

**Universidad CEU Cardenal Herrera  
CEINDO – CEU Escuela Internacional de  
Doctorado**

**PROGRAMA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA SALUD**



**CEU**

*Escuela Internacional  
de Doctorado*

**Caracterización inmunopatológica de un  
modelo de infección experimental  
intradérmica por *Staphylococcus aureus*  
en conejos**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Asunción Muñoz Silvestre

Dirigida por: Dr. D. Juan Manuel Corpa Arenas

Dr. D. David Viana Martín

VALENCIA

2018



***Facultad de Veterinaria***

***Departamento de Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos***

**AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE TESIS PARA SU PRESENTACIÓN**

Los Dres. D. JUAN MANUEL CORPA ARENAS y D. DAVID VIANA MARTÍN, como Directores de la Tesis Doctoral realizada por la Doctoranda Dña. ASUNCIÓN MUÑOZ SILVESTRE, titulada **“Caracterización inmunopatológica de un modelo de infección experimental intradérmica por *Staphylococcus aureus* en conejos”**, autorizamos la presentación de la citada Tesis Doctoral, puesto que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

En Alfara del Patriarca, a 28 de noviembre de 2018.

Los Directores de la Tesis.

Fdo. Dr. D. Juan Manuel Corpa Arenas

Fdo. Dr. D. David Viana Martín



Este trabajo ha sido financiado por proyectos de investigación de las siguientes entidades: Universidad CEU Cardenal Herrera (INDI-1505, INDI-1606 e INDI-1707) y la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (AGL2011-30170-CO2-02 y AGL2014-53405-C2-2-P). Igualmente la doctoranda ha disfrutado de una beca de investigación de la Universidad CEU Cardenal Herrera.



*A mis padres y seres queridos*





## **AGRADECIMIENTOS**

Transcurridos cuatro años desde que comenzara mi andadura en el ámbito de la investigación científica, reconozco que han pasado muy rápido. De esto me he dado cuenta precisamente al finalizar la elaboración de esta tesis doctoral, no exenta de algunos imprevistos y contratiempos que prolongaron en el tiempo su desarrollo y ejecución. Por este motivo, en primer lugar quiero agradecer a la Universidad CEU Cardenal Herrera y a la CEU Escuela Internacional de Doctorado la oportunidad de disponer de un año más. Además, en esta primera posición también incluyo a los Dres. Juan Manuel Corpa y David Viana por brindarme en su día la ocasión de iniciar el doctorado bajo su dirección. Les agradezco el tiempo que me han dedicado durante todo el periodo, aún más si cabe en la etapa final, en la cual se recogen y condensan al máximo los conocimientos y experiencia aportados por los directores. Así pues, su dedicación ha sido el pilar de este trabajo, por lo que reitero mi gratitud hacia mis directores.

Por otra parte, durante este tiempo he conocido y he estado acompañada por personas que, en su estilo y forma de ser, me han aportado sensaciones y ejemplos para vivir, además de consejos prácticos y habilidades. Debo hacer especial mención a dos de estas personas, a mis compañeras Sara Pérez y Elena Moreno, con quienes más tiempo he compartido. Juntas hemos trabajado en equipo y nos hemos apoyado, en las penas y alegrías, de las vivencias del doctorado y de la vida misma. A Sara la conocí en el primer año del doctorado, momento en el que ella, alumna de quinto de veterinaria, era becaria de colaboración en nuestro grupo de investigación y estaba realizando su TFG. Elena se incorporó al grupo a finales de mi segundo año de doctorado, y recuerdo perfectamente que pasó a conocer el laboratorio y nuestras rutinas el día de mi cumpleaños, rechazando el aperitivo que le ofrecí... quién nos iba a decir que más adelante íbamos a compartir adicción por rosquilletas, croissants y empanadillas. Chicas: sabéis que aunque a veces puedo resultar distante y distraída, y tuve días un tanto huraños con vosotras, os guardo un gran cariño. De hecho, os echaba de menos incluso estando a dos puertas de vosotras. Han sido muchas horas y días de trabajo en vuestra compañía, donde la organización fue fundamental y la responsabilidad un requisito de

confianza. Me alegro mucho de haberos conocido. Y ahora, ¿quién va a hacer desaparecer las cajas de puntas vacías?

Otras personas que también he conocido durante este tiempo han sido los doctorandos del resto de grupos de investigación de la Universidad. Cuando empecé la mayoría de doctorandos estaban acabando su tesis (Ana, Maríoa, Sole, Sarita, María, Ester, Tania) y compartíamos el laboratorio con el grupo de investigación de Nacho Pérez (el llamado grupo de bioquímica). Al mismo tiempo que yo se incorporó al CEU otra doctoranda, Pilar Madrigal, y las dos fuimos las primeras doctorandas de la CEINDO en Valencia. Además, Pili fue quien depositó antes. Creo que nosotras, incluyendo a Sara, aportamos nuevos aires al laboratorio, una tarea que resultó sencilla gracias a la personalidad y disponibilidad de Pili, que estoy segura le van a ser útiles para hacer grandes proyectos.

En los años siguientes se fueron incorporando nuevos doctorandos y doctorandas: Beatriz, Roberto, Ángel, Cristina, Adrián, Josep, Teresa. Crecía de nuevo la familia de “becarios”, y a medida que pasaba el tiempo y se acercaba el momento de que yo entregara la tesis, podía ver en sus rostros la incertidumbre de pensar “cuando yo esté ahí donde está ella”, que seguro contrastaría con mi cara de cansancio (así me describían en esos días). Por eso, como he dicho al principio, todo llega y, además, llega más rápido de lo que imaginamos. Y en esto seguro que me entiende Bea, con quien intercambié tanto información sobre trámites y documentos, como estados de emoción. Así que, ánimo!!

En la Universidad, obviamente, también he coincidido con profesores, sobre todo anatomopatólogos: Joaquín, Agustín y Laura. También les agradezco la atención que me han prestado cuando he tenido dudas y los consejos que me han dado. Además, sin salir del ámbito de la anatomía patológica, una merecida mención a los técnicos de laboratorio por su labor: Rocío, Brenda y Laura. Con Brenda intercambié alguna hipótesis científica, en momentos de pseudo-lucidez en los que nos dejábamos llevar por el entusiasmo de querer dar respuesta alguna pregunta que no se había respondido todavía. Precisamente por ese interés, estoy segura de que vas a elaborar un TFG de mucha calidad. Disfruta de tu estancia Brenda. Y cómo no hablar de Fany, dedicada a la anatomía patológica casi durante toda la carrera, y con quien he compartido congresos y

momentos de trabajo en el laboratorio y en el microscopio. Ahora te toca a ti, Fany. Felicidades!! Y también mencionar a Jorge, Jaume y Carlota, a quienes les esperan nuevos retos, a cada cual desde una situación diferente; Jorge va a dar un paso más en su formación de anatomopatólogo, y Jaume y Carlota, que sin dejar de ser alumnos ya son veterinarios. Suerte a todos!!

Y sin abandonar todavía el CEU, recordar también a los alumnos que vinieron a nuestro laboratorio a hacer su TFG (Celia, Servando), TFM (Álex) o prácticas Erasmus (Natasha). Asimismo, comentar el cambio de vecindario que experimentamos al mudarnos al nuevo edificio. Al principio estuvieron con nosotras Marta, Sandra, Carmen López y Edgar, pero tras designarse definitivamente los puestos de trabajo, acabamos compartiendo estufas de cultivo con el grupo de Provagin (Juanjo, Ángel, Estrella, Empar, Lorena, Lola). Fuera con unos o con otros, la convivencia fue agradable. Y como no podía ser de otra manera, citar a las personas que también participan (o participaron) en el funcionamiento de la Universidad a través de su trabajo: Ámparo (laboratorio análisis clínicos); José Manuel y Maricarmen (recepción hospital); los Pacos (y su furgoneta); Eliseo (mantenimiento edificio Salud); José Antonio, Vanesa, Cris, Rocío y Ana (laboratorios); Paula, Juan, Javi, Marcos (granja); Ricardo, Iván, Matías, David, Marlene, Paqui (conserjes); Lorena, Vanesa, Ámparo (limpieza). Todas estas personas han aportado también su granito o montoncito de arena a mi trabajo, aunque se tratara de hacer su trabajo, valga la redundancia.

Por otra parte, mencionar también con cariño las ocasiones que he estado en la granja de conejos de la UPV, por el buen trato que he recibido por parte de quienes trabajan allí y lo que he aprendido de ellos, bien fuera en la granja bien fuera en los congresos de ASESCU. Gracias a Juanjo, Concha, Enrique, Eugenio, Luís, Pablo. Guardo anécdotas graciosos con todos ellos. Y por supuesto con Alberto, quien me ha ayudado muchísimo con el análisis estadístico de este trabajo y ha tenido paciencia para explicarme, incluso varias veces, las cuestiones que le reformulaba. Ahora veo de otra forma la estadística. Gracias Alberto!! Y cómo no acordarse del incomparable Joan Rosell, a quien tenemos en gran estima por su dedicación y profesionalidad, y su carisma.

Además, recordar de especial manera a mis amistades más apreciadas (Mariangeles, Marta y Joana) por su interés y apoyo, y al resto de personas conocidas del pueblo que también se interesaron por mi trabajo. Quienes me conocen bien saben que cuando digo pueblo, según el contexto y sin que diga el nombre, se trata de mi localidad natal (Bonrepós y Mirambell) o de mi localidad “de adopción” (Bronchales). No he podido evitar nombrar estos pueblos distantes porque siento alegría de haberme criado en un pueblo de la huerta valenciana, así como de disfrutar de la naturaleza y encontrar la paz al mismo tiempo en “el balcón de España”.

Finalmente, y no por ello menos importantes, mi familia, sobre todo mis padres. La razón principal ya no es sólo porque les debo la vida, sino porque también les debo su ejemplo. Las actitudes buenas que en mí puedan ver las demás personas en gran medida son las que me inculcaron en casa. Ellos tuvieron aptitud para criarme y educarme, y tanto en mis estudios universitarios como durante el doctorado, han tenido actitud para apoyarme y sostenerme con el cariño propio de los padres y la comprensión inherente al ser humano. Por eso les dedico el trabajo que se expone en las siguientes páginas.

## RESUMEN

*Staphylococcus aureus* es una bacteria capaz de producir diferentes tipos de lesiones en multitud de hospedadores. Las infecciones producidas por *S. aureus* son causa habitual de infecciones en la piel, donde suelen generar abscesos. Para entender la patogénesis de estas lesiones se requieren modelos de infección animal que se aproximen a las situaciones clínicas naturales. La susceptibilidad del hospedador, la dosis del inóculo y la elección de la cepa bacteriana son consideraciones importantes para establecer el modelo animal apropiado. Por esta razón, el presente manuscrito se centra en la caracterización y descripción inmunopatológica pormenorizada de un modelo de infección experimental en conejo empleando dosis bajas de *S. aureus*.

En primer lugar, se caracterizaron las lesiones cutáneas y las respuestas inmunitarias local y periférica tras la inoculación de una cepa ST121 de *S. aureus* aislada de conejo. Los resultados mostraron un aumento del número de linfocitos B y T CD25<sup>+</sup> sanguíneos a los 0,5 días post-inoculación (dpi). Todos los animales presentaron lesiones evidentes al 1º dpi, coincidiendo con el incremento del número de células inflamatorias (heterófilos) a nivel microscópico y el aumento de granulocitos sanguíneos. Esta afluencia de heterófilos y su agrupación en el lugar de inoculación dio lugar a la formación de nódulos. A los 3 dpi los abscesos alcanzaron las mayores dimensiones y se observaron los primeros casos de dermonecrosis y ulceración. Además, a nivel microscópico los abscesos estaban rodeados por una banda eosinófila y presentaban fenómenos de Splendore-Hoeppli en su interior, y comenzaron a aumentar el número de macrófagos locales y de monocitos sanguíneos. El 7º dpi se caracterizó por la apertura de los abscesos y la consecuente disminución del número de bacterias. A nivel local, se elevaron el número de células plasmáticas, linfocitos T y macrófagos; y de granulocitos y monocitos en sangre. Tras el drenaje del contenido purulento comenzó la reparación progresiva de las lesiones hasta los 28 dpi. A nivel histológico los fenómenos de reparación se correspondieron con la presencia de tejido de granulación, disminución gradual del número de células inflamatorias y reepitelización de la zona de lesión. Asimismo, durante la fase de recuperación tuvo lugar un incremento de las poblaciones sanguíneas de granulocitos y monocitos a los 14 dpi.

En segundo lugar, se evaluaron las lesiones provocadas por diversas cepas de *S. aureus* mutantes en genes involucrados en la formación de abscesos (*agr*, *coa-vwb*, *hla* y el locus *psm $\alpha$* ), para estudiar posibles modificaciones en su morfología y respuesta inflamatoria. A los 7 dpi, no hubo diferencias significativas en el número de animales infectados, el tamaño y la gravedad de las lesiones producidas por las cepas mutantes respecto a la cepa salvaje. En cuanto a las lesiones a nivel histológico, los abscesos producidos por los mutantes también se caracterizaban por rodearse de bandas eosinófilas, mayoritariamente incompletas en las cepas J  $\Delta$ *agr* y J $\Delta$  *hla*, y fenómenos de Splendore-Hoeppli. Además, se observó mayor presencia de heterófilos difusos alrededor de los abscesos desarrollados por J  $\Delta$ *psm $\alpha$* ., J  $\Delta$ *agr* y J $\Delta$  *hla*. Por último, el infiltrado inflamatorio en el músculo cutáneo fue de carácter más leve-moderado, salvo con la cepa J  $\Delta$ *psm $\alpha$* .

Finalmente, se planteó comparar las lesiones y la respuesta inmunitaria desarrolladas por la cepa ST121 salvaje con las provocadas por distintas cepas ST121 mutantes a los 1, 3 y 7 dpi. La cepa cunícola salvaje y la cepa humana *rabbitizada* (F *dltB*<sup>f</sup>) fueron capaces de producir lesiones en todos los animales inoculados. Además, las lesiones cutáneas desarrolladas por la cepa mutante humana fueron similares a las producidas por la cepa salvaje aislada de conejo. Sin embargo, las cepas de origen cunícola produjeron lesiones más leves tras restablecer el gen *rot* (J *rot*<sup>+</sup>) y mutar el gen *dltB* (J *dltB*<sup>h</sup>). Asimismo, en los abscesos desarrollados por la cepa J *dltB*<sup>h</sup> no se observó una banda eosinófila, y sólo se encontraron fenómenos de Splendore-Hoeppli con la J *rot*<sup>+</sup>. Por otra parte, la respuesta inmunitaria periférica en los animales inoculados con las cepas mutantes se caracterizó por menor número de granulocitos y monocitos, y recuentos superiores de linfocitos (B, T, T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> y T CD25<sup>+</sup>). En cuanto a la respuesta inmunitaria local, al 1º dpi se encontró un mayor número de células plasmáticas en las lesiones producidas por la cepa J *rot*<sup>+</sup>, y sólo se detectaron linfocitos T en los animales infectados con F *dltB*<sup>f</sup> y J *dltB*<sup>h</sup>.

Por todo ello, el modelo experimental caracterizado en este trabajo puede constituir un sistema adecuado para reproducir, de forma fiable, las infecciones provocadas por *S. aureus* en condiciones naturales.

## ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is a bacterium capable of producing different types of lesions in many hosts. The infections produced by *S. aureus* are the usual cause of skin infections, where abscesses tend to form. Animal infection models that approach natural clinical situations are needed to understand the pathogenesis of these lesions. Host susceptibility, inoculum dose and choice of bacterial strain are relevant considerations to determine a suitable animal model. This is why the present manuscript centres on a characterisation and immunopathological description by detailing an experimental infection model in rabbits using low *S. aureus* doses.

Firstly, skin lesions and local and peripheral immune responses were characterised after the inoculation of an isolated rabbit strain ST121 of *S. aureus*. The results showed an increase in the number of B and T CD25<sup>+</sup> blood lymphocytes at 0.5 days post-inoculation (dpi). All the animals presented evident lesions on 1 dpi, which coincided with an increasing number of inflammatory cells (heterophils) under a microscope, and more granulocytes in blood. This abundance of heterophils and their grouping at the inoculation site gave way to nodes forming. On 3 dpi, abscesses had reached their biggest size, and the first cases of dermonecrosis and ulceration were observed. The microscope revealed that abscesses were surrounded by an eosinophil band, presented Splendore-Hoeppli phenomena in their interior, and the number of local macrophages and monocytes in blood began to grow. Dpi 7 was characterised by abscesses opening and the number of bacteria subsequently lowered. Locally, the number of plasma cells, T lymphocytes and macrophages rose, as did the number of granulocytes and monocytes in blood. After draining purulent content, lesion repair progressively started until 28 dpi. In histological terms, repair phenomena corresponded with the presence of granulation tissue, a gradual reduction in the number of inflammatory cells and epithelialisation in the lesion area. During the recovery phase, the granulocyte and monocyte populations in blood had grown by 14 dpi.

Secondly, the lesions caused by the different mutant *S. aureus* strains in the genes involved in abscess formation (*agr*, *coa-vwb*, *hla* and locus *psmA*) were evaluated to study any possible modifications in their morphology and inflammatory response. On 7

dpi, no significant differences were found in the number of infected animals, nor in the size or severity of the lesions caused by the mutant strains in relation to the wild strain. With the histological-type lesions, the abscesses caused by mutants were also characterised by being surrounded by eosinophil bands, most of which were incomplete in strains J  $\Delta agr$  and J  $\Delta hla$ , and by Splendore-Hoeppli phenomena. More diffuse heterophils were present around the abscesses developed by J  $\Delta psm\alpha$ , J  $\Delta agr$  and J  $\Delta hla$ . The inflammatory infiltrate in skin muscle was more mild-moderate, except with strain J  $\Delta psm\alpha$ .

Finally, a comparison of the lesions and immune response developed by wild strain ST121 with those caused by different mutant ST121 strains by 1, 3 and 7 dpi was made. The wild rabbit strain and the human *rabbitised* (F  $dltB^r$ ) strain were capable of producing lesions in all the inoculated animals. Moreover, the skin lesions developed by the human mutant strain were similar to those produced by the wild isolated rabbit strain. However, the strains of rabbit origin caused less severe lesions after gene *rot* (J  $rot^+$ ) was re-established and gene *dltB* (J  $dltB^h$ ) mutated. In the abscesses developed by strain J  $dltB^h$ , no eosinophil band was observed, and Splendore-Hoeppli phenomena were found only with J  $rot^+$ . The peripheral immune response in the animals inoculated with mutant strains was characterised by fewer granulocytes and monocytes, and by higher lymphocyte counts (B, T, T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> and T CD25<sup>+</sup>). More plasma cells were found for the local immune response on 1 dpi in the lesions caused by strain J  $rot^+$ , and T lymphocytes were detected only in the animals infected by F  $dltB^r$  and J  $dltB^h$ .

Thus the experimental model characterised herein may prove to be a suitable system to reliably reproduce infections caused by *S. aureus* under natural conditions.



