



**Universidad
Zaragoza**



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**

Trabajo Fin de Máster
Máster en Biología Molecular y Celular

***Staphylococcus lugdunensis*: Fenotipos y Genotipos de resistencia a antibióticos, producción y caracterización de sustancias antimicrobianas**

Autora:

Fernández Fernández Rosa

Directora:

Torres Manrique Carmen

Ponente:

Ainsa Claver Jose Antonio

2018. Rosa Fernández Fernández

Zaragoza, 28 de Junio de 2018

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
ABREVIATURAS	4
LISTA DE TABLAS	6
LISTA DE FIGURAS	7
ABSTRACT/RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	11
1. Problemática de la resistencia a antibióticos	11
2. El género <i>Staphylococcus</i> y la especie <i>S. lugdunensis</i>	12
3. Mecanismos de resistencia a antibióticos en <i>Staphylococcus</i>	13
Resistencia a β -lactámicos	13
Resistencia a meticilina y tipado del cassette cromosómico <i>SCCmec</i>	14
Resistencia a tetraciclina.....	16
Resistencia a macrólidos y lincosamidas.....	16
Resistencia a aminoglucósidos.....	17
Resistencia a mupirocina.....	17
4. Las bacteriocinas: estructura, mecanismo de acción y aplicaciones.....	17
Bacteriocinas en <i>Staphylococcus</i> y en la especie <i>S. lugdunensis</i>	18
OBJETIVOS	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
1. Cepas bacterianas incluidas en el estudio	21
2. Procesado e identificación de las cepas	21
Procesado de las cepas y condiciones de cultivo	21
Confirmación de la identidad de las cepas por MALDI-TOF.....	21
3. Determinación de la sensibilidad a antibióticos	22
Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	22
Método de difusión en disco-placa.....	22
4. Extracción de ADN.....	23
ADN total.....	23
Cuantificación del ADN.....	23
5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	23
6. Electroforesis en gel de agarosa.....	24
7. Determinación de los genes de resistencia.....	24

8. Tipado molecular del elemento cromosómico SCC <i>mec</i> , que incluye el gen <i>mecA</i>	28
9. Estudio de la producción de bacteriocinas	29
Screening por el método “Spot in the lawn”	29
Obtención del sobrenadante libre de células de bacterias productoras de bacteriocinas y estudio de su actividad antimicrobiana.....	30
10. Estudio de los elementos génicos asociados a la producción de bacteriocinas.....	31
Diseño de cebadores.....	31
Optimización de las condiciones para la PCR.....	31
11. Secuenciación y análisis de las secuencias de ADN.....	32
12. Análisis estadístico.....	32
RESULTADOS.....	33
1. Cepas bacterianas incluidas en el estudio.....	33
2. Evaluación de la resistencia a antibióticos en cepas de <i>S. lugdunensis</i>	33
3. Estudio de la producción de bacteriocinas en cepas de <i>S. lugdunensis</i>	37
Screening de bacteriocinas por el método “Spot in the lawn”	37
Obtención del sobrenadante libre de células de bacterias productoras de bacteriocinas y estudio de su actividad antimicrobiana.....	43
4. Estudio de los elementos génicos asociados a la producción de bacteriocinas.....	44
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONS/CONCLUSIONES	53
BIBLIOGRAFÍA	55

AGRADECIMIENTOS

Comienzo este trabajo agradeciendo al departamento de Agricultura y Alimentación de la Universidad de La Rioja, en concreto al laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular. Han sido muchos los compañer@s con los que he colaborado durante este año y de los que he aprendido todo lo que aquí queda plasmado así como otros muchos valores que llevaré siempre conmigo en el recuerdo.

Quisiera dar las gracias a algunas de las integrantes del grupo de investigación Sara, Femi, Andrea, Paula..., por la atención y dedicación que han tenido conmigo pero sobre todo a ti Laura, porque me has enseñado más de lo que pudiera pedir estando siempre dispuesta a cualquier necesidad que se presentara.

Agradezco también de todo corazón a mi directora Carmen Torres Manrique, por haberme aceptado en su equipo con los brazos abiertos desde el primer momento dandome la posibilidad de formarme en este interesante mundo. Todo ello ha hecho posible que hoy vea mi nombre en comunicaciones a congresos, me sienta parte de este gran equipo y quiera decididamente seguir siéndolo en el futuro.

Por último me despido reconociendo el buen trabajo y asesoramiento del coordinador del Máster en Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, Patricio Fernández Silva, quien ha permitido que este trabajo sea realizado en la Universidad de La Rioja confiando plenamente en mí y en mi directora.

ABREVIATURAS

- (m/z): relación masa carga
- μL : microlitro
- A: adenina
- ABC: Casete de unión a ATP (ATP-Binding cassette)
- Abs: absorbancia
- ADN: ácido desoxiribonucleótido
- AMP: ampicilina
- ARN: ácido ribonucleótido
- BHI: Brain Heart Infusion
- C: citosina
- CDC: centers of disease control and prevention, Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
- CLI: clindamicina
- cm: centímetro
- CMI: concentración mínima inhibitoria
- dNTPs: desoxinucleótido trifosfato
- Dr: doctor
- Dra: doctora
- *E. coli*: *Escherichia coli*
- *E. Enterococcus*
- EE. UU: Estados Unidos
- ERI: eritromicina
- EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
- F: forward
- FOS: fosfomicina
- G:guanina
- GEN: gentamicina
- h: horas
- HCCA: α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (matriz Bruker utilizada en el MALDI-TOF)
- HPLC: high performance liquid chromatography (cromatografía líquida de alta eficacia)
- HRV: Hospital Royo Villanova
- HSP: Hospital San Pedro
- IPPB: infección de piel y partes blandas
- M: molar
- mA: miliamperios
- MALDI: desorción/ionización láser asistida por matriz
- mg: miligramos
- min: minuto

- mL: mililitro
- mm: milímetro
- MUP: mupirocina
- NE: No Evaluado
- NE: No Evaluado
- nm: nanómetros
- °C: grados centígrados
- OXA: oxacilina
- pb: pares de bases
- PB: producción de bacteriocinas
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- PEN: penicilina
- pH: potencial de hidrógeno
- R: reverse
- rpm: revoluciones por minuto
- *S. Staphylococcus*
- SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina
- SASM: *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina
- SCoN: estafilococos coagulasa-negativos
- SCoP: estafilococos coagulasa-positivos
- seg: segundo
- SL: *Staphylococcus lugdunensis*
- SLRM: *Staphylococcus lugdunensis* resistente a meticilina
- SP: *Staphylococcus pseudintermedius*
- *Spp*: especie
- SPRM: *Staphylococcus pseudintermedius* resistente a meticilina
- SPSM: *Staphylococcus pseudintermedius* sensible a meticilina
- T: timina
- TET: tetraciclina
- Tm: temperatura de fusión
- TOB: tobramicina
- TOF: analizador de tiempo de vuelo
- tRNA: ácido ribonucleótido de transferencia
- TSA: Tryptic Soy Agar
- TSB: Tryptic Soy Broth
- UFC: unidades formadoras de colonia
- UR: Universidad de La Rioja
- V: voltios
- W: watios
- Φ : diámetro

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de SCCmec en *S. aureus*, ampliable a otros *Staphylococcus* como *S. lugdunensis* (Lozano C., 2012).

Tabla 2. Reactivos usados en la PCR para un volumen final de 25µL.

Tabla 3. Secuencia de cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a penicilina.

Tabla 4. Secuencia de cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a meticilina/oxacilina.

Tabla 5. Secuencia de cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a tetraciclina.

Tabla 6. Secuencia de cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a macrólidos y lincosamidas.

Tabla 7. Secuencia de cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a aminoglucósidos.

Tabla 8. Secuencia de cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a mupirocina.

Tabla 9. Secuencia de cebadores usados para determinar el tipo de SCCmec y condiciones de amplificación

Tabla 10. Características de los 37 microorganismos usados como indicadores.

Tabla 11. Secuencia de cebadores y condiciones de amplificación de *lugD*.

Tabla 12. Características de las 48 cepas clínicas de *S. lugdunensis* analizadas en este estudio.

Tabla 13. Actividad antimicrobiana de las 48 cepas clínicas de *S. lugdunensis* frente a 12 microorganismos indicadores.

Tabla 14. Actividad antimicrobiana de las 48 cepas clínicas de *S. lugdunensis* frente a 25 microorganismos indicadores de distintas especies de estafilococos y enterococos.

Tabla 15. Producción de bacteriocinas de 12 aislados de *S. lugdunensis* frente a 37 bacterias Gram-positivas y Gram-negativas

Tabla 16. Características fenotípicas/genotípicas de las 12 cepas de *S. lugdunensis* productoras de bacteriocinas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias Gram-positivas. A. Barrera de impermeabilización; B. Bombas de eflujo; C. Mutación; D. Inactivación del antibiótico. Adaptado de Allen HK, et al., 2010.

Figura 2. Comparación de las estructuras del cassette cromosómico SCCmec de *S. lugdunensis* de tipo V (nº de acceso: NTUH-4179) y tipo IV (nº de acceso AB063172). El rectángulo negro indica IS431; las flechas grises indican *orfX*, *mecA* y genes *ccrC*; y las flechas blancas muestran genes hipotéticos.

Figura 3. Clúster de genes, vía de biosíntesis propuesta y estructura de la sustancia química lugdunina. **a**, genes pertenecientes al operon lug: *lugA*, *B*, *C*, *D*. **b**, Organización modular de los productos genéticos. **c**, Estructura química de la lugdunina.

Figura 4. Fenotipo de resistencia inducible a clindamicina detectado por el método de difusión disco-placa en la cepa C9927.

Figura 5. Esquema de la plantilla guía utilizada en la siembra por picadura del método “Spot in the lawn”

Figura 6. Origen de las 48 cepas de *S. lugdunensis*.

Figura 7. Porcentaje de resistencia a antibióticos de las 48 cepas testadas.

Figura 8. Porcentaje de cepas sensibles y resistentes en cuanto a su origen de aislamiento.

Figura 9. Ejemplo representativo de los resultados de la identificación de genes de resistencia a antibióticos por medio de PCR y electroforesis en gel de agarosa. **A.** Gen *blaZ* (C+/C+/C-/C9143/C9142/C9144); **B.** Gen *mecA* (C+/C-/C9897); **C.** Gen *erm(C)* (C+/C-/C10112/C9894/C9927/C9891).

Figura 10. Alineación entre las secuencias de los amplicones de *tet(L)* de las cepas resistentes a tetraciclina: C9889 y C9144.

Figura 11. Ejemplo representativo de la producción de bacteriocinas detectada por medio del sistema “Spot in the lawn”. Actividad inhibitoria de la cepa de *S.lugdunensis* productora de bacteriocinas (C9954) frente a cuatro microorganismos indicadores de referencia: **A.** SPSM; **B.** SPRM; **C.** *S. lugdunensis*; **D.** SARM

Figura 12. Actividad inhibitoria del sobrenadante. A. Microorganismo indicador SPRM. Sobrenadante de SL: 1,2. Centrifugado; 3,4 Centrifugado y hervido 1 minuto; 5,6 Centrifugado y hervido 5 minutos. **B. Microorganismo indicador SPSM.** Sobrenadante

de SL: 1,2. Centrifugado; 3,4 Centrifugado y hervido 1 minuto; 5,6 Centrifugado y hervido 5 minutos.

Figura 13. Actividad inhibitoria del sobrenadante concentrado por liofilización. A. Microorganismo indicador SPRM. Producto liofilizado de SP: 1. Centrifugado y hervido; 2 Centrifugado; 3,4. Centrifugado y filtrado. Producto liofilizado de SL: 5. Centrifugado; 6. Centrifugado y hervido 1 minuto; 7,8. Centrifugado y filtrado. **B.** Microorganismo indicador SPSM. El orden de los números es equivalente.

Figura 14. Presencia del gen *lugD* (%) en las 48 cepas clínicas de *S. lugdunensis*, tanto productoras de bacteriocinas (PB) como no productoras (No PB).

Figura 15. Ejemplo de análisis y corrección de los cromatogramas

Figura 16. Comparación de las secuencias de nucleótidos del gen *lugD* entre la secuencia de referencia (N920143) y las cepas C9954, C9961, C9981 y C9146.

Figura 17. Comparación de las secuencias del péptido LugD entre la secuencia de referencia (N920143) y las cepas C9954, C9961, C9981 y C9146.

ABSTRACT

Staphylococcus lugdunensis (SL) is a clinically relevant microorganism because it can be an opportunistic pathogen. Recently, it has been described its interest in microbial ecology due to the production of bacteriocins by some strains. Based on this, the objective of this Master's Thesis was to characterize a collection of 48 clinical strains of *S. lugdunensis* obtained during 2013-2018 in two Spanish hospitals (San Pedro's Hospital, Logroño (HSP) and Royo Villanova's Hospital, Zaragoza (HRV)).

In this study, it was evaluated the resistance phenotype/genotype of the *S. lugdunensis* strains, its capacity of antimicrobial compounds production and their genetic elements associated. First of all, the strains were identified by MALDI-TOF. After that, it was confirmed the sensitivity to 8 selected antibiotics (penicillin, methicillin / oxacillin, tetracycline, erythromycin, clindamycin, gentamicin, tobramycin, mupirocin and fosfomicin) by the disk-diffusion method. The presence of resistance genes was analyzed by PCR/sequencing. Regarding the production of bacteriocins of the 48 strains of *S. lugdunensis*, screenings by the "Spot in the lawn" method were performed against 37 indicator microorganisms, both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Moreover, studies of the *lugD* gene were carried out by PCR/sequencing, gene which has been associated with the production of the bacteriocin lugdunin.

Sixty percent of strains were resistant to at least one of the antibiotics tested, being penicillin (46%) and fosfomicin (27%) the most frequent. It was also found that these strains were carriers of the associated resistance genes: penicillin (*blaZ*), methicillin / oxacillin (*mecA*, gene included in this case in the chromosomal element SCC*mec* type V), tetracycline (tet (K)), mupirocin (*mup(A)*), erythromycin and clindamycin (*erm(C)* and / or *msr(A)*), tobramycin (*ant4(4')* - (4'')) and gentamicin (*acc(6')* - *aph(2'')*)).

In relation to the production of bacteriocins from the collection of 48 clinical strains of *S. lugdunensis*, the presence of 12 highly productive strains became evident, of which 7 showed inhibitory activity against bacteria with various resistance genotypes of interest, including multi-resistant bacteria and opportunistic pathogens such as: *S. aureus* MSSA and MRSA, *vanA/vanB2* enterococci, *Listeria monocytogenes* and *S. pseudintermedius* MSSP and MRSP, among others. One of these strains (C9954), produced an active antimicrobial substance against 70% of the indicator microorganisms tested. Finally, the evaluation of the *lugD* gene by PCR confirmed its presence in 100% of the strains of *S. lugdunensis* producing bacteriocins and in 75% of the non-producing ones. By sequencing, it was confirmed the identity of the amplicons and the subsequent analysis of the sequences showed their similarity in respect to the reference one (NC_017353.1).

RESUMEN

Staphylococcus lugdunensis (SL) es un microorganismo de gran interés en el ámbito clínico como patógeno oportunista, y recientemente se ha descrito su interés en ecología microbiana debido a la producción de bacteriocinas por algunas cepas. En base a ello, en este Trabajo Fin de Máster se ha planteado como objetivo caracterizar una colección de 48 cepas clínicas de *S. lugdunensis* obtenidas durante 2013-2018 en dos hospitales españoles (Hospital San Pedro, Logroño (HSP) y Hospital Royo Villanova, Zaragoza (HRV)).

En este estudio, se evaluó su fenotipo/genotipo de resistencia, su capacidad productora de compuestos antimicrobianos y los elementos genéticos asociados. Para ello, se identificaron las cepas por MALDI-TOF, se confirmó la sensibilidad a 8 antibióticos seleccionados (penicilina, meticilina/oxacilina, tetraciclina, eritromicina, clindamicina, gentamicina, tobramicina, mupirocina y fosfomicina) por el método de difusión disco-placa y se analizó por PCR/secuenciación la presencia de genes de resistencia asociados. En cuanto a la producción de bacteriocinas de las 48 cepas en estudio, se realizaron screenings por el método "Spot in the lawn" frente a 37 microorganismos indicadores, tanto bacterias Gram-positivas como Gram-negativas. Por último, se realizaron estudios por PCR/secuenciación del gen *lugD*, asociado a la producción de la bacteriocina lugdunina, descrita recientemente en la especie bacteriana *S. lugdunensis*.

Se identificó un 60% de cepas resistentes al menos a uno de los antibióticos testados, siendo la penicilina (46%) y la fosfomicina (27%) los más frecuentes. Asimismo se comprobó que dichas cepas eran portadoras de los genes de resistencia asociados: penicilina (*blaZ*), meticilina/oxacilina (*mecA*, gen incluido en este caso en el elemento cromosómico SCC*mec* de tipo V), tetraciclina (*tet(K)*), mupirocina (*mup(A)*), eritromicina y clindamicina (*erm(C)* y/o *msr(A)*), tobramicina (*ant4(4')-(4'')*) y gentamicina (*acc(6')* - *aph(2'')*).

