



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

Tesis para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires

Aspectos epidemiológicos y moleculares
implicados en la sensibilidad disminuida a la
vancomicina en *Staphylococcus aureus*

Bioq. Sabrina Noelia Di Gregorio

Director: Dra. Marta Mollerach

Co director: Dra. Ángela Famiglietti

2014

Los resultados del presente trabajo de tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:

Artículos:

- “Clinical, microbiological and genetic characteristics of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* bacteremia in a teaching hospital”. **Sabrina Di Gregorio**, Beatriz Perazzi, Andrea Martínez Ordoñez, Stella De Gregorio, Monica Foccoli, María B Lasala, Susana García, Carlos Vay, Angela Famiglietti y Marta Mollerach. Microbial Drug Resistance. 2014. MDR-2014-0190.R2.

Congresos internacionales:

- Increased IS256 Transposition Associated with Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus* Mutants. **S. Di Gregorio**, A. Cuirolo, S. Fernandez, O. Verlaine, A. Amoroso, A. Famiglietti, B. Joris, M. Mollerach. 53rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). 2013. Denver, USA. Póster
- Persistent and recurrent bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*: Clinical, microbiological and molecular analysis. B. Perazzi, **S. Di Gregorio**, S. de Gregorio, A. Martínez Ordoñez, N. Bello, M. Foccoli, S. García, C. Vay, M. Lasala, M. Mollerach, A. Famiglietti. 53rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). 2013. Denver, USA. Póster.
- Implication of peptidoglycan structure in methicillin resistance and vancomycin reduced susceptibility in *Staphylococcus aureus*. **Di Gregorio S**, Cuirolo A, Gardella N, Fernandez S, Verlaine O, Famiglietti, A, Amoroso A, Joris B, Mollerach M. Puentes 2013: Jornada de Conferencias Científicas. Presentación de la Red de Científicos Argentinos en Bélgica y Luxemburgo – RCABL. Bélgica. 17/05/2013. Póster.
- Caracterización de mutantes de *Staphylococcus aureus* con sensibilidad disminuida a vancomicina. **S. Di Gregorio**, A. Cuirolo, N. Gardella, S. Fernández, A. Famiglietti, M. Mollerach. Tercer Congreso Colombiano de Microbiología. Medellín. Colombia. 2012. Póster.
- Methicillin resistance and Vancomycin reduced susceptibility in *Staphylococcus aureus*: a hidden link? **S. Di Gregorio**, A. Cuirolo, N. Gardella, S. Fernández, A. Famiglietti, A. Amoroso, B. Joris, M. Mollerach. 6th International Conference on Gram-Positive Microorganisms. 2011. Toscana, Italia. Póster.

- *Staphylococcus aureus* con sensibilidad disminuida a vancomicina: Caracterización de dos aislamientos clínicos isogénicos. **Di Gregorio, S.**; Cuirolo, A.; Gardella, N.; Perazzi, B.; Famiglietti, A.; Mollerach, M. XX Congreso Latinoamericano de Microbiología. 2010. Montevideo, Uruguay. **Presentación oral.**

Congresos nacionales:

- *Staphylococcus aureus* con resistencia heterogénea a vancomicina (hVISA): Aumento de la transposición en un aislamiento seleccionado in vivo. **Di Gregorio S.**, Perazzi B., Famiglietti A., Mollerach M. XIV Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Infectología SADI. Rosario. 2014. **Presentación oral.**
- Detección de heteroresistencia a vancomicina en bacteriemias por *Staphylococcus aureus*. **S. Di Gregorio**, B Perazzi, A Martínez Ordoñez, CH Rodríguez, C Barberis, C Vay, M Mollerach, A Famiglietti. 157° Jornada Científica: “Resistencia bacteriana y uso racional de los antibióticos”. Buenos Aires. 15/8/2013. Póster. **Accesit.**
- Evaluación de diferentes metodologías para detectar VISA y hVISA en infecciones invasivas por *Staphylococcus aureus* en un Hospital universitario. **Di Gregorio, S.**; Perazzi, B.; Martínez Ordoñez, A.; Rodríguez, CH.; Barberis, C.; Vay, C.; Famiglietti, A.; Mollerach, M. VII Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas. 26-29/06/2012. Buenos Aires. **Presentación oral.**
- Análisis molecular de las bacteriemias persistentes y recurrentes por *Staphylococcus aureus*. Perazzi, B.; **Di Gregorio, S.**; de Gregorio, S.; Martínez Ordoñez, A.; Bello, N.; Foccoli, M.; García, S.; Vay, C.; Lasala, M.; Famiglietti, A.; Mollerach, M. VII Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas. 26-29/06/2012. Buenos Aires. **Presentación oral. Mención especial.**
- *Staphylococcus aureus* y fracaso terapéutico a vancomicina: ¿Emergencia de cepas con sensibilidad disminuída en Argentina? **Di Gregorio, S.**; Perazzi, B.; Cuirolo, A.; Gardella, N.; Vay, C.; Famiglietti, A.; Mollerach, M. XII Congreso Argentino de Microbiología. 2010. Buenos Aires. Póster.

