



Universidad
de La Laguna



Facultad de Ciencias
Sección BIOLOGÍA

Departamento de Bioquímica,
Microbiología, Biología Celular y
Genética

**Posible relación existente entre la presencia de
toxinas y la sensibilidad a antibióticos en
cepas de *Staphylococcus aureus*.**

**Possible relationship between the presence of
toxins and sensitivity to antibiotics in
Staphylococcus aureus.**

**Trabajo Fin de Grado
Septiembre 2015**

Dácil González Méndez

SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 2014/2015	ENTRADA Fecha: Núm:
--	----------------------------------

Datos Personales

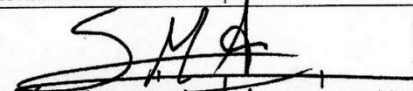
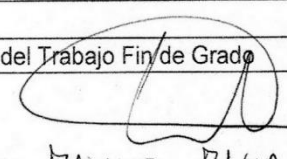
Nº DNI o pasaporte:	Nombre y Apellidos:
78636239K	DÁCIL GONZALEZ MENDEZ
Teléfono:	Dirección de correo electrónico:
636795332	dacil_biologa_92@hotmail.es

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO


ESTUDIO DE LA POSIBLE RELACIÓN EXISTENTE ENTRE LA PRESENCIA DE DETERMINADAS TOXINAS Y LA SENSIBILIDAD FRENTE A DIVERSOS ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS
--

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

D./Dña. SEBASTIAN MENDEZ ALVAREZ
Profesor/a del Departamento de MICROBIOLOGÍA
y D. MANUEL MACÍA HERAS
Profesor/a del Departamento de
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado
 
Fdo. SEBASTIAN MENDEZ ALVAREZ Fdo.: MANUEL MACÍA HERAS

La Laguna, a 2 de sept de 2015

Firma del interesado/a



SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA

RESUMEN

La bacteria *Staphylococcus aureus* es considerada actualmente la principal responsable de la mayoría de las enfermedades estafilocócicas. Supone un problema grave de salud por su capacidad destructora y su resistencia a múltiples antimicrobianos. En el proceso de infección, son claves los factores de virulencia que presenta esta bacteria. Por lo tanto, es fundamental conocer estos factores y las enfermedades que pueden provocar. Este estudio tiene como primer objetivo conocer algunos factores de virulencia de *S. aureus*, mediante técnicas de PCR y electroforesis. Por otra parte, las bacterias presentan resistencia a algunos antibióticos que debemos conocer para aplicar, cuando sea necesario, el tratamiento adecuado. Así, el segundo objetivo del presente trabajo, es determinar la resistencia o sensibilidad de cepas de esta bacteria, a unos determinados antibióticos. Para ello, usamos el método de *Kirby-Bauer* y se observó resistencia a múltiples antibióticos.

Palabras clave: antimicrobianos, bacteria, resistencia, virulencia.

ABSTRACT

The bacterium *Staphylococcus aureus* is currently considered the main responsible for the majority of staphylococcal diseases. It is a serious health's problem for their destructive capacity and resistance to multiple antibiotics. In the process of infection, virulence's factors presented by these bacteria, are key. Therefore, it is essential to understand the factors and diseases that they can cause. This study has as its primary objective to know some virulence factors of *S. aureus* by PCR and electrophoresis. Moreover, the bacteria are resistant to some antibiotics that we know to apply, when it is necessary, the appropriate treatment. Thus, the second objective of this study is to determine the resistance or susceptibility of strains belonging to the bacteria, particularly to certain antibiotics. For that, we used the method of *Kirby-Bauer* and resistance was observed to multiple antibiotics.

Keywords: antimicrobial, bacteria, resistance, virulence.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>.	1
1.2 Factores de virulencia.	2
1.3 Formas de resistencia.	4
2. OBJETIVOS.	6
3. MATERIAL Y MÉTODOS.	6
3.1 Aislados y medios utilizados en los experimentos.	6
3.2 Detección de las toxinas presentes en las cepas de <i>S. aureus</i>.	7
3.2.1 PCR.	7
3.2.2 Electroforesis.	9
3.3 Determinación de la sensibilidad a distintos antibióticos.	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	13
4.1 Detección de las toxinas presentes en cepas de <i>S. aureus</i>.	13
4.2 Determinación de la sensibilidad a distintos antibióticos.	14
CONCLUSIONES.	17
AGRADECIMIENTOS	19
BIBLIOGRAFÍA.	19
ANEXO 1	21

1. INTRODUCCIÓN.

El género *Staphylococcus* está ubicado dentro de la familia *Staphylococcaceae*. Los miembros de este género son cocos gram positivos, inmóviles y no esporulados, de 0.15 a 1.5 μm de diámetro; aparecen solos o en parejas, en cadenas cortas y tienen tendencia a agruparse formando racimos irregulares tridimensionales de los que deriva su nombre (del griego *staphulé*, “con forma de uva”), indicativo de la habilidad para dividirse en más de un plano (Figura 1). Son microorganismos poco exigentes en sus requerimientos nutricionales, pueden crecer en muy diversas condiciones ambientales, pero lo hacen mejor entre 30 y 37°C y a un pH próximo a la neutralidad. Son resistentes a la desecación y a los desinfectantes químicos, y toleran concentraciones de NaCl de hasta el 12%. Salvo raras excepciones, los estafilococos son anaerobios facultativos (Kloos *et al.*, 1999).

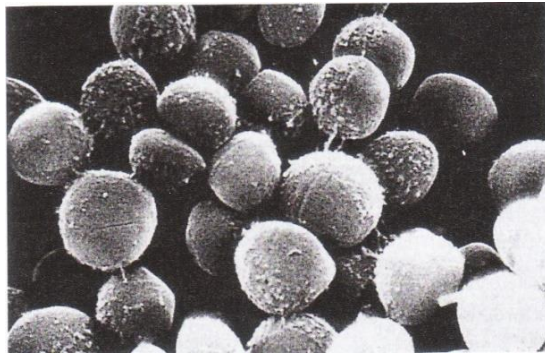


Figura 1. Micrografía con el microscopio electrónico de barrido de células típicas de *Staphylococcus aureus*, que muestran la ordenación irregular de los agrupamientos de células (Madigan *et al.*, 2012).

Este género comprende en la actualidad a 32 especies y 15 subespecies, muchas de las cuales se encuentran en el hombre. Las especies que se asocian más frecuentemente a las enfermedades en humanos son *Staphylococcus aureus* (especie más virulenta y mejor conocida de este género), *sp. epidermidis*, *sp. saprophyticus*, *sp. capitis* y *sp. haemolyticus* (Murray *et al.*, 2003).