## ÍNDICE GENERAL

---



## ÍNDICE GENERAL

	<u>Página</u>
<u>LISTA DE ABREVIATURAS</u> -----	3
<u>ÍNDICE DE FIGURAS</u> -----	13
<u>ÍNDICE DE IMÁGENES</u> -----	19
<u>ÍNDICE DE TABLAS</u> -----	23
<b>1. <u>INTRODUCCIÓN</u></b> -----	<b>27</b>
<b>1.1. Género <i>Staphylococcus</i></b> -----	<b>27</b>
1.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> -----	27
1.1.2. Importancia clínica de <i>S. aureus</i> -----	29
1.1.2.1. Humanos -----	32
1.1.2.2. Ganadería -----	34
1.1.2.2.1. Cunicultura -----	35
1.1.3. Factores de virulencia de <i>S. aureus</i> -----	36
1.1.4. Modelos de infección experimental con <i>S. aureus</i> -----	41
1.1.4.1. Estudios experimentales en piel -----	43
1.1.4.2. El conejo como modelo de infección experimental -----	59
<b>1.2. Sistema inmunitario</b> -----	<b>60</b>
1.2.1. Respuesta inmunitaria innata -----	61
1.2.1.1. Polimorfonucleares neutrófilos -----	63
1.2.1.2. Células mononucleares: monocitos-macrófagos -----	66
1.2.2. Respuesta inmunitaria adaptativa -----	66
1.2.2.1. Linfocitos -----	67
1.2.2.1.1. Linfocitos B -----	67
1.2.2.1.2. Linfocitos T -----	67
1.2.3. Citoquinas -----	68
<b>1.3. Piel</b> -----	<b>69</b>
1.3.1. Estructura histológica de la piel -----	70
1.3.2. Mecanismos de defensa cutáneos -----	71
<b>2. <u>OBJETIVOS</u></b> -----	<b>79</b>

## ÍNDICE GENERAL

	<u>Página</u>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	83
<b>3.1. Cepas bacterianas y medios de cultivo</b> .....	83
<b>3.2. Plásmidos y cebadores</b> .....	85
<b>3.3. Biología molecular</b> .....	88
3.3.1. Extracción del DNA genómico .....	88
3.3.2. Amplificación del DNA mediante PCR .....	88
3.3.3. Transformación de <i>Escherichia coli</i> .....	89
3.3.3.1. Obtención de células competentes: método del CaCl <sub>2</sub> .....	89
3.3.3.2. Método del choque térmico .....	89
3.3.4. Transformación de <i>S. aureus</i> .....	90
3.3.4.1. Obtención de células competentes: método de la sacarosa .....	90
3.3.4.2. Electroporación .....	90
3.3.5. Transferencia de plásmidos entre cepas de <i>S. aureus</i> .....	91
3.3.5.1. Inducción de cepas con mitomicina .....	91
3.3.5.2. Infección con bacteriófago en medio líquido .....	91
3.3.5.3. Transducción de plásmido entre cepas .....	91
3.3.6. Mutagénesis por recombinación .....	92
3.3.6.1. Amplificación de las flanqueantes mediante PCR .....	92
3.3.6.2. Clonación de las flanqueantes y del pMAD .....	93
3.3.6.3. Recombinación bacteriana en <i>S. aureus</i> .....	94
3.3.7. Extracción de DNA plasmídico .....	96
3.3.8. Secuenciación de los productos de PCR y digestión .....	96
<b>3.4. Comportamiento <i>in vitro</i> de cepas de <i>S. aureus</i></b> .....	96
3.4.1. Evaluación del crecimiento bacteriano en medio líquido .....	96
3.4.2. Coagulación de plasma de conejo .....	97
3.4.3. Supervivencia en sangre de conejo .....	97
<b>3.5. Modelo de infección experimental en piel de conejo</b> .....	98
3.5.1. Preparación del inóculo bacteriano .....	98
3.5.2. Protocolo de inoculación intradérmica .....	98
3.5.3. Cepas bacterianas, animales empleados y tiempos de muestreo .....	99
3.5.4. Toma de muestras .....	100
3.5.5. Análisis mediante citometría de flujo y contador hematológico .....	100
3.5.6. Análisis histopatológicos .....	102
3.5.6.1. Estudios histológicos .....	102
3.5.6.2. Estudios inmunohistoquímicos .....	102
3.5.7. Análisis bacteriológico: pureza de los cultivos y recuentos bacterianos ---	106
3.5.8. Cuantificación de citoquinas plasmáticas y locales .....	106
<b>3.6. Análisis estadístico</b> .....	107

## ÍNDICE GENERAL

	<u>Página</u>
<b>4. RESULTADOS</b> .....	115
<b>4.1. Modelo de infección experimental intradérmica en conejo con una cepa de <i>S. aureus</i> de origen cunícola</b> .....	115
4.1.1. Observaciones macroscópicas .....	115
4.1.1.1. Desarrollo y evolución clínica de las lesiones cutáneas .....	115
4.1.1.2. Recuentos bacterianos .....	117
4.1.1.3. Estado de salud de los animales .....	118
4.1.2. Observaciones microscópicas .....	120
4.1.2.1. Descripción histológica .....	120
4.1.2.2. Evaluación de la respuesta inmunitaria local .....	139
4.1.3. Estudio de la respuesta inmunitaria periférica .....	147
4.1.4. Estudio de las citoquinas locales y plasmáticas .....	153
<b>4.2. Evaluación de cepas mutantes de <i>S. aureus</i></b> .....	157
4.2.1. Caracterización <i>in vitro</i> de cepas mutantes de <i>S. aureus</i> .....	157
4.2.1.1. Crecimiento en medio líquido en condiciones controladas .....	157
4.2.1.2. Capacidad de coagulación en plasma de conejo .....	159
4.2.1.3. Supervivencia bacteriana en sangre de conejo .....	160
4.2.2. Caracterización <i>in vivo</i> de cepas mutantes de <i>S. aureus</i> .....	162
4.2.2.1. Estudio de la capacidad de formación de abscesos intradérmicos --	162
4.2.2.1.1. Observaciones macroscópicas .....	162
4.2.2.1.2. Observaciones microscópicas .....	166
<b>4.3. Estudio de la interacción de cepas de <i>S. aureus</i> modificadas genéticamente y el conejo</b> .....	174
4.3.1. Observaciones macroscópicas .....	174
4.3.1.1. Capacidad de producir lesiones cutáneas .....	174
4.3.1.2. Recuentos bacterianos .....	176
4.3.1.3. Estado de salud de los animales .....	178
4.3.2. Observaciones microscópicas .....	178
4.3.2.1. Descripción histológica .....	178
4.3.2.2. Evaluación de la respuesta inmunitaria local .....	186
4.3.3. Estudio de la respuesta inmunitaria periférica .....	188

## ÍNDICE GENERAL

	<u>Página</u>
5. <u>DISCUSIÓN</u> -----	197
5.1. El modelo de infección experimental intradérmica a baja dosis infectiva -	197
5.2. Genes implicados en la patogenia de <i>S. aureus</i> en conejos -----	212
5.3. Importancia de la cepa ST121 cunícola para el estudio de <i>S. aureus</i> -----	215
6. <u>CONCLUSIONES</u> -----	221
7. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> -----	225

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

---





## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>agr</b>	Gen regulador accesorio. Del inglés: <i>Accessory gene regulator</i>
<b>AIPs</b>	Péptidos autoinductores Del inglés: <i>Auto-inducing peptides</i>
<b>ALT</b>	Ácido lipoteicoico
<b>amp</b>	Ampicilina
<b>AMPs</b>	Péptidos antimicrobianos. Del inglés: <i>Antimicrobial peptides</i>
<b>APCs</b>	Células presentadoras de antígenos. Del inglés: <i>Antigen-presenting cells</i>
<b>Aur</b>	Aureolisina
<b>BPI</b>	Factor bactericida/estimulador de la permeabilidad. Del inglés: <i>Bactericidal/permeability-increasing protein</i>
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de calcio
<b>CA-MRSA</b>	<i>S. aureus</i> resistente a la meticilina asociado a la comunidad. Del inglés: <i>Community-acquired methicillin-resistant S. aureus</i>
<b>CAMPs</b>	Péptidos catiónicos antimicrobianos. Del inglés: <i>Cationic antimicrobial peptides</i>
<b>CLP</b>	Progenitor linfoide común. Del inglés: <i>Common lymphoid progenitors</i>
<b>cm / cm<sup>2</sup> / cm<sup>3</sup></b>	Centímetro/ centímetro cuadrado/ centímetro cúbico
<b>CSFs</b>	Factores estimulantes de colonias. Del inglés: <i>Colony-stimulating factors</i>
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico. Del inglés: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>DO (nm)</b>	Densidad óptica a una determinada longitud de onda (nm)
<b>DPBS</b>	Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco. Del inglés: <i>Dulbecco's phosphate-buffered saline solution</i>
<b>dpi</b>	Día/s post-inoculación
<b>ECDC</b>	Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades. Del inglés: <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminetetraacético. Del inglés: <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
<b>e.g.</b>	Por ejemplo. Del latín: <i>exempli gratia</i>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>EGFP-PMNs</b>	Polimorfonucleares neutrófilos con proteína verde fluorescente mejorada. Del inglés: <i>Enhanced green fluorescence protein-Polymorphonuclear neutrophils</i>
<b>ELISA</b>	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas. Del inglés: <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>ELP</b>	Progenitor linfoide primario o temprano. Del inglés: <i>Early lymphoid progenitor</i>
<b>Eri</b>	Eritromicina
<b>ETs</b>	Toxinas exfoliativas. Del inglés: <i>Exfoliative toxins</i>
<b>F</b>	Flanqueante
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<b>FDA</b>	Agencia del gobierno de los Estados Unidos responsable de la administración de medicamentos; en España es la AEMPS. Del inglés: <i>Food and Drug Administration</i>
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína. Del inglés: <i>Fluorescein isothiocyanate</i>
<b>g</b>	Gramo
<b>g (RCF)</b>	Fuerza g (unidad de la fuerza centrífuga relativa. Del inglés: <i>Relative centrifugal force</i>
<b>g/l</b>	Gramos/litro
<b>G/L</b>	Granulocitos/Linfocitos
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos. Del inglés: <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
<b>h</b>	Horas
<b>HA-MRSA</b>	<i>S. aureus</i> resistente a la meticilina asociado a los hospitales. Del inglés: <i>Hospital-acquired methicillin-resistant S. aureus</i>
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>hBDs</b>	Defensinas beta humanas. Del inglés: <i>Human <math>\beta</math>-defensins</i>
<b>Hla</b>	Hemolisina alfa. Del inglés: <i>Alpha-hemolysin</i>
<b>Hlb</b>	Hemolisina beta. Del inglés: <i>Beta-hemolysin</i>
<b>Hlg</b>	Hemolisina gamma. Del inglés: <i>Gamma-hemolysin</i>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>HNPs</b>	Péptidos neutrofílicos humanos. Del inglés: <i>Human neutrophil peptides</i>
<b>hpi</b>	Hora/s post-inoculación
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano. Del inglés: <i>Horseradish peroxidase</i>
<b>Hto</b>	Hematocrito
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina-eosina
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno (también conocido como agua oxigenada)
<b>i.b.</b>	Intrabronquial
<b>IBMCP-UPV</b>	Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia
<b>i.d.</b>	Intradérmico
<b>i.e.</b>	Es decir. Del latín: <i>id est</i>
<b>IFN</b>	Interferón
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>i.m.</b>	Intramamaria
<b>i.n.</b>	Intranasal
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>IsdA</b>	Determinante A de superficie regulado por hierro. Del inglés: <i>Iron-regulated surface determinant protein</i>
<b>i.t.</b>	Intratraqueal
<b>i.v.</b>	Intravenoso
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>Kv</b>	Kilovoltios
<b>l</b>	Litro
<b>L</b>	Longitud
<b>LA-MRSA</b>	<i>S. aureus</i> resistente a la meticilina asociado al ganado. Del inglés: <i>Livestock-associated methicillin-resistant S. aureus</i>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>LB</b>	Medio de cultivo Luria-Bertani
<b>M (mM)</b>	Molar (milimolar)
<b>MDSCs</b>	Células supresoras mieloides derivadas. Del inglés: <i>Myeloid-derived supresor cells</i>
<b>MGEs</b>	Elementos genéticos móviles. Del inglés: <i>Mobile genetic elements</i>
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de magnesio
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad. Del inglés: <i>Major histocompatibility complex</i>
<b>ml</b>	Mililitro
<b>MLST</b>	Tipificación de secuencias multiloculares. Del inglés: <i>Multilocus sequence typing</i>
<b>MRSA</b>	<i>S. aureus</i> resistente a la meticilina. Del inglés: <i>Methicillin-resistant S. aureus</i>
<b>MSCRAMMs</b>	Componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz. Del inglés: <i>Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i>
<b>MSSA</b>	<i>S. aureus</i> sensible a la meticilina. Del inglés: <i>Methicillin-sensitive S. aureus</i>
<b>NaCl</b>	Cloruro sódico
<b>Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub></b>	Citrato de sodio
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de sodio
<b>NETs</b>	Trampas extracelulares de los neutrófilos. Del inglés: <i>Neutrophil extracellular traps</i>
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas. Del inglés: <i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	Cloruro de amonio
<b>NK</b>	Células asesinas naturales. Del inglés: <i>Natural killer</i>
<b>NODs</b>	Dominio de oligomerización por unión de nucleótidos. Del inglés: <i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
<b>NSG</b>	Cepa de ratón inmunodeficiente. Del inglés: <i>NOD scid gamma</i>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>OIE</b>	Organización Mundial de Sanidad Animal
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b><i>o.n.</i></b>	Durante toda la noche. Del inglés: <i>Overnight</i>
<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos. Del inglés: <i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
<b>PTAH</b>	Hematoxilina ácida fosfotúngstica de Mallory. Del inglés: <i>Mallory's phosphotungstic acid haematoxin</i>
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBMCs</b>	Células mononucleares de sangre periférica. Del inglés: <i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino. Del inglés: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa. Del inglés: <i>Polimerase chain reaction</i>
<b>PepG</b>	Peptidoglicano
<b>PFGE</b>	Electroforesis en gel de campo pulsado. Del inglés: <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
<b>PFTs</b>	Toxinas formadoras de poros. Del inglés: <i>Pore-forming toxins</i>
<b>pi</b>	Post-inoculación
<b>pg</b>	Picogramo
<b>PMNs</b>	Polimorfonucleares neutrófilos. Del inglés: <i>Polymorphonuclear neutrophils</i>
<b>Pmt</b>	Sistema transportador de modulinas solubles en fenol. Del inglés: <i>Phenol-soluble modulins transporter</i>
<b>PRRs</b>	Receptores de reconocimiento de patrones. Del inglés: <i>Pattern recognition receptors</i>
<b>PSMs</b>	Modulinas solubles en fenol. Del inglés: <i>Phenol-soluble modulins</i>
<b>PTSAgs</b>	Superantígenos de toxinas pirogénicas. Del inglés: <i>Pyrogenic toxin superantigens</i>
<b>PVL</b>	Leucocidina Panton-Valentine. Del inglés: <i>Panton-Valentine leukocidin</i>
<b>RNS</b>	Especies reactivas de nitrógeno. Del inglés: <i>Reactive nitrogen species</i>
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno. Del inglés: <i>Reactive oxygen species</i>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SACs</b>	Agrupaciones de estafilococos en los abscesos. Del inglés: <i>Staphylococcal abscess communities</i>
<b>SAK</b>	Estafiloquinasa. Del inglés: <i>Staphylokinase</i>
<b>sar</b>	Regulador estafilocócico accesorio. Del inglés: <i>Staphylococcal accessory regulator</i>
<b>s.c.</b>	Subcutáneo
<b>SCCmec</b>	Cassete cromosómico estafilocócico mec. Del inglés: <i>Staphylococcal chromosome cassette mec</i>
<b>SCN</b>	<i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo
<b>SD</b>	Sin diluir
<b>SFP</b>	Intoxicación alimentaria por estafilococos. Del inglés: <i>Staphylococcal food poisoning</i>
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un solo nucleótido. Del inglés: <i>Single nucleotide polymorphism</i>
<b>spp.</b>	Especies
<b>SSSS</b>	Síndrome estafilocócico de la piel escaldada. Del inglés: <i>Staphylococcal scalded-skin syndrome</i>
<b>ST</b>	Secuencia tipo. Del inglés: <i>Sequence type</i>
<b>SSTIs</b>	Infecciones de piel y tejidos blandos. Del inglés: <i>Skin and soft tissue infections</i>
<b>TBST</b>	Solución salina con tampon Tris con Tween. Del inglés: <i>Tris buffered saline with Tween</i>
<b>TCS</b>	Sistema regulador de dos componentes. Del inglés: <i>Two component system</i>
<b>TLRs</b>	Receptores tipo Toll. Del inglés: <i>Toll-like receptors</i>
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral. Del inglés: <i>Tumor necrosis factor</i>
<b>Treg</b>	Células T reguladoras. Del inglés: <i>Regulatory T cells</i>
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano (Fórmula: $C_4H_{11}NO_3$ )
<b>TSA</b>	Medio de cultivo agar de soja tríptico. Del inglés: <i>Tryptic soy agar</i>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>TSB</b>	Medio de cultivo líquido de soja tríptico. Del inglés: <i>Tryptic soy broth</i>
<b>TSS</b>	Síndrome del shock tóxico. Del inglés: <i>Toxic shock syndrome</i>
<b>TSST-1</b>	Toxina 1 del Síndrome del shock tóxico. Del inglés: <i>Toxic shock syndrome toxin 1</i>
<b>U</b>	Unidad de actividad enzimática
<b>UE</b>	Unión Europea
<b>UFC</b>	Unidad formadora de colonias
<b>VRSA</b>	<i>S. aureus</i> resistente a la vancomicina. Del inglés: <i>Vancomycin-resistant S. aureus</i>
<b>vWbp</b>	Proteína de unión al factor de von Willebrand. Del inglés: <i>von Willebrand factor-binding protein</i>
<b>W</b>	Anchura. Del inglés: <i>Width</i>
<b>wt</b>	Cepa salvaje. Del inglés: <i>Wild type</i>
<b>X-gal</b>	5-Bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-galactopiranosido (también BCIG)
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramo
<b><math>\mu</math>F</b>	Microfaradio
<b><math>\mu</math>l</b>	Microlitro
<b><math>\mu</math>M</b>	Micromolar





## ÍNDICE DE FIGURAS

---



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b><u>Número</u></b>	<b><u>Contenido</u></b>	<b><u>Página</u></b>
1.1	Interpretación de la prueba del manitol en medio agar. (Dibujo generado a partir de Washington y Yu, 1970)	28
1.2	Porcentaje de aislados MRSA en países de la UE en el año 2015. (Fuente: European Centre for Disease Prevention and Control)	33
1.3	Interacción entre los factores de virulencia de <i>S. aureus</i> y la respuesta inmunitaria. (Figura adaptada a partir de Pozzi <i>et al.</i> , 1995)	62
1.4	Fagocitosis de <i>S. aureus</i> por los neutrófilos. (Figura adaptada a partir de McGuinness <i>et al.</i> , 2016)	64
1.5	Función microbicida de los neutrófilos. (Figura adaptada a partir de McGuinness <i>et al.</i> , 2016)	65
1.6	Componentes de la piel implicados en la defensa frente a la colonización, invasión e infección por <i>S. aureus</i> . (Figura adaptada a partir de Krishna y Miller, 2012a)	74
3.1	Representación esquemática de la PCR para obtener los fragmentos flanqueantes (F) al gen de estudio	93
3.2	Representación esquemática de la PCR para unir F1 y F2 en un solo fragmento amplificado (F12)	93
3.3	Primera recombinación del proceso de mutagénesis. (Dibujo generado a partir de Arnaud <i>et al.</i> , 2004)	94
3.4	Segunda recombinación del proceso de mutagénesis. (Dibujo generado a partir de Arnaud <i>et al.</i> , 2004)	95
4.1	Evolución del volumen (cm <sup>3</sup> ) de los nódulos a lo largo del período experimental con la cepa Jwt	116
4.2	Evolución del peso de los animales a lo largo del período experimental tras la inoculación de la cepa Jwt	119
4.3	Evolución de la temperatura corporal de los animales a lo largo del período experimental tras la inoculación de la cepa Jwt	120
4.4	Representación de los hallazgos microscópicos a las 12 horas tras la inoculación intradérmica de la cepa Jwt	122

## ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Número</u>	<u>Contenido</u>	<u>Página</u>
4.5	Representación de los hallazgos microscópicos a las 24 horas tras la inoculación intradérmica de la cepa Jwt	124
4.6	Representación de los hallazgos microscópicos a las 48 horas tras la inoculación intradérmica de la cepa Jwt	125
4.7	Representación de los hallazgos microscópicos a las 72 horas tras la inoculación intradérmica de la cepa Jwt	128
4.8	Representación de los hallazgos microscópicos a los 7 días tras la inoculación intradérmica de la cepa Jwt	130
4.9	Representación de los hallazgos microscópicos a los 14 días tras la inoculación intradérmica de la cepa Jwt	133
4.10	Representación de los hallazgos microscópicos a los 21 días tras la inoculación intradérmica de la cepa Jwt	134
4.11	Representación de los hallazgos microscópicos a los 28 días tras la inoculación intradérmica de la cepa Jwt	135
4.12	Evolución del número de células linfocitos T (a), células plasmáticas (b) y macrófagos (c) a nivel local durante el estudio con la cepa Jwt	143
4.13	Evolución del número de leucocitos totales (a), granulocitos (b), monocitos (c), linfocitos totales (d), linfocitos B (e) y linfocitos T CD25 <sup>+</sup> (f) en sangre periférica tras la inoculación intradérmica de la cepa Jwt	151
4.14	Evolución de la ratio Granulocitos/Linfocitos en sangre periférica tras la inoculación intradérmica de la cepa Jwt	152
4.15	Evolución del hematocrito (a) y de la hemoglobina (b) tras la inoculación intradérmica de la cepa Jwt	152
4.16	Evolución de la concentración (pg/ml) de las interleuquinas 4 (a) y 18 (b) en plasma, y de la interleuquina 4 (c) e interferón gamma (b) en tejido, tras la inoculación intradérmica de la cepa Jwt	156
4.17	Curva de crecimiento de 9 cepas mutantes de <i>S. aureus</i> de origen cunícola	158
4.18	Curva de crecimiento de 6 cepas mutantes de <i>S. aureus</i> de origen humano y la USA300 (CA-MRSA)	158

## ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Número</u>	<u>Contenido</u>	<u>Página</u>
4.19	Número total de bacterias ( $10^3$ UFC/100 $\mu$ l) de diferentes cepas de <i>S. aureus</i> tras su incubación en sangre de conejo	160
4.20	Número de bacterias ( $10^3$ UFC/100 $\mu$ l) de cepas mutantes de <i>S. aureus</i> de origen cunícola incubadas en sangre de conejo a diferentes tiempos (hasta 3 horas)	161
4.21	Porcentaje de animales infectados con cada cepa mutante y la cepa salvaje (Jwt; control positivo) a los 7 días post-inoculación	163
4.22	Representación del volumen ( $\text{cm}^3$ ) de los nódulos producidos por las cepas mutantes J $\Delta\text{coa-vwb}$ ( <b>Estudio 1</b> ), J $\Delta\text{hla}$ ( <b>Estudio 2</b> ), J $\Delta\text{psm}\alpha$ ( <b>Estudio 3</b> ) y J $\Delta\text{agr}$ ( <b>Estudio 4</b> ).en comparación a la Jwt (control positivo) a los 7 días post-inoculación	164
4.23	Gravedad de las lesiones cutáneas con cada cepa mutante y sus controles a los 7 días post-inoculación	165
4.24	Caracterización de los hallazgos histológicos a los 7 días post-inoculación con las cepas Jwt y J $\Delta\text{coa-vwb}$	167
4.25	Caracterización de los hallazgos histológicos a los 7 días post-inoculación con las cepas Jwt y J $\Delta\text{hla}$	169
4.26	Caracterización de los hallazgos histológicos a los 7 días post-inoculación con las cepas Jwt y J $\Delta\text{psm}\alpha$	171
4.27	Caracterización de los hallazgos histológicos a los 7 días post-inoculación con las cepas Jwt y J $\Delta\text{agr}$	173
4.28	Porcentaje de animales con lesiones tras la inoculación intradérmica de 300 UFC de las cepas Jwt, F $\text{dltB}^r$ , J $\text{rot}^+$ y J $\text{dltB}^h$	175
4.29	Gravedad de las lesiones cutáneas observadas con las cepas Jwt, F $\text{dltB}^r$ , J $\text{rot}^+$ y J $\text{dltB}^h$	175
4.30	Evolución del número medio de bacterias ( $10^6$ UFC/g) aisladas a partir de las lesiones cutáneas con las cepas Jwt, F $\text{dltB}^r$ y J $\text{rot}^+$ durante el estudio	177
4.31	Evolución del engrosamiento de la epidermis tras la inoculación intradérmica de las cepas Jwt, F $\text{dltB}^r$ , J $\text{rot}^+$ y J $\text{dltB}^h$	179
4.32	Evolución de los hallazgos histológicos en la dermis superficial tras la inoculación intradérmica de las cepas Jwt, F $\text{dltB}^r$ , J $\text{rot}^+$ y J $\text{dltB}^h$ : dilatación vascular (A), edema (B) y hemorragias (C)	183

## ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Número</u>	<u>Contenido</u>	<u>Página</u>
4.33	Evolución de los hallazgos histológicos en la dermis profunda tras la inoculación intradérmica de las cepas Jwt, F <i>dltB</i> <sup>r</sup> , J <i>rot</i> <sup>+</sup> y J <i>dltB</i> <sup>h</sup> : dilatación vascular ( <b>A</b> ), inflamación perivascular ( <b>B</b> ) y abscesos ( <b>C</b> )	184
4.34	Evolución de los hallazgos histológicos en el músculo cutáneo tras la inoculación intradérmica de las cepas Jwt, F <i>dltB</i> <sup>r</sup> , J <i>rot</i> <sup>+</sup> y J <i>dltB</i> <sup>h</sup> : inflamación intersticial ( <b>A</b> ) y atrofia muscular ( <b>B</b> )	185
4.35	Número (cél/mm <sup>2</sup> ) de células plasmáticas ( <b>a</b> ), linfocitos B ( <b>b</b> ), linfocitos T ( <b>c</b> ) y macrófagos ( <b>d</b> ) a nivel local según el tipo de cepa de <i>S. aureus</i> (Jwt, F <i>dltB</i> <sup>r</sup> , J <i>rot</i> <sup>+</sup> y J <i>dltB</i> <sup>h</sup> ) en cada tiempo de muestreo (1, 3 y 7 días post-inoculación)	187
4.36	Efecto del tipo de cepa de <i>S. aureus</i> (Jwt, F <i>dltB</i> <sup>r</sup> , J <i>rot</i> <sup>+</sup> y J <i>dltB</i> <sup>h</sup> ) y del tiempo post-inoculación sobre el número de leucocitos totales ( <b>a</b> ), granulocitos ( <b>b</b> ) y monocitos ( <b>c</b> ), y sobre el valor de la ratio Granulocitos/Linfocitos ( <b>d</b> ), el hematocrito ( <b>e</b> ) y la hemoglobina ( <b>f</b> ) en sangre periférica	192
4.37	Recuento de leucocitos totales, granulocitos, linfocitos totales, linfocitos T, T CD4 <sup>+</sup> , T CD8 <sup>+</sup> y monocitos (10 <sup>6</sup> /l) en los animales con lesiones producidas por las cepas Jwt, F <i>dltB</i> <sup>r</sup> , J <i>rot</i> <sup>+</sup> y J <i>dltB</i> <sup>h</sup> de <i>S. aureus</i>	193
4.38	Recuento de linfocitos B y linfocitos T CD25 <sup>+</sup> (10 <sup>6</sup> /l), y las ratios CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> y Granulocitos/Linfocitos en los animales con lesiones cutáneas producidas por las cepas Jwt, F <i>dltB</i> <sup>r</sup> , J <i>rot</i> <sup>+</sup> y J <i>dltB</i> <sup>h</sup> de <i>S. aureus</i>	194

## ÍNDICE DE IMÁGENES

---





## ÍNDICE DE IMÁGENES

<u>Número</u>	<u>Contenido</u>	<u>Página</u>
4.1	Hallazgos macroscópicos representativos de cada tiempo de muestreo del estudio con la cepa Jwt	116
4.2	Presencia de descarga purulenta en la extremidad posterior derecha <b>(a)</b> e izquierda <b>(b)</b> de dos conejos a los 9 días post-inoculación con la cepa Jwt	117
4.3	Infiltrado inflamatorio en la dermis profunda a las 12 horas tras la inoculación intradérmica de la cepa Jwt. 10x. H&E	121
4.4	Dilatación vascular e hiperemia. 40x. H&E	121
4.5	Agrupación de heterófilos formando un absceso en la dermis profunda a las 24 horas post-inoculación. 2x. H&E	123
4.6	Absceso intradérmico a los 2 días post-inoculación. Imagen principal a 2x. Imagen en detalle a 10x. H&E	125
4.7	Agrupación de bacterias Gram-positivas en el interior de un absceso. 20x. Gram	126
4.8	Dermonecrosis y presencia de hemorragias subepidérmicas. 10x. H&E	127
4.9	Absceso intradérmico rodeado por una banda eosinófila completa. 2x. H&E	127
4.10	Fenómenos de Splendore Hoeppli. <b>A.</b> 60x. <b>B.</b> 40x. H&E	128
4.11	Necrosis de la epidermis y pérdida de la integridad del epitelio. 10x. H&E	129
4.12	Infiltración, atrofia e interrupción del músculo cutáneo. 20x. H&E	130
4.13	<b>(A)</b> Reepitelización epidérmica y ausencia de anejos cutáneos. 10x. H&E. <b>(B)</b> Tejido de granulación inmaduro. 20x. H&E	131
4.14	Infiltración, atrofia e interrupción del músculo cutáneo. 20x. H&E	132
4.15	Atrofia de las fibras del músculo cutáneo de una zona de lesión <b>(A)</b> en comparación a una zona sana <b>(B)</b> . 20x. Tricrómico de Masson	132
4.16	Hiperplasia del epitelio de los bordes de la úlcera. 40x. H&E	134
4.17	Hiperplasia epitelial, invasión de folículos pilosos y hemorragias en zonas recuperadas de lesión a los 28 días post-inoculación. 10x. H&E	136

## ÍNDICE DE IMÁGENES

<u>Número</u>	<u>Contenido</u>	<u>Página</u>
4.18	Linfocitos próximos a la zona de lesión en la dermis profunda. (A) Linfocitos T adyacentes a vasos sanguíneos. 20x. Mouse Monoclonal Anti-Dog CD3-12. Complejo avidina-biotina peroxidasa (ABC). (B) Linfocitos B agrupados. 10x. Monoclonal Mouse Anti-Human CD79 $\alpha$ . Complejo avidina-biotina peroxidasa (ABC)	140
4.19	Agrupación de células plasmáticas en dermis profunda. 20x. Mouse Monoclonal Anti-Rabbit Light Chain, HRP Conjugated	140
4.20	Macrófagos distribuidos de manera difusa a las 24 horas post-inoculación, 20x (A), y a los 7 días post-inoculación, 40x (B), y delimitando un absceso, 2x (C). Mouse Monoclonal Anti-Rabbit Macrophage Clone RAM11. Complejo avidina-biotina peroxidasa (ABC)	141
4.21	Inmunoglobulinas alrededor de las bacterias contenidas en un Splendore-Hoeppli. 20x. Biotinylated Anti-Rat IgG (H+L)	144
4.22	Presencia de células en proliferación en la dermis profunda tras la inoculación intradérmica de la cepa Jw $t$ . (A) Diferentes tipos de células de morfología redondeada a los 3 días post-inoculación: células plasmáticas, linfocitos y macrófagos. 40x. (B) Células proliferativas distribuidas de manera difusa en la dermis profunda y entre las fibras del músculo cutáneo a los 7 días post-inoculación. 4x. Mouse Monoclonal Anti-PCNA. Complejo avidina-biotina peroxidasa (ABC).	146
4.23	Incubación de <i>S. aureus</i> en plasma de conejo	159

## ÍNDICE DE TABLAS

---



## ÍNDICE DE TABLAS

<b><u>Número</u></b>	<b><u>Contenido</u></b>	<b><u>Página</u></b>
1.1	Modelos de infección experimental <i>in vivo</i> con <i>S. aureus</i>	44
1.2	Aislados clínicos de <i>S. aureus</i> de origen humano más comúnmente utilizados en los estudios experimentales <i>in vivo</i>	56
1.3	Péptidos antimicrobianos catiónicos que participan en la inmunidad cutánea frente a <i>S. aureus</i>	72
3.1	Cepas bacterianas utilizadas en este estudio	82
3.2	Plásmidos utilizados en este estudio	83
3.3	Cebadores utilizados en este estudio	84
3.4	Cepas de <i>S. aureus</i> incubadas en sangre de conejo	95
3.5	Número de conejos inoculados con cada cepa de <i>S. aureus</i> y tiempos de muestreo empleados	97
3.6	Anticuerpos utilizados en la técnica de citometría de flujo para el estudio de las poblaciones celulares a nivel periférico	99
3.7	Anticuerpos utilizados en el estudio inmunohistoquímico	103
3.8	Citoquinas analizadas en este estudio	104
3.9	Modelos estadísticos utilizados en este trabajo en función de la variable y del estudio	108
4.1	Número de bacterias de la cepa Jwt en los puntos de inoculación durante el estudio	118
4.2	Evolución del peso y la temperatura corporal de los animales tras la inoculación intradérmica de la cepa Jwt	119
4.3	Caracterización de los hallazgos histológicos tras la inoculación experimental intradérmica de la cepa Jwt	137 138
4.4	Caracterización de la respuesta inmunitaria local tras la inoculación experimental intradérmica de la cepa Jwt	142
4.5	Evolución de las poblaciones leucocitarias ( $10^6/l$ ) en sangre periférica tras la inoculación intradérmica de la cepa Jwt	149
4.6	Evolución de los parámetros hematológicos (% hematocrito y g hemoglobina/l) tras la inoculación intradérmica de la cepa Jwt	150

## ÍNDICE DE TABLAS

<b><u>Número</u></b>	<b><u>Contenido</u></b>	<b><u>Página</u></b>
4.7	Concentración de citoquinas (pg/ml) en plasma y piel durante el estudio tras la inoculación experimental intradérmica de la cepa Jwt	154
4.8	Número medio de bacterias ( $10^6$ UFC/g) en las zonas de lesión producidas por diferentes cepas de <i>S. aureus</i> (Jwt, F <i>dltB</i> <sup>r</sup> y J <i>rot</i> <sup>+</sup> )	176
4.9	Número medio de bacterias ( $10^6$ UFC/g) aisladas a partir de las lesiones en función de la cepa de <i>S. aureus</i> (Jwt, F <i>dltB</i> <sup>r</sup> y J <i>rot</i> <sup>+</sup> ) y del tiempo post-inoculación	177
4.10	Temperatura corporal de los animales inoculados con diferentes cepas de <i>S. aureus</i> (Jwt, F <i>dltB</i> <sup>r</sup> , J <i>rot</i> <sup>+</sup> y J <i>dltB</i> <sup>h</sup> )	178
4.11	Caracterización de los hallazgos histológicos y evolución de su gravedad tras la inoculación intradérmica de diferentes cepas de <i>S. aureus</i> (Jwt, F <i>dltB</i> <sup>r</sup> , J <i>rot</i> <sup>+</sup> y J <i>dltB</i> <sup>h</sup> )	182
4.12	Número de fenómenos de Splendore-Hoeppli encontrados en los abscesos producidos por las cepas Jwt y J <i>rot</i> <sup>+</sup> en los días 3 y 7 post-inoculación	185
4.13	Recuento de las poblaciones leucocitarias sanguíneas y los parámetros hematológicos (hematocrito y hemoglobina) en los animales inoculados con las cepas Jwt, F <i>dltB</i> <sup>r</sup> , J <i>rot</i> <sup>+</sup> y J <i>dltB</i> <sup>h</sup> de <i>S. aureus</i>	189
4.14	Recuento de las poblaciones leucocitarias sanguíneas y los parámetros hematológicos (hematocrito y hemoglobina) de los animales inoculados con las cepas Jwt, F <i>dltB</i> <sup>r</sup> , J <i>rot</i> <sup>+</sup> y J <i>dltB</i> <sup>h</sup> de <i>S. aureus</i> en función del tiempo post-inoculación	191

# 1.INTRODUCCIÓN

---





---

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Género *Staphylococcus*

Los estafilococos son bacterias Gram-positivas que pertenecen a la familia *Micrococcaceae*. Este género bacteriano se caracteriza por crecer tanto en condiciones con oxígeno como carente de éste (anaerobio facultativo), y en medios que contienen un 10% de NaCl. Además, son cocos catalasa positivos y utilizan los glúcidos para su metabolismo (Branson, 1968; Lowy, 1998).

El genoma de los estafilococos consiste en un cromosoma circular, así como elementos extracromosomales (fagos, plásmidos y transposones) a través de los cuales transmiten entre sí los genes que codifican los caracteres de virulencia, como puede ser la capacidad de resistencia antibiótica, entre otros (Lowy, 1998; Baba *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2018).

Una de las especies más conocidas perteneciente a este género es *Staphylococcus aureus*, adaptada al ser humano y aislada también de un gran número de especies animales. Además, existen otras especies de estafilococos no adaptadas al hospedador humano, tales como *S. delphini*, *S. intermedius* y *S. pseudintermedius* (Thomer *et al.*, 2016).

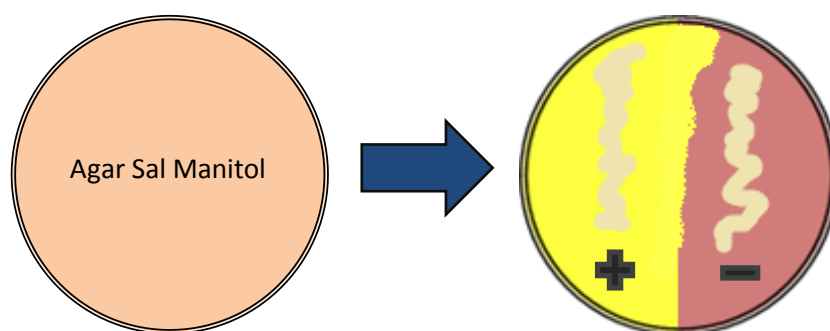
#### 1.1.1. *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* es el primer agente que se aisló a partir del exudado purulento de una herida (1881). Fue Alexander Ogston quien identificó a esta bacteria como un estafilococo atendiendo a su aspecto en forma de esferas agrupadas, que recuerda a racimos de uva, y desde entonces empezó a distinguirse de los estreptococos, bacterias que también pueden producir lesiones purulentas y que se establecen como formaciones en cadena (Thomer *et al.*, 2016).

La terminología de *S. aureus* fue propuesta poco después por Friedrich Julius Rosenbach basándose en la pigmentación amarilla de sus colonias. Esta coloración amarillenta, presente en algunas cepas, se debe a la presencia de la estafiloxantina, un pigmento

carotenoide que participa en la evasión de la fagocitosis. Por otra parte, Rosenbach también añadió la nomenclatura de *S. albus* para los aislados de color blanco (Thomer *et al.*, 2016).

Este microorganismo es capaz de sobrevivir en numerosos y diversos ambientes, y prueba de ello es el hecho de que ha sido aislado de gran cantidad de animales vertebrados. Esta habilidad de adaptación deriva de su potencial para adquirir características fenotípicas específicas para su hospedador, como pueden ser la actividad hemolítica y la capacidad de coagular el plasma y la sangre (Fitzgerald, 2012). Este último rasgo es de interés diagnóstico porque permite diferenciarlo de algunas bacterias comensales pertenecientes al mismo género; como por ejemplo, *S. epidermidis*, que es un estafilococo coagulasa negativo (SCN) (Cheng *et al.*, 2010). Además del test de la coagulasa, gracias a la prueba del manitol también se puede distinguir de otras especies de *Staphylococcus* (Branson, 1968; Lowy, 1998; Baba *et al.*, 2008) (**Figura 1.1**). Otra particularidad de este agente también es la producción de DNAsa y proteína A (Baba *et al.*, 2008).



**Figura 1.1.** Interpretación de la prueba del manitol en medio agar. Resultado positivo (+): la bacteria aislada es *S. aureus* cuando el medio cambia a color amarillo por la fermentación del manitol. Resultado negativo (-): el medio aparece de color rosa porque la bacteria aislada no fermenta el manitol. (Dibujo generado a partir de Washington y Yu, 1970).

En un principio se pensó que *S. aureus* no era móvil porque carece de flagelos. Sin embargo, en superficies de agar blandas forma colonias gigantes a 37°C tras 10 horas de incubación, un fenómeno que se conoce como *colony spreading* (Kaito y Sekimizu, 2007; Pollit *et al.*, 2015) y que puede ocurrir por medio de la absorción de agua de las placas de agar y flotando en la superficie de soluciones acuosas (Lin *et al.*, 2016). Al respecto, hay cepas que manifiestan una mayor habilidad de dispersión, participando así en su virulencia ya que contribuye a evitar a otras colonias bacterianas a través del halo que las rodea (Tsompanidou *et al.*, 2013; Kizaki *et al.*, 2016). Además, esta capacidad se puede estimular en medio agar mediante la suplementación con suero de mamífero (Omae *et al.*, 2014).

### **1.1.2. Importancia clínica de *S. aureus***

*S. aureus* es uno de los agentes integrantes del grupo de patógenos llamado *ESKAPE* (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacter spp.*), reconocidos como la causa principal de las infecciones nosocomiales y por ser resistente a la mayoría de los antibióticos convencionales. Este grupo es también responsable de gran parte de las infecciones en piel y tejidos blandos (SSTIs), que por otra parte se encuentran entre las infecciones bacterianas más frecuentes en los seres humanos, y para las que se ha descrito a *S. aureus* como su principal agente causal en todo el mundo (Pfalzgraff *et al.*, 2018).

La presentación clínica de las SSTIs puede ser de carácter leve y superficial, o bien grave y complicada, con propagación sistémica e incluso desenlace letal. Las formas más habituales de las SSTIs son la celulitis y los abscesos, y es a partir de éstos últimos, sobre todo aquellos que se encuentran próximos al músculo subyacente, desde donde las bacterias pueden difundir y producir infección en prácticamente cualquier sistema orgánico interno. Por otra parte, la clasificación empleada con mayor frecuencia en los ensayos clínicos es la establecida por la FDA, que distingue entre SSTIs complicadas y SSTIs no complicadas, pudiendo ser necesaria la intervención quirúrgica para el caso de las primeras. La antibioterapia tópica se puede usar en casos de infecciones superficiales no complicadas, permitiendo así alcanzar una mayor concentración del fármaco en el sitio de infección y una reducción de los posibles efectos adversos a nivel sistémico. No

obstante, la aplicación de fármacos tópicos requiere de la suficiente penetración tisular (Cho *et al.*, 2011; Pfalzgraff *et al.*, 2018). Por otra parte, la afectación sistémica en muchas ocasiones está mediada tanto por las toxinas bacterianas como por la respuesta inflamatoria del propio organismo. La secreción de toxinas repercute en un mayor tiempo del periodo de inflamación y el retraso de la cicatrización, cronificando así la infección. Esta demora y/o defectos en la recuperación de las lesiones es una característica de las infecciones por *S. aureus* (Pfalzgraff *et al.*, 2018).

Además de ocasionar infecciones en la piel, *S. aureus* puede afectar a otras localizaciones y sistemas del organismo, ayudado por un amplio repertorio de mecanismos de virulencia y una tolerancia metabólica que conjuntamente le permiten producir diferentes enfermedades: endocarditis, osteomielitis, neumonía, septicemia y síndrome del shock tóxico (TSS). La capacidad de colonizar varios tejidos puede ocurrir por contacto directo tras un traumatismo, por diseminación hematógena o mediante propagación a partir de una infección contigua. En general, las infecciones producidas por *S. aureus* se caracterizan por la persistencia local, necrosis tisular, metástasis a distancia y resistencia a la terapia antimicrobiana, siendo la formación de abscesos la manifestación patológica habitual (Lowy, 1998; DeLeo y Chambers, 2009; Brandt *et al.*, 2018).

*S. aureus* es una bacteria comensal y oportunista muy extendida, cuyo éxito como patógeno humano guarda relación con su coexistencia mutua durante muchos años, circunstancia que le ha permitido desarrollar medios para contrarrestar al sistema inmunitario de la especie humana (Kobayashi *et al.*, 2015b). El hospedador humano puede ser infectado por las bacterias que colonizan su piel y superficies mucosas. De hecho, la colonización proporciona a las bacterias una oportunidad para introducirse en el organismo cuando las defensas decaen, y está determinada por múltiples factores que, en conjunto, contribuyen a la interacción entre el hospedador y el microorganismo. Por una parte, están los determinantes bacterianos que definen la habilidad del patógeno para adherirse al tejido y evadir la respuesta inmunitaria; por otra interviene también la genética del hospedador, que define la susceptibilidad hacia un determinado microorganismo; y por último, los factores ambientales participan igualmente en esta interacción afectando tanto al hospedador como a la bacteria (Sollid *et al.*, 2014).

