



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Caracterización molecular y de sensibilidad *in vitro* a antibióticos y péptidos derivados de catelicidina como agentes antimicrobianos frente a aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* procedentes de la ciudad de Bogotá D.C.

Angie Lorena Fonseca Fernández

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Bogotá D.C., Colombia
2022

Caracterización molecular y de sensibilidad *in vitro* a antibióticos y derivados de catelicidina como agentes antimicrobianos frente a aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* procedentes de la ciudad de Bogotá D.C.

Angie Lorena Fonseca Fernández

Trabajo de grado para optar al título de:
Magister en Ciencias-Microbiología

Director(a):

Adriana Marcela Celis Ramirez M.Sc, Ph.D

Grupo de Investigación Celular y Molecular de Microorganismos Patógenos, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

Codirector(a):

Aura Lucía Leal Castro M.D. M.Sc.

Grupo de investigación en enfermedades infecciosas, Facultad de medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Línea de Investigación:

Biología molecular de agentes infecciosos

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación Celular y Molecular de Microorganismos Patógenos, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias
Bogotá D.C., Colombia

2022

Agradecimientos

Agradezco al grupo para el control de la resistencia bacteriana en Bogotá (GREBO), por proporcionar los aislamientos incluidos en este estudio y la información que permitió la clasificación epidemiológica de los mismos. Al laboratorio de biofísica, del departamento de física de la Universidad de los Andes, en cabeza del doctor Chad Leidy , por proporcionar los péptidos analizados dentro del proyecto y finalmente, a MinCiencias por la financiación de este trabajo. A la doctora Adriana Marcela Celis Ramírez por su guía y acompañamiento en el transcurso de mi vida profesional, por enseñarme a hacer ciencia a pesar de las dificultades; a la doctora Aura Lucia Leal, por sus consejos y el acompañamiento dado a este proyecto. A mi familia por estar conmigo frente a los diferentes retos que supone mi formación profesional, y finalmente al Grupo Celular y Molecular de Microorganismos Patógenos y cada uno de sus miembros, mi segunda casa desde hace ya tres años, gracias por ser una red de apoyo constante.

Resumen

Staphylococcus aureus es una bacteria de gran importancia clínica, caracterizada por ser la especie más virulenta dentro de su género y causante de infecciones muy diversas que pueden amenazar la vida de quienes las padecen. Sin embargo, su importancia no radica únicamente en las enfermedades que causa, sino en la alta capacidad que ha evidenciado para presentar resistencia a múltiples antibióticos dentro de los que se encuentran los β -lactámicos, ejemplificada por la resistencia a meticilina. Los aislamientos resistentes a meticilina son un problema de salud pública mundial, que inicialmente se atribuían a ambientes hospitalarios, pero que con el paso del tiempo han comenzado a reportarse cada vez con más frecuencia en la comunidad. Adicional a esto, se ha observado resistencia a otros antibióticos con blancos terapéuticos diferentes. Lo anterior hace necesario la búsqueda de nuevas alternativas que permitan controlar el crecimiento bacteriano de aislamientos que no pueden tratarse mediante los antimicrobianos existentes actualmente. Este trabajo tiene como objetivo determinar el efecto de péptidos derivados de catelicidina en el crecimiento y la morfología de aislamientos clínicos de *S. aureus* procedentes de la ciudad de Bogotá D.C. Para ello, realizaremos la caracterización molecular respecto al gen de resistencia a meticilina *mecA*, la proteína A (*spa*) y *pvl*, causante de la presencia de leucocidina Panton-Valentine, e identificaremos los perfiles de sensibilidad a compuestos antibióticos de 57 aislamientos clínicos de *S. aureus*. Adicionalmente, evaluaremos la actividad de péptidos de catelicidina, LL-37 y ATRA-1, y daptomicina sobre los aislamientos clínicos caracterizados. Finalmente, identificaremos los cambios en la morfología bacteriana de *S. aureus*, por acción de los péptidos de catelicidina, mediante microscopía electrónica de barrido. Determinamos que existe una importante prevalencia de aislamientos resistentes a meticilina, y que además, existen aislamientos con discordancias en el perfil de sensibilidad a estos antibióticos en *S. aureus*, por otra parte se evidencia una tasa alta de sensibilidad a antibióticos con mecanismos de acciones diferentes a meticilina. Comprobamos que los péptidos LL-37 y ATRA-1 presentan capacidad antimicrobiana frente a este patógeno y que existen diferencias entre la actividad de estos compuestos y el perfil de sensibilidad a meticilina. Finalmente, comprobamos que estos péptidos generan cambios en la morfología superficial como uno de sus mecanismos de acción, sin embargo, no se descarta que presenten efectos intracelulares que potencien su actividad antimicrobiana. Con este trabajo, buscamos contribuir a la vigilancia de la resistencia bacteriana en la ciudad de Bogotá, promover el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas que permitan controlar la resistencia bacteriana en nuestra región, así como aportar en la caracterización de la actividad de péptidos antimicrobianos sintéticos en *S. aureus*.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, Péptidos antimicrobianos, LL-37, ATRA-1, Catelicidina, Resistencia antibiótica, Resistencia a meticilina, Antimicrobial peptides, Cathelicidin, Antibiotic resistance, Methicillin resistance.

Abstract

Molecular and *in vitro* sensitivity characterization to antibiotics and cathelicidin peptides as antimicrobial agents against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from Bogotá city.

Staphylococcus aureus is a bacterium of great clinical importance. It is the most virulent species within its genus and the cause of very diverse infections that can threaten the lives of those who suffer from them. More importantly, it has shown resistance to multiple antibiotics, including β -lactam antibiotics, like Methicillin resistance. Methicillin-resistant isolates are a worldwide public health problem, attributed initially to hospital environments, but it has begun to be reported more and more frequently in the community. In addition to this, resistance to other antibiotics with different therapeutic targets has been observed. That makes it necessary to search for new alternatives to control the bacterial growth of isolates that cannot be treated with existing antibiotics. This work aims to determine the effect of cathelicidin-derived peptides on the growth and morphology of *S. aureus* clinical isolates from Bogotá D.C. city. We performed molecular characterization of the methicillin resistance *mecA* gene, protein A (*spa*), and *pvl* genes, and we identified the sensitivity profiles to the antibiotics of 57 *S. aureus* clinical isolates. Additionally, we evaluated the antimicrobial activity of LL-37, ATRA-1, and daptomycin on the characterized clinical isolates. Finally, we identified the changes in *S. aureus* bacterial morphology by peptides' action using scanning electron microscopy (SEM). We determined that there is an important prevalence of resistant isolates to Methicillin. Some of them with discordances in the methicillin sensitivity in *S. aureus*. However, a high sensitivity rate to antibiotics with mechanisms of action different from methicillin is evidenced. We found that LL-37 and ATRA-1 peptides have antimicrobial capacity against this pathogen and are differences between the activity of these compounds and the sensitivity of the Methicillin profile. Finally, we proved that these peptides generate Surface changes in morphology as one of their mechanisms; however, it is not excluded that they present intracellular effects that potentiate its antimicrobial action. With this work, we are looking to contribute to the surveillance of bacterial resistance in Bogotá city, promote the development of new therapeutic strategies to control bacterial resistance in our region, and contribute to the characterization of the activity of synthetic antimicrobial peptides against *S. aureus*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Antimicrobial peptides, LL-37, ATRA-1, Cathelicidin, Antibiotic resistance, Methicillin resistance.

Contenido

Introducción	16
Objetivos	18
Objetivo general	18
Objetivos específicos	18
Marco teórico	19
Importancia de la tipificación de aislamientos <i>S. aureus</i> y clasificación SARM-AH y SARM-AC	19
Antecedentes del uso de péptidos antimicrobianos	21
Variables por considerar para la evaluación de péptidos antimicrobianos	23
Metodología	26
Caracterización de aislamientos de <i>S. aureus</i>	26
Perfil de sensibilidad antibiótica	26
Perfil molecular	26
Evaluación de actividad inhibitoria de péptidos antimicrobianos	27
Ensayo <i>in vitro</i> para la evaluación de péptidos antimicrobianos	27
Efecto de péptidos antimicrobianos sobre la morfología de <i>S. aureus</i>	28
Resultados	30
Caracterización de aislamientos de <i>S. aureus</i>	30
Evaluación de actividad inhibitoria de péptidos antimicrobianos	35
Efecto de péptidos antimicrobianos sobre la morfología de <i>S. aureus</i>	40
Discusión:	39
Conclusiones	45
Anexos	46
Anexo A: Listado de aislamientos	48
Anexo B: Listado de primer	51
Anexo C. distribución de microplacas para la evaluación de péptidos antimicrobianos.	52
Bibliografía	54

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismos de acción en membranas de PAM.	21
Figura 2. Árbol filogenético de máxima verosimilitud.....	29
Figura 3. Árbol de expansión mínima de <i>spa-Typing</i> y clones pandémicos de <i>S. aureus</i>	33
Figura 4. Actividad de péptidos derivados de catelicidina y daptomicina.....	35
Figura 5. Actividad antimicrobiana de péptidos por presencia de genes <i>pvl</i>	36
Figura 6. Actividad antimicrobiana de péptidos por el perfil de sensibilidad a antibióticos β -lactámicos.....	36
...	
Figura 7. Actividad antimicrobiana de péptidos clasificados por sensibilidad a antibióticos no β -lactámicos.....	38
Figura 8. Efecto de péptidos derivados de catelicidina y daptomicina en la morfología superficial de <i>S. aureus</i>	39
Anexo C. Figura 1. Esquema de distribución en microplacas de 96 pozos para la evaluación de péptidos antimicrobianos.....	52

Índice de tablas

Tabla 1. Categorías principales de péptidos antimicrobianos y sus principales representantes.....	20
Tabla 2. Perfil de sensibilidad antibiótica clasificados por el tipo de antibióticos.....	30
Tabla 3. Sensibilidad a antibióticos β -lactámicos y presencia de gen de resistencia <i>mecA</i>	31
Tabla 4. Presencia de genes <i>pvl</i> en aislamientos clasificados por el perfil de sensibilidad a antibióticos β -lactámicos.....	31
Tabla 5. Perfil de sensibilidad antibióticas β -lactámicos y no β -lactámicos.....	32
Tabla 6. Rangos de actividad de péptidos de catelicidina detectados en los aislamientos de <i>S. aureus</i>	34
Tabla 7. Rangos de actividad de péptidos de catelicidina detectados en los aislamientos de <i>S. aureus</i> clasificandos mediante perfil de sensibilidad antibióticos β -lactámicos.....	37
Anexo A. Tabla 1. Información para de los aislamientos de <i>S. aureus</i> empleados en el estudio.....	48
Anexo B. Tabla 1. Listado de genes empleados para evaluar el perfil molecular y protocolo de amplificación por PCR convencional.....	51

Abreviaturas

SARM: <i>S. aureus</i> resistente a meticilina	MODSA: Sensibilidad modificada a oxacilina en <i>S. aureus</i>
SASM: <i>S. aureus</i> sensible a meticilina	SARM-OS: <i>S. aureus</i> sensible a oxacilina <i>mecA</i> positivo
SARM-AH: <i>S. aureus</i> resistente a meticilina asociado al hospital	OXA: oxacilina
SARM-AC: <i>S. aureus</i> resistente a meticilina Asociado a la comunidad.	FOX: cefoxitin
UCI: Unidad de cuidados intensivos	E: eritromicina
PAM: Péptidos antimicrobianos	DA: clindamicina
CMI: Contracción mínima inhibitoria	CIP: ciprofloxacina
CMB: Concentración mínima bactericida	GN: gentamicina
CE₅₀: Concentración efectiva 50	STX: trimetoprim-sulfametoaxol
PGN: Peptidoglicano	DAP: daptomicina
PCE: Proteína catiónica eosinofílica	NY: New Yorkina
ALT: Ácidos lipoteicoicos	PBP: Proteína de unión a penicilina
PMN: Células polimorfonucleares	CE: Control de esterilidad
CLSI: <i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>	CC: Control de crecimiento
GREBO: Grupo para el Control de la resistencia bacteriana en Bogotá	PVL: leucocidina Panton-Valentine
TSA: Agar tripticasa de soya	UVP: Ulceras venosas de pierna
ADE: Agua destilada estéril	EMA: Enzimas modificadoras de aminoglucósidos
SEM: Microscopio electrónico de barrido	BORSA: <i>S. aureus</i> con sensibilidad <i>Borderline</i> a oxacilina

Introducción

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva con morfología cocoidal, oxidasa negativa, no formadora de esporas, coagulasa positiva y anaerobia facultativa (Akanbi et al., 2017). Este microorganismo pertenece a la familia *Staphylococcaceae*, y se considera una de sus especies más significativas, principalmente debido a su capacidad para causar enfermedad tanto en humanos como en animales (Quinn et al., 2011). Puede generar una gran variedad de entidades clínicas, desde infecciones cutáneas como forúnculos y foliculitis, hasta infecciones diseminadas como bacteriemia, endocarditis, neumonía, osteomielitis, artritis séptica; así como enfermedades mediadas por toxinas como intoxicación alimentaria, síndrome del shock tóxico y síndrome de piel escaldada (Murray et al., 2020).

Adicional a su habilidad para producir enfermedad, este patógeno humano posee una gran disposición desarrollando resistencia a diversos antibióticos de uso clínico, dentro de ellos meticilina (Pal et al., 2020). La resistencia a meticilina, y en general a los antibióticos β -lactámicos así como cefalosporinas y carbapenémicos, se da gracias a la presencia del gen de resistencia *mecA*, cuyo producto de expresión PBP2a o proteína de unión a penicilina específica, confiere resistencia al presentar afinidad reducida a estos antibióticos (Becker et al., 2014). Las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) inicialmente se atribuían a ambientes hospitalarios (SARM-AH) y se consideraban causantes de infecciones nosocomiales. Pero, con el paso del tiempo han comenzado a reportarse aislamientos de *S. aureus* resistentes a meticilina circulando en la comunidad (SARM-AC) (Askari et al., 2012). Además, en Colombia se evidencia la presencia de aislamientos asociados al clon genético comunitario (SARM-CG) que puede diseminarse en ambos ambientes, hospitalarios y de la comunidad (Escobar-Pérez et al., 2014). Una de las posibles causas de ello, se podría atribuir a que *S. aureus* puede hacer parte de la microbiota de humanos en proporción de 25 a 50% de la población mundial sana (Cervantes-García et al., 2014), contribuyendo tanto a la diseminación de la bacteria como de su resistencia. Actualmente SARM es un problema de salud pública mundial, con una amplia distribución en donde se destaca Colombia con porcentajes de 30-40% de resistencia a oxacilina en *S. aureus* entre los años 2015 y 2020 (Ovalle Guerra, 2020). Bogotá evidencia tasas de resistencia a estos compuestos igualmente preocupantes, que oscilan entre 35-50% en servicios diferentes a unidad de cuidados intensivos (UCI) y hasta 71% en UCI (Espinosa et al., 2011). Pese a que en la actualidad existen moléculas antimicrobianas con otros blancos que no se ven afectados por los genes de resistencia *mec*, como bloqueadores de la síntesis proteica (eritromicina, clindamicina y gentamicina), antimetabolitos (trimetoprim-sulfametoxazol) e inhibidores de ADN girasa (ciprofloxacina), estos han resultado ser insuficientes para controlar la diseminación de cepas SARM, presentado tasas de resistencia cercanas al 100% (Sohail & Latif, 2017).

La alta prevalencia de SARM y la aparición de aislamientos *S. aureus* multiresistentes, ha puesto en evidencia la necesidad de ahondar en la búsqueda de nuevas estrategias para controlar el crecimiento bacteriano en aislamientos que no pueden ser tratados con los antibióticos anteriormente mencionados. Una de las alternativas que toma fuerza es el uso de péptidos antimicrobianos, moléculas que pueden contener de 5 hasta 1000 aminoácidos y actúan sobre un rango extendido de organismos desde virus hasta parásitos, generando la muerte celular en segundos luego del contacto inicial con las células (Bahar & Ren, 2013). Los péptidos antimicrobianos (PAM) se dividen en familias dependiendo de su composición y estructura (K. A. Brogden, 2005). Dentro de los más

estudiados se encuentran los péptidos estructurados por α -hélices, especialmente aquellos formados por hélices anfipáticas catiónicas, debido a que estas características les confieren una alta capacidad bactericida al interactuar y desestabilizar fácilmente la membrana bacteriana, generalmente conformada por fosfolípidos aniónicos (Epanand & Vogel, 1999). Adicional a esto, se han reportado otros mecanismos de acción como inhibición de síntesis de ácidos nucleicos, inhibición de síntesis proteica e interferencia en el plegamiento de proteínas (Falanga et al., 2016), así como acción anti-biopelícula (Batoni et al., 2016). Características que han promovido su estudio sobre diversos organismos patógenos como controladores del crecimiento bacteriano.

El péptido LL-37, también llamado catelicidina humana, es una molécula anfipática, catiónica (carga +6) de estructura α -helicoidal, con actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas (Henzler Wildman et al., 2003). Este péptido ha mostrado capacidad inhibitoria en cepas de *S. aureus* sensibles y resistentes a meticilina con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de 2 mg/L y 16 mg/L respectivamente (Ouhara et al., 2008). Adicional a esto, LL-37 tiene actividad moduladora del sistema inmunológico, al regular positivamente genes que codifican para quimiocinas y receptores de quimiocinas e inhibir la estimulación de macrófagos; lo que sugiere que el péptido además de tener capacidad antimicrobiana, actúa reduciendo el daño causado por componentes bacterianos, controlando eficientemente las infecciones (Scott et al., 2002). A pesar de que los péptidos naturales como LL-37 son altamente eficientes para combatir el crecimiento antimicrobiano, la investigación actual dirige sus esfuerzos en el desarrollo de péptidos antimicrobianos sintéticos con modificaciones que permitan, entre otras cosas, mejorar la actividad antimicrobiana selectiva, aumentar la capacidad para unirse a superficies médicas o industriales, impedir la degradación por enzimas del microorganismo y optimizar la disponibilidad en el hospedero. Dentro de esas modificaciones se encuentran: compuestos miméticos de PAM, péptidos híbridos que conservan las porciones activas de otras moléculas naturales con actividad antimicrobiana y conjugación de PAM (N. K. Brogden & Brogden, 2011). En estos péptidos antimicrobianos sintéticos se encuentra ATRA-1, una molécula construida a partir de la estructura de catelicidina de la serpiente *Naja atra*, está conformado por los primeros 11 aminoácidos de esta, es igualmente catiónico (+8), anfipático y con estructura α -helicoidal. Exhibe potencial bactericida sorprendente, requiriendo menos de 1 μ g/mL para ocasionar la lisis de hasta el 50% de células (CE₅₀) de *S. aureus* (de Latour et al., 2010). Sumado a esto, tanto LL-37 como ATRA-1 han evidenciado una muy baja afección sobre otras células del hospedero, requiriendo más de 100 μ g/mL de péptido para generar hemólisis, promoviéndose como posibles antimicrobianos seguros para la salud humana y animal (Dean et al., 2011b). Todo esto postula a los péptidos LL-37 y ATRA-1 como alternativas terapéuticas para tratar infecciones causadas por *S. aureus*, inclusive en aquellas que no pueden ser controladas por los antibióticos de uso clínico actualmente empleados.

