

UNIVERSIDAD EUROPEA DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO FIN DE GRADO

CURSO 2024-2025

**Mejora de herramientas destinadas a la
manipulación genética de *Staphylococcus
epidermidis* con el fin de estudiar la
inducción y movilización de sus islas de
patogenicidad**

Autor

Rebeca Maria Fortuño Benavent

Tutor interno

Edgar Bernat Ponce

Tutor externo

M.^a Ángeles Tormo Mas

Co-tutor externo

Marina Costa Lacuesta

Mejora de herramientas destinadas a la manipulación genética de *Staphylococcus epidermidis* con el fin de estudiar la inducción y movilización de sus islas de patogenicidad

Trabajo Final de Grado, presentado por:

Rebeca Maria Fortuño Benavent

Tutorizado por:

Edgar Bernat Ponce

M.^a Ángeles Tormo Mas

Marina Costa Lacuesta

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

UNIVERSIDAD EUROPEA DE VALENCIA

VALENCIA

CURSO 2024-2025

Tabla de contenidos

Índice de figuras y tablas.....	6
Listado de símbolos y siglas	7
Resumen y palabras clave	8
1. Introducción	11
1.1 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	
1.1.1 Descripción	11
1.1.2 Virulencia.....	12
1.1.3 Elementos genéticos móviles	12
1.1.4 Islas de patogenicidad.....	12
1.2 Bacteriófagos	13
1.2.1 Descripción	13
1.2.2 Ciclo de vida.....	14
1.2.3 Transducción	
1.3 Cepas clínicas de <i>S. epidermidis</i> , SCN45 e IPA.....	14
1.3.1 Descripción	14
1.3.2 Resultados previos	15
2. Hipótesis	19
3. Objetivos	19
3.1 Objetivo general	19
3.2 Objetivos específicos	19
4. Materiales y Métodos	19
4.1 Crecimiento bacteriano.....	19
4.2 Técnicas de biología molecular	20
4.2.1 Extracción de ADN plasmídico	20
4.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	20
4.2.3 Digestión con endonucleasas de restricción	21
4.2.4 Purificación de DNA.....	22
4.2.5 Electroforesis en gel de agarosa	22
4.2.6 Ligación de fragmentos de ADN con T4 DNA ligasa.....	22
4.2.7 Construcción de plásmidos.....	22
4.2.8 Secuenciación de ADN.....	22
4.3 Transformación bacteriana.....	23
4.3.1 Preparación de competentes de <i>E. coli</i>	23
4.3.2 Preparación de competentes de <i>S. aureus</i> RN4220	23
4.3.3 Preparación de competentes de <i>S. epidermidis</i> O47	23
4.3.4 Transformación de <i>E. coli</i> DH5α	23
4.3.5 Electroporación de <i>S. aureus</i> RN4220	24
4.3.6 Electroporación de <i>S. epidermidis</i> O47 por el método de Grosser y Richardson (2016).....	24

4.3.7 Electroporación de <i>S. epidermidis</i> O47 por el método basado en el protocolo de Löfblom et al. (2007)	24
4.4 Metodología de bacteriófagos	25
4.4.1 Inducción de profagos	25
4.4.2 Infección por bacteriófagos	25
4.4.3 Evolución de bacteriófagos	26
4.4.4 Ensayo de titulación de bacteriófagos	26
4.4.5 Transducción por el método basado en el protocolo de Krausz y Bose (2016)	26
4.4.6 Transducción por el método basado en el protocolo de Mašlaňová et al. (2016)	27
4.4.7 Transducción por el método de Schulze et al. (2025)	27
4.4.8 Titulación de la transducción	27
5. Resultados	28
5.1 Construcción del vector	28
5.2 Lisis bacteriana inducida por fagos líticos y lisogénicos	28
5.3 Titulación de fagos evolucionados	30
5.4 Titulación de la transducción	31
6. Discusión	32
7. Conclusión	34
8. Bibliografía	35

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Comparación de SePIs y bacteriófagos entre las cepas de <i>S. epidermidis</i> IPA1 y SCN45	14
Figura 2. Southern Blot de las integrasas de las SePIs de SCN45 y IPA1	15
Figura 3. Esquema de los pasos para el ensayo de fusión transcripcional	16
Figura 4. Ensayo de actividad B-lactamasa	16
Figura 5. Método concentración DNA plasmídico	18
Figura 6. Diseños de primers para HPDUF1381 y DUF1381 con sitios de restricción específicos para la inserción dirigida en el plásmido pCN36_pCd, realizado con el software SnapGene....	20
Figura 7. Revelado electroforesis gel de agarosa	28
Figura 8. Titulación de fagos A1 y A2 antes (WT) y después de evolucionarlos	30
Figura 9. Placa de cultivo representativa de la única transducción efectiva obtenida, realizada con el fago A2 evolucionado	31
Tabla 1. Primers utilizados para PCR	19
Tabla 2. Lisados bacterianos tras infección con profagos inducidos de <i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i>	29

Listado de símbolos y siglas

AUC	Área bajo la curva
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Amp	Ampicilina
EGM	Elementos genéticos móviles
ISS La Fe	Instituto de Investigación Sanitaria La Fe
PI	Porcentaje de inhibición
LB	Luria-Bertani
MC	Mitomicina C
MTasa	ADN-Metiltransferasas
OD	Densidad óptica
PAI	Islas de patogenicidad
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PT	Partículas transductoras
PTA	Phage top agar
REasa	Endonucleasas de restricción
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo
SePI	Islas de patogenicidad de <i>Staphylococcus epidermidis</i>
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TGH	Transferencia génica horizontal
TSA	Agar soya tripticaseína
TSB	Caldo soya tripticaseína
UFP	Unidad formadora de placa
UFT	Unidad formadora de transductantes

Resumen y palabras clave

Staphylococcus epidermidis ha cobrado un papel cada vez más relevante como patógeno oportunista, especialmente en el ámbito hospitalario. Tradicionalmente considerado parte de la microbiota comensal de la piel y las mucosas humanas, hoy se reconoce como una de las principales causas de infecciones asociadas a dispositivos médicos, como catéteres, prótesis y válvulas cardíacas. Su capacidad para formar biopelículas y su creciente resistencia a los antibióticos complican aún más su tratamiento. La manipulación genética para su estudio sigue representando un reto debido a sus robustas barreras de restricción/modificación y a la baja eficiencia de transformación. En este trabajo se evaluaron diferentes estrategias de transformación mediante transducción y electroporación con la finalidad de estudiar la inducción y movilización de las islas de patogenicidad de dos cepas clínicas de *S. epidermidis*, SCN45 e IPA1. Para la transducción, las proteínas de interés, responsables de la inducción de las islas de patogenicidad de SNC45, DUF1381 y HPDUF1381, fueron clonadas en el plásmido pCN36_cd y este fue introducido mediante electroporación en la cepa de *S. aureus* RN4220. Se elaboró una colección de fagos líticos y lisogénicos derivados de especies de *S. aureus* y *S. epidermidis* y se emplearon en diferentes métodos de transducción basados en una amplia revisión bibliográfica actualizada. Ante las dificultades para introducir material genético en *S. epidermidis*, se evaluó también la aplicación de un choque térmico como estrategia para debilitar temporalmente sus sistemas de restricción. Este enfoque, basado en trabajos previos, consiste en exponer las células receptoras a temperaturas elevadas de forma controlada para permitir la entrada de ADN exógeno antes de que los sistemas de defensa bacterianos se recuperen y puedan volver a actuar. A pesar de implementar esta técnica en combinación con distintos fagos y protocolos de transformación, no se logró transformar las cepas de *S. epidermidis*. Sin embargo, sí se consiguió una transducción efectiva utilizando un fago evolucionado, A2, para transferir material genético entre cepas isogénicas de *S. aureus* RN4220. Estos resultados resaltan la dificultad de manipular genéticamente *S. epidermidis*, pero también aportan herramientas experimentales, como la colección de fagos y la adaptación de protocolos, que pueden facilitar futuras investigaciones y optimización de técnicas de ingeniería genética en estafilococos coagulasa negativos.

Palabras clave: *S. aureus*, *S. epidermidis*, bacteriófago, islas de patogenicidad, transducción, electroporación, choque térmico.

Abstract

Staphylococcus epidermidis has gained increasing relevance as an opportunistic pathogen, particularly in hospital settings. Traditionally considered a part of the commensal microbiota of human skin and mucosa, it is now recognized as one of the leading causes of device-associated infections, including catheters, prosthetics, and heart valves. Its ability to form biofilms and its growing antibiotic resistance further complicate treatment. Genetic manipulation for its study remains challenging due to robust restriction/modification systems and low transformation efficiency. In this study, various transformation strategies were evaluated, including transduction and electroporation, to investigate the induction and mobilization of pathogenicity islands in two clinical *S. epidermidis* strains, SCN45 and IPA1. For transduction, proteins responsible for the induction of SCN45 pathogenicity islands, DUF1381 and HPDUF1381, were cloned into plasmid pCN36_cd and introduced into *S. aureus* RN4220 via electroporation. A collection of lytic and lysogenic phages derived from *S. aureus* and *S. epidermidis* species was assembled and used in different transduction methods based on an extensive literature review. Given the difficulties in introducing genetic material into *S. epidermidis*, a heat shock strategy was also assessed to temporarily weaken its restriction systems. This approach, based on previous studies, involves exposing recipient cells to elevated temperatures in a controlled manner to allow the entry of exogenous DNA before bacterial defense mechanisms recover. Despite implementing this technique alongside various phages and transformation protocols, transformation of *S. epidermidis* strains was unsuccessful. However, effective transduction was achieved using an evolved phage, A2, to transfer genetic material between isogenic *S. aureus* RN4220 strains. These results highlight the genetic manipulation challenges in *S. epidermidis* but also provide experimental tools—such as the phage collection and adapted protocols—that may support future research and optimization of genetic engineering techniques in coagulase-negative staphylococci.

Keywords: *S. aureus*, *S. epidermidis*, bacteriophage, pathogenicity islands, transduction, electroporation, heat shock.

1. Introducción

Las especies del género bacteriano *Staphylococcus* se clasifican clínicamente según su capacidad para producir la enzima coagulasa, que coagula el plasma al unirse a la protrombina, lo que facilita la conversión de fibrinógeno en fibrina (Burke et al., 2023). *Staphylococcus* coagulasa negativa (SCN) se encuentran entre los microorganismos más frecuentemente aislados en el laboratorio de microbiología. Sin embargo, su significado clínico en muchas situaciones es difícil de establecer, pues pueden ser comensales inofensivos o patógenos invasores (Fariña González et al., 2013). Esta dualidad en su comportamiento puede estar mediada, en parte, por la adquisición de elementos genéticos móviles (EGM), que se identifican típicamente como fragmentos de ADN que codifican una variedad de determinantes de virulencia y resistencia, como los plásmidos, las islas genómicas o los bacteriófagos (Malachowa & Deleo, 2010).

La capacidad de manipular genéticamente a *Staphylococcus* es un requisito fundamental para investigar su estilo de vida y características fenotípicas. Para ello, en las últimas décadas se han desarrollado numerosos métodos destinados a facilitar la transformación y manipulación genética en bacterias (Schulze et al., 2025). Aunque técnicas como la transformación química y la conjugación han demostrado ser eficaces en muchas especies bacterianas (Cohen et al., 1972; LaBreck et al., 2018; Ramsay et al., 2016), su aplicación en *Staphylococcus* es limitada, debido a la ausencia general de competencia natural y a la baja frecuencia de conjugación en este género (Nedelmann et al., 1998). Además, se han descrito que los *Staphylococcus* pueden codificar cuatro tipos diferentes de sistemas de restricción/modificación: Tipo I, II, III o IV. Estos sistemas consisten en diversas combinaciones de endonucleasas de restricción (REasa), ADN-metiltransferasas (MTasa) y proteínas que confieren especificidad de secuencia. Los sistemas de Tipo I constan de las tres proteínas, mientras que los sistemas de Tipo II y Tipo III constan solo de REasa y MTasa, y los sistemas de Tipo IV de una sola REasa (Kelleher y Raleigh, 1991; Murray, 2000; Pingoud et al., 2005; Rao et al., 2000).

