

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Farmacia y Bioquímica  
Cátedra de Microbiología

Tesis para aplicar al título de Magister en Biología Molecular Médica de  
la Universidad de Buenos Aires

***“Staphylococcus aureus resistente a oxacilina por  
mecanismos alternativos a la presencia del gen mecA”***

**Bioq. Gabriela Debora Weltman**

**Directora de Tesis: Dra. Marta Mollerach**

**Co-Directora: Dra. Sabrina Di Gregorio**

**2016**

**A mis hijos: Sebi, Gonza y Fede.**

## Agradecimientos

Lograr un objetivo tan deseado como este, a esta altura de la vida, requiere mucho esfuerzo y dedicación. Pero sin duda, ese esfuerzo fue posible con el apoyo de todos ustedes. No puedo dejar de agradecerles infinitamente y decirles lo importantes que son para mí.

Gracias a mis directoras de Tesis, por confiar en mí, por explicarme con paciencia, por corregirme, y por dedicarme su tiempo y pensamientos (muchas veces en tiempos difíciles). Gracias Marta por mostrarme un modelo de profesional al que admiro, por darme la oportunidad de trabajar en tu equipo, por permitirme realizar los experimentos con libertad, por guiarme en este camino, por brindarme tu laboratorio y hacerme sentir parte de tu equipo. Gracias Sabri por tus valiosos aportes a esta tesis, por develarme tus tips para realizar los experimentos sin escatimar detalles, y por ayudarme siempre con la mejor onda y paciencia.

Mil gracias Pablo, por tu enorme y experta colaboración para realizar los modelos de proteínas. Gracias a todos los integrantes del cepario, que me acompañaron todo este tiempo con consejos, y sobre todo con mucha y valiosísima solidaridad. Gracias Silvi, por ayudarme con mi tesis aportando tus conocimientos y experiencia. Gracias Meli, Marian, Magui, Dani, las dos Barbis, Lu, Sol, Gaby, Gio, Alan, Mary, Vivi y Flor por el compañerismo e incalculable ayuda. Gracias también a Gabriel, José, Marcela y Laura, por aconsejarme siempre que lo necesité. Espero no olvidar a nadie...A todos, gracias por dejarme ser, por un tiempito, parte de este equipazo.

Gracias a todos mis profesores y compañeros de Maestría por compartir este tiempo conmigo. Gracias Luz, Marie, Naza, Raquel, Raul, Sindy, Vivi, y Erica, mis colegas de Micro Molecular por las tardes de virus, bacterias, hongos y parásitos. Gracias Tomy y Lean, por hacer más entretenido el camino, y por los incontables mails de apoyo, preguntas y respuestas.

Gracias a la Secretaría de Cooperación Internacional de la Universidad John F. Kennedy que becó mis estudios de Maestría, y a la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA por formarme como profesional y en esta oportunidad también permitirme realizar mi tesis de maestría en la Cátedra de Microbiología.

Gracias a Soledad Zarate y al laboratorio de CEMIC por facilitarme amablemente las cepas para esta investigación.

Gracias Lina, por confiar en mí desde hace mucho tiempo, por contagiarme el amor por la microbiología y por estar siempre cerca para brindarme un consejo personal o profesional.

Gracias Ali por escucharme y aconsejarme más allá de lo profesional.

Gracias a mis amigas, hermanas de la vida, que me comprenden, me apoyan, me distraen, me divierten, me aconsejan, me escuchan, me esperan, y me acompañan. No podría haber conseguido esta meta sin ustedes!

Gracias a mis queridos padres y hermanos, que me marcaron el camino del conocimiento como el mejor camino, y que se sienten orgullosos de cada uno de mis logros profesionales. Gracias por estar cerca y ayudarme siempre que los necesito. Gracias Sil, por ser mucho más que una hermana.

Gracias a mis adorados hijos, que aguantaron con paciencia los períodos de cursada y examen (a veces sin tanta paciencia). A ellos les dedico este trabajo. Para que tomen el ejemplo de esfuerzo y dedicación para lograr un objetivo. Para transmitirles lo que me enseñaron: que el camino del conocimiento es el mejor camino.

Gracias a mi amado marido, por bancarme incondicionalmente en este proyecto, por valorar mi esfuerzo, por cubrirme, por acompañarme, por ayudarme y comprenderme. Edu, jamás podría haberlo logrado sin tu ayuda!

A todos, infinitas GRACIAS!

**Los resultados del presente trabajo de Tesis han dado lugar a la siguiente presentación:**

“Caracterización molecular de un aislamiento de *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente *mecA* negativo”. Gabriela Weltman; Silvina Fernández; Sabrina Di Gregorio; Pablo Power; Mariela Zárate; Jorgelina Smayevsky y Marta Mollerach. Presentado en el XV Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Infectología - SADI2015. Buenos Aires, 28, 29 y 30 de mayo de 2015.

# Índice

Abreviaturas (por orden alfabético) .....	8
Resumen .....	11
Introducción .....	13
1. Principales características microbiológicas de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	13
2. Importancia Clínica .....	14
3. Pared celular y proteínas de unión a penicilina (PBPs) .....	15
4. Mutagénesis bacteriana inducida por estrés: .....	18
5. Resistencia de <i>Staphylococcus aureus</i> a antibióticos $\beta$ -lactámicos.....	19
6. Epidemiología de las infecciones causadas por SAMR .....	21
Hipótesis.....	24
Objetivos .....	25
Objetivo general: .....	25
Objetivos específicos: .....	25
Materiales y Métodos.....	26
1. Caso clínico.....	26
2. Microorganismos .....	26
Microorganismos analizados en este trabajo .....	27
Microorganismos utilizados como controles.....	27
3. Medios de cultivo.....	28
4. Cebadores .....	28
5. Técnicas utilizadas para la determinación de la sensibilidad a antibióticos .....	30
Pruebas de difusión en agar con discos.....	30
Ensayos cuantitativos de sensibilidad: concentración inhibitoria mínima (CIM) en medio líquido .....	30
Detección de producción de $\beta$ -lactamasa.....	31
Semi-cuantificación de la producción de $\beta$ -lactamasa .....	31
6. Estudio de la frecuencia mutacional:.....	32

7. Caracterización genotípica.....	33
Extracción de ADN .....	33
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): .....	33
Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE).....	34
Multi locus sequence typing (MLST) .....	35
Tipificación basada en el polimorfismo del gen <i>spa</i> .....	36
Secuenciación y análisis.....	36
8. Herramientas informáticas para el modelado de proteínas .....	37
Resultados.....	38
1. Caracterización fenotípica y genotípica de los diferentes aislamientos .....	38
2. Determinación del patrón de sensibilidad de los diferentes aislamientos .....	40
3. Caracterización molecular del mecanismo de resistencia a meticilina .....	44
4. Ensayo de actividad de $\beta$ -lactamasas .....	44
Semi-cuantificación de la producción de $\beta$ -lactamasas .....	45
5. Amplificación y secuenciación del operón <i>bla</i> , y de los genes <i>pbp2</i> y <i>pbp4</i> .....	50
6. Análisis del efecto de la mutación Ala450Asp con modelos moleculares:.....	53
7. Estudio de la frecuencia mutacional.....	58
Discusión .....	59
Conclusiones .....	63
Anexo .....	64
1. Composición del Agar Almidón con antibiótico: .....	64
2. Determinación de proteínas totales en sobrenadante de cultivo.....	64
3. Reacciones de PCR realizadas en este trabajo: .....	65
Amplificación del gen <i>mecA</i> [53] .....	65
Amplificación del gen <i>mecC</i> [54] .....	66
Amplificación del gen <i>luk-PV</i> [55].....	67
Amplificación del gen <i>ccrAB</i> [56].....	68
Amplificación del gen <i>ccrC</i> [57] .....	69
Amplificación del gen <i>spa</i> [58] .....	70
Amplificación de los genes <i>arc</i> y <i>tpi</i> para MLST [59].....	71
Amplificación de los genes <i>pta</i> , <i>glp</i> , <i>aro</i> , <i>yqi</i> y <i>gmk</i> para MLST [59].....	72

Amplificación del operón <i>bla</i> .....	73
Amplificación del gen <i>pbp2</i> .....	74
Amplificación del gen <i>pbp4</i> .....	75
Bibliografía .....	77



## Abreviaturas (por orden alfabético)

A: absorbancia

AA-atb: agar almidón con antibiótico

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADN pol: ADN polimerasa

Ala: alanina

ASO: agar sangre ovina

Asp: ácido aspártico

ATB: antibiótico

ATCC: American Type Culture Collection

BORSA: borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*

BSA: seroalbúmina bovina

CA-SFM: Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CIM: concentración inhibitoria mínima

CLAV: ácido clavulánico

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

cm: centímetro

CMH: caldo Muller Hinton

dNTP: desoxi nucleótidos trifosfato

DO: densidad óptica

FOX: cefoxitina

Gly: glicina

Hetero-SAMR: SAMR heteroresistente

hs: hora

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

kb: kilobases

LB: caldo Luria-Bertani

LPV: Leucocidina de Panton-Valentine  
M: molar  
MHA: agar Muller Hinton  
mg: miligramo  
min: minuto  
ml: mililitro  
MLST: multi-locus sequence typing  
mm: milímetro  
NAcGln: N-acetylglucosamina  
NAcMur: ácido N-acetilmurámico  
ng: nanogramo  
nm: nanómetro  
O/N: overnight. Durante la noche  
OXA: oxacilina  
pb: pares de bases  
PBP: proteínas ligadoras de penicilina (penicillin binding proteins)  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
PEN: penicilina  
PFGE: pulse field gel electroforesis ó electroforesis en campo pulsado  
RIF: rifampicina  
RPM: revoluciones por minuto  
SaPis: Islas de patogenicidad de *Staphylococcus aureus*  
SAMR: *S. aureus* resistente a meticilina  
SAMR-AC: SAMR adquirido en la comunidad  
SAMR-AH: SAMR adquirido en ámbito hospitalario  
SAMS: *S. aureus* sensible a meticilina  
SAOR: *S. aureus* resistente a oxacilina  
SCCmec: *Staphylococcal chromosome cassette mec*  
SF: solución fisiológica  
TGasa: transglicosilasa

TPasa: transpeptidasa

TSA: agar tripteína soya

TSB: caldo tripteína soya

U: unidades

UFC: unidades formadoras de colonias

V: volts

µg: microgramos

µl: microlitro

µm: micrómetro

µM: micromolar

## Resumen

*Staphylococcus aureus*, forma parte de la microbiota colonizante de piel y mucosas en humanos y animales. Sin embargo, este patógeno oportunista es uno de los patógenos más frecuentes e importantes, aislado tanto en el ámbito nosocomial como en la comunidad, responsable de una gran variedad de infecciones tales como endocarditis, osteomielitis y sepsis.

En el presente trabajo se caracterizaron cuatro aislamientos clínicos de *S. aureus* recuperados de un paciente que padeció cuatro episodios sucesivos de bacteriemia. Los primeros 3 aislamientos fueron sensibles a cefoxitina (FOX) y oxacilina (OXA), mientras que el último resultó resistente a OXA.

Se determinó la isogenicidad de los cuatro aislamientos recuperados del paciente por la técnica de PFGE. La genotipificación indicó que estos aislamientos pertenecen al ST8, y *spa* tipo t024, linaje que no se encuentra dentro de los más frecuentes en Argentina. Se profundizó el estudio del primer aislamiento, SAMS1, y del último, SA2 dado su fenotipo poco frecuente en nuestro medio (sensibilidad a FOX y resistencia a OXA)

La detección molecular del gen *mecA* que codifica la PBP2a, mecanismo más frecuente asociado a resistencia a oxacilina, dio resultado negativo. Se descartó también la presencia del gen *mecC* y de las diferentes recombinasas descritas en los SCC*mec*. En consecuencia, se evaluaron mecanismos alternativos que pudiesen explicar este fenotipo.

No se detectaron mutaciones en el gen *pbp4* entre los aislamientos.

El aislamiento SA2 presentó mayor actividad de  $\beta$ -lactamasas que el aislamiento SAMS1. Sin embargo, no se encontraron mutaciones en el operón *bla*, que pudieran justificar esta hiperproducción.

Se pudo evidenciar también, la presencia de una mutación en la posición 1350 del gen *pbp2* de la cepa SA2 respecto de la SAMS1, que resultó en una sustitución Ala450Asp. Este cambio no se evidenció en la cepa SAMS3 (aislada en el tercer episodio de bacteriemia), lo que

sugiere que esta mutación se podría vincular con la emergencia de resistencia a oxacilina en SA2.

El análisis del efecto de esta mutación con modelos tridimensionales muestra el reemplazo de un aminoácido hidrofóbico como la alanina, por uno ácido como el aspártico, en un entorno hidrofóbico y cercano a la cavidad del sitio activo del dominio transpeptidasa de la PBP2 de SA2. La carga introducida en ese entorno hidrofóbico produciría una distorsión del  $\alpha$ -hélice y del cercano bolsillo de reacción, dificultando así el ingreso de la molécula de OXA.

Posiblemente, tanto la hiperproducción de  $\beta$ -lactamasa como la mutación que resulta en la sustitución Ala450Asp en PBP2, descritas en la cepa SA2, contribuyan al fenotipo de resistencia observado. No se descarta la posible coexistencia de otros mecanismos moleculares que contribuyan a la resistencia a este antibiótico.

La detección de aislamientos resistentes a oxacilina pero carentes del gen *mec*, representa un gran desafío para los laboratorios clínicos, dado que no se detectan utilizando el disco de FOX. Si bien el CLSI recomienda, dentro de las pruebas cualitativas, el uso del disco de FOX para informar la sensibilidad a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, este trabajo demuestra la emergencia en Argentina de aislamientos de *S. aureus* resistentes a OXA que no se detectan con ese método y serían reportados como SAMS.

## Introducción

### 1. Principales características microbiológicas de *Staphylococcus aureus*

Las bacterias que pertenecen al género *Staphylococcus*, son cocos Gram positivos de un tamaño entre 0.8 a 1  $\mu\text{m}$  de diámetro. Estos se dividen por fisión binaria en diversos planos dando lugar a grupos irregulares por lo cual se disponen solos, de a pares, en tetradas o en cadenas cortas (figura 1). Son anaerobios facultativos, inmóviles, no esporulados, pero resistentes a la desecación.

El género *Staphylococcus* pertenece al Phylum 2 del Dominio *Bacteria*, Clase *Bacilli*, Orden *Bacillales* y Familia *Staphylococcaceae*. Dentro de este género existen 32 especies, siendo *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus* las de mayor importancia clínica.

*S. aureus* se puede destacar por la característica pigmentación amarillenta de sus colonias en Agar Tripteína Soya (TSA) y en Agar Sangre, donde frecuentemente se encuentra asociada con la producción de hemólisis tipo  $\beta$  (figura 1).

El test de la catalasa positiva, distingue el género *Staphylococcus* de otros cocos Gram positivos tales como *Enterococcus* y *Streptococcus*.

Las siguientes pruebas bioquímicas identifican a *S. aureus* diferenciándolo de otras especies dentro del género: I) producción de coagulasa; II) sensibilidad al disco de novobiocina; III) actividad fosfatasa alcalina; IV) producción aeróbica de ácido a partir de D-trealosa y D-manitol, y V) producción de desoxirribonucleasa termoestable [1, 2].

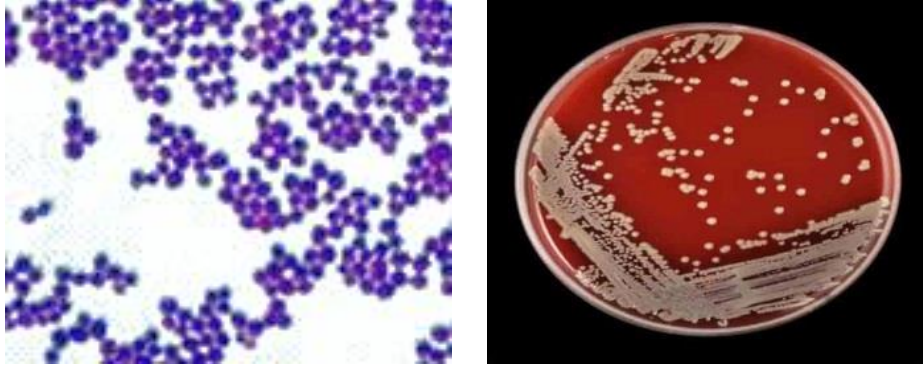


Figura 1. *Staphylococcus aureus*. Izquierda: coloración de Gram (1000X). Derecha: aislamiento en Agar sangre

## 2. Importancia Clínica

*S. aureus*, forma parte de la microbiota colonizante de piel y mucosas en humanos y animales. Sin embargo, ante la alteración de estas barreras por lesiones traumáticas o procedimientos médico quirúrgicos, este patógeno oportunista puede causar enfermedad. De esta manera, *S. aureus* es uno de los patógenos más frecuentes e importantes, aislado tanto en el ámbito nosocomial como en la comunidad, responsable de una gran variedad de infecciones, algunas muy severas, tales como endocarditis, osteomielitis y sepsis.

Su patogenicidad está asociada a múltiples factores de virulencia entre los cuales podemos destacar la producción de diversas toxinas, adhesinas, enzimas degradativas y de varios tipos de cápsulas antifagocíticas. Varios de los genes que codifican para estos factores de virulencia, están localizados en elementos genómicos móviles (islas de patogenicidad, islas genómicas, fagos, plásmidos, y transposones) que conforman aproximadamente el 25% del genoma de *S. aureus*, y que se transmiten en forma vertical y horizontal entre los distintos linajes. Es por ello que este microorganismo se caracteriza por presentar una gran plasticidad genómica, lo que le permite una eficiente adaptación a distintos entornos [3].

Algunas cepas pueden además formar biofilms, que les confiere protección para evadir la respuesta inmune del hospedador y lograr una mayor sobrevivencia frente a los antimicrobianos [4].

La patogénesis de la mayoría de las enfermedades causadas por *S. aureus* es multifactorial, es decir, resulta de la acción combinada de varios determinantes de patogenicidad con diversas funciones: adherencia, invasión de tejidos, evasión de fagocitosis y toxigenicidad [1, 3].

Otra característica de *S. aureus* con relevancia clínica, es la capacidad de adquirir rápidamente determinantes de resistencia a antimicrobianos localizados también en elementos genéticos móviles, aunque las mutaciones cromosomales y la presión de selección ejercida por los antibióticos juegan también un importante papel en la génesis de la resistencia [3, 5, 6].

### **3. Pared celular y proteínas de unión a penicilina (PBPs)**

La pared celular de las bacterias Gram positivas, está formada principalmente por una gruesa capa de peptidoglicano. También forman esta estructura otras moléculas, tales como proteínas, ácidos teicoicos (polímeros de glicerol fosfato que otorgan carga negativa a la célula) y ácidos lipoteicoicos (polímeros de glicerol fosfato unidos a un glicolípido anclado en la membrana plasmática).

La capa de peptidoglicano es el componente más importante, además de exclusivo, de la envoltura bacteriana, por su función, estructura y síntesis. No sólo le permite a la bacteria resistir la presión osmótica intracelular sino que también le provee a la célula una forma bien definida que es reproducida a través de las generaciones.

El peptidoglicano es una red tridimensional, que está formada por cadenas que alternan moléculas de N-acetylglucosamina (NAcGln) y ácido N-acetilmurámico (NAcMur), entrecruzadas por péptidos cortos unidos al NAcMur.

Las bacterias Gram positivas producen un peptidoglicano de varias capas. Los precursores de esta macromolécula son incorporados a la superficie interna de la pared celular y se movilizan hacia el exterior permitiendo la expansión celular.