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo significó para mí un crecimiento académico, profesional, pero por sobre todo personal. A lo largo de todos estos años aprendí que un trabajo de investigación es el resultado del esfuerzo de muchos; y el trabajo en equipo, el compañerismo y la solidaridad son importantísimos. Son muchas las personas que de alguna u otra forma contribuyeron, y por eso quisiera darles las gracias:

A mis directoras de tesis, Marta y Lina, que confiaron en mí y me dieron la oportunidad de trabajar con ellas, me enseñaron a desenvolverme en el ambiente académico y científico, y me apoyaron todo este tiempo, siempre con la mejor predisposición ante cualquier cosa que necesitara.

A la Dra. Noella Gardella y la Dra. Arabela Cuirolo, que aunque ya no trabajen en el laboratorio, fueron quienes me enseñaron a dar mis primeros pasos en la mesada de microbiología.

A Andrea Martínez, la Dra. Beatriz Perazzi, y todos los profesionales de Bacteriología del Hospital de Clínicas José de San Martín, junto con quienes realizamos algunos experimentos allí, entre sus tareas asistenciales, y sin cuya participación este trabajo hubiera sido imposible.

Al Dr. Bernard Joris, Dra. Ana Amoroso, Dra. Arabela Cuirolo, y Olivier Verlaine del Centro de Ingeniería de Proteínas de la Universidad de Lieja (Bélgica), que me recibieron en su laboratorio, y en una “melange” de 3 idiomas me enseñaron y ayudaron con mis experimentos.

A Mary Cruz y Flor, las técnicas del cepario, porque sin ellas, el trabajo de cada día sería muchísimo más difícil.

A mis compañeras del cepario, “las chicas del fondo”, Marian, Meli, Dani, Barbi, Gio, Marylú, Aleja, con quienes compartimos experimentos, mates, charlas (muuuuchas charlas ☺), salidas y hasta vacaciones; y especialmente Silvi, mi compañera “coca” que a la par me acompañó y me pasó parte de su templanza (solo para entendidos). A los integrantes más nuevos, Vero, Alan, Barby A., Lucía, Sol, Belén, Gaby W. y Gaby D. que en esta última etapa también estuvieron presentes.

A los integrantes más antiguos del laboratorio, Gabriel, Marcela, José, Pablo, Magui, y Laura por transmitirme toda su experiencia y siempre estar dispuestos a conversar y ayudar en lo que fuera. A todos aquellos integrantes de otras cátedras de la facultad (Biotecnología, Farmacología, Virología) por su solidaridad para cuando nuestros experimentos los necesitaran.

A mi familia por su apoyo incondicional todos estos años, sea cual fuere el camino que quisiera seguir, y a Ale por haberme acompañado en este último tiempo, el de final y escritura de tesis, con lo difícil y estresante que eso puede ser, con toda la paciencia, amor y comprensión posibles.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS	15
INTRODUCCIÓN	19
<i>Staphylococcus aureus</i> : Características microbiológicas.....	19
La pared celular de <i>Staphylococcus aureus</i>	19
Síntesis de la pared celular	21
Proteínas de unión a penicilina (PBPs)	21
Peptidoglicano hidrolasas.....	23
Regulación de la síntesis y metabolismo del peptidoglicano.....	24
El locus <i>agr</i>	25
<i>Staphylococcus aureus</i> : Importancia clínica	27
Evolución de la resistencia a antibióticos en <i>Staphylococcus aureus</i>	27
Plasticidad genómica de <i>Staphylococcus aureus</i>	29
El SCC <i>mec</i> en <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente.....	30
Epidemiología de las infecciones por <i>Staphylococcus aureus</i>	33
Epidemiología molecular para el estudio de SAMR	34
Vancomicina	35
<i>Staphylococcus aureus</i> con sensibilidad disminuída a vancomicina	37
Detección de cepas VISA y hVISA en el laboratorio	38
Mecanismo implicado en la disminución de la sensibilidad a vancomicina en <i>Staphylococcus aureus</i>	39
Antibióticos utilizados para el tratamiento de infecciones por hVISA/VISA.....	40
Hipótesis y justificación del estudio	42
OBJETIVOS	45
MATERIALES Y MÉTODOS	49
1. Microorganismos	49