No obstante, la introducción de métodos basados en la transferencia de ADN mediada por fagos, conocida como transducción, junto con el perfeccionamiento de protocolos de transformación por electroporación (Luchansky et al., 1988) ha permitido avances significativos en la capacidad de manipulación genética de numerosas cepas de *Staphylococcus*.

1.1 *Staphylococcus epidermidis*

1.1.1 Descripción

Muchos *Staphylococcus* coagulasa negativa (SCN), incluido *Staphylococcus epidermidis*, se encuentran en la piel y actúan principalmente como comensales humanos. *S. epidermidis* es un anaerobio facultativo grampositivo y representa la mayor parte de la microbiota bacteriana normal de este hábitat (Burke et al., 2023; Vuong y Otto, 2002).

Dentro de este contexto, los estafilococos generalmente tienen una relación simbiótica benigna con su huésped. Sin embargo, cuando se produce una alteración en la integridad de la piel, ya sea por traumatismos, punciones con agujas o la implantación directa de dispositivos médicos, los estafilococos pueden penetrar en el organismo y comportarse como agentes patógenos (Gill et al., 2005).

1.1.2 Virulencia

Anteriormente *S. epidermidis* fue considerado un microorganismo comensal inocuo en la piel humana, pero en la actualidad se sabe que puede llegar a ser un patógeno oportunista importante de gran relevancia clínica (Otto, 2009). Junto con *S. aureus*, *S. epidermidis* ocupa el primer lugar entre los agentes causantes de infecciones nosocomiales (Rupp & Archer, 1994). En particular, *S. epidermidis* representa la fuente más común de infecciones en dispositivos médicos implantables. Esto, probablemente se deba a que *S. epidermidis* es un colonizador permanente y ubicuo de la piel humana, lo que resulta en una alta probabilidad de contaminación del dispositivo durante su inserción (Uçkay et al., 2009). Si bien las infecciones por *S. epidermidis* rara vez se convierten en enfermedades potencialmente mortales, su frecuencia y su extrema dificultad para tratar representa una grave carga para el sistema de salud pública (Rogers et al., 2009).

1.1.3 Elementos genéticos móviles

Los elementos genéticos móviles (EGM) se describieron por primera vez en el genoma del maíz a fines de la década de 1940 y son un medio importante para la transferencia de información genética entre procariotas y eucariotas (McClintock, 1950). Los EGM se identifican típicamente como fragmentos de ADN que codifican posibles factores de virulencia y moléculas que confieren resistencia a los antibióticos —incluido el gen que otorga resistencia a los betalactámicos—, así como las enzimas necesarias para su propia transferencia e integración en el ADN del huésped (Frost et al., 2005). Los EGM demuestran movilidad intracelular e intercelular, y aquellos dentro de una célula en particular se denominan "mobiloma" (Siefert, 2009). La transferencia de EGM entre células se conoce como transferencia génica lateral u horizontal (TGH). La TGH ocurre como transferencia de ADN de procariota a procariota, de procariota a eucariota y de eucariota a eucariota, constituyendo un proceso clave en la adaptación microbiana (Keeling & Palmer, 2008). En este contexto, los EGM desempeñan un papel fundamental como medio para transferir información genética entre especies bacterianas y dentro de ellas (Hacker & Kaper, 2000). Los EGM pueden consistir en secuencias de inserción, transposones, fagos, plásmidos, islas de patogenicidad y casetes cromosómicos (Malachowa & Deleo, 2010).

1.1.4 Islas de patogenicidad

Las denominadas islas de patogenicidad (PAI) pertenecen al grupo de EGMs y desempeñan un papel fundamental en la virulencia de patógenos bacterianos humanos (Jyoti et al., 2011). El concepto de PAI fue fundado a finales de la década de 1980 por Jörg Hacker y el grupo de Werner Goebel en la Universidad de Würzburg, Würzburg, Alemania, quienes investigaban la base genética de la virulencia de las cepas UPEC 536 y J96. Demostraron que la delección de una PAI condujo a un fenotipo no patógeno de la cepa 536 de *Escherichia coli*, por lo que se ha sugerido que tales delecciones son un mecanismo genético para modular la virulencia bacteriana (Hacker et al., 1990; Knapp et al., 1986).

Las islas de patogenicidad estafilocócicas (SaPI), son las primeras islas de patogenicidad claramente definidas en bacterias Gram positivas, y cada una codifica uno o más de los superantígenos estafilocócicos (Novick et al., 2001). En 2007 se presentó la primera evidencia de una isla de patogenicidad en *S. epidermidis* y la expresión de enterotoxinas. La cepa fue identificada como *S. epidermidis* FRI909 (Jyoti et al., 2011).

De manera similar a los profagos, las SaPIs (islas patogénicas de *Staphylococcus*) permanecen integradas de forma estable en el cromosoma, pero con la diferencia de que sus procesos de escisión y replicación no son inducidos directamente por la respuesta SOS. En su lugar, se movilizan mediante fagos ayudantes específicos, lo que da lugar al empaquetamiento del genoma de la SaPI en partículas de transducción derivadas de fagos (Guzman et al., 2016).

Las SaPIs no codifican los genes morfogenéticos necesarios para la formación de la cápside, sino que secuestran las cápsides del fago y se empaquetan dentro de ellas para ser movilizadas (Úbeda et al., 2005). Las partículas resultantes pueden transferir los factores de virulencia contenidos en las SaPIs a otras células, incluso entre géneros distintos, con alta frecuencia.

El ciclo de vida de la SaPI comienza con la infección por un fago ayudante o con la activación de un profago ayudante endógeno a través de la respuesta SOS. Esta respuesta puede ser causada por estrés oxidativo, exposición a luz ultravioleta o tratamiento con antibióticos. Una vez que el bacteriófago está activo, la interacción entre una proteína del fago y la proteína StI provoca el inicio del ciclo de escisión-replicación-empaquetamiento (ERP) de la SaPI (Guzman et al., 2016.)

1.2 Bacteriófagos

1.2.1 Descripción

Entre toda la población viral, los bacteriófagos, conocidos popularmente como fagos (del griego "*phagein*", que significa "comer"), representan el grupo de virus que infectan y lisan bacterias. Esta propiedad antibacteriana potencial de los fagos es única (Jamalludeen et al., 2009). Una vez que una célula bacteriana es infectada, los fagos se multiplican dentro de ella de forma exponencial utilizando la maquinaria celular de la bacteria, incluidos los sistemas de síntesis de proteínas y generación de energía (Sharma et al., 2017).

Generalmente son altamente específicos, estando a menudo restringidos a cepas particulares dentro de una sola especie bacteriana. Sin embargo, algunos bacteriófagos tienen un rango de hospedador relativamente amplio, infectando múltiples especies dentro de un mismo género e incluso pueden infectar miembros de otros géneros estrechamente relacionados con su hospedador habitual (Monk et al., 2010). Gracias a este nivel de especificidad y a su capacidad de persistir en el ambiente, los fagos desempeñan un papel importante en la regulación del equilibrio microbiano, actuando como moduladores naturales de poblaciones bacterianas (Guttman et al., 2005). Además, los fagos son uno de los principales vehículos de la TGH y contribuyen a la patogenicidad al codificar genes de adaptación y virulencia, mediante la transferencia directa de EGM o a través de la conversión lisogénica (Touchon et al., 2017).

1.2.2 Ciclo de vida

Como todos los virus, los fagos son parásitos intracelulares obligados que dependen de bacterias hospedadoras específicas para su reproducción (Monk et al., 2010). Al infectar, los fagos se unen a objetivos específicos presentes en la superficie bacteriana, como las estructuras y los patrones de glicosilación de los glicopolímeros de ácido teicoico e inyectan su genoma en el citoplasma (Christian et al., 2024). A partir de esta unión, pueden iniciar dos ciclos de vida diferentes: el ciclo lítico (fagos líticos) o el ciclo lisogénico (fagos lisogénicos) (Cervera et al., 2019).

El fago lítico se replica dentro de la célula y utiliza los ribosomas del hospedador para fabricar sus proteínas. Luego, lisa la bacteria y los viriones son liberados, listos para infectar células susceptibles en el entorno (Lee et al., 2018; St-Pierre & Endy, 2008). El fago lisogénico o profago, también se adhiere a una bacteria e introduce su genoma en la célula hospedadora. Sin embargo, en este caso, el genoma del fago se integra en una ubicación específica del cromosoma del hospedador. El genoma del profago se replica de manera pasiva junto con el genoma del hospedador y se transmite a las células hijas en cada división celular sin matar a la bacteria (Nanda et al., 2015). No obstante, la exposición a condiciones ambientales alteradas, como el tratamiento con antibióticos, el estrés oxidativo o el daño en el ADN, puede convertir al profago en un fago lítico, permitiéndole entrar en el ciclo lítico y escapar del hospedador (Cervera et al., 2019).

1.2.3 Transducción

La transferencia horizontal de genes puede generar una enorme diversidad genética en organismos, especialmente en aquellos que se reproducen asexualmente. Los tres mecanismos clásicos de la TGH en procariotas son la transformación, la conjugación y la transducción (Schneider, 2021). Históricamente, se consideraba que la conjugación y la transformación eran los principales factores que contribuían a la TGH bacteriana, pero estudios recientes indican que se ha subestimado el papel de la transducción (Novick, 2003; Wamel et al., 2006).

La transducción generalizada ocurre cuando fragmentos de ADN bacteriano, en lugar del ADN del fago, son empaquetados accidentalmente en las cápsides virales durante el ensamblaje del fago. Estas partículas, que contienen exclusivamente material genético bacteriano, se denominan partículas transductoras (PT) (Thierauf & Maloy, 2003). Este proceso se diferencia de la transducción especializada, en la cual el profago se escinde de manera imprecisa del cromosoma del huésped, incorporando genes bacterianos adyacentes que luego son empaquetados junto con el ADN viral en nuevas partículas fágicas (Brammar, 2013).

1.3 Cepas clínicas de *S. epidermidis*, SCN45 e IPA1

1.3.1 Descripción

El Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe) cuenta con un grupo multidisciplinar destinado al estudio de infecciones graves, acreditado en el 2011 y dirigido por la Dra M^a Ángeles Tormo Mas. Este grupo pertenece a la Red Española de Bacteriófagos y Elementos Transductores (Fagoma) del Ministerio de Ciencia (IIS La Fe, 2025).

En el grupo se desarrollan varias líneas de investigación, siendo una de ellas la mejora de técnicas y estandarización de protocolos para la manipulación genética de *Staphylococcus* coagulasa negativos, como *S. epidermidis*. Este estudio sigue siendo un desafío, ya que muchas cepas clínicas no pueden transformarse con la metodología genética actualmente disponible debido a sus potentes y diversas barreras de restricción (Nedelmann et al., 1998). Estas limitaciones impiden la introducción eficiente de ADN exógeno, lo que dificulta la manipulación genética y hace que numerosas cepas sean prácticamente inaccesibles a la investigación molecular (Schulze et al., 2025).

A pesar de estas dificultades, se han estudiado los procesos regulatorios de las islas de patogenicidad de *Staphylococcus epidermidis* (SePIs) de las cepas clínicas SCN45, aislada de un paciente con una infección asociada a catéter, e IPA1, aislada de un paciente con una infección asociada a prótesis articular, dando los siguientes resultados no publicados.

1.3.2 Resultados previos

Las dos cepas clínicas fueron previamente secuenciadas y analizadas mediante bioinformática, lo que permitió identificar con precisión sus elementos genéticos móviles, tres islas de patogenicidad y dos fagos. Ambas cepas se compararon mediante el software Mauve, una herramienta de alineamiento de genomas que permite detectar regiones conservadas, reordenamientos, inversiones y los puntos de ruptura exactos en dichas regiones (Darling et al., 2004). Gracias a este análisis genómico, se observó que comparten de forma idéntica las tres islas de patogenicidad (SePI1, SePI3 y SePI5) así como un bacteriófago endógeno común, aunque difieren en un segundo fago adicional, lo que podría influir en su variabilidad fenotípica y capacidad de movilización génica (Figura 1).