De estas, las más destacadas son *S. aureus*, especie de pigmentación amarilla que está asociada muy habitualmente a diversas patologías, y *S. epidermidis*, organismo no pigmentado y no patógeno que se encuentra habitualmente en la piel o en las membranas mucosas (Madigan *et al.*, 2012).

1.1 *Staphylococcus aureus*.

Los seres humanos constituyen su principal reservorio en la naturaleza cuando las defensas del hospedador se ven comprometidas. Dado que las infecciones causadas por esta bacteria son principalmente endógenas, la colonización del hospedador desempeña un papel básico en su epidemiología (Domínguez *et al.*, 2006).

S. aureus forma parte de la microbiota normal de la piel pero, a su vez, supone uno de los motivos principales de preocupación en salud pública por su capacidad destructora y resistente a toda clase de antimicrobianos. Esta bacteria es el agente causal de la mayoría de las infecciones estafilococales y está asociada a enfermedades tanto nosocomiales como extra hospitalarias. Las infecciones causadas por esta bacteria incluyen osteomielitis, neumonía, sepsis, endocarditis, cerebritis, meningitis, síndrome de la piel escaldada (Pérez, 2006).

Los individuos sanos son muchas veces transmisores de enfermedades a individuos inmunodeprimidos. Las infecciones estafilocócicas graves ocurren cuando la resistencia del hospedador es baja debido a cambios hormonales, enfermedades debilitantes, heridas o tratamientos con esteroides u otros fármacos que comprometen el sistema inmunitario (Madigan *et al.*, 2012)

1.2 Factores de virulencia.

Los factores de virulencia son moléculas producidas por bacterias que tienen la capacidad de provocar enfermedades en el ser humano. *S. aureus* produce muchos factores de virulencia, como proteasas, factores inmunomoduladores y toxinas tales como hemolisinas, enterotoxinas, leucocidinas, toxinas exfoliativas y adhesinas (Tabla 1) (Foster, 2004; Foster, 2005; Manders, 1998; Rooijackers *et al.*, 2005)

Las toxinas pueden dañar directamente los tejidos o poner en marcha actividades biológicas destructivas. Estas actividades están producidas por componentes de la pared celular, por enzimas degradativas que producen la lisis de células y por células que se unen a receptores específicos. Pueden iniciar reacciones tóxicas en un tejido diana específico o comenzar con una respuesta sistémica al facilitar la liberación acentuada de citosinas. De esta manera, las toxinas son las responsables de los síntomas característicos de muchas enfermedades (Murray *et al.*, 2003)

Tabla 1. Clasificación de toxinas implicadas en la virulencia de las cepas de *S. aureus*.
(López, 1996-97)

Toxinas	Subtipos	Efectos biológicos
Toxinas exfoliativas	<i>Eta, Etb</i>	Actividad proteasa
Hemolisinas	<i>A-(Hla), β-(Hlb), δ-(Hlc)</i>	Lisis de células rojas de la sangre, efectos dermonecróticos y neurotóxicos.
Toxina del síndrome del shock tóxico	<i>Tsst-1</i>	Inductor del Síndrome del shock tóxico, pirogénica.
Enterotoxinas estafilocócicas	<i>Sea-e, Seg-j, Seb-sec, Sed, Seh, Sei, Sej, See</i>	Inducción de la proliferación celular y expresión de Citoquinas (CQs). Pirogénicas.
Adhesinas	<i>Fnbp (A y B), Eno, Cna, EbpS, BBp, Ica, Fib, ClfA, ClfB</i>	Unión a moléculas de la matriz celular.
Leucocidinas	<i>LukE-LukD, PVL (componentes LukS-LukF) y LukM</i>	Inducción de poros en neutrófilos y monocitos, activación de mediadores inflamatorios.

En este trabajo se estudiarán principalmente tres grupos diferentes de toxinas de *S. aureus*: hemolisinas, enterotoxinas y leucocidinas.

Las hemolisinas son potentes toxinas citolíticas que actúan sobre las membranas de muchas células (como los glóbulos rojos), causan una gran destrucción tisular y su producción está codificada en el cromosoma bacteriano aunque también puede ser codificada por plásmidos adquiridos. Se pueden diferenciar cuatro tipos de hemolisinas diferentes y cada cepa puede producir varias de estas toxinas.

Las enterotoxinas, por otra parte, son la causa del síndrome de intoxicación alimentaria estafilocócica. Son proteínas termorresistentes y su producción está codificada en plásmidos, cromosoma o fagos temperados. Se conocen cinco tipos antigénicos, siendo el A el más importante por su alta frecuencia en la aparición de brotes de intoxicación alimentaria.

Por otra parte, las leucocidinas son proteínas que destruyen a los leucocitos, interfiriendo así en un importante mecanismo de defensa del huésped. Su producción está codificada principalmente en el cromosoma de la bacteria. En las lesiones de la piel, como quemaduras y granos, la producción de estas proteínas ocasiona una considerable destrucción de células del hospedador y es uno de los factores responsables de la formación de pus (Madigan *et al.*, 2012).

1.3 Formas de resistencia de la bacteria.

La patogénesis es la capacidad que posee un microorganismo para causar una determinada enfermedad. Dicha capacidad depende de que la bacteria pueda superar los obstáculos que pone de manifiesto el hospedador para evitar o impedir el proceso de infección. Para combatir la invasión por dichos microorganismos al hospedador se le administran sustancias químicas que tienen un efecto inhibitorio o letal en las bacterias que provocan dicha infección. Dichas sustancias son conocidas como antimicrobianos (Ingraham & Ingraham, 1998).

Los antimicrobianos actuarán como bactericidas o bacteriostáticos según la clase de antimicrobiano, así como la sensibilidad que el microorganismo presente ante dicho compuesto. En términos de sensibilidad podemos encontrarnos con antibióticos que no causan efectos en los microorganismos, entonces se dice que la bacteria es resistente a dicho antimicrobiano. De esta manera, teniendo en cuenta el patrón de sensibilidad o resistencia que presenten, podemos clasificarlos en compuestos de amplio espectro o espectro reducido. Los de espectro reducido afectan solamente a un grupo concreto de microorganismos y son la mejor opción cuando se conoce el agente causal de la infección. Los de amplio espectro, por el contrario, son activos frente a dos o más grupos microbianos, lo que presenta una clara ventaja cuando se desconoce el agente causal de la enfermedad (Mims *et al.*, 1999).

Las resistencias que presentan las bacterias a los distintos antibióticos se pueden dividir en naturales (o innatas) y adquiridas por variación genética. La resistencia natural a determinados agentes antimicrobianos es una propiedad exclusiva de una especie concreta. Sin embargo, las resistencias adquiridas son propiedad de una o varias cepas individuales dentro de una especie. Estas son debidas a alteraciones genéticas que pueden transmitirse de una generación a otra de cepas microbianas.