En relación a la producción de bacteriocinas de la colección de las 48 cepas clínicas de *S. lugdunensis*, se hizo patente la presencia de 12 cepas altamente productoras, de las cuales 7 mostraron actividad inhibitoria frente a bacterias con diversos genotipos de resistencia de interés, incluyendo bacterias multi-resistentes y patógenos oportunistas como: *S. aureus* SARM y SASM, *vanA/vanB2 enterococci*, *Listeria monocytogenes* y *S. pseudintermedius* SPRM y SPSM, entre otros. Una de estas cepas (C9954), producía una sustancia antimicrobiana activa frente al 70% de los microorganismos indicadores testados. Finalmente, la evaluación del gen *lugD* por PCR permitió confirmar su presencia en el 100% de las cepas de *S. lugdunensis* productoras de bacteriocinas y en 75% de las no productoras. Por secuenciación se confirmó la identidad de los amplicones y los análisis de las secuencias posteriores evidenciaron su semejanza con respecto a la de referencia (NC_017353.1).

INTRODUCCIÓN

1. Problemática de la resistencia a antibióticos

La era moderna de los antibióticos comenzó con el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928 [1]. Desde entonces, los antibióticos han transformado la medicina moderna y salvado millones de vidas [2], siendo un factor clave en el aumento de la esperanza de vida, en la cirugía invasiva y en otro tipo de tratamientos médicos como la quimioterapia. Sin embargo, décadas después del inicio del uso de los antibióticos, la aparición de bacterias resistentes pone en peligro la eficacia de los antibióticos [1].

En los últimos años, las infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos han aumentado notablemente representando una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, incluso en los países desarrollados [3]. Todo ello, hace de la resistencia a los antimicrobianos un problema de salud con prioridad global [4]. Se estima que en Europa mueren cada año alrededor de 25,000 personas como resultado de infecciones bacterianas resistentes a múltiples fármacos [5], y se espera que en décadas futuras, ésta sea una causa de muerte más frecuente que el cáncer [6].

La crisis de resistencia a los antibióticos ha sido atribuida a varias causas. Por un lado, diversos estudios epidemiológicos han demostrado una relación directa entre el consumo excesivo de antibióticos y la emergencia y diseminación de cepas de bacterias resistentes [7]. Asimismo, los antibióticos prescritos incorrectamente debido a errores en la asignación del tratamiento, en la elección del agente o en la duración de la terapia con antibióticos incorrectos [8], contribuyen al aumento de bacterias resistentes en un porcentaje estimado del 30% y 50% de los casos.

Otro de los focos del origen de la resistencia a antibióticos proviene de su uso abusivo en la agricultura intensiva puesto que los antibióticos son ampliamente utilizados como suplementos de crecimiento en el ganado [7], y todavía hay países que los siguen usando para este fin (no en la Unión Europea). Se estima que el 80% de los antibióticos vendidos en los EE. UU., se usan principalmente para promover el crecimiento y prevenir la infección en animales [9]. Además, la presencia de genes de resistencia en elementos genéticos móviles, como los plásmidos, permite la transferencia horizontal de los mismos, lo cual incrementa la capacidad de diseminación del problema [10].

Muchos de los genes de resistencia a antibióticos conocidos, se encuentran en: transposones, integrones o plásmidos, los cuales pueden movilizarse y transferirse a otras bacterias de la misma especie o de diferentes especies. En este sentido, existen evidencias de la transferencia de elementos de resistencia entre bacterias patógenas y comensales de humanos y animales [11].

Frente a esta problemática, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), clasificaron un número de bacterias de interés urgente por ser causantes de patologías graves, entre las que se encuentra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) [8].

2. El género *Staphylococcus* y la especie *S. lugdunensis*

Los estafilococos son microorganismos Gram-positivos, clasificados como estafilococos coagulasa-negativos (SCoN) o coagulasa-positivos (SCoP) en base a su capacidad para coagular el plasma de conejo [12]. Si bien los SCoN se encuentran entre los microorganismos aislados con mayor frecuencia en el laboratorio, es difícil establecer su relevancia clínica, puesto que pueden comportarse como comensales inofensivos y como patógenos oportunistas [13].

El papel de los SCoP como patógenos oportunistas, especialmente *S. aureus*, es importante y claro desde hace tiempo; sin embargo, los SCoN han sido habitualmente considerados como comensales, pero cada vez se está valorando más su papel también como patógenos oportunistas [12]. Estos microorganismos han sido catalogados como agentes etiológicos de bacteremias relacionadas a catéteres, infecciones asociadas al empleo de otros dispositivos protésicos, abscesos superficiales, infecciones en piel y tejidos blandos, infecciones post-quirúrgicas e infecciones urinarias [14].

Cabe destacar a *S. aureus*, presente en la microbiota de individuos sanos que coloniza las fosas nasales, piel y membranas mucosas de humanos y animales [15]. Sin embargo, *S. aureus* también puede actuar como patógeno oportunista causando diversas enfermedades.

Otro microorganismo de interés es *Staphylococcus lugdunensis* (SL), especie de SCoN que crece en condiciones aerobias en medio común [16]. Sus colonias presentan diversos morfotipos con pigmentación variable, desde color crema o no pigmentadas hasta coloración amarilla/dorada. Asimismo es característico el olor a fuet de estas colonias.

S. lugdunensis forma parte de la microbiota de la piel y aunque es un patógeno humano infrecuente, cada vez ha sido descrito con mayor frecuencia tanto en pacientes con enfermedades de base o tras recibir terapias inmunosupresoras como en individuos sanos con infecciones superficiales o profundas [17]. Como patógeno, *S. lugdunensis* es causante de infecciones nosocomiales y comunitarias que pueden desarrollarse con agresividad y gravedad.

En cuanto a los aspectos fisiológicos, *S. lugdunensis* produce factores de adherencia con los que se produce la unión al fibrinógeno, proteína vinculada a la pared celular bacteriana que actúa como un factor de agrupamiento [18]. Las funciones de estos factores de adhesión no quedan limitadas a la unión de la molécula de la matriz extracelular sino que, posibilitan la evasión del sistema inmune y la formación de biopelículas, entre otras [19].

A su vez, se ha descrito recientemente en *S. lugdunensis* una fuerte actividad proteolítica debida a una nueva proteasa dependiente de Zn^{2+} llamada lugdulisina. Por último, *S. lugdunensis* a diferencia de otros SCoN se caracteriza por poseer alta susceptibilidad a los antibióticos, en particular a los β -lactámicos [19].

3. Mecanismos de resistencia a antibióticos en *Staphylococcus*

La resistencia bacteriana a los antibióticos puede ser intrínseca, resultado de características estructurales o funcionales inherentes que les permiten sobrevivir a la acción del antibiótico o adquirida, a través de mutaciones en los genes cromosómicos y mediante la transferencia horizontal de genes, que da lugar a la adquisición de genes de resistencia [5].

La resistencia a los antibióticos está mediada por varios mecanismos, divididos en tres grupos principales. En primer lugar, se agrupan aquellos que minimizan las concentraciones intracelulares del antibiótico como resultado de una penetración deficiente en la bacteria o del flujo de salida de antibióticos. En segundo lugar, se encuentran aquellos que modifican la diana molecular del antibiótico por mutación genética o modificación post-traducciona y finalmente, aquellos que inactivan el antibiótico por hidrólisis o modificación directa (Figura 1).

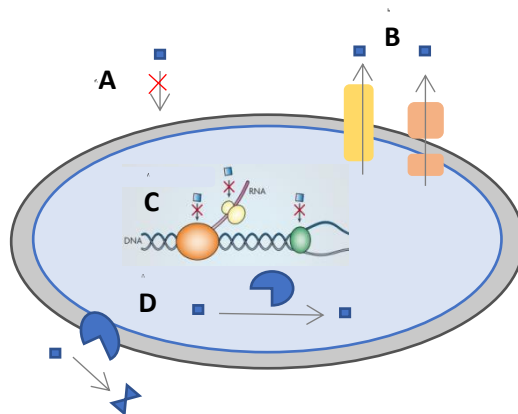


Figura 1. Mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias Gram-positivas. A. Barrera de impermeabilización; B. Bombas de eflujo; C. Mutación; D. Inactivación del antibiótico. Adaptado de Allen HK, et al., 2010.

A continuación, se presentan algunos de los mecanismos de resistencia en microorganismos Gram-positivos frente a los grupos de antibióticos más relevantes [21].

Resistencia a β -lactámicos

Los antibióticos que conforman este grupo, se caracterizan por poseer el anillo betalactámico, estructura hidrolizada e inhibida por la acción de betalactamasas, enzimas bacterianas capaces de romper el enlace amida del anillo betalactámico. Estas proteínas son mayoritariamente inducibles y se excretan extracelularmente. Algunos

de los genes que las codifican, están localizados en plásmidos de pequeño tamaño que pueden ser transferidos de célula a célula por transducción. Asimismo, se pueden localizar en plásmidos más grandes junto a los genes que codifican otros mecanismos de resistencia y se pueden transferir por conjugación entre cepas distintas [21].

En el caso concreto de los estafilococos, la betalactamasa producida es una penicilinasa codificada por el gen *blaZ* que adquiere la capacidad de hidrolizar exclusivamente a las penicilinas.

Por lo tanto, el fenotipo de resistencia a la penicilina mediado por betalactamasa implica resistencia a todas las penicilinas excepto las semisintéticas, como la oxacilina y la cloxacilina. Si el microorganismo produce una penicilinasa, adquiere resistencia a todas las penicilinas (penicilina, ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina, azlocilina, mezlocilina y piperacilina) [21].

Resistencia a meticilina y tipado del complejo SCCmec

El fenotipo de resistencia a la meticilina (oxacilina, meticilina) es frecuente entre las diferentes especies de SCoN, con la excepción de *S. lugdunensis* y *S. saprophyticus*. La resistencia a meticilina viene ocasionada, entre otros por la presencia del gen *mecA*, el cual codifica una proteína de unión a penicilina (PBP2a), con baja afinidad por todos los betalactámicos [21].

El gen *mecA* es portado por el cassette cromosómico de estafilococos denominado SCCmec [22]. Este complejo se compone de un grupo de elementos móviles de ADN que se integran en el cromosoma bacteriano otorgando resistencia a la meticilina [23]. Se distinguen dos estructuras genéticas: complejo *mec* y complejo *ccr*. Existen varios tipos de complejo *mec* (A, B, C1, C2, D y E), siendo el de mayor prevalencia el de tipo A, el cual se encuentra asociado a genes reguladores y secuencias de inserción.

Por otra parte, el complejo *ccr* está formado por los genes *ccrC* o el par de *ccrA* y *ccrB*, los cuales codifican para enzimas recombinasas que actúan por integración y escisión del cassette SCCmec en el cromosoma [24]. Se desconoce el mecanismo responsable de la transferencia de *mecA*, pero se ha hecho patente la transferencia horizontal de ADN entre distintas especies de estafilococos y del gen *mecA* entre diferentes géneros de microorganismos Gram-positivos [24].

Sin embargo, la resistencia a meticilina no es debida exclusivamente a la presencia del gen *mecA* sino que estudios recientes, han identificado un alelo divergente de *mecA*, llamado *mecC* [25]. Este gen se localiza en un elemento móvil del complejo SCCmec de tipo XI y aunque comparte el 70% identidad de nucleótidos a *mecA*, es difícil de identificar fenotípicamente (alta susceptibilidad a oxacilina y resistencia a cefoxitina) [26] y genotípicamente (ensayos de PCR estándar) [27].

Atendiendo a las clases del complejo *mec* y del gen *ccr*, se han descrito 11 tipos (I a XI) de SCC*mec* para *S. aureus* [28].

Tabla 1. Tipos de SCC*mec* en *S. aureus*, ampliable a otros *Staphylococcus* como *S. lugdunensis* (Lozano C., 2012).

Tipo SCC <i>mec</i>	Tipo <i>ccr</i>	Complejo <i>mec</i>
I	1 (<i>ccrA1ccrB1</i>)	B
II	2 (<i>ccrA2ccrB2</i>)	A
III	3 (<i>ccrA3ccrB3</i>)	A
IV	2 (<i>ccrA2ccrB2</i>)	B
V	5 (<i>ccrC</i>)	C2
VI	4 (<i>ccrA4ccrB4</i>)	B
VII	5 (<i>ccrC</i>)	C1
VIII	4 (<i>ccrA4ccrB4</i>)	A
IX	1 (<i>ccrA1ccrB1</i>)	C2
X	7 (<i>ccrA1ccrB6</i>)	C1
XI	8 (<i>ccrA1ccrB3</i>)	E

En cuanto a *S. lugdunensis*, estudios recientes han demostrado que el complejo SCC*mec* más frecuente en este microorganismo es el de tipo V [30]. La figura 2, muestra la estructura genética del cassette cromosómico SCC*mec* de tipo V, con perfecta homología para los aislados de *S. lugdunensis* resistentes a meticilina identificados por (Tseng SP, et al., 2015).

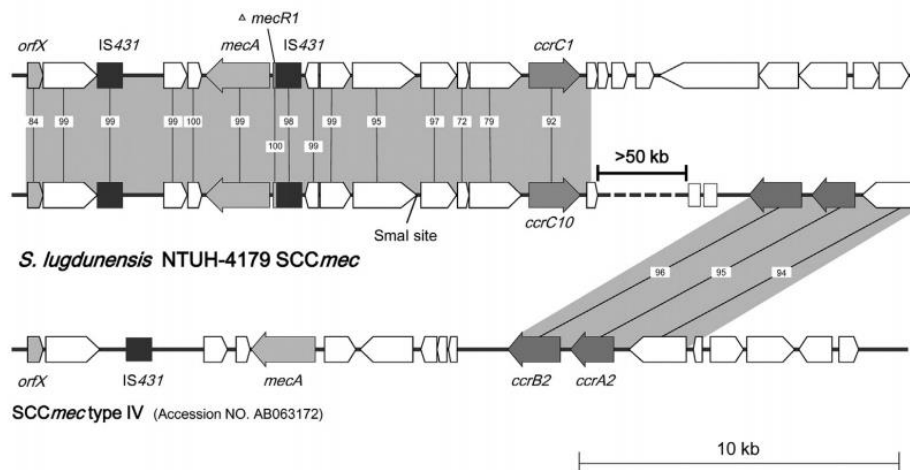


Figura 2. Comparación de las estructuras del cassette cromosómico SCC*mec* de *S. lugdunensis* de tipo V (nº de acceso: NTUH-4179) y tipo IV (nº de acceso AB063172). El rectángulo negro indica IS431; las flechas grises indican *orfX*, *mecA* y genes *ccrC*; y las flechas blancas muestran genes hipotéticos.

Resistencia a tetraciclina

La tetraciclina pertenece a un grupo de antibióticos con una estructura química tetracíclica básica, formadas por la fusión de cuatro anillos bencénicos con diversos sustituyentes [32]. En cuanto a su modo de acción, las tetraciclinas inhiben de forma reversible la síntesis de proteínas, impidiendo la unión del aminoacil-tARN al sitio A del ribosoma bacteriano o uniéndose directamente a la proteína S7 de la subunidad 30S [33]. Para ello, deben atravesar consecutivamente la pared celular por difusión pasiva y la membrana citoplasmática por un proceso dependiente de energía [34]. En la actualidad, se han descrito tres mecanismos de resistencia a tetraciclina: eflujo activo, protección ribosomal e inactivación enzimática [35], además de varios genes con un mecanismo de acción desconocido.

Atendiendo a los mecanismos de resistencia mediante eflujo activo y protección ribosomal, se ha confirmado que el eflujo de tetraciclinas está mediado por bombas de eflujo dependientes de energía, proteínas codificadas en las bacterias Gram-positivas por los genes *tet(K)*, *tet(L)* generalmente [36]. Por su parte, la resistencia mediante protección ribosomal es un mecanismo asociado a la presencia de los genes *tet(O)* y *tet(M)* principalmente [32].

Resistencia a macrólidos y lincosamidas

Este grupo de antibióticos se clasifica en función de su mecanismo de acción. En estafilococos, la resistencia a los macrólidos (eritromicina, claritromicina, azitromicina, midecamicina) o a las lincosamidas (clindamicina), puede asociarse a diferentes fenotipos de sensibilidad [21]:

1. Resistencia a la eritromicina y a la clindamicina por modificación de la diana molecular (ARNr 23S) o a través de la acción de enzimas metilasas codificadas principalmente por genes *erm* (*erythromycin ribosome methylase*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, entre otros)
2. Resistencia a la eritromicina y sensibilidad a la clindamicina pero con un achatamiento del halo de la clindamicina en la proximidad de la eritromicina (resistencia inducida). Este fenotipo se debe a la expulsión activa del antimicrobiano, acción relacionada con diferentes genes de codificación plasmídica del tipo *msr(A)*
3. Resistencia a la eritromicina y sensibilidad a la clindamicina sin achatamiento del halo, debido a la inactivación del antimicrobiano (genes de tipo *Inu*)
4. Resistencia a la clindamicina y sensibilidad a la eritromicina debido a la acción de enzimas que inactivan las lincosamidas (codificadas por los genes *Inu*).