La síntesis de este polímero es iniciada en el citoplasma bacteriano por 6 enzimas Mur (Mur A a Mur F), las cuales catalizan la formación de los precursores, y subsecuentemente agregan cinco aminoácidos (en *S. aureus*, generalmente L-Alanina - D-Glutamina - L-Lisina - D-Alanina - D-Alanina) en el grupo carboxilo de cada molécula precursora de NAcMur.





*S. aureus* posee cuatro PBPs, tres de ellas de alto peso molecular (PBP1, 2 y 3) y una de bajo peso molecular, PBP4. La función primaria de la PBP1 es la formación del septo durante la división celular. La PBP2 es la única bifuncional: contiene un dominio transpeptidasa (TPasa) y un dominio transglicosilasa (TGasa). La intervención de PBP3 en la biosíntesis del peptidoglicano no ha sido completamente dilucidada. En cuanto a la proteína PBP4, su función sería la de cooperar con PBP2 en las reacciones de transpeptidación [9].

La actividad de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, se basa en la similitud estructural que estos antibióticos comparten con la terminación D-alanina – D-alanina del péptido de la molécula precursora de NAcMur (figura 3) [8, 9]. Las funciones de transpeptidación y carboxipeptidación de las PBPs son inhibidas cuando estas proteínas son aciladas por un antibiótico  $\beta$ -lactámico, con la apertura del anillo  $\beta$ -lactámico y con la formación de un enlace covalente con el residuo Serina del sitio activo de la PBP [10]. Estos agentes antimicrobianos actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular al unirse irreversiblemente a las PBPs. La pared sin entrecruzamientos queda debilitada, y la bacteria expuesta a presiones osmóticas del medio ambiente, muere.

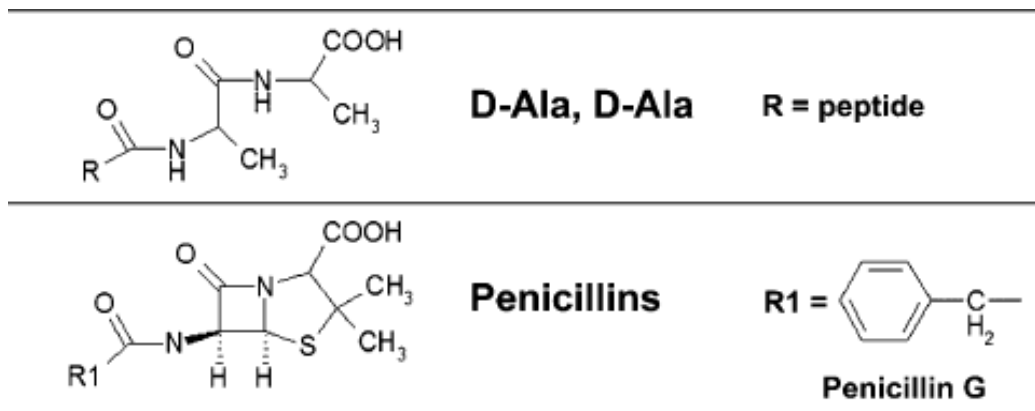


Figura 3: similitud de la estructura química de antibióticos  $\beta$ -lactámicos y de la terminación D-ala – D.ala del péptido de la molécula precursora de NAcMur, que interacciona con el dominio transpeptidasa de las PBPs. Tomado de Pauline Macheboeuf y colaboradores, 2006 [8].

#### 4. Mutagénesis bacteriana inducida por estrés:

Numerosos estudios han demostrado que las bacterias responden a variaciones bruscas del medio ambiente o al estrés, con cambios en la fisiología celular, incluyendo cambios en la expresión génica. Dentro de los factores que generan estrés se incluyen la privación de nutrientes, la presencia de radicales libres e inhibidores, el shock térmico, etc. Existen evidencias que indican que varios tipos de estrés inducen eventos moleculares importantes como son la reparación y mutabilidad del DNA que contribuyen a la evolución adaptativa. Este proceso “mutagénico” es esencialmente azaroso y puede estar regulado por varios mecanismos [11].

Uno de los sistemas principalmente responsables de estas mutaciones, es el sistema de reparación de emergencia o sistema SOS. Este sistema es inducido frente a lesiones en el ADN, y provoca un aumento de la expresión de varios genes involucrados en la reparación del mismo de manera de permitir la supervivencia de la bacteria.

El sistema SOS se ha descrito en *Escherichia coli* y está constituido por más de 30 genes. Entre ellos podemos mencionar al gen *recA* que codifica para una proteasa RecA, que se activa en presencia de ADN simple cadena y promueve el clivaje de la proteína LexA, represora de los promotores de los genes del sistema. La activación de RecA, y consecuentemente la autohidrólisis del represor LexA, resulta en la inducción del sistema SOS y por lo tanto en la expresión de una serie de genes que codifican para ADN polimerasas (ADN pol), dentro de las cuales encontramos a la ADN pol II, IV y V. Sin embargo, las polimerasas de este sistema presentan menor fidelidad y por lo tanto provocan un incremento en la tasa de mutación.

Este efecto mutagénico resulta relevante especialmente bajo ciertas condiciones selectivas, como por ejemplo durante el curso del tratamiento con antibióticos [11, 12].

Algunas clases de antibióticos, entre ellos los  $\beta$ -lactámicos, a concentraciones sub-inhedoras incrementan la tasa de mutación hasta 15 veces. Este escenario, que ha sido descrito en varias publicaciones científicas, podría deberse a diversos mecanismos, entre ellos, la inducción de la respuesta SOS [11-17].

La gran variedad de elementos genéticos móviles encontrados en las bacterias, tales como secuencias de inserción, transposones, bacteriófagos, etc., constituyen un pool de genes flexibles que pueden ser intercambiados ente individuos de la misma especie y aún entre diferentes especies por transferencia horizontal [18]. La movilidad de estos elementos, está ligada a una respuesta bacteriana frente al estrés, dado que el movimiento de los mismos puede ocasionar ruptura o rearrreglos del ADN.

Particularmente en *S. aureus*, se ha relacionado la respuesta SOS con la diseminación horizontal de factores de virulencia y genes de resistencia antibiótica, con la producción de toxinas reguladas por represores sensibles al clivaje de RecA, y con la inducción de profagos y SaPis (Islas de patogenicidad de *S. aureus*, por sus siglas en Ingles) que habitualmente codifican factores de virulencia [11, 19, 20].

## **5. Resistencia de *Staphylococcus aureus* a antibióticos $\beta$ -lactámicos.**

Desde su descubrimiento, la penicilina fue un tratamiento efectivo para las infecciones por *S. aureus*. Sin embargo, para la década del 50 ya se reportaban resistencias. Hoy en día, más del 90% de los aislamientos clínicos de *S. aureus* son resistentes a la penicilina. Esta resistencia se debe a la adquisición de un plásmido que contiene el gen *blaZ* que codifica para una penicilinas, BlaZ, capaz de hidrolizar al anillo  $\beta$ -lactámico de las penicilinas para inactivarlas. La síntesis de esta penicilinas es regulada por un sistema conformado por una proteína represora (BlaI) y una proteína sensora/traductora (BlaR1) que inactiva al represor cuando es activada por los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Las proteínas BlaZ, BlaI y BlaR1 están codificadas en el operón *bla* [21, 22].

El primer aislamiento de *S. aureus* resistente a metilina (SAMR), se reportó en Inglaterra en 1961 [23], un año después de la introducción de metilina (antibiótico no hidrolizado por la  $\beta$ -lactamasa de *S. aureus*) para uso terapéutico, e inicialmente, fue un patógeno del ambiente hospitalario. En las últimas décadas, las infecciones por SAMR adquirido en la comunidad (SAMR-AC) se han incrementado significativamente en muchos países.

En *S. aureus*, la resistencia a metilina es comúnmente mediada por la PBP extra numeraria denominada PBP2a [24-27]. Esta proteína de baja afinidad a antibióticos  $\beta$ -

lactámicos, está codificada en el cromosoma por el gen *mecA* o *mecC* ubicado en un elemento genético móvil, denominado *SCCmec* (*Staphylococcal chromosome cassette mec*). Este es adquirido por transferencia horizontal [8, 28], y confiere a la cepa portadora resistencia a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos excepto a la nueva cefalosporina de quinta generación: ceftarolina.

*SCCmec* posee 2 componentes esenciales: el complejo génico *ccr* y el complejo génico *mec*. El complejo *ccr* está compuesto por genes que codifican para recombinasas. El complejo *mec* está compuesto por el gen *mecA* o *mecC*, y sus genes regulatorios río abajo o arriba del mismo [28, 29].

La síntesis de PBP2a es inducible a través de un sistema de transducción de señales codificado por los genes regulatorios del complejo *mec*, e involucra una proteína integral de membrana sensora (codificada por *mecR1*) y un represor de transcripción (codificada por *mecI*) [21].

La variedad de alotipos descritos para los complejos *mec* y *ccr*, y sus múltiples combinaciones resultan en una gran diversidad de *SCCmec* [30]. Hasta la fecha se han descrito al menos 11 tipos de *SCCmec*.

Este elemento móvil confiere mayor habilidad para supervivencia y mayor virulencia a la cepa que lo porta, dado que es un vehículo, no sólo para genes determinantes de resistencia a otras drogas, sino también para diversos genes que le confieren una mejor adaptación al entorno, tales como *SCCcapI* que codifica para cápsula tipo I, *SCCfur* que codifica para resistencia a ácido fusídico, y *SCCHg*, operón para resistencia a mercurio, entre otros [6].

Si bien la PBP2a producida por *S. aureus* es bioquímica y estructuralmente diferente a la penicilinasasa BlaZ, el sistema de regulación de ambas proteínas es muy similar [24, 31].

La resistencia a meticilina puede ser expresada en forma heterogénea, siendo esto una característica distintiva de un alto porcentaje de las cepas SAMR. Este fenotipo se denomina heterogéneo o heterotípico cuando sólo el 0,1 al 0,01% de la población expresa resistencia a concentraciones superiores de 10  $\mu\text{g/ml}$  de oxacilina (OXA), mientras que el crecimiento del resto de las células es inhibido a bajas concentraciones del mismo. En contraste, en el fenotipo homogéneo u homotípico, la totalidad de las células de la población expresan resistencia a OXA [25, 27, 32]. Se ha demostrado que el fenotipo homogéneo resistente proviene de una

población con fenotipo heteroresistente expuesta a concentraciones sub-inhedorias de antibióticos  $\beta$ -lactámicos [33]. Las cepas con fenotipo heterogéneo son un problema en el laboratorio clínico ya que pueden ser erróneamente interpretadas como *S. aureus* sensibles a meticilina (SAMS) [34].

La prueba de difusión en disco de oxacilina (10  $\mu$ g), fue el método de elección para predecir meticilino resistencia en el laboratorio de diagnóstico clínico hasta el año 2012, cuando se demostró que el disco de cefoxitina (30  $\mu$ g) resultaba ser más eficiente como marcador de esta resistencia [25, 35]. A pesar de ello, la detección de poblaciones SAMR con fenotipo heterogéneas (hetero-SAMR) sigue siendo un desafío.

El uso del disco de cefoxitina es actualmente recomendado con esta finalidad por diferentes sociedades científicas, tales como Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) y el Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) [35, 36].

Sin embargo, la detección de la proteína PBP2a o del gen *mecA* son los métodos de referencia ("gold standard") para la detección de cepas SAMR, aunque no siempre son factibles en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico clínico [35].

En limitadas ocasiones, se detectan cepas con bajo nivel de resistencia a oxacilina, no mediada por *mecA/C*, denominándose "borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*" (BORSA, por sus siglas en inglés) [25, 37-39].

En los últimos años han sido publicados varios trabajos que reportan aislamientos resistentes a meticilina y carentes del gen *mecA* o *mecC* [40-43]. Esto sugiere que los aislamientos fenotípicamente resistentes a meticilina, pueden ser sub-diagnosticados investigando solamente el gen *mecA* o *mecC* por métodos moleculares. Además la detección de estos aislamientos evidencia mecanismos alternativos de resistencia a meticilina que deben ser considerados en laboratorios de diagnóstico clínico.

## **6. Epidemiología de las infecciones causadas por SAMR**

Desde el año 1961, cuando fue reportado en Inglaterra el primer aislamiento, SAMR se ha convertido en una preocupación mundial [44].

Hoy en día es igualmente preocupante la alta proporción de cepas de SAMR que poseen la capacidad adicional de subsistir y diseminarse por fuera de las instituciones de salud, afectando a la comunidad en general. *S. aureus* adquirido en la comunidad (SAMR-AC) ha alcanzado niveles de prevalencia superiores a los observados a nivel hospitalario [45]. Es por este motivo que la Sociedad Argentina de Infectología y la Sociedad Argentina de Pediatría, han modificado las recomendaciones para el tratamiento empírico de las infecciones de piel y partes blandas reemplazando la cefalexina por otras alternativas que cubran este tipo de cepas [46].

La mayoría de las cepas SAMR-AC, hasta ahora, siguen siendo susceptibles a varios antibióticos no  $\beta$ -lactámicos, son portadores de SCCmec tipo IV o V, y generalmente son portadoras del gen para Leucocidina de Panton-Valentine (LPV). En cambio, los aislamientos SAMR asociados al cuidado de la salud o adquiridos en el ámbito hospitalario (SAMR-AH) generalmente presentan resistencia acompañada a múltiples grupos de antimicrobianos, por lo que resultan ser aislamientos muy difíciles de tratar, portan SCCmec tipo I, II ó III, y raramente poseen el gen para LPV [47]. Sin embargo, en los últimos años, los típicos aislamientos característicos de la comunidad se han recuperado en infecciones de origen hospitalario, y en algunos casos han alcanzado una frecuencia de aislamiento semejante a los propiamente hospitalarios [48].

Las alternativas terapéuticas para el tratamiento de SAMR multiresistente han sido los glicopéptidos tales como la Vancomicina y la Teicoplanina, que sólo pueden ser administradas por vía parenteral y requieren un cuidadoso monitoreo para evitar efectos tóxicos. Hoy en día existen nuevas opciones terapéuticas, aunque también asociadas a efectos adversos: Linezolid y Daptomicina [44].

Según la Organización Mundial de la Salud, las personas infectadas por SAMR tienen una probabilidad de morir un 64% mayor que las infectadas por cepas no resistentes. Además, las infecciones por SAMR también aumentan el costo de la atención sanitaria, pues alarga las estadías en el hospital y requieren más cuidados intensivos [44].

Una consecuencia de la alta proporción de SAMR reportada, es que el tratamiento para las infecciones sospechosas o confirmadas por *S. aureus*, así como para profilaxis en procedimientos ortopédicos o quirúrgicos, pueden requerir antibióticos de segunda línea. Estas drogas son más costosas, y tienen serios efectos adversos. Sin embargo, el uso empírico de

estas drogas, puede llevar al uso abusivo de antimicrobianos y conducir a un incremento de la resistencia en *S. aureus* o en otras especies bacterianas.

En Argentina, el 54% de los aislamientos de *S. aureus* obtenidos de la comunidad son resistentes a meticilina, sin embargo, esta cifra varía considerablemente en otras regiones o países [44]. Estas diferencias encontradas se deben a la diseminación de distintos clones epidémicos de *S. aureus*. La aparición y desaparición de distintos clones de *S. aureus* en determinadas regiones probablemente se relacione con la diversidad en terapias antibióticas o a diferentes costumbres de vida [6].

La tipificación clonal de las especies bacterianas consiste en el estudio de determinados marcadores moleculares mediante diferentes técnicas, tales como el PFGE, la identificación del tipo de *spa* o *spa* type, y el MLST. Estas técnicas, proveen información sobre la distribución de los diferentes genotipos en la población a lo largo del tiempo y en las diferentes áreas geográficas.

Varios grupos de trabajo muestran la prevalencia de clones en nuestro país. Un estudio de SAMR-AC aislados en centros de salud de diferentes zonas del país, realizado entre 2004 y 2006, reveló la prevalencia del tipo clonal ST5 - pulsotipo A - SCCmec IV - *spa* t311 [49]. Sola y colaboradores realizaron un relevamiento en varios centros del país, y hallaron este mismo genotipo prevalente tanto en SAMR-AC (82%) como en SAMR-AH (57%) [50]. Otro estudio, muestra la prevalencia del “clon cordobés”, perteneciente al ST5 y SCCmec tipo I, entre los SAMR-AH en el período 2002-2003 [51]. Recientemente se ha documentado el reemplazo del tipo clonal prevalente por otro tipo clonal, el ST30 - pulsotipo C - SCCmec tipo IV - *spa* t019, entre aislamientos de SAMR-AC obtenidos entre marzo de 2010 y octubre de 2011 en diversos centros de salud de Buenos Aires [52].



## Hipótesis

Este trabajo se inició para explorar el mecanismo responsable de la resistencia a oxacilina en una cepa de *Staphylococcus aureus* con fenotipo no habitual (resistencia a oxacilina y sensibilidad a cefoxitina), aislada de un paciente intratratamiento antibiótico.

Dado que no se pudo detectar la presencia del gen *mecA* en este aislamiento, se postula la existencia de mecanismos alternativos que puedan explicar dicho fenotipo.

## Objetivos

### Objetivo general:

Contribuir al conocimiento de los variados mecanismos moleculares responsables de la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus* carentes del gen *mecA*, y su significado clínico.

### Objetivos específicos:

- ✓ Analizar el fenotipo no habitual (resistencia a oxacilina, y sensibilidad a ceftioxitina) de una cepa SAOR (*S. aureus* oxacilino resistente) aislada intratratamiento con vancomicina y cefazolina, en un caso de bacteriemia múltiple.
- ✓ Genotipificar los aislamientos recuperados durante la evolución de este caso clínico.
- ✓ Caracterizar los mecanismos moleculares responsables de la emergencia de resistencia a oxacilina.
- ✓ Alertar sobre un mecanismo de resistencia a oxacilina infrecuente en Argentina.

## **Materiales y Métodos**

### **1. Caso clínico**

Paciente masculino de 61 años, con antecedente de insuficiencia renal crónica que ingresa a un Hospital de la Ciudad de Buenos Aires para colocación de un Stent. En una vía periférica desarrolla una trombosis de vena superficial con cultivo positivo para *S. aureus* meticilino sensible (SAMS). Recibe tratamiento con teicoplanina, cefazolina y cefalexina sucesivamente con dosis ajustadas al clearance de creatinina hasta completar el tratamiento. Cuarenta y cinco días después, reingresa por cuadro de sepsis sin foco. En hemocultivos desarrolla SAMS y recibe vancomicina y piperacilina/tazobactama, pasando luego a cefazolina hasta completar 6 semanas de tratamiento antibiótico. A los pocos días de finalizado el tratamiento, reingresa con fiebre y en 2/2 hemocultivos se aísla SAMS con igual antibiotipo al inicial. El ecocardiograma transesofágico evidencia imagen de vegetación en válvula tricúspide. Inicia tratamiento con vancomicina y cefazolina. Luego de 14 días, en 2/2 hemocultivos desarrolla *S. aureus* oxacilino resistente (SAOR), llamativamente sensible a cefoxitina, y sin resistencias acompañantes, además, una tomografía computada de tórax mostro imágenes compatibles con embolias sépticas. Recibió tratamiento con vancomicina, daptomicina y teicoplanina sucesivamente asociadas a rifampicina, completando 6 semanas desde último hemocultivo positivo, evolucionando favorablemente.

### **2. Microorganismos**

Los microorganismos fueron conservados a -20°C en presencia de glicerol al 20%. Al momento de utilizarse, se descongelaron y se sembraron en los medios de cultivo correspondientes, y se incubaron entre 35 y 37°C.

### Microorganismos analizados en este trabajo

En la tabla 1 se describen los 4 sucesivos aislamientos asociados a este caso clínico. La tipificación bioquímica se realizó en el hospital de origen.