La resistencia natural que las bacterias pueden presentar a los agentes antimicrobianos son: que su célula diana haya sido alterada por lo que no puede ser atacada por el antimicrobiano, o que dicho antibiótico no pueda unirse a la pared del hospedador por cambios conformacionales en las proteínas de unión, o a la inactivación del fármaco utilizado (Tabla 2) (Ingraham & Ingraham, 1998).

Tabla 2. Los mecanismos de resistencia pueden diferenciarse en tres tipos principales (Mims *et al.*, 1999).

Antibacterianos	Mecanismos de resistencia		
	Diana alterada	Captación alterada	Inactivación del fármaco
B-lactámicos	+	+	++
Glucopéptidos	+		
Aminoglucósidos	-	+	++
Tetraciclinas	-	+	
Cloranfenicol		-	+
Sulfamidas	++	-	
Rimpamicina	++		

- **Raro: infrecuente o sólo en algunas especies, + frecuente, ++ muy frecuente en muchas especies**

Un mecanismo bastante común de resistencia es la producción de enzimas que destruyen los antibióticos. Por ejemplo la enzima bacteriana β -lactamasa rompe el anillo de los agentes β -lactámicos, dando lugar a productos inactivos desde el punto de vista microbiológico. Los β -lactámicos inhiben la síntesis de la pared celular al unirse a las proteínas ligadoras de penicilina (PLP). La inhibición de una o más de estas enzimas esenciales dan lugar a la acumulación de unidades precursoras de la pared celular, lo que activa el sistema autolítico de la célula y su lisis. Los genes que codifican estas enzimas se distribuyen ampliamente en el reino bacteriano y se encuentran en el cromosoma o en plásmidos (Mims *et al.*, 1999).

Las resistencias adquiridas que presentan los agentes antimicrobianos pueden estar codificadas en genes cromosómicos o contenidos en plásmidos. La resistencia codificada por el cromosoma se adquiere mediante mutaciones en su genoma. Esto da lugar a microorganismos que tienen una mayor probabilidad de sobrevivir en ambientes donde exista un antimicrobiano.

La resistencia codificada por plásmidos puede transferirse fácilmente de una cepa a otra, incluso de una especie a otra, mediante conjugación. A los plásmidos que portan genes de resistencia a antibacterianos se les llama factores R, estos pueden tener distintos genes que codifiquen resistencia a antibióticos diferentes (Ingraham & Ingraham, 1998).

2. OBJETIVOS.

- Detección de alguno de los factores de virulencia implicados en los mecanismos de patogenicidad como hemolisinas, enterotoxinas o leucocidinas en los diez aislados seleccionados de *S. aureus*.
- Determinar la sensibilidad que presentan esos diez aislados, previamente seleccionados de la especie *S. aureus*, a los antibióticos siguientes: *linezolid*, *mupirocina*, *daptomicina*, *oxacilina*, *fosfomicina*, *clindamicina*, *tobramicina*, *nitrofurantoína*, *ácido nalidíxico*, *amoxicilina*, *gentamicina* y *aztreonam*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1 Aislados y medios utilizados en los experimentos.

En este trabajo se utilizaron diez aislados que se escogieron al azar de una reserva de catorce cepas de *S. aureus* utilizados previamente en el trabajo de Laura García China (García, 2014) que se recuperaron de muestras clínicas de pacientes de la Unidad de Diálisis del Hospital Universitario Nuestra Señora de la Candelaria (HUNSC). Dichos aislados fueron sembrados en placas y, posteriormente, se incubaron a 37° C durante 24 horas. Tales aislados fueron los siguientes: 182, 195, 265, 266, 381, 382, 383, 384, 385, 387.

Para la obtención y conservación de los aislados se sembraron las bacterias en placas de Petri con medio enriquecido *BHI* (*Brain Heart Infusion*). Tras el crecimiento de las bacterias, se hizo una suspensión de las mismas en tubos eppendorfs 1.5 ml que contenían 700 µl BHI y 200 µl glicerol al 80%. Se conservaron en el congelador a -20°C.

Los medios y reactivos utilizados en el estudio fueron los siguientes:

- Para los aislados y los experimentos de sensibilidad o resistencia: *BHI Agar* (Difco™ Brain Heart Infusion Agar) y *Mueller Hinton* (Difco™ Mueller Hinton) preparados siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Para la realización de la electroforesis: se diluyó con agua destilada TAE 5X (40 mM Tris, 40 mM acetato, 2 mM EDTA, pH 8) para obtener TAE 1X. Por otra parte, para la

preparación de la agarosa (Agarose D1 Low EEO, Conda Pronadisa) se añadieron 50 g del producto en 50 ml de TAE 1X en una relación 1:1 (agarosa al 1%). Y el tampón de carga se preparó 0.15% de azul de bromoferol, 0.15% de xileno cianol y 30% de glicerol, a una concentración de 6X.

3.2 Detección de las toxinas presentes en las cepas de *S. aureus*.

Las posibles toxinas que se pueden detectar en las diferentes cepas son: *Hla* (*Hemolisina a*), *Hld* (*Hemolisina d*), *Hlg* (*Hemolisina g*), *sea-e* (*Enterotoxina estafilocócica e*), *seg-j* (*Enterotoxina estafilocócica j*), *sei* (*Enterotoxina estafilocócica i*), *sed* (*Enterotoxina estafilocócica d*), *seb-sec* (*Enterotoxina estafilocócica b-c*), *see* (*Enterotoxina estafilocócica e*), *seg* (*Enterotoxina estafilocócica g*), *seh* (*Enterotoxina estafilocócica h*), *lukE* (*Leucocidina E*), *lukD* (*Leucocidina D*), *lukM* (*Leucocidina M*), *PVL* (*Panton Valentin leucocidina*).

Para llevar a cabo el estudio de la presencia de genes que codifiquen dichas toxinas, utilizamos los diez aislados escogidos previamente. Tras la preparación de las cepas que se iban a utilizar, se procedió a la amplificación de las muestras mediante la técnica de *Reacción en Cadena de la Polimerasa* (PCR) y, a continuación, se visualizó la migración mediante el proceso de electroforesis (Figura 2).