Resistencia a aminoglucósidos

Se incluyen en este grupo varios antibióticos, entre los cuales se destaca la gentamicina y tobramicina. En ambos casos, la resistencia se debe a la producción de enzimas modificantes de aminoglucósidos. Una de estas enzimas, conocida como enzima bifuncional, es codificada por el gen *aac(6')-aph(2'')* y confiere resistencia tanto a la gentamicina como a la tobramicina. Por el contrario, la enzima codificada por el gen *ant(4')(4'')* únicamente otorga resistencia frente al aminoglucósido tobramicina [21].

Resistencia a mupirocina

También conocida como ácido pseudomónico, la mupirocina es un antimicrobiano de utilizado ampliamente en la descolonización de portadores nasales de *S. aureus*. El porcentaje de cepas resistentes a la mupirocina es superior en cepas de SCoN que en *S. aureus* [21].

Este antibiótico, actúa inhibiendo la enzima isoleucil t-ARN sintetasa de manera que la síntesis proteica se ve detenida. Se distingue entre dos niveles de resistencia a mupirocina: alta y baja [21].

La resistencia de bajo nivel se debe a mutaciones en el gen cromosómico *ileS (mupB)*, que codifica la síntesis de la enzima isoleucil t-ARN sintetasa, alterando en consecuencia su centro activo y disminuyendo su afinidad por la mupirocina. La resistencia de alto nivel se debe a la adquisición de un gen adicional, de localización plasmídica (*ileS- 2 o mupA*) que codifica una isoleucil t-ARN sintetasa sin afinidad por la mupirocina [21].

4. Las bacteriocinas: estructura, mecanismo de acción y aplicaciones

El descubrimiento de la penicilina permitió luchar contra una amplia gama de infecciones y enfermedades bacterianas. Sin embargo, ante la actual problemática de la resistencia a los antibióticos, es de gran necesidad desarrollar antimicrobianos alternativos. Entre ellos, se encuentran las bacteriocinas, grupo de pequeños péptidos antimicrobianos muy diversos que son sintetizados ribosomalmente por una amplia gama de bacterias en el medio ambiente [37].

Según su estructura, las bacteriocinas se han clasificado en dos grupos principales con diversas subdivisiones, en función del tipo de modificación secundaria. De este modo se distingue entre bacteriocinas clase I en las que los péptidos experimentan modificaciones postraduccionales y péptidos de clase II, aquellos que permanecen sin modificar [38].

Con respecto a la especificidad diana, varias bacteriocinas demuestran actividad antimicrobiana de amplio espectro, aunque son las de espectro estrecho las más utilizadas para el control de patógenos específicos ya que no interfieren en el resto de comunidades bacterianas [39]. A pesar de que actualmente existe una creciente

aparición de nuevas bacteriocinas, el conocimiento sobre su transporte y procesamiento es deficiente.

En cuanto a su mecanismo de acción, se ha comprobado que diferentes clases de bacteriocinas actúan de forma distinta contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Las bacteriocinas se unen a los componentes de la pared celular, incluyendo sitios de unión molecular lipídica o superficial, a través de la unión específica o no específica del receptor. Esto, facilita la formación de poros o lisis celular directa, resultando en muerte celular por disipación de la fuerza motriz del protón del sistema bacteriano [40] o por inhibición de la síntesis de proteínas o ácidos nucleicos [41].

Por todo ello, las bacteriocinas son una excelente alternativa a los antibióticos puesto que presentan numerosas aplicaciones clínicas por tratarse de proteínas no patogénicas fácilmente degradables por enzimas [42], y por tener alta actividad contra patógenos resistentes a múltiples fármacos [43].

Bacteriocinas en *Staphylococcus* y en la especie *S. lugdunensis*

Estudios recientes han revelado que de forma ocasional, algunas de las bacterias de la microbiota humana producen bacteriocinas con potente actividad antimicrobiana frente bacterias estrechamente relacionadas [44]. En este sentido, se ha comprobado que tanto los estafilococos considerados comensales como aquellos patógenos oportunistas, producen bacteriocinas de naturaleza no tóxica contra huéspedes eucariotas, lo que revela su importancia en el mantenimiento del microbioma de la piel y las superficies mucosas [45].

Este es el caso de la cepa de *S. lugdunensis* IVK28, la cual posee una capacidad particularmente fuerte para prevenir el crecimiento de *S. aureus*. IVK28 produjo una sustancia antibacteriana en condiciones limitantes de hierro y en superficies sólidas de agar, exclusivamente. Esto sugiere que la molécula inhibidora de IVK28 puede ser un compuesto peptídico complejo, de síntesis no ribosomal [46].

En base al supuesto anterior, Zipperer A, et al., demostraron en 2016 que el operon NRPS, también conocido como operon lug, incluye cuatro genes: lugA, B, C y D que codifican los dominios de adenilación en cinco aminoácidos distintos (Figura 3). Los productos de estos genes participan en la síntesis de un péptido cíclico no ribosomal, lugdunina, nueva tiazolidina que posee actividad antimicrobiana.

Estos estudios permitieron comprobar que el operon lug está presente en todos los genomas de *S. lugdunensis* registrados en las bases de datos, por lo que se concluyó que se trata de una secuencia génica característica de la especie. Sin embargo, se detectaron variaciones en el contenido de GC del operón lug (26,9%), valor claramente distinto al del genoma completo (33,8%). Con ello, se confirmó que el grupo de genes puede haber sido transferido a *S. lugdunensis* por transferencia horizontal de genes de otra especie bacteriana [46].

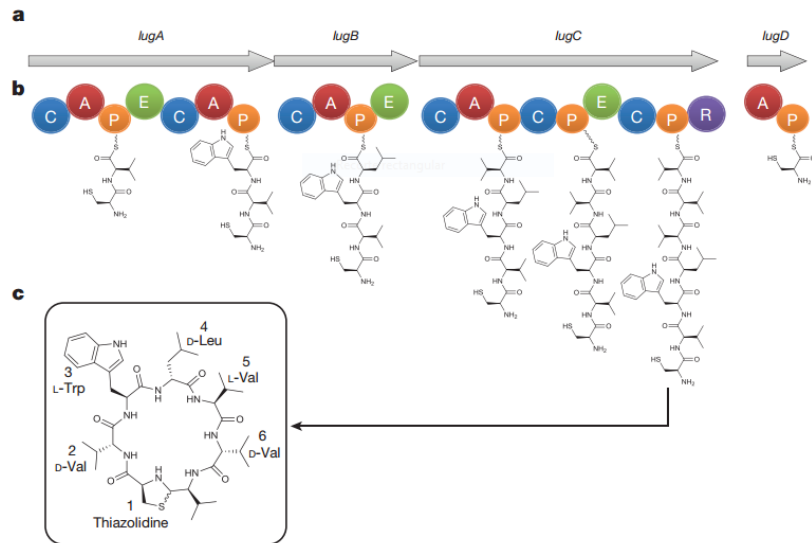


Figura 3. Clúster de genes, vía de biosíntesis propuesta y estructura de la sustancia química lugdunina. **a**, Genes pertenecientes al operon *lug*: *lugA*, *B*, *C*, *D*. **b**, Organización modular de los productos genéticos. **c**, Estructura química de la lugdunina.

El operón del *lug* se encontró exclusivamente en *S. lugdunensis* y codifica una única combinación de enzimas de biosíntesis de antibióticos, todas con menos del 35% de identidad con cualquier otra enzima descrita, lo que sugiere que puede ser responsable de la biosíntesis de un nuevo compuesto. Este compuesto se identificó como lugdunina, bacteriocina con una potente actividad antimicrobiana contra una amplia gama de bacterias Gram-positivas, incluyendo patógenos oportunistas tales como *S. aureus* resistente a metilina difícil de tratar, *S. aureus* resistente a glucopéptidos intermedios y aislados de *Enterococcus* resistentes a vancomicina [46].

OBJETIVOS

Staphylococcus lugdunensis es un microorganismo de gran interés en el ámbito clínico como patógeno oportunista y recientemente se ha descrito su interés en ecología microbiana debido a la producción de bacteriocinas por algunas cepas. El objetivo de este Trabajo Fin de Máster, ha sido caracterizar una colección de 48 cepas clínicas de *S. lugdunensis*. Dicha caracterización consistirá en:

1. Confirmación de la identidad de los aislados mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF)
2. Determinación de la sensibilidad a antibióticos pertenecientes a diversas familias de interés médico y epidemiológico
3. Caracterización de los mecanismos de resistencia a los antibióticos, en función de su fenotipo de resistencia y determinación del sistema SCCmec en las cepas resistentes a meticilina.
4. Determinación de la producción de sustancias antimicrobianas a partir de esta colección de cepas de *S. lugdunensis* frente a bacterias indicadoras seleccionadas de diversos géneros y grupos microbianos, con diferentes genotipos de resistencia de interés.
5. Estudio de la actividad antimicrobiana de cepas productoras Bac+ seleccionadas frente a una colección muy amplia de bacterias indicadoras para determinar diferentes fenotipos de actividad.
6. Análisis de los determinantes genéticos relacionados con la producción de bacteriocinas en aislados altamente productores de sustancias antimicrobianas y determinación de su posible liberación al medio extracelular.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas incluidas en el estudio

Se han incluido en este estudio 48 cepas clínicas de *S. lugdunensis* (SL), obtenidas durante 2013-2018 en dos hospitales españoles (Hospital San Pedro, Logroño (HSP) y Hospital Royo Villanova, Zaragoza (HRV)), y que fueron remitidas a la Universidad de La Rioja para su estudio en este TFM. Este trabajo ha sido posible gracias a la estrecha colaboración científica que existe entre la supervisora de este trabajo en la Universidad de la Rioja (UR) y el Dr. Jose Manuel Azcona (HSP) y la Dra. Carmen Aspiroz (HRV), Facultativos Especialistas de Microbiología de dichos hospitales.

2. Procesado e identificación de las cepas

Procesado de las cepas y condiciones de cultivo

Las cepas de *S. lugdunensis* remitidas por el HSP y HRV, fueron conservadas en tubos de leche descremada estéril a -80°C. Los cultivos frescos de *S. lugdunensis*, se obtuvieron por medio de siembras consecutivas (aislamiento en estría y siembra en extensión), en medio sólido (BHI agar). En ambas fases, las placas se mantuvieron en la estufa a 37°C durante 24h. Todos los medios se prepararon siguiendo las condiciones del fabricante. La esterilización se llevó a cabo en autoclave a 121°C, durante 20 min.

Confirmación de la identidad de las cepas por MALDI-TOF

La ionización MALDI (desorción/ionización láser asistida por matriz) está acoplada a un detector de iones analizador del tiempo de vuelo (TOF). Se trata de una técnica de espectrometría de masas, que facilita el análisis de biomoléculas (proteínas, péptidos y azúcares). El proceso consta de una matriz aplicada en exceso sobre una superficie metálica donde se carga la muestra. Al incidir pulsos cortos de láser en alto vacío se da lugar a la cocrystalización de la matriz y la muestra. Esto facilita la transferencia de H⁺ a la muestra (ionización) dando lugar a especies cargadas. Las proteínas y péptidos se ordenan según su relación masa/carga (m/z) en un espectro que constituye una "huella" individual para cada microorganismo.

En el presente estudio, la identificación bacteriana por MALDI-TOF se realizó con el espectrómetro de masas Biotyper^R de Bruker, acoplado al programa Biotyper^R CA System microflex LT/SH, utilizando el protocolo de extracción proteica previa. Para garantizar resultados óptimos, fue necesario partir de material biológico fresco (<24h).

En primer lugar, se resuspende el material biológico (1 asa) en 300µL de agua MiliQ estéril. Posteriormente se añaden 900µL de etanol (grado HPLC) y se mezcla vigorosamente. A continuación, se centrifugan las muestras (2 min, 13000 rpm), se decanta el sobrenadante evitando la pérdida del pellet y se vuelve a centrifugar (2 min, 13000 rpm).

Una vez el etanol haya sido evaporado completamente, se adicionan 10µL de ácido fórmico al 70% y 10µL de acetonitrilo puro resuspendiendo el precipitado con la pipeta tras cada adición. Posteriormente, se centrifugan las muestras (2 min, 13000 rpm) y se aplica 1µL del sobrenadante en la placa de MALDI. Finalmente, cuando la muestra quede completamente seca, se adiciona 1µL de matriz (Bruker HCCA 2,5mg) y el calibrante (Bruker Bacteria Test Estándar). El calibrante es un compuesto usado como medida de referencia para el espectrómetro, el cual proporciona el perfil proteico de una cepa de *Escherichia coli* DH5-α.

3. Determinación de la sensibilidad a antibióticos

Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La CMI de las 48 cepas de *S. lugdunensis* fue determinada por el HSP y el HRV testando la sensibilidad a 21 antibióticos (ampicilina, amoxicilina-clavulánico, penicilina, oxacilina, gentamicina, tobramicina, ciprofloxacino, levofloxacino, furantoína, eritromicina, clindamicina, pristamicina, linezolida, mupirocina, fosfomicina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, vancomicina, teicoplanina, quinupristin/dalfopristin, daptomicina, ceftaxima, ceftarolina), mediante el método semiautomático MicroScan^R. En la Universidad de La Rioja y en el presente trabajo, se obtuvo el fenotipo de resistencia interpretando las CMI recibidas según los criterios EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017).

Método de difusión en agar

Partiendo de las CMI cedidas por el HSP y HRV, en la Universidad de La Rioja y en el desarrollo de este TFM se confirmó la sensibilidad a antibióticos seleccionados (penicilina, tetraciclina, mupirocina, gentamicina, tobramicina, eritromicina y clindamicina) de aquellas cepas resistentes.

Para ello, se recurrió a otro método de evaluación sistema de difusión en agar, también denominado antibiograma o difusión disco-placa. En este caso, se parte de un cultivo fresco de la bacteria en medio sólido (BHI agar), crecida durante 24 h a 37°C. Posteriormente se prepara una suspensión bacteriana a concentración 0,5 MacFarland, (equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL), la cual se extiende con ayuda de una torunda estéril sobre placas de agar Müller-Hinton. Seguidamente, se colocan los discos de antibiótico comerciales con una separación aproximada de 1 cm y se incuban las placas a 37°C durante 24h. Tras este tiempo, se miden los halos de inhibición interpretando dichos resultados según los criterios EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017).

Para la detección de la resistencia inducible a clindamicina, se colocan los discos de antibiótico de eritromicina y clindamicina a una distancia aproximada de 20mm. La detección de un achatamiento claro del halo de inhibición de clindamicina en la proximidad de eritromicina en las cepas que son eritromicina-resistentes, es indicativo de un fenotipo inducible de resistencia (Figura 4).



Figura 4. Fenotipo de resistencia inducible a clindamicina detectado por el método de difusión disco-placa en la cepa C9927.

4. Extracción de ADN

ADN total

Se parte de un cultivo bacteriano fresco sembrado en BHI agar a 37°C durante 24h. En primer lugar, se resuspende el material biológico (1 asa) en 45µL de agua MiliQ estéril y se añade 5µL de lisostafina 1mg/mL. Posteriormente, se agita vigorosamente la mezcla y se incuba en un baño a 37°C durante 10 minutos. Tras este tiempo se añade sucesivamente 45µL de agua MiliQ estéril, 5µL de proteinasa K (2mg/mL) y 150µL de Tris-HCl (0,1 M, pH=8). A continuación, se agita vigorosamente la mezcla y se incuba consecutivamente en un baño a 60°C durante 10 minutos y en un baño a 100°C durante 5 minutos. Finalmente, las muestras se centrifugan a 1200rpm durante 3 minutos, se recogen los sobrenadantes y se almacenan a -20°C

Cuantificación del ADN

La concentración (máximo de absorbancia a 260nm) y pureza (Abs260nm/Abs280nm) del ADN extraído se evaluó por espectrofotometría usando el programa NANO-DROP. Se considera muestra de alta pureza de ADN pura aquella cuyo cociente de absorbancias se encuentre entre el rango 1,8-2.

5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR consiste en la amplificación de fragmentos de material genético. En este estudio se usaron los termocicladores T3 y T3000 (Biometra). Esta técnica se utilizó para la detección de genes de resistencia, el tipado molecular del elemento cromosómico *SCCmec* y el estudio de los determinantes génicos asociados a la producción de bacteriocinas. La mezcla de reacción de PCR se preparó en un volumen final de 25µL para análisis rutinarios y de 50µL en caso de requerir secuenciación posterior (Tabla 2).

Tabla 2. Reactivos usados en la PCR para un volumen final de 25µL.

Componentes	Volumen µL¹
Agua MiliQ estéril ³	15,1
Tampón de reacción	2,5
MgCl ₂	0,75
dNTPs	0,5
Cebador Forward (F) ²	0,5
Cebador Reverse (R) ²	0,5
BioTaq DNA polimerasa	0,15
ADN	5

¹. Volúmenes de muestra calculados para 1 muestra en el caso de PCR rutinaria a 25µL

². Los cebadores usados fueron sintetizados por Sigma Aldrich

³. En el caso de los controles negativos, el volumen final se ajusta adicionando agua MiliQ estéril.