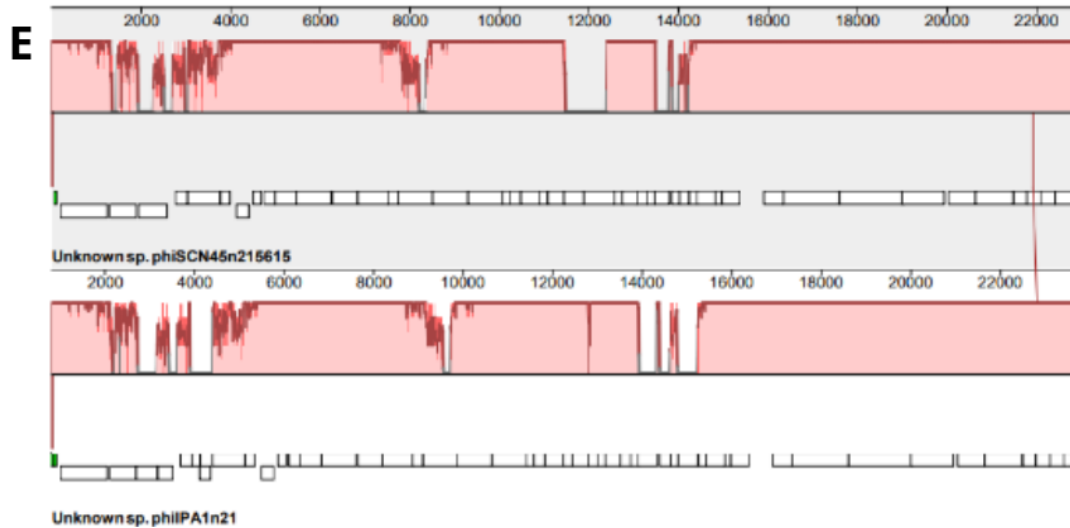


Figura 1. Comparación de SePIs y bacteriófagos entre las cepas de *S. epidermidis* IPA1 y SCN45. Alineamiento obtenido mediante el software Mauve donde se observa la comparación de: A) SePI1. B) SePI3. C) SePI5. D) Fagos Phi_n23 de IPA1 y Phi_n28 de SCN45. E) Fagos Phi_n21

A continuación, se estudió la movilización de sus SePIs con la técnica Southern blot, que consiste en la transferencia de fragmentos de ADN desde un gel de electroforesis a una membrana. Este paso inmoviliza los fragmentos de ADN de modo que la membrana reproduce semipermanentemente el patrón de bandas del gel (Chomczynski, 1992). Tras la inmovilización, el ADN puede someterse a un análisis de hibridación, lo que permite identificar bandas con similitud de secuencia con una sonda marcada (Brown, 1993). Utilizando sondas correspondientes a las integrasas de las SePIs, se observó que los fagos de la cepa IPA1 no movilizaban ninguna isla (Figura 2A), mientras que los fagos de la cepa SCN45 eran capaces de inducir las tres islas (Figura 2B). Esto planteó la posibilidad de que en las regiones genéticas donde había diferencias en las secuencias, en el fago Phi_n21, estaban localizados los inductores de las islas.

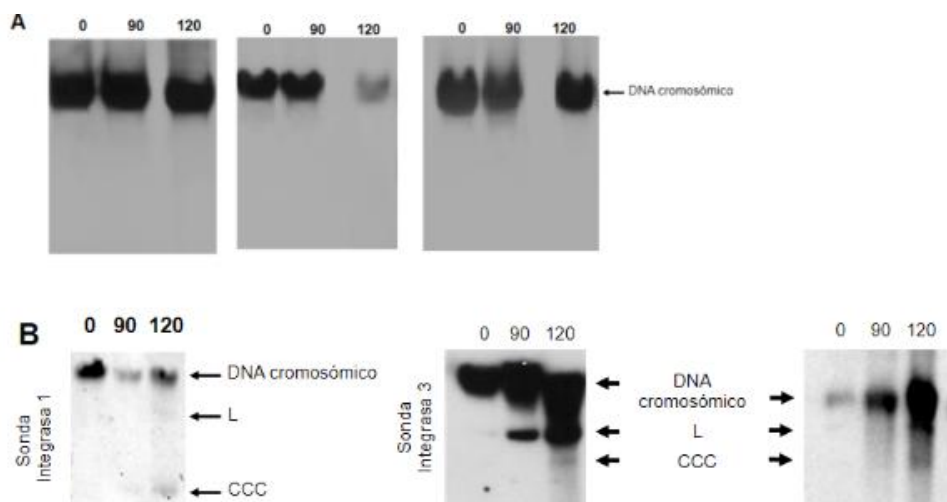


Figura 2. Southern Blot de las integrasas de las SePIs de SCN45 y IPA1. A) Southern Blot de la cepa IPA1. B) Southern Blot de la cepa SCN45. Se pueden observar tres bandas que hibridan con la sonda: integrasa en el DNA cromosómico, el intermediario circular (CCC) cuando escinde de este tras su inducción, y la banda procedente de la cápside del fago (L) cuando empaqueta su DNA en esta.

Seguindo la misma metodología, se evaluaron las proteínas inductoras de la región tres (Figura 4A), por separado y en combinaciones, dando como responsables de la inducción de la SePI5 de SCN45, la proteína DUF1381 y su combinación con la proteína HP (Figura 4B).

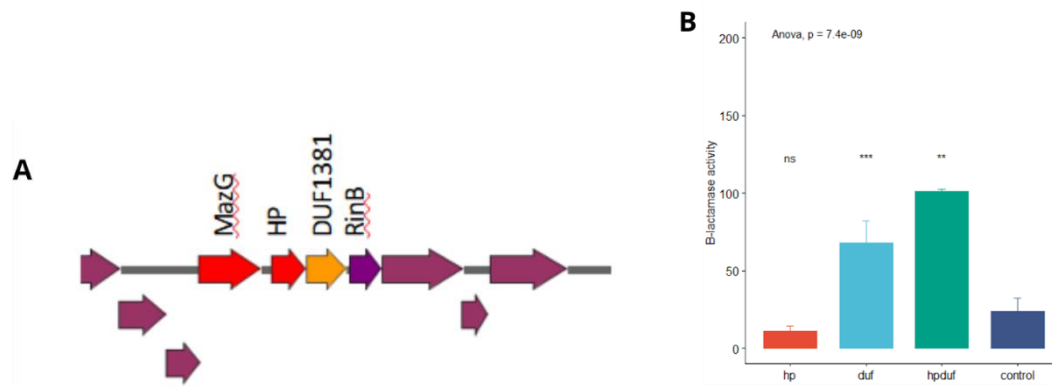


Figura 4. Ensayo de actividad B-lactamasa. **A)** Proteínas inductoras pertenecientes a la tercera región diferente de phi_n21_SCN45. **B)** Ensayo de actividad B-lactamasa entre las proteínas HP y DUF1381 y la combinación de estas frente al control sin inductor.

A partir de estos resultados, se dio continuidad a la investigación mediante la clonación de la proteína DUF1381, así como su combinación con la proteína HP, en la cepa IPA1, con el fin de analizar la movilización de sus SePIs en presencia de estas proteínas.

Asimismo, y con la finalidad de mejorar las herramientas disponibles para la manipulación genética de SCN, se ha llevado a cabo una línea de trabajo centrada en la optimización de metodologías para la transducción bacteriana, un proceso fundamental para la obtención de mutantes y la introducción de plásmidos complementadores. En este contexto, se ha trabajado en la búsqueda, aislamiento y caracterización de fagos líticos y lisogénicos con capacidad de transducir material genético desde *S. aureus* a *S. epidermidis*, con el fin de ampliar las posibilidades de transferencia horizontal en cepas difíciles de manipular.

Además, se han realizado evoluciones experimentales de estos fagos para mejorar su eficiencia de transducción y su especificidad frente a distintas cepas clínicas de interés, con la intención de generar una colección funcional de fagos adaptados que sirvan como herramienta genética versátil para estudios moleculares en *S. epidermidis*. Este trabajo no solo busca superar las barreras naturales a la entrada de ADN en estos microorganismos, sino también contribuir a la estandarización de protocolos fiables y reproducibles que puedan ser empleados por otros grupos de investigación que trabajen con estafilococos coagulasa negativos. Esto tiene un papel destacado en cuanto al objetivo de desarrollo sostenible (ODS) número 9: Industria, innovación e infraestructura, más concretamente en la meta 9.5 debido a que amplía el conocimiento de esta materia y contribuye a la investigación de posibles aplicaciones biotecnológicas. Asimismo, este trabajo también se alinea con el ODS 3, especialmente con la meta 3.3, al aportar conocimiento clave sobre los mecanismos de movilización de elementos patogénicos en *Staphylococcus epidermidis* y al desarrollar herramientas que facilitan su manipulación genética, contribuyendo así al control de enfermedades infecciosas.

2. Hipótesis

La proteína DUF13181, sola o en combinación con la proteína HP, es responsable de la movilización y activación de la isla de patogenicidad SePI5 de *Staphylococcus epidermidis* SCN45. Si estas proteínas se expresaran en IPA1 se produciría la movilización de su SePI5. Para ello se necesita un fago transductor que permita transferir plásmidos funcionales a *S. epidermidis*, facilitando la generación de mutantes y complementaciones que permitan estudiar este mecanismo.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Determinar si la proteína DUF13181, sola o en combinación con la proteína HP, es responsable de la movilización y activación de la SePI5 en la cepa clínica de *S. epidermidis* SCN45. Desarrollar herramientas basadas en fagos transductores para facilitar estudios funcionales mediante la transferencia de plásmidos, contribuyendo así al entendimiento de los mecanismos moleculares que regulan la virulencia en este patógeno.

3.2 Objetivos específicos

1. Desarrollar una colección de fagos transductores capaces de transferir plásmidos desde *S. aureus* hacia *S. epidermidis*, evaluando su eficiencia y estabilidad.
2. Optimizar las condiciones de transducción para maximizar la frecuencia de obtención de mutantes y complementaciones funcionales en cepas modelo de *S. epidermidis*.

4. Materiales y Métodos

4.1 Crecimiento bacteriano

Las cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. carnosus* se cultivaron rutinariamente en medio líquido de caldo de soja tripticado (TSB) y en agar TSB a 37°C, salvo que se indique lo contrario. pCN36_cd codifica resistencia al antibiótico tetraciclina, por lo que el medio se suplementa con 3 µg ml⁻¹ cuando se utiliza el plásmido, y se añade citrato (64 µg ml⁻¹) en las transducciones para inhibir la replicación del fago una vez producida la infección. Las cepas de *Escherichia coli* se cultivaron en caldo Luria-Bertani (LB) y en placas de agar LB a 37°C, suplementadas con ampicilina (Amp) (100 µg mL⁻¹) si contenían el plásmido pCN_36cd.

Se incluyeron 2 cepas clínicas de *S. epidermidis*, SCN45 e IPA1 aisladas de una infección asociada a catéter y una infección asociada a prótesis articular respectivamente, en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia. Previamente a este trabajo el grupo de investigación obtuvo la autorización ética del Comité de Investigación Biomédica del Instituto de Investigación La Fe (referencias 2104/0563 y 2017/0523).

4.2 Técnicas de biología molecular

4.2.1 Extracción de ADN plasmídico

Se centrifugaron 4 mL de un cultivo nocturno de *E. coli* o *S. aureus* y se eliminó el sobrenadante. El ADN genómico se aisló utilizando el kit “ZymoPure™ Plasmid MiniPrep Kit”, siguiendo las instrucciones del fabricante con la diferencia de que para *S. aureus* se realizó una lisis adicional con lisozima (12,5 µg mL⁻¹ Sigma-Aldrich) para la rotura de la pared bacteriana (15-60 minutos a 37°C) y una concentración sucesiva del ADN plasmídico como se representa en la Figura 5. Se cuantificó con el espectrofotómetro NanoDrop y se almacenó a -20°C.

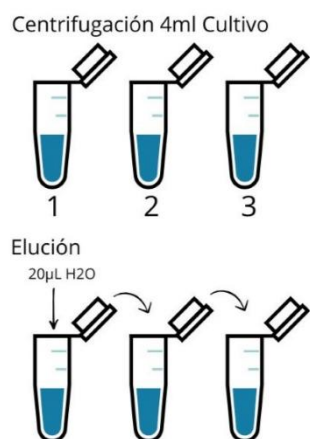


Figura 5. Método concentración DNA plasmídico. Se centrifugo 4ml de cultivo nocturno de *S. aureus* por cada Eppendorf (1.5 mL) y en el paso de elución se fue transfiriendo el contenido de la elución del primero al siguiente Eppendorf siendo este la sustitución del eluyente.