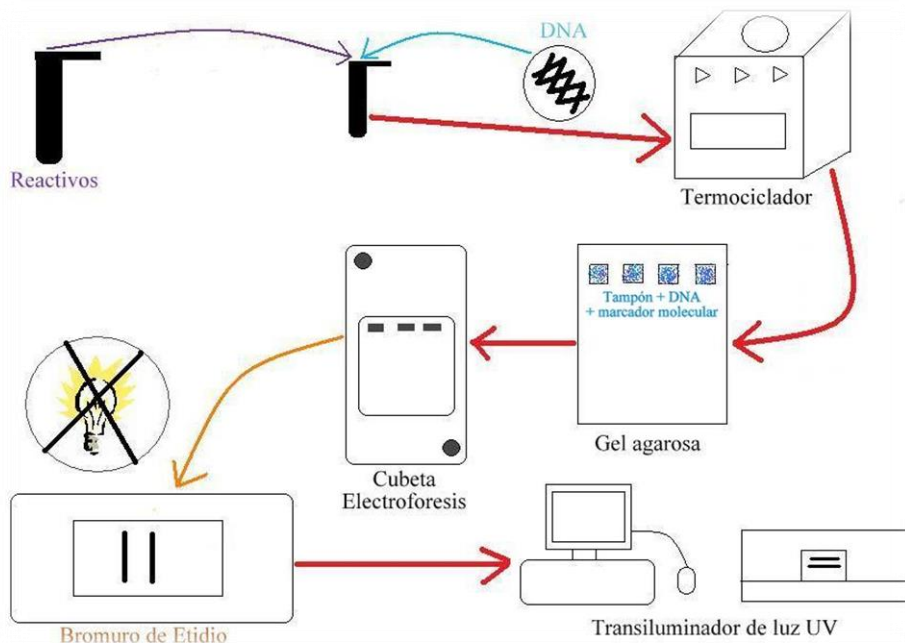


Figura 2. Proceso de PCR y electroforesis en gel de agarosa para detectar las toxinas presentes en los diferentes aislados de *S. aureus*.

3.2.1 PCR

Para la realización de esta técnica se tomaron como referencia los protocolos utilizados y/o descritos previamente por el grupo del Dr. Sebastián Méndez Álvarez en la Unidad de Investigación del HUNSC en otros estudios, cuyos resultados habían sido favorables (Rivero, 2008).

Se añadió en un tubo eppendorf de 150 µl la cantidad de DNA estipulado en el protocolo (López, 1996-97) y se alcanzaron los 25 µl de volumen total necesario con la adición de la mezcla de reactivos preparada previamente. Se variaron las cantidades de reactivos en PCRs simple (Tabla 3) o PCRs doble (Tabla 4).

Tabla 3. Protocolo PCR simple.

Buffer	2.5 µl
MgCl₂	1.5 µl
dNTPs	2 µl
Primers	0.5 µl
Taq pol	0.25 µl
DNA	2.5 µl
H₂O	Enrasar a 25 µl

Tabla 4. Protocolo PCR doble.

Buffer	2.5 µl
MgCl₂	1 µl
dNTPs	2 µl
Primers	0.25 µl
Taq pol	0.25 µl
DNA	2.5 µl
H₂O	Enrasar a 25 µl

Posteriormente, se colocaron los tubos eppendorf de 150 µl con todos los reactivos y el DNA en el termociclador (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler). Este fue programado, dependiendo de la toxina, variando la temperatura de anillamiento y unos tiempos determinados en cada caso (Tabla 5).

Tabla 5. Tiempos y temperaturas de anillamiento para PCR dependiendo de la toxina (López, 1996-97)

<i>Hla</i>	<i>Hld, Hlg</i>
94° C → 5 min	95° C → 5 min
94° C → 1 min	95° C → 30 seg } 60° C → 45 seg } 72° C → 45 seg } 30 ciclos (T. a.)
60° C → 1 min	
72° C → 1 min	
94° C → 1 min	72° C → 7 min
55° C → 1 min	
72° C → 1 min	
72° C → 10 min	

<i>LukE, lukD</i>	<i>LukM</i>
94° C → 4 min 94° C → 30 seg } 63° C → 30 seg } 10 ciclos (T. a.) 72° C → 30 seg } 94° C → 30 seg } 55° C → 45 seg } 25 ciclos (T. a.) 72° C → 30 seg } 72° C → 7 min }	94° C → 5 min 94° C → 30 seg } 58° C → 30 seg } 30 ciclos (T. a.) 72° C → 30 seg } 72° C → 7 min }
<i>PVL</i>	<i>Sea-e, seg-j, sed, sei, seb-sec, see, seg</i>
94° C → 5 min 94° C → 30 seg } 59° C → 45 seg } 30 ciclos (T. a.) 72° C → 45 seg } 72° C → 7 min }	95° C → 5 min 95° C → 1 min } 68° C → 45 seg } 15 ciclos (T. a.) 72° C → 1 min } 94° C → 1 min } 64° C → 45 seg } 16 ciclos (T. a.) 72° C → 1 min }
T. a. = Temperatura de anillamiento	

3.2.2 Electroforesis.

Se preparó un gel de agarosa con 14 pocillos y se procedió a la preparación de las muestras:

- 3 µl de marcador molecular + 3 µl de tampón de carga + 6 µl de agua (1 muestra).
- 5 µl de muestra amplificada + 3 µl de tampón de carga + 4 µl de agua (10 muestras).

El gel solidificado fue sumergido en tampón TAE 1X en una unidad de electroforesis de forma que quedó cubierto unos 3-5 mm. Las muestras fueron colocadas en los pocillos en un orden escogido previamente, siendo el marcador de peso molecular el que se encuentra en primer lugar. El proceso de electroforesis se realizó a 85 V durante aproximadamente 1 hora.

Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a sumergir el gel en tampón TAE 1X con *Bromuro de Etidio* durante 30-40 minutos en condiciones de oscuridad. De esta manera, con un transiluminador de radiación ultravioleta se hicieron visibles los ácidos nucleicos. Éstos se

fotografiaron empleando un analizador de imagen *GelDoc 2000* (Biorad), quedando registradas las imágenes de forma digital (Figura 3).



Figura 3. Ejemplo de gel obtenido tras la electroforesis.

3.3 Determinación de la sensibilidad o resistencia a distintos antibióticos.

Las pruebas de sensibilidad bacteriana se llevaron a cabo mediante el antibiograma que se utiliza para medir la sensibilidad de una cepa bacteriana a uno o varios antibióticos. La clave utilizada para conocer la información de dicha sensibilidad es la siguiente:

- Sensible (S): si existe un halo de inhibición inferior al estipulado por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica para el estudio antibiótico de la especie *S. aureus*. El tamaño de dicho halo dependerá del antibiótico que se estudie.
- Intermedio (I): si el halo de inhibición se encuentra en una posición intermedia entre la sensibilidad y la resistencia.
- Resistente (R): si la el halo de inhibición supera el estipulado por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica para el estudio antibiótico de la especie *S. aureus*. El tamaño de dicho halo dependerá del antibiótico que se estudie.

El método utilizado en este trabajo para la determinación de la sensibilidad a los distintos antibióticos es el de *Kirby-Bauer* (Figura 4).