Objetivos

Objetivo general

Determinar el efecto de péptidos derivados de catelicidina LL-37 y ATRA-1 en el crecimiento y la morfología de aislamientos clínicos de *S. aureus* procedentes de la ciudad de Bogotá D.C.

Objetivos específicos

1. Caracterizar el perfil molecular y de sensibilidad antibiótica de aislamientos clínicos de *S. aureus*.
2. Evaluar la capacidad antimicrobiana de péptidos derivados de catelicidina LL-37 y ATRA-1 en aislamientos clínicos de *S. aureus*.
3. Observar el efecto de péptidos derivados de catelicidina LL-37 y ATRA-1 en la morfología de *S. aureus*.

Marco teórico

Composición morfológica *S. aureus* y actividad de péptidos antimicrobianos

S. aureus una bacteria Gram positiva, cuenta con una gruesa capa de pared celular que rodea a la membrana citoplasmática, protegiendo a las células de factores físicos como estrés osmótico. La pared de este microorganismo está compuesta por peptidoglicano (PGN), un complejo que por su rigidez determina la morfología superficial del microorganismo, representando alrededor del 90% del peso seco en *S. aureus*. El PGN es un agregado del disacárido N-acetilglucosamina-N-acetilmurámico, cada capa se une mediante cadenas laterales de pentapéptidos que varían entre las especies (Malanovic & Lohner, 2016). A pesar de la importancia de esta estructura en las bacterias no se conoce con certeza el papel que desempeña la pared celular en la actividad de los péptidos antimicrobianos. Pues en algunos casos se sugiere que esta actúa como atractor de péptidos impidiendo su acción principal sobre la membrana, y en otros, que los componentes de la pared actúan como facilitadores para la introducción de los péptidos a la membrana u otros blancos (Malanovic & Lohner, 2016).

Los péptidos como omiganan y la proteína catiónica eosinofílica (PCE), tienen una alta interacción con PGN, pero han demostrado que su habilidad disruptiva de membrana es débil, por lo que la actividad bactericida de ellos se atribuye a la internalización de la molécula por translocación a través de la membrana, aunque no se conoce cuál sería el objetivo intracelular (Malanovic & Lohner, 2016). No obstante, en las paredes de *S. aureus* se encuentra una alta proporción de ácidos lipoteicoicos (ALT), que presenta alrededor de 24 repeticiones de glicerofosfato que varían en longitud de 15 a 50 aminoácidos y se unen mediante enlaces covalentes a la subunidad N-acetilmurámico de la pared bacteriana (Malanovic & Lohner, 2016). ALT cuenta con carga negativa en los grupos fosfatos que lo componen, esta particularidad postula a los ALT anclados a la pared, como trampas para los péptidos antimicrobianos atraídos por estas cargas aniónicas. Los péptidos mellitin y LL-37 interactúan fuertemente con ALT, sin embargo, no pierden su actividad antimicrobiana por disrupción de la membrana en su totalidad, pero se genera disminución de la concentración de péptidos localizados en la membrana citoplasmática (Malanovic & Lohner, 2016), por lo que se haría necesario concentraciones más altas de esta molécula para generar la lisis celular.

Importancia de la tipificación de aislamientos *S. aureus* y clasificación SARM-AH y SARM-AC.

S. aureus es reconocido desde hace mucho tiempo como agente causal de enfermedades humanas con consecuencias dramáticas frecuentemente relacionadas con pacientes hospitalizados, debido en gran medida a fallos en el tratamiento con compuestos antibióticos, gracias a la resistencia antimicrobiana. No es extraño que SARM fuera considerado por mucho tiempo un patógeno causante de infecciones predominantemente asociadas a ambientes hospitalarios SARM-AH (Trindade et al., 2003), con patrones de resistencia a antibióticos β -lactámicos y no β -lactámicos y ausencia de gen *pvl*; generalmente causantes de bacteriemias, infecciones de heridas quirúrgicas, asociadas a dispositivos médicos y úlceras, afectando pacientes de edad avanzada o con enfermedades crónicas. Sin embargo, con el paso del tiempo se reportaron casos SARM asociados a la comunidad (SARM-AC), con características

diferenciales frente a SARM-AH, como sensibilidad a antibióticos no β -lactámicos y presencia del gen *pvl*, causando afecciones a personas jóvenes, estudiantes, atletas o militares que involucran infecciones de piel y tejidos blandos como celulitis y abscesos, síndrome de shock tóxico e infecciones de hueso (Nathwani et al., 2008). Además, efectuar clasificaciones entre los aislamientos en términos de su diseminación como SARM-AH y SARM-CA, está directamente asociados con la sensibilidad antibiótica que ellos presentan, pues se ha demostrado que aislamientos SARM-CA son más susceptibles a la eritromicina, clindamicina, ciprofloxacina, gentamicina y trimetoprima-sulfametoxazol que aquellos SARM-AH (Jung et al., 2006) (Hsiao et al., 2015). Aun así, en la actualidad dichas características que los diferenciaban ahora son compartidas e impiden su detección y clasificación (Carvalho et al., 2019).

Determinar las relaciones genéticas entre los aislamientos y sus patrones de sensibilidad, así como el entorno en el cual se transmite permiten realizar una vigilancia efectiva sobre estos y probar nuevas moléculas que permitan hacer el tratamiento más adecuado. Una de las principales características a determinar es la especie que causa la patología, y esto se logra gracias a al análisis del marcador molecular *16s rARN*, un gen altamente conservado en bacterias, pero que a su vez cuenta con regiones variables que permiten determinar relaciones filogenéticas entre ellas. Cambios en estas regiones son más aleatorios a lo largo de la historia y funcionan como medida de tiempo evolutivo muy preciso. A pesar de su amplio uso y las propiedades que permiten la clasificación bacteriana, este gen presenta algunas limitaciones cuando se espera una clasificación más precisa de los aislamientos, pues este no genera medidas perfectas de divergencia de las secuencias entre diferentes cepas (Patel, 2001). Por lo anterior, es necesario incluir otros genes en la clasificación molecular de aislamientos tanto de *S. aureus* como de otros patógenos humanos, a fin de evidenciar patrones mucho más específicos, como la presencia de factores de virulencia que se relacionan con las manifestaciones clínicas en el paciente y facilitan la colonización de tejidos y la adhesión a superficies (Labandeira-Rey et al., 2007).

La proteína A, codificada por el gen *spa*, compone un importante factor de virulencia para esta bacteria, al ser un componente de la superficie bacteriana anclado a la pared celular con capacidad para unirse a la región Fc de IgG en la mayoría de los mamíferos. Además, puede activar tanto la vía clásica como alterna del complemento y desencadenar reacciones anafilácticas en el hospedero, inhibir la opsonización y la fagocitosis (Callegan et al., 1994). Este gen es una de las herramientas moleculares más exploradas en *S. aureus*, en especial dentro de los aislamientos SARM, lo que lo perfila como el instrumento más útil en epidemiología molecular, con el fin de establecer y descifrar la diseminación de los aislamientos resistentes a meticilina, debido a que su secuencia cuenta con una porción variable denominada región X, con aproximadamente 3 a 15 repeticiones, en algunos casos *S. aureus* han reportado hasta 25 patrones diferentes de estas repeticiones, permitiendo que los aislamientos sean caracterizados basándose en ellas (Frenay et al., 1996). El gen *spa* tiene ventajas dentro de otros métodos de tipificación al presentar facilidad en su uso, así como en la estandarización de la técnica y la interpretación de resultados (Shopsin et al., 1999).

Otro aspecto importante es la presencia de toxinas como leucocidina Panton-Valentine (*PVL*), una proteína que facilita la necrosis de tejidos ayudando a la bacteria en la colonización de los mismos (Takizawa et al., 2005). Su presencia en cepas *S. aureus* es una característica muy estudiada para la clasificación de SARM-AC, por ser estos quienes presentan generalmente esta

toxina. Los aislamientos productores de PVL expresan 2 clases de proteínas tipo S y tipo F codificadas por los genes *LukS-PV* y *LukF-PV*, también denominados genes *pvl* y proteínas formadoras de g-hemolisis. Se ha demostrado que PVL forma poros en las células polimorfonucleares (PMN) y macrófagos tanto de conejo, como de humano. Esta leucocidina puede relacionarse con lesiones de tipo inflamatorio al ser evaluada por vía intradérmica, causando quimiotaxis de células del sistema inmune, dilatación capilar, necrosis cutánea e infiltraciones de PMN (Lina et al., 1999). En Colombia la prevalencias de PVL se ha alcanzado hasta el 73,4% en aislamientos de *S. aureus* (Correa-Jiménez et al, 2016). Esto convierte a los aislamientos SARM-AC además de resistentes a múltiples tratamientos, altamente peligrosos para la vida y la salud de los individuos que desarrollan infecciones asociados con estos aislamientos; y a los genes *pvl* como un componente a estudiar para determinar adecuadamente el origen de aislamientos *S. aureus* resistentes a metilicina.

Antecedentes del uso de péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos son sumamente abundantes, se generan en varios tejidos y tipos de células: en plantas, invertebrados y animales; Se han descrito más de 880 péptidos con capacidad antimicrobiana, todos diferentes con relación a su secuencia de aminoácidos. Estos compuestos se clasifican basados en su estructura principalmente (Epanand & Vogel, 1999) como α -helicoidales, formados por β -laminas y de configuración flexible (P. Kumar et al., 2018). En especial los péptidos catiónicos α -helicoidales, son generalmente cortos, carentes de residuos como cisteína, y una de sus características especiales es que pueden generar bisagras o pliegues que favorecen su actividad. Estos generan cambios en la morfología de la membrana bacteriana al introducirse y originar poros en forma de barril, poros toroidales, y alfombras (ver Figura 1), que llevan a la muerte de las células bacterianas. Sin embargo estas interrupciones no son las únicas implicaciones de su actividad bacteriostática y bactericida, se ha reportado que los péptidos translocados pueden bloquear la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, alterar la actividad enzimática y matar rápidamente a las células microbianas (K. A. Brogden, 2005).

Tabla 1. Categorías principales de péptidos antimicrobianos y sus principales representantes. Modificada a partir de (P. Kumar et al., 2018).

Categoría	Representante	Origen	Estructura primaria	Características importantes
α -hélices	Mellitin (Terra et al., 2007)	Abejas	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKR KRQQ	C-terminal aminado
	Buforina II (Park et al., 2000)	Rana	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	
	Catelicidinas LL-37 (Dürr et al., 2006)	Humano	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQ RIKDFLRNLVPRTE	C-terminal aminado
β -laminas (Ganz, 2003)	Defensinas α -defensinas (HNP3)	mamíferos	CYCRIPACIAGERRYGTCTIYQG RLWAFCC	3 enlaces disulfuro
	β -defensinas (HBD2)	Mamíferos	GGIGDPVTCLKSGAICHVPVFCP RRYKQIGTCGLPGTKCKKP	3 enlaces disulfuro
	θ -defensinas (RTD1)	Gorila	CRCLCRRGVCRRCRCRTGF	3 enlaces disulfuro y estructura cíclica

Estructura flexible	Histatinas (Khurshid et al., 2017)	Humano	DSpHEKRHHGYRRKFHEKHH SHREFPFYGDYGSNYLYDN	Riqueza de histidina y C-terminal aminado
---------------------	------------------------------------	--------	---	---

La gran actividad que han mostrado los péptidos antimicrobianos para generar la lisis de células bacterianas ha impulsado su estudio a lo largo de los años, poniendo de manifiesto algunos obstáculos para el aprovechamiento de su actividad antimicrobiana sobre todos en modelos *in vivo*. Dentro de ellos se encuentra la toxicidad para el hospedero, alto costo de síntesis, degradación por enzimas y pérdida de actividad *in vivo*. Esto lejos de frenar el estudio de péptidos antimicrobianos ha impulsado el desarrollo de una serie de modificaciones que permiten sobrepasar estas dificultades. Ejemplo de ello son los péptidos modificados, que al eliminarse una porción de aminoácidos hidrofóbicos, la hemólisis se reduce hasta en 100% (Dawson & Liu, 2011), superando así la toxicidad sobre células del hospedero. Por otro lado, el costo de la extracción de péptidos de fuentes naturales limita su utilización de forma masiva; Sin embargo, se han diseñado péptidos recombinantes que se pueden sintetizar con altos niveles de expresión en *Pichia pastoris* a través del plásmido (Cao et al., 2015) lo que permitiría su síntesis y comercialización a gran escala. Paralelamente, uno de los mayores problemas de la utilización de péptidos antimicrobianos es la degradación por enzimas del microorganismo, para solucionarlo se ha postulado el diseño de péptidos con D-aminoácidos que no son reconocidos por las enzimas degradadoras, además se ha demostrado que la sustitución de aminoácidos por su enantiómero permite mejorar la estabilidad *in vivo* del péptido mejorando su actividad (Hong et al., 1999). Adicionalmente, para potenciar la actividad antimicrobiana se han realizado diseño de péptidos híbridos que contienen las porciones proteicas de mayor actividad o conjugados que actúen en sinergia incrementando su acción sobre las células bacterianas, en algunos casos puede realizarse modificaciones en términos de la longitud y de la carga, agregando aminoácidos con carga positiva, lo que lleva a una mejor interacción con los componentes de carga negativa de las bacterias (N. K. Brogden & Brogden, 2011). Las modificaciones que pueden realizarse a los péptidos muestran su versatilidad como un elemento adicional que permita su potencial uso en el tratamiento de infecciones causadas por diversos microorganismos.

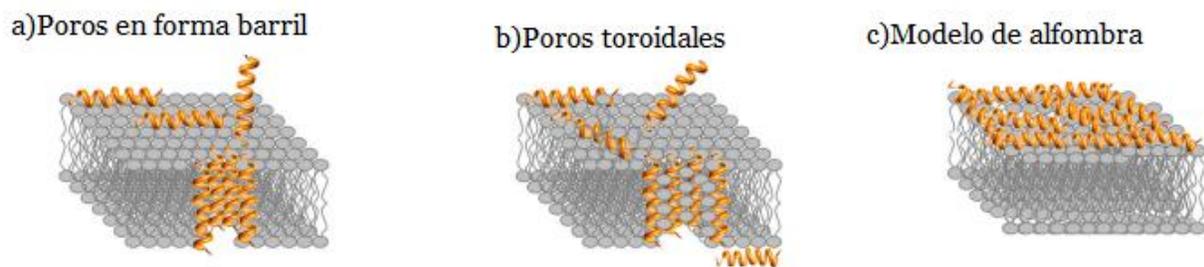


Figura 1 . Mecanismos de acción en membranas de PAM. Tomado y modificado a partir: (P. Kumar et al., 2018).

Se ha demostrado que el péptido antimicrobiano natural LL-37 es capaz de combatir el crecimiento de patógenos Gram positivos del género *Staphylococcus* (CMI:>128-14 µg/mL), *Enterococcus* (>20-5 µg/mL) , *Clostridium* (128 µg/mL), *Streptococcus* (62,5-14 µg/mL), *Listeria* (2,2-0,5 µg/mL), *Bacillus* (250-35 µg/mL); y Gram negativos como *Acinetobacter* (32-

4 µg/mL), *Pseudomonas* (64-16 µg/mL), *Escherichia* (44,9-9 µg/mL), *Klebsiella* (32 µg/mL), *Salmonella* (143,7-4 µg/mL), *Yersinia* (CMB:>160-40 µg/mL) y *Vibrio* (50 µg/mL). Inclusive, algunos otros patógenos como *Treponema* (62,5-31,3 µg/mL), *Mycoplasma* (32 µg/mL) y *Mycobacterium* (5 µg/mL) son afectados por esta molécula (Neshani et al., 2019). Estos resultados han impulsado la investigación del compuesto como tratamiento en pacientes con infecciones cutáneas, ejemplo de ello es la evaluación de LL-37 como terapia en úlceras venosas de pierna (UVP), que son uno de los tipos más frecuentes de heridas crónicas, demostrando que su uso en concentraciones de 0,5-1,6 mg/mL en aplicación tópica para las úlceras crónicas, disminuye el área media de la lesión y además es seguro para tratar este tipo de afecciones (Grönberg et al., 2014). Inclusive se han diseñado transportadores biológicos para la formulación de este péptido como tratamiento en heridas, empleando nanopartículas lipídicas que contienen el péptido y que permiten administrarlo en proporciones específicas sobre la zona de lesión llevando a la curación acelerada de la lesión (Fumakia & Ho, 2016). Esto muestra que los péptidos antimicrobianos, y en especial LL-37, tiene una gran aplicabilidad en clínica, no solo como inhibidor del crecimiento bacteriano, sino también como acelerador para la curación de heridas.

Pese a que los péptidos naturales han mostrado resultados positivos en la disminución del crecimiento bacteriano, se ha trabajado arduamente en el desarrollo de péptidos sintéticos más cortos y con carga positiva mayor, debido a que esto incide directamente en la actividad antimicrobiana (M. L. Juba et al., 2015). Dentro de ellos, el péptido ATRA-1 ha demostrado actividad contra patógenos como *Francisella* (CE50: 8,95 µg/mL) (Amer et al., 2010), *Escherichia coli* (0,88 µg/mL), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (0,93 µg/mL) (de Latour et al., 2010), *Pseudomonas aeruginosa* (0,64 µg/mL) (Dean et al., 2011b), *Burkholderia thailandensis* (10,4 µg/mL) (Blower et al., 2015) y *Staphylococcus aureus* (0,52 µg/mL) (Dean et al., 2011a), demostrando que esta molécula es eficaz a muy bajas concentraciones combatiendo el crecimiento de bacterias que afectan la salud humana.

Variables por considerar para la evaluación de péptidos antimicrobianos

Los péptidos al ser moléculas de origen biológico son altamente sensibles a las condiciones ambientales, por lo que su actividad puede verse afectada por múltiples factores, dentro de ellos la concentración de sal en el medio. Se ha detectado que altas concentraciones de NaCl afecta negativamente la efectividad del péptido, pues en concentración de 20 mM NaCl el péptido LL-37 tiene CMI de 16 µg/mL para *E. coli*, pero al aumentar a 300 mM NaCl su actividad disminuye a >500 µg/mL (Bals et al., 1998). Simulaciones con otros péptidos mostraron que la concentración de sal disminuye el área de péptido por lípido y la inclinación de las cabezas de fosfolípidos, esto hace que a altas concentraciones de sal los péptidos no se unan fuertemente a los lípidos de membrana, como lo haría en concentraciones más bajas (Kandasamy & Larson, 2006). La concentración normal de Na⁺ y Cl⁻ en suero humanos es 135-145 y 98-107 respectivamente (Li et al., 2016). En concentraciones fisiológicas algunos péptidos naturales disminuyen su actividad. Sin embargo, modificaciones como péptidos cortos de 11-13 aminoácidos con G,L y K en su estructura, con hélices simétricas e hidrofobicidad alrededor del 30-50% permiten estabilizar las estructuras y resistir estas concentraciones de sal sin afectar su actividad antimicrobiana (Chou et al., 2019).