4.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los cebadores (primers) fueron obtenidos de Sumilab (Tabla 1). Los cebadores liofilizados se resuspendieron en en buffer Tris-EDTA a una concentración final de 200 µM. Se prepararon soluciones de trabajo de cebadores a 10 µM mediante una dilución 1:20. Para la clonación de proteínas, se utilizó la ADN polimerasa Phusion High-Fidelity (Thermo Fisher). La PCR rutinaria para la detección de productos se realizó con DreamTaq® (Promega). Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Tabla 1. Primers utilizados en las PCR

		Oligos	Secuencia
pCN36_pCd	Promotor cadmio	3m	GAATCGAACTAGTACGAAATGCGCACTTATTCA AGTGTATTT
		1c	GTTTCAGACATTGACCTTCAC
<i>S. aureus</i>	Coagulasa	coa 1m	ATAGAGATGCTGGTACAGG
		coa 2c	GCTTCCGATTGTTTCGATGC
		3mS	ACGCGTCGACTATAATAATAATTTGTTTAACTTT AAGAAGGAGATATACCATGCAACATC

Proteínas	HP-DUF	6cB	CGCGGATCCGGATAGTATCATGCGTTTCATC
	DUF	5mS	ACGCGTCGACAGAAGCAGAAGTTGTAGGAGT
		6cB	CGCGGATCCGGATAGTATCATGCGTTTCATC

El diseño de los primers se realizó utilizando el software SnapGene (GSL Biotech LLC), que permitió visualizar y simular la secuencia de ADN, identificar regiones de interés y seleccionar sitios de restricción compatibles con el vector de destino.

Para cada primer, se incluyó:

- Una secuencia de 15-18 nucleótidos específica del gen blanco.
- El sitio de restricción seleccionado en el extremo 5', seguido de 4-6 nucleótidos adicionales para asegurar la eficiencia de corte por la enzima de restricción.
- Se verificó que la Tm (temperatura de fusión) de ambos primers fuera similar y que el contenido de GC estuviera entre 40-60%.

Las secuencias de los primers y la disposición de los sitios de restricción se validaron in silico mediante la función de simulación de digestión de SnapGene, asegurando la correcta orientación y compatibilidad con el plásmido pCN36_pCd. Posteriormente, los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes y purificados para su inserción en el vector previamente linealizado mediante digestión enzimática.

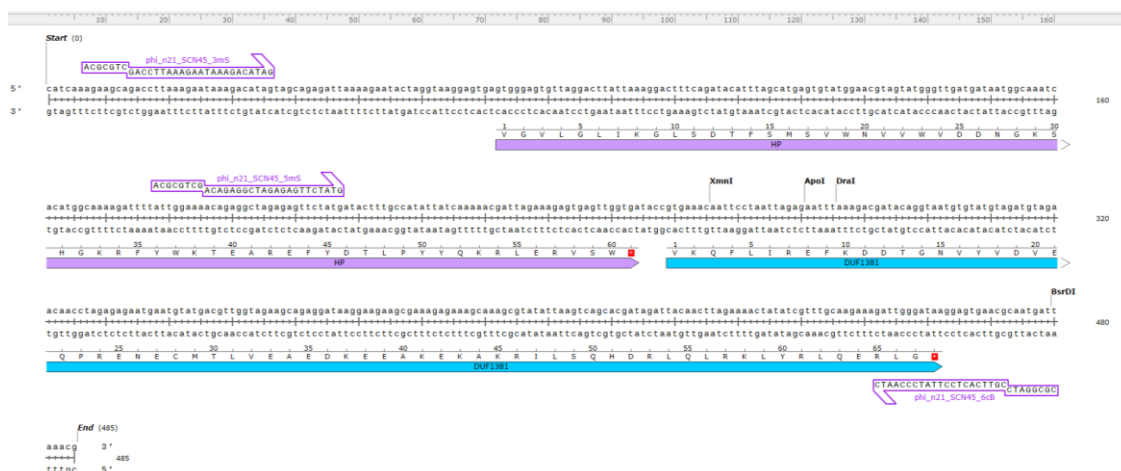


Figura 6. Diseños de primers para HPDUF1381 y DUF1381 con sitios de restricción específicos para la inserción dirigida en el plásmido pCN36_pCd, realizado con el software SnapGene.

4.2.3 Digestión con endonucleasas de restricción

Las muestras de ADN (plásmidos o productos de PCR) fueron digeridas mediante doble digestión con dos enzimas de restricción diferentes, BamHI y Sall (Thermo Fisher). Se seleccionó el buffer Bam HI que proporcionara la máxima actividad para ambas enzimas, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las digestiones se incubaron a 37°C durante 18-24 horas.

4.2.4 Purificación de DNA

Se purificaron los productos de PCR y las digestiones utilizando el kit “DNA clean & concentrator™ Zymo Pure”, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó con el espectrofotómetro NanoDrop y se almacenó a -20°C.

4.2.5 Electroforesis en gel de agarosa

El éxito de la amplificación por PCR se evaluó mediante electroforesis. Se prepararon geles de agarosa disolviendo agarosa D1 Low EEO (Pronadisa) en una concentración de 0,7-1% en tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE) y se añadió el intercalante Safe View para su detección por luz ultravioleta. Antes de cargar las muestras en el gel, se agregó buffer de carga 1X a cada muestra, compuesto por 60% glicerol, Tris-HCl (pH 7,6, 10 mM), EDTA (60 mM), azul de bromofenol (0,03%) y xylene cyanol FF (0,03%). Para la determinación del tamaño de las bandas, se usaron los marcadores de peso molecular “Gene Ruler 1Kb Plus” (Thermo Scientific). Los geles se visualizaron utilizando el sistema Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ con el software Image Lab™ (Bio-Rad).

4.2.6 Ligación de fragmentos de ADN con T4 DNA ligasa

Para la reacción de ligación, el vector y el inserto se utilizaron en una proporción molar de 1:3, siguiendo las recomendaciones del fabricante, aproximadamente 20 ng de vector y 60 ng de inserto. La ligación se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL, utilizando 1X de buffer de ligación y 1 µL de la enzima T4 DNA ligasa (Thermo Scientific). Las reacciones se incubaron a 22°C durante 1 hora y posteriormente la enzima ligasa fue inactivada a 65°C durante 10 minutos.

4.2.7 Construcción de plásmidos

La generación de vectores plasmídicos se llevó a cabo utilizando el procedimiento estándar (Russell & Sambrook, 2001). Los fragmentos de ADN (inserciones) fueron amplificados mediante PCR, purificados y luego digeridos con las enzimas de restricción apropiadas. Los productos digeridos se ligaron con el vector correspondiente previamente digerido.

Después de la ligación, el plásmido fue transformado en células de *E. coli* DH5α y DC10B químicamente competentes. El vector utilizado en este trabajo fue el pCN36 (Emmanuelle et al., 2004). El promotor inducible por cadmio fue clonado en el vector pCN36.

4.2.8 Secuenciación de ADN

Los fragmentos clonados fueron secuenciados por la empresa STABVIDA. Los datos de secuenciación fueron verificados utilizando la herramienta BLAST (Altschul et al., 1990), a través de su plataforma en línea en NCBI para realizar comparaciones de secuencias.

4.3 Transformación bacteriana

4.3.1 Preparación de competentes de *E. coli*

La preparación de competentes de *E. coli* se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento modificado de Chung et al. (1989). Se partió de cultivos crecidos durante la noche anterior, de DH5α y DC10B, de los que se preparó una dilución 1/100 de 100 mL de medio de cultivo LB y se dejó en agitación a 160 rpm, 37°C entre 1:30-2 horas hasta alcanzar una Densidad óptica (OD) de $_{600nm}$ de 0,3-0,4. A partir de este paso se trabajó en frío utilizando un recipiente con hielo. Se transfirió el cultivo en su totalidad a dos tubos Falcons de 50 mL y se dejó 10 minutos en hielo. A continuación, el contenido fue centrifugado a 2600 rpm, 4°C y 5 minutos. Se resuspendió el pellet con 1/25 de volumen de CaCl 0,1M y 15% glicerol y se dejó en hielo durante 24 horas. Por último, se realizaron alícuotas de 70 µL que fueron congeladas con nitrógeno líquido y posteriormente se guardaron a -80°C.

4.3.2 Preparación de competentes de *S. aureus* RN4220

La preparación de competentes de *S. aureus* RN4220 se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento modificado de Zeden et al. (2023). Se prepararon a partir de un cultivo nocturno cultivado a 37°C en TSB. Se inocularon 100 mL de LB con 1 mL del cultivo nocturno en un matraz y se incubaron a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una OD_{540nm} de 0,2. Posteriormente, el cultivo se colocó en hielo durante 10 min para detener el crecimiento bacteriano. Las células se pasaron a dos tubos Falcon de 50 mL, previamente ya enfriados y se recolectaron por centrifugación (3,000 x g, 10 min, 4°C), el sobrenadante resultante se descartó y el sedimento celular (pellet) se resuspendió en 10 mL de sacarosa 0,5M estéril y fría. Se repitieron los lavados dos veces más con la diferencia de que en el último solo se añadió 1 mL de sacarosa al 0,5M y se dejaron incubando a temperatura ambiente 20 min. Se centrifugaron a 3,000 x g, 10 min, 4°C y se resuspendió el pellet con 1 mL de sacarosa a 0,5M y 15% de glicerol. Por último, se hicieron alícuotas de 60 µL y se almacenaron a -80°C.

4.3.3 Preparación de competentes de *S. epidermidis* O47

La preparación de competentes de *S. epidermidis* O47 se llevó a cabo siguiendo el protocolo estándar de Grosser y Richardson (2016). Se hizo una dilución de 1:100 del cultivo nocturno de O47 en 50 ml de LB en un matraz de 250 ml y se incubó a 37°C hasta una OD_{660nm} de 0,8-1. A continuación el cultivo fue transferido a un Falcon de 50ml y se centrifugó a 5000 g 4°C 15 min. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 50 ml de glicerol al 10% frío y se volvió a centrifugar con los mismos parámetros anteriores. Este paso se repitió 3 veces más utilizando volúmenes decrecientes de glicerol (25 ml - 2,5 ml - 1 ml). Finalmente, se dividieron en alícuotas de 70 µL y se guardaron a -80°C.

4.3.4 Transformación de *E. coli* DH5α

Según el procedimiento basado en el protocolo de Pope & Kent (1996). Para cada alícuota de competentes de DH5α (70 µL) se añadió 2 µL de DNA plasmídico (10ng-100ng) o 10 µL de ligación, y se incubó por 30 minutos en hielo. Las células fueron sometidas a un choque térmico durante 1,5 minutos en estufa a 42°C y luego se colocaron 2 minutos en hielo. Se añadió 750 µL de LB y se dejó en agitación durante 1h a 37°C. Al finalizar este último paso, se sembró en placas de LB+Amp y se incubó 18-24h a 37°C.

4.3.5 Electroporación de *S. aureus* RN4220

Para el método de electroporación de *S. aureus* RN4220 se siguió el protocolo estándar de Grosser y Richardson (2016). Se añadió aproximadamente 1 µg de ADN plasmídico a 60 µL de células electrocompetentes de *S. aureus*, se mezcló con la pipeta y se transfirió a una cubeta de 1 mm (Gene Pulser® Cuvette, Bio-Rad). Las células fueron sometidas a un pulso de 2,5 kV (25 µF, 100 Ω) utilizando el sistema de electroporación Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad), seguido inmediatamente por la adición de 600 µL de TSB. La mezcla se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y se incubó a 37°C con agitación a 180 rpm durante 1 hora. Se sembró en 2 placas de medio Agar Soya Trypticaseína (TSA) selectivo (200 µL en una placa y el resto en la otra). Las placas se incubaron a 37°C durante 18-24 horas.