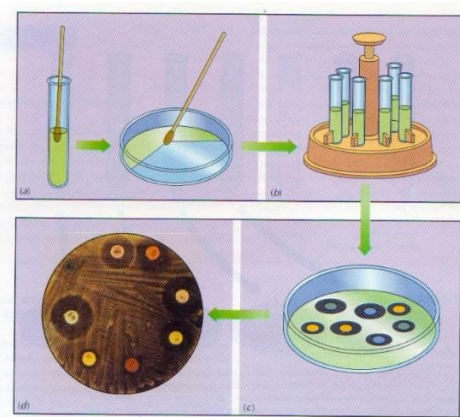


Figura 4. Técnica de difusión en agar para estudiar la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos (Ingraham & Ingraham, 1998)

En primer lugar, se inoculó en tubos que contenían 5 ml de MH líquido (*Mueller Hinton* líquido) las bacterias de interés. Tras esto, se sembró 0.1 ml de dicha solución en un medio de cultivo sólido enriquecido con BHI (*Brain Heart Infusión Agar*), mediante la realización de una siembra en césped. Finalmente, se colocaron los diferentes discos que contenían los antibióticos para la realización del método de sensibilidad por difusión en placa. Se incubaron a 37° C durante 24h para su posterior observación.

Una vez transcurrido este tiempo, se observó la presencia o ausencia de halos de inhibición en las placas. Tras la identificación de dichos halos, se procedió a la medición de su radio y se compararon con las tablas elaboradas por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica con los diferentes antibióticos para la especie *S. aureus*.

Los antibióticos que se utilizaron en este trabajo se obtuvieron de la reserva que había en la Unidad de Investigación del HUNSC, pertenecientes a distintas casas comerciales detalladas a continuación (Tabla 6).

Tabla 6. Mecanismos de acción de determinados antibióticos (Vademecum, 2015).

Nombre	Mecanismo de acción
<i>Linezolid</i> 5μg (Conda Pronadisa)	Antibacteriano, inhibe la síntesis proteica bacteriana por unión al ribosoma y bloqueo de la translación.

<i>Mupirocina 20 µg</i> (Conda Pronadisa)	Antibiótico de amplio espectro, inhibe la síntesis bacteriana de proteínas mediante la ligazón específica y reversible a isoleucil-tRNA sintetasa.
<i>Daptomicina 30 µg</i> (Conda Pronadisa)	Activo contra Gram+, se une a la membrana bacteriana causando despolarización y conduciendo a inhibición rápida de síntesis de proteínas, ADN y ARN.
<i>Oxacilina 10 µg</i> (Conda Pronadisa)	Bactericida. Inhibe transpeptidasas y carboxipeptidasas impidiendo la síntesis de la pared celular bacteriana.
<i>Fosfomicina 200 µg</i> (BD Sensi-disc)	Bactericida. Inhibe la síntesis de pared bacteriana por bloqueo irreversible de UDP-N-acetil-glucosamina.
<i>Clindamicina 2 µg</i> (BD Sensi-disc)	Inhibe la síntesis proteica bacteriana a nivel de la subunidad 50S ribosomal y evita formación de uniones peptídicas.
<i>Tobramicina 10 µg</i> (BD Sensi-disc)	Inhibe la síntesis proteica bacteriana por unión a subunidad 30S ribosomal.
<i>Nitrofurantoína 300 µg</i> (BD Sensi-disc)	Bactericida. Interfiere en los procesos enzimáticos de respiración celular, metabolismo glucídico y síntesis de pared bacteriana.
<i>Ácido nalidíxico 30 µg</i> (BD Sensi-disc)	Bloquea, selectiva y reversiblemente la replicación del DNA bacteriano.
<i>Amoxicilina 20 µg</i> (BD Sensi-disc)	Bactericida. Inhibe la acción de peptidasas y carboxipeptidasas impidiendo la síntesis de la pared celular bacteriana.

Gentamicina 10 µg
(BD Sensi-disc)

Bactericida. Penetra en la bacteria y se une a las subunidades ribosomales 30S y 50S inhibiendo la síntesis proteica.

Aztreonam 30 µg
(BD Sensi-disc)

Bactericida. Inhibe la síntesis de pared celular bacteriana.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Detección de las toxinas presentes en las cepas de *S. aureus*.

En estudios anteriores se ha podido observar el tamaño de los fragmentos amplificados de las cepas de *S. aureus* que sirvieron de referencia en la elaboración de este trabajo (López, 1996-97), permitiendo tener una idea previa del tamaño aproximado que deberíamos obtener de cada una de las diferentes toxinas.

Como los procedimientos basados en PCR que se utilizaron, no estaban dando los resultados esperados se comenzaron a variar las condiciones para la detección de las diferentes toxinas que presentaban las distintas cepas de *S. aureus*.

- Variación de las cantidades de MgCl₂, dNTPs, Taq polimerasa que se incluían en los diferentes protocolos de PCR.
- Construcción de una rampa de temperatura, donde se varía la temperatura de anillamiento por encima y por debajo de la inicial hasta 4° C.
- Cambio de la Taq polimerasa por otra de un nuevo lote, lo que implicó también el cambio del Buffer y el MgCl₂.
- Cambio del tampón de carga y el marcador de peso molecular que se utilizan en el proceso de electroforesis.
- Cambio en la cantidad de DNA molde utilizado.
- Regeneración de los nucleótidos a partir de un nuevo kit.
- Regeneración del *Bromuro de Etidio*, puesto que cabía la posibilidad de que estuviera alterado.
- Utilización de las cepas portadoras del *loci* para toxinas que estaban conservadas en el congelador de la Unidad de Investigación del HUNSC a -80° C.

A pesar de los cambios realizados, no se logró la obtención de ningún resultado demostrable. Este hecho puede ser debido a que en el momento de la realización, en alguno de los pasos, se produjo un error humano debido a la inexperiencia en dicha técnica.

4.2 Determinación de la sensibilidad a distintos antibióticos.

Tabla 7. Resistencia / Sensibilidad de las diferentes cepas a los distintos antibióticos.

CEPAS	ANTIBIÓTICOS					
	<i>AMC</i>	<i>ATM</i>	<i>CMN₂</i>	<i>DAP</i>	<i>FOS</i>	<i>F/M</i>
182	R	R	R	R	S	R
195	R	R	R	R	S	R
265	R	R	R	R	R	R
266	R	R	R	R	S	R
381	R	R	R	R	S	R
382	R	R	R	R	S	R
383	R	R	R	R	S	R
384	R	R	R	R	S	R
385	R	R	R	R	S	R
387	R	R	R	R	S	R
R = cepas resistentes			S = cepas sensibles			

Tabla 8. Resistencia / Sensibilidad de las diferentes cepas a los distintos antibióticos.