6. Electroforesis en gel de agarosa

La separación de los fragmentos de ADN amplificados se lleva a cabo en geles de agarosa horizontales, en un campo eléctrico. Los geles se realizan con una disolución de agarosa, TBE 1X y Midori Green (permite visualizar los fragmentos de ADN amplificados). Las muestras se cargan en el gel mezclando 10µL de producto de PCR y 2µL de tampón de carga. Posteriormente, los geles se depositan en la cubeta de electroforesis aplicando una corriente continua: 96V, 120mA, 100W, 45 min (variable en función del tamaño del amplicón esperado). Finalmente se visualiza el gel con luz ultravioleta y se fotografía el resultado con el captador de imágenes (Image Store 5000, UVP).

7. Determinación de los genes de resistencia

Se usó a la técnica de PCR para identificar genes de resistencia en los aislados con fenotipo resistente (por CMI y/o difusión en disco) para los antibióticos: penicilina, oxacilina, tetraciclina, eritromicina, clindamicina, gentamicina, tobramicina y mupirocina. A continuación, se indican los cebadores, condiciones usadas en las reacciones de PCR y tamaño de los amplicones esperados.

Resistencia a β -lactámicos

Tabla 3. Secuencia de cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a penicilina.

Cebadores (Secuencia 5'-3')	Condiciones			Referencia (Tamaño del amplicón)
<i>blaZ</i> F: CAGTTCACATGCCAAAGAG R: TACTACTCTTGCGGTTTC	94°C	3 min	1 ciclo	Schnellmann et al., 2006 (772 pb)
	94°C	1 min		
	50°C	1 min	30 ciclos	
	72°C	2 min		
	72°C	5 min	1 ciclo	

Tabla 4. Secuencia de cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a meticilina/oxacilina.

Cebadores (Secuencia 5'-3')	Condiciones			Referencia (Tamaño del amplicón)
<i>mecA</i> F: GGGATCATAGCGTCATTATTC R: AACGATTGTGACACGATAGCC	94°C	5 min	1 ciclo	Comunity reference Laboratory Antimicrobial Resistance (UE), 2009 (527 pb)
	94°C	30 seg		
	55°C	30 seg	30 ciclos	
	72°C	1 min		
	72°C	10 min	1 ciclo	
<i>mecC</i> F: GCTCCTAATGCTAATGCA R: TAAGCAATAATGACTACC	95°C	2 min	1 ciclo	Cuny et al., 2011 (304 pb)
	94°C	30 seg		
	50°C	30 seg	30 ciclos	
	72°C	30 seg		
	72°C	4 min	1 ciclo	

Resistencia a tetraciclina

Tabla 5. Secuencia de cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a tetraciclina.

Cebadores (Secuencia 5'-3')	Condiciones			Referencia (Tamaño del amplicón)
<i>tet(L)</i> F: CATTGGTCTTATTGGATCG R: ATTAACTTCCGATTTCGG	94°C	1 min	1 ciclo	Aerestrup et al., 2000 (456 pb)
	94°C	1 min		
	50°C	1 min	30 ciclos	
	72°C	1 min		
	72°C	10 min	1 ciclo	
<i>tet(K)</i> F: TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC R: GCAAACCTCATTCCAGAAGCA	94°C	1 min	1 ciclo	Aerestrup et al., 2000 (697 pb)
<i>tet(M)</i> F: GAAAAGTACTCAACCAAATA R: AGTAACGGTACTTAAATTGTTTA	94°C	1 min		Aerestrup et al., 2000 (576 pb)
	55°C	2 min	30 ciclos	
	72°C	2 min		
	72°C	10 min	1 ciclo	

Resistencia a macrólidos y lincosamidas

Tabla 6. Secuencia de cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a macrólidos y lincosamidas.

Cebadores (Secuencia 5'-3')	Condiciones			Referencia (Tamaño del amplicón)
<i>msr(A)</i> F: GCAAATGGTGTAGGTAAGACAACT R: ATCATGTGATGTAAACAAAAT	95°C	3 min	1 ciclo	Wondrack et al., 1996 (339 pb)
	93°C	30 seg		
	55°C	2 min	35 ciclos	
	72°C	1,5 min		
	72°C	5 min	1 ciclo	
<i>erm(A)</i> F: TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA R: CTTCGATAGTTTATTAATATTAG	93°C	3 min	1 ciclo	Sutcliffe et al., 1996 (645 pb)
<i>erm(B)</i> F: GAAAAGTACTCAACCAAATA R: AGTAACGGTACTTAAATTGTTTA	93°C	1 min		Sutcliffe et al., 1996 (639 pb)
	52°C	1 min	35 ciclos	
<i>erm(C)</i> F: TCAAAACATAATATAGATAAA R: GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT	72°C	1 min		Sutcliffe et al., 1996 (642 pb)
	72°C	5 min	1 ciclo	

Resistencia a aminoglucósidos

Tabla 7. Secuencia de cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a aminoglucósidos.

Cebadores (Secuencia 5'-3')	Condiciones			Referencia (Tamaño del amplicón)
<i>acc(6')</i> - <i>aph(2'')</i> F: CCAAGAGCAATAAGGGCATA R: CACTATCATAACCACTACCG	94°C	5 min	1 ciclo	Van de Klundert et al., 1993 (220 pb)
	94°C	30 seg	30 ciclos	
	60°C	45 seg		
	72°C	2 min		
<i>ant4(4')</i> -(4'') F: GCAAGGACCGACAACATTTTC R: TGGCACAGATGGTCATAACC	94°C	3 min	1 ciclo	Van de Klundert et al., 1993 (165 pb)
	94°C	30 seg	32 ciclos	
	60°C	45 seg		
	72°C	2 min		
F: GCAAGGACCGACAACATTTTC R: TGGCACAGATGGTCATAACC	72°C	5 min	1 ciclo	

Resistencia a mupirocina

Tabla 8. Secuencia de cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a mupirocina.

Cebadores (Secuencia 5'-3')	Condiciones			Referencia (Tamaño del amplicón)
<i>mup(A)</i> F: CCCATGGCTTACCAGTTGA R: CCATGGAGCACTATCCGAA	94°C	5 min	1 ciclo	Udo et al., 2003 (419 pb)
	94°C	3 min	32 ciclos	
	60°C	45 seg		
	72°C	1 min		
<i>mup(B)</i> F: CTAGAAGTCGATTTTGGAGTAG R: AGTGTCTAAAATGATAAGACGAT	72°C	2 min	1 ciclo	Seah et al., 2012 (674 pb)
	94°C	1 min	1 ciclo	
	94°C	30 seg	35 ciclos	
	53°C	30 seg		
68°C	4 min			
F: CTAGAAGTCGATTTTGGAGTAG R: AGTGTCTAAAATGATAAGACGAT	72°C	7 min	1 ciclo	

8. Tipado molecular del elemento cromosómico SCC*mec*, que incluye el gen *mecA*

Para conocer el tipo de elemento cromosómico SCC*mec*, se debe identificar por PCR el tipo de “*ccr*” y el “complejo *mec*” presente en aquellos aislados resistentes a meticilina.

Tabla 9. Secuencia de cebadores usados para determinar el tipo de SCC*mec* y condiciones de amplificación

Cebadores (Secuencia 5´-3´)	Condiciones			Referencia (Tamaño del amplicón)
<i>ccrA2-ccrB</i>	94°C	2 min	1 ciclo	Kondo et al., 2007 (937 pb)
F: TAAAGGCATCAATGCACAAACACT R: ATGCCTTGATAATAGCCITCT	94°C	2 min	30 ciclos	
	57°C	1 min		
	72°C	3 min		
	72°C	7 min	1 ciclo	
<i>ccrC</i>	94°C	5 min	1 ciclo	Witte et al., 2007 (336 pb)
F: CACTTAATCCATGTACACAG R: TTAGGAAATCTTGATGGCAA	94°C	1 min	30 ciclos	
	50°C	1 min		
	72°C	2 min		
	72°C	10 min	1 ciclo	
<i>SCCmecV</i>	94°C	5 min	1 ciclo	Zhang et al., 2005 (325 pb)
F: GAACATTGTTACTTAAATGAGCG R: TGAAAGTTGTACCCTTGACACC	94°C	45 seg	10 ciclos	
	65°C	45 seg		
	72°C	1,5min		
	72°C	7 min	1 ciclo	
	94°C	45 seg	25 ciclos	
	55°C	45 seg		
	72°C	1,5min		
	72°C	10 min	1 ciclo	

9. Estudio de la producción de bacteriocinas

Screening por el método “Spot in the lawn”

La técnica “Spot in the Lawn” consiste en enfrentar varios microorganismos productores (sembrados por picadura), con un microorganismo indicador (sembrado en capa) con el objetivo de detectar halos de inhibición nítidos que indiquen la producción de sustancias antimicrobianas. En el presente estudio se evaluó la capacidad productora de bacteriocinas en 48 aislados de *S. lugdunensis* frente a 37 microorganismos indicadores, tanto bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, representantes de distintos grupos microbianos (Tabla 10).

Tabla 10. Características de los 37 microorganismos usados como indicadores.

Código de Referencia*	Microorganismo	Nº de cepas	Fenotipo de resistencia de interés **
C2381, C3930, C2382-ST71	<i>S. pseudintermedius</i>	3	Resistente a meticilina
C3468, C8187, C2915 C2912, C8189, C3917 C8188, C8368, C3007.	<i>S. pseudintermedius</i>	9	Sensible a meticilina
C9927, C9981, C9159, C10107, C9954, C9780	<i>S. lugdunensis</i>	6	
C1570-ST398, C7246, C5313-t067	<i>S. aureus</i>	3	Resistente a meticilina
ATCC29213	<i>S. aureus</i>	1	Sensible a meticilina
C2709, C9780, C9459, C2663	Staphylococcus spp: <i>S. haemolyticus, S. sciuri, S. delphini, S. epidermidis</i>	4	
C232, C1436, C1433	<i>E. faecium, E. hirae, E. durans</i>	3	Resistente a vancomicina (<i>vanA</i>)
C3735	<i>E. faecalis</i>	1	Resistente a vancomicina (<i>vanB2</i>)
ATCC29212, C1232, C2310	Enterococcus spp: <i>E. faecalis, E. casseliflavus, E. gallinarum</i>	3	Resistente a vancomicina (<i>vanC1/C2</i>)
C157	<i>Micrococcus luteus</i>	1	
C137	<i>Listeria monocytogenes</i>	1	
ATCC25922	<i>Escherichia coli</i>	1	
C3282	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO	1	

*En algunos casos se indica el tipo spa o la secuencia tipo (ST) de la bacteria.

**Solamente se indican algunos fenotipos de resistencia relevantes, como es la meticilina o vancomicina.

Para ello, se prepararon los siguientes medios:

- Placas de medio sólido TSA (Tryptic Soy Agar, 15mL) suplementado con 0,3% de extracto de levadura
- Tubos de BHI líquido (5mL)
- Tubos de medio semisólido TSB (Tryptic Soy Broth, 5mL), suplementado con 0,7% de agar y 0,3% de extracto de levadura

En primer lugar, se sumergieron los tubos de medio semisólido “TSB” en un baño a 90°C, hasta que estos queden completamente fundidos. Paralelamente se resuspendió un cultivo fresco de microorganismo indicador en medio líquido BHI (turbidez 0,5 MacFarland). Posteriormente, se adicionaron 10µL de la disolución de microorganismo indicador en los tubos de TSB semisólido fundido (≈40°C), se agitó suavemente, se vertió en las placas de medio sólido TSA y se dejó secar.

Finalmente, se sembraron en las placas de medio sólido (TSA + TSB) por picadura los microorganismos potencialmente productores de bacteriocinas (Bac+). Dichos microorganismos habían sido previamente cultivados (24h) en medio BHI sólido. La siembra por picadura se realizó siguiendo la siguiente plantilla de referencia (Figura 5), donde cada casilla se corresponde con un microorganismo productor.

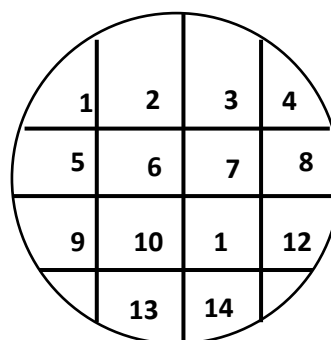


Figura 5. Esquema de la plantilla guía utilizada en la siembra por picadura del método “Spot in the lawn”

Las placas fueron incubadas a 37°C valorándose la producción de sustancias antimicrobianas a las 24 y 48 horas en función de la presencia/ausencia de halo nítido de inhibición alrededor de la bacteria productora inoculada y de su diámetro (ϕ).

Obtención del sobrenadante libre de células de bacterias productoras de bacteriocinas y estudio de su actividad antimicrobiana

Se seleccionaron las cepas de *S. lugdunensis* con mayor producción de bacteriocinas de las testadas por el método de “Spot in the lawn” y se analizó si las bacteriocinas eran secretadas al medio externo. Para ello, se obtuvo el sobrenadante de la cepa productora tras centrifugación y se dividió en dos alícuotas, una de ellas se sometió a hervido (1 y 5 minutos) y otra se mantuvo sin hervir.

A continuación, se testó la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células, tanto hervidos como sin hervir, frente a una bacteria indicadora. Para ello se prepararon las placas con la bacteria indicadora sembrada en capa (tal y como se indicó anteriormente) y se realizaron pocillos en el agar donde se incluyeron 50µL del sobrenadante libre de células en las diferentes condiciones testadas (sin hervir o con

hervido de 1 o 5 minutos), y tras incubación a 37°C durante 24h, se analiza la formación de halos de inhibición.

Por otro lado, los sobrenadantes centrifugados, centrifugados y hervidos (1 minuto) y centrifugados y filtrados fueron concentrados mediante liofilización. Para ello, se prepararon criotubos que fueron congelados a -80°C y posteriormente liofilizados en un equipo Omnitronics L-230, siguiendo las instrucciones del fabricante. La actividad inhibitoria del material liofilizado se testó sobre placas de medio sólido preparadas según el método "Spot in the Lawn". En primer lugar, se añadieron 100µL (dilución 1:10) de medio líquido TSB al criotubo, resuspendiendo el polvo hasta obtener una disolución homogénea. A continuación, se añadieron 25µL de la disolución de material liofilizado a discos blancos estériles, que, tras su secado, fueron incubados en la estufa a 37°C durante 24 horas para analizar la actividad antimicrobiana frente a la bacteria indicadora seleccionada.

10. Estudio de los elementos génicos asociados a la producción de bacteriocinas

Diseño de cebadores

Se diseñaron cebadores para el estudio de la presencia del gen de la lugdunina *lugD*, a partir de la secuencia de referencia de dicho gen, que forma parte del *clúster* génico implicado en la formación de la proteína no ribosomal lugdunina, depositada en la base de datos del NCBI (NC_017353.1). Para ello, se usó el programa Primer-BLAST. Los cebadores seleccionados fueron sintetizados por la empresa SIGMA y permitían la amplificación de un fragmento de 189 pb.

Optimización de las condiciones para la PCR

Para la amplificación del gen *lugD* se partió inicialmente de las condiciones estándar siendo posteriormente optimizadas tal y como se indica en la tabla 11.

Tabla 11. Secuencia de cebadores y condiciones de amplificación de *lugD*.

Cebador (Secuencia 5´-3´)	Condiciones			Referencia (Tamaño del amplicón)
<i>lugD</i>	94°C	7 min	1 ciclo	(189 pb)
F: TTCGGGAACTACTGGAATGC _(Tm=60,1°C)	94°C	1 min	30 ciclos	
R: AAATGCAATGTCCCTCCAAC _(Tm=59,8°C)	57°C	1 min		
	72°C	1 min	1 ciclo	

11. Secuenciación y análisis de las secuencias

La secuenciación se llevó a cabo según el método de secuenciación Sanger. La empresa encargada fue Cogenics (United Kindom), la cual utiliza un sistema automático ABI Prism 3730 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Esta técnica se utilizó para el análisis de los amplicones obtenidos para los genes *lugD* y *mup(B)*, así como para verificar algunos productos de PCR correspondientes a los genes *tet(L)* y *mup(A)*. Para el análisis de las secuencias, se analizaron los cromatogramas resultantes y se utilizaron los siguientes programas:

- BLAST, Basic Local Alignment Search Tool para comparar la secuencia nucleotídica de interés con las secuencias de nucleótidos y proteínas depositadas en GeneBank, base de datos del NCBI: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- EMBOSS Needle, para alinear pares de secuencias tanto de DNA como de proteínas y verificar su similitud: https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/
- Clustal Omega, para el alineamiento progresivo de secuencias proteicas. También puede ser usado en el caso de secuencias génicas: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolresult.ebi?jobId=clustalo-120180625-161458-0188-87652942-p2m>

12. Análisis estadísticos

Habida cuenta del tamaño muestral y de las categorías en las se podrían estratificar los datos, no se ha llevado a cabo el análisis inferencial puesto que la potencia de las pruebas sería muy baja. Por esta razón, solo se llevó a cabo el análisis descriptivo, suficiente en esta primera aproximación para entender el objeto de estudio.