Microorganismo	Fecha de aislamiento	Sensibilidad a OXA/FOX	Nombre asignado
<i>S. aureus</i>	05-08-2013	S/S	SAMS1
<i>S. aureus</i>	19-09-2013	S/S	SAMS2
<i>S. aureus</i>	02-11-2013	S/S	SAMS3
<i>S. aureus</i>	16-11-2013	R/S	SA2

Tabla 1: aislamientos recuperados del paciente del caso clínico estudiado en este trabajo

### Microorganismos utilizados como controles

En la tabla 2 se describen las cepas utilizadas como controles en los ensayos realizados en este trabajo.

Cepa control	Característica relevante	Origen
<i>S. aureus</i> 25923	<i>mec A</i> negativo, $\beta$ -lactamasa negativa	ATCC
<i>S. aureus</i> 29213	<i>mec A</i> negativo, $\beta$ -lactamasa positiva	ATCC
<i>S. aureus</i> 43300	<i>mec A</i> positivo	ATCC
<i>Escherichia coli</i> 35218	$\beta$ -lactamasa positiva	ATCC
<i>Bacillus subtilis</i> 6633	Sensibilidad a $\beta$ -lactámicos	ATCC
<i>S. aureus</i> Clon Córdoba	SCC <i>mec I</i> , ST5	Dra. Sola
<i>S. aureus</i> 63 Clon comunitario	SCC <i>mec IV</i> , ST5, <i>luk-PV</i> (+)	Dra. Gardella
<i>S. aureus</i> 138 Clon comunitario	SCC <i>mec IV</i> , ST30, <i>luk-PV</i> (+)	Dra. Gardella

Tabla 2: Descripción de las cepas controles utilizadas en este trabajo. ATCC: American Type Culture Collection

### 3. Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados en los diversos experimentos de esta tesis se detallan en la tabla 3.

Nombre	Abreviatura	Proveedor
Agar Tripteína-Soya	TSA	Britania
Agar Mueller-Hinton	MHA	Difco Laboratories
Agar sangre ovina	ASO	Laboratorio Argentino
Caldo Luria-Bertani	LB	Difco Laboratories
Caldo Tripteína Soya	TSB	Britania
Caldo Mueller-Hinton	CMH	Britania
Agar Almidón-ATB	AA-atb	Varios*

Tabla 3: medios de cultivo utilizados en este trabajo. \* Composición y proveedores detallados en Anexo, punto 1.

Los medios de cultivo comerciales se hidrataron y esterilizaron según las indicaciones del fabricante. Cuando fue necesario, se adicionó el antibiótico correspondiente en la concentración indicada en cada caso.

### 4. Cebadores

Los cebadores utilizados para detección o secuenciación de los diversos genes estudiados en esta tesis se detallan en la tabla 4.

Cebador	Secuencia 5' a 3'	Tamaño de fragmento (pb)	Utilidad	Referencia
<i>mecA</i> F <i>mecA</i> R	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	550	Detección gen <i>mecA</i>	Murakami [53] 1991
<i>mecLGA251</i> F <i>mecLGA251</i> R	GCTCCTAATGCTAATGCA TAAGCAATAATGACTACC	304	Detección gen <i>mecC</i>	Cuny [54] 2011
<i>luk</i> -PV-1 <i>luk</i> -PV-2	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC	443	Detección gen <i>lukS</i> /F-PV	Lina [55] 1999
<i>ccr</i> -β2 F <i>ccr</i> -α2 R <i>ccr</i> -α3 R <i>ccr</i> -α4 R	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT AACCTATATCATCAATCAGTACGT TAAAGGCATCAATGCACAAACACT GCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT	700 1000 1600	Detección gen <i>ccrAB1</i> Detección gen <i>ccrAB2</i> Detección gen <i>ccrAB3</i>	Ito [56] 2001
<i>ccrC</i> F2 <i>ccrC</i> R2	GTACTCGTTACAATGTTTGG ATAATGGCTTCATGCTTACC	449	Detección gen <i>ccrC</i>	Milheirico [57] 2007
<i>spa</i> -1113F <i>spa</i> -1514R	TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT	-	Polimorfismo de gen <i>spa</i>	Harmsen [58] 2003
<i>arc up</i> <i>arc dn</i> <i>aro up</i> <i>aro dn</i> <i>glp up</i> <i>glp dn</i> <i>gmk up</i> <i>gmk dn</i> <i>pta up</i> <i>pta dn</i> <i>tpi up</i> <i>tpi dn</i> <i>yqi up</i> <i>yqi dn</i>	TTGATTACCAGCGCGTATTGTC AGGTATCTGCTTCAATCAGCG ATCGGAAATCCTATTTACATTC GGTGTTGTATTAATAACGATATC CTAGGAACTGCAATCTTAATCC TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC ATCGTTTTATCGGGACCATC TCATTAECTACAACGTAATCGTA GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA TCGTTTCACTGAAACGTGCGTAA TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC CAGCATACAGGACACCTATTGGC CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	456 456 465 429 474 402 516	MLST	Enright [59] 2000
<i>blaZ</i> F <i>bla</i> IR <i>bla</i> R1F <i>bla</i> OP F <i>bla</i> RI R <i>bla</i> R1 R2 <i>bla</i> Z R	GTTGCTTTTTCGATTGATGAACACC GGTATTTTCTGGACTCTCATC GGATCTTTCGTTATGTACAGCATG TTGGTATCTAACTATGCTTGCTGG GGTGGTATTTATGTTATGGTTCA GCTTGAGTTGAGCCGAGTATAG GTTACATGCCAAAGAGTTAAATG	3423	Secuenciación operón <i>bla</i>	Diseño de profesionales del laboratorio de Microbiología de la FFyB
PBP 2 F1 PBP 2 R1 PBP 2 F INT PBP 2 R INT PBP2GF1 PBP2 GF2 PBP2 GR1 PBP2 GR2	AAGTGAGGACCGGTATGAC TGAATATACCTGTTAATCCACCGCT TCTGGCGGACGTGATTTCAA ACAGTACCGTGACTTTCGT CCAACAAGTTGGTGAACGAT TGTGGGACATAGCCAACAAG TCATTGATTTCCGGCAGTCT TCGATTGTTCCACATCAGC	2193	Secuenciación gen <i>pbp2</i>	Diseño de esta tesis
PBP4F1 PBP4R1 PBP4F2 PBP4R2	TTGGAAAAGGGAAGATTAACGC GCAACTTGTCGGTTTTAGTATG CACATTTCTGCAATCCAACG TAACTGCATGCGTTGTTGGT	1296	Secuenciación gen <i>pbp4</i>	Diseño de esta tesis

Tabla 4. Cebadores utilizados en esta tesis

## **5. Técnicas utilizadas para la determinación de la sensibilidad a antibióticos**

### **Pruebas de difusión en agar con discos**

De acuerdo al método de Kirby-Bauer, se inocularon placas de MHA de 4 mm de espesor con hisopos embebidos en una suspensión en solución fisiológica (SF) del microorganismo a ensayar en una turbidez correspondiente a 0,5 de Mc Farland. Posteriormente se colocaron los discos cargados con antibióticos (Britania, o BBL en el caso de ertapenem) sobre la superficie de la placa. Finalmente, las placas se incubaron entre 35 y 37°C durante 20 hs. La lectura de los halos de inhibición se expresó en mm y se interpretó de acuerdo al CLSI [35]. Se utilizaron cepas ATCC adecuadas para controlar la carga del disco y la metodología empleada.

### **Ensayos cuantitativos de sensibilidad: concentración inhibitoria mínima (CIM) en medio líquido**

Se determinó la sensibilidad de los sucesivos aislamientos clínicos a diferentes grupos de antibióticos utilizando el equipo automatizado VITEK 2C (Biomerieux) con la tarjeta AST-P577, siguiendo las indicaciones recomendadas por el fabricante.

La CIM para oxacilina (OXA), para cefoxitina (FOX), y para la combinación de OXA – Ácido Clavulánico, se evaluó mediante el método de microdilución, según las recomendaciones del CLSI [35].

Brevemente, se prepararon diluciones seriadas del antibiótico en CMH en una microplaca de 96 pocillos. Luego, se inocularon con una suspensión del microorganismo  $10^6$  UFC/ml (una dilución 1/100 a partir de una suspensión 0.5 de Mc Farland en SF). Se realizaron controles de esterilidad de las soluciones de antibiótico, control de crecimiento, recuento del inóculo en TSA, y control de la carga de los antibióticos con cepas ATCC adecuadas. La microplaca se incubó en estufa entre 35 y 37°C durante 20 – 24 hs.

## **Detección de producción de $\beta$ -lactamasa**

Con el objeto de detectar la producción de  $\beta$ -lactamasa, se realizó la metodología de la cefalosporina cromogénica (Nitrocefín) [60]. Para ello, se mezclaron 20  $\mu$ l de una solución de Nitrocefín 178  $\mu$ M con 20  $\mu$ l de una suspensión densa del microorganismo en SF en un portaobjetos. La lectura se realizó a los 5 minutos, siendo positiva cuando la coloración de la mezcla se tornó de amarilla a rojiza, y negativa, cuando no cambió su coloración. Se realizaron controles con una solución de  $\beta$ -lactamasa pura (control +), con SF (control -), con *S. aureus* ATCC 25923 y *S. aureus* ATCC 29213.

## **Semi-cuantificación de la producción de $\beta$ -lactamasa**

Para realizar los siguientes experimentos, se utilizaron sobrenadantes de cultivo en fase exponencial de cada una de las cepas en estudio, con  $DO_{620nm}=1$ . Para que los resultados sean comparables, se cuantificó la concentración de proteínas totales en cada uno de ellos, utilizando el reactivo Pierce BCA Protein Assay Kit de Thermo Scientific. Con este objetivo, se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de seroalbúmina bovina (BSA) y midiendo en cada punto la Absorbancia (A) a 540nm (resultados presentados en el punto 2 del Anexo). Luego, por interpolación del valor de  $A_{540nm}$  de cada sobrenadante de cultivo en la curva de calibración, se pudo determinar la concentración en  $\mu$ g/ml de las proteínas totales.

### **- Ensayo biológico:**

Se realizó el método biológico descrito por Keserú y colaboradores [61] modificado para semi-cuantificar la producción de  $\beta$ -lactamasas a partir de cultivos de SAMS1 y SA2, incubados con y sin inducción con FOX (1/4 valor de CIM: 0.5  $\mu$ g/ml) [62].

Se mezclaron 50  $\mu$ l del sobrenadante de cultivo filtrado ( $DO_{620nm}=1$ ) con 50  $\mu$ l de una solución de OXA (80  $\mu$ g/ml), o de PENI (60  $\mu$ g/ml). Luego de 30 min de incubación, se midió la concentración de OXA o PENI remanente por el método de difusión en agar. Para ello, se hisoparon placas de MHA con una suspensión en SF 0.5 Mc Farland de la cepa de *B. subtilis*



ATCC 6633. Luego se ubicaron cilindros metálicos estériles sobre la superficie del agar, y se colocó en ellos la mezcla de sobrenadante de cultivo y antibiótico. La actividad remanente de OXA o PENI fue evaluada luego de 20 - 24 hs de incubación entre 35 y 37 °C, midiendo el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento de la cepa ATCC de *B. subtilis*.

Se realizaron controles incubando a cada una de las soluciones de OXA o PENI con 50 µl de buffer fosfato 0.05M (control de actividad antibiótica) o con un extracto purificado de β-lactamasa CMY-16 (control de hidrólisis del antibiótico) durante 30 min previos a la inoculación de las placas. Además se inocularon las placas directamente con cada sobrenadante de cultivo filtrado (control de ausencia de actividad inhibitoria).

#### - **Ensayo iodométrico:**

Se evaluó de manera semicuantitativa la actividad de β-lactamasa en el sobrenadante de cultivo filtrado ( $DO_{620nm}=1$ ) de cada aislamiento incubado con y sin inducción con FOX (1/4 valor de CIM: 0.5 µg/ml) [62]. Para ello se prepararon placas de Agar Almidón (ver Anexo punto 1) con OXA (100 µg/ml), Agar Almidón con FOX (100 µg/ml) y Agar Almidón con PENI (500 µg/ml). Las placas se inocularon con 50 µl de sobrenadante sin diluir y en diluciones seriadas. Se incubaron las placas entre 35 y 37°C durante 60 min.

La presencia de β-lactamasas en el sobrenadante de cultivo, produce la decoloración del agar como producto de la acidificación del medio al ser hidrolizado el antibiótico [63].

## **6. Estudio de la frecuencia mutacional:**

Con la intención de evaluar la frecuencia mutacional en estos aislamientos, las cepas ATCC 25923, SAMS1 y SA2 fueron incubadas en caldo TSB a 37°C con agitación constante hasta alcanzar su fase exponencial de crecimiento ( $DO_{620nm}= 0,5-0,7$ ). Se sembraron entonces 0.1 ml de diluciones seriadas de estos cultivos en placas de TSA para el recuento del número de células totales viables, y placas de TSA con rifampicina (100 µg/ml) para el recuento de mutantes. Las placas se incubaron entre 35 y 37°C, las de TSA durante 20 - 24 hs, y las que contenían TSA+RIF

durante 48 hs. La frecuencia mutacional se expresó como el número de mutantes resistentes a RIF obtenidas respecto del total de viables. Los experimentos se realizaron por triplicado [64, 65].

## **7. Caracterización genotípica**

### **Extracción de ADN**

En todas las reacciones de PCR, se utilizó como templado el ADN extraído utilizando el protocolo descrito por Harris-Warrick y colaboradores [66] con algunas modificaciones.

Los microorganismos fueron cultivados en LB durante 24 hs, a 37°C. Las células bacterianas se concentraron centrifugando 1,5 ml del cultivo durante 2 min a 9000 g, y se lavaron con 1ml de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH: 8). Se centrifugaron nuevamente durante 10 minutos a 9000 g, y se resuspendieron en 100 µl de buffer TES (buffer TE + 50% sacarosa). A continuación se trataron con lisozima y lisostaphina (Sigma-Aldrich) 2 mg/ml y 0,3 mg/ml respectivamente, durante una hora a 37°C. Luego, se agregó 40 µl de buffer TE + Dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10% y 20 µl de EDTA 0,5M pH: 8, y se mezcló suavemente por inversión. Posteriormente se trató con RNAsa (Fermentas, 10 µg/ml) durante 50 min y finalmente con Proteinasa K (Fermentas, 0,22 mg/ml) hasta ver clarificación, aproximadamente durante 40 min.

El lisado se extrajo sucesivamente con fenol-cloroformo (1:1), con una mezcla de fenol-cloroformo-isoamílico (24:24:1), y luego sólo con cloroformo, mezclando por inversión y centrifugando cada vez durante 10 min a 9000 g.

El ADN fue precipitado O/N con 1 ml de etanol 100% pre-enfriado y resuspendido al día siguiente en 200 µl de agua calidad Milli-Q estéril. El ADN se conservó entre 4 y 8°C.

### **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):**

Los cebadores utilizados en cada una de las reacciones están descritos en la tabla 4.

En las reacciones de PCR realizadas con el objeto de evaluar presencia o ausencia de genes y/o secuenciar fragmentos menores a 2.0 kb, se utilizó la enzima Taq polimerasa (Invitrogen). Cuando el fragmento en estudio fue mayor a 2.0 kb, se utilizó la enzima Taq LHF polimerasa (INBIO HIGHWAY) para amplificación con alta fidelidad de fragmentos largos. Los protocolos de todas las reacciones de PCR realizadas en este trabajo se describen en el punto 3 del Anexo de este trabajo.

Una vez finalizada la reacción de PCR, se analizaron 5 µl homogenizados con 2 µl de buffer de carga (glicerol 50%, TAE 1X y azul de bromofenol 1%) en un gel de agarosa (BioRad) de 0.8% ó 1.5% en buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X (0.8 mM Tris-Acetato, 0.02 mM EDTA) y conteniendo bromuro de etidio (1 µg/ml). La electroforesis se realizó a 90 V durante 30 minutos y finalmente los geles se visualizaron a través de luz UV. La determinación del tamaño de los fragmentos se realizó por comparación con un marcador comercial (1 Kb DNA ladder Invitrogen, 1kb DNA ladder Genruler Thermo Scientific, ó 100 bp DNA ladder Promega). Los geles se fotografiaron para su posterior análisis con transiluminador UV, Molecular Imager GelDoc XR Sistem, Life Science Research, Bio-Rad.

### **Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE)**

#### **- Preparación de los bloques de agarosa**

Se tomaron 3 ó 4 colonias de un cultivo de 24 hs para inocular 5 ml de TSB, el cual se incubó a 35°C durante 16-18 hs en agitación. Se centrifugó 1 ml de ese cultivo a 9000 g por 2 min, y el pellet se resuspendió en buffer PIV (Tris 10 mM pH: 8, NaCl 1M) hasta ajustar la concentración bacteriana a una  $DO_{620nm}$  de 5 unidades. Se transfirieron 200 µl de esa suspensión bacteriana, termostatzada a 42°C, a un tubo eppendorf conteniendo 200 µl de agarosa (BioRad, Agarose Standard Low<sub>mt</sub>) al 1,5% en buffer PIV y termostatzada también a 42°C. Luego de homogeneizar, se armaron los bloques de agarosa o “plugs” transfiriendo la mezcla a moldes adecuados (BioRad). Allí se dejaron solidificar a temperatura ambiente y luego

a -20°C durante 5 min. Una vez solidificados y removidos de sus moldes, los bloques fueron incubados a 37°C hasta el día siguiente en buffer de lisis EC, compuesto por Tris 6 mM pH: 8, ClNa 1 M, EDTA 100 mM pH: 8, Deoxicolato-Na 0,2%, Laurilsarcosina-Na 0,5%, Brij-58 0,5%, RNAsa A (Fermentas) 50 µg/ml, Lisozima (Sigma-Aldrich) 100 µg/ml, y Lisostaphina (Sigma-Aldrich) 50 µg/ml. Luego, la solución de lisis fue reemplazada por buffer ES-P compuesto por EDTA 0,25M pH: 9, Laurilsarcosina-Na 0,5% + Proteinasa K (Fermentas) 1 mg/ml. Los bloques de agarosa en buffer ES-P fueron incubados a 50°C durante al menos 17 hs y luego transferidos a tubos conteniendo 10 ml de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH: 8) para los lavados. Se realizaron 6 lavados de 30 minutos de incubación cada uno.

- **Digestión de los bloques:**

El ADN en los bloques fue digerido utilizando la enzima *SmaI* (15 U/plug) a 25°C hasta el día siguiente.

- **PFGE:**

Los fragmentos de ADN fueron resueltos en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 0,5X (Tris 44,5 mM, Ácido Bórico 44,5 mM, EDTA 1 mM, pH: 8,3) con pulsos de 5 a 35 seg y un voltaje de 6V/cm. La electroforesis se realizó a 11,3°C durante 21 hs en un CHEF DRIII (BioRad, Hércules, CA, USA) [67-70].

### **Multi locus sequence typing (MLST)**

Se amplificaron, purificaron y secuenciaron fragmentos de 7 genes metabólicos descritos en la base de datos de MLST para *S. aureus*: *arc* (Carbamate kinase), *aro* (Shikimate dehydrogenase), *glp* (Glycerol kinase), *gmk* (Guanylate kinase), *pta* (Phosphate acetyltransferase), *tpi* (Triosephosphate isomerase), *yqi* (Acetyle coenzima A acetyltransferase).

Los cebadores que se utilizaron son los descritos para este fin por Enright y colaboradores [59]. Los diferentes alelos de cada uno de los 7 genes metabólicos estudiados y el secuencio-

tipo correspondiente se identificaron utilizando la base de datos de MLST de *S. aureus* (<http://www.mlst.net>).