La concentración de cationes divalentes que se sugieren en la norma CLSI, ha mostrado ser una de las limitaciones en la utilización de esta norma para evaluar péptidos antimicrobianos, pues los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} , que deben adicionarse al medio de cultivo, muestran efecto antagonista frente a la actividad de estos tipos de moléculas, haciendo que los péptidos pierdan actividad bactericida incluso en concentraciones bajas de los iones (Wu et al., 2008). Esto se debe a que los iones divalentes disipan el potencial eléctrico transmembranal e impide la captación del péptido (Minahk & Morero, 2003).

Otro factor por discutir al emplear la norma CLSI para la evaluación de péptidos antimicrobianos es el material de las placas necesarias para la técnica microdilución, pues las características de los péptidos que les confieren capacidad bactericida, también los hace muy afines a algunos materiales como el polietileno o cloruro de polivinilo (Cunningham et al., 2011), por lo que ellos pueden ligarse a las paredes de los pozos en placas de estos materiales, dejando a los péptidos sin su mecanismo de acción, al no poderse ligar a su sitio de actividad. Se sugiere emplear placas de polipropileno, para disminuir el riesgo de unión irreversible de los péptidos al material de laboratorio (Conlon & Sonnevend, 2010).

Como ya se ha dicho antes los péptidos como LL-37 y ATRA-1 basan la función en sus propiedades fisicoquímicas, que a su vez los hace generar conformaciones específicas. Esta relación estructura/función puede verse seriamente afectada por el pH de la solución en la cual se encuentran inmersos. Esto se debe a que el pH del medio puede hacer que cambie la carga neta del péptido, la plasticidad conformacional y la protonación de aminoácidos como histidina, ácido glutámico y ácido aspártico, haciendo que algunas de estas moléculas tengan su actividad óptima a pH altos y otras a pH bajos. Además el pH, podría determinar el uso clínico de los mismos, pues dado que LL-37 depende de pH bajos para realizar su actividad, este se ha propuesto como método de tratamiento de heridas cutáneas, dado que la piel presenta estas mismas condiciones (Malik et al., 2016). Por lo que controlar todos estos factores se hace relevante, a fin de identificar la actividad de péptidos antimicrobianos que potencialmente puedan ser empleados como tratamientos de infecciones ocasionadas por *S. aureus* u otros microorganismos.

Metodología

Caracterización de aislamientos de *S. aureus*

Perfil de sensibilidad antibiótica

En este estudio se incluyeron 57 aislamientos proporcionados por el Grupo para el Control de la resistencia bacteriana en Bogotá (GREBO) y el laboratorio de Biofísica de la Universidad de los Andes (ver Anexo A). A partir de estos aislamientos se realizaron cultivos iniciales de 24 h a 37°C en medio sólido tripticasa de soya (TSA) (Scharlau Chemie, España). La sensibilidad oxacilina se evaluó empleando el método microdilución en caldo conforme a lo descrito en la norma CLSI M07 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018) y a cefoxitina, gentamicina, eritromicina, clindamicina, ciprofloxacina y trimetoprima-sulfametoxazol empleando el método difusión en agar conforme a lo descrito en la norma CLSI M02 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018). Como controles se emplearon las cepas *Staphylococcus aureus* subsp. aureus (ATCC® 25923™), *Staphylococcus aureus* subsp. aureus (ATCC® 29213™) y *Staphylococcus aureus* subsp. aureus (ATCC® 33591™) (American Type Culture Collection, Virginia, USA) y los aislamientos clínicos 1631 sensible a daptomicina y 1634 resistente a daptomicina, proporcionados por el laboratorio de Biofísica de la Universidad de los Andes (ver anexo A). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Perfil molecular

a. Extracción de ADN

A partir del cultivo inicial de 24 h en agar sólido tripticasa de soya (Scharlau Chemie, España) de cada aislamiento, se realizó extracción de ADN mediante los kits comerciales Zymo Quick DNATM Universal kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) y GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, USA). Para confirmar la adecuada extracción de ADN e integridad de este se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % a 45V-45 min y mediciones de espectrofotometría NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Scientific™). El ADN genómico se almacenó a -20 °C hasta el momento de su utilización.

b. Amplificación de los genes de interés

La amplificación de los genes de interés *16rARN*, *spa*, *mecA* y *pvl* se realizaron empleando 25 uL como volumen final de reacción (para los genes *16s rARN* y *spa* se emplearon 35 uL volumen final debido a los requerimientos para el subsecuente proceso de secuenciación), que contenían 1,25 U de ExcelTaq™ Taq DNA Polymerase (CoreBioSystem, Corea), 1X Taq Buffer (CoreoBiosystem, Corea), 0,2 mM de primers específicos para cada gen (ver Anexo C), 0,2 mM de mezcla de dNTPs (0,5 mM para genes *16s rARN* y *spa*), 1,6 % Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merck, Germany), 1 uL de DNA (150ng/ µL) y

agua libre de nucleasas hasta completar el volumen final. El protocolo de amplificación y el tamaño de amplicón esperado se describe detalladamente en el Anexo C. Los productos de PCR se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

c. Secuenciación

El producto de PCR para los genes *16s rARN* y *spa* se enviaron al centro de secuenciación de ADN de la Universidad de Los Andes (GenCore) (<https://investigaciones.uniandes.edu.co/secuenciacion/>) para su purificación y posterior secuenciación por el método Sanger–Electroforesis capilar ABI 3500XL.

d. Detección de genes *mecA* y *pvl*

El producto de PCR de los genes de resistencia *mecA* y *pvl* se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% a 80 V-45 min. Como controles se emplearon las cepas *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 25923™) (*mecA* negativa, *pvl* positiva) y *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 33591™) (*mecA* positiva, *pvl* negativa) (American Type Culture Collection, Virginia, USA).

e. Análisis de secuencias

Una vez generadas las secuencias, estas se limpiaron mediante el software Geneious Prime 2021 (www.geneious.com). Para la evaluación con el gen *16s rARN*, se realizó BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Donkor et al., 2014) y análisis filogenético de máxima verosimilitud mediante el software MEGA-X (S. Kumar et al., 2018), como *out-groups* se adicionaron las secuencias de *S. saprophyticus* ATCC15305 (NCBI: NR_115607.1) y *S. epidermidis* (NCBI: KR149342.1). Para la tipificación utilizando el gen *spa*, las secuencias se analizaron y clasificaron empleando el software BioNumerics v8.0 (<https://www.applied-maths.com/bionumerics/patches/71/patch>) y se incluyeron los *spa-Type* de clones pandémicos de *S. aureus* (Oliveira et al., 2001).

Evaluación de actividad inhibitoria de péptidos antimicrobianos

Ensayo *in vitro* para la evaluación de péptidos antimicrobianos.

f. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Para la preparación del inóculo inicial, a partir de cultivo de 24 h de cada aislamiento en agar sólido tripticasa de soya (Scharlau Chemie, España) se tomaron de 2-5 colonias y se transfirieron a 1 mL de buffer PBS (125 nM de NaCl). Se realizaron lavados en buffer PBS (125 nM NaCl) durante 10 minutos a 3000 rpm por duplicado, a fin de retirar remanentes del medio de cultivo. Las células bacterianas se adicionaron a PBS (125 mM NaCl) y se determinó concentración mediante espectrofotometría a 625 nm para obtener concentración celular comparable a patrón de McFarland 0,5 ($2,5 \times 10^8$ células/mL), una vez realizado esto, los inóculos iniciales se ajustaron a 5×10^5

células/mL en PBS. De forma independiente se ajustaron concentraciones los péptidos LL-37 (LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES ,carga +6) y ATRA-1 (KRFKKFFKCLK-NH₂, carga +6) en medio PBS (125 mM NaCl) desde 64 a 2 µg/mL y se agregaron 50 µL/pozo de cada concentración de péptido en placas de 96 pozos de polipropileno, conforme a la disposición expuesta en el anexo D; las placas se sellaron y guardaron a -20°C hasta su utilización. Una vez descongeladas las placas, adicionamos 50 µL de inóculo inicial, estas se incubaron a 37°C por 16h. Como control positivo se realizaron estos ensayos con daptomicina, un péptido antimicrobiano de uso clínico, para este se evaluaron concentraciones de 32 a 0,125 µg/mL debido a que su actividad ha sido determinado en rango de concentración baja, inferior a 2 µg/mL y al buffer PBS (125 mM NaCl) se adicionó CaCl₂ hasta obtener 50 mg/L de Ca²⁺ en solución, ya que el péptido requiere este ion para su función antimicrobiana (Richter et al., 2003), las placas con daptomicina se realizaron el mismo día de su uso. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

g. Concentración mínima bactericida (CMB)

Una vez hallada la CMI, se tomó el volumen total de cada pozo, se realizaron diluciones seriadas en 900 µL de agua destilada estéril (ADE) que fueron plaqueadas por la técnica de spots (Thomas et al., 2015) en agar tripticasa de soya (TSA) (Scharlau Chemie, España), estas se incubaran por 24h a 37°C y pasado este tiempo se realizó recuento de UFC/mL. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

h. Análisis e interpretación de resultados

Para la evaluación de la capacidad inhibitoria de los péptidos se tomaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) expresados en µg/mL entendiendo como la mínima concentración en la cual no se detecta visualmente crecimiento bacteriano en la placa. Además, se midieron las concentraciones mínimas bactericidas (CMB) como la concentración mínima en la cual se redujo el crecimiento bacteriano en 99,9% luego del plaqueo en TSA y se realizaron pruebas de *Kruskal-wallis* global y pareada, para identificar diferencias entre las variables analizadas.

Efecto de péptidos antimicrobianos sobre la morfología de *S. aureus*

Para este ensayo se empleó la cepa *Staphylococcus aureus* subsp. aureus (ATCC® 25923™) tratada en concentraciones supra-CMI (2 CMI) y sub-CMI (1/2 CMI) halladas para cada cepa de cada uno de los péptidos evaluados en condiciones similares a lo expuesto en el ítem f. Las muestras se lavaron con agua destilada estéril (ADE) a 8000 rpm durante 10 min, y posteriormente se fijaron con glutaraldehído 2,5% (v/v), durante 3h. Entonces, se realizaron 8 lavados con agua destilada a 15°C aproximadamente. Finalmente, las muestras se deshidrataron mediante gradiente de etanol (70-100%) durante 30 min. Estas se secaron por punto crítico y su visualización se realizó en microscopio electrónico de barrido (SEM) LYRA3 TESCAN© del centro de microscopía de la Universidad de los Andes, MicroCore (<https://microcore.uniandes.edu.co/es/>) a 5-10 kV. Como control negativo se emplearon células sin tratamiento, similar a control de crecimiento (CC) expuesto en el Anexo D.

Resultados

Caracterización de aislamientos de *S. aureus*

Caracterizamos 57 aislamientos clínicos presuntivos *S. aureus*. Por otro lado, confirmamos que la totalidad de los aislados evaluados en este estudio corresponden a aislamientos de *S. aureus* dado que se encontraban en el mismo clado con cepas de referencias de la especie, con un porcentaje de confianza de la rama del 96%. Además, los análisis BLASTn relacionaron esta especie como la identidad de cada aislamiento, sin embargo, los aislados 5, 14, 45 y 46 se agruparon en un subclado con distancia evolutiva mayor con relación a los demás aislamientos analizados (Figura 2).

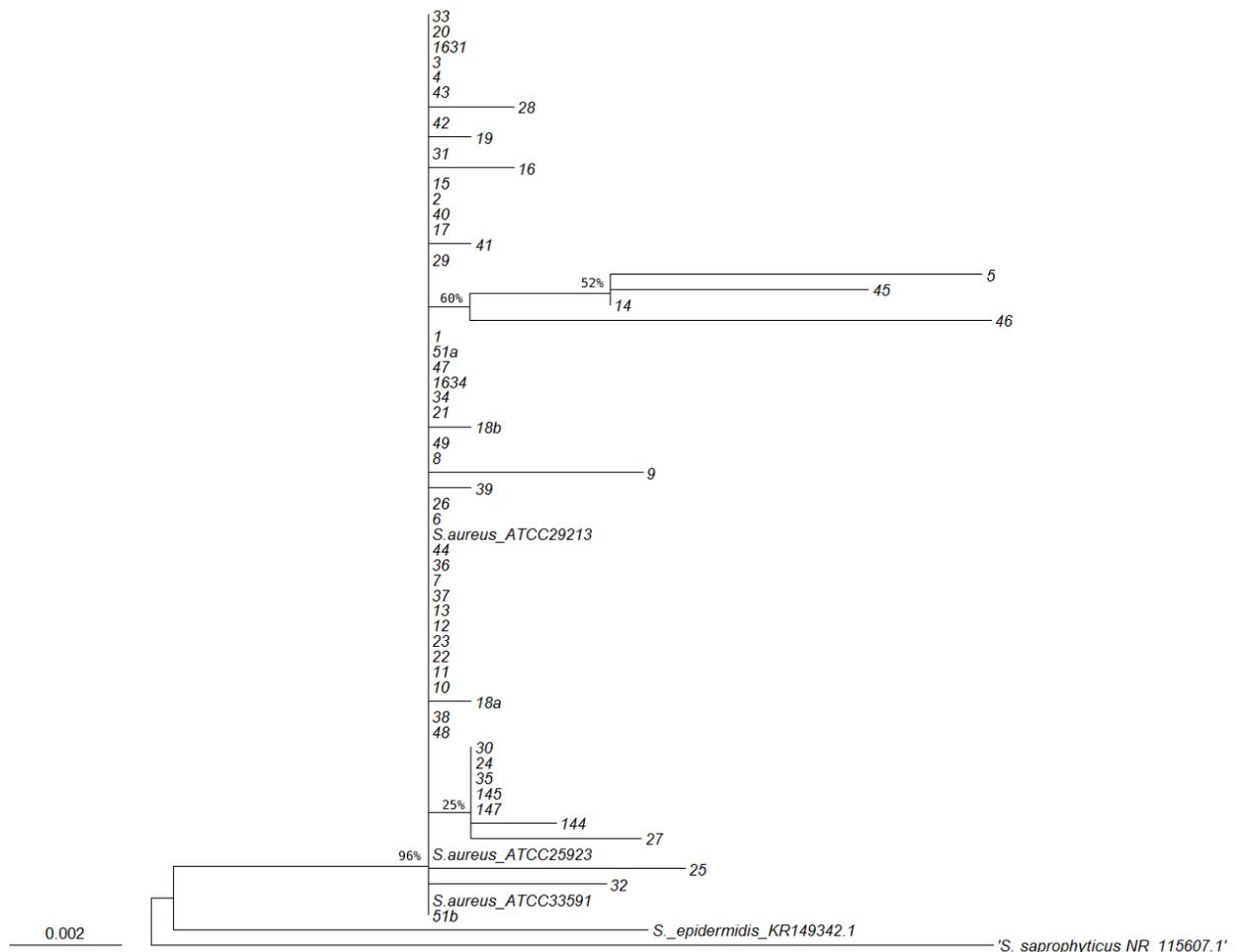


Figura 2. Árbol filogenético de máxima verosimilitud (bootstrap:1000, modelo evolutivo:kimura 2) construido con marcador molecular *16s rARN*; como como outgroups: *S. saprophyticus* ATCC 15305 (NR_115607.1) y *S. epidermidis* (KR_149342.1); en la parte inferior se muestra la escala de distancia evolutiva.

Tabla 2. Perfil de sensibilidad antibiótica clasificados por el tipo de antibióticos. Se indica el porcentaje sobre total de los aislamientos y entre paréntesis la frecuencia de estos.

Clasificación antibióticos	Antibiótico	Perfil sensibilidad <i>S. aureus</i> 100% (57)		
		R	S	I
β-lactámicos	OXA	54.3% (31)	45.6% (26)	
	FOX	47.3% (27)	52.6% (30)	
No β-lactámicos	E	21% (12)	70.1% (40)	8.7% (5)
	GN	1.75% (1)	92.9% (53)	5.2% (3)
	CIP	3.5% (2)	96.4% (55)	
	DA	12.28% (7)	85.9% (49)	1.7% (1)
	STX		100% (57)	

OXA: oxacilina, FOX: cefoxitina, E: eritromicina, DA: clindamicina, CIP: ciprofloxacina, GN: gentamicina, STX: trimetoprim-sulfametozaxol.

R: Resistente

I: Intermedio

S: Sensible

Por otro lado, evaluamos la presencia de genes de virulencia y resistencia en los aislamientos de *S. aureus*. Identificamos que 52,6% (n=30) presentaban el gen de resistencia *mecA* (Tabla 3); mientras que el 49,1% (n=28) contaban con genes *pvl* (Tabla 4). Y además, determinamos el perfil de sensibilidad a antibióticos β-lactámicos, confirmando que el 54,3% (n=31) de los aislamientos eran resistentes a oxacilina, mientras que el 47,3% (n=27) eran resistentes a cefoxitina (Tabla 2). Ahora bien, comparamos la presencia de dichos genes con los perfiles de sensibilidad a antibióticos β-lactámicos y encontramos que, el 47,3% (n=27) eran resistentes a meticilina (SARM) pues presentaban el gen *mecA* y eran resistentes a oxacilina y cefoxitina. El 40,3% (n=23) eran sensibles a meticilina (SASM) debido a que carecían de gen de resistencia y el perfil de sensibilidad antibiótica los identificaba como sensibles tanto a oxacilina como a cefoxitina. Sin embargo, en el 5,2%(n=3) de los aislamientos se encontró el gen de resistencia *mecA*, pese a que eran sensibles a oxacilina y cefoxitina, por tanto, dichos aislados fueron clasificados como presuntivos *S. aureus* resistentes a meticilina (*mecA-positivos*) oxacilina sensibles (SARM-OS) (Saeed et al., 2014) y finalmente, el 7% (n=4) no contaban con *mecA*, pero eran resistentes a oxacilina, por lo que fueron clasificados como presuntivos *S. aureus* con sensibilidad *Borderline* a oxacilina (BORSA) o *S. aureus* con sensibilidad modificada a oxacilina (MODSA) (Hryniewicz & Garbacz, 2017) (Tabla 3). Una vez establecido el perfil de sensibilidad a antibióticos β-lactámicos, identificamos que 81.5% (n=22/27) de los aislamientos SARM presentaban los genes *pvl*, mientras que en los SASM el 21.7% (n=5/23) contaba con estos genes de virulencia, y únicamente un aislamiento presuntivo BORSA/MODSA se identificó como *pvl* positivo (Tabla 4).