CEPAS	ANTIBIÓTICOS					
	<i>GM</i>	<i>LNZ</i>	<i>MUP</i>	<i>NA30</i>	<i>OX</i>	<i>TMN</i>
182	R	R	R	R	R	R
195	R	R	R	R	R	R
265	R	R	R	R	R	R
266	R	R	S	R	R	R
381	R	R	S	R	R	R
382	R	R	S	R	R	R
383	R	R	S	R	R	R
384	R	R	S	R	R	R
385	R	R	R	R	R	R

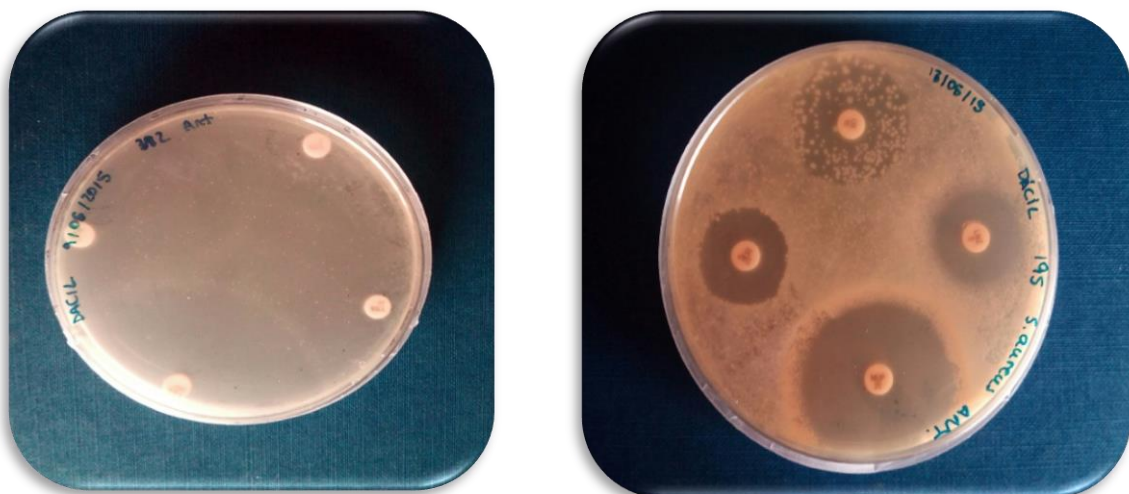
387	R	R	R	R	R	R
R = cepas resistentes			S = cepas sensibles			

Como podemos observar en las dos tablas anteriores (Tabla 7 y 8), existe una resistencia muy elevada por parte de los diez aislados estudiados a los antibióticos utilizados en este trabajo. El porcentaje de sensibilidad total es del 11.66% mientras que el otro 88.33% se corresponde con la resistencia a la acción de dichos antimicrobianos, según las tablas para los distintos antibióticos asignadas por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

En el estudio de la sensibilidad y resistencia podemos observar dos antibióticos que destacan sobre los demás, puesto que producen sensibilidad en algunas de las cepas. La fosfomicina por un lado provoca la mayor sensibilidad, siendo solamente resistente una de las diez cepas estudiadas (265), suponiendo un 1% del total. Por otro lado, la mupirocina, que aunque su nivel de afección es menor que el antimicrobiano antes nombrado, presenta un 50% de resistencia en las cepas estudiadas.

En el resto de los antibióticos estudiados tales como: ácido nalidíxico, amoxicilina, aztreonam, clindamicina, daptomicina, gentamicina, linezolid, nitrofurantoina, oxacilina y tobramicina, se observa como las cepas presentan un 100% de resistencia a ellos.

Podemos observar ejemplos de estos resultados en las imágenes que se muestran a continuación (Figura 5)



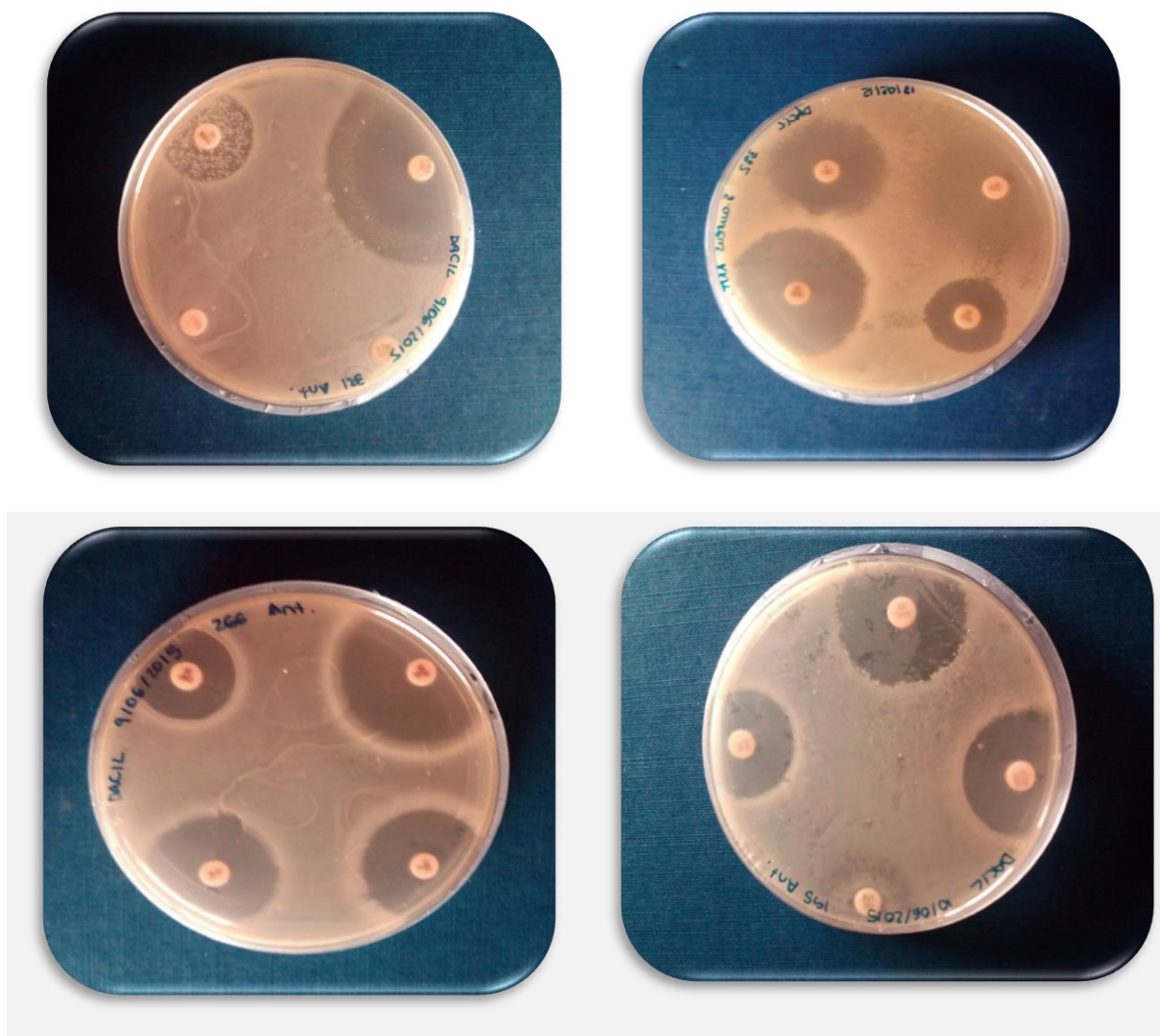


Figura 5. Resultado de la técnica de Kirby-Bauer.