Las superficies mucosas principalmente colonizadas por *S. aureus* son nariz, garganta, pared vaginal, y tracto gastrointestinal. Un estudio llevado a cabo en Alemania concluyó que el 80% de las infecciones invasivas producidas por esta bacteria tiene su origen en la cepa que coloniza al paciente (von Eiff *et al.*, 2001). La capacidad de colonización, entre otros factores, permite clasificar a los clones de *S. aureus* en cepas de alta y baja virulencia. En conejos se ha visto que tras la inoculación en cavidad nasal (Hermans *et al.*, 2000) y heridas cutáneas (Meulemans *et al.*, 2007) con ambos tipos de cepas, algunos de los animales infectados con cepas de alta virulencia desarrollan lesiones en otras locaciones anatómicas de la piel. No obstante, aunque la colonización puede predisponer a la infección, se ha visto que los individuos colonizados presentan infecciones menos severas en comparación con los individuos no colonizados, y que entre los pacientes que desarrollan bacteriemia, los que no son portadores registran mayores índices de mortalidad que los portadores (Liu, 2009). De este modo, atendiendo a que muchas infecciones en individuos portadores son producidas por sus cepas colonizantes, la colonización puede conferir ciertos niveles de protección inmunitaria (Gordon y Lowy, 2008; Liu, 2009), y en este sentido se ha encontrado que los portadores persistentes presentan niveles de inmunoglobulinas (IgGs) frente a las exotoxinas de *S. aureus* significativamente superiores a los no portadores (Clarke *et al.*, 2006; Verkaik *et al.*, 2009).

El riesgo de infección por *S. aureus* es mayor en individuos hospitalizados, durante el postoperatorio y en pacientes con dispositivos médicos (tubo traqueal, marcapasos y válvulas cardíacas, catéteres intravenosos e implantes articulares). Otras poblaciones consideradas de elevado riesgo de contraer una infección invasiva por este agente son los neonatos de muy bajo peso, y pacientes que han recibido una terapia inmunosupresora o anticancerígena (Lowy, 1998; Thomer *et al.*, 2016).

En general, las cepas de *S. aureus* presentan una especialización con respecto al grado de infectividad de su huésped, lo que limita la infección cruzada entre especies (Kapur *et al.*, 1995; Jorgensen *et al.*, 2005; Herron-Olson *et al.*, 2007).

### 1.1.2.1. Humanos

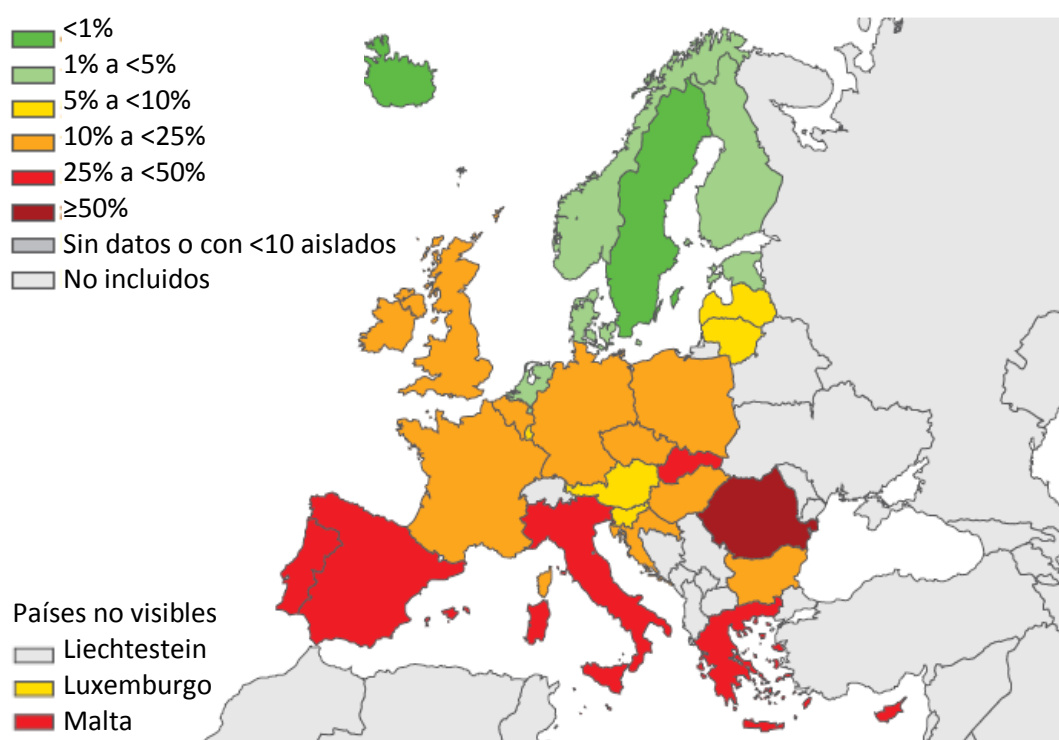
Además de por su alta prevalencia, *S. aureus* es conocido por su capacidad para adquirir resistencia a los antibióticos, una habilidad de manifiesto carácter epidémico. Las cepas resistentes a la penicilina aparecieron a finales de 1940, y el incremento de éstas a mediados de los años 50 derivó en la ineficacia terapéutica de estos productos antimicrobianos en general (Kobayashi *et al.*, 2015b).

Las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) fueron descritas a principios de 1960, y durante las siguientes décadas se extendieron por todo el mundo. Además, pueden dividirse en dos grupos genéticamente distintos que afectan a diferentes, pero a veces solapadas, poblaciones: las cepas asociadas a hospitales (HA-MRSA) y las vinculadas a comunidades (CA-MRSA) (Liu, 2009; Kobayashi *et al.*, 2015b).

Hasta finales de los 90 las infecciones por cepas MRSA estuvieron limitadas en gran medida a los individuos inmunodeprimidos o al personal sanitario (Liu, 2009). En esa misma década tuvo lugar un notable incremento en la incidencia de infecciones bacterianas, en particular de las infecciones en piel y tejidos blandos, a causa de cepas CA-MRSA. Este aumento pudo atribuirse a varios motivos, como: 1) la mejora de la capacidad de supervivencia de la bacteria en el ambiente, a través de fómites y animales; 2) el incremento de la transmisión entre individuos; 3) la mayor habilidad para colonizar el hospedador; 4) la disminución del umbral del propio mecanismo bacteriano para activar sus genes de virulencia; y 5) el incremento de la patogenicidad durante la infección (Liu, 2009; Kobayashi *et al.*, 2015b). El conocido como USA300 es el clon CA-MRSA más extendido a nivel internacional y es la causa principal de infecciones en piel y tejidos blandos en humanos. Su éxito se debe a que se transmite más fácilmente, coloniza mejor y es más patogénica (Miller y Diep, 2008; Liu, 2009; Cho *et al.*, 2011; Kobayashi *et al.*, 2015b).

Por otra parte, en 2002 se identificó otro grupo de *S. aureus* resistentes: las cepas VRSA, resistentes al antibiótico de elección frente a los MRSA, la vancomicina. No obstante, este no fue el primer caso conocido de resistencia a la vancomicina, pues fue descubierta con anterioridad (1980) en enterococos (McGuinness *et al.*, 2017).

En la actualidad las cepas MRSA prevalecen como un grave problema sanitario. En un informe emitido por la ECDC sobre resistencia a antibióticos en 2015 se puso de manifiesto una reducción del 2% de aislados MRSA en la población europea entre los años 2012 y 2015. Sin embargo, la presencia de MRSA no fue la misma en todos los países, y en algunos seguía siendo elevada (**Figura 1.2**). Además, el 85,2% de las cepas MRSA que se aislaron fueron también resistentes a fluoroquinolonas (<https://ecdc.europa.eu>). Ante este escenario, que se extiende a nivel mundial, la FAO, la OIE y la OMS conjuntamente elaboraron y publicaron en 2016 un manual para orientar a los diferentes países en la elaboración de planes estratégicos frente a las resistencias antimicrobianas (<http://www.who.int/iris/handle/10665/204470>).



**Figura 1.2.** Porcentaje de aislados MRSA en países de la UE en el año 2015. (Fuente: European Centre for Disease Prevention and Control -ECDC-).

Así pues, casi un siglo después de que Fleming descubriera la penicilina (1928), los datos relativos a la resistencia a los antibióticos de uso común, debido a su uso inadecuado y excesivo en el ámbito de la medicina, el sector agropecuario y la industria alimentaria, plantean una situación dirigida hacia la búsqueda de terapias antimicrobianas alternativas (Pfalzgraff *et al.*, 2018).

### 1.1.2.2. Ganadería

A parte de ser un conocido patógeno humano, *S. aureus* produce gran variedad de infecciones con importancia económica para la ganadería (principalmente vacuno lechero, ovejas, cabras, aves de corral y conejos), puesto que repercuten en la productividad y el bienestar de los animales, y también pueden ser trascendentes para la seguridad alimentaria global. Los estudios muestran que la gran mayoría de las cepas de *S. aureus* aisladas de ganado pertenecen a un reducido número de clones asociados a animales, algunos de los cuales pertenecen a secuencias tipo (STs) encontrados en aislados de origen humano, lo que sugiere un ancestro común bastante reciente entre ellos (Fitzgerald, 2012; Viana *et al.*, 2015).

Históricamente la resistencia a la meticilina rara vez ha sido observada entre las cepas de *S. aureus* aisladas de animales. El primer LA-MRSA (cepa MRSA asociada a ganadería) identificado proviene de vacuno lechero, hace aproximadamente 40 años. Desde entonces se describieron más casos de MRSA en vacas y se especuló que pudieran actuar como reservorio de infecciones por MRSA en humanos tras descubrir un nuevo alelo del gen *mecA* (*mecA*<sub>LGA251</sub>) en aislados bovinos. El gen *mecA* está incluido en el cassette cromosómico estafilocócico mec (SCCmec), un elemento genético móvil (MGE) que confiere resistencia a la meticilina y está asociado al SCCmecXI descrito en humanos (Fitzgerald, 2012).

Sin embargo, la detección en cerdos del clon MRSA ST398 pasó a ser la principal causa de preocupación debido a su carácter zoonótico y a que se aislaron cepas pertenecientes al genotipo ST398 en otras especies animales (Fitzgerald, 2012). Asimismo, el interés por los MRSA aumentó todavía más tras encontrar nuevas especies de hospedador para estas cepas en algunos países del norte de Europa occidental (rata, oveja, pinzón, foca común y conejo) (Paterson *et al.*, 2012), y más recientemente se ha descrito la presencia



de LA-MRSA en explotaciones cunícolas de la Península Ibérica (Moreno-Grúa *et al.*, 2018).

Entre los posibles desencadenantes de adquisición de SCCmec, además de la presión antibiótica selectiva en la industria ganadera, destacaría el papel de los seres humanos como fuente de nuevas cepas patógenas para ganado, plausible principalmente por la presencia de MGEs bacterianos. Por ello, la industrialización y la globalización también han participado en la emergencia y propagación de patógenos (Fitzgerald, 2012).

#### 1.1.2.2.1. Cunicultura

En el continente europeo se han descrito brotes desencadenados por *S. aureus* en el sector de la cunicultura industrial (Vancraeynest *et al.*, 2006; Fitzgerald, 2012). En estos brotes los animales muestran diferentes lesiones de tipo purulento tanto a nivel local como sistémico y pueden verse afectados individuos de diversas edades y estados productivos. Los principales procesos piógenos que se encuentran en maternidad y cebadero son las dermatitis supurativas, mastitis, abscesos multisistémicos y pododermatitis. En la estafilococia de los gazapos lactantes se suelen observar pequeños abscesos en la piel, a veces subcutáneos, e incluso en órganos internos, dando lugar a cuadros subagudos y muerte del animal (Corpa *et al.*, 2009). Las mastitis por *S. aureus* son una de las principales causas de muerte y eliminación de conejas reproductoras en las granjas (Segura *et al.*, 2007; Rosell y De la Fuente, 2009 y 2018).

En la especie cunícola han sido identificados varios genotipos de *S. aureus*, siendo la cepa ST121 la más extendida en las granjas de conejos de la costa mediterránea española (Viana *et al.*, 2007 y 2011) y a nivel internacional (Vancraeynest *et al.*, 2006). Además, se ha descrito que este clon 121 es capaz de producir abscesos en piel de conejo a partir de una reducida carga bacteriana, y que se adaptó a esta especie tras la mutación de un único nucleótido del gen *dltB* en una cepa humana (Viana *et al.*, 2015). Mientras que el gen *dltB* se encuentra altamente conservado en los aislados humanos, se observan mutaciones para este gen entre cepas de conejo de diferente origen clonal, lo que sugiere una evolución convergente entre los clones de *S. aureus* que infectan al hospedador cunícola (Viana *et al.*, 2015; Holmes *et al.*, 2016). Además, se ha descrito que las cepas de *S. aureus* de origen humano pueden sobrevivir en las explotaciones

cunícolas y transmitirse a los conejos por contacto directo (Devriese *et al.*, 1981; Hermans *et al.*, 1999). Por otra parte, cabe resaltar que entre las infecciones humanas producidas por *S. aureus* a nivel global destaca la presencia de cepas pertenecientes al genotipo ST121 (Rao *et al.*, 2015).

### **1.1.3. Factores de virulencia de *S. aureus***

*S. aureus* produce una gran variedad de factores de virulencia que participan en todos los niveles de las interacciones que se producen entre el hospedador y el patógeno, de manera que le permiten unirse a los tejidos, facilitando la subsiguiente invasión tisular y diseminación por el organismo, así como la supervivencia en el nuevo ambiente. De este modo, entre estas moléculas se incluyen proteínas que contribuyen a su habilidad para colonizar y producir la lisis de las células de los mamíferos, permitiendo así a la bacteria eludir la respuesta inmunitaria, pero a su vez actúan también como potentes estímulos para activar la inmunidad innata. Además, un mismo factor de virulencia puede tener varias funciones en la patogénesis de una enfermedad, del mismo modo que varios factores de virulencia pueden desarrollar una misma función (Dinges *et al.*, 2000; Gordon y Lowy, 2008; Liu, 2009; Rigby y DeLeo, 2012; Brandt *et al.*, 2018), como la de protegerse de la actividad bactericida de los leucocitos polimorfonucleares o alterar su función (Rigby y DeLeo, 2012). Por otra parte, la supervivencia bacteriana no sólo depende de la evasión de las defensas del sistema inmunitario, sino también del éxito en la adquisición de nutrientes, particularmente de hierro y carbohidratos, siendo también importantes para el metabolismo bacteriano otros elementos como el manganeso y el zinc (Balasubramanian *et al.*, 2017).

Un aspecto representativo de la patogénesis de las infecciones bacterianas es la regulación de la expresión genética de los factores de virulencia microbianos. Esto ocurre de manera coordinada en virtud de las necesidades de la bacteria para reducir excesivas demandas metabólicas. Se consigue mediante la liberación de moléculas de señalización (AIPs), que son producidas de forma basal. De este modo, al inicio de la infección (fase de crecimiento exponencial) la bacteria expresa en su superficie moléculas de adhesión para facilitar la colonización de los tejidos, mientras que en la posterior fase de diseminación, coincidiendo con la fase estacionaria, predominan la

síntesis y secreción de toxinas citolíticas. El primer gen regulador descrito (1968) y más conocido es *agr*, el gen regulador accesorio, cuya activación se asocia con la invasión del hospedador, mientras que cuando se encuentra inhibido se relaciona con el periodo de colonización (Lowy, 1998; Novick, 2003; Gordon y Lowy, 2008; Balasubramanian *et al.*, 2017). Además, se ha descrito menor virulencia en cepas mutantes en el gen regulador *sar* (Cheung *et al.*, 1994; Gresham *et al.*, 2000; Rasigade *et al.*, 2013; Tuchscherer *et al.*, 2015), y se ha señalado al gen *rot* como represor de toxinas, siendo su influencia sobre la expresión de ciertos genes opuesta a la de *agr*, de manera que al comienzo de una infección, contando con la presencia de un bajo número de bacterias y niveles basales de AIPs, *agr* se encuentra inactivo y la expresión de la proteína Rot está aumentada (Saïd-Salim *et al.*, 2003; Balasubramanian *et al.*, 2017). También se ha referido al factor sigma alternativo (*sigB*) como un regulador global de genes de virulencia a partir de la fase final de multiplicación logarítmica y ante condiciones de estrés (Kullik *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 2011).

Además, se han definido sistemas reguladores de dos componentes (TCS) implicados en la patogénesis de *S. aureus*, tales como *arIRS*, que participa en la aglutinación (Walker *et al.*, 2013), *graRS*, que regula la sensibilidad frente a los elementos antimicrobianos de la inmunidad innata (Kraus *et al.*, 2008; Cheung *et al.*, 2014a), y *vraRS*, responsable de la resistencia a los antibióticos (Galbusera *et al.*, 2011).

Un mecanismo importante para promover la colonización del hospedador es la capacidad de adherencia a sus tejidos, a través de proteínas de superficie llamadas MSCRAMMs que se unen a componentes tales como el fibrinógeno, la fibronectina y la citoqueratina presentes en el epitelio nasal o en los queratinocitos de la epidermis (Gordon y Lowy, 2008; Krishna y Miller, 2012b). Algunos elementos que permiten la colonización nasal de *S. aureus* son el ClfB y la proteína A (*spa*), que se unen a la proteína loricrina del epitelio escamoso (Mulcahy *et al.*, 2012; Pietrocola *et al.*, 2017), y el IsdA, que se expresa de manera mayoritaria durante las infecciones humanas producidas por *S. aureus*, y es un ejemplo de factor de virulencia multifuncional. IsdA por una parte actúa como inhibidor de proteasas al unirse a la lactoferrina, el polipéptido más abundante en las secreciones nasales, y por otra parte participa en la resistencia a las defensas innatas de la piel, como los ácidos grasos y los péptidos antimicrobianos.

Además, el déficit de hierro es un estímulo ambiental que favorece la expresión de esta proteína para potenciar la adhesión celular (Clarke *et al.*, 2007; Zinkernagel y Nizet, 2007; Clarke *et al.*, 2008 y 2009).

Asimismo, componentes de la pared celular de *S. aureus*, comunes para las bacterias Gram-positivas, como son el ácido lipoteicoico (ALT) y el peptidoglicano (PepG), tienen potentes propiedades proinflamatorias y actúan de manera sinérgica durante la inducción de la fisiopatología del shock séptico (De Kimpe *et al.*, 1995). La capacidad de formar biofilm proporciona resistencia a la antibioterapia convencional y protección frente a los mecanismos de defensa del huésped, como la fagocitosis mediada por los macrófagos (Scherr *et al.*, 2015). En este sentido las cepas que presentan biofilm son de 10 a 1000 veces más resistentes a los antibióticos de uso común. Se estima que están presentes en, al menos, el 65% de todas las infecciones humanas (Pfalzgraff *et al.*, 2018).

Por otra parte, *S. aureus* secreta moléculas citotóxicas que rompen la integridad de la superficie de las células para favorecer su invasión, y en el caso de las células del sistema inmunitario, para modificar las funciones inmunitarias. Además, algunas de estas toxinas citolíticas presentan especificidad tanto a nivel de célula como de especie animal (Brandt *et al.*, 2018). Estas exoproteínas pueden dividirse en varias clases atendiendo a su mecanismo de acción y efectos, y tropismo celular; estos grupos son los superantígenos de toxinas pirogénicas (PTSAGs), las toxinas exfoliativas, hemolisinas, leucocidinas y modulinas solubles en fenol (PSMs) (Lowy, 1998; Dinges *et al.*, 2000).

Los PTSAGs son toxinas secretadas por *S. aureus* y *Streptococcus pyogenes* y poseen características biológicas importantes. Incluyen la TSST-1, la mayoría de las enterotoxinas estafilocócicas (SEA, SEB, SEC, SED, SEE y SEH) y las toxinas pirogénicas estreptocócicas. Los PTSAGs estafilocócicos causan o pueden estar implicados en la patogénesis de varios estados agudos o crónicos de enfermedades humanas, como la intoxicación alimentaria por estafilococos (SFP) y el TSS (Dinges *et al.*, 2000).

Las toxinas exfoliativas (ETs) no sólo son producidas por *S. aureus*, sino también por otras especies de su mismo género (*S. chromogenes*, *S. hyicus*, *S. pseudintermedius*), y también se ha visto que son específicas para varios organismos hospedadores. Las cepas de *S. aureus* que infectan a humanos principalmente producen ETA y ETB, y son

responsables del síndrome estafilocócico de la piel escaldada (SSSS). La toxina ETD es menos común y se aísla de abscesos cutáneos y forúnculos, y la toxina ETC puede afectar a caballos, polluelos y ratones lactantes (Bukowski *et al.*, 2010).

Las hemolisinas y las leucocidinas son toxinas formadoras de poros (PFTs) que producen daño en la bicapa lipídica de la membrana plasmática de las células eucariotas, permitiendo así el intercambio de iones y la lisis celular por hinchazón osmótica. En el grupo de las hemolisinas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ ), la hemolisina  $\alpha$  (Hla, también conocida como toxina  $\alpha$ ) es la más prominente, de hecho un elevado porcentaje de cepas de *S. aureus* producen esta citotoxina, y es activa frente a un gran rango de células de mamíferos, siendo especialmente sensibles los eritrocitos de conejo. Por su parte, la hemolisina  $\beta$  (Hlb, también conocida como esfingomielinasa C) es altamente hemolítica para ovejas, pero no para los eritrocitos de conejo, lo cual puede deberse al diferente contenido en esfingomielina de los eritrocitos de ambas especies. La hemolisina  $\gamma$  (Hlg) es una toxina de dos componentes (Hlg1 y Hlg2) que además de lisar los glóbulos rojos de varias especies animales, también puede afectar a macrófagos y neutrófilos. Por su parte, las leucocidinas son citolisinas bicomponente que presentan una especificidad celular por los leucocitos polimorfonucleares y monocitos/macrófagos, e incluyen seis exoproteínas: LukSF-PV, LukED, LukMF, LukAB/HG, HlgAB y HlgCB (Tomita y Kamio, 1997; Dinges *et al.*, 2000; Alonzo y Torres, 2014).