### **Tipificación basada en el polimorfismo del gen *spa***

La secuenciación de la región polimórfica X del gen que codifica para la proteína A (*spa*) muestra un número variable de secuencias repetitivas de 24 pares de bases. Esta técnica es utilizada como un método eficiente para la tipificación de aislamientos, siendo un marcador en epidemiología local como global.

La amplificación de la región polimórfica del gen *spa* se llevó a cabo tal como se recomienda en [http://www3.ridom.de/staphtype/spa\\_sequencing.shtml](http://www3.ridom.de/staphtype/spa_sequencing.shtml). Los productos de amplificación se purificaron y secuenciaron, y los datos obtenidos se analizaron a través de la base de datos <http://www.ridom.de/spaserver> [58, 71, 72].

### **Secuenciación y análisis**

Las secuencias de interés se evaluaron luego de enviar los respectivos productos de PCR obtenidos a servicios externos de secuenciación. Los servicios utilizados fueron: INTA (<http://inta.gob.ar/servicios/secuenciacion>) y MacroGen (<http://dna.macrogen.com/esp/>). Los resultados de la secuenciación fueron analizados utilizando el programa (off line) Vector NTI 11.0 (InforMax, Bethesda, Md.). Cuando fue necesario, se recurrió también a herramientas gratuitas disponibles en diversos servidores tales como ExPASy ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)), National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), y European Biotechnology Institute ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)).

Los fragmentos amplificados por PCR fueron purificados utilizando el equipo comercial ADN Puriprep-GP Kit (INBIO Highway) o GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) cuando fueron enviados a INTA.

## 8. Herramientas informáticas para el modelado de proteínas

Una vez analizadas las secuencias de los genes estudiados en los aislamientos SAMS1 y SA2, se realizó primero un multi-alineamiento de las secuencias de aminoácidos traducidas utilizando ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) y Esript 3.0 (<http://esript.ibcp.fr/ESPrpt/ESPrpt/>).

Finalmente, modelos moleculares teóricos de estas proteínas fueron determinados utilizando el servidor Swiss model (<http://swissmodel.expasy.org/>) con un templado modelo previamente descripto (2olu.1).

## Resultados

### 1. Caracterización fenotípica y genotípica de los diferentes aislamientos

Los cuatro sucesivos aislamientos presentaron igual aspecto, color y tamaño. Asimismo, resultaron ser todos productores de hemólisis en ASO (Foto 1). Se confirmó la identificación de los aislamientos mediante las pruebas bioquímicas convencionales.

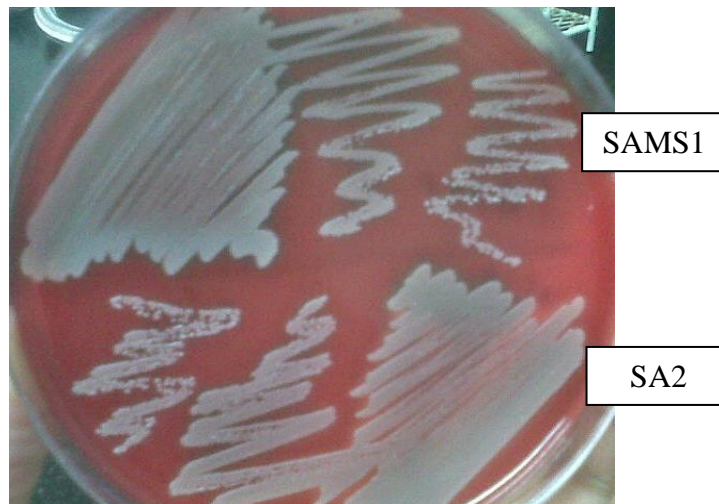


Foto 1. Crecimiento de SAMS1 y SA2 en Agar Sangre Ovin

Mediante la técnica de PFGE, se determinó que los cuatro aislamientos presentaban idéntico patrón de bandas. En el gel (foto 2), se incluyeron cepas de clones circulantes de SAMR en nuestro país (clon Córdoba, clones comunitarios).

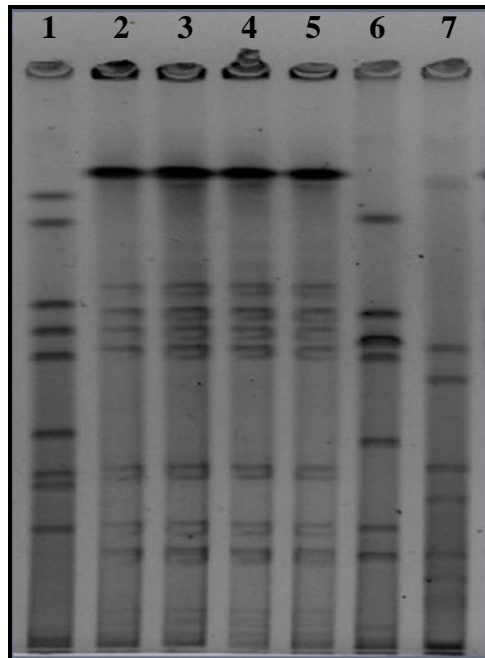


Foto 2. PFGE de los cuatro aislamientos obtenidos a partir del caso clínico. Calle 1: Clon Cordobés. Calle 2: SAMS1. Calle 3: SAMS2. Calle 4: SAMS3. Calle 5: SA2. Calle 6: Clon comunitario ST5 [49]. Calle 7: Clon comunitario ST30 [73]

Dado que las cepas son isogénicas, se decidió profundizar el análisis del primer aislamiento SAMS1 (5-8-13) sensible a oxacilina, y del último aislamiento SA2 (16-11-13) con resistencia a oxacilina.

La detección de los genes *lukS/F-PV* por la técnica de PCR fue negativa. La presencia de los genes codificantes de la leucocidina de Pantón Valentine, como ya se describió en la introducción, está relacionada a aislamientos de *S. aureus* meticilino resistente aislados en la comunidad y es utilizada como marcador de este tipo de cepas [55]. Este factor de virulencia es una citotoxina formadora de poros que produce la destrucción de células del sistema inmune.

Para completar la caracterización molecular de estas cepas se realizó la determinación del secuenciotipo por MLST y la secuenciación del gen codificante de la proteína A (*spa*). Tanto el aislamiento SAMS1 como el aislamiento SA2 pertenecen al ST 8 y poseen el *spa* tipo t024.



## 2. Determinación del patrón de sensibilidad de los diferentes aislamientos

La información recibida del hospital fue corroborada mediante las pruebas de sensibilidad realizadas a los aislamientos recuperados del caso clínico (foto 3). Además se incluyeron en el estudio pruebas de sensibilidad a otras familias de ATBs para determinar así su antibiograma.

Los resultados del antibiograma por difusión se presentan en la tabla 5 donde se destaca el fenotipo de resistencia a oxacilina y sensibilidad a cefoxitina de SA2. Se observó además que el halo de inhibición para cefoxitina en SA2 fue llamativamente mayor que en SAMS1.

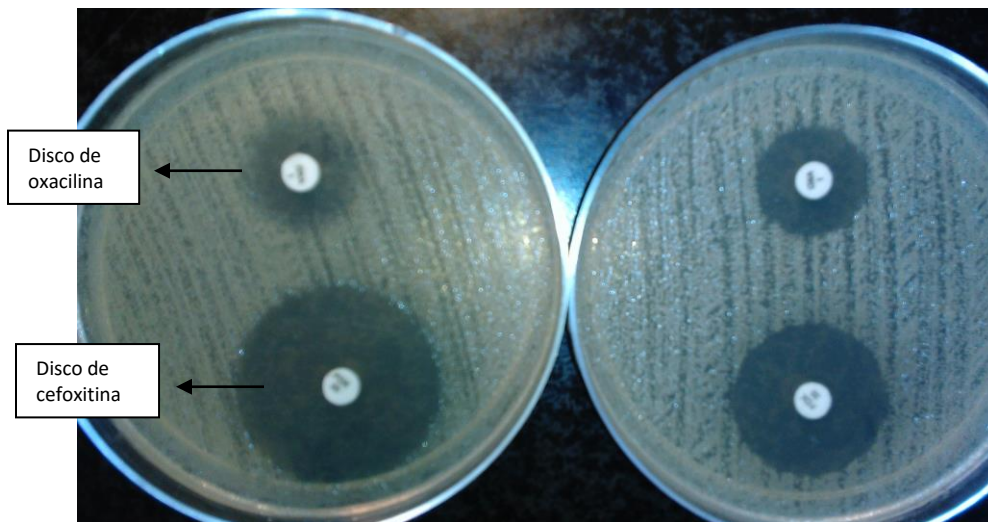


Foto 3: antibiograma por difusión en medio sólido. Izquierda: aislamiento SA2. Derecha: aislamiento SAMS1

ATBs	Carga del disco	SAMS1		SA2	
	( $\mu$ g)	Halo (mm)	Interpretación	Halo (mm)	Interpretación
Gentamicina	10	22	S	24	S
Clindamicina	2	30	S	28	S
Eritromicina	15	30	S	30	S
Rifampicina	5	30	S	32	S
Penicilina	10U	14	R	06	R
<b>Oxacilina</b>	<b>1</b>	<b>15</b>	<b>S</b>	<b>06</b>	<b>R</b>
<b>Cefoxitina</b>	<b>30</b>	<b>24</b>	<b>S</b>	<b>35</b>	<b>S</b>
TMS*	25	26	S	24	S
Tetraciclina	30	27	S	30	S
Minociclina	30	30	S	30	S
Ciprofloxacina	5	24	S	24	S

Tabla 5: Antibiograma en medio sólido de los aislamientos. \* Trimetoprima- sulfametoxazol

Adicionalmente, se determinó la CIM por microdilución a FOX y a OXA para ambos aislamientos. La CIM para OXA fue 2  $\mu$ g/ml (sensible según CLSI) para SAMS1, y 16  $\mu$ g/ml (resistente según CLSI) para SA2. La CIM para FOX fue 4  $\mu$ g/ml para SAMS1 y 2  $\mu$ g/ml para SA2 (sensibles según CLSI).

Mediante la utilización del equipo automatizado VITEK2 Compact (bioMérieux) con la tarjeta AST-P577 se confirmó el fenotipo antes descrito y se obtuvieron los datos de sensibilidad de otros grupos de antibióticos (Tabla 6). Cabe destacar que el aislamiento SA2 presentó la CIM a Teicoplanina aumentada al menos en tres diluciones respecto de los aislamientos previos del caso.

ATB		SAMS1	SAMS2	SAMS3	SA2
Test de cefoxitina		NEG	NEG	NEG	NEG
Oxacilina	CIM	<= 0.25	1	<= 0.25	>= 4
	INTERPRETACION	S	S	S	R
Gentamicina	CIM	<= 0.5	<= 0.5	<= 0.5	<= 0.5
	INTERPRETACION	S	S	S	S
Ciprofloxacina	CIM	<= 0.5	<= 0.5	<= 0.5	<= 0.5
	INTERPRETACION	S	S	S	S
Levofloxacina	CIM	<= 0.12	<= 0.12	<= 0.12	<= 0.12
	INTERPRETACION	S	S	S	S
Moxifloxacina	CIM	<= 0.25	<= 0.25	<= 0.25	<= 0.25
	INTERPRETACION	S	S	S	S
Eritromicina	CIM	<= 0.25	<= 0.25	<= 0.25	<= 0.25
	INTERPRETACION	S	S	S	S
Clindamicina	CIM	<= 0.25	<= 0.25	<= 0.25	<= 0.25
	INTERPRETACION	S	S	S	S
Quintupristina	CIM	<= 0.25	<= 0.25	<= 0.25	<= 0.25
	INTERPRETACION	S	S	S	S
Linezolid	CIM	2	2	2	1
	INTERPRETACION	S	S	S	S
Teicoplanina	CIM	<= 0.5	<= 0.5	<= 0.5	4
	INTERPRETACION	S	S	S	S
Vancomicina	CIM	1	1	<= 0.5	1
	INTERPRETACION	S	S	S	S
Minociclina	CIM	<= 0.5	<= 0.5	<= 0.5	<= 0.5
	INTERPRETACION	S	S	S	S
Tetraciclina	CIM	<= 1	<= 1	<= 1	<= 1
	INTERPRETACION	S	S	S	S
Nitrofurantoína	CIM	<= 16	<= 16	<= 16	<= 16
	INTERPRETACION	S	S	S	S
Rifampicina	CIM	<= 0.5	<= 0.5	<= 0.5	<= 0.5
	INTERPRETACION	S	S	S	S
TMS	CIM	<= 10	<= 10	<= 10	<= 10
	INTERPRETACION	S	S	S	S
Resistencia inducible a Clindamicina		NEG	NEG	NEG	NEG

Tabla 6: recopilación de resultados de sensibilidad de los cuatro aislamientos por VITEK 2C.

Con estos resultados, se confirma el fenotipo infrecuente de resistencia a OXA aislado en el cuarto episodio de bacteriemia del caso clínico.

Para profundizar el conocimiento de las diferencias entre estos aislamientos, se realizó la técnica del antibiograma por difusión a diferentes antibióticos  $\beta$ -lactámicos. En la tabla 7 se muestran los resultados. No se informan interpretaciones dado que en el CLSI 2015 no recomienda el uso de estos discos para estudios de sensibilidad en *S. aureus*.

ATBs	Carga del disco	Halo (mm)	
	( $\mu$ g)	SAMS1	SA2
Ampicilina	10	13	8
Ampicilina-sulbactama	10-10	16	12
Amoxicilina-clavulánico	20-10	20	18
Cefalotina	30	24	20
Cefotaxima	30	22	14
Ceftazidima	30	15	12
Cefepime	30	20	18
Ceftriaxona	30	20	18
Imipenem	10	48	48
Meropenem	10	32	32
Ertapenem	10	25	25

Tabla 7: Antibiograma en medio sólido a diferentes antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

Se observa una constante disminución de los halos de inhibición en la cepa SA2 respecto de la SAMS1 para todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos testeados, excepto para los halos de inhibición obtenidos con los antibióticos del tipo carbapenemes.

### 3. Caracterización molecular del mecanismo de resistencia a meticilina de los aislamientos

La detección de los genes *mecA*, *mecC*, y *ccr* por la técnica de PCR fue negativa, lo que confirma la ausencia del mecanismo de resistencia a meticilina más frecuentemente descrito en la literatura.

### 4. Ensayo de actividad de $\beta$ -lactamasas

Como ya se describió en la introducción, más del 90% de los aislamientos de *S. aureus* son productores de  $\beta$ -lactamasa. Se evaluó la expresión de esta enzima mediante la prueba de la cefalosporinasa cromogénica (Nitrocefín). Los resultados de la detección de esta enzima, fueron positivos para ambos aislamientos.

Teniendo en cuenta que la hiperproducción de  $\beta$ -lactamasa es un mecanismo de resistencia descrito en aislamientos de *S. aureus* resistentes a oxacilina (SAOR) que no poseen gen *mecA* ni *mecC* [39, 74], se realizó la determinación de la CIM por microdilución en medio líquido para OXA y OXA-CLAV (inhibidor de  $\beta$ -lactamasas). Los resultados se muestran en la tabla 8.

ATBs	SAMS1		SA2	
	CIM ( $\mu\text{g/ml}$ )	Interpretación	CIM ( $\mu\text{g/ml}$ )	Interpretación
Oxacilina	0.5	S	16	R
Oxa-Clavulánico (4 $\mu\text{g/ml}$ )	0.25	S	16	R

Tabla 8: Concentración inhibitoria mínima para Oxacilina y Oxacilina-Clavulánico de los aislamientos SAMS1 y SA2.

No se detecta disminución del valor de la CIM a OXA en presencia de ácido clavulánico (4 $\mu\text{g/ml}$ ) en la cepa SA2.

## Semi-cuantificación de la producción de $\beta$ -lactamasas

Con el objeto de poder comparar la producción de  $\beta$ -lactamasas en los diferentes aislamientos estudiados, se determinó la concentración de proteínas totales en los sobrenadantes de cultivo de SAMS1 y SA2, incubados con y sin inducción con FOX (1/4 valor de CIM: 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ).

Los resultados de la concentración de proteínas totales en los sobrenadantes de cultivo ( $\text{DO}_{620\text{nm}}=1$ ) fueron comparables (tabla 9). La curva de calibración realizada para este fin se detalla en el punto 2 del Anexo.

Sobrenadante de cultivo	Absorbancia a 540nm		Absorbancia promedio	Concentración (mg/ml)
	Lectura 1	Lectura 2		
SAMS	0,247	0,272	0,2595	0.98
SAMS+FOX <sub>0.5 <math>\mu\text{g/ml}</math></sub>	0,246	0,260	0,253	0.95
SA2	0,244	0,262	0,253	0.95
SA2+FOX <sub>0.5 <math>\mu\text{g/ml}</math></sub>	0,259	0,259	0,259	0.97

Tabla 9: concentración de proteínas totales en sobrenadantes de cultivo

### - Ensayo biológico

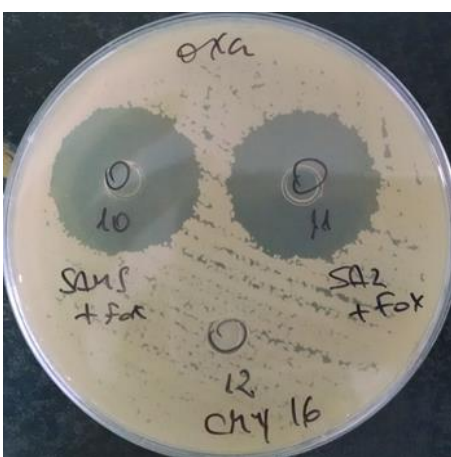
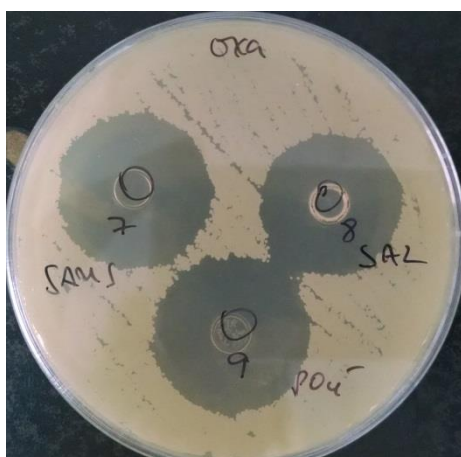
Cuando se evaluó la actividad penicilinasas en sobrenadantes de cultivos sin inducción, se pudo observar un menor halo de inhibición producido por el sobrenadante de la cepa SA2 preincubado con penicilina respecto del de la cepa SAMS1 (foto 4), lo cual indica una menor concentración de antibiótico remanente en el caso de SA2.

Al evaluar la actividad penicilinasas en sobrenadantes de cultivos inducidos con FOX, no se observó inhibición del crecimiento de *B. subtilis* por ninguno de los sobrenadantes preincubados con penicilina, indicando que en estas condiciones no se pueden detectar diferencias en la cantidad de antibiótico remanente (foto 5).



Fotos 4 y 5: Ensayo biológico modificado de Keserú [61]. Inhibición del crecimiento de *B. subtilis* por la penicilina remanente, luego de incubar una solución de penicilina 60 µg/ml con sobrenadante de cultivo de SAMS1 (pocillo 1), con sobrenadante de cultivo de SA2 (pocillo 2), con buffer fosfato (pocillo 3), con sobrenadante de cultivo de SAMS1 inducido con FOX (pocillo 4), con sobrenadante de cultivo de SA2 inducido con FOX (pocillo 5) y con extracto puro de β-lactamasa CMY-16, Cátedra de Microbiología, FFyB, UBA (pocillo 6).

Por otra parte, cuando la preincubación de los sobrenadantes se realizó con OXA en lugar de PENI, no se evidenciaron diferencias en la cantidad de antibiótico remanente entre SAMS1 y SA2 (foto 6 y 7).



