cerdá, R. F. D. (2004). Deficiencia de IgA. *Revista Española de Pediatría* 60(5), 339-347.

González, M. L., Hernández, N., Apaulaza, K., Díaz, M. y Cordero, A. (2016). Portadores asintomáticos nasal y faríngeo de *Staphylococcus aureus* en trabajadores de un hospital pediátrico. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río* 20(3), 23-29.

Hanson, B. M., Dressler, A. E., Harper, A. L., Scheibel, R. P., Wardyn, S. E., Roberts, L. K. y Smith, T. C. (2011). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on retail meat in Iowa. *Journal of Infection and Public Health* 4(4), 169-174.

Hernández, I. T., Toraño Peraza, G. T., González, M. y González Bonet, I. (2003). *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina: detección de portadores entre niños hospitalizados y niños sanos de la comunidad. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 55(3), 153-161.

Joachim, A., Moyo, S. J., Nkinda, L., Majigo, M., Rugarabamu, S., Mkachabani, E. G., Mmbaga, E. J., Mbembati, N., Aboud, S. y Lyamuya, E. F. (2018). Nasal carriage of methicillin-resistant

*Staphylococcus aureus* among health care workers in tertiary and regional hospitals in Dar es Salam, Tanzania. International Journal of Microbiology ID 5058390, 7 pp.

Lankisch, P., Schiffner, J., Ghosh, S., Babor, F., Borkhardt, A. y Laws, H. J. (2015). The Duesseldorf warning signs for primary immunodeficiency: "Is it time to change the rules?". Journal of Clinical Immunology 35(3), 273-279.

Leibovici, L., Schønheyder, H., Pitlik, S. D., Samra, Z. y Møller, J. K. (2000). Bacteraemia caused by hospital-type microorganisms during hospital stay. Journal of Hospital Infection 44(1), 31-36.

Lo, W. T., Lin, W. J., Tseng, M. H., Wang, S. R., Chu, M. L. y Wang, C. C. (2008). Risk factors and molecular analysis of panton-valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in healthy children. The Pediatric Infectious Disease Journal 27(8), 713-718.

Mama, O. M., Ruiz-Ripa, L., Fernández-Fernández, R., González-Barrio, D., Ruiz-Fons, J. F. y Torres, C. (2019). High frequency of coagulase-positive staphylococci carriage in healthy wild boar with detection of MRSA of lineage ST398-t011. FEMS Microbiology Letters 366(4), fny292.

Mediaceja, V. L. W., Motas, I. M., Páez, Y. F., Hernández, M. J. V. y Pérez, L. I. (2014). Colonización de bacterias potencialmente patógenas en la faringe de adultos sanos y factores de riesgos asociados. Panorama. Cuba y Salud 7(1), 24-30.

Neyra, R. C., Frisancho, J. A., Rinsky, J. L., Resnick, C., Carroll, K. C., Rule, A. M. y Silbergeld, E. K. (2014). Multidrug-resistant and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hog slaughter and processing plant workers and their community in North Carolina (USA). Environmental Health Perspectives 122(5), 471-477.

Omwenga, I., Aboje, G. O., Mitema, E. S., Obiero, G., Ngaywa, C., Ngwili, N. 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.

Parlet, C. P., Brown, M. M. y Horswill, A. R. (2019). Commensal Staphylococci Influence *Staphylococcus aureus* Skin Colonization and Disease. Trends in Microbiology 25(6), 497-507.

Pupo-Rodríguez, O. L., Bello-Rodríguez, M. M. y Reyes-Reyes, E. (2016). Estudio inmunológico en pacientes con dermatitis atópica e infección en piel por *Staphylococcus aureus*. Revista Electrónica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta 41(7), 9 pp.

Rodríguez-Noriega, E., León-Garnica, G., Petersen-Morfin, S., Pérez-Gómez, H. R., González-Díaz, E. y Morfin-Otero, R. (2014). La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. Biomédica 34(1), 181-190.

Subramanian, A., Chitalia, V. K., Bangera, K., Vaidya, S. P., Warke, R., Chowdhary, A. y Deshmukh, R. A. (2017). Evaluation of HiaureusTM Coagulase Confirmation Kit in identification of *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical and Diagnostic Research 11(2), 8-13.

Swenson, J. M., Tenover, F. C. y "Cefoxitin Disk Study Group". (2005). Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. Journal of Clinical Microbiology 43(8), 3818-3823.

Torres-Escobar, I. (2014). Estudio de la resistencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA) e identificación del gen *mecA* por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real empleando el equipo: GeneXpert Cepheid. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma del Estado de México.

Totté, J. E. E., Van der Feltz, W. T., Bode, L. G. M., van Belkum, A., Van Zuuren, E. J. y Pasmans, S. G. M. A. (2016a). A systematic review and meta-analysis on *Staphylococcus aureus* carriage in psoriasis, acne and rosacea. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 35(7), 1069-1077.

Totté, J. E. E., Van Der Feltz, W. T., Hennekam, M., van Belkum, A., Van Zuuren, E. J. y Pasmans, S. G. M. A. (2016b). Prevalence and odds of *Staphylococcus aureus* carriage in atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis. *British Journal of Dermatology* 175(4), 687-695.