Por otra parte, los PSMs son toxinas que tienen como células diana de su actividad citolítica los glóbulos blancos y rojos de la sangre. Diferenciando en la secuencia de aminoácidos se han descrito cuatro péptidos PSM $\alpha$  (PSM $\alpha$ 1-4), dos PSM $\beta$  (PSM $\beta$ 1 y 2) y un PSM $\delta$ , siendo los primeros los más predominantes, y el PSM $\alpha$ 3 el que presenta mayor actividad proinflamatoria. Todas las cepas patógenas secretan toxinas de la familia de los PSMs mediante el sistema Pmt, que a su vez protege a la bacteria de estos mismos péptidos. Además, también intervienen en la formación del biofilm (Wang *et al.*, 2007; Chatterjee *et al.*, 2013).

Hay una acción coordinada entre la Hla y los PSMs durante las fases tempranas de la infección, de tal manera que el locus *psm $\alpha$*  regula la producción de Hla durante la fase de crecimiento para potenciar el mecanismo que le permite a *S. aureus* modular la

respuesta inmunitaria innata a través de los PSMs, y simultáneamente producir daño tisular mediante la Hla (Berube *et al.*, 2014). La Hla y el PSM $\alpha$  participan en la patogénesis de las infecciones en piel porque interfieren de manera directa en la actividad de los PMNs (Kennedy *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Kobayashi *et al.*, 2011; Adhikari *et al.*, 2016; Le *et al.*, 2016).

Igualmente cabe mencionar una serie de enzimas que contribuyen a la supervivencia de *S. aureus* mediante la evasión de la respuesta inmunitaria y, por lo tanto, al desarrollo de la enfermedad. Una de estas enzimas es la coagulasa (Coa), que fue además uno de los primeros factores de virulencia descritos para este patógeno (Loeb, 1903), y más recientemente se descubrió una segunda coagulasa, la proteína de unión al factor Von Willebrand (vVwbp) (Bjerketorp *et al.*, 2002). Ambas son polipéptidos que se unen y activan la protrombina y convierten el fibrinógeno en fibrina, siendo así responsables de la coagulación del plasma y de la sangre. Además, intervienen en la formación de abscesos (McAdow *et al.*, 2012a) y se han asociado también al desarrollo de infecciones cutáneas (Vanassche *et al.*, 2011; Malachowa *et al.*, 2016). La expresión de los genes *coa* y *vwb* es un rasgo universal de las cepas de *S. aureus* (Cheng *et al.*, 2010) y, mientras que la secuencia del gen *coa* es variable entre los aislados, la del gen *vwb* se encuentra más conservada (McCarthy y Lindsay, 2010). Ambos genes presentan una estructura y secuencia homólogas (McAdow *et al.*, 2012a).

Por otra parte, *S. aureus* también utiliza enzimas como la alquil hidroperóxido reductasa, catalasa y superóxido dismutasa para protegerse de las especies de oxígeno reactivo (ROS) liberadas por las células fagocíticas, contribuyendo el pigmento estafiloxantina en la protección adicional frente a estas moléculas (Kobayashi *et al.*, 2015b). Asimismo, la estafiloquinasa (SAK) y la aureolisina (Aur) inhiben la función de algunos péptidos antimicrobianos (Ryu *et al.*, 2014; Pietrocola *et al.*, 2017). Aur también induce la coagulación y puede interferir en la activación de linfocitos B y T (Pietrocola *et al.*, 2017).

La distribución de algunos factores de virulencia está ligada con el tipo clonal, lo que implica que no todas las cepas de *S. aureus* contienen los mismos tipos de toxinas (Peacock *et al.*, 2002; Baba *et al.*, 2008). Así pues, mientras la Hla es expresada por la mayoría de los aislados clínicos (Berube y Bubeck Wanderburg, 2013), los PSMs son

expresados en menor medida por las cepas HA-MRSA en comparación a las CA-MRSA (Wang *et al.*, 2007), y entre éstas últimas, la cepa USA300 es más virulenta que la USA400 (Liu, 2009). Por otra parte, teniendo en cuenta que la contribución de las toxinas de *S. aureus* a la patogénesis y severidad de las infecciones depende del sitio de infección (tropismo celular), de la especie animal objeto de estudio y del repertorio de factores de virulencia de la cepa, se puede entender que exista controversia en torno al papel los mecanismos de patogenicidad de *S. aureus* a tenor de los resultados de los diferentes modelos animales empleados (Brandt *et al.*, 2018).

#### **1.1.4. Modelos de infección experimental con *S. aureus***

Durante los últimos años ha quedado claro que la interacción de *S. aureus* con las células del hospedador es más compleja de lo que se expuso años atrás, y los resultados publicados son tan variables como contradictorios. Aparentemente, los estudios desarrollados varían dependiendo de la cepa bacteriana y de la dosis que se inocula, así como del tipo de célula hospedadora (Sinha y Fraunholz, 2010; Strobel *et al.*, 2016; Brandt *et al.*, 2018).

De entre los numerosos esfuerzos que han sido desarrollados para conocer la interacción entre *S. aureus* y el hospedador, el ratón ha sido el animal que se ha utilizado con mayor frecuencia en los diferentes modelos de infección experimental, seguido por la especie cunícola. Otros roedores (e.g., rata, ratón algodónero) también se han empleado para el estudio de la patogenia de *S. aureus*, aunque en menor medida, así como otras especies animales (cabras, cerdos, ovejas y vacas) (**Tabla 1.1**).

La susceptibilidad del hospedador es una consideración importante a la hora de seleccionar el modelo de especie animal apropiado. Dado que se requieren modelos animales que mimeticen las infecciones humanas, advirtiendo que *S. aureus* no es un colonizador natural del ratón y que existe una afinidad selectiva de los factores de virulencia de *S. aureus* hacia las células humanas, muchos de estos mecanismos que evaden la respuesta inmunitaria en humanos difícilmente pueden ser estudiados en la especie murina, como es el caso de PVL (Liu, 2009; Tseng *et al.*, 2015). Por esta razón, en las infecciones experimentales en ratón se emplean elevadas dosis de inóculo bacteriano para establecer lesión (salvo excepciones, de  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^{10}$  UFC), y esto

puede tener consecuencias involuntarias en la interpretación de la patogenia de *S. aureus* (Tseng *et al.*, 2015). Además, los nulos resultados obtenidos en ensayos clínicos en los que se aplicaba en humanos los mecanismos de inmunización (activa o pasiva) frente a *S. aureus* desarrollados en ratones, han hecho que se cuestione a esta especie como herramienta para el estudio de la patogénesis y terapéutica de este patógeno en humanos.

Para resolver esta falta de afinidad entre las toxinas de *S. aureus* y las células murinas se han desarrollado los conocidos como “ratones humanizados” (NSG) (**Tabla 1.1**), que al presentar un sistema inmunitario defectuoso no rechazan las células hematopoyéticas humanas trasplantadas, a diferencia de los ratones normales, y producen células de la inmunidad innata y adaptativa propias de los humanos. Además, la carga bacteriana que se inocula a este tipo de ratones puede ser inferior en comparación a los ratones *wt* (Knop *et al.*, 2015; Soong *et al.*, 2015; Tseng *et al.*, 2015; Prince *et al.*, 2017), pues la presencia de células inmunitarias humanas confiere un incremento en la susceptibilidad a las infecciones por *S. aureus*. Sin embargo, a pesar de que consiste en un modelo murino más selecto, se trata de un sistema económicamente costoso y los resultados pueden verse afectados por el uso de células de diferentes donantes. Además, como el ratón está inmunocomprometido puede no ser útil para determinados estudios, y se desconocen las posibles incompatibilidades entre ratones y humanos que puedan interferir en el desarrollo y funciones de las células inmunitarias humanas (Tseng *et al.*, 2015).

Por otra parte, cabe considerar igualmente no sólo las características generales de la especie hospedadora, sino también de la cepa de hospedador, sobre todo en el caso de los ratones, ya que se ha visto que algunas cepas murinas presentan mayor resistencia a ser infectadas por *S. aureus*, y estas diferencias pueden condicionar el desarrollo de la inmunidad protectora (von Kröckritz-Blickwede *et al.*, 2008; Montgomery *et al.*, 2014).

Sin embargo, la necesidad de inocular elevadas cargas bacterianas no sólo ocurre en los modelos en ratón, sino también en otras especies animales, y esto puede estar relacionado con la inoculación de cepas de origen humano (**Tabla 1.2**). Son pocos los modelos experimentales donde utilizan cepas aisladas de animales: colonización nasal



en cerdos (Crombé *et al.*, 2012; Jouy *et al.*, 2012; Szabó *et al.*, 2012); infección en piel de conejo (Hermans *et al.*, 2000; Meulemans *et al.*, 2007; Viana *et al.*, 2015); y mastitis en cabras (Cremonesi *et al.*, 2012; Rainard *et al.*, 2018), ovejas (Cucarella *et al.*, 2004; Tormo *et al.*, 2007), ratones (Breyne *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017) y vacas (Bannerman *et al.*, 2004; Sladek *et al.*, 2005; Sladek y Rysanek, 2006; Slama *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2013; Ster *et al.*, 2013). Cuando se inoculan cepas de origen animal “en animales” la dosis bacteriana se reduce entre 10 y 1000 veces, a excepción de los estudios de colonización (**Tabla 1.1**). De este modo, la elección de la cepa bacteriana supone una consideración fundamental para establecer el modelo animal apropiado, y teniendo en cuenta que *S. aureus* es una bacteria específica de hospedador, utilizar cepas no adaptadas a la especie objeto de estudio también puede conducir a la obtención de resultados no representativos para la especie en cuestión ni extrapolables a la especie humana (Holtfreter *et al.*, 2013).

#### 1.1.4.1. Estudios experimentales en piel

Las infecciones cutáneas por *S. aureus* generan lesiones piógenas caracterizadas por eritema, calor y endurecimiento, y frecuente ulceración y drenaje de material purulento. Microscópicamente estas lesiones están compuestas ante todo por colecciones de neutrófilos, una marca distintiva de las infecciones por este agente (Cheng *et al.*, 2011; Krishna y Miller, 2012b). Sin embargo, atendiendo a las posibles vías de inoculación presentadas en los modelos experimentales en piel (como se pueden ver en la **Tabla 1.1**: epicutánea, i.d., s.c. o a través de heridas) y las distintas localizaciones anatómicas (oreja, espalda, flanco), sumadas a la elevada dosis de bacterias que se inocula, a las diferencias genéticas entre las cepas infectantes, al volumen del inóculo, así como a las características intrínsecas de la especie animal objeto de estudio, no se ha afianzado un modelo animal que mimetice el desarrollo y la evolución de las infecciones en piel producidas por *S. aureus* en humanos.

Tabla 1.1. Modelos de infección experimental in vivo con *S. aureus*.

Especie animal	Tipo de infección (vía de inoculación <sup>1</sup> )	Cepa de <i>S. aureus</i>	Dosis inoculada (UFC)	Volumen (ml)	Referencia bibliográfica
Cabra	Mastitis (i.m.)	DV137 (mastitis caprina)	1,0x10 <sup>3</sup>	1,00	Cremonesi <i>et al.</i> , 2012
Cabra	Mastitis (i.m.)	Ch122 y Ch204 (mastitis caprina)	700 (Ch122) 1,0x10 <sup>3</sup> (Ch204)	1,00	Rainard <i>et al.</i> , 2018
Cerdo	Colonización (i.n.)	ST398 (cerdo)	3,0 x10 <sup>8</sup>	1,00	Crombé <i>et al.</i> , 2012*
Cerdo	Colonización (i.n.)	ST398 (cerdo)	2,0 x10 <sup>4</sup>	1,00	Jouy <i>et al.</i> , 2012
Cerdo	Colonización (i.n.)	ST8 y ST398 (cerdo) ST9 (pollo)	5,0x10 <sup>2</sup> , 5,0x10 <sup>4</sup> , 5,0x10 <sup>7</sup> y 5,0x10 <sup>8</sup> (ST398) 5,0x10 <sup>8</sup> (ST8 y ST9)	-	Szabó <i>et al.</i> , 2012
Cerdo	Colonización (piel)	ST398 (cerdo)	1,5-9,0 x10 <sup>8</sup>	0,50	Crombé <i>et al.</i> , 2012*
Conejo	Endocarditis séptica (i.v.)	c9959; CDC587; COL; FRI1169; LAC; Levy; MN8; MNPE; MNWH; Newman	2,0x10 <sup>4</sup> -8,0x10 <sup>8</sup>	0,20	Spaulding <i>et al.</i> , 2012a
Conejo	Endocarditis séptica (i.v.)	MNPE	2,0x10 <sup>9</sup>	2,00	Spaulding <i>et al.</i> , 2012b*
Conejo	Endocarditis séptica (i.v.)	MW2	2,0 x10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup>	2,00	Walker <i>et al.</i> , 2013
Conejo	Endocarditis séptica (i.v.)	MW2	1,0 x10 <sup>6</sup>	-	Cheung <i>et al.</i> , 2014a

<sup>1</sup> i.b.: intrabronquial/ i.d.: intradérmico/ i.m.: intramamario/ i.n.: intranasal/ i.p.: intraperitoneal/ i.t.: intratraqueal/ i.v.: intravenoso/ s.c.: subcutáneo.

\* El estudio presenta más de un modelo de infección experimental; \*\* Cepa de laboratorio.

Tabla 1.1. Modelos de infección experimental in vivo con *S. aureus*.

Especie animal	Tipo de infección (vía de inoculación <sup>1</sup> )	Cepa de <i>S. aureus</i>	Dosis inoculada (UFC)	Volumen (ml)	Referencia bibliográfica
Conejo	Colonización (heridas piel)	KH 24; KH 171; KH 365; PI41/95 (conejo)	1,0x10 <sup>8</sup>	0,10	Meulemans <i>et al.</i> , 2007
Conejo	Colonización (heridas piel)	RN6390**	>1,0x10 <sup>8</sup>	0,50	Liu <i>et al.</i> , 2018
Conejo	Colonización (i.n.)	KH 15; KH 103; KH 171; KH 365 (conejo)	1,0x10 <sup>9</sup>	0,05	Hermans <i>et al.</i> , 2000
Conejo	Mastitis (i.m.)	BB (mastitis bovina) CN.6708 (mastitis en conejo) Compton 201 (mastitis bovina)	2,2x10 <sup>3</sup> y 8,8x10 <sup>3</sup> 1,2x10 <sup>4</sup> y 3,0x10 <sup>3</sup> 1,4x10 <sup>3</sup> y 2,0x10 <sup>3</sup>	-	Adlam <i>et al.</i> , 1977
Conejo	Neumonía (i.b.)	c99-529; MN128; MN1021; MNPA; MW2	2,0x10 <sup>9</sup>	0,20	Strandberg <i>et al.</i> , 2010
Conejo	Neumonía (intrapulmonar)	SF8300	2,0-3,0x10 <sup>10</sup>	1,50	Diep <i>et al.</i> , 2010
Conejo	Neumonía (i.t.)	LAC	2,0x10 <sup>9</sup>	0,20	Wilson <i>et al.</i> , 2011
Conejo	Neumonía (i.t.)	MNPE	2,0x10 <sup>9</sup>	0,20	Spaulding <i>et al.</i> , 2012b*
Conejo	Osteomielitis (canal medular)	LAC	8,0x10 <sup>5</sup> y 4,0x10 <sup>8</sup>	0,20	Crémieux <i>et al.</i> , 2009
Conejo	Osteomielitis (canal medular)	LAC	4,0x10 <sup>8</sup>	0,20	Crémieux <i>et al.</i> , 2014
Conejo	Osteomielitis (canal medular)	LAC	3,0x10 <sup>8</sup>	0,20	Davido <i>et al.</i> , 2016

<sup>1</sup> i.b.: intrabronquial/ i.d.: intradérmico/ i.m.: intramamario/ i.n.: intranasal/ i.p.: intraperitoneal/ i.t.: intratraqueal/ i.v.: intravenoso/ s.c.: subcutáneo.

\* El estudio presenta más de un modelo de infección experimental; \*\* Cepa de laboratorio.

Tabla 1.1. Modelos de infección experimental in vivo con *S. aureus*.

Especie animal	Tipo de infección (vía de inoculación <sup>1</sup> )	Cepa de <i>S. aureus</i>	Dosis inoculada (UFC)	Volumen (ml)	Referencia bibliográfica
Conejo	Piel (i.d.)	07-02662; BD02-25; CN1; MW2; SF1208; SF1497; SF1681; SF2561; SF8300	5,0x10 <sup>8</sup>	0,10	Li <i>et al.</i> , 2010
Conejo	Piel (i.d.)	LAC	1,0x10 <sup>8</sup>	0,05	Lipinska <i>et al.</i> , 2011
Conejo	Piel (i.d.)	I; J; DL9 (ST121 de conejo) A; G; F (ST121 de humano)	300 300 y 1,0x10 <sup>5</sup>	0,10	Viana <i>et al.</i> , 2015
Conejo	Piel (i.d.)	SF8300	2,0-3,0x10 <sup>9</sup>	0,12	Le <i>et al.</i> , 2016*
Conejo	Piel (s.c.)	LAC	5,0x10 <sup>8</sup>	0,10	Kobayashi <i>et al.</i> , 2011 Malachowa <i>et al.</i> , 2012*
Conejo	Piel (s.c.)	LAC	5,0x10 <sup>8</sup>	0,10	Malachowa <i>et al.</i> , 2015
Conejo	Piel (s.c.)	SF8300	3,0-3,6x10 <sup>9</sup>	0,12	Le <i>et al.</i> , 2016*
Conejo	Piel (s.c.)	Newman	5,0x10 <sup>8</sup>	0,10	Malachowa <i>et al.</i> , 2016
Oveja	Mastitis (i.m.)	V329, m556 (mastitis bovina)	2,0x10 <sup>3</sup>	1,00	Cucarella <i>et al.</i> , 2004
Oveja	Mastitis (i.m.)	V329 (mastitis bovina)	5,0x10 <sup>2</sup>	1,00	Tormo <i>et al.</i> , 2007

<sup>1</sup> i.b.: intrabronquial/ i.d.: intradérmico/ i.m.: intramamario/ i.n.: intranasal/ i.p.: intraperitoneal/ i.t.: intratraqueal/ i.v.: intravenoso/ s.c.: subcutáneo.

\* El estudio presenta más de un modelo de infección experimental; \*\* Cepa de laboratorio.

Tabla 1.1. Modelos de infección experimental in vivo con *S. aureus*.

Especie animal	Tipo de infección (vía de inoculación <sup>1</sup> )	Cepa de <i>S. aureus</i>	Dosis inoculada (UFC)	Volumen (ml)	Referencia bibliográfica
Rata	Neumonía (i.t.)	LAC; MW2	4,0-5,0x10 <sup>8</sup> 1,0-2,0x10 <sup>9</sup>	0,10	Montgomery <i>et al.</i> , 2008
Rata	Osteomielitis (canal medular)	LS-1 (artritis en ratón); SH1000**	1,0x10 <sup>6</sup>	0,005	Tuscherr <i>et al.</i> , 2015
Ratón	Abscesos en cerebro (Caudate putamen)	RNG390**	1,0x10 <sup>5</sup> 1,0-2,0x10 <sup>4</sup>	0,003 0,002	Kielian <i>et al.</i> , 2001 Kielian <i>et al.</i> , 2004 y 2007
Ratón	Abscesos en riñón (i.v.)	LAC; MW2; Newman	1,0x10 <sup>7</sup>	0,10	Rauch <i>et al.</i> , 2012*
Ratón	Artritis séptica (i.v.)	LS-1 (artritis en ratón)	1,0x10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup>	0,20	Bremell <i>et al.</i> , 1991
Ratón	Artritis séptica (i.v.)	LS-1 (artritis en ratón)	1,5-8,0x10 <sup>6</sup> -3,0x10 <sup>7</sup>	0,20	Verdrengh y Tarkowski, 1997
Ratón	Artritis séptica (i.v.)	SH1000**	1,0x10 <sup>7</sup>	0,20	Kenny <i>et al.</i> , 2013
Ratón	Colonización (catéter)	V329 (mastitis bovina)	1,5x10 <sup>5</sup>	-	Cucarella <i>et al.</i> , 2001
Ratón	Colonización (heridas piel)	COL; PS80; Reynolds	≤100	0,005	McLoughlin <i>et al.</i> , 2006*
Ratón	Colonización (heridas piel)	SH1000**	2,5x10 <sup>6</sup>	Punción	Kim <i>et al.</i> , 2008
Ratón	Colonización (heridas piel)	PS80	100	0,005	McLoughlin <i>et al.</i> , 2008

<sup>1</sup> i.b.: intrabronquial/ i.d.: intradérmico/ i.m.: intramamario/ i.n.: intranasal/ i.p.: intraperitoneal/ i.t.: intratraqueal/ i.v.: intravenoso/ s.c.: subcutáneo.

\* El estudio presenta más de un modelo de infección experimental; \*\* Cepa de laboratorio.

Tabla 1.1. Modelos de infección experimental in vivo con *S. aureus*.