RESULTADOS

1. Cepas bacterianas incluidas en el estudio

En el presente estudio se trabajó con 48 cepas de *S. lugdunensis*, de orígenes muy diversos (Figura 6): exudados, sangre, orina, herida quirúrgica, muestras epidemiológicas, catéter e infección de piel y partes blandas (IPPB).

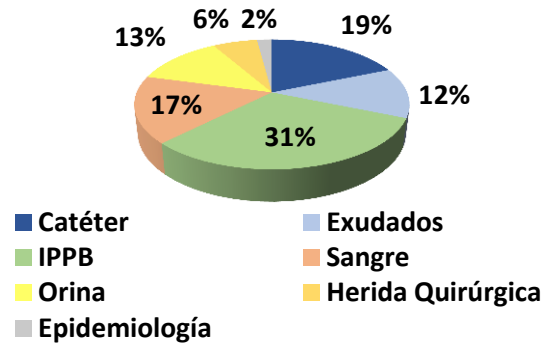


Figura 6. Origen de las 48 cepas de *S. lugdunensis*.

Dichos aislados, representaron el 3,4% del total de SCoN obtenidos de muestras clínicas en el periodo analizado. Teniendo en cuenta el porcentaje de aislados de *S. lugdunensis* identificados en relación con el origen de la muestra, se comprobó que los aislados procedentes de IPPB, junto con los aislados procedentes de catéter y sangre, fueron los más frecuentes.

2. Evaluación de la resistencia a antibióticos en cepas de *S. lugdunensis*

La confirmación de la identidad de los aislados de *S. lugdunensis* procedentes de los dos hospitales, fue realizada por MALDI-TOF en la Universidad de La Rioja (UR) lo que permitió descartar 3 de las cepas recibidas. Tras la confirmación de los fenotipos de resistencia aportados por los hospitales para estas cepas, por medio del método de difusión disco-placa en la UR, se procedió a identificar el genotipo de resistencia asociado en cada caso mediante la técnica de PCR/secuenciación (Tabla 12).

En la tabla 12 se presenta el fenotipo y genotipo de resistencia de las 48 cepas clínicas de SL, así como los genes de resistencia a antibióticos detectados. Se observó que del total de las 48 cepas analizadas, 33 presentaron resistencia al menos a uno de los antibióticos testados (69%), siendo las 15 cepas restantes sensibles a todos ellos (31%).

Asimismo, 3 de las cepas caracterizadas, obtenidas a partir de aislados de IPPB presentaron un fenotipo de multi-resistencia (6%), lo que implica resistencia al menos a 3 familias de antibióticos.

Tabla 12. Características de las 48 cepas clínicas de *S. lugdunensis* analizadas en este estudio.

Nº cepa	Origen (nº aislados)	Fenotipo de resistencia ¹	Genotipo de resistencia	Tipo SCCmec
C9891	IPPB	ERI-CLI-TET-FOS	<i>erm(C), msr(A), tet(K),</i>	
C10112	IPPB	PEN-ERI-CLI	<i>erm(C), msr(A)</i>	
C9927	IPPB	ERI-CLI-MUP-FOS	<i>erm(C), msr(A), mup(A)</i>	
C9897	IPPB	PEN-AMP-OXA-TOB	<i>blaZ, mecA, ant4(4')-(4''), acc(6') - aph(2'')</i>	SCCmecV
C10113	IPPB	GEN-TOB-FOS	<i>ant4(4')-(4''), acc(6') - aph(2'')</i>	
C9890	IPPB	PEN-AMP-FOS	<i>blaZ</i>	
C9892	IPPB	PEN-AMP	<i>blaZ</i>	
C9893	IPPB	PEN-AMP	<i>blaZ</i>	
C10053	IPPB	PEN-AMP	<i>blaZ</i>	
C9342	IPPB	FOS	-	
C10341	IPPB	FOS	-	
C10510	IPPB	FOS	-	
C9145	Catéter	PEN-AMP	<i>blaZ</i>	
C9144	Sangre	PEN-AM-TET	<i>blaZ, tet(K)</i>	
C9912	Sangre	PEN-AMP	<i>blaZ</i>	
C9143	Sangre	PEN-AMP	<i>blaZ</i>	
C9142	Sangre	PEN-AMP	<i>blaZ</i>	
C9159	Sangre	PEN-FOS	<i>blaZ</i>	
C9925	Sangre	PEN	<i>blaZ</i>	
C10107	Sangre	PEN	<i>blaZ</i>	
C10109	Sangre	PEN	<i>blaZ</i>	
C10108	Sangre	FOS	-	
C9889	Orina	PEN-AMP-TET	<i>blaZ, tet(K)</i>	
C10342	Orina	PEN-AMP	<i>blaZ</i>	
C9980	Orina	PEN-AMP	<i>blaZ</i>	
C9981	Orina	PEN-AMP	<i>blaZ</i>	
C10247	Orina	FOS	-	
C10052	Exudado	PEN-AMP	<i>blaZ</i>	
C10320	Exudado	PEN-AMP	-	
C9150	Exudado	FOS	-	
C9343	Exudado	FOS	-	
C9894	Herida quirúrgica	ERI-CLI	<i>msr(A)</i>	
C10513	Epidemiología	PEN-AMP-FOS	<i>blaZ</i>	
	IPPB (4)	Sensible	-	
	Catéter (7)	Sensible	-	
	Orina (1)	Sensible	-	
	Exudado (1)	Sensible	-	
	Herida (2)	Sensible	-	

¹ Fenotipo. FOS: fosfomicina; PEN: penicilina; AMP: ampicilina; TET: tetraciclina; ERI: eritromicina; CLI: clindamicina; OXA: oxacilina; TOB: tobramicina; GEN: gentamicina; MUP: mupirocina.

Teniendo en cuenta los resultados de la tabla 12 se calcularon los porcentajes de resistencia a cada uno de los antibióticos testados (Figura 7). De este modo, se comprobó que las resistencias mayoritarias fueron frente a penicilina y fosfomicina con un 46% y 27% respectivamente.

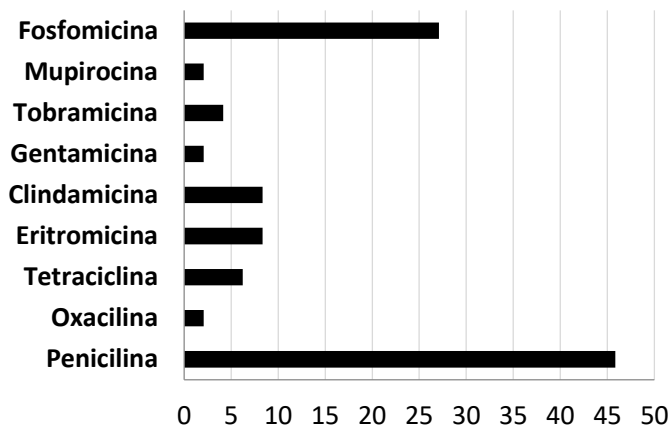


Figura 7. Porcentaje de resistencia a antibióticos de las 48 cepas testadas.

Para el resto de los antibióticos las resistencias fueron bajas (rango 2%-8%). Sin embargo, cabe destacar la presencia de la cepa resistente a oxacilina SLRM C9897 (2%), por ser una de las resistencias de mayor interés clínico. Se confirmó que dicha cepa era portadora del gen *mecA*, el cual estaba incluido en el elemento cromosómico SCCmec tipo V (Tabla 12).

Por otro lado, se evaluó el porcentaje de cepas sensibles y resistentes con respecto a cada uno de los orígenes anteriormente comentados (Figura 8).

De este modo, se detectó una alta proporción de cepas resistentes, destacando con un 100% de resistencia los aislados procedentes de sangre y muestras epidemiológicas. En cuanto a los aislados de los dos orígenes más frecuentes, IPPB y catéter, se identificaron porcentajes de resistencia notablemente diferentes: 80% y 20% respectivamente.

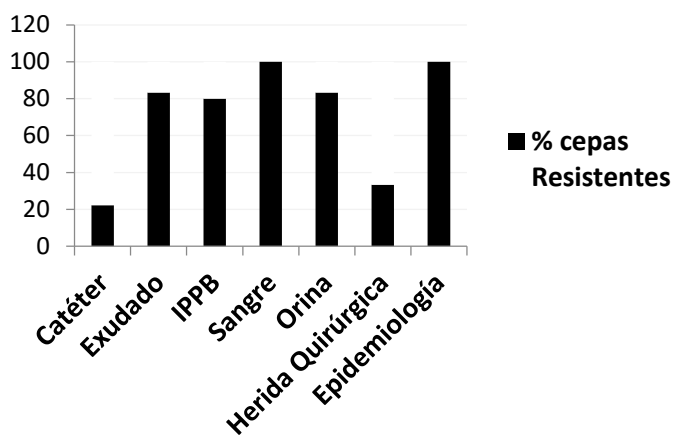


Figura 8. Porcentaje de cepas sensibles y resistentes en cuanto a su origen de aislamiento.

Atendiendo a los resultados mostrados en la tabla 12, se observa una asociación entre cada uno de los fenotipos de resistencia y su correspondiente genotipo, estableciéndose las siguientes relaciones: 1) resistencia a penicilina y presencia del gen *blaZ*, codificante de una beta-lactamasa; 2) resistencia a oxacilina y presencia del gen *mecA*, codificante de la proteína modificada PBP2a; 3) resistencia a tetraciclina y presencia el gen *tet(K)*, codificante de bombas de eflujo dependientes de energía 4) resistencia a eritromicina y clindamicina y presencia de los genes *erm(C)* y/o *msr(A)*,

codificante de una enzima metilasa Erm y de una bomba de eflujo, respectivamente; 5) resistencia a tobramicina y presencia del gen *ant4(4')-(4'')*, codificante e una enzima nucleótidotransferasa modificante de aminoglucósidos; 6) Resistencia a gentamicina y presencia del gen de la enzima bifuncional *acc(6') - aph(2'')* ; 7) resistencia a mupirocina y presencia del gen *mup(A)*. En la figura 9 se muestran algunos de los resultados de la electroforesis en gel de agarosa.



Figura 9. Ejemplo representativo de los resultados de la identificación de genes de resistencia a antibióticos por medio de PCR y electroforesis en gel de agarosa. **A.** Gen *blaZ* (C+/C+/C-/C9143/C9142/C9144); **B.** Gen *mecA* (C+/C-/C9897); **C.** Gen *erm(C)* (C+/C-/C10112/C9894/C9927/C9891).

Para confirmar algunos de los genes de resistencia a tetraciclina y mupirocina detectados mediante PCR, se procedió a la secuenciación de sus amplificaciones. Con respecto a la resistencia a tetraciclina, se obtuvieron bandas del tamaño esperado por PCR para los genes *tet(K)*, *tet(L)* y *tet(M)*. Tal y como se muestra en la tabla 12, se confirmó la presencia del gen *tet(K)* mientras que en el caso del gen *tet(M)* no se detectaron bandas en el gel de electroforesis.

En cuanto al gen *tet(L)*, el análisis de los amplicones en el gel de electroforesis mostró bandas poco nítidas en las 3 cepas resistentes a tetraciclina (C9144, C9889, C9891), por lo que se evaluó su presencia por secuenciación. Posteriormente, las secuencias nucleotídicas resultantes se compararon con la base de datos tanto de nucleótidos como de proteínas por medio del programa BLAST.

En todos los casos se observó que las secuencias nucleotídicas amplificadas y secuenciadas, se correspondían con la secuencia de un gen codificante para un transportador de membrana ABC. Por otro lado, el programa EMBOSS Needle demostró que los amplicones de dichas cepas de *S. lugdunensis* poseían un porcentaje de identidad muy alto cercano al 94% (Figura 10), por lo que se deberán realizar estudios avanzados en el futuro que clarifiquen las posibles asociaciones entre el transportador ABC y el gen de resistencia a tetraciclina *tet(L)*.

En cuanto a la resistencia a mupirocina, los resultados de la secuenciación confirmaron la presencia del gen asociado a alta resistencia *mup(A)*, el cual se encuentra habitualmente en elementos móviles de transmisión génica.

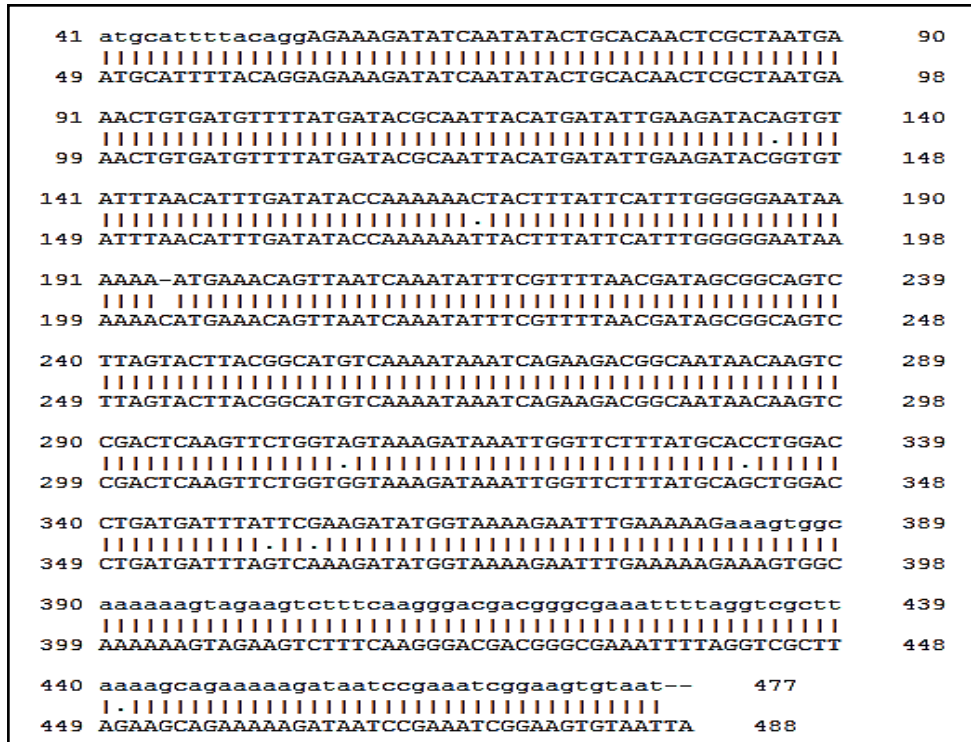


Figura 10. Alineación entre las secuencias de los amplicones de *tet(L)* de las cepas resistentes a tetraciclina: C9889 y C9144.

3. Estudio de la producción de bacteriocinas en cepas de *S. lugdunensis*

Screening de bacteriocinas por el método "Spot in the lawn"

La evaluación de la posible producción de bacteriocinas en cepas de *S. lugdunensis*, se realizó por el método "Spot in the lawn". En la figura 11, queda representado un ejemplo de este método, que permite evaluar la producción de bacteriocinas de una gran diversidad de bacterias frente a microorganismos indicadores de interés como es el caso de SARM.

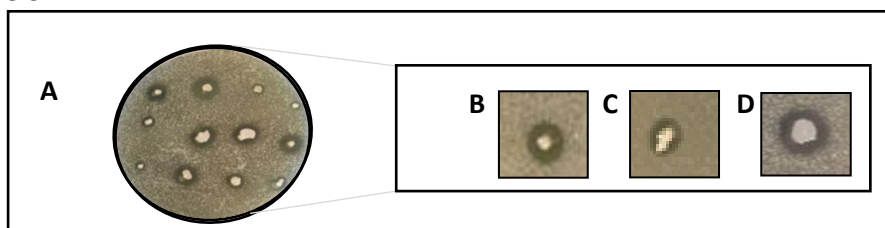


Figura 11. Ejemplo representativo de la producción de bacteriocinas detectada por medio del sistema "Spot in the lawn". Actividad inhibitoria de la cepa de *S.lugdunensis* productora de bacteriocinas (C9954) frente a cuatro microorganismos indicadores de referencia: **A.** SPSM; **B.** SPRM; **C.** *S. lugdunensis*; **D.** SARM

En primer lugar, se realizó un screening donde se evaluó la capacidad de producción de bacteriocinas de las 48 cepas en estudio frente a 12 bacterias indicadoras Gram-positivas y Gram-negativas: *Micrococcus luteus* C157, *Staphylococcus aureus*

ATCC29213 sensible a meticilina (SASM), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) C1570-ST398 , SARM-mecC C7246, SARM-t067 C5313, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Listeria monocytogenes* C137, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* PAO C3282, *S. pseudintermedius* resistente a meticilina C2381 (SPRM), *S. pseudintermedius* sensible a meticilina C3468 (SPSM), *S. epidermidis* C2663 (Tabla 13).

Los análisis de la producción de bacteriocinas se realizaron considerando como bacterias altamente productoras aquellas que poseían entre 7 y 9mm de halo nítido de inhibición (***), bacterias de producción media si producían halos de ϕ menor (** ó *) y bacterias de producción nula (-) en aquellos casos en los que no se detectó halo.