Fotos 6 y 7: Ensayo biológico modificado de Keserú [61]. Inhibición del crecimiento de *B. subtilis* por la oxacilina remanente, luego de incubar una solución de oxacilina 80 µg/ml con sobrenadante de cultivo de SAMS1 (pocillo 7), con sobrenadante de cultivo de SA2 (pocillo 8), con buffer fosfato (pocillo 9), con sobrenadante de cultivo de SAMS1 en presencia de FOX (pocillo 10), con sobrenadante de cultivo de SA2 en presencia de FOX (pocillo 11) y con extracto puro de β-lactamasa CMY-16, Cátedra de Microbiología, FFyB, UBA, (pocillo 12).

La ausencia de actividad inhibitoria de los sobrenadantes de cultivo por si mismos sobre *B. subtilis*, se demostró preincubándolos sólo con buffer fosfato (foto 8).

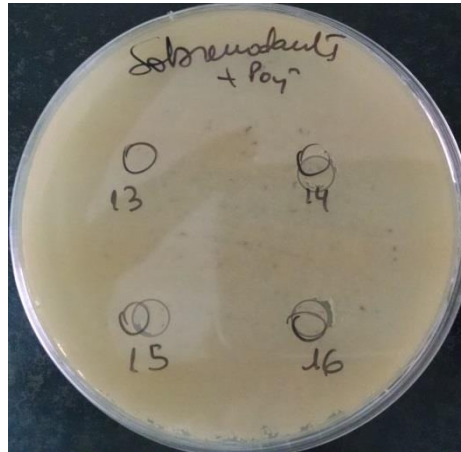


Foto 8: Ensayo biológico modificado de Keserú [61]. Inhibición del crecimiento de *B. subtilis* por sobrenadantes de cultivo de SAMS1 (pocillo 13), de SAMS1 en presencia de FOX (pocillo 14), de SA2 (pocillo 15) y de SA2 en presencia de FOX (pocillo 16), incubados con buffer fosfato.

#### - Ensayo Iodométrico

Se realizó semicuantificación de la actividad de  $\beta$ -lactamasa en los sobrenadantes de cultivo de cada aislamiento con y sin inducción con FOX en forma comparativa.

La placa de Agar almidón con penicilina (AA-PENI), inoculada con sobrenadante de cultivo de ambos aislamientos sin diluir y diluidos 1/5, reveló mayor actividad de penicilinasas en SA2 (fotos 9 y 10).



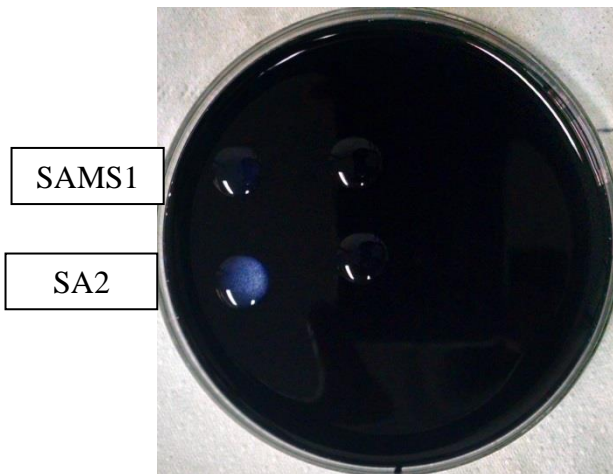


Foto 9

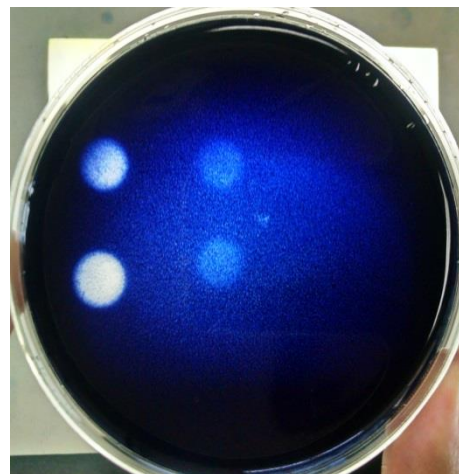


Foto 10

Fotos 9 y 10: Evaluación de la actividad  $\beta$ -lactamasa en sobrenadantes de cultivo por el método iodométrico (placas de AA-PENI). Fotos de resultados obtenidos a los 30 y 60 minutos de incubación respectivamente. Primera fila de izquierda a derecha: sobrenadante de cultivo de SAMS1 sin diluir y diluido 1/5. Segunda fila: sobrenadante de cultivo de SA2 sin diluir y diluido 1/5.

Asimismo, se volvió a evidenciar mayor actividad de penicilasa en SA2 al realizar la inducción con FOX (fotos 11 y 12).

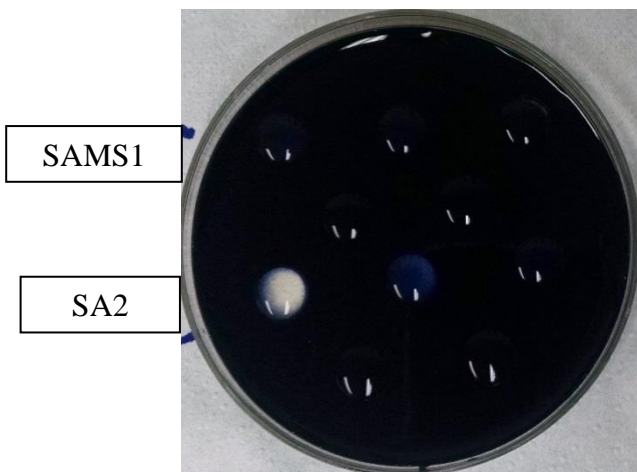


Foto 11

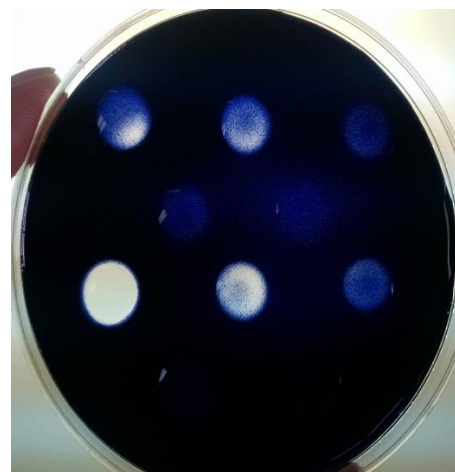


Foto 12

Fotos 11 y 12: Evaluación de la actividad  $\beta$ -lactamasa por el método iodométrico en sobrenadantes de cultivo inducidos con FOX (placas de AA-PENI). Fotos de resultados obtenidos a los 30 y 60 minutos de incubación respectivamente. Primera y segunda fila de izquierda a derecha: sobrenadante de cultivo SAMS1 sin diluir, diluido 1/5, 1/10, 1/20 y 1/50. Tercera y cuarta fila de izquierda a derecha: sobrenadante de cultivo SA2 sin diluir, diluido 1/5, 1/10, 1/20 y 1/50.

Con el objetivo de evaluar si la mayor producción de penicilinas observada en SA2 puede relacionarse con la resistencia a oxacilina de esta cepa, se prepararon placas de Agar almidón con este antibiótico (AA-OXA) para ensayar los sobrenadantes de cultivo utilizados en el experimento anterior.

No se encontraron diferencias entre las cepas SAMS1 y SA2 al comparar los sobrenadantes de los cultivos no inducidos. En cambio, se pudo observar una mayor actividad de  $\beta$ -lactamasa que afectan la molécula de oxacilina en SA2 cuando fue inducido con FOX (fotos 13 y 14).

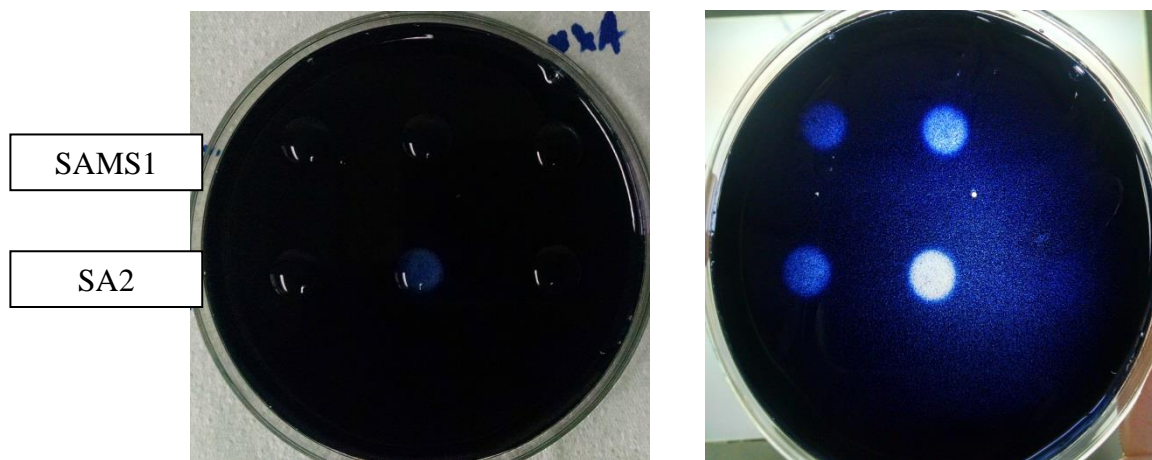


Foto 13

Foto 14

Fotos 13 y 14: Evaluación de la actividad  $\beta$ -lactamasa por el método iodométrico en sobrenadantes de cultivos con y sin inducción con FOX (placas de AA-OXA). Fotos de resultados obtenidos a los 30 y 60 minutos de incubación respectivamente. Primera fila de izquierda a derecha: sobrenadante de cultivo SAMS1 incubado sin FOX sin diluir, de SAMS1 incubado con FOX sin diluir y diluido 1/10. Segunda fila: sobrenadante de cultivo SA2 incubado sin FOX sin diluir, de SA2 incubado con FOX sin diluir y diluido 1/10.

De manera análoga, se prepararon placas de Agar almidón con FOX (AA-FOX) y se ensayó la actividad de los sobrenadantes ya estudiados. No se observó hidrólisis de FOX a los 60 min de incubación (foto 15). Cuando se realizó el mismo experimento con 72 hs de incubación, se visualizó una leve hidrólisis de la cefoxitina con ambos sobrenadantes de cultivo (foto 16).

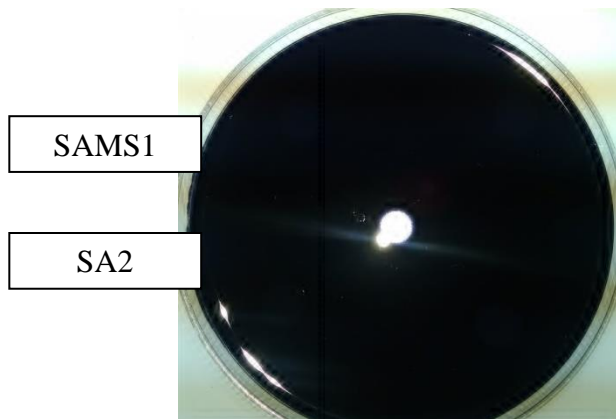


Foto 15

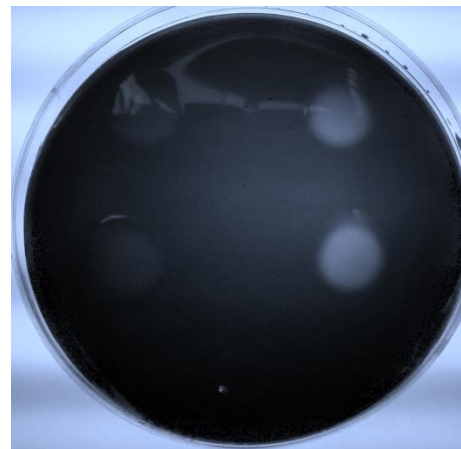


Foto 16

Fotos 15 y 16: Ensayo iodométrico con cultivos en ausencia y presencia de FOX, placas de AA-FOX. Resultados obtenidos en diferentes ensayos a los 60 min (foto 15) y 72 horas (foto 16) de incubación. Primera fila de izquierda a derecha: sobrenadante de cultivo SAMS1 incubado sin FOX y con FOX. Segunda fila de izquierda a derecha: sobrenadante de cultivo de SA2 incubado sin FOX y con FOX. En el centro de la foto 15, se inculó con un extracto purificado de  $\beta$ -lactamasa CMY16.

## 5. Amplificación y secuenciación del operón *bla*, y de los genes *pbp2* y *pbp4*

Se realizó la amplificación por PCR y posterior secuenciación del producto de amplificación del operón *bla* (3423 pb, conteniendo los genes *blaR1/blaI/blaZ*) de SAMS1 y SA2. No se encontraron diferencias en las secuencias. Del mismo modo se secuenció el gen *pbp4* (1296 pb) de ambos aislamientos, y tampoco se hallaron diferencias.

Sin embargo, la cepa SA2 presentó una mutación en la posición 1350 del gen *pbp2* (2193 pb) respecto de la cepa SAMS1, que genera una sustitución de aminoácidos Ala450Asp. En la figura 4 se muestra el alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de la proteína PBP2 de ambos aislamientos y de una cepa de referencia.

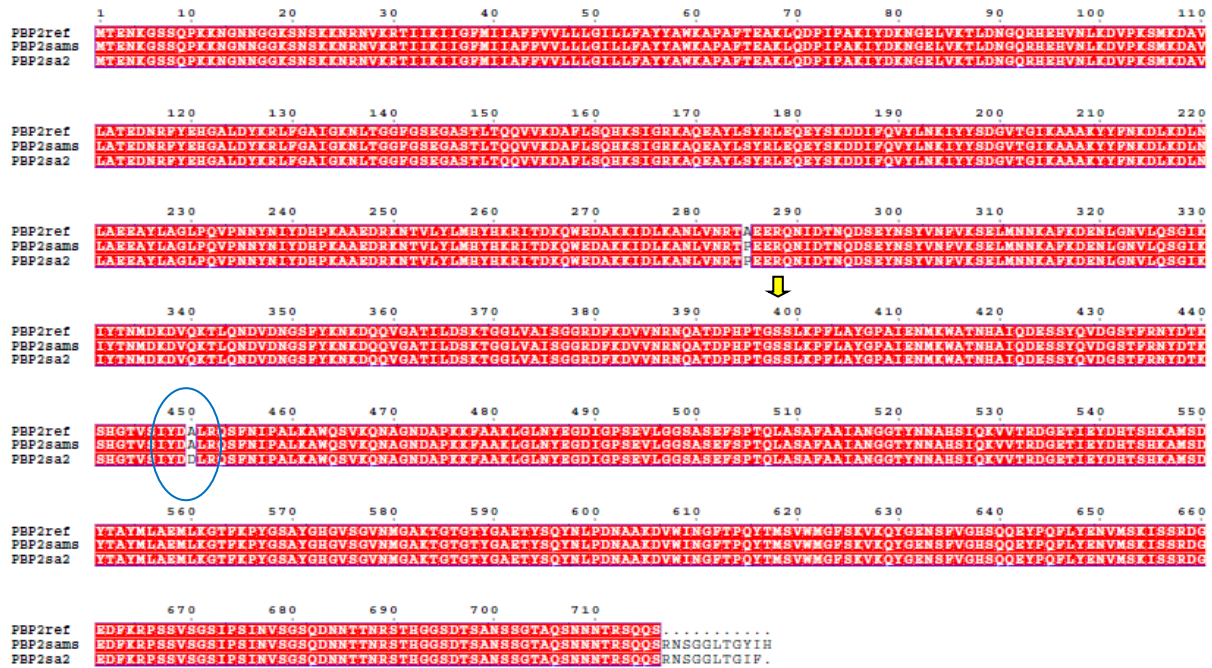


Figura 4: Multialineamiento de las secuencias de aminoácidos codificados por los genes *pbp2* de SAMS1 y SA2 junto con una cepa de referencia de *S. aureus* N315 con ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) y luego con Esprict 3.0 (<http://esprict.ibcp.fr/ESPrict/ESPrict/>). Se observa enmarcado el cambio de aminoácidos en la posición 450 entre los aislamientos SAMS1 y SA2, y señalado con una flecha la Serina del sitio activo Transpeptidasa en las posición 398.

Esta sustitución Ala450Asp, se encuentra cercana al sitio activo de la transpeptidasa PBP2.

Se descartó la presencia de esta mutación en el aislamiento SAMS3, por secuenciación del gen *pbp2*.

En la figura 5 se observa la estructura secundaria de este polipéptido según el modelo de PBP2OLU, donde se puede ubicar al aminoácido 450 en la  $\alpha$  hélice 22, entre la cadena  $\beta$  12 y el loop 25.

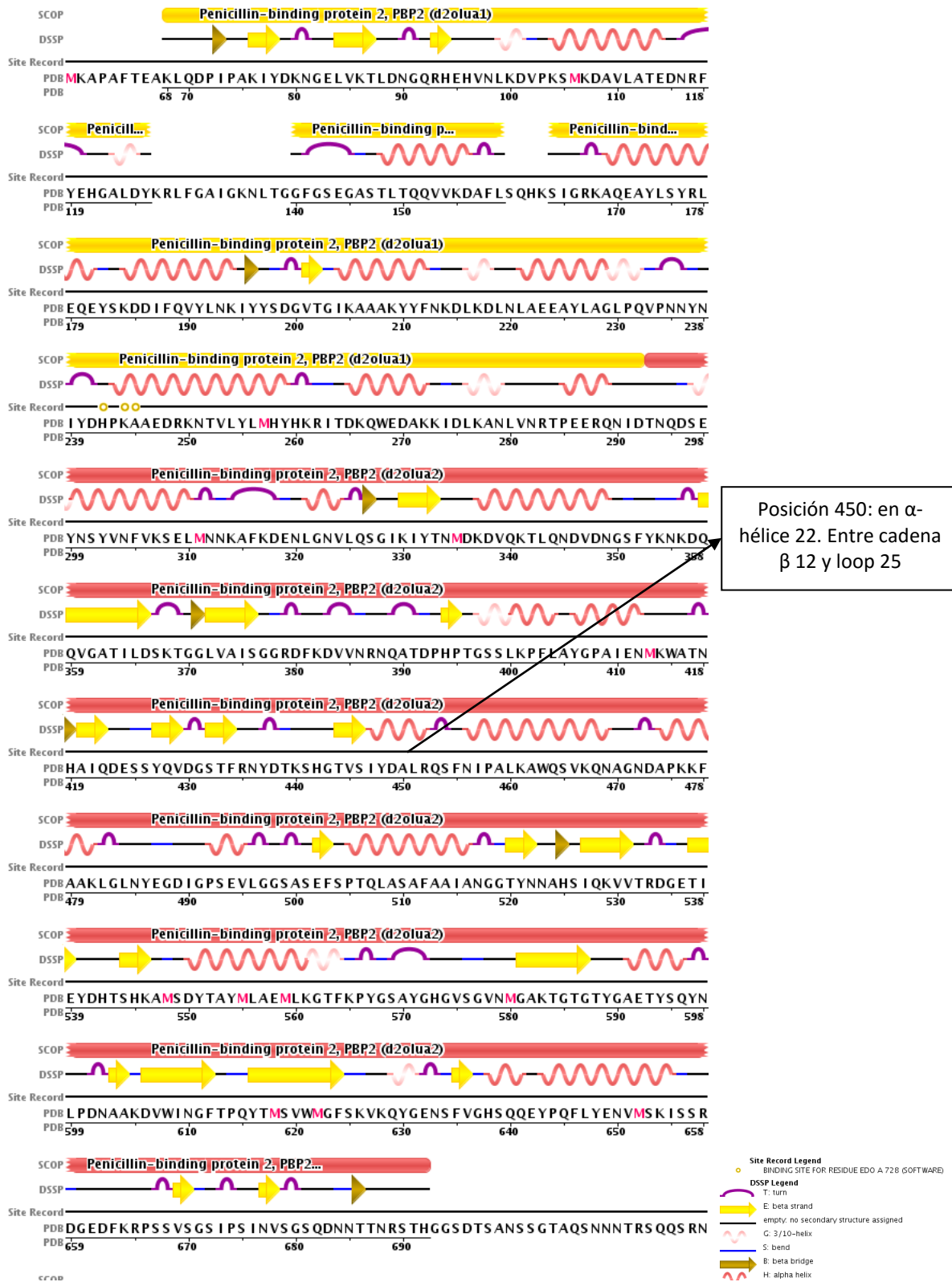


Figura 5: estructura secundaria de PBP2 de *S. aureus* según el modelo de PBP2OLU



## 6. Análisis del efecto de la mutación Ala450Asp con modelos moleculares:

La sustitución de una única base, observada en el gen *pbp2* de la cepa SA2 respecto de la cepa sensible SAMS1, resultó en el cambio de una Alanina, un aminoácido neutro e hidrofóbico, por Ácido Aspártico, un aminoácido ácido.