4.3.6 Electroporación de *S. epidermidis* O47 por el método de Grosser y Richardson (2016)

Para el método de electroporación de *S. epidermidis* O47 se siguió el protocolo estándar de Grosser y Richardson (2016). Se añadió 1 µg de ADN plasmídico a 70 µL de células electrocompetentes de *S. epidermidis* y se dejó en incubación a temperatura ambiente durante 30 min y se transfirieron a una cubeta de 1 mm (Gene Pulser® Cuvette, Bio-Rad). Las células fueron sometidas a un pulso de 2,0 kV (25 µF, 100 Ω) utilizando el sistema de electroporación Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad), seguido inmediatamente por la adición de 500 µL de TSB. La mezcla se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y se incubó a 37°C con agitación a 180 rpm durante 4 horas. Se sembraron en 2 placas de TSA selectivo (100 µL en una placa y el resto en la otra). Las placas se incubaron a 37°C durante 18-24 horas.

4.3.7 Electroporación de *S. epidermidis* O47 por el método basado en el protocolo de Löfblom et al. (2007)

Según el procedimiento basado en el protocolo de Löfblom et al. (2007). Se incubaron las células competentes en hielo durante 5 minutos y otros 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 14,000 x g por 1 min y se resuspendieron en 80 µL de buffer de 0,5 mol⁻¹ de sacarosa y 10 % de glicerina. A partir de este paso se provo a añadir 1 µg de ADN plasmídico antes de un choque térmico a 54°C por 2 min, a añadir 1 µg de ADN plasmídico después del choque térmico y a añadir 1 µg de ADN plasmídico sin choque térmico. Se transfirió la mezcla a una cubeta de 1 mm (Gene Pulser® Cuvette, Bio-Rad). Las células fueron sometidas a un pulso de 2,0 kV (25 µF, 100 Ω) utilizando el sistema de electroporación Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad), seguido inmediatamente por la adición de 500 µL de TSB. La mezcla se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y se incubó a 37°C sin agitación durante 1 hora. Se sembraron 100 µL en placas de TSA selectivo. Las placas se incubaron a 37°C durante 18-24 horas.

4.4 Metodología de bacteriófagos

4.4.1 Inducción de profagos

Los bacteriófagos fueron inducidos y aislados basándose en los métodos descritos por Kaneko et al. (1998). Se realizó una dilución 1/50 en TSB de un cultivo estacionario y se creció hasta alcanzar una $DO_{540nm} = 0,25-0,3$. Seguidamente se añadió Mitomicina C (MC) ($2 \mu g mL^{-1}$ MC). La MC causa daño en el ADN, lo que desencadena la vía de respuesta SOS e inicia el ciclo lítico del fago. Posteriormente los cultivos se crecieron en agitación lenta a $32^{\circ}C$ con 80 rpm durante 4 horas o hasta que ocurriera la lisis. Los lisados obtenidos se centrifugaron a $3,000 \times g$ por 5 min y se filtraron a través de una membrana de $0,22 \mu m$ para eliminar aquellas bacterias que no hubieran sido lisadas. Finalmente, estos lisados se guardaron a $4^{\circ}C$ hasta su uso.

4.4.2 Infección por bacteriófagos

Se empleó el protocolo descrito en Cervera et al. (2019). Para ello se realizó una dilución 1/50 en TSB de un cultivo estacionario y se creció el cultivo hasta alcanzar una $DO_{650nm} = 0,15$. Posteriormente el cultivo se centrifugó, se resuspendió en TSB-Phage buffer ($1mM NaCl$, $0,05M$ Tris $pH = 7,8$, $1mM MgSO_4$, $4mM CaCl_2$) (1:1) y se infectó con el fago a una multiplicidad de fagos/bacterias 3:1 o 1:1. La lisis ocurría también sobre las 4h después de la infección. Cuando finalizó la infección se midió la absorbancia del cultivo a una DO_{650nm}

Para evaluar la eficacia de lisado de un fago se recurrió a los modelos matemáticos y estadísticos descritos por Geng et al. (2024); Molendijk et al. (2023); Rajnovic et al. (2019), que utilizan la medición de la densidad óptica de los cultivos bacterianos a lo largo del tiempo para estudiar la interacción con los fagos.

Uno de los métodos principales que describen es el cálculo del Porcentaje de Inhibición (PI). Este porcentaje se calcula integrando el área bajo la curva (AUC) de la DO a lo largo del tiempo, comparando el área de un cultivo infectado con un cultivo control (sin fagos) y una línea base. La fórmula es: $PI = (\text{Área_control} - \text{Área_fago}) / (\text{Área_control} - \text{Área_línea_base}) \times 100$. Este es un enfoque cuantitativo para medir cuánto se inhibió el crecimiento bacteriano debido al fago.

Para la detección de fagos a bajas concentraciones, se utiliza un modelo estadístico basado en la distribución de Poisson. Este modelo les permite calcular la probabilidad de que una muestra de un volumen determinado contenga cero partículas de fago, lo que es crucial para determinar el límite de detección y la confiabilidad del ensayo a baja concentración. La probabilidad de una muestra "vacía" (sin fagos) se calcula como $e^{(-\lambda)}$, donde λ es el número promedio esperado de fagos en la muestra.

Por lo que se determina que si no hay lisis el porcentaje de Inhibición estará cerca del 0%, mientras que cuando haya lisis completa el Porcentaje de Inhibición estará cerca del 100%. Nuestro grupo de investigación se apoyó en estos análisis para proponer un método para la cuantificación rutinaria de fagos en distintos ámbitos y para establecer umbrales que indiquen lisis nula, parcial o completa en cada sistema.

Para ello también se midió la DO de la cepa sin fago, expuesta a las mismas condiciones que el protocolo de infección, y este valor se asumió como un 0% de PI, dado que no había fago que pudiera impedir la inhibición del crecimiento bacteriano. Por lo que se afirmó que valores de DO cercanos a los valores del cultivo sin fago están cerca de una PI de 0% y por tanto se catalogó como una lisis nula.

La turbidez es directamente proporcional a la concentración de células bacterianas vivas presentes en el medio. El denominado "blanco" es el medio de cultivo sin bacterias ni fagos, y su medición de DO representa la línea base de turbidez del sistema experimental. Cuando se añade un fago a un cultivo bacteriano susceptible, el fago infecta y lisa las células bacterianas. Este proceso de lisis reduce la población bacteriana, lo que a su vez causa una disminución en la turbidez del cultivo y, por lo tanto, en la lectura de DO. Por lo que hemos determinado que una lisis completa ocurre cuando la actividad del fago es tan efectiva que la mayoría o la totalidad de la población bacteriana es destruida. En este escenario, la turbidez del cultivo vuelve al nivel de la línea base, es decir, al nivel de la DO del blanco, es decir DO=0.

4.4.3 Evolución de bacteriófagos

Según el procedimiento basado en el protocolo de Koskella (2014). Se realizó una dilución 1/50 en TSB de un cultivo estacionario de la cepa en la que se quisiera evolucionar el fago y se creció hasta alcanzar una $OD_{540nm} = 0,2$. Se transfirieron 50 μ L del cultivo a tubos de ensayo de 12 mL y se añadió 100 μ L de lisado. Se dejó incubar 10 minutos a temperatura ambiente y se añadió 3 mL de Phage Top Agar (10mM $CaCl_2$) al tubo de cultivo y se vertió a una placa de TSA. Las placas se incubaron a 37°C durante 18-24 horas. Con una asa de Drigalski se recogió la capa de Phage Top Agar (PTA) en un Falcon de 15 mL y se centrifugó a 4,000 x g a 4°C por 15 minutos. Se filtró el sobrenadante a través de una membrana de 0,22 μ M para obtener solo el fago evolucionado. Este paso se repitió tantas veces se quisiera mejorar la eficiencia del fago sobre la cepa.

4.4.4 Ensayo de titulación de bacteriófagos

Para el ensayo de titulación se siguió el protocolo modificado de Adams (1959). Se pasaron 80 μ L de cultivo estacionario de la bacteria receptora a un nuevo tubo de cultivo (12 mL). Se añadió 3 mL de PTA (10mM $CaCl_2$) que estaba a 55°C al tubo de cultivo y se vertió a una placa de Phage buffer. Cuando el Top Agar se solidificó (15-20 min) se añadió al tapiz de la bacteria aceptora 10 μ L de lisado. Se incubó a 37°C toda la noche. Este paso se repitió a diferentes concentraciones de lisado: -1, -2, -3, -4, -5, y -6. Al día siguiente si hubo lisógenos se vieron halos y dentro de ellos se observó colonia aisladas. Cada halo representa la lisis de un cultivo bacteriano infectado por un fago y puede designarse como una unidad formadora de placa (UFP). $UFP/mL = \text{Número de halos} / (\text{Dilución de la placa contada} \times \text{Volumen de lisado})$

Para el análisis estadístico de UFP/mL cada experimento se hizo por triplicado y se calcularon funciones estadísticas básicas como la desviación estándar para ver la dispersión de los valores con respecto a la media de los datos. Se utilizó un análisis de varianza bidireccional (ANOVA) para determinar la significancia estadística seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Šidák (García, Molina, Lozano, & Herrera, 2005), indicadas como: no significancia (ns), * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ y **** $P < 0,0001$.

4.4.5 Transducción por el método basado en el protocolo de Krausz y Bose (2016)

Para estudiar el proceso de transferencia se usó una SePI o de otros EGM como plásmidos, se utilizaron los lisados obtenidos mediante el método de inducción o infección. Cabe destacar que los plásmidos deben poseer un marcador genético que confiera a la bacteria resistencia a un antibiótico determinado, lo cual nos permite estudiar la transferencia de estos (Fiedler & Wirth, 1988).

Basándose en el protocolo descrito por Krausz y Bose (2016), se realizaron diluciones seriadas de los lisados en Phage buffer. De esas diluciones, 100 μ L se añadieron a 1 mL de

bacterias aceptoras (RN4220, 047, IPA1, SCN45, TM300) crecidas hasta $OD_{540nm} = 1,4$ a las que se añadió $CaCl_2$ a una concentración final de 4,4 mM. La mezcla del lisado con la bacteria se incubó a 37°C durante 20 min para dar tiempo suficiente a la isla a penetrar en la bacteria.

Posteriormente se sembró en placas de TSA con el antibiótico requerido, añadiendo a la mezcla fago-bacterias, 3 mL de TSA top agar (TSB 3g / 100 mL + agar 0,075 / 100 mL). Además, estas placas contenían Citrato Sódico (17 mM) para mejorar la adhesión de los fagos a las bacterias aceptoras. Se dejaron incubando a 37 °C durante la noche.

4.4.6 Transducción por el método basado en el protocolo de Mašlaňová et al. (2016)

En un matraz de 100 mL se añadieron 20 mL de TSB y una colonia de bacteria (RN4220, 047, IPA1, SCN45, TM300) y se dejó crecer toda la noche. Se centrifugaron los 20 mL de cultivo en Falcon de 50 mL a 4,000 x g a 4°C por 15 minutos y se resuspendió en 1 mL de TSB.

Se preparo la muestra en eppendorf de 2 mL añadiendo 250 µL del cultivo bacteriano, 500 µL de LB más 10mM $CaCl_2$ y 250 µL de lisado. Para el control no se añadió lisado y se añadieron 750 µL de LB. Se dejó incubar a 37°C sin agitación por 15 minutos. Se pasaron las muestras a hielo y se añadió 500 µL de NaCitate 0,02M frío. Se centrifugó a 10,000 x g a 4°C por 10 minutos y se volvió a resuspender en NaCitate 0,02M frío. Se dejó incubar en hielo por 2h. Se sembraron 100µL en placas de TSA selectivo. Las placas se incubaron a 37°C durante 18-24 horas.

4.4.7 Transducción por el método de Schulze et al. (2025)

Para llevar a cabo el ensayo de transducción, las cepas receptoras (RN4220, 047, IPA1, SCN45, TM300) fueron inoculadas en TSB y cultivadas durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, se inocularon 10 mL de TSB fresco con el cultivo nocturno hasta alcanzar una densidad óptica (OD_{600}) de 0,1. Las culturas se incubaron con agitación (160 rpm) a 37 °C hasta alcanzar una OD_{600} de 0,8.

A continuación, se transfirieron 200 µL de cultivo a cinco tubos de 1,5 mL. Las células fueron centrifugadas a 11,000 × g durante 1 minuto, se eliminó el sobrenadante y los pellets celulares fueron resuspendidos en 200 µL de tampón fágico (4 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgSO_4$, 0,1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0,1% gelatina (w/v); pH ajustado a 7,8).