Zendejas-Manzo, G. S., Avalos-Flores, H. y Soto-Padilla, M. Y. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica* 25(3), 129-143.

**ANEXO 1. Vista general de la organización de los datos de la población de estudio en el programa estadístico SPSS**

Tipo de problema en la piel	Frecuencia problemas desórdenes digestivos	Intoxicación infección alimentaria grave	En caso infección alérgica mentaria especificar	Portador nasal de estafilococos DNAsa positivos	Portador nasal de estafilococos coagulasa positivo	Portador piel de estafilococos DNAsa positivos	Portador piel de estafilococos coagulasa positivo	Rango IgA en saliva
Piel atópica	1-2 veces/año	No	No procede	No	No	No	Si	Muy bajo (< 2)
Ninguno	1-2 veces/año	No	No procede	No	No	Si	Si	Intermedio (5,0...)
Ninguno	1-2 veces/año	Si	No sabe	No	No	No	Si	Bajo (2,01-5)
Ninguno	Nunca	No	No procede	Si	Si	No	Si	Bajo (2,01-5)
Piel atópica	1-2 veces/año	No	No procede	Si	Si	Si	Si	Intermedio (5,0...)
Ninguno	1-2 veces/año	No	No procede	No	No	No	Si	Intermedio (5,0...)
Ninguno	>4 veces/año	Si	No sabe	Si	Si	Si	Si	Bajo (2,01-5)
Ninguno	Nunca	No	No procede	No	Si	No	No	Muy alto (> 20)
Ninguno	Nunca	Si	No sabe	Si	Si	Si	No	Intermedio (5,0...)
Ninguno	Nunca	Si	Otras	Si	Si	Si	Si	Bajo (2,01-5)
Ninguno	Nunca	Si	Salmonella	Si	Si	Si	Si	Bajo (2,01-5)
Ninguno	Nunca	No	No procede	Si	Si	Si	Si	Muy bajo (< 2)
Dermatitis seborreica	Nunca	No	No procede	Si	Si	Si	Si	Alto (15,01-20)
Ninguno	Nunca	Si	No sabe	Si	Si	Si	Si	Bajo (2,01-5)
Ninguno	Nunca	Si	No sabe	Si	Si	No	Si	Bajo (2,01-5)
Ninguno	Nunca	Si	No sabe	Si	Si	Si	No	Intermedio (5,0...)
Acné	>4 veces/año	Si	No sabe	Si	No	Si	No	Intermedio (5,0...)
Piel atópica	1-2 veces/año	No	No procede	Si	Si	Si	Si	Intermedio (5,0...)
Ninguno	>4 veces/año	No	No procede	Si	Si	Si	Si	Bajo (2,01-5)
Ninguno	Nunca	Si	No sabe	No	Si	No	No	Bajo (2,01-5)
Acné	Nunca	No	No procede	No	No	Si	Si	Intermedio (5,0...)
Otros	3-4 veces/año	No	No procede	No	Si	No	No	Intermedio (5,0...)
Ninguno	Nunca	No	No procede	No	Si	No	No	Intermedio (5,0...)
Ninguno	>4 veces/año	No	No procede	Si	Si	No	Si	Alto (15,01-20)
Ninguno	>4 veces/año	Si	Otras	No	No	No	No	Bajo (2,01-5)
Acné	>4 veces/año	No	No procede	No	No	No	No	Intermedio (5,0...)
Ninguno	1-2 veces/año	No	No procede	No	Si	Si	Si	Muy alto (> 20)
Infeción por hongos	Nunca	No	No procede	No	No	Si	Si	Intermedio (5,0...)
Piel atópica	Nunca	No	No procede	Si	Si	Si	Si	Intermedio (5,0...)
Ninguno	Nunca	No	No procede	No	Si	No	Si	Intermedio (5,0...)
Ninguno	Nunca	No	No procede	Si	Si	Si	Si	Intermedio (5,0...)
Ninguno	Nunca	No	No procede	Si	Si	Si	Si	Intermedio (5,0...)
Ninguno	Nunca	No	No procede	Si	Si	No	No	Intermedio (5,0...)
Ninguno	Nunca	No	No procede	Si	Si	No	No	Intermedio (5,0...)
Ninguno	Basrite	No	No procede	Si	Si	No	No	Intermedio (5,0...)
Ninguno	Nunca	Si	No sabe	Si	Si	No	Si	Bajo (2,01-5)
Ninguno	Nunca	No	No procede	No	No	No	Si	Intermedio (5,0...)
Ninguno	Nunca	No	No procede	Si	Si	Si	No	Intermedio (5,0...)
Ninguno	Nunca	No	No procede	Si	Si	Si	No	Intermedio (5,0...)
Otros	3-4 veces/año	No	No procede	Si	Si	No	No	Intermedio (5,0...)
Ninguno	Nunca	No	No procede	No	No	No	Si	Intermedio (5,0...)

**ANEXO 2. Tabla de distribución de la Chi-cuadrado**

$df$	$\chi^2_{.995}$	$\chi^2_{.990}$	$\chi^2_{.975}$	$\chi^2_{.950}$	$\chi^2_{.900}$	$\chi^2_{.100}$	$\chi^2_{.050}$	$\chi^2_{.025}$	$\chi^2_{.010}$	$\chi^2_{.005}$
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