Al comparar nuestros resultados con estudios anteriores, hemos observado algunas diferencias con respecto a la sensibilidad o resistencia de las cepas de *S. aureus* a diferentes antibióticos (Tabla 9). Por ejemplo: en algunos trabajos se observan unos porcentajes de sensibilidad altos a antibióticos tales como la oxacilina (Mamani *et al.*, 2006; Souza, 2015), la tobramicina (Vola *et al.*, 2013), el aztreonam, el linezolid, la amoxicilina, la nitrofurantoína, la ampicilina y el ácido nalidíxico (Souza, 2015). En cambio, en nuestro trabajo la totalidad de las cepas resultaron resistentes a ellos.

Por otro lado, nos encontramos que para un mismo antibiótico pueden haber porcentajes de sensibilidad bastante distintos dependiendo del trabajo, como la gentamicina (Souza, 2015; Mamani *et al.*, 2006; Seidl *et al.*, 2015) y la clindamicina (Seidl *et al.*, 2015; Treesirichod, 2013).

Sin embargo en nuestro estudio todas las cepas presentaron a dichos antibióticos el mismo resultado, el 100% de resistencia.

Respecto a la sensibilidad a la fosfomicina se obtuvieron en otro estudio un 89% (Souza, 2015) de manera similar a lo que obtuvimos en el nuestro (99%).

Tabla 9. Comparación de resultados obtenidos en este estudio, en relación a la sensibilidad que presentan las cepas a los distintos antibióticos, con otros trabajos consultados.

ANTIBIÓTICOS	RESULTADOS DE SENSIBILIDAD OBTENIDOS	RESULTADOS DE SENSIBILIDAD HALLADOS EN OTROS TRABAJOS
Gentamicina	0%	24.4% [1], 65% [2], 84% [3]
Oxacilina	0%	68% [2], 100% [1]
Clindamicina	0%	69% [3], 36.8% [4]
Tobramicina	0%	56.4% [5]
Aztreonam	0%	100% [1]
Linezolid	0%	100% [1]
Amoxicilina	0%	80% [1]
Nitrofurantoína	0%	72.2% [1]
Ampicilina	0%	62.9% [1]
Ácido nalidíxico	0%	50% [1]
Fosfomicina	99%	89% [1]

[1] Souza, 2015; [2] Mamani *et al.*, 2006; [3] Seidl *et al.*, 2015; [4] Treesirichod, 2013; [5] Vola *et al.*, 2013

CONCLUSIONES

Los aislados utilizados de *S. aureus* son resistentes a la mayor parte de los antibióticos ensayados en este trabajo (10/12 antibióticos). Los dos antibióticos a los que son sensibles las cepas de esta bacteria son: la fosfomicina y la mupirocina, produciendo la primera un menor índice de resistencia en las cepas (1%) que la segunda (50%).

La mejor opción como tratamiento a dichas cepas sería no utilizar los otros antibióticos (ácido nalidíxico, amoxicilina, aztreonam, clindamicina, daptomicina, gentamicina, linezolid,

nitrofurantoína, oxacilina, tobramicina) ya que el índice de resistencia que presentan éstos es mucho mayor (100%).

Un punto a tener en cuenta, es que en comparación con otros estudios se ha observado como la frecuencia de resistencias en las cepas es mucho mayor. Esto puede ser debido a un mal uso o abuso de los antibióticos utilizados en momentos previos al estudio realizado en la Unidad de Diálisis del Hospital Universitario Nuestra Señora de la Candelaria. Pero no podemos asegurarlo firmemente, puesto que, no se ha realizado ningún test estadístico que lo confirme.

A pesar de todo, es necesario seguir investigando en este campo, realizando estudios con mayor número de réplicas, que nos permitan obtener resultados fiables con validez estadística. Con ello, se puede dilucidar claramente las resistencias y sensibilidades obteniendo resultados más representativos, buscando la unanimidad.

CONCLUSION

All isolates of *S. aureus* studied are resistant to most antibiotics tested in this study (10/12 antibiotics). We only found sensitive isolates in the case of two antibiotics: fosfomicin and mupirocin, producing the first a lower rate of resistance strains (1%) than the second (50%).

The best treatment option, for these strains, would not use other antibiotics studied (nalidixic acid, amoxicillin, aztreonam, clindamycin, daptomycin, gentamicin, linezolid, nitrofurantoin, oxacillin, tobramycin) since the resistance index presented against theirs are higher (100%).

A point to note is that in comparison to other studies is that the frequency of resistance in strains is so much great in the present study. This may be due to a misuse or abuse of antibiotics used in the previous study conducted at the Dialysis Unit of the Hospital Universitario Nuestra Señora de la Candelaria. This is a clear example of what causes the misuse of antibiotics in our society, and it must be corrected to prevent future resistance to antibiotics which are currently sensitive.

Nevertheless, further research is needed in this field, conducting studies with larger numbers of replicas that allow us to obtain reliable results with statistical validity. Thus, clearly elucidate the strengths and sensitivities obtain more representative results, searching unanimity.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecerles a mis tutores, el Dr. Sebastián Méndez, por su preocupación constante sobre los avances del trabajo, a pesar de las dificultades que nos han podido surgir durante la investigación, y el Dr. Macía por su participación en el trabajo. También a Félix Machín y sus colaboradores por resolverme las dudas que me fueron surgiendo en el día a día y por los intercambios de material. A la técnica Isabel Lorenzo por esos consejos y por ayudarme en la búsqueda de respuesta a esas preguntas complicadas. Al grupo de investigación de Félix Claverie, por ayudarme en la búsqueda de soluciones cuando mi imaginación se había agotado y por prestarme también los recursos que necesitaba para la elaboración de mi trabajo. Además, agradecer al director de la Unidad de Investigación del HUNSC, su beneplácito para poder estar en la unidad como alumna para realizar el trabajo de Fin de Grado.