Tabla 3. Sensibilidad a antibióticos β -lactámicos y presencia de gen de resistencia *mecA*. Se indica el porcentaje sobre total de los aislamientos y entre paréntesis la frecuencia de estos.

<i>S. aureus</i> 100% (57)				
Antibiótico β -lactámicos	<i>mecA</i> positivo 52.6% (30)		<i>mecA</i> negativo 47.3% (27)	
	R	S	R	S
OXA	47.3% (27)	5.2% (3)	7% (4)	40.3% (23)
FOX	47.3% (27)	5.2% (3)		47.3% (27)

OXA: oxacilina, FOX: cefoxitina
R: Resistente
S: Sensible

Por otro lado, determinamos la sensibilidad a antibióticos no β -lactámicos. Identificamos que el antibiótico con la tasa de resistencia más alta fue eritromicina con 21% (n=12), seguido por clindamicina con 12,28% (n=7), ciprofloxacina con 3,5% (n=2), gentamicina con 1,75% (n=1), y finalmente, no se detectaron aislamientos resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol (tabla 2). En su mayoría los aislamientos eran sensibles a antibióticos de este tipo 61,40% (n=35). Sin embargo, el 3,51% (n=2) presentaba resistencia a 3 antibióticos no β -lactámicos (ciprofloxacina, eritromicina y clindamicina) en donde se encontraban tanto SARM como presuntivos SARM-OS (Tabla 5).

Tabla 4. Presencia de genes *pvl* en aislamientos clasificados por el perfil de sensibilidad a antibióticos β -lactámicos. Frente a los títulos de cada categoría se indica el porcentaje de aislamientos con dicha característica sobre el total de los aislamientos, mientras en el interior de la tabla, se indica el porcentaje sobre los aislamientos clasificados por el perfil de sensibilidad a antibióticos β -lactámicos.

<i>S. aureus</i> 100% (57)				
Genes <i>pvl</i>	BORSA/MODSA*: 7% (4)	SARM: 47% (27)	SARM-OS*: 5.2% (3)	SASM: 40.3% (23)
Negativo 50.8% (29)	75% (3)	18.5% (5)	100% (3)	78.2% (18)
Positivo 49,1% (28)	25% (1)	81.5% (22)		21.7% (5)

*: Aislamientos presuntivos en la clasificación por sensibilidad a meticilina

Finalmente, los análisis de la región polimórfica X del gen *spa* permitió identificar 32 *spa-types*; dentro de los más prevalentes se encontró el clon t008 en 22.8% (n=13) de los aislamientos, t002 en 12.2% (n=7) y t024 en el 10.5% (n=6); Y aunque en menor proporción se hallaron los clones t084 en 5.2% (n=3), t1451 en 5.2% (n=3), t019 en 3.5% (n=2), t122 en 3.5% (n=2), t648 en 3.5% (n=2); mientras que los *spa-types* restantes: t018, t065, t4546, t209, t9434, t189, t3001, t743, t267, t9987, t1814, t4701 y t5608 se hallaron relacionados únicamente a un aislamiento. Aun así, para el 8.7% (n=5) no se identificó *spa-type*. Además, comparamos los clones hallados con cepas pandémicas de *S. aureus* y determinamos que existe relación entre los *spa-type* t008 con la cepa SARM Arcaica, t002 con cepas Pediátrica y NY-Japón y t0024 se relacionaban con SARM pertenecientes a los clones Arcaico e Ibérico. Asimismo, se halló una relación estrecha (menor a 2,8 distancia filogenética) con los clones Brasileño y Húngaro (Oliveira et al., 2001) (Figura 3).

Tabla 5. Perfil de sensibilidad antibióticas β -lactámicos y no β -lactámicos de los aislamientos *S. aureus pvl* positivos y negativos. Se indica el porcentaje sobre total de los aislamientos y entre paréntesis la frecuencia de estos.

		<i>S. aureus</i> 100% (57)									
Antibiótico no β -lactámicos		BORSA/MODSA*: 7% (4)		SARM: 47% (27)			SARM-OS*: 5.2% (3)		SASM: 40.3% (23)		
		R	S	R	I	S	R	S	R	I	S
<i>pvl</i> negativo 50.8% (29)	E,DA,CIP,GN,STX		1.7% (1)			3.5% (2)		3.5% (2)			19.2% (11)
	CIP,E,DA			1.7% (1)			1.7% (1)				
	E,DA	1.7% (1)							5.2% (3)		
	DA			1.7% (1)							
	GN	1.7% (1)									
	E				1.7% (1)				5.2% (3)	1.7% (1)	
<i>pvl</i> positivo 49.1% (28)	E,DA,CIP,GN,STX		1.7% (1)			24.5% (14)					7% (4)
	DA				1.7% (1)						
	GN				3.5% (2)						
	E			5.2% (3)	3.5% (2)					1.7% (1)	

E: eritromicina, DA: clindamicina, CIP: ciprofloxacina, GN: gentamicina, STX: trimetoprim-sulfametoaxol.

R: Resistente

I: Intermedio

S: Sensible

*: Aislamientos presuntivos en la clasificación por sensibilidad a meticilina

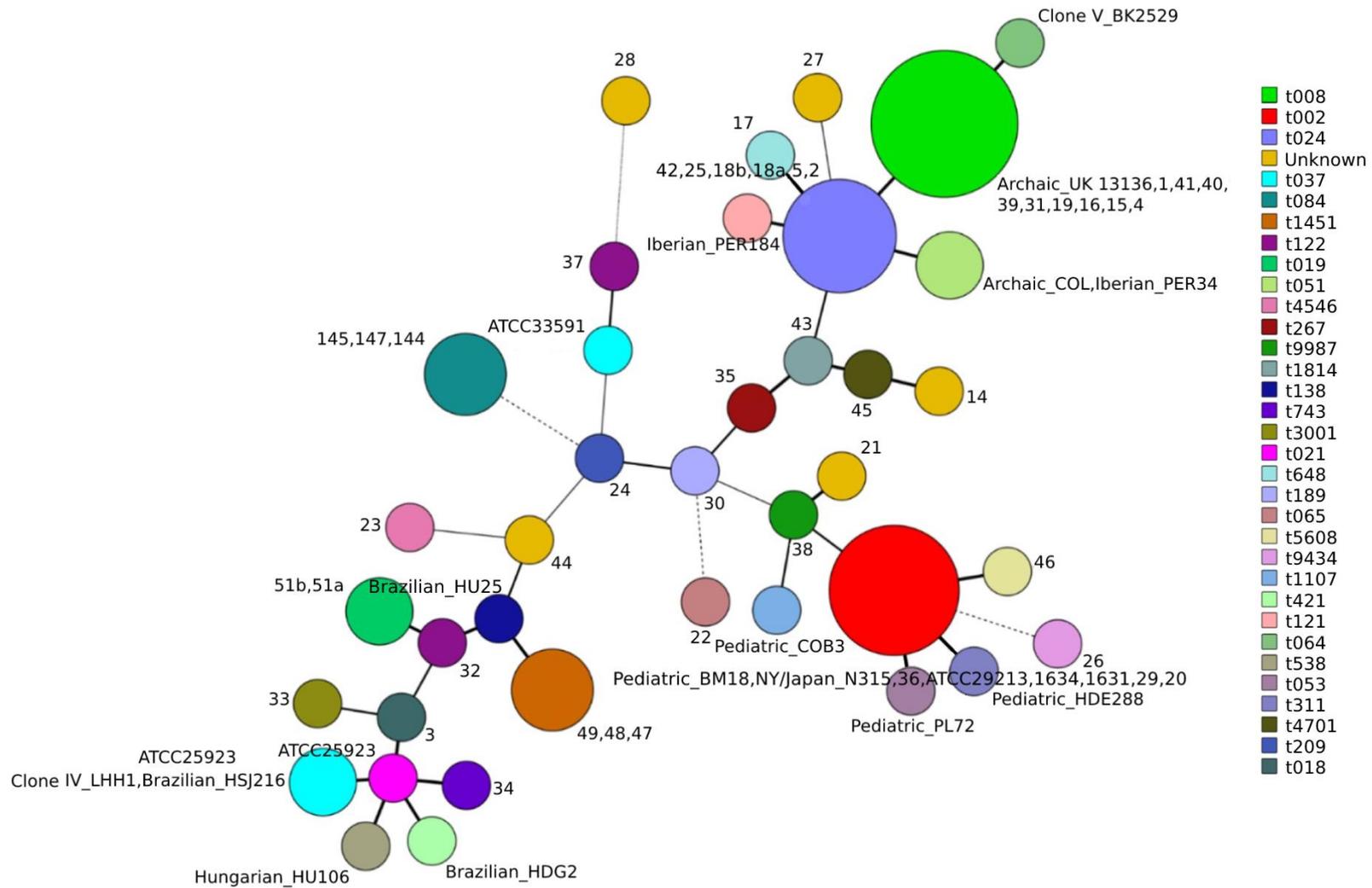


Figura 3. Árbol de expansión mínima de *spa*-Typing y clones pandémicos de *S. aureus* (Oliveira et al., 2001), indicado frente a cada nodo. Los colores indican el *spa*-type y el estilo de las líneas la distancia filogenética entre nodos (línea continua gruesa para diferencias de hasta 2,8; línea continua delgada para variaciones de hasta 4,59; línea continua más delgada para variaciones de hasta 6,4; línea discontinua para diferencias de hasta 8,19; y línea punteada superiores a 8,19).

Evaluación de actividad inhibitoria de péptidos antimicrobianos

Determinamos la actividad inhibitoria y bactericida de péptidos derivados de catelicidina. LL-37 presentó rango de actividad bacteriostática de 64-8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cuyo promedio fue 34,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A su vez ATRA-1 demostró actividad entre 32-4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con promedio de actividad de 16,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Mientras que daptomicina demostró actividad entre 8-0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con promedio de 0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por otro lado, la actividad bactericida de LL-37 se encontró en rango similar a su actividad bacteriostática, con un aumento de actividad promedio de 42,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por el contrario, el rango de actividad bactericida de ATRA-1 evidencio un leve aumento en rango 64-8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y promedio 24.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, similar a daptomicina que presento rango de actividad de 16-0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y promedio de 2,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Comprobamos que existe diferencias significativas para la actividad bacteriostática y bactericida entre los péptidos evaluados (Tabla 6, Figura 4).

Tabla 6. Rangos de actividad de péptidos de catelicidina detectados en los aislamientos de *S. aureus*. Se exprese la frecuencia de aislamientos a partir de su concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB).

Rango actividad ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CMI			CMB		
	LL-37	ATRA-1	DAP	LL-37	ATRA-1	DAP
64	11			24		
64-32	4			1	1	
64-16					3	
64-8	1					
32	18	7		21	19	
32-16	12	4		1	8	
32-8		2				
16	6	20		9	24	2
16-8	2	9			1	1
16-4						1
8	3	11		1	1	2
8-4		1	1			1
4		3	3			2
4-2			2			5
4-1						1
4-0.5			1			
2-1			2			6
2-0.5						2
1			1			7
1-0.5			3			4
0.5			4			12
0.5-0.25			16			5
0.5-0.125			6			
0.25			4			6
0.25-0.125			9			
0.125			5			
Total general	57	57	57	57	57	57

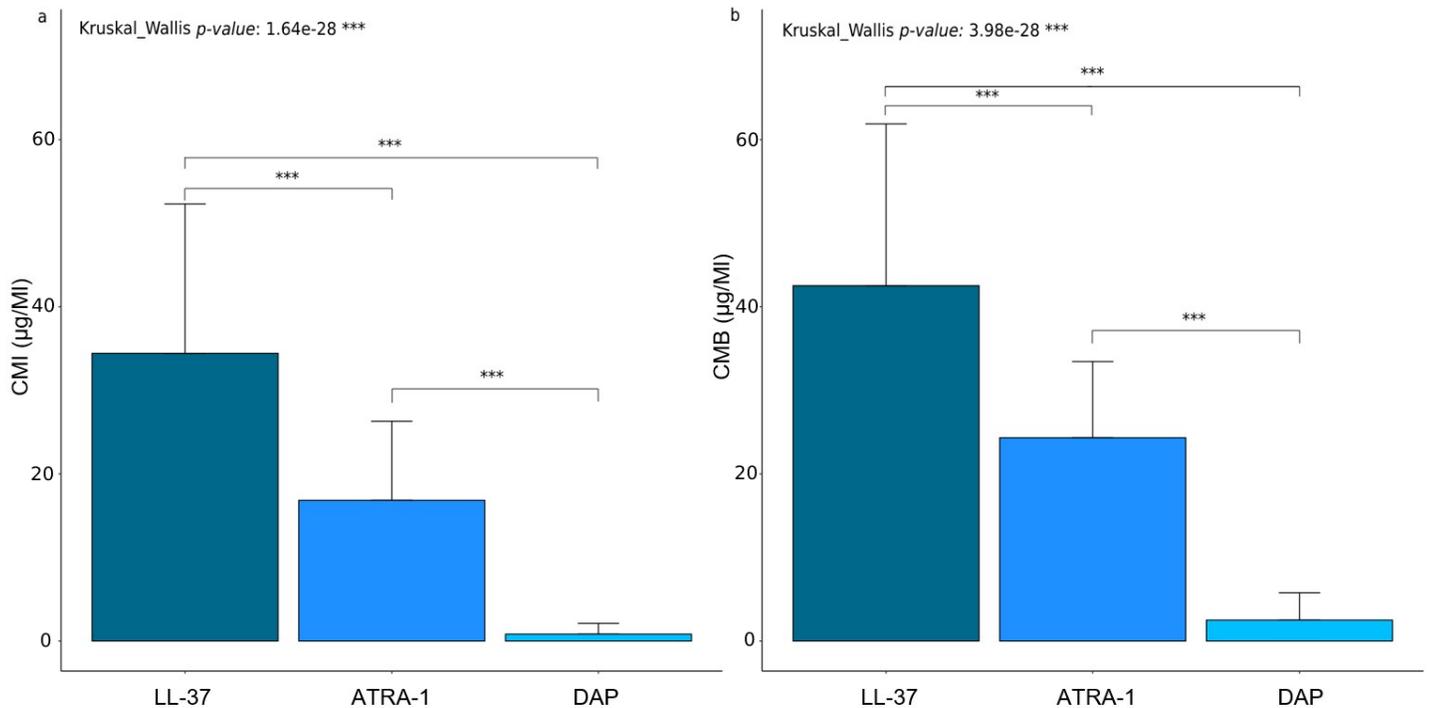


Figura 4. Actividad de péptidos derivados de catelicidina y daptomicina. A) Concentración mínima inhibitoria (CMI) y b) Concentración mínima bactericida (CMB) Los datos que se muestran resultan del promedio de tres experimentos independientes. DAP: daptomicina. Significancia *p-value* * <0.05, ** <0.001, ***<0.0001.

Por otro lado, comparamos la actividad antimicrobiana de péptidos derivados de catelicidina y daptomicina con relación a la presencia de genes de virulencia *pvl*, así como la caracterización del perfil de sensibilidad a antibióticos β -lactámicos. Determinamos que no existen diferencias significativas entre los aislamientos de *S. aureus* *pvl*-positivos y *pvl*-negativos (Figura 5), así mismo, no se hallaron diferencias significativas en la actividad antimicrobiana de péptidos ATRA-1 y daptomicina; por el contrario, LL-37 evidenció diferencias estadísticamente significativas en la capacidad bactericida del mismo, en especial que se relacionaban con las CMB de los aislamientos presuntivos SARM-OS ,cuyos rangos de actividad fueron 32-8 $\mu\text{g/ml}$, con SARM y SASM con rango de actividad 64-16 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 8, Figura 6). Pero, es evidente que los aislamientos con perfiles de sensibilidad a meticilina discordantes (presuntivos SARM-OS y BORSA/MODSA) presentaron menor CMI y CMB con el péptido LL-37, mientras que para ATRA-1 se ilustra el patrón contrario.

Además, evaluamos las diferencias entre la actividad antimicrobiana de LL-37, ATRA-1 y daptomicina clasificados por la sensibilidad a antibióticos no β -lactámicos. Verificamos que no existe efectos diferenciales estadísticamente significativo con relación a la resistencia o sensibilidad a antibióticos con mecanismos diferentes a meticilina (Figura 7). Pese a esto, detectamos que frente a LL-37 los aislamientos con resistencia a por lo menos tres antibióticos no β -lactámicos y aquellos que presentaban resistencia a gentamicina, contaban con CMI interesantemente más bajas en comparación con los aislamientos con sensibilidad intermedia a este mismo antibiótico, e incluso con aislamiento resistentes a otros antibióticos, panorama que contrasta nuevamente con ATRA-1 en el cual las concentraciones más altas se hallaron relacionadas a aislamientos resistentes a ciprofloxacina, eritromicina y clindamicina.

Finalmente, para daptomicina la actividad de péptidos se mantuvo relativamente semejante pese a las diferencias en resistencia a antibióticos no β -lactámicos (Figura 7).

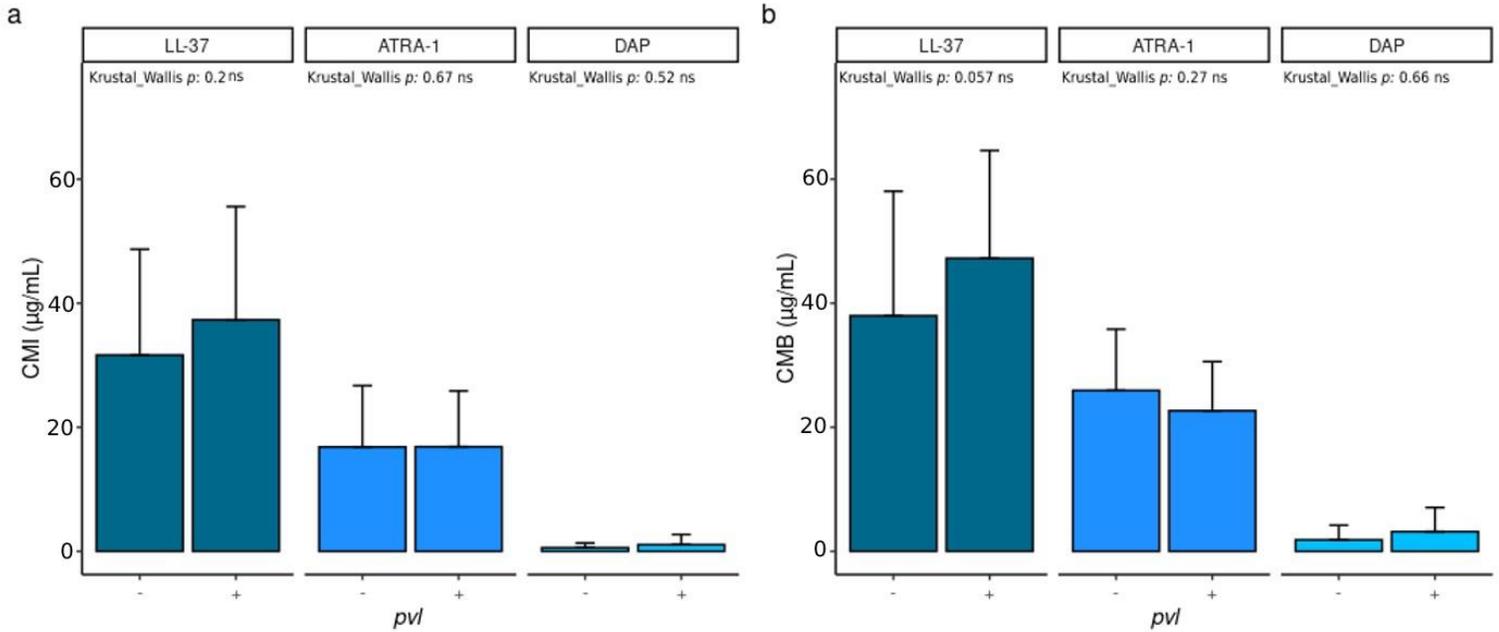


Figura 5. Actividad antimicrobiana de péptidos por presencia de genes *pvl*. A) Concentración mínima inhibitoria (CMI) y b) Concentración mínima bactericida (CMB) Los datos que se muestran resultan del promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. DAP: daptomicina.