La posible influencia de esta mutación en el sitio activo de la proteína, se analizó utilizando modelos moleculares. En la figura 6 se presentan las estructuras tridimensionales de las proteínas PBP2 de ambos aislamientos determinadas teóricamente utilizando el servidor Swiss model (<http://swissmodel.expasy.org/>), PyMol y Autodock Vina ([www.pymol.org](http://www.pymol.org)), con un templado modelo previamente descrito de PBP2 de *S. aureus* (PDB: 2 OLU).

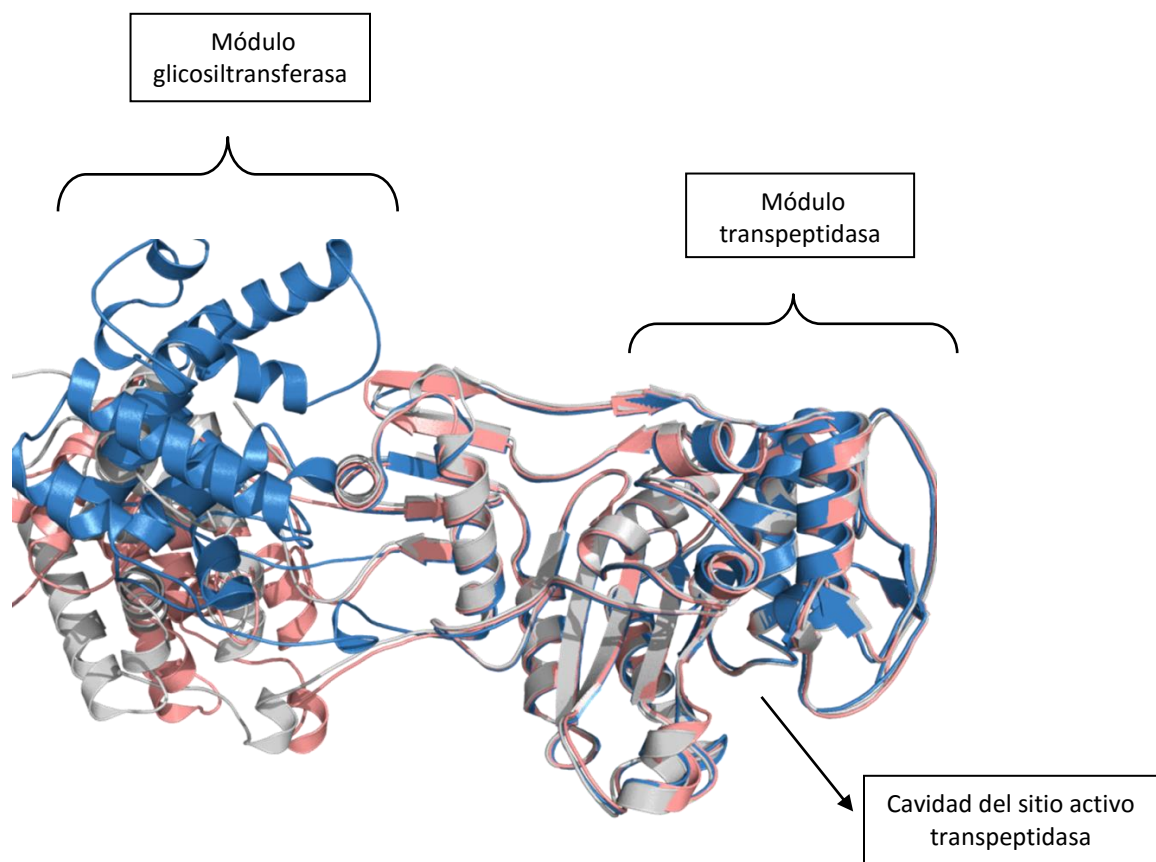


Figura 6: plegamiento general de PBP2 de SA2 (azul), PBP2 de SAMS (salmón) y 2OLU (gris)

En la figura 7, donde se presenta el modelo de la estructura tridimensional del sitio activo transpeptidasa de la proteína PBP2 de SA2, se observa el entorno hidrofóbico donde se produce la sustitución por Aspártico. Este cambio, es decir la introducción de un aminoácido cargado, si bien no se localiza dentro del bolsillo donde se encuentra la Serina activa, podría distorsionar la posición del  $\alpha$ -hélice 22 y de esta manera, impactar en la cavidad del sitio activo.

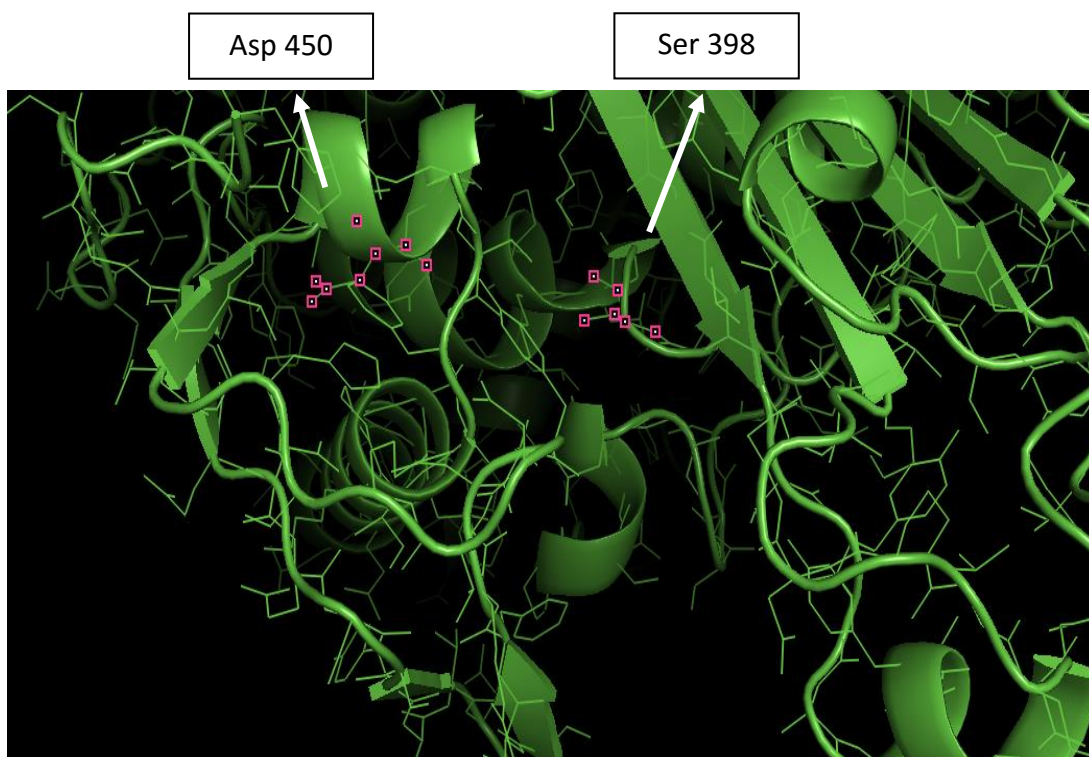


Figura 7. Modelo tridimensional del sitio activo transpeptidasa de PBP2 de SA2. Marcados en rosa se observan el Aspártico en la posición 450 y la Serina activa en la posición 398, en la cavidad.

Se obtuvieron también modelos de superficie de PBP2 de SA2 en asociación con las moléculas de oxacilina y cefoxitina, en donde puede observarse la aparente dificultad para el acomodamiento de oxacilina, a diferencia de cefoxitina, en la cavidad del sitio activo de la transpeptidasa (figuras 8 y 9).

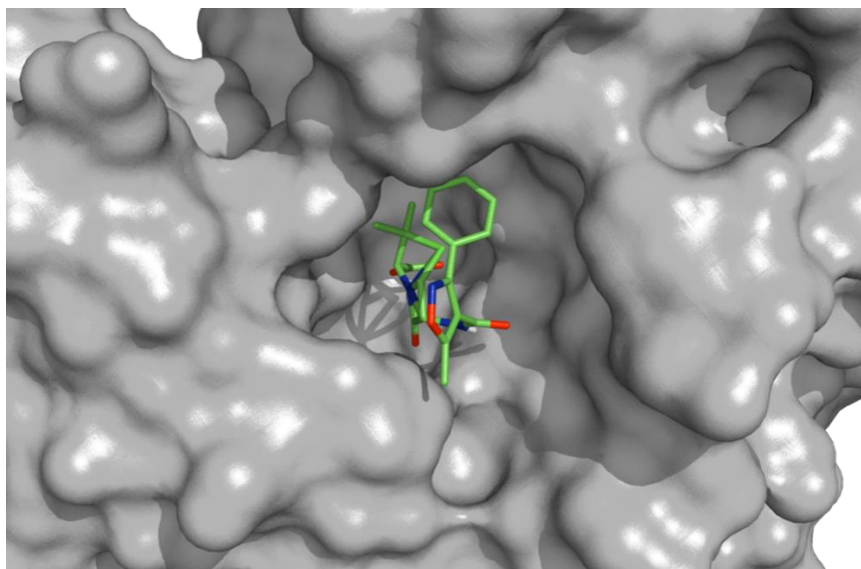


Figura 8. Modelo de superficie de PBP2 de SA2 con la molécula de oxacilina ubicada en el sitio activo.

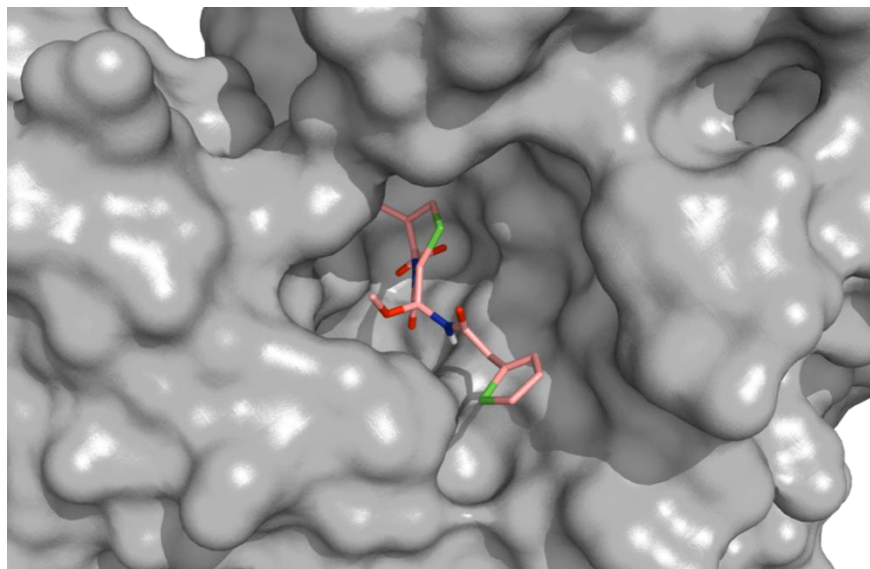
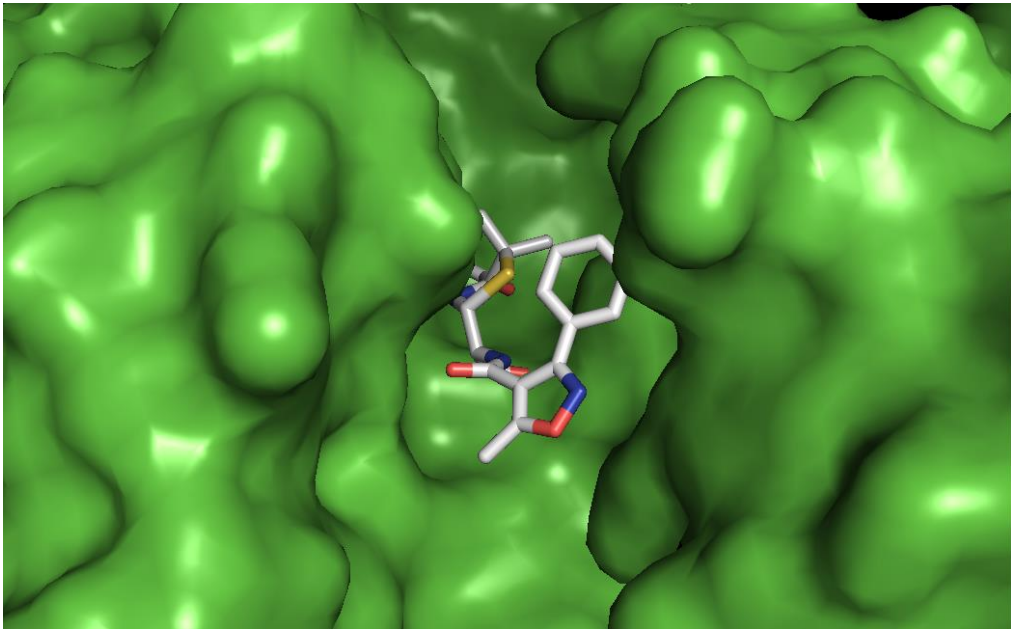
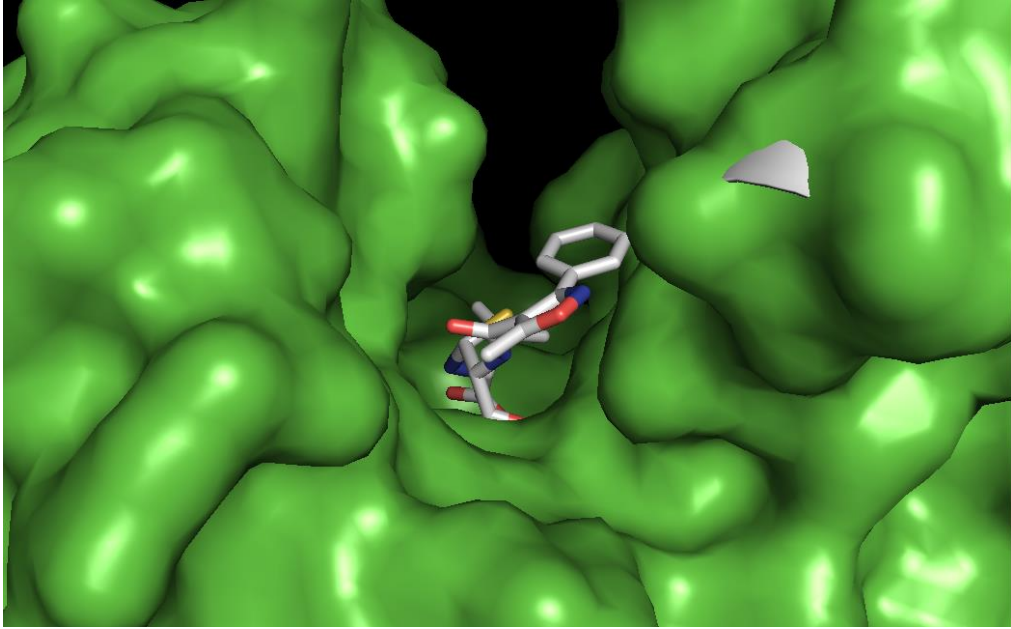


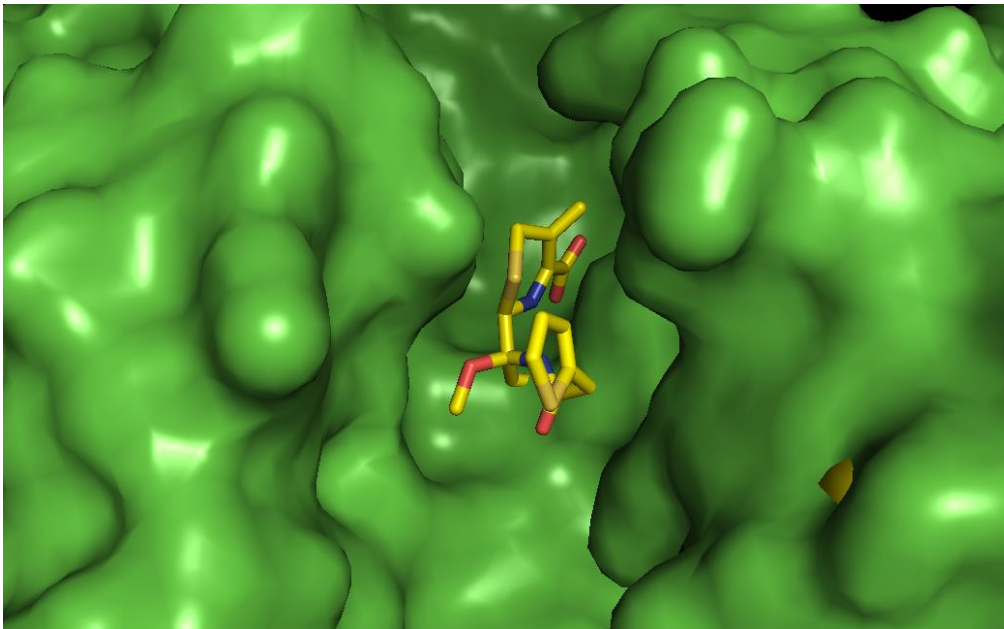
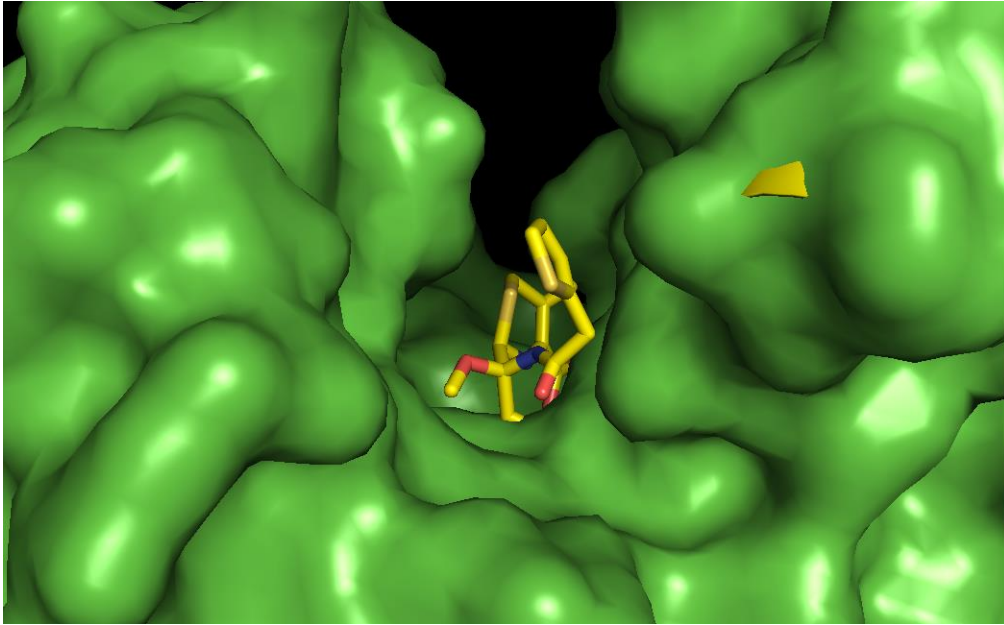
Figura 9. Modelo de superficie de PBP2 de SA2 con la molécula de cefoxitina ubicada en el sitio activo .