Cada alícuota fue sometida a tratamiento térmico durante 2 minutos en un bloque térmico (Eppendorf) a distintas temperaturas: 37 °C (control), 48 °C, 50 °C, 52 °C y 54 °C, sin agitación. Posteriormente, se añadieron 100 µL de lisado fágico conteniendo el plásmido y se incubó la mezcla a 37 °C durante 10–15 minutos sin agitación, para permitir la adhesión del fago y la transducción. Finalmente, las mezclas fueron sembradas en placas de TSA suplementadas con el antibiótico correspondiente. Las placas se incubaron durante la noche a 37 °C

4.4.8 Titulación de la transducción

Transcurridas entre 18 y 24 horas de incubación, se procedió al recuento de las colonias presentes en cada placa. Cada colonia obtenida se consideró una unidad formadora de transductantes (UFT). $UFT/mL = (\text{Número de colonias contadas} \times \text{Dilución inversa}) / \text{Volumen de lisado usado (mL)}$.

5. Resultados y discusión

5.1 Construcción del vector

Las proteínas fueron clonadas en el plásmido pCN36_cd (Figura 7) e introducidas en *S. aureus* RN4220 mediante electroporación.

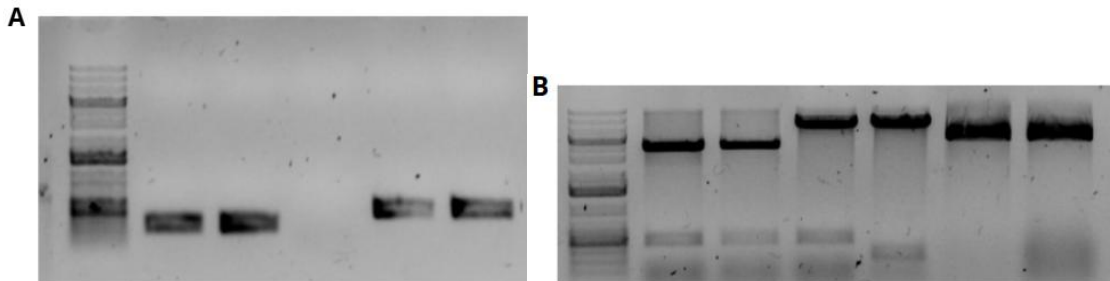


Figura 7. Revelado electroforesis gel de agarosa. **A)** Los pocillos 2 y 3 representan la clonación de la proteína DUF1381 de 287 pares de bases (pb), los pocillos 5 y 6 representan la clonación de las proteínas HPDUF1381 de 459 pb. **B)** Los pocillos 2 y 3 muestran el plásmido pCN36_cd digerido de 4542 pb, los pocillos 4 y 5 representan el pCN36_cd con HPDUF1381, 5001pb, y los pocillos 6 y 7 muestran el pCN36_cd con DUF1381, 4829 pb. . El primer carril corresponde al marcador de peso molecular Gene Ruler 1kb DNA plus Ladder.

5.2 Lisis bacteriana inducida por fagos líticos y lisogénicos

Un total de 40 profagos fueron inducidos de diferentes cepas de *S.aureus* y *S.epidermidis* y se emplearon para infectar las cepas RN4220, IPA1, SCN45, 047 y TM300. La cepa O47, un aislado de laboratorio ampliamente utilizado derivada de *S. epidermidis*, y TM300, perteneciente a *S. carnosus*, fueron utilizadas con el propósito de servir como posibles intermediarios entre RN4220 y las cepas clínicas de *S. epidermidis* (Tabla 2). Además, se buscaron fagos con la capacidad de infectar a más de una cepa bacteriana y así proceder a un estudio de evolución dirigida.

Tabla 2. Valores de OD de los lisados bacterianos tras infección con profagos inducidos de *S. aureus* y *S. epidermidis*.

Lista de Fagos	RN4220	IPA1	SCN45	O47	TM300
$\emptyset$	0,98	0,67	0,69	0,72	0,80
80,00	0,00	0,45	0,67	x	x
11,00	0,04	0,60	0,59	x	x
IPA1	0,96	0,67	0,63	x	x
IPA2	0,73	0,52	0,45	0,69	x
IPA15	0,92	0,56	0,48	x	x
IPA26 4.1	0,14	0,59	0,69	0,75	0,04
IPA26 4.2	0,05	0,33	0,61	0,07	0,05
IPA26 6.1	0,11	0,66	0,27	0,04	0,09
IPA26 6.2	0,07	0,69	0,62	0,12	0,01
Phi3	0,01	0,57	0,70	0,56	x
Phi4	0,11	0,61	0,68	0,70	x
Phi5	0,01	0,65	0,57	0,58	x
Phi6	0,20	0,45	0,65	0,62	x
Phi10	0,08	0,58	0,54	0,67	x
Phi15	0,02	0,61	0,59	0,54	x
Phi16	0,14	0,46	0,43	0,60	x
Phi20	0,12	0,65	0,59	0,65	x
Phi21	0,05	0,64	0,62	0,72	x
Phi26	0,02	0,49	0,57	0,71	x
Phi46	0,09	0,68	0,46	0,64	x
Phi67	0,08	0,65	0,68	0,53	0,06
Phi71	0,10	0,42	0,50	0,05	0,06
SCN1	0,84	0,65	0,56	0,09	x
SCN2	0,80	0,66	0,66	0,04	x
SCN99	0,98	0,50	0,48	x	x
SCN100	0,79	0,59	0,57	x	x
SCN101	0,47	0,72	0,57	0,49	x
SCN109	0,56	0,62	0,63	0,62	x
SCN204	0,84	0,62	0,48	0,73	x
SCN264	0,96	0,59	0,46	0,61	x
A1	0,05	0,07	0,62	0,12	0,16
A2	0,02	0,39	0,51	0,09	0,06
2F2	0,62	0,63	0,60	0,03	0,80
2F8	0,59	0,68	0,49	0,03	0,69
3F8	0,57	0,53	0,55	0,07	0,76
AT2	0,83	0,58	0,63	0,11	0,82
AT6	0,79	0,47	0,41	0,14	0,70
256 1.1	0,98	0,55	0,60	0,07	0,79
FF6	0,96	0,65	0,57	0,05	0,77
L1	0,87	0,67	0,61	0,12	0,67

Como se ha comentado anteriormente, se buscaba un fago que fuera capaz de infectar tanto a la cepa donante de plásmidos (*S. aureus* RN4220) como a la hospedadora (idealmente *S. epidermidis*, pero con opción de infectar primero a *S. carnosus* dependiendo de los resultados obtenidos). Los valores de absorbancia más cercanos al del control tienen un PI menor, reflejando una eficiencia de infección muy limitada. Los valores más cercanos a la OD=0 indican una lisis bacteriana total o casi total. En vista de los resultados obtenidos, se optó por utilizar los fagos A1 y A2 para transducción puesto que producían buena lisis tanto en RN4220 como en IPA1 y O47.

5.3 Titulación de fagos evolucionados

Los fagos A1 y A2 fueron aislados previamente en el laboratorio a través del muestreo de aguas residuales y ambientales sobre cepas de *S. epidermidis*. Por ese motivo, aunque los fagos parecían presentar buena infección en ambas especies, se optó por optimizarla en *S. aureus*. Para ello, los fagos fueron sometidos a un proceso de evolución dirigida con el fin de optimizar su capacidad de infección en la cepa RN4220, forzándolos a infectar esta cepa a través de sucesivos pases. Para comprobar la infección, se realizó un recuento de calvas en placa enfrentando los fagos antes y después de la evolución en RN4220 y O47 (Figura 8).

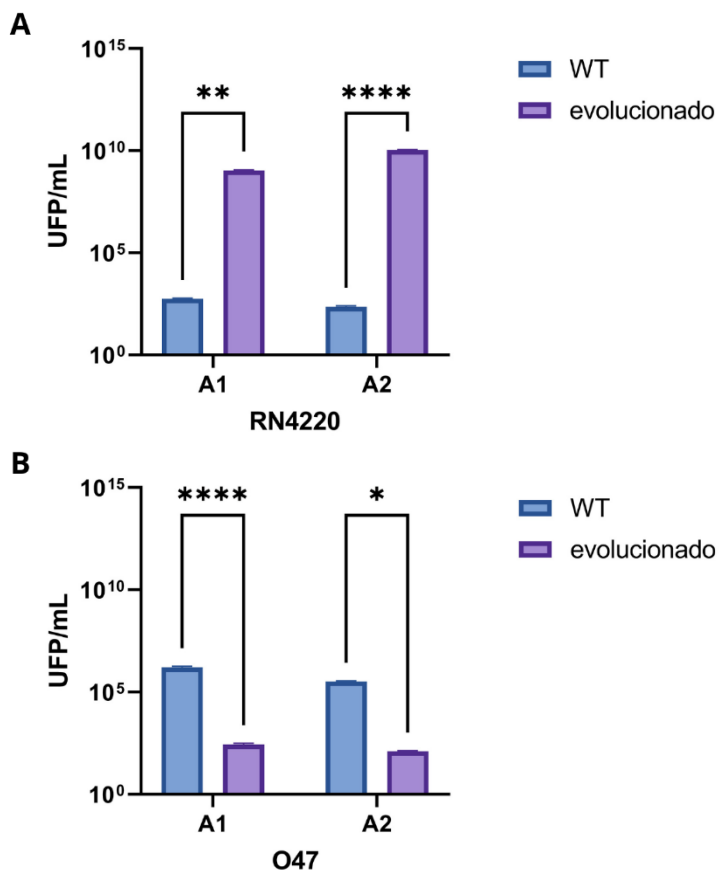


Figura 8. Titulación de fagos A1 y A2 antes (WT) y después del proceso de evolución. Los fagos A1 y A2 se evolucionaron tres veces sobre la cepa RN4220 y se determinó su título tanto en *S. aureus* como en *S. epidermidis* mediante el recuento de calvas, expresándose como unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mL). **A)** Titulación de los fagos A1 y A2, WT y evolucionados en la cepa de *S. aureus* RN4220. **B)** Titulación de los fagos A1 y A2, WT y evolucionados en la cepa de *S. epidermidis* O47. Los datos representan la media $\pm$ SEM de al menos tres experimentos independientes. Evaluado mediante ANOVA de dos factores y comparación múltiple de Sidak. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

La titulación de los fagos A1 y A2 evolucionados muestra un incremento notable de infectividad en la cepa RN4220, alcanzando valores de hasta ocho órdenes de magnitud superiores respecto a los fagos no evolucionados, con un P value de $<0,01$ para el fago A1 y de $<0,0001$ para el fago A2. Sin embargo, esta mejora se acompañó de una pérdida significativa de la capacidad infecciosa en la cepa O47, con un P value de $<0,0001$ para el fago A1 y $<0,05$ para el fago A2, lo que indica una especialización del fago hacia RN4220 a costa de reducir su espectro de hospedadores.

5.4 Titulación de la transducción

Tras la infección de la cepa RN4220 donante de plásmido pCN36_cd, el lisado resultante se utilizó para la transducción de este plásmido hacia O47 y hacia RN4220 como control positivo de infección y transducción. La única transducción efectiva se obtuvo en el control positivo utilizando el fago A2 evolucionado sobre RN4220, con un título de 2670 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) (Figura 9). Aunque el fago A2 evolucionado incrementó su capacidad para infectar RN4220 (Figura 8), mostró una pérdida significativa de título frente a la cepa O47, lo que impidió su uso exitoso en la transducción hacia *S. epidermidis*, que era el objetivo principal.

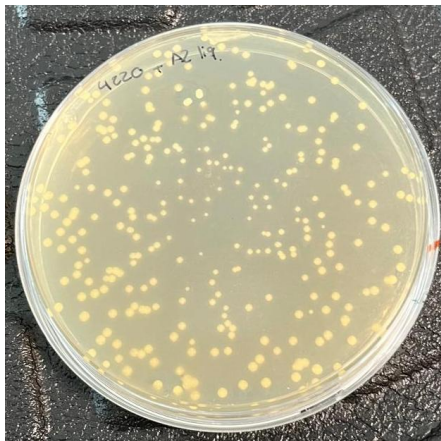


Figura 9. Placa de cultivo representativa de la única transducción efectiva obtenida, realizada con el fago A2 evolucionado. La transferencia de material genético se logró desde una cepa de *S. aureus* RN4220 transformada hacia otra cepa de RN4220 no transformada con un título de 2670 UFC/mL.