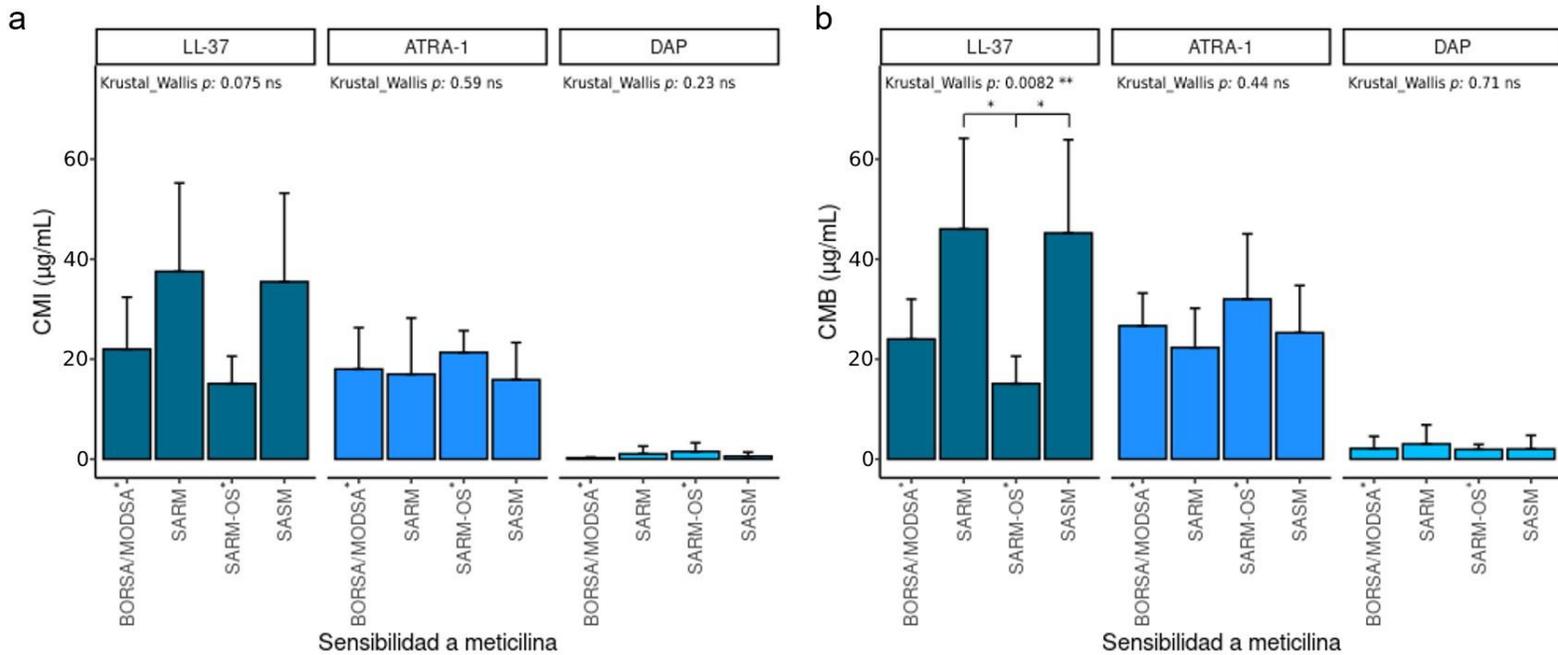


Figura 6. Actividad antimicrobiana de péptidos por el perfil de sensibilidad a antibióticos β -lactámicos. A) Concentración mínima inhibitoria (CMI) y b) Concentración mínima bactericida (CMB) Los datos que se muestran resultan del promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. DAP: daptomicina. Significancia *p-value* * <0.05, **

<0.001, ***<0.0001.

Tabla 7. Rangos de actividad de péptidos de catelicidina detectados en los aislamientos de *S. aureus* clasificandos mediante perfil de sensibilidad antibióticos β -lactámicos. Se exprese la frecuencia de aislamientos a partir de su concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB).

Rango De actividad (μ g/mL)	BORSA/ MODSA*			SARM			SARM-OS*			SASM													
	CMI	CMB		CMI	CMB		CMI	CMB		CMI	CMB												
	LL-37 ATRA-1 DAP																						
64				6			13						5			11							
64-32				3			1						1				1						
64-16								2					1										
64-8													1										
32	2	1		2	2		10	4		10	7			1	6	2	9	9					
32-16					1		3	2		4		2		1	7	2		3					
32-8								1				1											
16	1	1		2	1		3	9		3	12	2		2	1	1	2	8	3	10			
16-8		2					1	3			1		1					4			1		
16-4												1											
8	1						1	4			1	1		1			1	7			1		
8-4								1	1													1	
4								3	1			2		1					1				
4-2									2			3										1	
4-1																						1	
4-0.5																						1	
2-1						1			1			3										1	
2-0.5																						1	
1						1			1			1										1	
1-0.5						1			3			2										1	
0.5			1			1			2			8										1	
0.5-0.25									9													7	
0.5-0.125									1					1								4	
0.25									1			4										3	
0.25-0.125									2													4	
0.125									3													1	
Total general	4	4	4	4	4	4	27	27	27	27	27	27	3	23	23	23							

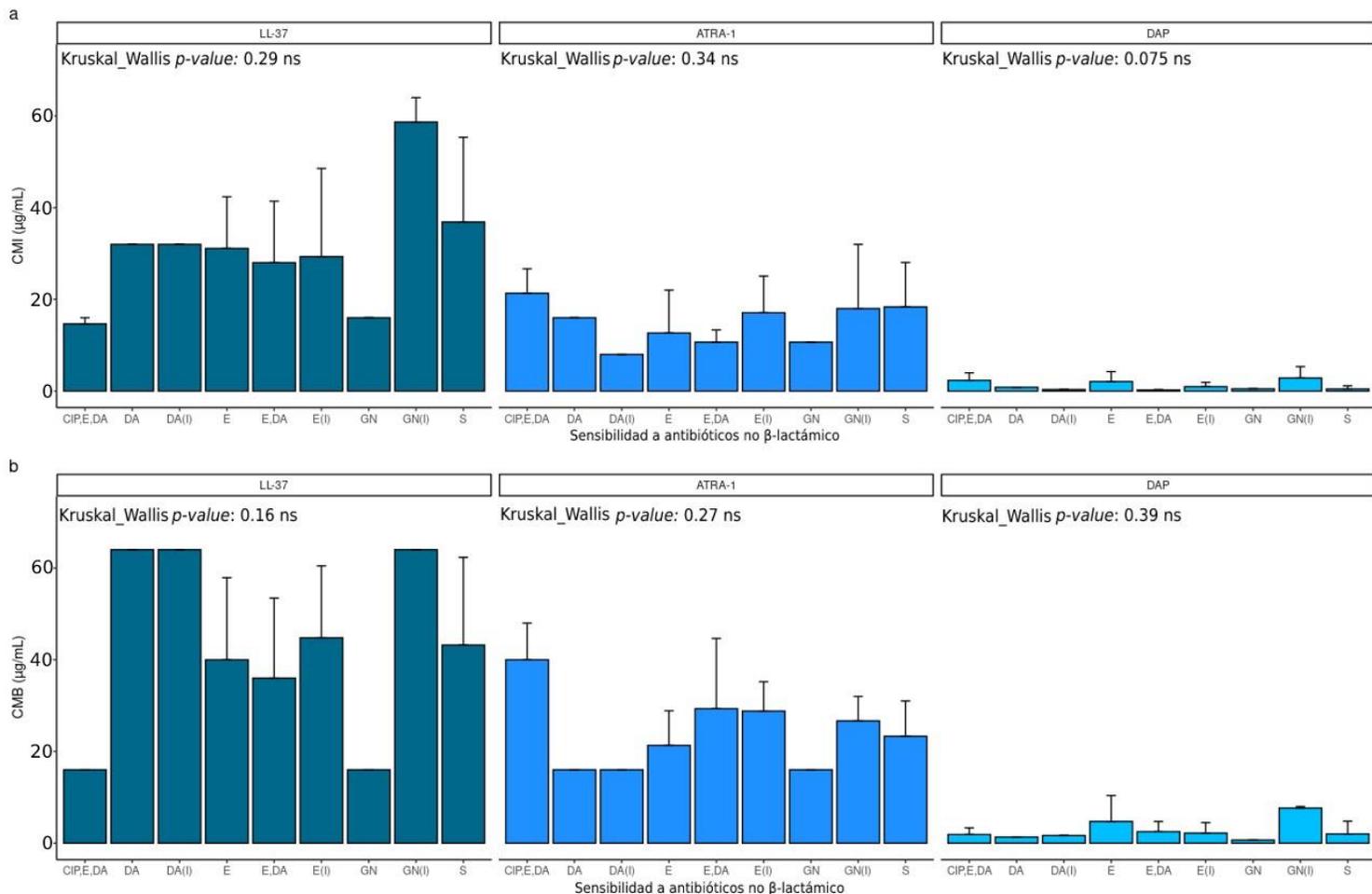


Figura 7. Actividad antimicrobiana de péptidos clasificados por sensibilidad a antibióticos no β -lactámicos. a) Concentración mínima inhibitoria (CMI) y b) Concentración mínima bactericida (CMB) Los datos que se muestran resultan del promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. DAP: daptomicina. E: eritromicina, DA: clindamicina, CIP: ciprofloxacina, GN: gentamicina, STX: trimetoprim-sulfametoaxol. S: Sensibilidad a todos los antibióticos no β -lactámicos.

Efecto de péptidos antimicrobianos sobre la morfología de *S. aureus*.

Examinamos los efectos de péptidos derivados de catelicidina sobre la morfología de *S. aureus*. Detectamos que LL-37 causa daño morfológico notable sobre la superficie bacteriana, tanto en la concentración sub-CMI ($\frac{1}{2}$ CMI) como supra-CMI (2 CMI) que se manifiestan con aumento de la rugosidad de la bacteria y presencia de poros que aumentan de tamaño con el incremento en la concentración del péptido (Figura 8). De otra forma, ATRA-1 evidenció cambios morfológicos menores a la exposición del péptido, con la generación de poros de menor tamaño que se mantienen en el tratamiento sub-CMI y supra-CMI. Finalmente, daptomicina como se esperaba genera pérdida de la morfología superficial de forma mucho más drástica, generando remanentes celulares luego de la acción del antibiótico (Figura 8).

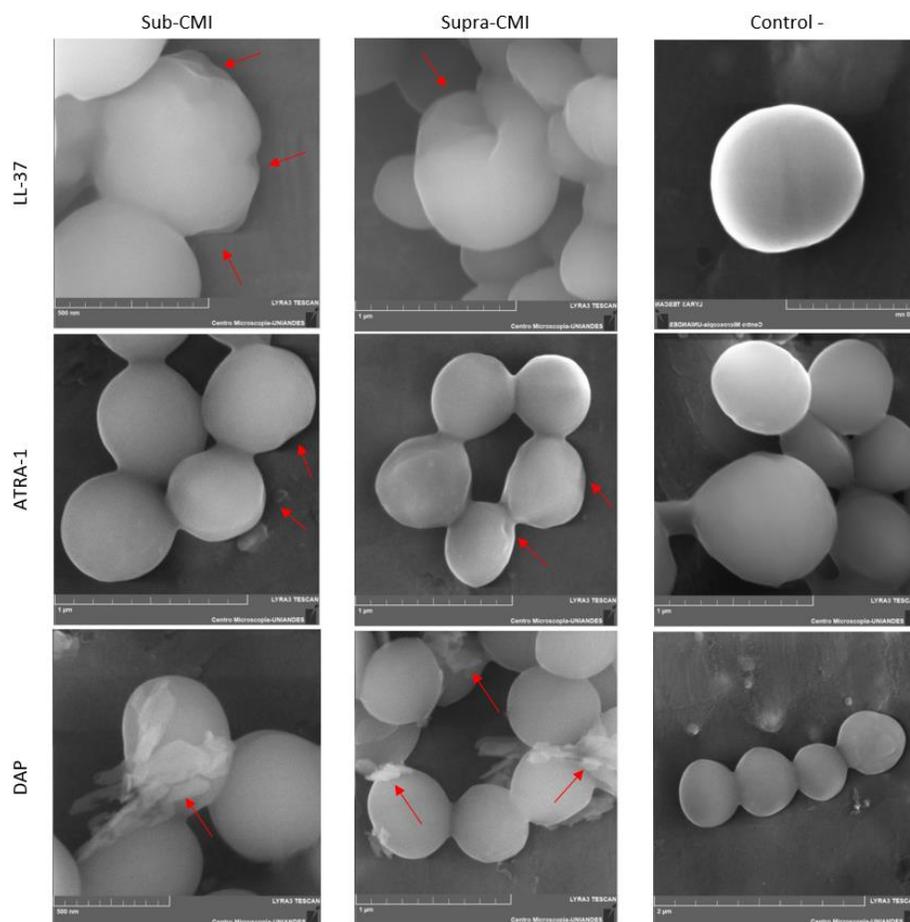


Figura 8. Efecto de péptidos derivados de catelicidina y daptomicina en la morfología superficial de *S. aureus*, tratada en sub y supra-CMI con los péptidos LL-37, ATRA-1 y daptomicina. Las flechas en rojo indican cambios en la morfología superficial con respecto al control de crecimiento. sub:1/2CMI y supra: 2CMI, DAP: daptomicina; en cada fotografía, parte interior izquierda se describe la escala.

Discusión:

S. aureus es uno de los patógenos más estudiados en el mundo, pese a esto, esta bacteria no deja de sorprendernos con la asombrosa habilidad para adaptarse de forma eficiente a diferentes ambientes, desafiando constantemente a la humanidad, en una lucha por encontrar alternativas que sobrepasen las dificultades que trae consigo este patógeno (Santaniello et al., 2020). Desde este enfoque, el presente proyecto busca contribuir al estudio de este microorganismo a nivel descriptivo y potencialmente terapéutico, y de esta forma, avanzar en la búsqueda de estrategias para el control de este. Comprobamos que los aislamientos analizados en este estudio corresponden la especie *S. aureus*, aun así, es interesante hallar un grupo de ellos con distancia evolutiva relativamente mayores en comparación con los demás taxones analizados y pese en gen 16s *rARN* los agrupo en un mismo clado, mediante análisis de *spa-type* estos fueron agrupados en clones diferentes en donde 5 correspondían a t0024, 14 clasificación *spa-type* desconocida, 45 a t4701 y 46 a t5608. Estas ramas largas en los análisis filogenéticos pueden manifestarse en tres casos, en el primero de ellos este linaje evoluciona sin aumentar la tasa de división de clados; En el segundo caso, las ramas experimentarías una tasa acelerada de evolución molecular y finalmente en el caso tres, se presume que los taxones habrían sido podados, es decir se eliminaron secuencias más cercanas a las ramas en cuestión (Pellens & Grandcolas, 2016). Este último caso lo descartados debido a que mediante BLASTn confirmamos que los aislamientos con ramas largas corresponden a *S. aureus*; Por tanto, nos quedan los dos primeros casos en los cuales se evidenciarían historias evolutivas poco usuales, que podrían estar dadas por la baja discriminación que presenta este marcador molecular en variaciones intraespecie (Klemetsen et al., 2021) y que explicarían porque en análisis de gen 16s *rARN* estos aislamientos se encuentran cercanamente relacionados, mientras que en análisis de otro marcador como el gen *spa*, los mismos son hallados en agrupaciones diferentes. Por tanto, consideramos que dichos hallazgos deben confirmarse mediante análisis filogenético con otros marcadores moleculares, tal como han sugerido otros autores (Pellens & Grandcolas, 2016). Uno de los cuales ha sido útil en el análisis de esta especie, es el gen *gap*, este codifica para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y secuencias parciales del mismo han demostrado ser una herramienta complementaria útil, junto con marcador 16s *rARN*, para el análisis filogenético de *Staphylococcus* (Ghebremedhin et al., 2008). Por tanto, es evidentes que se requiere emplear diversas herramientas moleculares para la adecuada descripción de aislamientos *S. aureus*.