También se realizaron modelos de superficie con las moléculas de OXA (figuras 10 y 11) y FOX (figuras 12 y 13) en unión covalente con la PBP2 de SA2, donde se reafirma la hipótesis de la dificultad de la molécula de OXA para reaccionar con la PBP2 de SA2.





Figuras 10 y 11. Modelo de superficie del sitio activo de PBP2 de SA2 en unión covalente con la molécula de OXA.



Figuras 12 y 13. Modelo de superficie del sitio activo de PBP2 de SA2 en unión covalente con la molécula de FOX.

## 7. Estudio de la frecuencia mutacional

La resistencia a RIF está asociada a mutaciones puntuales en su sitio blanco (gen *rpoB* que codifica la RNA polimerasa) [65], por lo tanto, podemos vincular la existencia de un estado de hipermutabilidad a un incremento en el número de mutantes emergentes con esta resistencia.

Para evaluar la existencia de dicho estado en los aislamientos SAMS1 y SA2, que pudieran explicar la mutación detectada, se determinó la frecuencia de mutación como se describió en materiales y métodos. No se detectaron diferencias en la frecuencia mutacional entre las cepas SAMS y SA2, ni se detectó aumento de estos valores en comparación con el obtenido a partir de la cepa *S. aureus* ATCC 25923 (Tabla 10).

Aislamiento	Frecuencia mutacional
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	$< 1.3 \times 10^{-7}$
SAMS1	$7.0 \times 10^{-7}$
SA2	$9.3 \times 10^{-7}$

Tabla 10: Frecuencia mutacional de los aislamientos *S. aureus* ATCC 25923, SAMS1 y SA2 expresada como el número de mutantes resistentes a RIF recuperadas respecto de las viables totales. Se muestra la media de 3 determinaciones.

## Discusión

En el presente trabajo se caracterizaron aislamientos clínicos de *S. aureus* recuperados sucesivamente de un paciente con bacteriemia en un centro de salud en Argentina, que presentaron diferente sensibilidad a oxacilina a pesar de ser sensibles a cefoxitina. Se corroboró este fenotipo realizando la determinación de los valores de CIM a estos antibióticos por métodos manuales y automatizados, siendo los resultados concordantes. La aplicación de la técnica PFGE permitió determinar la isogenicidad de todos los aislamientos recuperados del paciente. La genotipificación indicó que estos aislamientos pertenecen al ST8, y *spa* tipo t024. Este linaje no se encuentra dentro de los más frecuentes en Argentina [73].

Este caso clínico resultó especialmente preocupante, dado que las recomendaciones del CLSI sugieren que el uso del disco de cefoxitina es apropiado para predecir la resistencia a meticilina en *S. aureus*. La resistencia a oxacilina en la cepa SA2 (SAOR), no se hubiera detectado utilizando solamente el disco de cefoxitina, y en caso de utilizar antibióticos  $\beta$ -lactámicos hubiera llevado a una falla terapéutica. La CIM a OXA fue el ensayo adecuado para detectar la resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en esta cepa. Es importante destacar que todos los aislamientos SAOR deben ser considerados resistentes a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos con excepción de las nuevas cefalosporinas anti SAMR tales como ceftarolina [35].

Varios aislamientos con patrón de sensibilidad a OXA y FOX atípica ya fueron descritos por algunos autores, sin embargo los mecanismos moleculares que llevan a este fenotipo son variados. [38, 39, 41, 42]. El hallazgo de una cepa con un fenotipo poco frecuente en nuestro medio (sensibilidad a FOX y resistencia a OXA) y sus posibles consecuencias motivaron la investigación de esta tesis.

En las pruebas de sensibilidad por difusión en medio sólido, resultó interesante observar que, exceptuando para FOX y para los carbapenemes, SA2 presentó sistemáticamente una reducción de 2 a 5 mm del halo de inhibición para los antibióticos  $\beta$ -lactámicos con respecto a la cepa SAMS1. Esta observación no puede ser interpretada como un cambio en la sensibilidad desde los criterios del CLSI (no existen tablas de interpretación), pero indicaría una generalizada

disminución de la sensibilidad a estas drogas. Ambas cepas resultaron sensibles a FOX, pero llamativamente, la cepa SA2 presentó un halo de inhibición 11 mm mayor, y un valor de CIM una dilución menor, que la cepa SAMS1. Esta observación puede ser correlacionada con la alta eficiencia de FOX para inducir la expresión de *blaZ* [62].

Se exploró en primera instancia la presencia del gen *mecA*, dado que este es el mecanismo más frecuente asociado a resistencia a oxacilina en *S. aureus*. La detección molecular de este gen dio resultado negativo, y se descartó también la presencia de los genes que codifican para las diferentes recombinasas descritas en los SCC*mec*. La posible presencia del gen *mecC*, aunque aún no ha sido descrita en nuestro medio, también fue evaluada y descartada en este aislamiento. Varios autores reportaron el aislamiento de cepas resistentes a meticilina y carentes del gen *mec* [38, 41, 42]. Los resultados hasta aquí obtenidos nos condujeron a evaluar mecanismos alternativos que pudiesen explicar este fenotipo como la hiperproducción de  $\beta$ -lactamasa y mutaciones en las PBPs [37-43].

No se pudo evidenciar la hiperproducción de  $\beta$ -lactamasa en SA2 por disminución del valor de la CIM a OXA en presencia de ácido clavulánico, como lo reporta Maalej [39]. Sin embargo, los resultados obtenidos con los ensayos de actividad de  $\beta$ -lactamasas por los métodos biológico y iodométrico indicaron lo contrario.

El ensayo biológico de Keseru [61] modificado mostró mayor producción de penicilinasas en la cepa SA2 respecto de la cepa SAMS1. Al realizar la inducción de la producción de  $\beta$ -lactamasa con FOX, no se evidenciaron diferencias entre las cepas. Probablemente, esto se deba a que la cantidad de penicilinasas producidas por ambas cepas luego de la inducción, fue tal, que consumió por completo la penicilina, sin dejar remanente para la inhibición del crecimiento de *B. subtilis*. Así mismo, el ensayo iodométrico confirmó esta observación.

No se pudo demostrar con el experimento biológico que la OXA se vea afectada por la mayor producción de penicilinasas en SA2. Sin embargo, el experimento iodométrico reveló que el sobrenadante de cultivo inducido con FOX de la cepa SA2, presenta mayor actividad hidrolítica sobre la molécula de OXA que el de la cepa SAMS1. Probablemente el método iodométrico sea más sensible que el método biológico para detectar esta diferencia.

La penicilinasas de *S. aureus* no hidroliza eficientemente oxacilina ni cefoxitina. Al analizar los resultados del método iodométrico con FOX, y teniendo en cuenta que sólo se vio hidrólisis

luego de 72 hs de incubación, es posible concluir que la cefoxitina sería aun peor sustrato en comparación con la oxacilina para esta penicilinasasa, si bien la cefoxitina es un buen inductor de la expresión de *blaZ*[62].

No se encontraron mutaciones en el operón *bla*, que pudieran justificar la hiperproducción de BlaZ en SA2.

Sauvage y Terrak explican en un trabajo de revisión del año 2015 que la alteración de residuos que rodean el sitio activo de las PBPs es la forma más directa en estafilococos y enterococos de incrementar el nivel de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos [75]. Esto motivó la investigación de la presencia de mutaciones en los genes codificantes de las PBP2 y PBP4 que pudieran explicar el fenotipo de resistencia de la cepa SA2.

En este trabajo, se pudo evidenciar por secuenciación, la presencia de una mutación en la posición 1350 del gen *pbp2* de la cepa SA2 respecto de la SAMS1, que resultó en una sustitución Ala450Asp. Este cambio no se evidenció en la cepa SAMS3, lo que sugiere que esta mutación se podría vincular con la emergencia de resistencia a oxacilina en SA2. Se han reportado en varios trabajos científicos que los tratamientos con antibióticos provocan estrés bacteriano, y esto conlleva a la aparición de mutaciones a lo largo del genoma [11-17, 19]. Este fenómeno puede correlacionarse con el prolongado y variado tratamiento recibido por el paciente del caso clínico.

El análisis del efecto de esta mutación con modelos tridimensionales muestra el reemplazo de un aminoácido hidrofóbico como la alanina, por uno ácido como el aspártico, en un entorno muy hidrofóbico y muy cercano a la cavidad del sitio activo del dominio transpeptidasa de la PBP2 de SA2. Esto nos llevaría a pensar en la posibilidad de que la carga introducida en ese entorno hidrofóbico produciría una distorsión del  $\alpha$ -hélice y por lo tanto del cercano bolsillo de reacción, alterando así el ingreso de la molécula de OXA. Con este modelo, podemos suponer que este fenotipo no habitual, podría justificarse con la disminución de la afinidad del dominio transpeptidasa de la PBP2 por la molécula de oxacilina.

No se detectó un aumento de la frecuencia de mutación en estos aislamientos respecto de la cepa de referencia (*S. aureus* ATCC 29213), utilizando como marcador de selección de las mutantes la rifampicina. Sin embargo, no siempre el estado de hipermutabilidad conlleva a mutaciones en el gen *rpoB*, y por ende, no podemos descartar en estas cepas el fenotipo

hipermutable asociado al estrés por el tratamiento antibiótico [65]. Cabe resaltar que el aislamiento SA2 presentó un aumento en la CIM a Teicoplanina respecto del aislamiento SAMS1 (de  $<0.5 \mu\text{g/ml}$  a  $4 \mu\text{g/ml}$ ), lo que podría ser la evidencia de otro cambio genómico en respuesta al estrés en SA2, y que no fue explorado en profundidad en este trabajo.

Posiblemente, tanto la hiperproducción de  $\beta$ -lactamasa como la mutación, que resulta en la sustitución Ala450Asp en PBP2, descritas en la cepa SA2, contribuyan al fenotipo de resistencia observado.

Con el objeto de profundizar la contribución de cada uno de estos mecanismos, se propone a futuro curar la cepa SA2 del plásmido portador del operón *bla* para evaluar el impacto en la sensibilidad a OXA. Adicionalmente, se propone comprobar las diferentes afinidades de PBP2 de SA2 y de SAMS1 por OXA y FOX. Para ello, es necesario realizar una preparación de membrana de estas cepas, preincubarlas con diferentes concentraciones de dichos antibióticos, y finalmente revelar la actividad remanente con ampicilina fluorescente [76]. Paralelamente, se podría realizar un experimento de mutagenesis dirigida sobre *pbp2* de SA2 con el fin de revertir la mutación y analizar posibles modificaciones en la sensibilidad a OXA.

La detección de aislamientos resistentes a oxacilina pero carentes del gen *mec*, representa un gran desafío para los laboratorios clínicos, dado que no se detectan utilizando el disco de FOX. Si bien el CLSI recomienda, dentro de las pruebas cualitativas, el uso del disco de FOX para informar la sensibilidad a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, este trabajo demuestra la emergencia de aislamientos SAOR que no se detectarían con este método y serían reportados como SAMS.

## Conclusiones

El trabajo presentado en esta tesis confirma la existencia de variados mecanismos moleculares que justifican la resistencia a oxacilina en *Staphylococcus aureus*.

Se analizó en profundidad la emergencia de la resistencia a OXA en la cepa clínica SA2 seleccionada intratratamiento, y carente del gen *mec*. Los aislamientos recuperados del paciente resultaron ser isogénicos, ST 8 y *spa* tipo t024. Este genotipo no se encuentra dentro de los más frecuentemente encontrados en Argentina.

Se demostró la mayor producción de  $\beta$ -lactamasa y la existencia de una única mutación (sustitución) cercana al sitio activo transpeptidasa de la PBP2 en la cepa SA2 resistente a OXA, que podrían justificar este fenotipo infrecuente. Posiblemente, tanto la hiperproducción de  $\beta$ -lactamasa como la mutación que resulta en la sustitución Ala450Asp en PBP2, contribuyan al fenotipo de resistencia observado.

No se descarta la posible coexistencia de otros mecanismos moleculares que contribuyan a la resistencia a este antibiótico.

Según nuestro conocimiento, este sería el primer caso descrito hasta a la fecha de aislamientos SAOR sensibles a FOX en nuestro medio.

Los mecanismos alternativos de resistencia a OXA, si bien se presentan con baja frecuencia en el laboratorio clínico, no son detectados cuando se utiliza solamente FOX como marcador de resistencia a meticilina en los ensayos de difusión en medio sólido.



## Anexo

### 1. Composición del Agar Almidón con antibiótico:

El AA-atb se preparó de la siguiente manera:

- 0.25 gr de almidón (SIGMA Aldrich)
- 0.50 gr de Agar-Agar (Britania)
- 50 ml buffer fosfato 50 mM pH: 7.5

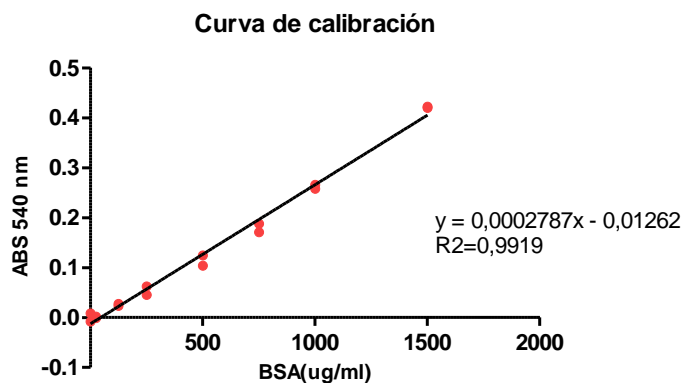
Se calentó hasta disolución y se colocó inmediatamente en baño termostático a 50 °C. Una vez entibiado, se agregó 1 ml de una solución de Iodo-Ioduro de potasio. Finalmente, se volcó 12 ml por placa y se agregó el antibiótico correspondiente en la concentración indicada en cada caso. Las placas de AA-atb se utilizaron luego de solidificadas.

### 2. Determinación de proteínas totales en sobrenadante de cultivo

- **Curva de calibración:**

BSA( $\mu$ g/ml)	ABSROBANCIA 540 nm	
	Lectura 1	Lectura 2
0	-0,008	0,008
25	-0,001	0,002
125	0,027	0,023
250	0,045	0,062
500	0,104	0,124
750	0,171	0,188
1000	0,258	0,266
1500	0,422	0,420

Lectura de absorbancia a 540 nm de las diferentes concentraciones de BSA para realizar la curva de calibración.



### 3. Reacciones de PCR realizadas en este trabajo:

- **Amplificación del gen *mecA* [53]**

Protocolo de reacción:

Reactivo	Concentración	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
dNTPs	10 mM	2.5	0.5 mM
Primer Foward <i>mecA</i>	5 $\mu$ M	8	0.8 $\mu$ M
Primer Reverse <i>mecA</i>	5 $\mu$ M	8	0.8 $\mu$ M
Buffer Taq	10X	5	1X
Cl <sub>2</sub> Mg	25 mM	5	2.5 mM
H <sub>2</sub> O Milli-Q	-	20.5	-
DNA	50 ng/ $\mu$ l	1	1 ng/ $\mu$ l
Taq pol (hot start)	5 U/ $\mu$ l	0.2	1U/reacción

Volumen final: 50  $\mu$ l

Tamaño del amplicón: 550 pb

Protocolo de ciclado:

95°C – 5 min

52°C – 15 min → a los 5 min de “annealing” se agrega 0.2 µl de *Taq* polimerasa

72°C – 1 min

95°C – 1 min  
52°C – 1 min  
72°C – 1 min

} 30 X

72°C – 10 min

Condiciones de corrida electroforética:

Gel de agarosa 0.8% en buffer TAE. 30 minutos, 90V.

- **Amplificación del gen *mecC* [54]**

Protocolo de reacción:

Reactivo	Concentración	Volumen (µl)	Concentración final
dNTPs	10 mM	0.5	0.2 mM
Primer F <i>mec</i> LGA251	10 µM	0.75	0.3 µM
Primer R <i>mec</i> LGA251	10 µM	0.75	0.3 µM
Buffer Taq	10X	2.5	1X
Cl <sub>2</sub> Mg	25 mM	5	5 mM
H <sub>2</sub> O Milli-Q	-	14.25	-
DNA	50 ng/µl	1	2 ng/µl
Taq pol (hot start)	5 U/µl	0.25	0.05 U/µl

Volumen final: 25 µl

Tamaño del amplicón: 304 pb

Protocolo de ciclado:

95°C – 2 min

94°C – 30 seg  
50°C – 30 seg  
72°C – 30 seg

} 30 X

72°C – 4 min

Condiciones de corrida electroforética:

Gel de agarosa 0.8% en buffer TAE. 30 minutos, 90V.

- **Amplificación del gen *luk-PV* [55]**

Protocolo de reacción:

Reactivo	Concentración	Volumen (µl)	Concentración final
dNTPs	10 mM	2.5	0.5 mM
Primer <i>lukPV-1</i>	5 µM	8	0.8 µM
Primer <i>lukPV-2</i>	5 µM	8	0.8 µM
Buffer Taq	10X	5	1X
Cl <sub>2</sub> Mg	25 mM	5	2.5 mM
H <sub>2</sub> O Milli-Q	-	20.5	-
DNA	50 ng/µl	1	1 ng/µl
Taq pol (hot start)	5 U/µl	0.2	1U/reacción

Volumen final: 50 µl

Tamaño del amplicón: 443 pb

Protocolo de ciclado:

95°C – 5 min

52°C – 15 min → a los 5 min de “annealing” se agrega 0.2 µl de *Taq* polimerasa

72°C – 1 min

95°C – 1 min  
52°C – 1 min  
72°C – 1 min

} 30 X

72°C – 10 min

Condiciones de corrida electroforética:

Gel de agarosa 0.8% en buffer TAE. 30 minutos, 90V.

- **Amplificación del gen *ccrAB* [56]**

Protocolo de reacción:

Reactivo	Concentración	Volumen (µl)	Concentración final
dNTPs	10 mM	2.5	0.5 mM
Primer Foward β2	10 µM	4	0.8 µM
Primer Reverse α2	10 µM	4	0.8 µM
Primer Reverse α3	10 µM	4	0.8 µM
Primer Reverse α4	10 µM	4	0.8 µM
Buffer Taq	10X	5	1X
Cl <sub>2</sub> Mg	25 mM	5	2.5 mM
H <sub>2</sub> O Milli-Q	-	20.3	-
DNA	50 ng/µl	1	1 ng/µl
Taq pol	5 U/µl	0.2	1U/reacción

Volumen final: 50 µl

Tamaño de los amplicones:

*ccrAB1*: 700 pb

*ccrAB2*: 1000 pb

*ccrAB3*: 1600 pb

Protocolo de ciclado:

94°C – 5 min

94°C – 1 min  
50°C – 1 min  
72°C – 2 min

} 30 X

72°C – 2 min

Condiciones de corrida electroforética:

Gel de agarosa 1.5% en buffer TAE. 30 minutos, 90V.