Especie animal	Tipo de infección (vía de inoculación <sup>1</sup> )	Cepa de <i>S. aureus</i>	Dosis inoculada (UFC)	Volumen (ml)	Referencia bibliográfica
Ratón	Colonización (heridas piel)	ALC2906** ALC6668**	2,0x10 <sup>5</sup> -10 <sup>7</sup> 2,0x10 <sup>6</sup>	0,01	Cho <i>et al.</i> , 2011*
Ratón	Colonización (heridas piel)	SH1000**	2,0x10 <sup>6</sup> -1,0x10 <sup>7</sup>	0,01	Kim <i>et al.</i> , 2011
Ratón	Colonización (heridas piel)	FPR3757; NRS384; TCH1516 (USAs300)	4,0x10 <sup>7</sup>	Punción	Prabhakara <i>et al.</i> , 2013
Ratón	Colonización (heridas piel)	IDRL-7971 RN6734	1,0x10 <sup>7</sup> 1,0x10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup>	0,01	Kim <i>et al.</i> , 2015
Ratón	Colonización (heridas piel)	LAC	1,0x10 <sup>7</sup>	Apósito	Syed <i>et al.</i> , 2015
Ratón	Colonización (heridas piel)	LAC	43-300	0,003	Adhikari <i>et al.</i> , 2016*
Ratón	Colonización (implante ortopédico)	LAC	1,0x10 <sup>3</sup>	-	Scherr <i>et al.</i> , 2015
Ratón	Colonización (i.n.)	502A; 8325-4**; Becker; COL; LAC; MW2; Newman; Reynolds; SH1000**	1,0x10 <sup>8</sup>	0,01	Lijek <i>et al.</i> , 2012
Ratón	Colonización (i.n.)	Newman; SH1000*	2,0x10 <sup>8</sup>	0,01	Mulcahy <i>et al.</i> , 2012
Ratón	Colonización (i.n.)	COL; Newman	1,0x10 <sup>8</sup>	0,05	Xu <i>et al.</i> , 2015
Ratón	Endocarditis (i.v.)	Tager104; Xen8.1**, Xen29**	1,0x10 <sup>6</sup>	0,10	Panizzi <i>et al.</i> , 2011

<sup>1</sup> i.b.: intrabronquial/ i.d.: intradérmico/ i.m.: intramamario/ i.n.: intranasal/ i.p.: intraperitoneal/ i.t.: intratraqueal/ i.v.: intravenoso/ s.c.: subcutáneo.

\* El estudio presenta más de un modelo de infección experimental; \*\* Cepa de laboratorio.

Tabla 1.1. Modelos de infección experimental in vivo con *S. aureus*.

Especie animal	Tipo de infección (vía de inoculación <sup>1</sup> )	Cepa de <i>S. aureus</i>	Dosis inoculada (UFC)	Volumen (ml)	Referencia bibliográfica
Ratón	Mastitis bovina (i.m.)	N305 (mastitis bovina)	3,45x10 <sup>2</sup>	0,10	Breyne et al., 2017
Ratón	Mastitis bovina (i.m.)	E48 (mastitis bovina)	1,0x10 <sup>4</sup>	0,05	Li et al., 2017
Ratón	Neumonía (i.n.)	Newman	1,3-8,0x10 <sup>8</sup>	0,03	Bubeck Wardenburg et al., 2007
Ratón	Neumonía (i.n.)	8325-4**	2,0 x10 <sup>7</sup> -8,0 x10 <sup>8</sup>	-	Bartlett et al., 2008*
Ratón	Neumonía (i.n.)	LAC	4,0-6,0 x10 <sup>7</sup>	0,02	Bubeck Wardenburg et al.
Ratón	Neumonía (i.n.)	Newman	3,0-4,0 x10 <sup>8</sup>	0,03	al., 2008*
Ratón	Neumonía (i.n.)	Newman	6,0x10 <sup>7</sup>	0,05	Adhikari et al., 2012*
Ratón	Neumonía (i.n.)	Newman	2,0-x10 <sup>8</sup>	0,01	Jongerijs et al., 2012*
Ratón	Neumonía (i.n.)	FPR3757; LAC	2,0-5,0x10 <sup>7</sup> 1,0-2,0x10 <sup>8</sup>	-	Parker y Prince, 2012
Ratón	Neumonía (i.n.)	LAC	2,0-3,0x10 <sup>8</sup>	0,03	Becker et al., 2014*
Ratón	Neumonía (i.n.)	LAC	1,0-3,0x10 <sup>8</sup>	0,03	Berube et al., 2014*
Ratón	Neumonía (i.n.)	36-477 (USA300)	2,0-5,0x10 <sup>7</sup> y 2,0x10 <sup>8</sup>	-	Parker et al., 2014
Ratón	Neumonía (i.n.)	LAC	4,0x10 <sup>8</sup>	0,02	Maurer et al., 2015*
Ratón	Neumonía (i.n.)	36-477 (USA300)	2,0-5,0x10 <sup>7</sup> y 2,0x10 <sup>8</sup>	-	Parker et al., 2015

<sup>1</sup> i.b.: intrabronquial/ i.d.: intradérmico/ i.m.: intramamario/ i.n.: intranasal/ i.p.: intraperitoneal/ i.t.: intratraqueal/ i.v.: intravenoso/ s.c.: subcutáneo.

\* El estudio presenta más de un modelo de infección experimental; \*\* Cepa de laboratorio.

Tabla 1.1. Modelos de infección experimental in vivo con *S. aureus*.

Especie animal	Tipo de infección (vía de inoculación <sup>1</sup> )	Cepa de <i>S. aureus</i>	Dosis inoculada (UFC)	Volumen (ml)	Referencia bibliográfica
Ratón	Osteomielitis (canal medular)	LAC	1,0x10 <sup>6</sup>	0,02	Cassat <i>et al.</i> , 2013
Ratón	Osteomielitis (canal medular)	AH1263 (USA300); HG003**	1,0-5,0x10 <sup>6</sup>	0,02	Wilde <i>et al.</i> , 2015
Ratón	Osteomielitis (canal medular)	LAC; JAMS-1 (USA200)	1,0x10 <sup>5</sup>	0,02	Loughran <i>et al.</i> , 2016
Ratón	Osteomielitis (i.v.)	6850	2,0-5,0x10 <sup>5</sup> y 1,0x10 <sup>6</sup>	0,15	Horst <i>et al.</i> , 2012
Ratón	Osteomielitis (i.v.)	SAP231**	1,0-5,0x10 <sup>6</sup> y 1,0x10 <sup>7</sup>	-	Wang <i>et al.</i> , 2017
Ratón	Peritonitis (i.p.)	MW2	1,0x10 <sup>7</sup>	0,10	Wang <i>et al.</i> , 2007*
Ratón	Peritonitis (i.p.)	SA113**	1,2x10 <sup>8</sup>	0,40	Kraus <i>et al.</i> , 2008
Ratón	Peritonitis (i.p.)	LAC; MW2; Newman	5,0x10 <sup>8</sup>	-	Rauch <i>et al.</i> , 2012*
Ratón	Peritonitis (i.p.)	2406 (USA300)	1,0x10 <sup>8</sup>	0,10	Yipp <i>et al.</i> , 2012*
Ratón	Piel (almohadilla plantar)	PS80	1,0x10 <sup>6</sup>	0,01	McLoughlin <i>et al.</i> , 2006*
Ratón	Piel (i.d.)	SH1000**	2,0x10 <sup>6</sup>	0,10	Cho <i>et al.</i> , 2010 y 2011*
Ratón	Piel (i.d.)	Xen8.1**, Xen29**	1,0x10 <sup>8</sup>	0,10	Yipp <i>et al.</i> , 2012*
Ratón	Piel (i.d.)	NRS5260; NRS5382; SF8300; Wood	1,0x10 <sup>8</sup>	0,05	Tkaczyk <i>et al.</i> , 2013
Ratón	Piel (i.d.)	Newman; SA113**	1,0x10 <sup>7</sup>	0,01	Feuerstein <i>et al.</i> , 2015
Ratón	Piel (i.d.); recurrente	LAC	3,0x10 <sup>7</sup>	0,10	Dillen <i>et al.</i> , 2018

<sup>1</sup> i.b.: intrabronquial/ i.d.: intradérmico/ i.m.: intramamario/ i.n.: intranasal/ i.p.: intraperitoneal/ i.t.: intratraqueal/ i.v.: intravenoso/ s.c.: subcutáneo.

\* El estudio presenta más de un modelo de infección experimental; \*\* Cepa de laboratorio.



Tabla 1.1. Modelos de infección experimental in vivo con *S. aureus*.

Especie animal	Tipo de infección (vía de inoculación <sup>1</sup> )	Cepa de <i>S. aureus</i>	Dosis inoculada (UFC)	Volumen (ml)	Referencia bibliográfica
Ratón	Piel (s.c.)	LS-1 (artritis en ratón)	2,0x10 <sup>6</sup> -10 <sup>8</sup>	0,10	Mölné y Tarkwski, 2000
Ratón	Piel (s.c.)	LS-1 (artritis en ratón)	1,0x10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup>	0,10	Mölné <i>et al.</i> , 2000
Ratón	Piel (s.c.)	LS-1 (artritis en ratón)	4,0x10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup>	0,10	Mölné <i>et al.</i> , 2003
Ratón	Piel (s.c.)	PS80	1,0x10 <sup>2</sup> -10 <sup>6</sup>	-	McLoughlin <i>et al.</i> , 2006*
Ratón	Piel (s.c.)	ALC2506**; ALC2906**	2,5x10 <sup>6</sup> y 5,0x10 <sup>7</sup>	0,10	Miller <i>et al.</i> , 2006
Ratón	Piel (s.c.)	BK1540; LAC	1,0x10 <sup>5</sup> -10 <sup>7</sup>	0,05	Voyich <i>et al.</i> , 2006*
Ratón	Piel (s.c.)	ALC2506**; ALC2906**	2,5x10 <sup>6</sup> y 5,0x10 <sup>7</sup>	0,10	Kielian <i>et al.</i> , 2007
Ratón	Piel (s.c.)	ALC2906**	2,5x10 <sup>6</sup>	0,10	Miller <i>et al.</i> , 2007
Ratón	Piel (s.c.)	LAC	1,0x10 <sup>7</sup>	0,05	Wang <i>et al.</i> , 2007* Bubeck Wardenburg <i>et al.</i> , 2008*
Ratón	Piel (s.c.)	8325-4**	1,0x10 <sup>6</sup>	0,05	Muñoz-Planillo <i>et al.</i> , 2009
Ratón	Piel (s.c.)	CST5 y CST6 (CA-MRSA); Newman	1,0x10 <sup>8</sup> -10 <sup>10</sup>	0,10	Tseng <i>et al.</i> , 2009
Ratón	Piel (s.c.)	LAC; Newman	1,0x10 <sup>7</sup>	0,05	Kennedy <i>et al.</i> , 2010
Ratón	Piel (s.c.)	ATCC25293; Newman	1,0x10 <sup>7</sup>	0,10	Vanassche <i>et al.</i> , 2011
Ratón	Piel (s.c.)	LAC	5,0x10 <sup>7</sup>	0,10	Malachowa <i>et al.</i> , 2012*

<sup>1</sup> i.b.: intrabronquial/ i.d.: intradérmico/ i.m.: intramamario/ i.n.: intranasal/ i.p.: intraperitoneal/ i.t.: intratraqueal/ i.v.: intravenoso/ s.c.: subcutáneo.

\* El estudio presenta más de un modelo de infección experimental; \*\* Cepa de laboratorio.

Tabla 1.1. Modelos de infección experimental in vivo con *S. aureus*.

Especie animal	Tipo de infección (vía de inoculación <sup>1</sup> )	Cepa de <i>S. aureus</i>	Dosis inoculada (UFC)	Volumen (ml)	Referencia bibliográfica
Ratón	Piel (s.c.)	LAC; MW2	2,0x10 <sup>7</sup>	0,05	Chatterjee et al., 2013
Ratón	Piel (s.c.)	LAC	1,0-3,0x10 <sup>7</sup>	0,05	Becker et al., 2014*
Ratón	Piel (s.c.)	LAC	2,0x10 <sup>7</sup>	0,05	Berube et al., 2014*
Ratón	Piel (s.c.)	MRSA252 MRSA22030	4,0x10 <sup>7</sup> 5,0x10 <sup>6</sup>	0,05	Cheung et al., 2014b*
Ratón	Piel (s.c.)	Xen36**	2,0x10 <sup>7</sup>	0,10	Peetermans et al., 2014
Ratón	Piel (s.c.)	LAC; Xen30**	2,0x10 <sup>7</sup>	0,10	Chan et al., 2015
Ratón	Piel (s.c.)	LAC	4,0x10 <sup>5</sup> -4,0x10 <sup>7</sup>	0,05	Adhikari et al., 2016*
Ratón	Piel (s.c.)	HG001	5,0x10 <sup>7</sup>	0,05	Mansour et al., 2016
Ratón	Piel (s.c.)	ST-239	5,0x10 <sup>8</sup>	0,05	Lei et al., 2018
Ratón	Piel (s.c.); recurrente	834	1º: 1,0x10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup> 2º: 1,0x10 <sup>7</sup>	-	Sasaki et al., 2006
Ratón	Piel (s.c.); recurrente	SF8300	1,5x10 <sup>7</sup>	0,05	Montgomery et al., 2014
Ratón	Piel (s.c.); recurrente	LAC	1º: 1,0-4,0x10 <sup>7</sup> 2º 3,0-4,0x10 <sup>7</sup>	0,05	Sampedro et al., 2014
Ratón	Piel (s.c.); recurrente	923 (USA300)	1,5x10 <sup>7</sup>	0,05	Zhao et al., 2016

<sup>1</sup> i.b.: intrabronquial/ i.d.: intradérmico/ i.m.: intramamario/ i.n.: intranasal/ i.p.: intraperitoneal/ i.t.: intratraqueal/ i.v.: intravenoso/ s.c.: subcutáneo.

\* El estudio presenta más de un modelo de infección experimental; \*\* Cepa de laboratorio.

Tabla 1.1. Modelos de infección experimental in vivo con *S. aureus*.

Especie animal	Tipo de infección (vía de inoculación <sup>1</sup> )	Cepa de <i>S. aureus</i>	Dosis inoculada (UFC)	Volumen (ml)	Referencia bibliográfica
Ratón	Piel (s.c.); recurrente	LAC	1,0x10 <sup>7</sup>	0,10	Chan <i>et al.</i> , 2017
Ratón	Septicemia (i.p.)	LAC	5,0x10 <sup>4</sup>	0,50	Adhikari <i>et al.</i> , 2012*
Ratón	Septicemia (i.v.)	834	1,0x10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup>	-	Nakane <i>et al.</i> , 1995
Ratón	Septicemia (i.v.)	834	1,0x10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup>	0,20	Sasaki <i>et al.</i> , 2000
Ratón	Septicemia (i.v.)	SH1000**	4,0x10 <sup>7</sup>	0,20	von Kröckritz-Blickwede <i>et al.</i> , 2008
Ratón	Septicemia (i.v.)	Newman	1,8x10 <sup>7</sup>	-	Collins <i>et al.</i> , 2002
Ratón	Septicemia (i.v.)	COL; LAC; MnCop; MRSA252; MW2	1,0x10 <sup>8</sup>	-	Voyich <i>et al.</i> , 2005
Ratón	Septicemia (i.v.)	BK648; BK2370; BK2394; BK9918; BK11540; LAC; MnCop; MW2	1,0x10 <sup>8</sup>	-	Voyich <i>et al.</i> , 2006*
Ratón	Septicemia (i.v.)	MW2	1,0x10 <sup>8</sup>	0,10	Wang <i>et al.</i> , 2007*
Ratón	Septicemia (i.v.)	Newman LAC	1,0x10 <sup>7</sup> 5,0x10 <sup>6</sup>	0,10 0,10	Cheng <i>et al.</i> , 2009 y 2010 Cheng <i>et al.</i> , 2010
Ratón	Septicemia (i.v.)	LAC	1,0x10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup>	-	DuMont <i>et al.</i> , 2011
Ratón	Septicemia (i.v.)	MW2; Newman; N315 LAC	1,0x10 <sup>8</sup> 5,0x10 <sup>7</sup>	0,10	McAdow <i>et al.</i> , 2011

<sup>1</sup> i.b.: intrabronquial/ i.d.: intradérmico/ i.m.: intramamario/ i.n.: intranasal/ i.p.: intraperitoneal/ i.t.: intratraqueal/ i.v.: intravenoso/ s.c.: subcutáneo.

\* El estudio presenta más de un modelo de infección experimental; \*\* Cepa de laboratorio.

Tabla 1.1. Modelos de infección experimental in vivo con *S. aureus*.

Especie animal	Tipo de infección (vía de inoculación <sup>1</sup> )	Cepa de <i>S. aureus</i>	Dosis inoculada (UFC)	Volumen (ml)	Referencia bibliográfica
Ratón	Septicemia (i.v.)	LAC	$1 \times 10^6 - 10^7$	-	DuMont <i>et al.</i> , 2011
Ratón	Septicemia (i.v.)	Newman; SA113 (ATCC35558)**	$1,0 \times 10^5 - 10^6$ y $5,0 \times 10^7$	-	Schmalzer <i>et al.</i> , 2011
Ratón	Septicemia (i.v.)	Newman	$1,5 \times 10^7$	0,10	Jongerius <i>et al.</i> , 2012*
Ratón	Septicemia (i.v.)	LAC	$1,0 \times 10^7$	0,05	Malachowa <i>et al.</i> , 2012*
Ratón	Septicemia (i.v.)	MRSA252 MRSA22030	$1,0 \times 10^7$ $1,0 \times 10^6$	0,05	Cheung <i>et al.</i> , 2014b*
Ratón	Septicemia (i.v.)	LAC	$1,0 \times 10^7 - 10^8$	-	Maurer <i>et al.</i> , 2015*
Ratón	Septicemia (i.v.)	8325-4 (SH1000)** 6850 (MSSA)	$3,0 - 6,0 \times 10^7$ $1,0 \times 10^6$	0,10	Tebartz <i>et al.</i> , 2015
Ratón algodónero	Colonización (i.n.)	SH1000**; SRC005**	$1,5 \times 10^7$	0,01	Clarke <i>et al.</i> , 2006
Ratón algodónero	Colonización (i.n.)	"A" (CC30); "B" (CC45)	$1,0 \times 10^8$	0,01	Burian <i>et al.</i> , 2010
Ratón humanizado	Colonización (herida piel)	FPR3757 (USA300)	$1,0 \times 10^8$	0,01	Soong <i>et al.</i> , 2015

<sup>1</sup> i.b.: intrabronquial/ i.d.: intradérmico/ i.m.: intramamario/ i.n.: intranasal/ i.p.: intraperitoneal/ i.t.: intratraqueal/ i.v.: intravenoso/ s.c.: subcutáneo.

\* El estudio presenta más de un modelo de infección experimental; \*\* Cepa de laboratorio.

Tabla 1.1. Modelos de infección experimental in vivo con *S. aureus*.

Especie animal	Tipo de infección (vía de inoculación <sup>1</sup> )	Cepa de <i>S. aureus</i>	Dosis inoculada (UFC)	Volumen (ml)	Referencia bibliográfica
Ratón humanizado	Colonización (i.n.)	LAC	$2,0-7,5 \times 10^7$	0,05	Prince <i>et al.</i> , 2017
Ratón humanizado	Peritonitis (i.p.)	PS80	$1,0-5,0 \times 10^8$	-	Knop <i>et al.</i> , 2015
Ratón humanizado	Piel (s.c.)	CST5 (CA-MRSA)	$1,0 \times 10^5 - 10^8$	0,10	Tseng <i>et al.</i> , 2015
Vaca	Mastitis (i.m.)	N305 (mastitis bovina)	$\geq 40$	-	Bannerman <i>et al.</i> , 2004
Vaca	Mastitis (i.m.)	N305 (mastitis bovina)	800	-	Sladek <i>et al.</i> , 2005
Vaca	Mastitis (i.m.)	N305 (mastitis bovina)	800	-	Sladek y Rysanek, 2006
Vaca	Mastitis (i.m.)	N305 (mastitis bovina)	800	5,00	Slama <i>et al.</i> , 2009
Vaca	Mastitis (i.m.)	1027	$1,0 \times 10^4$	-	Jensen <i>et al.</i> , 2013
Vaca	Mastitis (i.m.)	SHY97-3906 (mastitis bovina)	60	3,00	Ster <i>et al.</i> , 2013

<sup>1</sup> i.b.: intrabronquial/ i.d.: intradérmico/ i.m.: intramamario/ i.n.: intranasal/ i.p.: intraperitoneal/ i.t.: intratraqueal/ i.v.: intravenoso/ s.c.: subcutáneo.

\* El estudio presenta más de un modelo de infección experimental, \*\* Cepa de laboratorio.

**Tabla 1.2.** Aislados clínicos de *S. aureus* de origen humano más comúnmente utilizados en los estudios experimentales in vivo.