Los resultados mostrados en la tabla 13, revelaron diferencias notables en los niveles de producción. Mientras que la actividad antimicrobiana de las cepas de *S. lugdunensis* fue nula frente a *E. coli*, *P. aeruginosa* y *L. monocytogenes* se detectaron niveles de producción claros interesantes frente al resto de microorganismos indicadores testados, incluyéndose entre ellos *E. faecalis*, *M. luteus* y diversas especies de estafilococos.

En base a ello, se realizó un segundo screening utilizando en este caso como bacterias indicadoras una amplia batería de enterococos (6) y estafilococos (19), con gran diversidad genética incluyéndose entre ellos, bacterias multi-resistentes (tabla 14). Los resultados de este segundo screening permitieron identificar 12 cepas de *S. lugdunensis* claramente productoras por expresar actividad antimicrobiana frente a al menos más de 3 microorganismos indicadores distintos. Sin embargo, aproximadamente un 75% de los aislados mostraron producción nula de bacteriocinas.

Las 12 cepas de *S. lugdunensis* productoras de bacteriocinas identificadas fueron activas frente a *S. pseudintermedius* SPRM y SPSM así como para otros indicadores como: *S. aureus* SARM y SASM y enterococos vanA/vanB2 (Tabla 15). Entre ellas, cabe destacar la cepa de *S. lugdunensis* C9954 por su capacidad altamente productora de bacteriocinas, presentando actividad inhibitoria frente a más del 70% de las bacterias indicadoras testadas, incluyendo bacterias multi-resistentes.

Tabla 13. Actividad antimicrobiana de las 48 cepas clínicas de *S. lugdunensis* frente a 12 microorganismos indicadores.

	SARM (3)									SASM	SPRM	SPSM
	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>						
C9954	***	**	***	*	-	-	**	**	***	***	**	***
C9161	-	*	**	-	-	-	-	-	-	**	**	***
C9148	*	-	**	-	-	-	-	-	-	**	**	***
C10107	-	*	*	-	-	-	*	*	**	-	-	***
C9894	**	-	**	-	-	-	-	-	-	*	*	***
C9980	-	-	*	-	-	-	-	-	**	*	-	*
C9890	**	-	-	-	-	-	**	-	-	-	-	*
C9893	*	-	-	-	-	-	-	-	-	*/**	-	*
C9159	*	*	-	-	-	-	*	-	**	-	*	*
C9892	**	-	-	-	-	-	*	-	-	*/**	-	*
C10052	***	-	-	-	-	-	*	*	-	*	-	*
C9145	-	-	-	-	-	-	-	-	*	*	-	-
C9142	-	-	-	-	-	-	**	-	-	-	-	-
C9143	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9149	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9151	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9146	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-
C9147	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-
C9342	-	-	-	**	-	-	-	-	-	-	-	-
C9925	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9927	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9981	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9982	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9911	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-
C9912	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9897	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9896	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9895	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9891	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9889	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9343	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C10053	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C10042	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C10109	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C10108	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C10113	NE	NE	-	-	-	NE	-	-	NE	-	-	-
C10112	NE	NE	-	-	-	NE	-	-	NE	-	-	-
C10320	NE	NE	-	-	-	NE	-	-	NE	-	-	-
C10343	NE	NE	-	-	-	NE	-	-	NE	*	-	-
C10341	NE	NE	-	-	-	NE	-	-	NE	-	-	-
C10342	NE	NE	-	-	-	NE	-	-	NE	-	-	-
C10247	NE	NE	-	-	-	NE	-	-	NE	-	-	-
C10248	NE	NE	-	-	-	NE	-	-	NE	-	-	-
C10510	NE	NE	-	-	-	NE	-	-	NE	-	-	-
C10511	NE	NE	-	-	-	NE	-	-	NE	-	-	-
C10513	NE	NE	-	-	-	NE	-	-	NE	-	-	-

NE: producción de antimicrobianos No Evaluada.

Tabla 14. Actividad antimicrobiana de las 48 cepas clínicas de *S. lugdunensis* frente a 25 microorganismos indicadores de distintas especies de estafilococos y enterococos

	SPRM (2)		SPSM (8)		<i>S. lugdunensis</i> (6)						<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecium vanA</i>	<i>E. hirae vanA</i>	<i>E. durans vanA</i>	<i>E. faecalis vanB2</i>	<i>S. sciuri</i>	<i>S. delphini</i>	<i>S. haemolyticus</i>		
C9954	**	**	**	-	*	***	***	**	***	***	**	-	-	-	-	-	*/**	-	**	**	*
C9161	**	**	-	*	-	***	***	**	***	***	**	-	-	-	-	-	**	-	*	-	-
C9148	*	**	-	-	-	*	***	*	***	***	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C10107	-	**	-	-	-	***	***	-	*	***	-	-	-	-	-	-	-	**	*	-	-
C9894	-	*	-	-	-	**	***	-	**	**	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-
C9980	-	-	-	-	-	*	***	-	*	***	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9890	-	*	-	-	-	*	**	-	*	***	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-
C9893	-	-	-	-	*	-	*	-	*	***	-	-	-	-	-	-	-	**	**	-	-
C9159	-	*	-	-	-	-	*	-	*	***	-	-	-	-	-	-	-	-	**	**	-
C9892	-	-	-	-	-	*	*	-	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	**	**	-
C10052	-	-	-	-	-	-	*	-	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9145	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9142	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9143	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9149	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9151	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**
C9146	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9147	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9342	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9925	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9927	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9981	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 15. Producción de bacteriocinas de 12 aislados de *S. lugdunensis* frente a 37 bacterias Gram-positivas y Gram-negativas

		Microorganismos productores: nº de cepas indicadoras frente a las cuales se detecta actividad											
		C9954	C9161	C9148	C10107	C9894	C9980	C9890	C9893	C9159	C9892	C10052	C9145
Microorganismos indicadores (Nº aislados)	<i>S. pseudintermedius</i> SPRM (3)	3	3	3	1	2	0	1	0	2	0	0	0
	<i>S. pseudintermedius</i> SPSM (9)	9	9	9	8	8	8	8	7	7	8	7	4
	<i>S. lugdunensis</i> (6)	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	SASM (1)	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1
	SARM (3)	3	0	0	3	0	1	1	0	2	1	2	1
	<i>S. epidermidis</i> (1)	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0
	<i>S. sciuri</i> (1)	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0
	<i>S. delphini</i> (1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>S. haemolyticus</i> (1)	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Enterococcus vanA/vanB2</i> (4)	2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	<i>Enterococcus spp.</i> (3)	3	2	1	1	0	0	0	2	2	0	1	0
	<i>Micrococcus luteus</i> (1)	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Listeria monocytogenes</i> (1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>E. coli</i> (1)/ <i>P. aeruginosa</i> (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total Staphylococcus (26)	22	16	16	13	13	11	12	9	13	12	11	6
	Total Enterococcus(7)	5	3	1	1				3	2		1	

Obtención del sobrenadante libre de células de bacterias productoras de bacteriocinas y estudio de su actividad antimicrobiana

Una vez identificada la cepa de *S. lugdunensis* altamente productora de sustancias antimicrobianas (C9954), se quiso determinar si esta era liberada al medio extracelular. Para ello se obtuvo el sobrenadante libre de células y se evaluó su actividad inhibitoria (Figura 12). Para ello, se sometió el sobrenadante a diferentes condiciones: centrifugación para eliminar el componente celular o centrifugación combinada con hervido (1 y 5 minutos), a fin de comprobar si se podía detectar la actividad antimicrobiana en el medio extracelular libre de células.

Se seleccionó como microorganismo indicador la especie *S. pseudintermedius*, por ser esta especie la que mostró más sensibilidad a la actividad antimicrobiana expresada por *S. lugdunensis* en los screenings realizados mediante el test "Spot in the lawn" (Tabla 15). En este estudio, se testaron como indicadoras dos cepas de *S. pseudintermedius* una SPRM y otra SPSM.

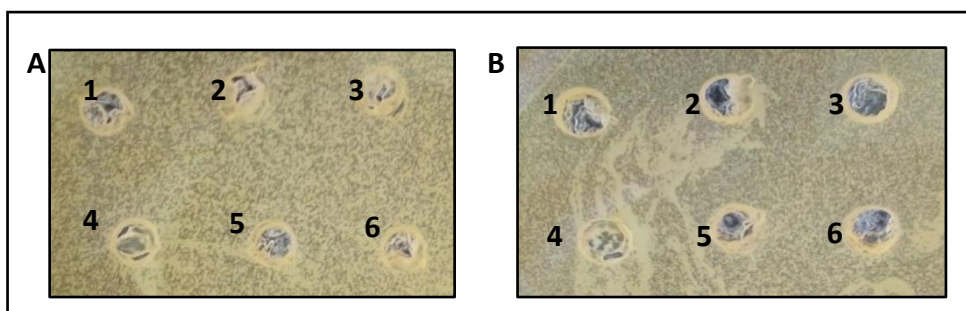


Figura 12. Actividad inhibitoria del sobrenadante. A. Microorganismo indicador SPRM. Sobrenadante de SL: 1,2. Centrifugado; 3,4 Centrifugado y hervido 1 minuto; 5,6 Centrifugado y hervido 5 minutos. **B. Microorganismo indicador SPSM.** Sobrenadante de SL: 1,2. Centrifugado; 3,4 Centrifugado y hervido 1 minuto; 5,6 Centrifugado y hervido 5 minutos.

Los resultados de este estudio, hicieron patente la ausencia de actividad antimicrobiana en el sobrenadante de la cepa de *S. lugdunensis* (C9954) en las tres condiciones empleadas. Con el objetivo de comprobar si el factor concentración podía estar influyendo en la actividad inhibitoria del compuesto antimicrobiano, se procedió a concentrar el sobrenadante por liofilización (Figura 13). Para ello, el sobrenadante fue sometido a las siguientes condiciones antes de ser liofilizado: centrifugado, centrifugado y hervido (1 minuto) y por último centrifugado y filtrado. Se incorporó la filtración como sistema para eliminar las células de *S. lugdunensis* del sobrenadante, evitando así la fase de hervido, la cual podía afectar a la actividad inhibitoria de la bacteriocina en estudio.

En este caso, se evaluó la actividad inhibitoria del sobrenadante liofilizado tanto de *S. lugdunensis* (C9954), bacteria altamente productora de bacteriocinas, como de *S. pseudintermedius* SPSM (C8189). Esta cepa fue usada como indicador y productor en screenings adicionales realizados en el laboratorio, detectándose así producción de bacteriocinas frente a microorganismos de su misma especie y otras bacterias Gram-negativas o Gram-positivas, como es el caso de *S. delphini*.

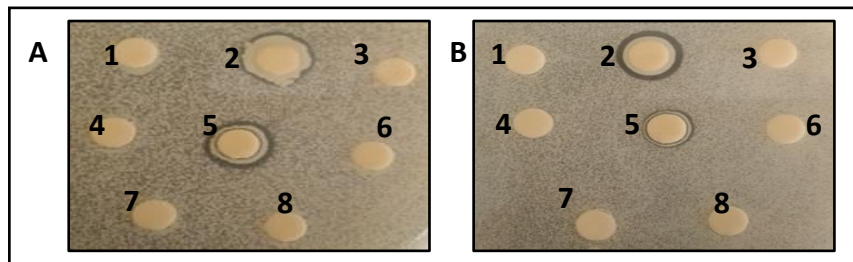


Figura 13. Actividad inhibitoria del sobrenadante concentrado por liofilización.
A. Microorganismo indicador SPRM. Producto liofilizado de SP: 1. Centrifugado y hervido; 2 Centrifugado; 3,4. Centrifugado y filtrado. Producto liofilizado de SL: 5. Centrifugado; 6. Centrifugado y hervido 1 minuto; 7,8. Centrifugado y filtrado.
B. Microorganismo indicador SPSM. El orden de los números es equivalente.

Los resultados mostrados en la Figura 13, confirman los halos nítidos de inhibición identificados previamente por el método “Spot in the lawn”, en aquellos casos en los que el sobrenadante fue únicamente centrifugado antes de la liofilización. Por otro lado, atendiendo a las condiciones de hervido y filtrado, no se observa en ninguna de ellas ni crecimiento bacteriano ni halo de inhibición. Sin embargo, en los extractos no sometidos a hervido se detecta crecimiento alrededor de los discos que podrían indicar la presencia de células viables en el extracto que podrían ser responsables de las actividades antimicrobianas observadas.

Comparando la actividad del sobrenadante centrifugado y liofilizado de los microorganismos productores (*S. lugdunensis* y *S. pseudintermedius*) frente a los indicadores SPRM y SPSM, se observa que *S. lugdunensis* posee mayor actividad frente a SPRM. Por el contrario, si bien *S. pseudintermedius* tiene mayor crecimiento al co-cultivarse con SPRM, su halo de inhibición es mayor frente a SPSM.

4. Estudio de los elementos génicos asociados a la producción de bacteriocinas

Se ha descrito en la literatura la expresión de la bacteriocina lugdunina por algunas cepas de *S. lugdunensis*. La lugdunina es un péptido de síntesis no ribosomal, en cuya formación intervienen una serie de proteínas codificadas en un operón, formando parte del mismo el gen *lugD*. Este operón está presente en todos los aislados de dicha especie bacteriana, aunque se ha observado que modificaciones en *lugD* pueden ser fundamentales en la síntesis de lugdunina [46].

En base a ello, se procedió a identificar por PCR la presencia del gen *lugD* en las 48 cepas de *S. lugdunensis* en estudio, usando para ello los cebadores diseñados en este trabajo que amplifican un fragmento de 189 pb. Mientras que el gen *lugD* fue detectado en el 100% de las cepas de *S. lugdunensis* que expresaban actividades antimicrobianas (Figura 14) sólo el 75% de las cepas que no expresaban actividades antimicrobianas.

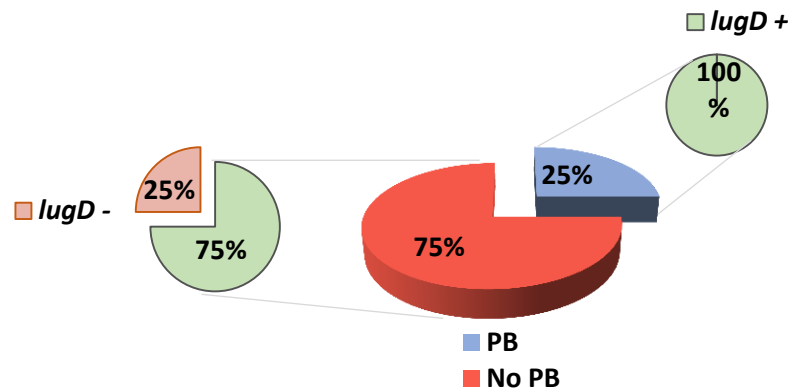


Figura 14. Presencia del gen *lugD* (%) en las 48 cepas clínicas de *S. lugdunensis*, tanto productoras de bacteriocinas (PB) como no productoras (No PB).

Con el objetivo de confirmar la identidad de los amplicones *lugD* obtenidos por PCR y de verificar las posibles modificaciones a nivel de nucleótido o de aminoácido, se procedió a la secuenciación de los productos de PCR de dos cepas productoras de bacteriocinas (C9954, C9961) y de dos cepas no productoras (C9981, C9146).

En primer lugar, se compararon las secuencias nucleotídicas amplificadas con la base de datos de nucleótidos del NCBI por medio del programa BLAST, observándose en todos los casos altos porcentajes de identidad (más del 90%) con el gen *lugD* de *S. lugdunensis*. Sin embargo, al evaluar las alineaciones se detectaron en las secuencias espacios blancos y mutaciones, por lo se procedió a analizar los cromatogramas obtenidos en la secuenciación de los amplicones de *lugD* en estudio y a la corrección de los mismos (Figura 15).

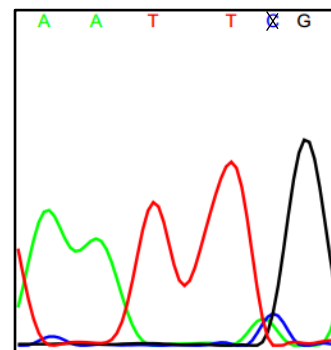


Figura 15. Ejemplo de análisis y corrección de los cromatogramas obtenidos.

Tras la corrección de las secuencias nucleotídicas de *lugD* de las cepas (C9954, C9961, C9981, C9146), se realizó una comparación múltiple con respecto a la secuencia de referencia (NC_017353.1), comprendida entre las bases 876925 y 878664 de *S. lugdunensis* N920143. Para ello, se utilizó el programa Clustal Omega y se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 16, en la cual se hace patente la semejanza entre todas las secuencias comparadas.