Los primeros casos de resistencia a meticilina se reportaron en el Reino Unido en 1961, solo un año después de la introducción de este antibiótico como tratamiento para *S. aureus*. Estos casos comenzaron a propagarse adquiriendo distribución mundial, no solo en ambientes hospitalarios sino en la comunidad (Enright et al., 2002). El fenotipo de estos aislamientos se detecta mediante técnicas tanto fenotípicas como pruebas de difusión en disco con cefoxitina y oxacilina, E-test de oxacilina, agar cromogénico y test automatizados como sistema VITEK-2 y técnicas moleculares como la detección de gen *mecA*, incluso este último, se considera *gold-standard* para la clasificación de SARM (Thampi et al., 2019). Sin embargo, como comprobamos en este estudio el uso de una única técnica para la identificación de aislados resistentes a estos antibióticos es insuficiente. Pues al comparar los perfiles de sensibilidad antibiótica y molecular, encontramos aislamientos que a pesar de contar con el gen *mecA*, eran susceptibles a oxacilina y cefoxitina, estos suelen clasificarse como *S. aureus* sensibles a oxacilina/cefloxitin *mecA*-positivos (SARM-OS) (Saeed et al., 2014). Las características propias de estos aislamientos se atribuyen a posibles mutaciones en los sistemas de regulación *mecA*, en especial en el sitio de unión de *mecI* al

promotor, lo que se manifiesta en regulación negativa de la expresión de PBP2a, y por lo anterior, aumento en la sensibilidad a oxacilina (Chen et al., 2014); de forma similar, mutaciones en el sitio de unión al ribosoma en *mecA* atenúan la resistencia a oxacilina (Chen et al., 2014). Pese a que no confirmamos la presencia de dichas mutaciones, las discordancias halladas en la presencia del gen de resistencia y el perfil de sensibilidad a antibióticos β -lactámicos soportan la clasificación de dichos aislamientos como sugestivos SARM-OS. Los aislamientos de este tipo representan un problema en la identificación mediante técnicas fenotípicas, y pueden ser fácilmente mal caracterizados en laboratorios clínicos, lo que lleva a problemas en el tratamiento y posiblemente falla terapéutica (Saeed et al., 2014). Además, encontramos aislamientos que no presentaban gen de resistencia *mecA*, sin embargo, eran resistentes a oxacilina, fenotipo vinculado a aislamientos *S. aureus* con sensibilidad *Borderline* a oxacilina (BORSA) o *S. aureus* con sensibilidad modificada a oxacilina (MODSA). Estos aislamientos representan un fenotipo difícil de entender e identificar dentro de la sensibilidad a antibióticos β -lactámicos en *S. aureus* (Hryniewicz & Garbacz, 2017). El hecho de no contar con el gen *mecA* permite deducir que su mecanismo de resistencia no está asociado a la producción de PBP modificadas relacionadas a este gen. En su lugar, la hiperproducción de β -lactamasas o mutaciones sobre PBP nativas explicarían mucho mejor este fenotipo (Hryniewicz & Garbacz, 2017). A pesar de esto, dichos aislamientos no pueden clasificarse como sensibles o resistentes a meticilina, no obstante, su epidemiología suele ser muy similar a SARM, aunque por lo general son mucho menos diagnosticados, lo que representan un problema generalmente desatendido (Hryniewicz & Garbacz, 2017). Debido a que no confirmamos la presencia de mutaciones en PBP nativas de *S. aureus* o producción de β -lactamasas, los aislamientos con estas características fueron clasificados como presuntivos BORSA/MODSA. En el futuro, es necesario realizar la confirmación de dichas características en estos aislamientos. Aun así, resaltamos la importancia de estos fenotipos, pues dificultan la adecuada detección en clínica, mostrando que es necesario el uso de pruebas complementarias para su detección, que involucren tanto análisis genotípicos como fenotípicos.

Comparamos la presencia de genes de virulencia y comprobamos que los genes *pvl* se encuentran en un porcentaje importante de estos aislamientos, siendo más frecuente en SARM que en SASM, resultados que concuerdan con los reportes realizados en otros países de Latinoamérica (Abente et al., 2016), incluyendo a Colombia (Escobar-Pérez et al., 2014). Solo un pequeño porcentaje de *pvl+* se encontraron en aislamientos presuntivos BORSA/MODSA, y aun cuando no se cuenta con suficiente información para establecer la tendencia de *pvl* en estos aislamientos, se creía que cepas con sensibilidad *borderline* a oxacilina carecen del locus para la síntesis de la leucotoxina (Hryniewicz & Garbacz, 2017), sin embargo, los resultados en este estudio indican lo contrario. La toxina *Panton-Valentine* se considera un factor de virulencia importante para el desarrollo de enfermedad por *S. aureus* y una de las causas del incremento en la severidad de infecciones de piel y tejidos blandos en especial en SARM-AC (Löffler et al., 2010), por tanto, contar con una alta proporción de estos genes evidencia un panorama preocupante, aun mas cuando estos se encuentran en aislamientos de difícil detección como presuntivos BORSA/MODSA. |

Este estudio se demostró alta proporción de sensibilidad a antibiótico no B-lactámicos tanto en SARM como en SASM para los aislamientos analizado; siendo mayor en SARM, lo que contrasta con resultados previamente publicados, en los cuales SARM tendían a presentar resistencia a antibiótico como eritromicina, clindamicina, trimetoprima-sulfametoxazol (Ong et al., 2013). Aun así, comprobamos que el antibiótico con mayor tasa de resistencia fue eritromicina, seguido por

clindamicina, y gentamicina concordando con lo reportado por otros autores en el país (Collazos Marín et al, 2015). Los mecanismos que se relacionan con esta resistencia están vinculados a la adquisición de genes *erm* codificantes de metilasas ribosomales, así como bombas de eflujo codificadas por el gen *msrA* que impiden el adecuado ingreso del antibiótico a la célula (Piątkowska et al., 2012) (Mwambi et al., 2014), y enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMA) relacionadas con los genes *aac(3)-Iia*, *aac(6')-Ib* entre otros (Díaz et al., 2004); elementos genéticos relacionados con resistencia que en su mayoría son transmisibles mediante transferencia horizontal de genes (Van Hoek et al., 2011), y por lo anterior su transferencia entre aislamientos de diversas fuentes es plausible. Por otro lado, fue evidente que en algunos aislamientos se presentó resistencia de hasta tres antibióticos no B-lactámicos de diferentes familias (eritromicina, clindamicina y ciprofloxacina), esto unido a la resistencia a meticilina e inclusive en presuntivos BORSA/MODSA y SARM-OS, denotando un fenómeno de multiresistencia dentro de los aislamientos estudiados en este proyecto (Magiorakos et al., 2012). Es interesante notar que los aislamientos multiresistentes generalmente se asocian a clones con características moleculares similares a clon chileno, que en general es resistente a antibióticos como eritromicina, gentamicina, ciprofloxacina y clindamicina, además de la resistencia a oxacilina; y aún más preocupante, se han documentado como causantes de infecciones hospitalarias en Colombia (Escobar-Pérez et al, 2014). En efecto, este hecho pese a que no deja de ser preocupante, pues en Colombia la tasa de multiresistencia en SARM es de 46,6 %, y particularmente para estos antibióticos es del 15,8% en UCI y 23,7% en no-UCI (Orozco et al., 2018), esto en parte gracias a que estos antibióticos se encuentran recomendados por las guías de manejo de infecciones de piel y tejidos blandos (Valderrama-Beltrán et al., 2019). Sin embargo, debido a que esta resistencia fue hallada en aislamientos de difícil detección, el presente hallazgo resulta alarmante y resalta la importancia realizar seguimientos a este fenómeno en la ciudad.

Debido a la asombrosa habilidad de *S. aureus* para colonizar, adaptarse a nuevos ambientes, diseminarse y generar enfermedad, cada vez toma más relevancia detectar y describir los clones de esta bacteria que pueden generar mayor riesgo para los humanos (Jokinen et al., 2018). Gracias a esto, *spa typing* toma un papel interesante como una de las técnicas novedosas para la descripción de clones de importancia clínica y epidemiológica en patógenos como *S. aureus* (Jokinen et al., 2018). Detectamos que los clones más prevalentes dentro de nuestro estudio fueron t008, t002 y t024. Se ha descrito cambios en la presencia de clones *spa* en los diferentes continentes, sin embargo, dentro de los más encontrados en Europa, Asia y América se encuentran t008 y t002; mientras que el continente africano los clones de mayores prevalencia son t037, t084 y t064 (Oliveira et al., 2001); clones que, aunque en menor proporción, también están presentes dentro de nuestros aislamientos. Sin embargo, no se detectó el *spa* clon t149 que característicamente se asocia al clon chileno-cordobés (Ocampo et al, 2014), uno de los más prevalentes en Latinoamérica y en especial en nuestro país y que además es una de las principales causas de infecciones hospitalarias (Chávez et al, 2015).

Además, comparamos la presencia de *spa-types* con clones pandémicos y encontramos que los tres clones más frecuentes, están a su vez relacionados con clones Arcaico, Pediátrico y NY-Japones, causantes de epidemias en Reino Unido, Dinamarca, Portugal, Polonia, USA, Argentina, Colombia, y Japón (Oliveira et al., 2001) e incluso con cepas USA-300 que se vinculan a SARM-AC, siendo esta última uno de los clones de mayor importancia en USA y Colombia debido a su alta virulencia y capacidad de diseminación en la población (Jokinen et al., 2018). Observamos con preocupación que dentro de los presuntivos SARM-OS hallados se encuentran aislamientos t002 y esto representa una asociación aún más alarmante, pues este clon se ha aislado en una importante

proporción en cepas SARM asociadas a animales de ganadería (*Livestock-Associated SARM*) llegando a considerarse un indicador de cepas este tipo (Köck et al., 2013); esto llama la atención acerca de diseminación de aislamientos de *S. aureus* en ambientes que no se consideraban anteriormente un nicho ecológico para este patógeno resistente, y que puede incidir directamente en la salud pública a nivel tanto local como global. El hecho de reconocer aislamientos difíciles de clasificar, que generalmente son desatendidos y que se relacionan con cepas causantes de epidemias a lo largo de la historia, resulta ser especialmente preocupante. Por consiguiente, este estudio resalta la importancia de identificar y rastrear dichos fenotipos en la región, a fin de disminuir su nivel de transmisión, en especial para cepas altamente virulentas.

El panorama actual pone de manifiesto la necesidad de contribuir no solo a la vigilancia de aislamientos de *S. aureus*, sino a la generación de nuevos enfoques terapéuticos que mejoren el curso de infecciones por este microorganismo. Conforme a lo anterior, este estudio demostró que LL-37, ATRA-1 y daptomicina presentan actividad tanto bacteriostática como bactericida en aislamientos de *S. aureus*. Confirmando que el péptido ATRA-1 presenta mejor capacidad antimicrobiana en comparación con LL-37, esto concuerda con datos previamente reportados, en los cuales los péptidos sintéticos basados en la secuencia de catelicidina presentan una mayor potencial antimicrobiano que el péptido nativo (Dean et al., 2011b) y se atribuye a que LL-37 es un péptido del sistema inmune innato (Dürr et al., 2006), con el cual bacterias patógenas co-evolucionan, por tanto no es extraño que gradualmente se genere resistencia a esta molécula (Baindara et al., 2020). Además, ATRA-1 cuenta con mayor carga y un grupo amida en el extremo C-terminal, características que se ha demostrado incrementan la actividad antimicrobiana de los péptidos catiónicos (Papanastasiou et al., 2009)(R Dennison et al., 2012). Aun así, ATRA-1 no alcanza la actividad inhibitoria de daptomicina, esto en parte, debido a que daptomicina presenta diversos blancos terapéuticos sobre las células, que abarca desde disrupción de la membrana, hasta repolarización de la células, inhibición de la síntesis de ATP, incluso agregación con la proteína Usp2 involucrada en la respuesta al estrés en células bacterianas, aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Po et al., 2021), por tanto es de esperar que este compuesto antibiótico, con diversos blancos intracelulares comprobados, genere la muerte celular más eficientemente, en comparación con otros péptidos antimicrobianos.

Por otro lado, evaluamos la actividad de péptidos derivados de catelicidina y daptomicina entre aislamientos clasificados por sus características moleculares y de sensibilidad antibiótica. La toxina *Panton-Valentine* afecta principalmente a los neutrófilos polimorfonucleares causando poros sobre las células (Cardot-Martin et al., 2015) mismas células responsables de la producción de péptidos antimicrobianos también conocidos como α -defensinas dentro de las que se cuenta LL-37 (Puklo et al., 2008). Este péptido además de contar con capacidad antimicrobiana se ha demostrado que puede inhibir la acción de toxinas como las producidas por los genes *pvl* (Toor et al., 2021). Por tanto, pese a que no se evidenció diferencias significativas en la actividad de péptidos antimicrobianos frente a la presencia o ausencia de genes *pvl*, no debe descartarse que LL-37 e inclusive ATRA-1 generen una ventaja en la disminución de la toxicidad de *S. aureus pvl*-positivos como han evidenciado otros péptidos similares pertenecientes a la familias de las catelicidinas (Cardot-Martin et al., 2015), pues estudios previos han demostrado generar inhibición en la producción de exotoxinas con una mínima o nula inhibición en el crecimiento bacteriano, esta capacidad inhibidora de exotoxinas depende de la porción de aminoácidos de carga positiva (Merriman et al., 2014), característica con la que cuentan los péptidos probados en este estudio.

Por otro lado, demostramos que la actividad bactericida de LL-37 se ve afectada por sensibilidad a

metilina, en tanto que los aislamientos presuntivos SARM-OS presentan muerte celular bacteriana en concentraciones menores a SARM y SASM. Desconocemos la causa que llevan a diferencias entre estos aislamientos, sin embargo reconocemos que los aislamientos con sensibilidad a oxacilina *mecA*-positivos presentan diversas mutaciones que explicarían la sensibilidad a estos antibióticos y que afectan la composición y morfología de la pared bacteriana (Boonsiri et al., 2020), un componente que interactúa con los péptidos antimicrobianos y que afectan la unión entre estos y su blanco celular principal, la membrana (Malanovic & Lohner, 2016), por tanto no desechamos la hipótesis que se presenten cambios sobre la pared bacteriana u otros componentes bacterianos en presuntivos SARM-OS, que mejoren la actividad a esta molécula antimicrobiana, cambios que sería relevante determinar más adelante, pues mediante estos se pueden definir tanto poblaciones bacterianas en las cuales se potencia la acción antimicrobiana de nuevas moléculas, así como identificar posibles factores de resistencia frente a alternativas terapéuticas novedosas.

Es aún más interesante, que LL-37 y ATRA-1 presentan patrones de actividad contrarios con relación a la sensibilidad a metilina, mostrando que aunque dichas diferencias en la inhibición del crecimiento y la muerte bacteriana no fueron en su totalidad significativas entre todos los grupos evaluados, podría existir selección del péptido con mejor habilidad antimicrobiana frente a cada grupo de aislamientos a partir de la sensibilidad a otros compuestos antibióticos, y en ese sentido podría, en el futuro, diseñarse tratamientos específicos para el tratamiento de estos patógenos con sensibilidad discordante a metilina. Además, hallamos que LL-37 presenta mejor actividad antimicrobiana en aislamientos multirresistentes y resistentes a gentamicina, mostrando que este péptido proporciona una alternativa terapéutica promisoriosa en infecciones por *S. aureus* aun cuando se evidencia resistencia a otros fármacos, aun así es interesante notar que en aislamientos con sensibilidad intermedia a gentamicina está compuesto requiere concentraciones mucho más altas para llevar su efecto antimicrobiano. En cuanto a esto, no es desconocido que la resistencia a antibióticos en algunos casos genera sensibilidad colateral a péptidos antimicrobianos (Lázár et al., 2018), lo que explicaría el aumento en la sensibilidad de LL-37 frente a los aislamientos con mayor grado de resistencia a antibióticos con mecanismos de acción muy diversos; y por el contrario disminución en la actividad en aislamientos con sensibilidad intermedia. Aun así, es evidente que ATRA-1 no presenta este mismo patrón de sensibilidad en aislamientos multirresistentes. Esta diferencia lejos de desconocer la habilidad de ambos compuestos para generar la muerte bacteriana, señala que existen diferencias en la actividad de los mismos frente a este patógeno bacteriano, diferencias que para otros péptidos antimicrobianos se explica gracias a variaciones en la longitud del mismo y la interacción con la carga negativa de la membrana (Liu et al., 2007), y en el futuro sería pertinente establecer las causas que llevan a éstas diferencias.

En la actualidad se sabe que los péptidos antimicrobianos interactúan con las membranas bacterianas como mecanismo de acción primario. Sin embargo, no es extraño encontrar moléculas de este tipo con mecanismos de acción diversos, incluso en los cuales no se genera poros sobre la bicapa para efectuar su acción (Graf et al., 2017). Por tanto, determinar si los péptidos catiónicos LL-37 y ATRA-1 ejercen su efecto sobre este componente vital de la célula bacteriana es un punto clave en el estudio de su potencial antibiótico.

Determinamos que LL-37 y ATRA-1 generan cambios en la morfología superficial de *S. aureus*. Sin embargo, contrario a lo esperado, ATRA-1, que mostro mayor actividad bacteriostática y bactericida, efectuó cambios morfológicos más modestos en comparación con LL-37. Aun así, esto

no parece ser completamente extraño, pues péptidos basados en la secuencia de ATRA-1 también han evidenciado comportamiento similar (M. L. Juba et al., 2015), a los cuales se les atribuye posible generación de poros poco dilatados por debajo de la resolución óptica que permite esta técnica de microscopía (500 nm) (M. Juba et al., 2013), incluso se han propuesto mecanismos disruptivos de membrana como *carpet-like*, en el cual contrario a la formación de un poro, los péptidos se disponen sobre la barrera y generan canales transitorios que permiten el paso de moléculas de bajo peso molecular, antes de la lisis membranal completa (Shai & Oren, 2001). Aún más importante dicha formación de canales transitorios, se ha visto vinculada con la translocación de péptidos al interior de la célula, afectando procesos biológicos vitales como replicación de ADN, síntesis y plegamiento de proteínas (Cardoso et al., 2019).

Por lo anterior, postulamos que ATRA-1 podría presentar mecanismos de acción sobre membrana semejante a generación de disrupciones transitorias que posiblemente, dieran paso a mecanismos de acción interna, generados por la posible translocación del péptido, lo que potenciaría la acción antimicrobiana incluso sobre otras moléculas como LL-37. Sin embargo, consideramos que se requieren estudios adicionales que permitan confirmar la translocación y subsecuente acción intracelular del péptido sobre patógenos bacterianos como *S. aureus*.

Por otro lado, daptomicina es un péptido antimicrobiano de gran habilidad bactericida en *S. aureus* (Mascio et al., 2007), hecho que comprobamos en este estudio. Algunos autores han postulado que su acción depolarizadora no generaba daño sobre la morfología, por lo menos no al nivel de otros péptidos antimicrobianos mediante la formación de poros (Huang, 2020). Sin embargo, lejos de ser así, la polimerización mediada por Ca^{2+} lleva a ruptura de membrana, pérdida de integridad de la pared y posterior liberación de contenido intracelular (Hobbs et al., 2008), incluso se ha reportado pérdida parcial de pared bacteriana y generación de bacterias fantasmas (Condrad, 1998). Además, pese a que en la actualidad no se conocen con certeza todos los puntos de acción de este antibiótico, se han postulado diversos blancos terapéuticos, dentro de los que se destacan componentes de la membrana y pared bacteriana (Müller et al., 2016), por tanto, pensar que esta molécula no efectuó un cambio apreciable sobre la morfología superficial del patógeno es un tanto inverosímil, y en consecuencia, este estudio evidencia cambios en la morfología de *S. aureus*, interpretados como remanentes celulares luego de la acción del péptido. Aun así, tenemos que recordar que daptomicina se considera antibiótico de *última línea* para el tratamiento de infecciones por Gram-positivos (Turner et al., 2021), y que pese a su asombrosa capacidad bacteriostática y bactericida esta molécula no es inmune al desarrollo de resistencia por parte del microorganismo, incluso son cada vez más frecuentes los casos de resistencia cruzada con otros antibióticos de *última línea* como vancomicina en SARM (Thitiananpakorn et al., 2020).