- **Amplificación del gen *ccrC* [57]**

Protocolo de reacción:

Reactivo	Concentración	Volumen (µl)	Concentración final
dNTPs	10 mM	2.5	0.5 mM
Primer <i>ccrC</i> F2	5 µM	8	0.8 µM
Primer <i>ccrC</i> R2	5 µM	8	0.8 µM
Buffer Taq	10X	5	1X
Cl <sub>2</sub> Mg	25 mM	5	2.5 mM
H <sub>2</sub> O Milli-Q	-	20.5	-
DNA	50 ng/µl	1	1 ng/µl
Taq pol	5 U/µl	0.2	1U/reacción

Volumen final: 50  $\mu$ l

Tamaño del amplicón: 449 pb

Protocolo de ciclado:

94°C – 5 min

94°C – 1 min  
50°C – 1 min  
72°C – 2 min

} 30 X

72°C – 2 min

Condiciones de corrida electroforética:

Gel de agarosa 1.5% en buffer TAE. 30 minutos, 90V.

- **Amplificación del gen *spa* [58]**

Protocolo de reacción:

Reactivo	Concentración	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
dNTPs	10mM	2	0.4mM
Primer <i>spa</i> 1113 F	10 $\mu$ M	5	0.5 $\mu$ M
Primer <i>spa</i> 1514 R	10 $\mu$ M	5	0.5 $\mu$ M
Buffer Taq	10X	5	1X
Cl <sub>2</sub> Mg	25mM	5	2.5mM
H <sub>2</sub> O Milli-Q	-	27	-
DNA	50 ng/ $\mu$ l	1	1 ng/ $\mu$ l
Taq pol	5U/ $\mu$ l	0.2	1U/reacción

Volumen final: 50  $\mu$ l

Protocolo de ciclado:

95°C – 5 min

95°C – 45 seg

58°C – 45 seg

72°C – 1 min 30 seg

72°C – 10 min

} 30 X

Condiciones de corrida electroforética:

Gel de agarosa 1.5 % en buffer TAE. 30 minutos, 90V para confirmar presencia de amplicón.

- **Amplificación de los genes *arc* y *tpi* para MLST [59]**

Protocolo de reacción para cada gen:

Reactivo	Concentración	Volumen (µl)	Concentración final
dNTPs	10 mM	1.25	0.5 mM
Primer Foward	10 µM	2.5	1 µM
Primer Reverse	10 µM	2.5	1 µM
Buffer Taq	10X	2.5	1X
Cl <sub>2</sub> Mg	50 mM	1.25	2.5 mM
H <sub>2</sub> O Milli-Q	-	14	-
DNA	50 ng/µl	1	2 ng/µl
Taq pol	5U/µl	0.2	1U/reacción

Volumen final: 25 µl

Tamaño de los amplicones:

*arc*: 456 pb

*tpi*: 402 pb



Protocolo de ciclado:

95°C – 5 min

95°C – 1 min

50°C – 30 seg

72°C – 30 seg

72°C – 10 min

} 30 X

Condiciones de corrida electroforética:

Gel de agarosa 0.8 % en buffer TAE. 30 minutos, 90V para confirmar presencia de amplicón.

- **Amplificación de los genes *pta*, *glp*, *aro*, *yqi* y *gmk* para MLST [59]**

Protocolo de reacción para cada gen:

Reactivo	Concentración	Volumen (µl)	Concentración final
dNTPs	10 mM	1.25	0.5 mM
Primer Foward	10 µM	2.5	1 µM
Primer Reverse	10 µM	2.5	1 µM
Buffer Taq	10X	2.5	1X
Cl <sub>2</sub> Mg	50 mM	1.25	2.5 mM
H <sub>2</sub> O Milli-Q	-	14	-
DNA	50 ng/µl	1	2 ng/µl
Taq pol	5U/µl	0.2	1U/reacción

Volumen final: 25 µl

Tamaño de los amplicones:

*pta*: 474 pb

*glp*: 465 pb

*aro*: 456 pb

*yqi*: 516 pb

*gmk*: 429 pb

Protocolo de ciclado:

95°C – 5 min

95°C – 1 min

55°C – 30 seg

72°C – 30 seg

72°C – 10 min

} 30 X

Condiciones de corrida electroforética:

Gel de agarosa 0.8 % en buffer TAE. 30 minutos, 90V para confirmar presencia de amplicón.

- **Amplificación del operón *bla***

Protocolo de reacción:

Reactivo	Concentración	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
dNTPs	10 mM	0.5	0.2 mM
Primer <i>bla</i> ZF	10 $\mu$ M	0.75	0.3 $\mu$ M
Primer <i>bla</i> IR	10 $\mu$ M	0.75	0.3 $\mu$ M
Buffer Taq LHF	10X	2.5	1X
H <sub>2</sub> O Milli-Q	-	19.25	-
DNA	50 ng/ $\mu$ l	1	2 ng/ $\mu$ l
Taq pol LHF	2.5U/ $\mu$ l	0.25	0.625U/reacción

Volumen final: 25  $\mu$ l

Tamaño del amplicón: 3423 pb

Protocolo de ciclado:

94°C – 5 min

95°C – 1 min

55°C – 1 min

72°C – 4 min

72°C – 10 min

} 30 X

Condiciones de corrida electroforética:

Gel de agarosa 0.8 % en buffer TAE. 30 minutos, 90V para confirmar presencia de amplicón.

- **Amplificación del gen *pbp2***

Protocolo de reacción:

Reactivo	Concentración	Volumen (µl)	Concentración final
dNTPs	10 mM	0.5	0.2 mM
Primer <i>pbp2F1</i>	10 µM	0.75	0.3 µM
Primer <i>pbp2R1</i>	10 µM	0.75	0.3 µM
Buffer Taq LHF	10X	2.5	1X
H <sub>2</sub> O Milli-Q	-	19.25	-
DNA	50 ng/µl	1	2 ng/µl
Taq pol LHF	2.5U/µl	0.25	0.625U/reacción

Volumen final: 25 µl

Tamaño del amplicón: 2193 pb

Protocolo de ciclado:

94°C – 5 min

94°C – 1 min

60°C – 1 min

72°C – 2 min 30 seg

72°C – 10 min

} 30 X

Condiciones de corrida electroforética:

Gel de agarosa 0.8 % en buffer TAE. 30 minutos, 90V para confirmar presencia de amplicón.

- **Amplificación del gen *pbp4***

Protocolo de reacción:

Reactivo	Concentración	Volumen (µl)	Concentración final
dNTPs	10 mM	0.5	0.2 mM
Primer <i>pbp4</i> F1	10 µM	0.75	0.3 µM
Primer <i>pbp4</i> R1	10 µM	0.75	0.3 µM
Buffer Taq	10X	2.5	1X
Cl <sub>2</sub> Mg	25 mM	5	5 mM
H <sub>2</sub> O Milli-Q	-	14.25	-
DNA	50 ng/µl	1	2 ng/µl
Taq pol	5U/µl	0.25	1.25 U/reacción

Volumen final: 25 µl

Tamaño del amplicón: 1296 pb

Protocolo de ciclado:

95°C – 5 min

95°C – 30 seg

55°C – 20 seg

72°C – 2 min

72°C – 5 min

} 35 X

Condiciones de corrida electroforética:

Gel de agarosa 0.8 % en buffer TAE. 30 minutos, 90V para confirmar presencia de amplicón.

## Bibliografía

1. Manual of Clinical Microbiology. Murray, P.M., 2005, Washington DC: ASM press.
2. Garrity, G.M., Holt, J.G., *The road map to the manual*. 2nd ed ed, ed. R.D. In: Boone, Castenholz, R.W., Garrity, G.M. 2001, Springer-Verlag, New York, NY.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.
3. Malachowa, N. and F.R. DeLeo, *Mobile genetic elements of Staphylococcus aureus*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010. **67**: p. 3057–3071.
4. Donlan, R.M. and J.W. Costerton, *Biofilms: Survival hanisms of Clinically Relevant Microorganisms*. Clinical Microbiology Reviews, 2002. **15**(2): p. 167–193.
5. Moran, G.J., et al., *Methicillin-resistant S. aureus infections among patients in the emergency department*. New England Journal of Medicine, 2006. **355**(7): p. 666-74.
6. Chambers, H.F. and F.R. Deleo, *Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era*. Nature Reviews Microbiology, 2009. **7**(9): p. 629-41.
7. Scheffers, D.J. and M.G. Pinho, *Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2005. **69**(4): p. 585-607.
8. Macheboeuf, P., et al., *Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes*. FEMS Microbiology Reviews, 2006. **30**(5): p. 673-91.
9. Sauvage, E., et al., *The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis*. FEMS Microbiology Reviews, 2008. **32**(2): p. 234-58.
10. Ghuysen, J.M., *Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins*. Annual Review of Microbiology, 1991. **45**: p. 37-67.
11. Foster, P.L., *Stress-Induced Mutagenesis in Bacteria*. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2007. **42**(5): p. 373–397.
12. Miller, C., et al., *SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality*. Science, 2004. **305**(5690): p. 1629-31.

13. Perez-Capilla, T., et al., *SOS-independent induction of dinB transcription by beta-lactam-mediated inhibition of cell wall synthesis in Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 2005. **187**(4): p. 1515-8.
14. Thi, T.D., et al., *Effect of recA inactivation on mutagenesis of Escherichia coli exposed to sublethal concentrations of antimicrobials*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2011. **66**: p. 531–538.
15. Kohanski, M.A., M.A.D. Pristo, and J.J. Collins, *Sub-lethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis*. Molecular Cell, 2010. **37**(3): p. 311–320.
16. Cuirolo, A., K. Plata, and A.E. Rosato, *Development of homogeneous expression of resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strains is functionally associated with a {beta}-lactam-mediated SOS response*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2009.
17. Plata, K.B., et al., *Targeting of PBP1 by b-lactams Determines recA/SOS Response Activation in Heterogeneous MRSA Clinical Strains*. PLOS ONE, 2012. **8**(4): p. e61083.
18. Hacker, J. and E. Carniel, *Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity*. EMBO reports, 2001. **2**(5): p. 376–381.
19. Maiques, E., et al., *beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology, 2006. **188**(7): p. 2726-9.
20. Dancer, S.J., *The effect of antibiotics on methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008. **61**: p. 246–253.
21. Zhang, H.Z., et al., *A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci*. Science, 2001. **291**(5510): p. 1962-5.
22. Lyon, B.R. and R. Skurray, *Antimicrobial Resistance of Staphylococcus aureus: Genetic Basis*. Microbiological Reviews, 1987. **51**(1): p. 88-134
23. Jevons, M.P., *Celbenin-resistant Staphylococci*. BMJ, 1961. **1**: p. 2.
24. Hiramatsu, K., et al., *Genomic Basis for Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus*. Infection & Chemotherapy, 2013. **45**(2): p. 117-136.

25. Chambers, H.F., *Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications*. Clinical Microbiology Reviews, 1997. **10**(4): p. 781–791
26. Ito, T. and K. Hiramatsu, *Acquisition of methicillin resistance and progression of multiantibiotic resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Yonsei Medical Journal, 1998. **39**(6): p. 526-33.
27. Chambers, H.F., *Penicillin-Binding Protein – Mediated Resistance in Pneumococci and Staphylococci*. The Journal of Infectious Diseases, 1999. **179** (Suppl 2): p. S353 – 9.
28. Katayama, Y., T. Ito, and K. Hiramatsu, *A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000. **44**(6): p. 1549-55.
29. Paterson, G.K., E.M. Harrison, and M.A. Holmes, *The emergence of mecC methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Trends in Microbiology, 2014. **22**(1): p. 42-47.
30. (IWG-SCC)\*, I.W.G.o.t.C.o.S.C.C.E., *Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009. **53**(12): p. 4961-7.
31. Katayama, Y., et al., *Jumping the Barrier to  $\beta$ -Lactam Resistance in Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology, 2003. **185**(18): p. 5465–5472.
32. Tomasz, A., S. Nachman, and H. Leaf, *Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1991. **35**(1): p. 124-9.
33. Hartman, B.J. and A. Tomasz, *Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1986. **29**(1): p. 85-92.
34. Finan, J.E., et al., *Conversion of oxacillin-resistant staphylococci from heterotypic to homotypic resistance expression*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002. **46**(1): p. 24-30.
35. CLSI, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-Fourth Informational Supplement*. CLSI document M100-S24. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute.2014.



36. CA-SFM, *Recommandations 2016*. Comité de l'Antibiogramme, [http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM2016\\_V1\\_0\\_FEV.pdf](http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM2016_V1_0_FEV.pdf); Société Française de Microbiologie.
37. Tomasz, A., et al., *New Mechanism for Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus: Clinical Isolates That Lack the PBP2a Gene and Contain Normal Penicillin binding Proteins with Modified Penicillin-Binding Capacity*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1989. **33**(11): p. 1869-1874.
38. Nadarajah, J., et al., *Identification of different clonal complexes and diverse amino acid substitutions in penicillin-binding protein 2 (PBP2) associated with borderline oxacillin resistance in Canadian Staphylococcus aureus isolates*. *Journal of Medical Microbiology*, 2006. **55**: p. 1675–1683.
39. Maalej, S.M., et al., *Analysis of Borderline Oxacillin-Resistant Staphylococcus aureus (BORSA) Strains Isolated in Tunisia*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012. **50**(10): p. 3345–3348.
40. Yoshida, R., et al., *Physiological and molecular analysis of a mecA-negative Staphylococcus aureus clinical strain that expresses heterogeneous methicillin resistance*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003. **51**: p. 247–255.
41. Banerjee, R., et al., *A mecA-Negative Strain of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus with High-Level-beta-Lactam Resistance Contains Mutations in Three Genes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010. **54**(11): p. 4900–4902
42. Ba, X., et al., *Novel mutations in penicillin-binding protein genes in clinical Staphylococcus aureus isolates that are methicillin resistant on susceptibility testing, but lack the mec gene*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2014. **69**: p. 594–597.
43. Hackbarth, C.J., et al., *Point Mutations in Staphylococcus aureus PBP 2 Gene Affect Penicillin-Binding Kinetics and Are Associated with Resistance*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995. **39**(1): p. 103-106.
44. WHO, *Antimicrobial resistance. Global report on surveillance*. World Health Organization, 2014.
45. *Resistencia a los antimicrobianos: causas, consecuencias y perspectivas en Argentina*, 2014, Servicio Antimicrobianos, Laboratorio Nacional de Referencia en Antimicrobianos,

- Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Programa Remediar. Secretaría de Promoción y Programas Sanitarios. Ministerio de Salud de la Nación: Buenos Aires, Argentina.
46. Ensinck, G.N., et al., *Infecciones de piel y partes blandas en pediatría: consenso sobre diagnóstico y tratamiento*. Archivos Argentinos de Pediatría, 2014. **112**(1): p. e96-e102.
  47. David, M.Z. and R.S. Daum, *Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic*. Clinical Microbiology Reviews, 2010. **23**(3): p. 616-87.
  48. Gregorio, S.D., et al., *Clinical, Microbiological, and Genetic Characteristics of Heteroresistant Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus Bacteremia in a Teaching Hospital*. Microbial Drug Resistance, 2015. **21**(1): p. 25-34.
  49. Gardella, N., et al., *Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus, eastern Argentina*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2008. **62**(3): p. 343-347.
  50. Sola, C., et al., *Spread of Epidemic MRSA-ST5-IV Clone Encoding PVL as a Major Cause of Community Onset Staphylococcal Infections in Argentinean Children*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e30487.
  51. Gardella, N., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains in Buenos Aires teaching hospitals: replacement of the multidrug resistant South American clone by another susceptible to rifampin, minocycline and trimethoprim-sulfamethoxazole*. Revista Argentina de Microbiología, 2005. **37**(3): p. 156-60.
  52. López Furst MJ; de Vedia L; Fernández S; Gardella N; Ganaha MC, S.P., Carbone E, Lista N, Rotryng F, Morena GI, Mollerach M and Stryjewski ME, *Prospective Multicenter Study of Community-Associated Skin and Skin Structure Infections due to Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Buenos Aires, Argentina*. Plos One, 2013.
  53. Murakami, K., et al., *Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction*. Journal of Clinical Microbiology, 1991. **29**(10): p. 2240-4.
  54. Cuny, C., et al., *Rare occurrence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus CC130 with a novel mecA homologue in humans in Germany*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24360.

55. Lina, G., et al., *Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing Staphylococcus aureus in primary skin infections and pneumonia*. Clinical Infectious Diseases, 1999. **29**(5): p. 1128-32.
56. Ito, T., et al., *Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001. **45**(5): p. 1323-36.
57. Milheirico, C., D.C. Oliveira, and H. de Lencastre, *Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007. **51**(9): p. 3374-7.
58. Harmsen, D., et al., *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, 2003. **41**(12): p. 5442-8.
59. Enright, M.C., et al., *Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology, 2000. **38**(3): p. 1008-15.
60. O'Callaghan, C.H., et al., *Novel Method for Detection of beta-Lactamases by Using a Chromogenic Cephalosporin Substrate*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1972. **1**(4): p. 283-288.
61. Keseru, J.S., et al., *Investigation of beta-Lactamases in Clinical Isolates of Staphylococcus aureus for Further Explanation of Borderline Methicillin Resistance*. Chemotherapy, 2005. **51**: p. 300-304.
62. McKinney, T.K., et al., *Transcription of the gene mediating methicillin resistance in Staphylococcus aureus (mecA) is corepressed but not coinduced by cognate mecA and beta-lactamase regulators*. Journal of Bacteriology, 2001. **183**(23): p. 6862-8.
63. Novick, R.P., *Micro-Iodometric Assay for Penicillinase*. Biochem. J., 1962. **83**: p. 236-240.
64. Pope, C.F., et al., *A Practical Guide to Measuring Mutation Rates in Antibiotic Resistance*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008. **52**(4): p. 1209–1214.
65. O'Neill, A.J., J.H. Cove, and I. Chopra, *Mutation frequencies for resistance to fusidic acid and rifampicin in Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2001. **47**(5): p. 647-50.

66. Harris-Warrick, R.M., et al., *Electrophoretic separation of Bacillus subtilis genes*. Proceedings of the National Academy of Sciences. U S A, 1975. **72**(6): p. 2207-11.
67. Struelens, M.J., et al., *Epidemiologic Typing and Delineation of Genetic Relatedness of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus by Macrorestriction Analysis of Genomic DNA by Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis*. Journal of Clinical Microbiology, 1992. **30**(10): p. 2599-2605.
68. Hallin, M., et al., *Validation of pulsed-field gel electrophoresis and spa typing for long-term, nationwide epidemiological surveillance studies of Staphylococcus aureus infections*. Journal of Clinical Microbiology, 2007. **45**(1): p. 127-33.
69. Chung, M., et al., *Molecular typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains*. Microbial Drug Resistance, 2000. **6**(3): p. 189-98.
70. Tenover, F.C., et al., *Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing*. Journal of Clinical Microbiology, 1995. **33**(9): p. 2233-9.
71. Frenay, H.M.E., et al., *Discrimination of Epidemic and Nonepidemic Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strains on the Basis of Protein A Gene Polymorphism*. Journal of Clinical Microbiology, 1994. **32**(3): p. 846-847.
72. Shopsin, B., et al., *Evaluation of Protein A Gene Polymorphic Region DNA Sequencing for Typing of Staphylococcus aureus Strains*. Journal of Clinical Microbiology, 1999. **37**(11): p. 3556-3563.
73. Fernandez, S., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST30-SCCmec IVc clone as the major cause of community-acquired invasive infections in Argentina*. Infection, Genetics and Evolution, 2013. **14**: p. 401-5.
74. McDougal, L.K. and C. Thornsberry, *The Role of beta-Lactamase in Staphylococcal Resistance to Penicillinase-Resistant Penicillins and Cephalosporins*. Journal of Clinical Microbiology, 1986. **23**(5): p. 832-839.
75. Sauvage, E. and M. Terrak, *Glycosyltransferases and Transpeptidases/Penicillin-Binding Proteins: Valuable Targets for New Antibacterials*. Antibiotics, 2016. **5**(12): p. 1.

76. Galleni, M., et al., *A new, highly sensitive method for the detection and quantification of penicillin-binding proteins*. *Biochemical Journal*, 1993. **291 ( Pt 1)**: p. 19-21.