N920143	TTCGGGA	ACTACTGGAATGCCAAAAGGAGTCATAGAATCTCATTATCAAGTTGTGAACAC	60
C9954	-----	-----TCAAGTTGTGAACAC	15
C9961	-----	-----TATCAAGTTGTGAACAC	17
C9981	-----	-----TTATCAAGTTGTGAACAC	18
CC9146	-----	-----TTATCAAGTTGTGAACAC	18

N920143	CATCTTCGATTTAATTGAAAGATTTGATTTAGATGATACTGATTATTTTTTAAATCTATC	120	
C9954	CATCTTCGATTTAATTGAAAGATTTGATTTAGATGATACTGATTATTTTTTAAATCTATC	75	
C9961	CATCTTCGATTTAATTGAAAGATTTGATTTAGATGATACTGATTATTTTTTAAATCTATC	77	
C9981	CATCTTCGATTTAATTGAAAGATTTGATTTAGATGATACTGATTATTTTTTAAATCTATC	78	
CC9146	CATCTTCGATTTAATTGAAAGATTTGATTTAGATGATACTGATTATTTTTTAAATCTATC	78	

N920143	ATCCCTATCATTGATTTAAGCATTTTTGATATATTTGCCTCAATAATTGTTGGAGGGAC	180	
C9954	ATCCCTATCATTGATTTAAGCATTTTTGATATATTTGCCTCAATAATTGTTGGAGGGAC	135	
C9961	ATCCCTATCATTGATTTAAGCATTTTTGATATATTTGCCTCAATAATTGTTGGAGGGAC	137	
C9981	ATCCCTATCATTGATTTAAGCATTTTTGATATATTTGCCTCAATAATTGTTGGAGGGAC	138	
CC9146	ATCCCTATCATTGATTTAAGCATTTTTGATATATTTGCCTCAATAATTGTTGGAGGGAC	138	

N920143	ATTGCATTT---	189	
C9954	ATTGCATTTAGAA	148	
C9961	ATTGCATTTAGAA	150	
C9981	ATTGCATTTAGAA	151	
CC9146	ATTGCATTTAGAA	151	

Figura 16. Comparación de las secuencias de nucleótidos del gen *lugD* entre la secuencia de referencia (N920143) y las cepas C9954, C9961, C9981 y C9146.

Por otro lado, para identificar posibles cambios a nivel de aminoácidos, se comparó cada una de las secuencias de nucleótidos mostradas en la Figura 16 con la base de datos de proteínas del NCBI con el programa BLAST. En así como se evidenció que los amplicones de *lugD* de las cepas productoras y no productoras se corresponden con el péptido de síntesis no ribosomal LugD con número de referencia (WP_002478846.1).

A continuación, se realizó la comparación de dichas secuencias de aminoácidos por medio del programa Clustal Omega para confirmar su nivel de identidad (Figura 17), confirmándose así que se trata del mismo fragmento nucleotídico y peptídico que participa en la síntesis de lugdunina.

N920143	SGTTGMPKGVIESHYQVVNTIFDLIERFDLDDTDYFLNLSLSFDLSIFDIFASIIVGGT	60
C9954	-----QVVNTIFDLIERFDLDDTDYFLNLSLSFDLSIFDIFASIIVGGT	45
C9961	-----YQVVNTIFDLIERFDLDDTDYFLNLSLSFDLSIFDIFASIIVGGT	46
C9981	-----YQVVNTIFDLIERFDLDDTDYFLNLSLSFDLSIFDIFASIIVGGT	46
C9146	-----YQVVNTIFDLIERFDLDDTDYFLNLSLSFDLSIFDIFASIIVGGT	46

N920143	LH-	62
C9954	LHL	48
C9961	LHL	49
C9981	LHL	49
C9146	LHL	49
**		

Figura 17. Comparación de las secuencias del péptido LugD entre la secuencia de referencia (N920143) y las cepas C9954, C9961, C9981 y C9146.

Finalmente, atendiendo a los resultados de la figura 14, haremos referencia a las características fenotípicas y genotípicas de las cepas productoras de bacteriocinas, las cuales se presentan en la Tabla 16 en función de su grado de producción.

Tabla 16. Características fenotípicas/genotípicas de las 12 cepas de *S. lugdunensis* productoras de bacteriocinas.

Nº cepa	Origen	Fenotipo	Genotipo	<i>lugD</i>
C9954	Catéter	sensible	-	+
C9161	Catéter	sensible	-	+
C9148	Catéter	sensible	-	+
C10107	Sangre	PEN	<i>blaZ</i>	+
C9894	Herida quirúrgica	ERI-CLI	<i>msr(A)</i>	+
C9980	Orina	PEN-AMP	<i>blaZ</i>	+
C9890	IPPB	PEN-AMP-FOS	<i>blaZ</i>	+
C9893	IPPB	PEN-AMP	<i>blaZ</i>	+
C9159	Orina	PEN-FOS	<i>blaZ</i>	+
C9892	IPPB	PEN-AMP	<i>blaZ</i>	+
C10052	Exudado	PEN-AMP	<i>blaZ</i>	+
C9145	Catéter	PEN-AMP	<i>blaZ</i>	+

Cabe destacar que, si bien todas ellas poseen *lugD*, su actividad inhibitoria es notablemente distinta. Por un lado, se observa que las cepas altamente productoras (C9954, C9161 y C9148) son sensibles a todos los antibióticos testados y poseen el mismo origen (catéter). En el caso de las cepas con producción de menor intensidad, se detectó variedad en el origen de la muestra: sangre, herida quirúrgica, orina, IPPB, exudado y catéter. Sin embargo, al evaluar su resistencia a antibióticos, se comprobó que dichas cepas de *S. lugdunensis* fueron en su mayoría resistentes a penicilina, fenotipo asociado a la presencia del gen *blaZ*.

DISCUSIÓN

Estudios previos indican que *S. lugdunensis* es relativamente poco común en las muestras clínicas, entre un 3 y 6% [47]. En nuestro caso, los resultados del aislamiento e identificación se ajustan a estos valores puesto que la frecuencia de *S. lugdunensis* con respecto al total de aislados SCoN es de 3,4%. Sin embargo, en los últimos años se ha detectado un incremento en dichas proporciones, siendo cada vez más frecuente encontrar en *S. lugdunensis* patrones de virulencia relevantes [47]. Este aumento, se debe en gran parte al mayor dominio de las tecnologías de identificación microbianas. Entre ellas se destaca la ionización por desorción láser asistida por matriz de tiempo de vuelo (MALDI-TOF), método adaptado de la espectrometría de masas que ha proporcionado a los laboratorios una herramienta de identificación rápida y rentable, permitiendo identificar microorganismos a nivel de especie [48].

En cuanto a la patogenicidad de *S. lugdunensis*, cabe destacar que este microorganismo ha sido asociado a un amplio espectro de infecciones: IPPB, abscesos subcutáneos, heridas, catéter... [49] Esto fue comprobado en el presente estudio, en el cual se identificaron cepas con orígenes muy variables siendo los más abundantes, los aislados de *S. lugdunensis* procedentes de IPPB y catéter con 31% y 19%, respectivamente.

Por otro lado y a diferencia de otros SCoN, *S. lugdunensis* se caracteriza por poseer alta susceptibilidad a los antibióticos [19]. Sin embargo, nuestros resultados permitieron concluir que únicamente el 31% de las cepas fueron sensibles a todos los antibióticos testados, porcentaje menor al esperado para dicha especie bacteriana. En cuanto a los porcentajes de resistencia se observó una gran variabilidad, entre 20 y 100%, y tal y como apuntaba Cercenado E., 2009, no se evidenció una asociación evidente entre sensibilidad y origen de aislamiento. En este sentido, varios estudios han hecho patente la resistencia a múltiples antibióticos en cepas de *S. lugdunensis*, incluidos la penicilina, oxacilina, tetraciclina, eritromicina, clindamicina, gentamicina, tobramicina y mupirocina [50]. A pesar de ello, la multi-resistencia ha sido referida en *S. lugdunensis* como un fenómeno excepcional, dato que se corresponde con los resultados del presente trabajo, donde se detectó un 6% de cepas multi-resistentes.

Atendiendo a cada una de las resistencias anteriormente indicadas, comenzaremos evaluando la resistencia a penicilina. Se ha comunicado que la frecuencia de producción de β -lactamasa en *S. lugdunensis* oscila en España entre el 12 y el 14%, resistencia que está asociada a la presencia del gen *blaZ* [51]. Por lo tanto, sorprende la elevada cifra de resistencia a penicilina (46%), comprobada en este estudio tanto fenotípica como genotípicamente (presencia del gen *blaZ*).

En cuanto a la meticilina, Kleiner E, et al., 2010 concluyeron que aproximadamente un 3% de las cepas de *S. lugdunensis* poseían resistencia a este betalactámico, por lo que todavía parece ser un fenotipo de resistencia marginal en dicho SCoN. Asimismo, se evidenció que la mayoría de las cepas de *S. lugdunensis* resistentes a oxacilina, poseen el gen *mecA*. Esto concuerda con los resultados obtenidos tras la caracterización de las 48 cepas de *S. lugdunensis*, de las cuales solo 1 (2%), presentó resistencia a oxacilina derivada de la presencia del gen *mecA*. En este sentido, se comprobó que el gen *mecA* se encontraba integrado en el complejo SCC*mec* de tipo V, propuesto por Lin JF, et al., en 2015 como el cassette cromosómico más frecuente en *S. lugdunensis*.

En relación a los porcentajes de resistencia de *S. lugdunensis* frente al resto de antibióticos (tetraciclina, eritromicina, clindamicina, gentamicina, tobramicina, mupirocina), no se encontraron en el presente estudio valores significativos, oscilando entre 2% y 8%. Este dato que se corresponde con estudios precedentes, donde se hizo patente que la resistencia de *S. lugdunensis* es menor a la del resto de SCoN, entre el 40% y 60% [21].

Si bien los porcentajes de resistencia fueron bajos, los resultados de la identificación por PCR de los mecanismos genéticos de resistencia a antibióticos confirmaron en todos los casos la presencia de los genes asociados a su correspondiente fenotipo de resistencia. Todo ello parece indicar que *S. lugdunensis*, ha adquirido dichos elementos por transferencia horizontal de genes, posiblemente desde *S. aureus*. Y es que, es habitual encontrar los determinantes genéticos de la resistencia a antibióticos en replicones extracromosómicos, los cuales pueden relocalizarse en el cromosoma principal [53], razón por la cual bacterias que en condiciones normales son comensales, adquieren patogenicidad y virulencia de modo que pueden desarrollarse en condiciones no aptas [54].

Un ejemplo de ello son los genes de resistencia a tetraciclina (genes *tet*) y mupirocina (genes *mup*), con amplia distribución entre diferentes especies bacterianas [55]. Atendiendo a los resultados de la secuenciación, se confirmó la presencia del gen *mup(A)* en la única cepa resistente a mupirocina. Sin embargo, la secuenciación de los amplicones de *tet(L)* identificó dichas secuencias con un transportador de membrana de tipo ABC de alta identidad en las tres cepas resistentes a tetraciclina evaluadas. En este sentido, ha sido descrito que el gen *tet(L)* codifica para bombas de eflujo y es el segundo gen de resistencia a tetraciclina de mayor prevalencia en estreptococos y enterococos [36]. Sin embargo, es necesario realizar más estudios que permitan establecer una posible asociación entre el transportador ABC y el mecanismo de resistencia a tetraciclina mediado por *tet(L)*. Por todo ello, cabe considerar que la resistencia a tetraciclina en dichas cepas es consecuencia de la presencia del gen *tet(K)* identificado por PCR.

En los últimos años, las infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos han aumentado notablemente representando una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, incluso en los países desarrollados [3]. Todo ello, sitúa a la resistencia a los antimicrobianos como un problema de salud con prioridad global [4] y hace patente la urgente necesidad de desarrollar fármacos antibióticos alternativos. Entre ellos, se encuentran las bacteriocinas, grupo de pequeños péptidos antimicrobianos muy diversos que son sintetizados ribosomalmente por una amplia gama de cepas bacterianas en el medio ambiente [37].

Un ejemplo de péptido antimicrobiano es la lugdunina, compuesto de alta actividad antimicrobiana contra una amplia gama de bacterias Gram-positivas, incluyendo patógenos humanos oportunistas tales como: *S. aureus* resistente a meticilina, *S. aureus* resistente a glucopeptidos y aislados de *Enterococcus* resistentes a vancomicina [46]. En base a ello, este estudio planteó como objetivo la identificación de microorganismos productores de bacteriocinas por el método “Spot in the lawn”, en una colección de 48 cepas de *S. lugdunensis*. Los resultados de la técnica revelaron 12 cepas altamente productoras, de las cuales 7 mostraron actividad inhibitoria frente a *S. aureus* SARM y SASM, *vanA/vanB2 enterococci*, *Listeria monocytogenes* y *S. pseudintermedius* SPRM y SPSM, entre otros.

Cabe destacar la potente acción inhibitoria de la cepa de *S. lugdunensis* (C9954) frente a aislados de *S. pseudintermedius*. Este microorganismo ha sido considerado como una especie comensal bacteriana, colonizadora de la piel y las superficies de la mucosa. Mientras que *S. aureus* es el colonizador más habitual en la especie humana, *S. pseudintermedius* se encuentra principalmente en animales domésticos, especialmente perros, siendo en ambos casos relevante la presencia de cepas resistentes a meticilina. De este modo, *S. pseudintermedius* al igual que *S. aureus*, se comporta en ocasiones como patógeno oportunista llegando a ser el responsable de infecciones graves en humanos [56].

En este sentido, varios estudios han sugerido que la lugdunina puede conducir a una descomposición rápida de los recursos energéticos bacterianos siendo eficiente incluso frente a SPRM y SARM [46]. Sin embargo, al evaluar la actividad inhibitoria del sobrenadante de la cepa C9954 de *S. lugdunensis* en diversas condiciones, no se detectó inhibición alguna, lo que llevó a proponer las siguientes hipótesis. Por un lado, tal y como indicaron en 2016 Zipperer A, et al., *S. lugdunensis* únicamente es capaz de producir el compuesto antibacteriano en condiciones limitantes de hierro o en superficies de agar sólido. Es así como *S. lugdunensis*, al ser cultivada en medio líquido, no es capaz de liberar la bacteriocina al exterior celular de manera que no será identificada en el sobrenadante.

Asimismo, cabe la posibilidad de que el compuesto antimicrobiano sea inhibido por las altas temperaturas alcanzadas en la fase de hervido. Por último, puede que las condiciones de cultivo empleadas induzcan cambios en la regulación del operon *lug* de manera que la concentración de bacteriocina liberada sea tan baja que no llegue a provocar un efecto

inhibitorio en el crecimiento de *S. pseudintermedius* usado como indicador. Esto permitiría explicar las variaciones en la producción de bacteriocinas, detectadas al enfrentar un mismo microorganismo indicador y productor [46].

Atendiendo a los determinantes genéticos, se concluyó que el operon *lug* está presente en todos los genomas de *S. lugdunensis* registrados en las bases de datos [46]. En base a ello, se propuso como objetivo identificar en las 48 cepas de *S. lugdunensis* mediante la técnica de PCR el gen *lugD*, implicado en la producción de lugdunina. Los resultados de la amplificación revelaron que *lugD* está presente en todas las cepas productoras (25%) de bacteriocinas aunque no se identificó en la totalidad de cepas en estudio.

Asimismo, se recurrió a la técnica de secuenciación para confirmar la identidad del gen *lugD* y verificar posibles variaciones. Los análisis de las secuencias nucleotídicas y la corrección de las mismas a partir de sus cromatogramas, evidenciaron que los amplicones se correspondían con la secuencia de nucleótidos del gen *lugD* y que poseían gran semejanza entre sí y con la secuencia de referencia. Asimismo, al evaluar la semejanza de dichas secuencias nucleotídicas con la proteína codificada *lugD*, se confirmó que en todos los casos, se trataba del mismo fragmento. De este modo, se hace patente que la presencia del gen *lugD* no es suficiente para que la bacteria produzca lugdunina de forma eficaz. Las diferencias en la producción de lugdunina por parte de *S. lugdunensis* pueden ser derivadas de procesos de regulación o mutaciones génicas. Asimismo y en relación a nuestro caso, al estudiar únicamente un fragmento interno y pequeño (189 pb) del operon *lug*, es posible que no se hayan detectado mutaciones en otras regiones de manera que sería de gran interés ampliar los estudios de dicho clúster génico y sus condicionantes.

Finalmente, en cuanto a las características fenotípicas y genotípicas de las 12 cepas de *S. lugdunensis* productoras de bacteriocinas. Los resultados de este estudio revelan fenómenos de fitness bacteriano, capacidad de las bacterias a dividirse para lo cual desarrollan distintas estrategias entre las que destacan la resistencia a antibióticos o virulencia. Esto se hace patente puesto que las cepas altamente productoras de bacteriocinas (C9954, C9161, C9148) poseen fenotipo sensible, hecho también comprobado en el caso de la cepa de *S. pseudintermedius* SPSM (C8189). Esta estrategia bacteriana se encuentra ampliamente distribuida en el medio ambiente y aunque se sabe que los microorganismos tratan de mantener su nivel de crecimiento y división en ambientes hostiles por medio de la resistencia a antibióticos o la virulencia, sus mecanismos siguen siendo poco conocidos en la actualidad.