Así mismo, este antibiótico ha presentado efectos secundarios serios, incluso relacionados con casos fatales si no se reconocen a tiempo (Miller et al., 2010)(Yamada et al., 2020). Por tanto, aun cuando no se alcanzó la actividad inhibitoria de daptomicina, las alternativas que ofrece ATRA-1 y LL-37 son sumamente notables, en especial al considerar que ensayos de hemólisis muestran daño celular de hasta 3% con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de daptomicina (Vasilchenko et al., 2020), mientras que ATRA-1 solo genera 0,9% en concentración de hasta 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (de Latour et al., 2010), por tanto ATRA-1 muestra ventaja en términos de la potencial seguridad del fármaco; Sin embargo, es importante confirmar esta baja capacidad hemolítica, así como el efecto del mismo sobre otras células humanas, previa a la formación del péptido como tratamiento alternativo frente infecciones por *S. aureus*.

Conclusiones

En el presente estudio se realizó la caracterización de aislamientos clínicos de *S. aureus* obtenidos de individuos en la ciudad de Bogotá, y pone de manifiesto la presencia de aislamientos multirresistentes, con alta presencia de factores de virulencia que están involucrados con la severidad de las infecciones por este patógeno humano, la presencia de presuntivos perfiles de sensibilidad a antibióticos β -lactámicos poco reportados, de difícil detección y que se relacionan con clones pandémicos de SARM, y resalta la importancia de establecer programas de vigilancia que identifiquen y reporten dicho fenotipos a fin de establecer los diferentes fenotipos circulantes en la ciudad.

Asimismo, dadas las características identificadas en los aislamientos hallados en la región, pudimos estudiar la capacidad antimicrobiana de potenciales alternativas terapéuticas como los péptidos LL-37 y ATRA-1, que abren la posibilidad del diseño de tratamientos adecuados y eficientes para infecciones por *S. aureus* incluso en aislamientos multirresistentes o con perfiles de sensibilidad discordantes, presentando potenciales ventajas en la seguridad del tratamiento frente a otros antibióticos de uso actual, aun cuando no alcanza su capacidad bactericida. Finalmente, comprobamos que los péptidos antimicrobianos LL-37, ATRA-1 y daptomicina generan cambios morfológicos sobre el patógeno que explicarían su capacidad antimicrobiana, sin embargo, resalta la posible presencia de mecanismos adicionales que potencian su capacidad sobre bacterias de importancia clínica como *S. aureus*.

Anexos

Anexo A: Listado de aislamientos

Tabla 1. Información para de los aislamientos de *S. aureus* empleados en el estudio.

Aislamiento	Entidad clínica	Edad	Edad paciente	Servicio del aislamiento	Servicio de origen
1	Sangre	71	Adulto	Unidad cuidados intensivos	UCI
2	Secreciones	23	Adulto	Urgencias	Extrahospitalario
3	Secreciones	59	Adulto	Hospitalización	Intrahospitalario
4	Secreciones	51	Adulto	Urgencias	Extrahospitalario
5	Secreciones	26	Adulto	Sala de cirugía	Intrahospitalario
6	Secreciones	1	Pediátrico	Sala de cirugía	Intrahospitalario
7	Secreciones	75	Adulto	Unidad renal	Intrahospitalario
8	Sangre	10	Pediátrico	UCI neonatos	UCI
9	Secreciones	48	Adulto	Consulta externa	Extrahospitalario
10	Drenaje mama	15	Pediátrico	Ginecología y obstetricia	Extrahospitalario
11	Secreciones	44	Adulto	Sala de partos	Intrahospitalario
12	Secreciones	16	Pediátrico	Hospitalización general	Intrahospitalario
13	Secreciones	33	Adulto	Observación	Intrahospitalario
14	Secreciones	5	Pediátrico	Sin especificar	Sin especificar
15	Sangre	60	Adulto	Sin especificar	Sin especificar
16	Secreciones	1	Pediátrico	Pediatría	Extrahospitalario
17	Absceso	61	Adulto	Medicina interna	Intrahospitalario
19	Secreciones	71	Adulto	Unidad cuidados intensivos	UCI
20	Secreciones	37	Adulto	Urgencias	Extrahospitalario

21	Sangre	70	Adulto	Unidad cuidados intensivos	UCI
22	Sangre	75	Adulto	Urgencias	Extrahospitalario
23	Secreciones	94	Adulto	Sala de cirugía	Intrahospitalario
24	Sangre	61	Adulto	Unidad renal	Intrahospitalario
25	Sangre	56	Adulto	Sin especificar	Sin especificar
26	Sangre	54	Adulto	Unidad renal	Intrahospitalario
27	Secreciones	1	Pediátrico	Pediatría	Extrahospitalario
28	Secreciones	7	Pediátrico	Urgencias	Extrahospitalario
29	Secreciones	4	Pediátrico	Sin especificar	Sin especificar
30	Secreciones	68	Adulto	Unidad cuidados intensivos	UCI
31	Secreciones	27	Adulto	Sala de cirugía	Intrahospitalario
32	Secreciones	93	Adulto	Urgencias	Extrahospitalario
33	Sangre	48	Adulto	Sin especificar	Sin especificar
34	Sangre	65	Adulto	Sin especificar	Sin especificar
35	Sangre	19	Adulto	Sin especificar	Sin especificar
36	Sangre	39	Adulto	Sin especificar	Sin especificar
37	Orina	52	Adulto	Hospitalización	Intrahospitalario
38	Secreciones	1	Pediátrico	Sala de cirugía	Intrahospitalario
39	Sangre	78	Adulto	Hospitalización	Intrahospitalario
40	Sangre	66	Adulto	Hospitalización	Intrahospitalario
41	Absceso	29	Adulto	Sala de cirugía	Intrahospitalario
42	Absceso	58	Adulto	Sin especificar	Sin especificar

43	Secreciones	8	Pediátrico	Sin especificar	Sin especificar
44	Sangre	84	Adulto	Sin especificar	Sin especificar
45	Forúnculo	28	Adulto	Sin especificar	Sin especificar
46	Punta catéter	52	Adulto	Sin especificar	Sin especificar
47	Hueso	68	Adulto	Sin especificar	Sin especificar
48	Secreciones	51	Adulto	Sin especificar	Sin especificar
49	Sangre	34	Adulto	Sin especificar	Sin especificar
144	Sin especificar				
145	Sin especificar				
147	Sin especificar				
1631	Sin especificar				
1634	Sin especificar				
18a	Absceso	42	Adulto	Cirugía general	Intrahospitalario
18b	Secreciones	59	Adulto	Urgencias	Extrahospitalario
51a	Sin especificar				
51b	Sin especificar				

Edad del paciente se clasificaron en Pediátrico (<18 años) y Adultos (>18 años).

Servicio de origen fueron clasificados como Intrahospitalario (Hospitalización, Sala de cirugía, Unidad renal, Sala de partos, Observación, Medicina interna, Cirugía general) y Extrahospitalario (Urgencias, Consulta externa, Ginecología y obstetricia, Pediatría , Urgencias).

Anexo B: Listado de primers

Tabla 1. Listado de genes empleados para evaluar el perfil molecular y protocolo de amplificación por PCR convencional.

Gen	Primers	Tamaño del amplicón (pb)	Condiciones de Amplificación
<i>16S rARN</i> (Lane, 1991)	27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) 1492R (5'-TACCTTGTACGACTT)	1465	Desaturación Inicial: 3 minutos a 94 ° C 35 ciclos: 45 segundos a 94 ° C, 45 segundos a 50 ° C, 45 segundos a 72 ° C Elongación final: 7 minutos a 72 ° C
<i>mecA</i> (Ali, 2016)	mecA-F (5'-TGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGA T) mecA-R (5'-CTAATCTCATATGTGTTCCCTGTATTGGC)	155	Desaturación Inicial: 5 min a 94 ° C 30 ciclos: 1 min a 94 ° C, 1 min a 57 ° C, 2 min a 72 ° C y 5 min Elongación final: 5 min a 72 ° C
<i>spa</i> (Harmsen et al., 2003)	Spa1095-F (5'-AAAGACGATCCTTCGGTGAGC) Spa1517-R(5'-GCTTTTGCAATGTCATTTACTG)	Variable	Desaturación Inicial: 5 min a 94 ° C 30 ciclos: 1 min a 94 ° C, 1 min a 55 ° C, 2 min a 72 ° C y 5 min Elongación final: 5 min a 72 ° C
<i>pvl</i> (Lina et al., 1999)	Luk-PV-F(5'-ATCATTAGGTA AAAATGTCTGGACATGATCCA) Luk-PV-R (5'-GCATCAAGTGTATTGGATAGCAAAAAGC)	433	Desaturación Inicial: 5 min a 94 ° C 30 ciclos: 1 min a 94 ° C, 1 min a 60 ° C, 2 min a 72 ° C Elongación final: 5 min a 72 ° C

Anexo C. Distribución de microplacas para la evaluación de péptidos antimicrobianos.

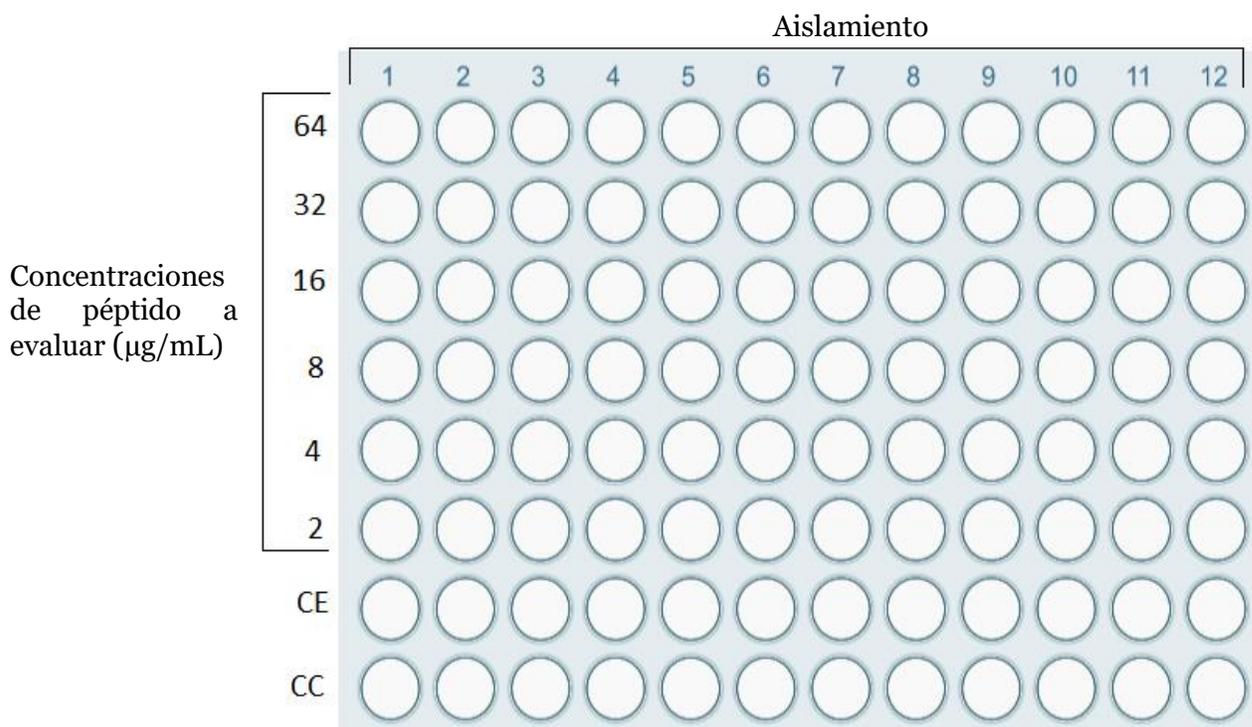


Figura 1. Esquema de distribución en microplacas de 96 pozos para la evaluación de péptidos antimicrobianos. CE: Control de esterilidad (medio de cultivo, sin adición de inóculo bacteriano ni péptido antimicrobiano). CC: Control de crecimiento (medio de cultivo con adición de inóculo bacteriano, sin péptido antimicrobiano).

Bibliografía

- Abente, S., Carpinelli, L., Guillén, R., Rodríguez, F., Fariña, N., Laspina, F., & López, Y. (2016). Frecuencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y del factor de virulencia PVL en pacientes ambulatorios con infección de piel y partes blandas de Asunción, Paraguay. *Memorias Del Instituto de Investigaciones En Ciencias de La Salud*, 14(2).
- Akanbi, O. E., Njom, H. A., Fri, J., Otigbu, A. C., & Clarke, A. M. (2017). Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from recreational waters and beach sand in Eastern Cape Province of South Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(9), 1001.
- Ali, A. (2016). Detection of *MecA*, *MecC* and *Femb* Genes by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Journal of Veterinary Advances*, 6(1), 1199. <https://doi.org/10.5455/jva.20151204111125>
- Amer, L. S., Bishop, B. M., & van Hoek, M. L. (2010). Antimicrobial and antibiofilm activity of cathelicidins and short, synthetic peptides against *Francisella*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(2), 246–251.
- Askari, E., Soleymani, F., Arianpoor, A., Tabatabai, S. M., Amini, A., & NaderiNasab, M. (2012). Epidemiology of *mecA*-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 15(5), 1010.
- Bahar, A. A., & Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543–1575.
- Baindara, P., Ghosh, A. K., & Mandal, S. M. (2020). Coevolution of resistance against antimicrobial peptides. *Microbial Drug Resistance*, 26(8), 880–899.
- Bals, R., Wang, X., Zasloff, M., & Wilson, J. M. (1998). The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(16), 9541–9546.
- Batoni, G., Maisetta, G., & Esin, S. (2016). Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1858(5), 1044–1060.
- Becker, K., Ballhausen, B., Köck, R., & Kriegeskorte, A. (2014). Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: the “*mec* alphabet” with specific consideration of *mecC*, a *mec* homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(7), 794–804.
- Blower, R. J., Barksdale, S. M., & van Hoek, M. L. (2015). Snake cathelicidin NA-CATH and smaller helical antimicrobial peptides are effective against *Burkholderia thailandensis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(7), e0003862.
- Boonsiri, T., Watanabe, S., Tan, X.-E., Thitiananpakorn, K., Narimatsu, R., Sasaki, K., Takenouchi, R., Sato'o, Y., Aiba, Y., & Kiga, K. (2020). Identification and characterization of mutations responsible for the β -lactam resistance in oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, 10(1), 1–22.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238–250.
- Brogden, N. K., & Brogden, K. A. (2011). Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38(3), 217–225.
- Callegan, M. C., Engel, L. S., Hill, J. M., & O'Callaghan, R. J. (1994). Corneal virulence of *Staphylococcus aureus*: roles of alpha-toxin and protein A in pathogenesis. *Infection and Immunity*, 62(6), 2478–2482.

- Cao, X., Zhang, Y., Mao, R., Teng, D., Wang, X., & Wang, J. (2015). Design and recombination expression of a novel plectasin-derived peptide MP1106 and its properties against *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(6), 2649–2662.
- Cardoso, M. H., Meneguetti, B. T., Costa, B. O., Buccini, D. F., Oshiro, K. G. N., Preza, S. L. E., Carvalho, C. M. E., Migliolo, L., & Franco, O. L. (2019). Non-lytic antibacterial peptides that translocate through bacterial membranes to act on intracellular targets. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4877.
- Cardot-Martin, E., Casalegno, J. S., Badiou, C., Dauwalder, O., Keller, D., Prevost, G., Rieg, S., Kern, W. V, Cuerq, C., & Etienne, J. (2015). α -defensins partially protect human neutrophils against Pantone-Valentine leukocidin produced by *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, 61(2), 158–164.
- Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28–40.
- Carvalho, S. P. D., Almeida, J. B. D., Andrade, Y. M., da Silva, L. S., Chamon, R. C., Santos, K., & Marques, L. M. (2019). Molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospital and community environments in northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 23, 134–138.
- Chávez, M., Erazo, N. C., Reina, D. A., & Esparza, M. (2015). Métodos de tipificación y epidemiología molecular de *Staphylococcus aureus* con resistencia a la meticilina. *Biosalud*, 14(2), 81–90.
- Chen, F.-J., Wang, C.-H., Chen, C.-Y., Hsu, Y.-C., & Wang, K.-T. (2014). Role of the *mecA* gene in oxacillin resistance in a *Staphylococcus aureus* clinical strain with a *pvl*-positive ST59 genetic background. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(2), 1047–1054.
- Chou, S., Wang, J., Shang, L., Akhtar, M. U., Wang, Z., Shi, B., Feng, X., & Shan, A. (2019). Short, symmetric-helical peptides have narrow-spectrum activity with low resistance potential and high selectivity. *Biomaterials Science*, 7(6), 2394–2409.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Conrad, R. S. (1998). The effects of daptomycin on chemical composition and morphology of *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*, 15–22.
- Conlon, J. M., & Sonnevend, A. (2010). Antimicrobial peptides in frog skin secretions. In *Antimicrobial Peptides* (pp. 3–14). Springer.
- Correa-Jiménez, O., Pinzón-Redondo, H., & Reyes, N. (2016). High frequency of Pantone-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* causing pediatric infections in the city of Cartagena-Colombia. *Journal of Infection and Public Health*, 9(4), 415–420.
- Cunningham, S. D., Lowe, D. J., O'brien, J. P., Wang, H., & Wilkins, A. E. (2011). *Polyethylene binding peptides and methods of use*. Google Patents.
- Dawson, R. M., & Liu, C.-Q. (2011). Analogues of peptide SMAP-29 with comparable antimicrobial potency and reduced cytotoxicity. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37(5), 432–437.
- de Latour, F. A., Amer, L. S., Papanastasiou, E. A., Bishop, B. M., & van Hoek, M. L. (2010). Antimicrobial activity of the *Naja atra* cathelicidin and related small peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(4), 825–830.
- Dean, S. N., Bishop, B. M., & Van Hoek, M. L. (2011a). Natural and synthetic cathelicidin peptides with anti-microbial and anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus*. *BMC*

Microbiology, 11(1), 1–13.