Por último, agradecer a mi familia por todo el apoyo que he recibido de ellos. A mis padres por animarme cuando lo veía todo perdido y por mostrarme que con esfuerzo puedo conseguir todo aquello que me proponga. A mi hermana por preocuparse por mí y estar a mi lado siempre que la necesité, corrigiéndome los errores de expresión a la hora de realizar el escrito. Y a mis amigos que se preocuparon de mi trabajo como si fuera el suyo. Por todo esto y mucho más, gracias a todos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguadero V., 2014. *Tipificación molecular y estudio de clonalidad de Staphylococcus aureus resistente a meticilina, productores de infecciones intrahospitalarias y extrahospitalarias en Extremadura*. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura, España.
- Borraz C., 2006. *Epidemiología de la Resistencia a meticilina en cepas de Staphylococcus aureus aisladas en hospitales españoles*. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona, España.
- Domínguez M. & Rodríguez J., 2006. *Infecciones por estafilococos, Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Panamericana, 253- 262. Madrid, España.
- Foster T., 2004. *The Staphylococcus aureus "superbug"*. J. Clin Invest. 1696-1696. Dublín.
- Foster T., 2005. *Immune evasión by staphylococci*. Nat. Rev. Microbiol. 948-958. Irlanda.
- García L., 2014. *Transferencia génica en estafilococos: diseminación de resistencias y factores de virulencia. Progreso y control de diálisis*. Trabajo de fin de grado. Universidad de La Laguna, España.
- Gómez C., 2013. *Staphylococcus aureus en población pediátrica: epidemiología molecular y factores de virulencia*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.

Ingraham J. & Ingraham C., 1998. *Farmacología antimicrobiana, Introducción a la Microbiología*. V.II, Editorial Reverté, 486-511. Barcelona, España.

Kloos W. & Bannerman T., 1999. *Staphylococcus and Micrococcus, Manual of clinical microbiology*. ASM Press, 264-282. Washington D. C.

López C., 1996-97. *Detección de polimorfismos en los genes tlr2, tlr4 y tfn humanos. Posible correlación con la susceptibilidad a infecciones por Staphylococcus aureus en pacientes con fibrosis quística*. Memoria de la fase de investigación. Universidad de La Laguna, España.

Madigan M., Martinko J., Dunlap P. & Clark P., 2009. *Biología de los Microorganismos*. 12ª Edición, Editorial Pearson, 491-1171. España.

Manders S., 1998. *Toxin-mediated streptococcal and staphylococcal disease*. J. Am. Acad. Dermatol. 383-398. USA.

Mamani E., Luján D. & Pajuelo G., 2006. *Perfil de sensibilidad y resistencia de Staphylococcus aureus. Experiencia en el Hospital Nacional Hipólito Unanue*. An. Fac. med. v.67. Lima, Perú.

Mims C., Playfair J., Roitt I., Wakelin D. & Williams R., 1999. *Agentes antimicrobianos y quimioterapia, Microbiología Médica*. Diorki Servicios Integrados de Edición, 411-429. Madrid, España.

Murray P., Baron E., Landry M. & Pealler M., 2006. *Staphylococcus, Micrococcus, and other Catalase-Positive Cocci, Manual of Clinical Microbiology*. V.I., 9ª edición. 390-411. España.

Murray P., Rosenthal K., Kobayashi G. & Pfaller M., 2003. *Microbiología Médica*. 4ª Edición, 173-212. España.

Pérez E., 2006. *Staphylococcus aureus resistentes a la meticilina: tipificación molecular y transferencia génica de la resistencia a mupirocina*. Tesis doctoral. Universidad de La Laguna, España.

Rivero, B., 2007-2008. *Caracterización de aislados de Staphylococcus aureus resistentes a la meticilina recolectados en la comunidad de Santa Cruz de Tenerife*. Memoria de Investigación. Universidad de La Laguna, España.

Rooijackers S., van Kessel K. & van Strijp J., 2005. *Staphylococcal innate immune evasion*. Trends Microbiol. 13: 596-601. Holanda.

Oogai Y., Matsuo M., Hashimoto M., Kato F., Sugai M. & Komatsuzawa H., 2011. *Expression of Virulence Factors by Staphylococcus aureus Grown in Serum*. Applied and Environmental Microbiology. 77: 8097-8105. Japón.

Seidl K., Leimer N., Palheiros M., Furrer A., Holzmann A., Senn G., Zbinden R. & Zinkernagel A., 2015. *Clonality and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus aureus at the University Hospital Zurich, Switzerland between 2012 and 2014*. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 14:14 doi: 10. 1186/s12941-015-0075-3.

Souza R., Trevisol D. & Schuelter F., 2015. *Bacterial sensitivity to fosfomicin in pregnant women with urinary infection*. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, volume 19, Issue 3, 319-323.

Treesirichod A., Hantagool S. & Prommalikit O., 2013. *Nasal carriage and antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus among medical student at the HRH Princess Maha Chakri Sirindhorn Medical Center, Thailand: A cross sectional study*. Journal of Infection and Public Health, Volumen 6, Issue 3, 196-201.

Vola M., Moriyama A., Lisboa R., Vola M., Hirai F., Martins P. & Höfling A., 2013. *Prevalence and antibiotic susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in ocular infection*. Arq. Bras. Oftalmol. vol.76 no.6

<http://www.vademecum.es/>

ANEXO 1: LISTADO DE ABREVIATURAS:

Tabla 10. Lista de abreviaturas utilizadas en el trabajo.

PALABRA	ABREVIATURA
<i>Brain Heart Infusion</i>	<i>BHI</i>
Desoxyribonucleic acid	DNA
Hemolisina a	<i>Hla</i>
Hemolisina b	<i>Hlb</i>
Hemolisina c	<i>Hlc</i>
Hospital Universitario Nuestra Señora de la Candelaria	HUNSC
Lecucocidina E-D	<i>LukE-lukD</i>
Leucocidina M	<i>LukM</i>
<i>Mueller Hinton</i>	<i>MH</i>
Reacción en cadena de la polimerasa	PCR
Panton Valentin Leucocidina	<i>PVL</i>
Resistente	R
Sensible	S
Enterotoxina estafilocócica a-e	<i>Sea-e</i>
Enterotoxina estafilocócica b-c	<i>Seb-sec</i>
Enterotoxina estafilocócica d	<i>Sed</i>
Enterotoxina estafilocócica e	<i>See</i>
Enterotoxina estafilocócica g-j	<i>Seg-j</i>
Enterotoxina estafilocócica h	<i>Seh</i>
Enterotoxina estafilocócica i	<i>Sei</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
Temperatura de anillamiento	T. a.
Toxina del síndrome del shock tóxico	<i>Tsst-1</i>