6. Discusión

La colección de 40 fagos lisogénicos y líticos activos frente a *S.aureus* y *S.epidermidis* mostró la presencia de fagos que tenían la capacidad de infectar a más de una cepa, por lo que se intentó buscar cepas intermediarias como *S.epidermidis* O47 y *S. carnosus* TM300 que sirvieran de “puente genético” para la transmisión del pCN36_cd + DUF1381 y pCN36_cd + HPDUF1381, de la cepa RN4220 hacia las cepas clínicas SCN45 e IPA1. Además, dos de los fagos capaces de infectar a más de una cepa, los fagos A1 y A2, fueron evolucionados para optimizar su capacidad de infección en la cepa RN4220.

A pesar de estos avances, en este estudio no se consiguió introducir las proteínas responsables de la inducción de la SePI5 de SCN45, en la cepa clínica IPA1, por tanto, no se logró determinar si estas proteínas eran capaces de inducir la SePI5 de IPA1 y por consiguiente que SePI5 albergara las proteínas responsables de la inducción de las SePI1 y SePI3. Esta dificultad refleja las potentes y diversas barreras que presentan los *Staphylococcus* coagulasa negativos para la introducción de ADN extraño, lo que impide la manipulación genética y hace que muchas cepas sean totalmente inaccesibles para la investigación molecular (Schulze et al., 2025).

Un reciente estudio describe una nueva técnica que combina el choque térmico y la transducción para permitir la manipulación genética de cepas y especies de estafilococos. Sus datos experimentales sugieren que la inactivación temporal de los sistemas de restricción mediante el choque térmico permite la introducción exitosa de ADN extraño en estas cepas (Schulze et al., 2025). Se replicó su técnica con nuestra colección de fagos evolucionados pero no se obtuvo ningún resultado positivo. También se evaluó la adición de un choque térmico en distintos intervalos previos a la electroporación; sin embargo, esta estrategia tampoco resultó efectiva.

En el artículo de Monk et al. (2012) describen la construcción de un mutante de ADN citosina metiltransferasa en la cepa de clonación de *E. coli* de alta eficiencia DH10B, llamada DC10B. Esta cepa elimina la metilación de citosina mediante la delección del gen *dcm*, permitiendo que el ADN plasmídico evite la barrera de restricción tipo IV y facilitando su transferencia directa a cepas clínicas de *S. aureus* y *S. epidermidis*. Por tanto, se decidió cambiar la *E. coli* DH5α por la utilizada en este estudio, para ello una vez transformada la cepa DC10B con los distintos plásmidos, se utilizó como fuente del plásmido y se utilizó tanto para transducción como electroporación. No obstante, la ausencia de metilación podría haber activado sistemas RM alternativos en las cepas diana, o bien, podrían existir otros factores epigenéticos que afectan la estabilidad y expresión del plásmido introducido (Roberts et al., 2015), lo que explicaría la falta de resultados positivos.

Por último, se emplearon métodos evolutivos como los descritos por Gómez y Buckling (2011), donde observaron que en *Pseudomonas aeruginosa*, fagos co-cultivados serialmente desarrollaron mutaciones en la proteína gp17, lo que les permitió ampliar su rango de hospedadores y superar barreras de especificidad. En este trabajo se aplicó la misma técnica con los fagos A1 y A2 en *S. aureus* RN4220 con la finalidad de mejorar la infectividad de los fagos. El análisis de secuenciación de los fagos evolucionados podría aportar información relevante sobre las mutaciones adquiridas y su impacto en la especificidad de adsorción y en la eficiencia de transducción. Sin embargo, en nuestro caso, mejoró la infectividad hacia la cepa RN4220 pero se perdió afinidad por la cepa O47, lo que sugiere un efecto de compensación en la adaptación de los fagos y, nuevamente, no obtuvo una transducción efectiva.

Además, se intentó evadir los complejos de restricción que presenta *S. epidermidis* y mejorar la afinidad de los fagos mediante co-evolución; sin embargo, no se logró una transformación efectiva. Diversos estudios presentan que la mayoría de las cepas donantes de ADN de *S. aureus* sintetizan receptores fágicos de ácido teicoico de pared de ribitol-fosfato (WTA) distintos de la mayoría de los receptores de CoNS, por lo que la adsorción de fagos transductores de *S. aureus* a CoNS suele estar bloqueada, imposibilitando la TGH (Guoqing et al., 2011; Winstel et al., 2013, 2014). Una futura línea de investigación podría ser encontrar fagos con propiedades compartidas en los receptores de superficie celular WTA y de ese modo obtener una herramienta adecuada para la transferencia de ADN plasmídico como han logrado Volker et al. (2015) con el fago $\Phi 187$.

Otra opción que podría investigarse en líneas futuras es el uso de la tecnología GOTraP que puede optimizar el DNA para la transducción mediante la optimización del reconocimiento del huésped. En el estudio realizado por (Auster et al., 2019) reflejan como el plásmido obtenido por GOTrap se transduce más que el plásmido parental (WT). La aplicación combinada de tecnologías como GOTraP y la caracterización funcional de las proteínas de envoltura fágica podría representar un enfoque integral para superar las barreras de transferencia genética en estafilococos clínicamente relevantes.

Otra posible continuación de este trabajo sería profundizar en la caracterización de los sistemas de restricción/modificación específicos de las cepas utilizadas, para así poder abordar esta problemática desde una perspectiva más dirigida y personalizada. También sería interesante explorar nuevas estrategias que incluyan la evolución dirigida de fagos y su secuenciación, con el fin de identificar las modificaciones genéticas ocurridas antes (WT) y después del proceso evolutivo.

Estos últimos años también ha surgido una prometedora técnica basada en explorar el diseño de regiones COS (*cohesive end sites*), y clonaras en plásmidos para mejorar la encapsidación del ADN durante la transducción mediada por fagos. Estas secuencias, presentes naturalmente en genomas de bacteriófagos como λ , actúan como señales específicas para la maquinaria de empaquetamiento viral (Cue & Feiss, 1993). En el estudio realizado por Chandry et al. (2002) el bacteriófago sk1 de *Lactococcus lactis* fue capaz de transducir plásmidos que contenían el sitio COS del fago y secuencias de ADN circundantes a frecuencias de hasta 2×10^{-3} transductantes por UFP. Otros autores como Quiles-Puchalt et al. (2014) evaluaron la funcionalidad de los sitios cos de fagos, para ello clonaron el sitio cos del fago $\phi 12$ específico de *S. aureus* en el plásmido pCU1, que originalmente no era transferible por $\phi 12$ (< 10 UFC/mL), consiguiendo demostrar que los sitios cos clonados permitieron la transferencia de los plásmidos mediante el fago $\phi 12$ al obtener títulos de $1-2 \times 10^3$ UFC/mL.

Aunque los resultados obtenidos en este trabajo no fueron positivos en cuanto a la introducción de plásmidos clonados en *S. epidermidis*, el proceso experimental ha permitido identificar con mayor precisión las barreras que limitan la manipulación genética en estafilococos coagulasa negativos. La recopilación de fagos líticos y lisogénicos, junto con la adaptación y evaluación de protocolos de transducción y electroporación, representa un avance metodológico útil para futuras investigaciones en el campo. En este contexto, la evolución dirigida de fagos ha emergido como una estrategia relevante para adaptar estos virus a nuevos hospedadores bacterianos (Hall et al., 2013; Koskella, 2014; Mavrich & Hatfull, 2017).

Cabe destacar que la integración de aproximaciones de biología sintética, como la edición de fagos mediante CRISPR-Cas y la síntesis de receptores bacterianos artificiales, podría abrir nuevas vías para la manipulación genética de cepas clínicamente relevantes. El desarrollo de sistemas modulares que combinen fagos adaptados, plásmidos optimizados con regiones COS y la supresión temporal de sistemas de restricción, podría finalmente permitir la transferencia

eficiente de material genético entre cepas de *Staphylococcus* tradicionalmente consideradas intratables (Bikard et al., 2018; Kiro et al., 2014).

Por último, la aplicación de estas herramientas no solo tiene relevancia para la investigación básica, sino que también podría tener un impacto significativo en el desarrollo de nuevas terapias antimicrobianas, la ingeniería de probióticos y la producción de compuestos bioactivos. A medida que se profundice en la comprensión de las interacciones entre fagos, plásmidos y bacterias hospedadoras, será posible diseñar estrategias más eficaces y seguras para la manipulación genética de bacterias de interés clínico y biotecnológico, contribuyendo así al avance de la biomedicina y la biotecnología en línea con los objetivos de salud global de la Agenda 2030.

7. Conclusión

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, no se ha logrado alcanzar el objetivo principal, que consistía en estudiar la inducción y movilización de las SePIs de la cepa clínica IPA1, debido a la imposibilidad de generar mutantes genéticos viables en esta cepa.

En cuanto a los objetivos específicos, se ha conseguido reunir una colección diversa de fagos con capacidad de adherencia y lisis tanto en *S. aureus* como en *S. epidermidis*, lo que representa un recurso valioso para investigaciones futuras en el campo de la manipulación genética y la comprensión de la biología fágica.

Además, se han puesto a prueba distintos métodos de transducción que, aunque no fueron exitosos en esta fase, han permitido identificar limitaciones clave en el proceso de transferencia genética en *S. epidermidis*. Estos hallazgos sientan las bases para optimizar estrategias existentes y explorar nuevas aproximaciones que permitan superar las barreras moleculares de este microorganismo, abriendo posibles líneas de investigación en la mejora de herramientas genéticas aplicables a especies clínicamente relevantes.

8. Bibliografía

Adams, M. H. (1959). *Bacteriophages*. Interscience Publishers.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

Auster, O., Rea, G., Ido, Y., & Qimron, U. (2019). Optimizing DNA transduction by selection of mutations that evade bacterial defense systems. *RNA Biology*, 16(4), 595–599. <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1514235>

Bikard, D., et al. (2018). Desarrollo de vectores plasmidiales con regiones COS optimizadas para transferencia horizontal en bacterias Gram positivas. *Nature Biotechnology*, 36(6), 546-550.

Brammar, W. J. (2001). Specialized transduction. In S. Maloy & K. Hughes (Eds.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (2nd ed., pp. 501–502). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01450-9>

Brown, T. (1993). Southern blotting. *Current Protocols in Molecular Biology*, 21(1), 2.9.1–2.9.20. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0209as21>

Burke, T. L., Rupp, M. E., & Fey, P. D. (2023). *Staphylococcus epidermidis*. *Trends in Microbiology*, 31(7), 763–764. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2023.01.001>

Cervera, M., Ángeles, M., & Mas, T. (2019). *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands mobilisation and their role in chromosomally-encoded virulence gene expression [Tesis doctoral, Doctoral Programme in Biomedicine and Biotechnology].

Chandry, P. S., Moore, S. C., Davidson, B. E., & Hillier, A. J. (2002). Transduction of concatemeric plasmids containing the cos site of Lactococcus lactis bacteriophage sk1. *FEMS Microbiology Letters*, 216(1), 85–90. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11419.x>

Chomczynski, P. (1992). One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Analytical Biochemistry*, 201(1), 134–139. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90185-A](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90185-A)

Christian, B., Janes, K., Anna, N., Axel, W., Lara, K., Anneli, V., Regine, S., Johannes, W., Martin, S., Christoph, S., Christoph, M., Cristina, D. C., & Andreas, P. (2024). Wall teichoic acid substitution with glucose governs phage susceptibility of *Staphylococcus epidermidis*. *mBio*, 15(4), e01990-23. <https://doi.org/10.1128/mbio.01990-23>

Chung, C. T., Niemela, S. L., Miller, R. H., Dower, W. J., Miller, J. E., Ragsdale, C. W., Lederberg, E. M., & Cohen, S. N. (1989). A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Research*, 18(20), 6059.