- Dean, S. N., Bishop, B. M., & Van Hoek, M. L. (2011b). Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm to alpha-helical peptides: D-enantiomer of LL-37. *Frontiers in Microbiology*, 2, 128.
- Díaz, P., Bello, H., Domínguez, M., Trabal, N., Mella, S., Zemelman, R., & González, G. (2004). Resistencia a gentamicina, amikacina y ciprofloxacina en cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* subespecie *pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido. *Revista Médica de Chile*, 132(10), 1173–1178.
- Donkor, E. S., Dayie, N. T. K. D., & Adiku, T. K. (2014). Bioinformatics with basic local alignment search tool (BLAST) and fast alignment (FASTA). *Journal of Bioinformatics and Sequence Analysis*, 6(1), 1–6.
- Dürr, U. H. N., Sudheendra, U. S., & Ramamoorthy, A. (2006). LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(9), 1408–1425.
- Enright, M. C., Robinson, D. A., Randle, G., Feil, E. J., Grundmann, H., & Spratt, B. G. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(11), 7687–7692.
- Epand, R. M., & Vogel, H. J. (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1462(1–2), 11–28.
- Escobar-Pérez, J. A., Castro, B. E., Márquez-Ortiz, R. A., Gaines, S., Chavarro, B., Moreno, J., Leal, A. L., & Vanegas, N. (2014). Aislamientos de *Staphylococcus aureus* sensibles a meticilina relacionados genéticamente con el clon USA300, ¿origen de los aislamientos SARM de genotipo comunitario en Colombia? *Biomédica*, 34(1), 124–136.
- Espinosa, C. J., Cortés, J. A., Castillo, J. S., & Leal, A. L. (2011). Revisión sistemática de la resistencia antimicrobiana en cocos Gram positivos intrahospitalarios en Colombia. *Biomédica*, 31(1), 27–34.
- Falanga, A., Lombardi, L., Franci, G., Vitiello, M., Iovene, M. R., Morelli, G., Galdiero, M., & Galdiero, S. (2016). Marine antimicrobial peptides: nature provides templates for the design of novel compounds against pathogenic bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5), 785.
- Frenay, H. M. E., Bunschoten, A. E., Schouls, L. M., Van Leeuwen, W. J., Vandenbroucke-Grauls, C., Verhoef, J., & Mooi, F. R. (1996). Molecular typing of methicillin- *aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15(1), 60–64.
- Fumakia, M., & Ho, E. A. (2016). Nanoparticles encapsulated with LL37 and serpin A1 promotes wound healing and synergistically enhances antibacterial activity. *Molecular Pharmaceutics*, 13(7), 2318–2331.
- Ganz, T. (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 3(9), 710–720.
- Ghebremedhin, B., Layer, F., König, W., & König, B. (2008). Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial *gap*, *16S rRNA*, *hsp60*, *rpoB*, *sodA*, and *tuf* gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(3), 1019–1025.
- Graf, M., Mardirossian, M., Nguyen, F., Seefeldt, A. C., Guichard, G., Scocchi, M., Innis, C. A., & Wilson, D. N. (2017). Proline-rich antimicrobial peptides targeting protein synthesis. *Natural Product Reports*, 34(7), 702–711.
- Grönberg, A., Mahlapuu, M., Stähle, M., Whately-Smith, C., & Rollman, O. (2014). Treatment with LL-37 is safe and effective in enhancing healing of hard-to-heal venous leg ulcers: a

- randomized, placebo-controlled clinical trial. *Wound Repair and Regeneration*, 22(5), 613–621.
- Harmsen, D., Claus, H., Witte, W., Rothgänger, J., Claus, H., Turnwald, D., & Vogel, U. (2003). Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5442–5448.
- Henzler Wildman, K. A., Lee, D.-K., & Ramamoorthy, A. (2003). Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37. *Biochemistry*, 42(21), 6545–6558.
- Hobbs, J. K., Miller, K., O’neill, A. J., & Chopra, I. (2008). Consequences of daptomycin-mediated membrane damage in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(5), 1003–1008.
- Hong, S. Y., Oh, J. E., & Lee, K.-H. (1999). Effect of D-amino acid substitution on the stability, the secondary structure, and the activity of membrane-active peptide. *Biochemical Pharmacology*, 58(11), 1775–1780.
- Hryniewicz, M. M., & Garbacz, K. (2017). Borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA)—a more common problem than expected? *Journal of Medical Microbiology*, 66(10), 1367–1373.
- Hsiao, C.-H., Ong, S. J., Chuang, C.-C., Ma, D. H. K., & Huang, Y.-C. (2015). A comparison of clinical features between community-associated and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* keratitis. *Journal of Ophthalmology*, 2015.
- Huang, H. W. (2020). DAPTOMYCIN, its membrane-active mechanism vs. that of other antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1862(10), 183395.
- Jokinen, E., Lindholm, L., Huttunen, R., Huhtala, H., Vuento, R., Vuopio, J., & Syrjänen, J. (2018). Spa type distribution in MRSA and MSSA bacteremias and association of spa clonal complexes with the clinical characteristics of bacteremia. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37(5), 937–943.
- Juba, M. L., Porter, D. K., Williams, E. H., Rodriguez, C. A., Barksdale, S. M., & Bishop, B. M. (2015). Helical cationic antimicrobial peptide length and its impact on membrane disruption. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1848(5), 1081–1091.
- Juba, M., Porter, D., Dean, S., Gillmor, S., & Bishop, B. (2013). Characterization and performance of short cationic antimicrobial peptide isomers. *Peptide Science*, 100(4), 387–401.
- Jung, S.-I., Shin, D.-H., Park, K.-H., & Shin, J.-H. (2006). Antimicrobial susceptibility and clonal relatedness between community-and hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from blood cultures. *Journal of Microbiology*, 44(3), 336–343.
- Kandasamy, S. K., & Larson, R. G. (2006). Effect of salt on the interactions of antimicrobial peptides with zwitterionic lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(9), 1274–1284.
- Khurshid, Z., Najeeb, S., Mali, M., Moin, S. F., Raza, S. Q., Zohaib, S., Sefat, F., & Zafar, M. S. (2017). Histatin peptides: Pharmacological functions and their applications in dentistry. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(1), 25–31.
- Klemetsen, T., Karlsen, C. R., & Willassen, N. P. (2021). Phylogenetic revision of the genus *Aliivibrio*: intra-and inter-species variance among clusters suggest a wider diversity of species. *Frontiers in Microbiology*, 12, 272.
- Köck, R., Schaumburg, F., Mellmann, A., Köksal, M., Jurke, A., Becker, K., & Friedrich, A. W. (2013). Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as causes

- of human infection and colonization in Germany. *PloS One*, 8(2), e55040.
- Kumar, P., Kizhakkedathu, J. N., & Straus, S. K. (2018). Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules*, 8(1), 4.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549.
- Labandeira-Rey, M., Couzon, F., Boisset, S., Brown, E. L., Bes, M., Benito, Y., Barbu, E. M., Vazquez, V., Höök, M., & Etienne, J. (2007). *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science*, 315(5815), 1130–1133.
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, 115–175.
- Lázár, V., Martins, A., Spohn, R., Daruka, L., Grézal, G., Fekete, G., Számel, M., Jangir, P. K., Kintses, B., & Csörgő, B. (2018). Antibiotic-resistant bacteria show widespread collateral sensitivity to antimicrobial peptides. *Nature Microbiology*, 3(6), 718–731.
- Li, H., Sun, S., Yap, J. Q., Chen, J., & Qian, Q. (2016). 0.9% saline is neither normal nor physiological. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 17(3), 181–187.
- Lina, G., Piémont, Y., Godail-Gamot, F., Bes, M., Peter, M.-O., Gauduchon, V., Vandenesch, F., & Etienne, J. (1999). Involvement of Panton-Valentine Leukocidin—Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*, 29(5), 1128–1132. <https://doi.org/10.1086/313461>
- Liu, Z., Brady, A., Young, A., Rasimick, B., Chen, K., Zhou, C., & Kallenbach, N. R. (2007). Length effects in antimicrobial peptides of the (RW) n series. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(2), 597–603.
- Löffler, B., Hussain, M., Grundmeier, M., Brück, M., Holzinger, D., Varga, G., Roth, J., Kahl, B. C., Proctor, R. A., & Peters, G. (2010). *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathogens*, 6(1), e1000715.
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., & Olsson-Liljequist, B. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281.
- Malanovic, N., & Lohner, K. (2016). Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1858(5), 936–946.
- Malik, E., Dennison, S. R., Harris, F., & Phoenix, D. A. (2016). pH dependent antimicrobial peptides and proteins, their mechanisms of action and potential as therapeutic agents. *Pharmaceuticals*, 9(4), 67.
- Mascio, C. T. M., Alder, J. D., & Silverman, J. A. (2007). Bactericidal action of daptomycin against stationary-phase and nondividing *Staphylococcus aureus* cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(12), 4255–4260.
- Merriman, J. A., Nemeth, K. A., & Schlievert, P. M. (2014). Novel antimicrobial peptides that inhibit gram positive bacterial exotoxin synthesis. *PloS One*, 9(4), e95661.
- Miller, B. A., Gray, A., LeBlanc, T. W., Sexton, D. J., Martin, A. R., & Slama, T. G. (2010). Acute eosinophilic pneumonia secondary to daptomycin: a report of three cases. *Clinical Infectious Diseases*, 50(11), e63–e68.

- Minahk, C. J., & Morero, R. D. (2003). Inhibition of enterocin CRL35 antibiotic activity by mono- and divalent ions. *Letters in Applied Microbiology*, 37(5), 374–379.
- Müller, A., Wenzel, M., Strahl, H., Grein, F., Saaki, T. N. V., Kohl, B., Siersma, T., Bandow, J. E., Sahl, H.-G., & Schneider, T. (2016). Daptomycin inhibits cell envelope synthesis by interfering with fluid membrane microdomains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(45), E7077–E7086.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2020). *Medical Microbiology E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Mwambi, B., Iramiot, J., Bwanga, F., Nakaye, M., Itabangi, H., & Bazira, J. (2014). Clindamycin resistance among *taphylococcus aureus* isolated at Mbarara regional referral hospital, in south western Uganda. *British Microbiology Research Journal*, 4(12), 1335.
- Nathwani, D., Morgan, M., Masterton, R. G., Dryden, M., Cookson, B. D., French, G., & Lewis, D. (2008). Guidelines for UK practice for the diagnosis and management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections presenting in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(5), 976–994.
- Neshani, A., Zare, H., Eidgahi, M. R. A., Kakhki, R. K., Safdari, H., Khaledi, A., & Ghazvini, K. (2019). LL-37: Review of antimicrobial profile against sensitive and antibiotic-resistant human bacterial pathogens. *Gene Reports*, 17, 100519.
- Ocampo, A. M., Vélez, L. A., Robledo, J., & Jiménez, J. N. (2014). Cambios a lo largo del tiempo en la distribución de los complejos de clones dominantes de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en Medellín, Colombia. *Biomédica*, 34, 34-40.
- Oliveira, D. C., Tomasz, A., & de Lencastre, H. (2001). The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated mec elements. *Microbial Drug Resistance*, 7(4), 349–361.
- Ong, S. J., Huang, Y.-C., Tan, H.-Y., Ma, D. H. K., Lin, H.-C., Yeh, L.-K., Chen, P. Y. F., Chen, H.-C., Chuang, C.-C., & Chang, C.-J. (2013). *Staphylococcus aureus* keratitis: a review of hospital cases. *PLoS One*, 8(11), e80119.
- Orozco, R. C., Ferrer, L. V., Jiménez, J. R., & Guzmán, N. A. (2018). Resistencia antimicrobiana en *aureus* y *epidermidis*: tendencia temporal (2010-2016) y fenotipos de multirresistencia, Cartagena (Colombia). *Biosalud*, 17(2), 25–36.
- Ouhara, K., Komatsuzawa, H., Kawai, T., Nishi, H., Fujiwara, T., Fujiue, Y., Kuwabara, M., Sayama, K., Hashimoto, K., & Sugai, M. (2008). Increased resistance to cationic antimicrobial peptide LL-37 in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(6), 1266–1269.
- Ovalle Guerra, M. (2020). *Vigilancia por WHONET de resistencia antimicrobiana en el ámbito hospitalario, Colombia 2020*. <https://www.ins.gov.co/BibliotecaDigital/vigilancia-por-whonet-de-resistencia-antimicrobiana-en-el-ambito-hospitalario-colombia-2020.pdf#search=Staphylococcus>
- Pal, M., Kerorsa, G. B., Marami, L. M., & Kandi, V. (2020). Epidemiology, Pathogenicity, Animal Infections, Antibiotic Resistance, Public Health Significance, and Economic Impact of *Staphylococcus* : A Comprehensive Review. *American Journal of Public Health*, 8(1), 14–21.
- Papanastasiou, E. A., Hua, Q., Sandouk, A., Son, U. H., Christenson, A. J., Van Hoek, M. L., & Bishop, B. M. (2009). Role of acetylation and charge in antimicrobial peptides based on human β -defensin-3. *Apmis*, 117(7), 492–499.
- Park, C. B., Yi, K.-S., Matsuzaki, K., Kim, M. S., & Kim, S. C. (2000). Structure–activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,

97(15), 8245–8250.

- Patel, J. B. (2001). 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular Diagnosis*, 6(4), 313–321.
- Pellens, R., & Grandcolas, P. (2016). *Biodiversity conservation and phylogenetic systematics: preserving our evolutionary heritage in an extinction crisis*. Springer Nature.
- Piątkowska, E., Piątkowski, J., & Przondo-Mordarska, A. (2012). The strongest resistance of *Staphylococcus aureus* to erythromycin is caused by decreasing uptake of the antibiotic into the cells. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 17(4), 633–645.
- Po, K. H. L., Chow, H. Y., Cheng, Q., Chan, B. K., Deng, X., Wang, S., Chan, E. W. C., Kong, H., Chan, K. F., & Li, X. (2021). Daptomycin exerts bactericidal effect through induction of excessive ROS production and blocking the function of stress response protein Usp2. *Natural Sciences*, 1(2), e10023.
- Puklo, M., Guentsch, A., Hiemstra, P. S., Eick, S., & Potempa, J. (2008). Analysis of neutrophil-derived antimicrobial peptides in gingival crevicular fluid suggests importance of cathelicidin LL-37 in the innate immune response against periodontogenic bacteria. *Oral Microbiology and Immunology*, 23(4), 328–335.
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., Hartigan, P., Fanning, S., & Fitzpatrick, Es. (2011). *Veterinary microbiology and microbial disease*. John Wiley & Sons.
- R Dennison, S., HG Morton, L., & A Phoenix, D. (2012). Effect of amidation on the antimicrobial peptide aurein 2.5 from Australian southern bell frogs. *Protein and Peptide Letters*, 19(6), 586–591.
- Richter, S. S., Kealey, D. E., Murray, C. T., Heilmann, K. P., Coffman, S. L., & Doern, G. V. (2003). The in vitro activity of daptomycin against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(1), 123–127.
- Saeed, K., Marsh, P., & Ahmad, N. (2014). Cryptic resistance in *Staphylococcus aureus*: a risk for the treatment of skin infection? *Current Opinion in Infectious Diseases*, 27(2), 130–136.
- Santaniello, A., Sansone, M., Fioretti, A., & Menna, L. F. (2020). Systematic review and meta-analysis of the occurrence of ESKAPE bacteria group in dogs, and the related zoonotic risk in animal-assisted therapy, and in animal-assisted activity in the health context. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(9), 3278.
- Scott, M. G., Davidson, D. J., Gold, M. R., Bowdish, D., & Hancock, R. E. W. (2002). The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *The Journal of Immunology*, 169(7), 3883–3891.
- Shai, Y., & Oren, Z. (2001). From “carpet” mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides*, 22(10), 1629–1641.
- Shopsin, B., Gomez, M., Montgomery, S. O., Smith, D. H., Waddington, M., Dodge, D. E., Bost, D. A., Riehman, M., Naidich, S., & Kreiswirth, B. N. (1999). Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(11), 3556–3563.
- Sohail, M., & Latif, Z. (2017). Prevalence and antibiogram of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from medical device-related infections; a retrospective study in Lahore, Pakistan. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 50(5), 680–684.
- Takizawa, Y., Taneike, I., Nakagawa, S., Oishi, T., Nitahara, Y., Iwakura, N., Ozaki, K., Takano, M., Nakayama, T., & Yamamoto, T. (2005). A Pantone-Valentine leucocidin (PVL)-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain, another such strain carrying a multiple-drug resistance plasmid, and other more-typical PVL-negative

- MRSA strains found in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(7), 3356–3363.
- Terra, R. M. S., Guimarães, J. A., & Verli, H. (2007). Structural and functional behavior of biologically active monomeric melittin. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 25(6), 767–772.
- Thampi, D. K., Mundangalam, N., Pulikottil, S. K., & Jacob, N. (2019). Comparison of Phenotypic MRSA Detection Methods with *mecA* gene PCR in a Tertiary Care Centre in India. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, 8(36), 2813–2818.
- Thitiananpakorn, K., Aiba, Y., Tan, X.-E., Watanabe, S., Kiga, K., Sato'o, Y., Boonsiri, T., Li, F.-Y., Sasahara, T., & Taki, Y. (2020). Association of *mprF* mutations with cross-resistance to daptomycin and vancomycin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Scientific Reports*, 10(1), 1–15.
- Thomas, P., Sekhar, A. C., Upreti, R., Mujawar, M. M., & Pasha, S. S. (2015). Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast cfu enumeration and single colony isolation from diverse samples. *Biotechnology Reports*, 8, 45–55.
- Toor, H. G., Banerjee, D. I., & Chauhan, J. B. (2021). In Silico Evaluation of Human Cathelicidin LL-37 as a Novel Therapeutic Inhibitor of Panton-Valentine Leukocidin Toxin of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbial Drug Resistance*, 27(5), 602–615.
- Trindade, P. A., McCulloch, J. A., Oliveira, G. A., & Mamizuka, E. M. (2003). Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 7(1), 32–43.
- Turner, A. M., Lee, J. Y. H., Gorrie, C. L., Howden, B. P., & Carter, G. P. (2021). Genomic Insights Into Last-Line Antimicrobial Resistance in Multidrug-Resistant *Staphylococcus* and Vancomycin-Resistant *Enterococcus*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 576.
- Valderrama-Beltrán, S., Cortés, J. A., Caro, M. A., Cely-Andrado, L., Osorio-Pinzón, J. V., Gualtero, S. M., Berrio-Medina, I., Rodriguez, J. Y., Granada-Copete, A. M., & Guevara, F. (2019). Guía de práctica clínica para el diagnóstico y manejo de las infecciones de piel y tejidos blandos en Colombia. *Infectio*, 23(4), 318–346.
- Van Hoek, A. H. A. M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P., & Aarts, H. J. M. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in Microbiology*, 2, 203.
- Vasilchenko, A. S., Julian, W. T., Lapchinskaya, O. A., Katrukha, G. S., Sadykova, V. S., & Rogozhin, E. A. (2020). A novel peptide antibiotic produced by *Streptomyces roseoflavus* strain INA-Ac-5812 with directed activity against Gram-positive bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- Wu, G., Ding, J., Li, H., Li, L., Zhao, R., Fan, X., & Shen, Z. (2008). Effects of Cations and PH on Antimicrobial Activity of Thanatin and s-Thanatin against *Escherichia coli* ATCC25922 and *B. subtilis* ATCC 21332. *Nature Precedings*, 1.
- Yamada, T., Ishikawa, S., Ishiguro, N., Kobayashi, M., & Iseki, K. (2020). Evaluation of daptomycin-induced cellular membrane injury in skeletal muscle. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, b20-00217.