Estudios recientes han demostrado cuán diversas y dinámicas son las microbiotas humanas, especialmente las de la microbiota de la piel [57] expuesta al medio ambiente y las vías aéreas superiores [58]. Estos nichos ecológicos son particularmente pobres en nutrientes [59], lo que sugiere que las bacterias colonizadoras están probablemente en una fuerte competencia y pueden usar una variedad de estrategias para vencer a los competidores [59],

entre las que se destaca la producción de bacteriocinas, sustancias antimicrobianas que actúan contra bacterias estrechamente relacionadas [60].

De ahí el interés de este trabajo, puesto que la identificación de compuestos antimicrobianos puede ser un tratamiento clínico rentable, eficaz, específico y no invasivo. Con respecto a los resultados experimentales, se comprueba que la cepa de *S. lugdunensis* C9954 presenta actividad inhibitoria frente a más del 70% de las bacterias indicadoras testadas, incluyendo bacterias multiresistentes. A ello, se suma el hecho de que la lugdunina no causa efectos nocivos en diversos linajes celulares humanos y de que resultaría particularmente difícil para las bacterias desarrollar resistencia a lugdunina. Por todo ello, se propone a *S. lugdunensis* como microorganismo de prevención frente a la colonización nasal por *S. aureus* y *S. pseudintermedius*, entre otros.

CONCLUSIONS

The results of the characterization of a collection of 48 clinical strains of *S. lugdunensis* made during this work, have allowed us to respond to the objectives set and establish the following conclusions:

1. Species identification using the mass spectrometry system MALDI-TOF, a fast and efficient method that has allowed the confirmation of the identity of 48 clinical strains of *S. lugdunensis* from a total of 51 strains received.
2. From the data received of the HSP, it is determined that *S. lugdunensis* represents 3.4% of the clinical CoNS, frequently isolated from IPPB and catheter samples.
3. 60% of the strains were resistant to any of the antibiotics tested, with high penicillin (46%) and fosfomicin (27%) resistance rates, and 6% of the strains were multi-resistant, in all cases isolated from SSTI. Resistance to oxacillin was infrequent among our isolates with only one strain showing resistance, due to the *mecA* gene included in the chromosomal element *SCCmec* of type V.
4. It has been detected strains carrying resistance genes to penicillin (*blaZ*), tetracycline (*tet(K)*), mupirocin (*mup(A)*), erythromycin and clindamycin *erm(C)* and / or *msr(A)*, tobramycin (*ant4(4')-(4'')*) and gentamicin (*acc(6') - aph(2'')*).
5. The production of antimicrobial substances was detected in 1/3 of the 48 strains of *S. lugdunensis* analyzed and it was observed activity against various Gram-positive and Gram-negative microorganisms of different genera and species.
6. Strain C9954 was selected because of its high production of bacteriocins, exhibiting antimicrobial activity against 70% of the 37 indicator microorganisms tested, including strains with resistance genotypes with clinical interest such as: *S. pseudintermedius* SPRM and SPSM, *S. aureus* MRSA and SASM and enterococci *vanA/vanB2*.
7. Studies of the presence of the bacteriocin in the supernatant of the highly productive strain C9954, allowed us to conclude that this antimicrobial substance is not released to the external environment under the conditions used.
8. The presence of the *lugD* gene, involved in the production of lugdunin, was detected by PCR in 100% of the strains of *S. lugdunensis* bacteriocin producers and in 75% of the non-producing strains. Moreover, the results of the sequencing confirmed the identity of the amplicons and the analysis of the subsequent sequences showed that both nucleotide and amino acid sequences were very similar to the reference (NC_017353.1) one.

CONCLUSIONES

Los resultados de la caracterización de una colección de 48 cepas clínicas de *S. lugdunensis* realizada durante este trabajo, nos han permitido responder a los objetivos planteados y establecer las siguientes conclusiones:

1. La identificación a nivel de especie mediante el sistema de espectrometría de masas MALDI-TOF es un método rápido y eficaz que ha permitido confirmar la identidad de 48 cepas clínicas de *S. lugdunensis* de un total de 51 cepas recibidas.
2. A partir de los datos cedidos por el HSP se determina que *S. lugdunensis* representa un 3,4% de los SCoN clínicos, aislándose con mayor frecuencia en muestras de IPPB y de catéter.
3. El 60% de las cepas presentó resistencia frente a alguno de los antibióticos testados, siendo la penicilina (46%) y la fosfomicina (27%) los más representados, y el 6% de las cepas fueron multi-resistentes, en todos los casos de IPPB. La resistencia a oxacilina fue infrecuente entre nuestros aislados, detectándose solo uno resistente, debido al gen *mecA* incluido en el elemento cromosómico SCC*mec* de tipo V.
4. Se detectan cepas portadoras de genes de resistencia a penicilina (*blaZ*), tetraciclina (*tet(K)*), mupirocina (*mup(A)*), eritromicina y clindamicina *erm(C)* y/o *msr(A)*, tobramicina (*ant4(4')-(4'')*), gentamicina (*acc(6') - aph(2'')*).
5. La producción de sustancias antimicrobianas fue detectada en un 1/3 de las 48 cepas de *S. lugdunensis* analizadas, observándose actividad frente a diversos microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos de diferentes géneros y especies.
6. La cepa C9954 seleccionada por su alta producción de bacteriocinas, presentó actividad antimicrobiana frente al 70% de los 37 microorganismos indicadores testados, incluyendo cepas con genotipos de resistencia de interés clínico como: *S. pseudintermedius* SPRM y SPSM, *S. aureus* SARM y SASM y enterococos *vanA/vanB2*.
7. Los estudios de la presencia de la bacteriocina en el sobrenadante de la cepa altamente productora C9954, permitieron concluir que este compuesto antimicrobiano no es liberado al medio externo en las condiciones utilizadas.
8. La presencia del gen *lugD*, implicado en la producción de lugdunina, se detectó por PCR en el 100% de las cepas de *S. lugdunensis* productoras de bacteriocinas y en el 75% de las cepas no productoras. Asimismo, los resultados de la secuenciación confirmaron la identidad de los amplicones y los análisis de las secuencias posteriores evidenciaron que dichas secuencias tanto nucleotídicas como aminoacídicas, eran muy semejantes a la de referencia (NC_017353.1).

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart H-P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2013 [cited 2018 Jun 5]; 4. Available from. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2013.00047/abstract>
- [2] Gould IM, Bal AM. New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance. *Virulence*. 2013 Feb 15; 4(2):185–91.
- [3] Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AKM, Wertheim HFL, Sumpradit N, et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*. 2013 Dec; 13(12):1057–98.
- [4] Haenssger MJ, Charoenboon N, Zanello G, Mayxay M, Reed-Tsochas F, Jones COH, et al. Antibiotics and activity spaces: protocol of an exploratory study of behaviour, marginalisation and knowledge diffusion. *BMJ Global Health*. 2018 Mar; 3(2):e000621.
- [5] Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 2015 Jan;13(1):42–51.
- [6] Shallcross LJ, Davies SC. The World Health Assembly resolution on antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014 Nov 1; 69(11):2883–5.
- [7] The antibiotic alarm. *Nature*. 2013 Mar 14; 495(7440):141.
- [8] Antibiotic resistance threats in the United States. Centers for Disease Control and Prevention, Office of Infectious Disease. 2013. Apr; <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013>.
- [9] Spellberg B, Gilbert DN. The Future of Antibiotics and Resistance: A Tribute to a Career of Leadership by John Bartlett. *Clinical Infectious Diseases*. 2014 Sep 15; 59(suppl 2):S71–5.
- [10] Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 2005 Sep; 3(9):711–21.
- [11] Aarestrup FM. Veterinary Drug Usage and Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. *Clinical Pharmacology* . 2005 Apr; 96(4):271–81.
- [12] Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-Negative Staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*. 2014 Oct; 27(4):870–926.
- [13] Fariña N, Carpinelli L, Samudio M, Guillén R, Laspina F, Sanabria R, et al. Staphylococcus coagulasa-negativa clínicamente significativos: Especies más frecuentes y factores de virulencia. *Revista chilena de infectología*. 2013 Oct; 30(5):480–8.
- [14] Tan TY, Ng SY, Ng WX. Clinical Significance of Coagulase-Negative Staphylococci Recovered from Nonsterile Sites. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006 Sep 1; 44(9):3413–4.
- [15] Gorwitz RJ, Kruszon-Moran D, McAllister SK, McQuillan G, McDougal LK, Fosheim GE, et al. Changes in the Prevalence of Nasal Colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001–2004. *The Journal of Infectious Diseases*. 2008 May; 197(9):1226–34.
- [16] Hellbacher C, Törnqvist E, Söderquist B. Staphylococcus lugdunensis: clinical spectrum, antibiotic susceptibility, and phenotypic and genotypic patterns of 39 isolates. *Clinical Microbiology and Infection*. 2006 Jan; 12(1):43–9.
- [17] Rodríguez-Gascó n M, Roig P, Montagud JB, Merino J. Acute Staphylococcus lugdunensis endocarditis with septic cerebral and pulmonary emboli, showing favorable evolution. *Enferm Infec Microbiol Clin*. 2003;21:465–7
- [18] Mitchell J. Characterization of the fibrinogen-binding surface protein Fbl of Staphylococcus lugdunensis. *Microbiology*. 2004 Nov 1; 150(11):3831–41.

- [19]Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology*. 2014 Jan; 12(1):49–62.
- [20]Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*. 2010 Apr;8(4):251–9.
- [21]Ardanuy C, Cercenado E, Morosi M, Torres C. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en grampositivos. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Madrid: La Sociedad. 2011
- [22]Hanssen A-M, Sollid JUE. Multiple Staphylococcal Cassette Chromosomes and Allelic Variants of Cassette Chromosome Recombinases in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci from Norway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007 May 1; 51(5):1671–7.
- [23]Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*. 2001 Oct; 9(10):486–93.
- [24]Hanssen AM, Kjeldsen G, Sollid JUE. Local variants of Staphylococcal cassette chromosome mec in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci: evidence of horizontal gene transfer? *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jan;48(1):285–96
- [25]Shore AC, Coleman DC. Staphylococcal cassette chromosome mec: Recent advances and new insights. *International Journal of Medical Microbiology*. 2013 Aug; 303(6–7):350–9.
- [26]Cartwright EJP, Paterson GK, Raven KE, Harrison EM, Gouliouris T, Kearns A, et al. Use of Vitek 2 Antimicrobial Susceptibility Profile To Identify mecC in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013 Aug 1;51(8):2732–4.
- [27]Stegger M, Andersen PS, Kearns A, Pichon B, Holmes MA, Edwards G, et al. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either mecA or the new mecA homologue mecALGA251. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012 Apr; 18(4):395–400.
- [28]Zong Z, Peng C, Lü X. Diversity of SCCmec Elements in Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci Clinical Isolates. Roop RM, editor. *PLoS ONE*. 2011 May 26; 6(5):e20191.
- [29]Lozano C. Epidemiología molecular de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina del linaje CC398 de distintos orígenes: resistencia, virulencia y contenido plasmídico. Doctoral dissertation. 2012
- [30]Lin JF, Cheng C-W, Kuo AJ, Liu TP, Yang CC, Huang CT, et al. Clinical experience and microbiologic characteristics of invasive *Staphylococcus lugdunensis* infection in a tertiary center in northern Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2015 Aug; 48(4):406–12.
- [31]Tseng SP, Lin YT, Tsai JC, Hung WC, Chen HJ, Chen PF, et al. Genotypes and phenotypes of *Staphylococcus lugdunensis* isolates recovered from bacteremia. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2015 Aug; 48(4):397–405.
- [32]Jara M. Tetraciclinas: un modelo de resistencia antimicrobiana. *Avances en Ciencias Veterinarias*. 2007; 22(1-2).
- [33]Goldman RA, Hasan T, Hall CC, Strycharz WA, Cooperman BS. Photoincorporation of tetracycline into *Escherichia coli* ribosomes. Identification of the major proteins photolabeled by native

- tetracycline and tetracycline photoproducts and implications for the inhibitory action of tetracycline on protein synthesis. *Biochemistry*. 1983 Jan 18;22(2):359–68
- [34]Taylor DE, Chau A. Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Jan; 40(1):1–5.
- [35]Roberts MC. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*. 2005 Apr; 245(2):195–203.
- [36]Michalova E, PNovotna, Schlegelova J. Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. *Veterinárni Medicína*. 2012 Mar 29; 49(No. 3):79–100.
- [37]Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food: Food microbiology. *Nature Reviews Microbiology*. 2005 Oct; 3(10):777–88.
- [38]Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins, a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*. 2013 Feb; 11(2):95–105.
- [39]Boakes S, Ayala T, Herman M, Appleyard AN, Dawson MJ, Cortés J. Generation of an actagardine A variant library through saturation mutagenesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012 Sep; 95(6):1509–17.
- [40]Clardy J, Fischbach MA, Walsh CT. New antibiotics from bacterial natural products. *Nature Biotechnology*. 2006 Dec; 24(12):1541–50.
- [41]Cascales E, Buchanan SK, Duche D, Kleanthous C, Lloubes R, Postle K, et al. Colicin Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2007 Mar 1; 71(1):158–229.
- [42]Lu Z, Guo W, Liu C. Isolation, identification and characterization of novel *Bacillus subtilis*. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2018; 80(3):427–33.
- [43]Bastos MCF, Ceotto H, Coelho MLV, Nascimento JS. Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications. *Curr Pharm Biotechnol*. 2009 Jan; 10(1):38–61.
- [44]Dobson A, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocin Production: a Probiotic Trait? *Applied and Environmental Microbiology*. 2012 Jan 1; 78(1):1–6.
- [45]Wladyka B, Piejko M, Bzowska M, Pieta P, Krzysik M, Mazurek Ł, et al. A peptide factor secreted by *Staphylococcus pseudintermedius* exhibits properties of both bacteriocins and virulence factors. *Scientific Reports [Internet]*. 2015 Nov [cited 2018 Jun 16];5(1). Available from: <http://www.nature.com/articles/srep14569>
- [46]Zipperer A, Konnerth MC, Laux C, Berscheid A, Janek D, Weidenmaier C, et al. Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature*. 2016 Jul 27; 535(7613):511–6.
- [47]McHardy IH, Veltman J, Hindler J, Bruxvoort K, Carvalho MM, Humphries RM. Clinical and Microbiological Aspects of β -Lactam Resistance in *Staphylococcus lugdunensis*. Ledebauer NA, editor. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017 Feb; 55(2):585–95.
- [48]Patel R. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Clinical Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*. 2013 Aug 15; 57(4):564–72.
- [49]Cercenado E. *Staphylococcus lugdunensis*: un estafilococo coagulasa negativo diferente de los demás. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2009 Mar; 27(3):139–42.
- [50]You Y-O, Kim K-J, Min B-M, Chung C-P. *Staphylococcus lugdunensis*—a potential pathogen in oral infection. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 1999 Sep; 88(3):297–302.

- [51]Mateo M, Maestre J-R, Aguilar L, Cafini F, Puente P, Sánchez P, et al. Genotypic versus phenotypic characterization, with respect to susceptibility and identification, of 17 clinical isolates of *Staphylococcus lugdunensis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005 Aug 1; 56(2):287–91.
- [52]Kleiner E, Monk AB, Archer GL, Forbes BA. Clinical Significance of *Staphylococcus lugdunensis* Isolated from Routine Cultures. *Clinical Infectious Diseases*. 2010 Oct; 51(7):801–3.
- [53]Shintani M, Sanchez ZK, Kimbara K. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2015 Mar 31 [cited 2018 Jun 14]; 6. Available from:http://www.frontiersin.org/Evolutionary_and_Genomic_Microbiology/10.3389/fmicb.2015.00242/abstract
- [54]Xia G, Wolz C. Phages of *Staphylococcus aureus* and their impact on host evolution. *Infection, Genetics and Evolution*. 2014 Jan; 21:593–601.
- [55]Ho P-L, Liu MC-J, Chow K-H, Tse CW-S, Lo W-U, Mak S-K, et al. Emergence of ileS2 -Carrying, Multidrug-Resistant Plasmids in *Staphylococcus lugdunensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016 Oct; 60(10):6411–4.
- [56]Weese JS, van Duijkeren E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*. 2010 Jan; 140(3–4):418–29.
- [57]Schloss PD. An integrated view of the skin microbiome: *Microbiology*. *Nature*. 2014 Oct; 514(7520):44–5.
- [58]Laufer AS, Metlay JP, Gent JF, Fennie KP, Kong Y, Pettigrew MM. Microbial Communities of the Upper Respiratory Tract and Otitis Media in Children. *mBio*. 2011 Feb 1; 2(1):e00245-10-e00245-10.
- [59]Krismer B, Liebeke M, Janek D, Nega M, Rautenberg M, Hornig G, et al. Nutrient Limitation Governs *Staphylococcus aureus* Metabolism and Niche Adaptation in the Human Nose. Gilmore MS, editor. *PLoS Pathogens*. 2014 Jan 16; 10(1):e1003862.
- [60]Kommineni S, Bretl DJ, Lam V, Chakraborty R, Hayward M, Simpson P, et al. Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian gastrointestinal tract. *Nature*. 2015 Oct; 526(7575):719–22.