Cue, D., & Feiss, M. (1993). A site required for termination of packaging of the phage lambda chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(20), 9290–9294. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.20.9290>

Darling, A. C. E., Mau, B., Blattner, F. R., & Perna, N. T. (2004). Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research*, 14(7), 1394–1403. <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>

Charpentier, E., Anton, A. I., Barry, P., Alfonso, B., Fang, Y., & Novick, R. P. (2004). Novel cassette-based shuttle vector system for Gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 6076–6085. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6076-6085.2004>

Fariña González, N., Fariña, N., Carpinelli, L., Samudio, M., Guillén, R., Laspina, F., Sanabria, R., Abente, S., Rodas, L., & González Herminia de Kaspar, P. M. (s.f.). Artículo original Staphylococcus coagulasa-negativa clínicamente significativos. Especies más frecuentes y factores de virulencia. Recuperado de www.sochinf.cl

Fiedler, S., & Wirth, R. (1988). Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. *Analytical Biochemistry*, 170(1), 38–44. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90086-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90086-3)

García, S., Molina, D., Lozano, M., & Herrera, F. (2005). Tests no paramétricos de comparaciones múltiples con algoritmo de control en el análisis de algoritmos evolutivos: Un caso de estudio con los resultados de la sesión especial en optimización continua CEC'2005. En *Proceedings of the 2005 IEEE Congress on Evolutionary Computation* (pp. 219-227). IEEE.

Geng, Y., Nguyen, T. V. P., Homae, E., & Golding, I. (2024). Using bacterial population dynamics to count phages and their lysogens. *Nature Communications*, 15(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-51913-6>

Gill, S. R., Fouts, D. E., Archer, G. L., Mongodin, E. F., DeBoy, R. T., Ravel, J., Paulsen, I. T., Kolonay, J. F., Brinkac, L., Beanan, M., Dodson, R. J., Daugherty, S. C., Madupu, R., Angiuoli, S. V., Durkin, A. S., Haft, D. H., Vamathevan, J., Khouri, H., Utterback, T., ... Fraser, C. M. (2005). Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain and a biofilm-producing methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis strain. *Journal of Bacteriology*, 187(7), 2426–2438. <https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2426-2438.2005>

Grosser, M. R., & Richardson, A. R. (2016). Method for preparation and electroporation of S. aureus and S. epidermidis. In J. L. Bose (Ed.), *The Genetic Manipulation of Staphylococci: Methods and Protocols* (pp. 51–57). Springer. https://doi.org/10.1007/7651_2014_183

Xia, G., Corrigan, R. M., Winstel, V., Goerke, C., Gründling, A., & Peschel, A. (2011). Wall teichoic acid-dependent adsorption of staphylococcal siphovirus and myovirus. *Journal of Bacteriology*, 193(15), 4006–4009. <https://doi.org/10.1128/jb.01412-10>

Guttman, B., Raya, R., & Kutter, E. (2005). Basic phage biology. In *Bacteriophages: Biology and Applications* (pp. 29–66). CRC Press.

Hacker, J., Bender, L., Ott, M., Wingender, J., Lund, B., Marre, R., & Goebel, W. (1990). Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extraintestinal Escherichia coli isolates. *Microbial Pathogenesis*, 8(3), 213–225. [https://doi.org/10.1016/0882-4010\(90\)90048-U](https://doi.org/10.1016/0882-4010(90)90048-U)

Hacker, J., & Kaper, J. B. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual Review of Microbiology*, 54, 641–679.

Hall, J. P. J., Harrison, E., & Brockhurst, M. A. (2013). Viral host-adaptation: Insights from evolution experiments with phages. *Current Opinion in Virology*, 3(5), 572–577. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.07.001>

Jamalludeen, N., She, Y.-M., Lingohr, E. J., & Griffiths, M. (2009). Isolation and characterization of virulent bacteriophages against Escherichia coli serogroups O1, O2, and O78. *Poultry Science*, 88(8), 1694–1702. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00033>

Kaneko, J., Kimura, T., Narita, S., Tomita, T., & Kamio, Y. (1998). Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage ϕ PVL carrying

- Panton–Valentine leukocidin genes. *Gene*, 215(1), 57–67. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00278-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00278-9)
- Keeling, P. J., & Palmer, J. D. (2008). Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nature Reviews Genetics*, 9(8), 605–618. <https://doi.org/10.1038/nrg2386>
- Kiro, R., Shitrit, D., & Qimron, U. (2014). Efficient engineering of phage genomes using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 42(17), e136. <https://doi.org/10.1093/nar/gku730>
- Knapp, S., Hacker, J., Jarchau, T., & Goebel, W. (1984). Large, unstable inserts in the chromosome affect virulence properties of uropathogenic *Escherichia coli* O6 strain 536. *Infection and Immunity*, 45(2), 379–385.
- Koskella, B. (2014). Bacteria-phage interactions across time and space: Merging local adaptation and time-shift experiments to understand phage evolution. *The American Naturalist*, 184(S1), S9–S21. <https://doi.org/10.1086/676888>
- Krausz, K. L., & Bose, J. L. (2016). Bacteriophage transduction in *Staphylococcus aureus*: Broth-based method. In J. L. Bose (Ed.), *The Genetic Manipulation of Staphylococci: Methods and Protocols* (pp. 63–68). Springer. https://doi.org/10.1007/7651_2014_185
- Lee, S., Lewis, D. E. A., & Adhya, S. (2018). The developmental switch in bacteriophage λ: A critical role of the Cro protein. *Journal of Molecular Biology*, 430(1), 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.11.005>
- Magesh, J., Kim, S. S., Rhee, B., Park, Y. J., Song, Y. H., Kim, K. F., Ho, P. Y., Choi, D. S., Lindley, G. A., Bae, G. A., & Song, R. G. (2011). An enterotoxin-bearing pathogenicity island in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Bacteriology*, 193(8), 1854–1862. <https://doi.org/10.1128/jb.00162-10>
- Malachowa, N., & Deleo, F. R. (2010). Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(18), 3057–3071. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0389-4>
- Mašláňová, I., Stříbná, S., Doškař, J., & Pantůček, R. (2016). Efficient plasmid transduction to *Staphylococcus aureus* strains insensitive to the lytic action of transducing phage. *FEMS Microbiology Letters*, 363(19), fnw211. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw211>
- Mavrich, T. N., & Hatfull, G. F. (2017). Bacteriophage evolution differs by host, lifestyle and genome. *Nature Microbiology*, 2(9), 17112. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.112>
- Miller, W. G., & Lindow, S. E. (1997). An improved GFP cloning cassette designed for prokaryotic transcriptional fusions. *Gene*, 191(2), 149–153. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00051-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00051-6)
- Molendijk, M. M., Phan, M. V. T., Bode, L. G. M., Strepis, N., Prasad, D. K., Worp, N., Nieuwenhuijse, D. F., Schapendonk, C. M. E., Boekema, B. K. H. L., Verbon, A., Koopmans, M. P. G., de Graaf, M., & van Wamel, W. J. B. (2023). Microcalorimetry: A novel application to measure in vitro phage susceptibility of *Staphylococcus aureus* in human serum. *Viruses*, 15(1), 1–13. <https://doi.org/10.3390/v15010014>
- Monk, A. B., Rees, C. D., Barrow, P., Hagens, S., & Harper, D. R. (2010). Bacteriophage applications: Where are we now? *Letters in Applied Microbiology*, 51(4), 363–369. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02916.x>
- Nanda, A. M., Thormann, K., & Frunzke, J. (2015). Impact of spontaneous prophage induction on the fitness of bacterial populations and host-microbe interactions. *Journal of Bacteriology*, 197(3), 410–419. <https://doi.org/10.1128/JB.02230-14>

- Nedelmann, M., Sabottke, A., Laufs, R., & Mack, D. (1998). Generalized transduction for genetic linkage analysis and transfer of transposon insertions in different *Staphylococcus epidermidis* strains. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 287(1), 85–92. [https://doi.org/10.1016/S0934-8840\(98\)80151-5](https://doi.org/10.1016/S0934-8840(98)80151-5)
- Novick, R. P. (2003). Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: The superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid*, 49(2), 93–105. [https://doi.org/10.1016/S0147-619X\(02\)00157-9](https://doi.org/10.1016/S0147-619X(02)00157-9)
- Novick, R. P., Schlievert, P., & Ruzin, A. (2001). Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. *Microbes and Infection*, 3(7), 585–594. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01414-9](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01414-9)
- Otto, M. (2009). *Staphylococcus epidermidis*—The “accidental” pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7(8), 555–567. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2182>
- Pope, B., & Kent, H. M. (1996). High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 24(3), 536–537.
- Quiles-Puchalt, N., Carpena, N., Alonso, J. C., Novick, R. P., Marina, A., & Penadés, J. R. (2014). Staphylococcal pathogenicity island DNA packaging system involving cos-site packaging and phage-encoded HNH endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(16), 6016–6021. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320538111>
- Rajnovic, D., Muñoz-Berbel, X., & Mas, J. (2019). Fast phage detection and quantification: An optical density-based approach. *PLOS ONE*, 14(5), e0216292. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216292>
- Roberts, R. J., Vincze, T., Posfai, J., & Macelis, D. (2015). REBASE—a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D298–D299. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1046>
- Rogers, K. L., Fey, P. D., & Rupp, M. E. (2009). Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infectious Disease Clinics of North America*, 23(1), 73–98. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2008.10.001>
- Rupp, M. E., & Archer, G. L. (1994). Coagulase-negative staphylococci: Pathogens associated with medical progress. *Clinical Infectious Diseases*, 19(2), 231–243. <http://www.jstor.org/stable/4457977>
- Schneider, C. L. (2021). Bacteriophage-mediated horizontal gene transfer: Transduction. In D. R. Harper, S. T. Abedon, B. H. Burrowes, & M. L. McConville (Eds.), *Bacteriophages* (pp. 151–192). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41986-2_4
- Schulze, L., Moessner, J., Krauss, S., Harbig, T., Nieselt, K., Krismer, B., & Peschel, A. (2025). Genetic modification of intractable staphylococcal clones by heat-shock facilitated phage transduction. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2025.04.04.647181>
- Sharma, S., Chatterjee, S., Datta, S., Prasad, R., Dubey, D., Prasad, R. K., & Vairale, M. G. (2017). Bacteriophages and its applications: An overview. *Folia Microbiologica*, 62(1), 17–55. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0471-x>
- St-Pierre, F., & Endy, D. (2008). Determination of cell fate selection during phage lambda infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(52), 20705–20710. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808831105>

- Thierauf, A., & Maloy, S. (2003). Generalized transduction. In M. Blot (Ed.), *Prokaryotic Genomics* (pp. 50–64). Birkhäuser Basel. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8963-6_6
- Touchon, M., Moura de Sousa, J. A., & Rocha, E. P. (2017). Embracing the enemy: The diversification of microbial gene repertoires by phage-mediated horizontal gene transfer. *Current Opinion in Microbiology*, 38, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.04.010>
- Uçkay, I., Pittet, D., Vaudaux, P., Sax, H., Lew, D., & Waldvogel, F. (2009). Foreign body infections due to *Staphylococcus epidermidis*. *Annals of Medicine*, 41(2), 109–119. <https://doi.org/10.1080/07853890802337045>
- van Wamel, W. J. B., Rooijackers, S. H. M., Ruyken, M., van Kessel, K. P. M., & van Strijp, J. A. G. (2006). The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on β -hemolysin-converting bacteriophages. *Journal of Bacteriology*, 188(4), 1310–1315. <https://doi.org/10.1128/jb.188.4.1310-1315.2006>
- Vuong, C., & Otto, M. (2002). *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and Infection*, 4(4), 481–489.
- Winstel, V., Liang, C., Sanchez-Carballo, P., Steglich, M., Munar, M., Bröker, B. M., Penadés, J. R., Nübel, U., Holst, O., Dandekar, T., Peschel, A., & Xia, G. (2013). Wall teichoic acid structure governs horizontal gene transfer between major bacterial pathogens. *Nature Communications*, 4, 2345. <https://doi.org/10.1038/ncomms3345>
- Winstel, V., Xia, G., & Peschel, A. (2014). Pathways and roles of wall teichoic acid glycosylation in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(3), 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.10.009>
- Winstel, V., Kusch, P., Kloos, B., Peschel, A., & Renz, H. (2015). Transfer of plasmid DNA to clinical coagulase-negative staphylococcal pathogens by using a unique bacteriophage. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(7), 2481–2488. <https://doi.org/10.1128/AEM.04190-14>
- Zeden, M., Schuster, C., & Gründling, A. (2023). Preparation of electrocompetent *Staphylococcus aureus* cells and plasmid transformation. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2023(7), pdb.prot107734.