Nombre de la cepa	MRSA/MSSA <sup>1</sup>	PFGE <sup>2</sup>	ST <sup>3</sup>	Referencia bibliográfica
BD02-25	HA-MRSA	USA500	8	Li <i>et al.</i> , 2010
BK648	MRSA	USA1000	59	Voyich <i>et al.</i> , 2006
BK2370	MRSA	USA500	8	Voyich <i>et al.</i> , 2006
BK2394	MRSA	USA1000	59	Voyich <i>et al.</i> , 2006
BK6789	MRSA	USA400	1	Voyich <i>et al.</i> , 2006
BK9918	MRSA	USA400	≈1	Voyich <i>et al.</i> , 2006
BK11540	MRSA	USA300	8	Voyich <i>et al.</i> , 2006
c99-529	CA-MRSA	USA400	1	Strandberg <i>et al.</i> , 2010 Spaulding <i>et al.</i> , 2012a
CDC587	MSSA	USA200		Spaulding <i>et al.</i> , 2012a
CN1	CA-MRSA		72	Li <i>et al.</i> , 2010
COL	HA-MRSA			Voyich <i>et al.</i> , 2005 McLoughlin <i>et al.</i> , 2006 Lijek <i>et al.</i> , 2012 Spaulding <i>et al.</i> , 2012a Xu <i>et al.</i> , 2015
FRI1169	MSSA			Spaulding <i>et al.</i> , 2012a
FPR3757		USA300		Parker y Prince <i>et al.</i> , 2012 Prabhakara <i>et al.</i> , 2013 Soong <i>et al.</i> , 2015
LAC*	CA-MRSA	USA300	8	Voyich <i>et al.</i> , 2005 y 2006 Wang <i>et al.</i> , 2007 Bubeck Wardenburg <i>et al.</i> , 2008 Montgomery <i>et al.</i> , 2008 Crémieux <i>et al.</i> , 2009 Cheng <i>et al.</i> , 2010 Kennedy <i>et al.</i> , 2010 DuMont <i>et al.</i> , 2011 Lipinska <i>et al.</i> , 2011 Kobayashi <i>et al.</i> , 2011 McAdow <i>et al.</i> , 2011

<sup>1</sup> MRSA: *S. aureus* resistente a la meticilina; asociado a la comunidad (CA-MRSA) o a los hospitales (HA-MRSA)/ MSSA: *S. aureus* sensible a la meticilina.

<sup>2</sup> Electroforesis en gel de campo pulsado; <sup>3</sup> Secuencia tipo.

\* Continúa en la página siguiente.

**Tabla 1.2.** Aislados clínicos de *S. aureus* de origen humano más comúnmente utilizados en los estudios experimentales *in vivo*.

Nombre de la cepa	MRSA/MSSA <sup>1</sup>	PFGE <sup>2</sup>	ST <sup>3</sup>	Referencia bibliográfica
LAC**	CA-MRSA	USA300	8	Wilson <i>et al.</i> , 2011 Adhikari <i>et al.</i> , 2012 Lijek <i>et al.</i> , 2012 Malachowa <i>et al.</i> , 2012 Parker y Prince <i>et al.</i> , 2012 Rauch <i>et al.</i> , 2012 Spaulding <i>et al.</i> , 2012a Cassat <i>et al.</i> , 2013 Chatterjee <i>et al.</i> , 2013 Becker <i>et al.</i> , 2014 Berube <i>et al.</i> , 2014 Crémieux <i>et al.</i> , 2014 Sampedro <i>et al.</i> , 2014 Chan <i>et al.</i> , 2015 Malachowa <i>et al.</i> , 2015 Maurer <i>et al.</i> , 2015 Scherr <i>et al.</i> , 2015 Syed <i>et al.</i> , 2015 Adhikari <i>et al.</i> , 2016 Davido <i>et al.</i> , 2016 Loughran <i>et al.</i> , 2016 Chan <i>et al.</i> , 2017 Prince <i>et al.</i> , 2017 Dillen <i>et al.</i> , 2018
Levy	MSSA	USA300		Spaulding <i>et al.</i> , 2012a
MN8	MSSA	USA200		Spaulding <i>et al.</i> , 2012a
MN128	CA-MRSA	USA200		Strandberg <i>et al.</i> , 2010
MN1021	CA-MRSA	USA200		Strandberg <i>et al.</i> , 2010
MnCop	MSSA	USA400	1	Voyich <i>et al.</i> , 2005 y 2006
MNPA	CA-MRSA	USA200		Strandberg <i>et al.</i> , 2010
MNPE	MSSA	USA200		Spaulding <i>et al.</i> , 2012a y b
MNWH	MSSA	USA200		Spaulding <i>et al.</i> , 2012a

<sup>1</sup> MRSA: *S. aureus* resistente a la meticilina; asociado a la comunidad (CA-MRSA) o a los hospitales (HA-MRSA)/ MSSA: *S. aureus* sensible a la meticilina.

<sup>2</sup> Electroforesis en gel de campo pulsado; <sup>3</sup> Secuencia tipo.

\*\* También en la página anterior.

**Tabla 1.2.** Aislados clínicos de *S. aureus* de origen humano más comúnmente utilizados en los estudios experimentales in vivo.

Nombre de la cepa	MRSA/MSSA <sup>1</sup>	PFGE <sup>2</sup>	ST <sup>3</sup>	Referencia bibliográfica
MW2	CA-MRSA	USA400	1	Voyich <i>et al.</i> , 2005 y 2006 Wang <i>et al.</i> , 2007 Montgomery <i>et al.</i> , 2008 Li <i>et al.</i> , 2010 Strandberg <i>et al.</i> , 2010 McAdow <i>et al.</i> , 2011 Lijek <i>et al.</i> , 2012 Spaulding <i>et al.</i> , 2012a Rauch <i>et al.</i> , 2012 Chatterjee <i>et al.</i> , 2013 Walker <i>et al.</i> , 2013 Cheung <i>et al.</i> , 2014a
Newman	MSSA			Collins <i>et al.</i> , 2002 Bubeck Wardenburg <i>et al.</i> , 2008 Cheng <i>et al.</i> , 2009 Tseng <i>et al.</i> , 2009 Cheng <i>et al.</i> , 2010 Kennedy <i>et al.</i> , 2010 McAdow <i>et al.</i> , 2011 Schmaler <i>et al.</i> , 2011 Vanassche <i>et al.</i> , 2011 Adhikari <i>et al.</i> , 2012 Jongorius <i>et al.</i> , 2012 Lijek <i>et al.</i> , 2012 Mulcahy <i>et al.</i> , 2012 Rauch <i>et al.</i> , 2012 Spaulding <i>et al.</i> , 2012a Feuerstein <i>et al.</i> , 2015 Xu <i>et al.</i> , 2015 Malachowa <i>et al.</i> , 2016
SF1208	HA-MRSA	USA200	36	Li <i>et al.</i> , 2010
SF1497	CA-MRSA	USA1100	30	Li <i>et al.</i> , 2010
SF1681	CA-MRSA	USA1100	59	Li <i>et al.</i> , 2010

<sup>1</sup> MRSA: *S. aureus* resistente a la meticilina; asociado a la comunidad (CA-MRSA) o a los hospitales (HA-MRSA)/ MSSA: *S. aureus* sensible a la meticilina.

<sup>2</sup> Electroforesis en gel de campo pulsado; <sup>3</sup> Secuencia tipo.



**Tabla 1.2.** Aislados clínicos de *S. aureus* de origen humano más comúnmente utilizados en los estudios experimentales *in vivo*.

Nombre de la cepa	MRSA/MSSA <sup>1</sup>	PFGE <sup>2</sup>	ST <sup>3</sup>	Referencia bibliográfica
SF2561	HA-MRSA	USA100	5	Li <i>et al.</i> , 2010
SF8300	CA-MRSA	USA300	8	Diep <i>et al.</i> , 2010 Li <i>et al.</i> , 2010 Tkaczyck <i>et al.</i> , 2013 Montgomery <i>et al.</i> , 2014 Le <i>et al.</i> , 2016

<sup>1</sup> MRSA: *S. aureus* resistente a la meticilina; asociado a la comunidad (CA-MRSA) o a los hospitales (HA-MRSA)/ MSSA: *S. aureus* sensible a la meticilina.

<sup>2</sup> Electroforesis en gel de campo pulsado; <sup>3</sup> Secuencia tipo.

#### 1.1.4.2. El conejo como modelo de infección experimental

Los modelos experimentales en conejos se iniciaron en los años 50 del siglo pasado (Rogers *et al.*, 1956 y 1957). En la década de los años 70, varios estudios *ex vivo* determinaron la existencia de similitudes entre la sensibilidad de células humanas y de conejo frente a determinadas toxinas estafilocócicas (Cassidy y Harshman, 1973; Wiseman, 1975). Más tarde, en 1991 Hildebrand *et al.* describieron que los eritrocitos de conejo son más sensibles incluso que los humanos al efecto de la toxina Hla, y más recientemente se ha demostrado que la sangre de humanos y conejos incubada con *S. aureus* presenta un perfil semejante de transcripción genética de citoquinas proinflamatorias (Malachowa *et al.*, 2015). Por otra parte, aunque los conejos son resistentes a altas concentraciones de PTSAGs por vía *i.v.*, desarrollan efectos letales similares a las TSS humanas mediante infusión continua de bajas dosis (Dinges *et al.*, 2000). Además, pueden reproducir infecciones en piel similares a las que *S. aureus* desarrolla en la población humana, hecho que también puede estar relacionado con el grosor de la piel del conejo (1,7 mm), que es similar al de los humanos (1,5 mm) (Le *et al.*, 2016).

Sin embargo, teniendo en cuenta que el conejo manifiesta susceptibilidades frente a las toxinas y superantígenos estafilocócicos similares a los humanos, en comparación a

otras especies animales (ratones, ratas y primates no humanos) como hemos visto en los apartados anteriores, los ratones han sido el modelo de elección para el estudio de su patogenicidad.

### 1.2. Sistema inmunitario

El sistema inmunitario debe garantizar la defensa efectiva contra los patógenos y minimizar los perjuicios mediados por la respuesta inflamatoria (Josefowicz *et al.*, 2012). Todas las células del sistema inmunitario derivan de células madre pluripotentes de la médula ósea, en concreto, las líneas mieloide y linfoide dan lugar a los leucocitos y linfocitos sanguíneos, respectivamente (Drouet-Viard y Fortun-Lamonthe, 2002). Dado el potencial de crecimiento logarítmico de los microorganismos durante las fases tempranas de la infección, la destrucción efectiva de estos agentes depende de la adecuada coordinación de una compleja serie de procesos celulares y moleculares en el hospedador, dando comienzo con la sensibilización de las células de la inmunidad innata (Rigby y DeLeo, 2012).

La respuesta inmunitaria incluye los sistemas innato y adaptativo, y aunque los mecanismos innatos se consideraron parte de una respuesta inflamatoria no específica (incluyendo la fagocitosis por neutrófilos y macrófagos, y la activación del complemento) presenta una especificidad considerable. Esto es debido a que está directamente dirigida hacia componentes moleculares presentes en la superficie de los microorganismos (PAMPs) (Krishna y Miller, 2012b). Además, la ausencia de vacunas que potencien la respuesta humoral frente a esta bacteria sugiere que los anticuerpos no son suficientes para su profilaxis, por lo que la inmunidad adaptativa por sí sola no basta para una óptima defensa frente a las infecciones por *S. aureus* (Chan *et al.*, 2017), lo que resalta, por lo tanto, la importancia de la respuesta innata. Por otra parte, también se ha visto que la respuesta inflamatoria observada en las infecciones localizadas, sobre todo en las de piel, a menudo contribuye más a la gravedad clínica que la propia carga bacteriana (Montgomery *et al.*, 2014). No obstante, no hay que perder de vista que las elevadas dosis infectivas que se establecen en algunos modelos dan lugar a una activación instantánea del sistema inmunitario innato al entrar en contacto con los agentes

patógenos, que antecede incluso a la síntesis de proteínas de evasión inmunitaria (Jongerijs *et al.*, 2012).

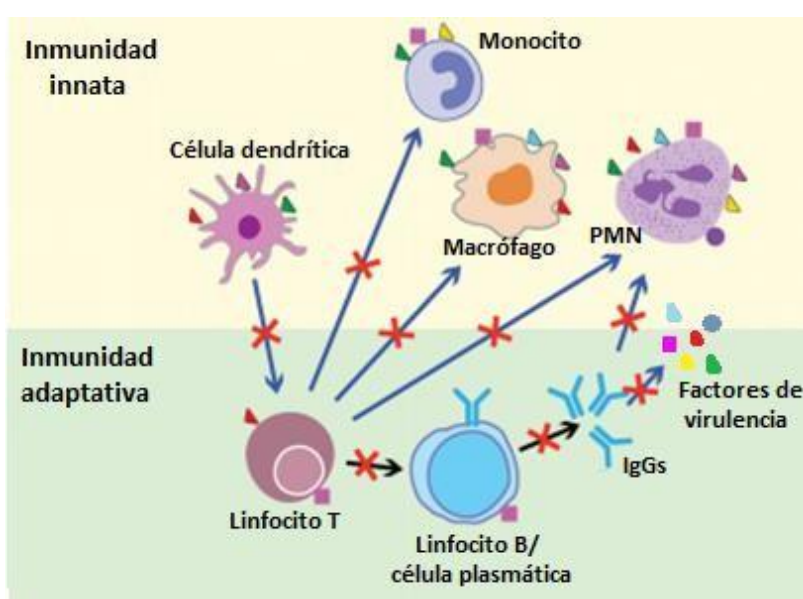
### **1.2.1. Respuesta inmunitaria innata**

El sistema inmunitario innato incluye diferentes tipos de células, como monocitos sanguíneos y macrófagos tisulares, células polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), células dendríticas y células NK, y aunque todas ellas se consideran la primera línea de defensa del hospedador, los neutrófilos juegan el papel central de la interacción bacteria-hospedador (Kin y Sanders, 2006). Igualmente, las proteínas que forman parte de la cascada del complemento son una parte fundamental de esta respuesta innata ya que promueven la actividad fagocítica de neutrófilos y macrófagos por medio de su fijación a las bacterias (Pietrocola *et al.*, 2017). Además, en las infecciones cutáneas los queratinocitos también participan como primera defensa frente a los patógenos (Krishna y Miller, 2012a y b; Brandt *et al.*, 2018).

La respuesta inmunitaria innata se caracteriza por una reacción inflamatoria de carácter agudo en la que las células efectoras (fagocitos) se distribuyen por el organismo hasta alcanzar y acumularse en el sitio de agresión (Drouet-Viard y Fortun-Lamonthe, 2002). La fagocitosis es un paso crítico en la eliminación de bacterias, y las células fagocíticas (neutrófilos, monocitos/macrófagos y células dendríticas) reconocen moléculas ligadas a la superficie de las bacterias (PAMPs) por medio de la interacción con sus receptores PRRs, entre los que se incluyen los TLRs. Estos TLRs activan vías de transducción de señales (como el NF- $\kappa$ B) que inducen la expresión de mediadores proinflamatorios (citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión y péptidos antimicrobianos), induciendo así la fagocitosis y prolongando la supervivencia celular. Aunque los PRRs son importantes para la detección de los patógenos, la eficiencia de la fagocitosis también depende de la opsonización de la bacteria con proteínas séricas del hospedador (DeLeo *et al.*, 2009; Krishna y Miller, 2012a y b; Ryu *et al.*, 2014), siendo la molécula del complemento C3 la más representativa en la inmunidad innata frente a *S. aureus* (Pietrocola *et al.*, 2017). Por su parte, las células dendríticas no actúan como células fagocíticas por definición, sino que su función es ingerir bacterias y luego migrar hacia

los nódulos cercanos donde presentan el material antigénico procesado a células especializadas del sistema inmunitario adaptativo (Brandt *et al.*, 2018).

Como se ha visto con anterioridad, *S. aureus* puede infectar a un amplio espectro de diferentes tipos celulares en el hospedador y es el agente etiológico de un gran rango de patologías, donde los mecanismos de defensa innatos son la primera interfase entre el hospedador y la bacteria, pero también es fundamental la inmunidad adaptativa (**Figura 1.3**).



**Figura 1.3.** Interacción entre los factores de virulencia de *S. aureus* y la respuesta inmunitaria. Las citotoxinas de *S. aureus* pueden lisar las células fagocíticas (PMNs y monocitos-macrófagos) que intervienen en la respuesta inmunitaria innata, interferir en la inducción y síntesis de anticuerpos específicos (cruces rojas sobre flechas negras), y también pueden afectar a la interacción entre los sistemas innato y adaptativo (cruces rojas sobre flechas azules). (Figura adaptada a partir de Pozzi *et al.*, 2015).

A continuación, de entre los citados componentes celulares que comprenden la respuesta innata, se van a comentar los que se han descrito como más representativos frente a las infecciones por *S. aureus*: los neutrófilos y los monocitos/macrófagos.

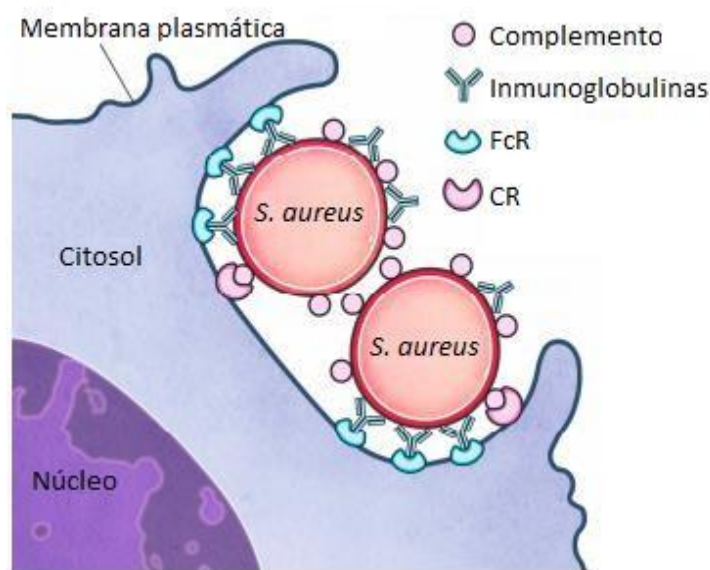
### 1.2.1.1. Polimorfonucleares neutrófilos

El primer paso para la erradicación de microorganismos invasores del organismo es el reclutamiento activo de neutrófilos (PMNs) al sitio de infección. En un proceso con múltiples pasos, los PMNs son movilizados desde la sangre periférica o médula ósea en respuesta a factores quimiotácticos producidos tanto por el hospedador como por el patógeno (DeLeo *et al.*, 2009; Pietrocola *et al.*, 2017). Estas células representan la población de leucocitos polimorfonucleares más abundante en sangre (los PMNs intravasculares representan la mitad de los granulocitos) y son cruciales para la defensa frente a *S. aureus*. Eliminan a las bacterias vía fagocitosis, generando ROS y NOS (mediante el sistema NADPH oxidasa), y liberando enzimas (azurocidina, BPI, catepsina, lactoferrina, lisozima, proteinasa 3 y elastasa) y péptidos antibacterianos (AMPs) contenidos en gránulos citoplasmáticos (Krishna y Miller, 2012b; Rigby y DeLeo, 2012; McGuinness *et al.*, 2016; Thomer *et al.*, 2016; Brandt *et al.*, 2018).

La liberación de moléculas reactivas desencadena una actividad tanto microbicida como inmunomoduladora, y a elevadas concentraciones pueden desencadenar efectos antiinflamatorios y predisponer a la infección mediante la inhibición de la proliferación e inducción de la muerte de células del hospedador (Brandt *et al.*, 2018). Individuos con defectos genéticos o adquiridos que dan lugar a una reducción del número de neutrófilos (e.g., neutropenia congénita severa, neutropenia inducida por quimioterapia) o que alteran su función, como la capacidad de producir superóxido (e.g., enfermedad granulomatosa crónica) tienen mayor riesgo de contraer graves infecciones por *S. aureus* (Krishna y Miller, 2012b; Kobayashi *et al.*, 2015b).

Por otra parte, los PMNs también pueden liberar NETs (trampas extracelulares de los neutrófilos), que están compuestos por DNA, histonas, péptidos antimicrobianos y proteasas que envuelven a las bacterias para su destrucción minimizando el daño tisular (Brinkmann *et al.*, 2004; Fuchs *et al.*, 2007). No obstante, *S. aureus* es capaz de destruir los NETs, y el producto de degradación de éstos (2'-deoxiadenosina) induce la apoptosis de macrófagos, lo cual puede contribuir a su supervivencia dentro de los abscesos (Brandt *et al.*, 2018).

La fagocitosis se ve facilitada cuando las bacterias son opsonizadas por componentes del sistema de complemento y/o inmunoglobulinas (Berends *et al.*, 2014). Los PMNs presentan dos tipos de receptores para mediar la fagocitosis: los receptores para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas (FcRs) y los receptores del complemento (CRs) (**Figura 1.4**). La producción de especies reactivas por los PMNs activados por la combinación de ambos tipos de receptores es más duradera y de mayor magnitud, sugiriendo así cooperativismo de receptores (Wright y Silverstein, 1983). Esto, además, apunta a que la activación por FcRs o CRs procede de dos vías diferentes de transducción de señal intracelular distinta. Además, la fagocitosis mediada por ambos tipos de receptores desencadena la apoptosis de manera más rápida (Kobayashi *et al.*, 2002).

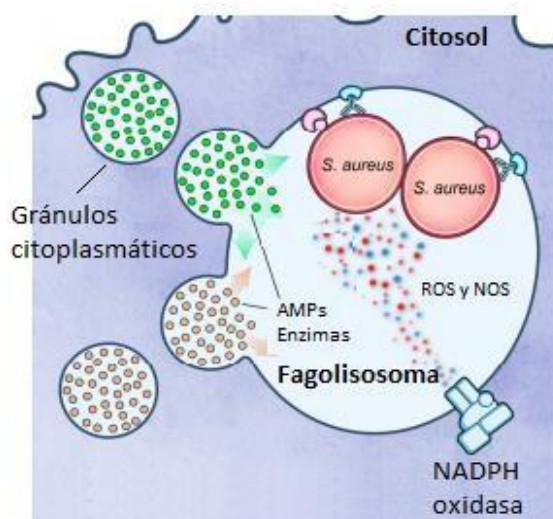


**Figura 1.4.** Fagocitosis de *S. aureus* por los neutrófilos. El proceso de fagocitosis es mediado por la unión específica de la bacteria opsonizada con su correspondiente receptor en la membrana plasmática del fagocito (Complemento-CR e Ig-FcR) (Figura adaptada a partir de McGuinness *et al.*, 2016).

La inducción de la apoptosis en PMNs activados y la posterior eliminación de los mismos del lugar de infección/inflamación por parte de los macrófagos son importantes porque previenen el daño de tejidos sanos y contribuyen a la resolución de la infección. La

eliminación de células apoptóticas por los macrófagos se denomina eferocitosis (Kobayashi *et al.*, 2002 y 2015b). Sin embargo, algunas cepas patógenas (como las CA-MRSA) alteran la progresión normal de la apoptosis, produciendo la lisis de los PMNs por necrosis programada, sobreviviendo y diseminándose a otras partes del organismo. Además, parece ser que la carga bacteriana juega un papel esencial en la dirección de los PMNs hacia la necrosis programada (DeLeo *et al.*, 2009; Kobayashi *et al.*, 2015b).

Por otra parte, Gresham *et al.* (2000) demostraron que los PMNs no sólo son importantes para la eliminación de bacterias, sino que también pueden facilitar la patogénesis de las infecciones por *S. aureus*, puesto que la bacteria es capaz de sobrevivir en el interior de estas células fagocíticas. Los PMNs presentan dos localizaciones intracelulares para el agente patógeno, una que contribuye a su destrucción (fagolisosoma) y otra que permite su supervivencia (macropinosoma). Los macropinosomas son fagosomas de gran tamaño cuya membrana no es competente para fusionarse con los gránulos citoplasmáticos (Bayles *et al.*, 1998) (**Figura 1.5**). Del mismo modo, se ha descrito que *S. aureus* también puede sobrevivir en monocitos y macrófagos (Kubica *et al.*, 2008), así como en fagocitos no profesionales, como células epiteliales y endoteliales, y osteoblastos (Bayles *et al.*, 1998; Gresham *et al.*, 2000).



**Figura 1.5.** Función microbicida de los neutrófilos. *S. aureus* es expuesto a mecanismos oxidativos (especies reactivas vía NADPH oxidasa) y factores oxígeno-independientes (gránulos citoplasmáticos) en el interior de fagosomas competentes (fagolisosomas). (Figura adaptada a partir de McGuinness *et al.*, 2016).

### 1.2.1.2. Células mononucleares: monocitos-macrófagos

En respuesta a la inflamación e infección, los monocitos sanguíneos derivados de la médula ósea acuden a los tejidos atraídos por señales quimiotácticas, e *in situ* se diferencian en macrófagos (Gordon *et al.*, 2014).

Los macrófagos son notablemente versátiles en su capacidad de reconocer y responder a una amplia gama de estímulos, a través de una gran variedad de receptores de superficie (TLRs) e intracelulares (NODs) (Gordon *et al.*, 2014). Junto con los macrófagos perivasculares, los macrófagos tisulares regulan el reclutamiento de PMNs y monocitos al sitio de infección, y participan en la eliminación de células muertas. También producen ROS y RNS, péptidos antimicrobianos, y proteínas quelantes que privan a las bacterias de los nutrientes esenciales para su metabolismo (Brandt *et al.*, 2018). Mayoritariamente, los macrófagos perivasculares son críticos para la migración de los PMNs a la piel infectada por *S. aureus*; los PMNs se extravasan desde las vénulas de la dermis inflamada en proximidad a macrófagos perivasculares, que son la mayor fuente de elementos quimiotácticos para estas células. Sin ir más lejos, *S. aureus* utiliza la muerte de los macrófagos perivasculares mediada por la Hla para disminuir la afluencia de neutrófilos al lugar de la infección (Abtin *et al.*, 2014).

### **1.2.2. Respuesta inmunitaria adaptativa**

El sistema inmunitario adaptativo está constituido por diferentes poblaciones de linfocitos que actúan de manera antígeno-específica, permitiendo así el desarrollo de una respuesta más rápida y contundente en posteriores exposiciones al mismo antígeno: memoria inmunológica (Kin y Sanders, 2006).

Una infección bacteriana severa normalmente induce en el hospedador una respuesta inmunitaria adaptativa en 7-10 días para limitar el desarrollo de la infección y prevenir futuras reinfecciones. Sin embargo, una de las características de *S. aureus* es su habilidad para infectar al hospedador humano repetidamente a lo largo de su vida, y aunque no está claro el mecanismo por el cual elude el desarrollo de memoria a largo plazo, una de las hipótesis es que altera la función de una subpoblación linfocitaria (linfocitos T) (Liu, 2009).



### 1.2.2.1. Linfocitos

A continuación se va a definir de manera breve y resumida las poblaciones de linfocitos cuya función se ha descrito tanto frente a las infecciones bacterianas en general, como ante la patogenia de *S. aureus* en particular.

#### 1.2.2.1.1. Linfocitos B

Los linfocitos B se someten a varias etapas de desarrollo desde su origen en las células madre hematopoyéticas, incluyendo los estadios celulares de progenitor linfoide primario o temprano (ELP), progenitor linfoide común (CLP), células pro-B y células pre-B, que acontecen en la médula ósea, y finalmente las células B transitorias. Éstas últimas cuando son activadas pueden dar lugar a linfocitos B maduros, células plasmáticas o células B de memoria en los órganos linfoides periféricos. Asimismo, los linfocitos B maduros también pueden diferenciarse en ambos tipos celulares (células plasmáticas y linfocitos B de memoria). Por otra parte, los linfocitos B activados pueden comportarse como células productoras de anticuerpos cuando se unen a un antígeno, pero también pueden participar como células presentadoras de antígenos (APCs). Además, también intervienen en la defensa inmunológica mediante la secreción de citoquinas (Drouet-Viard y Fortun-Lamonthe, 2002; Hua y Hou, 2013).

#### 1.2.2.1.2. Linfocitos T

La población de linfocitos T se divide en dos linajes celulares caracterizados por distintas funciones y especificidades antigénicas. Por una parte, los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, que se activan al reconocer péptidos antigénicos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II, y manifiestan funciones predominantemente cooperadoras (de ahí que se les llame linfocitos T colaboradores). Por ejemplo, las células T CD4<sup>+</sup> desempeñan un papel central en la defensa frente a una amplia variedad de microorganismos patógenos, ayudando a las células B a producir anticuerpos y regulando a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y macrófagos (Cosmi *et al.*, 2014). En lo que respecta a las células T CD8<sup>+</sup>, éstas están restringidas al reconocimiento mediante moléculas MHC clase I, y desempeñan funciones citotóxicas (Xiong y Bosselut, 2012).

Por otra parte, retomando el papel de las células T CD4<sup>+</sup>, éstas también se pueden subdividir en varias poblaciones atendiendo a sus funciones inmunológicas. Estos linajes incluyen células efectoras, como se ha comentado, y células reguladoras, las cuales protegen frente a las respuestas efectoras de defensa del hospedador (Cosmi *et al.*, 2014). Durante la respuesta inmunitaria debe alcanzarse un equilibrio que maximice el reconocimiento y la eliminación de los agentes patógenos, y que asimismo minimice la patología y autoinmunidad inmunomediadas. Una de las células que regulan este equilibrio son las células T reguladoras (Treg), entre ellas las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (las llamadas células Treg naturales), pero también las células CD8<sup>+</sup> y las NK, entre otras (Keynan *et al.*, 2007). La actuación de las células Treg puede generar cierta inmunosupresión que cronifique la infección, y en estos casos se ha visto que no intervienen tanto las células Treg, sino más bien las células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs) (Tebartz *et al.*, 2015).

### 1.2.3. Citoquinas

Las citoquinas son proteínas de pequeño tamaño sintetizadas por varios tipos celulares en respuesta a estímulos de activación, y que inducen diferentes efectos por medio de su unión a receptores específicos (Pietrocola *et al.*, 2017). Se han definido principalmente cuatro familias de citoquinas, a saber, las interleucinas (ILs), los factores de necrosis tumoral (TNFs), los interferones (IFNs) y los factores estimulantes de colonias (CSFs), cuya principal fuente celular son los linfocitos T (Drouet-Viard y Fortun-Lamonthe, 2002). Mucho se ha descrito acerca del papel de las citoquinas en la respuesta inmunitaria del hospedador, pues según autores estas moléculas reguladoras pueden desempeñar un efecto beneficioso o perjudicial en las infecciones por *S. aureus* dependiendo del estado de la enfermedad, de las condiciones inmunológicas y características de la respuesta del hospedador, y de la genética del huésped y el patógeno (Sasaki *et al.*, 2006).

Un ejemplo de esta controversia lo refleja el interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), el cual se ha descrito que sí participa en la regulación de la inmunidad celular y sobre la producción de inmunoglobulinas (IgG2a e IgM) frente a *S. aureus*, pero no interviene en la producción de Igs en las reinfecciones (Sasaki *et al.*, 2006). Nakane *et al.* (1995) también apuntaron

que el IFN- $\gamma$  sólo ejerce un efecto protector durante el estadio temprano de la infección y también añadieron que el factor de necrosis tumoral (TNF) participa en la resistencia frente a la septicemia por *S. aureus*.

Por otra parte, otras citoquinas que mejoran la defensa inmunitaria frente a las infecciones por *S. aureus* son la interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y la IL-6, porque favorecen la supervivencia de los PMNs y facilitan su acumulación durante las fases iniciales de la inflamación (DeLeo, 2004), y junto a la IL-1 $\beta$ , la IL-8 (Greenlee-Wacker *et al.*, 2014) y la IL-17 (Thammavongsa *et al.*, 2015), intervienen también en la quimiotaxis de PMNs.

Asimismo, las citoquinas que secretan las células inmunitarias activadas no sólo influyen de manera directa sobre otras células inmunitarias, sino que también actúan sobre la actividad del sistema nervioso central, y éste a su vez regula la magnitud de la respuesta inmunitaria a través del sistema nervioso periférico mediante la liberación de epinefrina, que actúa sobre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y las células B (Kin y Sanders, 2006).

### **1.3. La piel**

La piel es una importante barrera que no sólo protege al cuerpo de la flora microbiana del medio ambiente, sino también frente a otros agentes externos como alérgenos, radiación ultravioleta y otros agentes físicos y químicos (Pietrocola *et al.*, 2017). Por otra parte, presenta características únicas que no manifiestan otros sistemas de barreras también expuestos al entorno exterior (mucosa intestinal o respiratoria). Además de otorgar protección físico-química, interviene de manera directa en funciones vitales como la respuesta inmunitaria y la producción de hormonas y vitaminas. En la piel hay numerosas células inflamatorias que pueden participar de la respuesta inmunitaria cutánea: células dendríticas (células de Langerhans), macrófagos, mastocitos, linfocitos B y T, células plasmáticas y células NK. Todas estas células, incluyendo los queratinocitos, están implicadas en el control de las infecciones en piel por *S. aureus*, cuya incidencia es un reflejo de la competición que se establece entre la inmunidad cutánea del hospedador y los factores de virulencia de este patógeno (Krishna y Miller, 2012a y b; Ryu *et al.*, 2014; Brandt *et al.*, 2018).

### **1.3.1. Estructura histológica de la piel**

En la piel se distinguen tres partes: epidermis, dermis e hipodermis. La epidermis es la parte externa y está formada por queratinocitos en diferentes estados de maduración, células de Langerhans y células T. La capa más externa de la epidermis, la capa córnea, se considera la principal barrera física de la piel, pero puede ser interrumpida por heridas, permitiendo así la invasión del tejido subyacente por parte de microorganismos comensales y patógenos. El estrato córneo de la piel, que es una capa exclusiva de este órgano, se compone de queratinocitos diferenciados (desprovistos de orgánulos) y contiene fibrillas de queratina. Debajo de la capa córnea se encuentran las capas lúcida, granular, espinosa y basal, siguiendo este mismo orden. Además, la epidermis continuamente se está reformando con queratinocitos que migran desde la capa basal a la capa córnea (**Figura 1.6**) (Krishna y Miller, 2012a y b; Yousef y Sharma, 2017). El estrato lúcido sólo está presente en zonas de piel gruesa (Yousef y Sharma, 2017).

En cuanto a la dermis, contiene elementos que proporcionan soporte estructural a las células inmunitarias residentes, así como a los anejos cutáneos (glándulas sebáceas y sudoríparas, y folículos pilosos) y vasos sanguíneos. Este armazón de sostén está constituido por fibras de colágeno y elastina (Krishna y Miller, 2012a y b; Brandt *et al.*, 2018; Pfalzgraff *et al.*, 2018).

La hipodermis o fascia subcutánea es la capa más profunda de la piel. Principalmente contiene adipocitos, fibroblastos y macrófagos, junto con algunos folículos pilosos, neuronas sensoriales y vasos sanguíneos (Wong *et al.*, 2016; Yousef y Sharma, 2017).

Las propiedades de la piel como barrera física y bioquímica se deben a la asociación de los queratinocitos con los productos del sudor, componentes lipídicos y péptidos antimicrobianos. Asimismo, la piel también representa una barrera efectiva para la terapia tópica, debido especialmente a la gran organización de los lípidos del estrato córneo (Pfalzgraff *et al.*, 2018).

### 1.3.2. Mecanismos de defensa cutáneos

Los mecanismos de defensa cutáneos del huésped que previenen la colonización microbiana incluyen la barrera epidérmica, como se ha comentado anteriormente, así como los microorganismos comensales y los péptidos antimicrobianos presentes de manera natural, y las células inmunitarias residentes. En primer lugar, la superficie de la piel tiene propiedades constitutivas tales como condiciones de baja temperatura y pH ácido que interfieren en el crecimiento bacteriano. El pH bajo de la piel se debe a la presencia de los subproductos de degradación de la filagrina (ácido urocánico y ácido pirrolidona carboxílico) que se forman durante la diferenciación epidérmica, y estos metabolitos condicionan también la expresión de factores de virulencia implicados en la colonización de *S. aureus*, como el ClfB y el FnBPA (Krishna y Miller, 2012a y b; Ryu *et al.*, 2014).

En segundo lugar, la presencia de organismos comensales en la superficie de la piel también puede prevenir de manera directa la colonización e invasión por otros microorganismos. Por ejemplo, *S. epidermidis* segrega una proteína (llamada Esp) que inhibe la colonización por *S. aureus* mediante la destrucción del biofilm, y también produce otras proteínas con actividad antimicrobiana directa contra esta misma bacteria (PSM $\gamma$  y PSM $\delta$ ). Además, *S. epidermidis* activa TLR2 en los queratinocitos e induce la producción de AMPs (Krishna y Miller, 2012a; Ryu *et al.*, 2014).

Por último, los péptidos antimicrobianos son polipéptidos constituidos por menos de 50 aminoácidos que pueden actuar como bactericidas o bacteriostáticos, neutralizantes de toxinas y moduladores de la respuesta inmunitaria. La mayoría son de naturaleza catiónica (CAMPs) e interaccionan con la membrana aniónica de los microorganismos. Estos péptidos pueden ser producidos por los queratinocitos de la epidermis y otras células epiteliales (células de Langerhans y macrófagos activados), así como PMNs y glándulas sudoríparas. En humanos se han descrito varios grupos de CAMPs (**Tabla 1.3**), y mientras que algunos son sintetizados por los queratinocitos de manera fisiológica, otros son producidos durante procesos infecciosos e inflamatorios. De este modo, la regulación del sistema inmunitario por los péptidos antimicrobianos está principalmente determinada por el tipo de célula, la presencia de otro estímulo proinflamatorio y la

cinética de la propia respuesta inmunitaria (Komatsuzawa *et al.*, 2006; Krishna y Miller, 2012a y b; Ryu *et al.*, 2014; Pfalzgraff *et al.*, 2018).

Una evidencia de la importancia que tienen los péptidos antimicrobianos en la defensa frente a *S. aureus* son los mecanismos de inhibición que se han detectado hacia estas moléculas. Por otra parte se ha visto que pueden reducir también la susceptibilidad frente a los antibióticos. De hecho, la proporción de cepas que manifiestan baja sensibilidad frente a los péptidos antimicrobianos es mayor entre cepas MRSA que en MSSA (Komatsuzawa *et al.*, 2006; Krishna y Miller, 2012a y b; Ryu *et al.*, 2014; Pfalzgraff *et al.*, 2018).

**Tabla 1.3.** Péptidos antimicrobianos catiónicos que participan en la inmunidad cutánea frente a *S. aureus*.

Familia	Péptidos	Origen celular <sup>1</sup>	Función
Catelicidinas	LL-37 KS-30 RK-31	Queratinocitos, macrófagos y PMNs	Quimiotaxis de PMNs, monocitos y linfocitos T
Defensinas			
$\alpha$ -defensinas/HNPs	HNP1 HNP2* HNP3 HNP4	PMNs, macrófagos y células de Langerhans	Quimiotaxis de monocitos, linfocitos T y mastocitos [El 50% de los gránulos de los PMNs contienen $\alpha$ -defensinas (Ryu <i>et al.</i> , 2014)]
$\beta$ -defensinas/hBDs	hBD1 hBD2 hBD3* hBD4	Queratinocitos, macrófagos y células de Langerhans	Quimiotaxis de células de Langerhans inmaduras, linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y monocitos/macrófagos
Dermocidina		Glándulas sudoríparas	Antimicrobiana
RNasa7		Queratinocitos	Bactericida. Altos niveles en el estrato córneo pueden prevenir la colonización

<sup>1</sup> Por orden de importancia; \* Péptidos que presentan mayor actividad bactericida.

Por otra parte, la vitamina D también participa en la respuesta inmunitaria de la piel frente a *S. aureus* porque promueve la expresión de LL-37 por los queratinocitos, PMNs y monocitos/macrófagos (Ryu *et al.*, 2014).

En la piel existen un abundante número de células inmunitarias implicadas en el control de las infecciones por *S. aureus*, influenciando de diferentes maneras la respuesta inmunitaria. Durante una infección bacteriana las células presentes en la epidermis y la dermis reconocen al patógeno y desencadenan la respuesta inmunitaria innata. Los queratinocitos son las primeras células en encontrarse con los patógenos, pero no son las únicas capaces de reconocerlos; como se ha comentado, monocitos, macrófagos y PMNs también presentan TLRs. TLR1, TLR2 y TLR6 reconocen componentes de la pared celular de *S. aureus* (ácido lipoteicoico y peptidoglicano) y desencadenan la producción de citoquinas proinflamatorias y péptidos antimicrobianos, el reclutamiento de PMNs de la circulación sanguínea e inducen la fagocitosis (**Figura 1.6**) (Krishna y Miller, 2012a y b; Brandt *et al.*, 2018).

Por último, cabe mencionar que las interacciones que se producen entre *S. aureus* y el hospedador durante la colonización de la piel son clave para el tipo de infección que se va a producir, de acuerdo además con el sitio anatómico de la piel implicado (Krishna y Miller, 2012a y b).

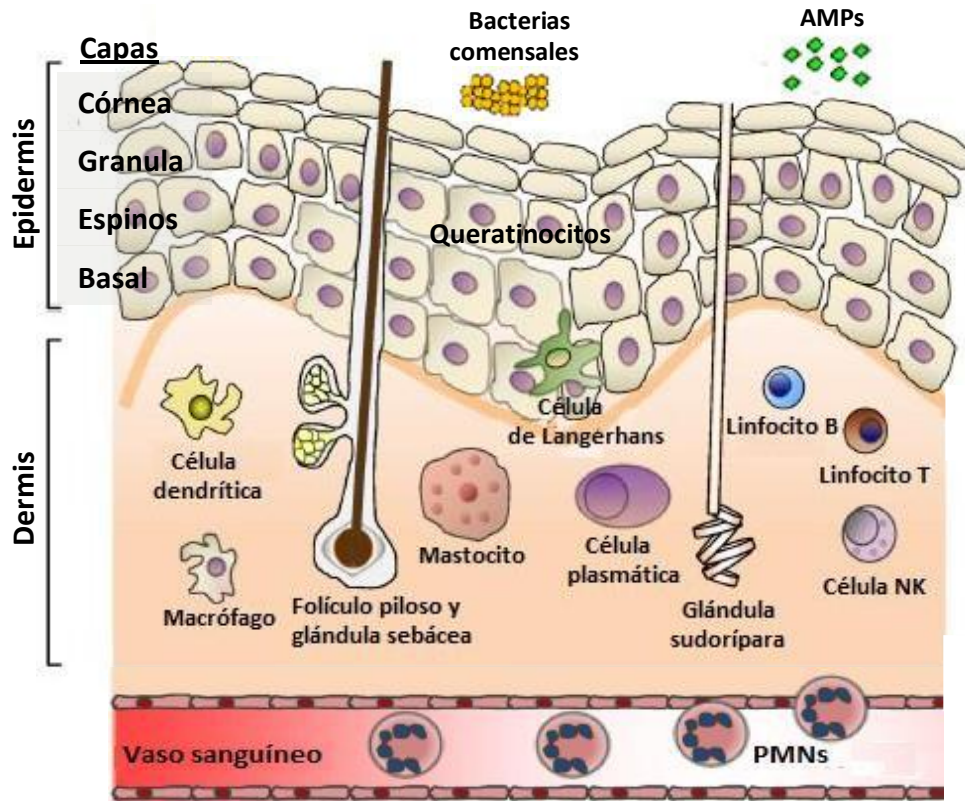


Figura 1.6. Componentes de la piel implicados en la defensa frente a la colonización, invasión e infección por *S. aureus*. (Figura adaptada a partir de Krishna y Miller, 2012a).