1.1 Microorganismos utilizados para el estudio epidemiológico de la sensibilidad disminuida a vancomicina.....	49
1.2 Microorganismos utilizados para el estudio de las bases moleculares implicadas en la susceptibilidad disminuida a vancomicina en cepas VISA y hVISA.....	49
1.3 Microorganismos utilizados como control.....	49
2. Medios y condiciones de cultivo.....	51
3. Técnicas utilizadas para el estudio de la sensibilidad a antibióticos.....	51
3.1 Concentración inhibitoria mínima (CIM).....	51
3.2 Ensayo por Difusión en agar, D-Test.....	51
3.3 Métodos de “screening” utilizados para la detección de la heteroresistencia a vancomicina	52
3.4. Análisis poblacional	53
4. Estudio de la estabilidad del fenotipo hVISA/VISA	53
5. Técnicas utilizadas para el estudio del ADN	54
5.1 Extracción de ADN.....	54
5.2 Genotipificación.....	54
5.3 Electroforesis en gel de agarosa	56
5.4 Electroforesis en geles por campo pulsado (PFGE)	56
5.5 Southern blot.....	56
5.6 Métodos y herramientas para el análisis de secuencias.....	57
6. Técnicas utilizadas para el estudio del ARN	57
6.1 Extracción de ARN	57
6.2 Retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RTqPCR).....	57
7. Selección de mutantes con sensibilidad disminuida a vancomicina	58
8. Análisis de la morfología bacteriana y del grosor de la pared mediante microscopía electrónica de transmisión (MET).....	59
9. Análisis del peptidoglicano	59
10. Extracción de proteínas de membrana y análisis de las PBPs.....	59

11. Estudio del sistema autolítico	60
Curvas de crecimiento y ensayos de autólisis.....	60
Extracción de proteínas totales.....	60
Zimogramas.....	60
12. Evaluación de la funcionalidad del locus <i>agr</i>	61
13. Análisis de la frecuencia mutacional	61
14. Análisis estadístico de los datos.....	62
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	65
CAPÍTULO 1: Sensibilidad disminuída a vancomicina en bacteriemias por <i>Staphylococcus aureus</i>.....	65
1.1 Evaluación de las bacteriemias por <i>Staphylococcus aureus</i> : sensibilidad a antibióticos y genotipos 65	
1.2 Metodologías para detección de hVISA. Prevalencia de hVISA y VISA en bacteriemias.....	68
1.3 Aislamientos hVISA y su asociación con bacteriemias recurrentes/persistentes	71
1.4 Caracterización genotípica de los hVISA y probables hVISA	73
DISCUSIÓN	75
CAPÍTULO 2: Aproximaciones al conocimiento de las bases moleculares implicadas en la sensibilidad disminuída a la vancomicina en <i>Staphylococcus aureus</i>.....	79
Caso Clínico	79
Selección de mutantes con mayor resistencia a vancomicina	79
2.1 Sensibilidad a los antibióticos de D1, D2 y mutantes D23C9 y D2P11.....	80
Estabilidad del fenotipo hVISA/VISA en D2 y los mutantes seleccionados.....	81
2.2 Caracterización genotípica.....	82
2.3 La pared celular y el metabolismo del peptidoglicano.....	84
Grosor de la pared celular.....	84
Análisis comparativo de la composición del peptidoglicano.....	85
Perfil de Proteínas de membrana y perfil de PBPs	88

Análisis de la expresión de genes codificantes de PBPs	90
Ensayos de autólisis	91
Perfil de peptidoglicano hidrolasas	93
2.4 Eventos genéticos relacionados con el desarrollo del fenotipo hVISA/VISA.....	93
Mutaciones asociadas a modificaciones en la sensibilidad a Vancomicina	93
Análisis de la frecuencia mutacional	94
Movilización de IS256 en cepas clínicas y sus mutantes.....	95
Análisis de la expresión del gen codificante de la transposasa de IS256.....	96
La funcionalidad del locus <i>agr</i> en cepas hVISA y VISA isogénicas	97
DISCUSIÓN.....	98
CONCLUSIONES	107
CAPÍTULO 1: Sensibilidad disminuída a vancomicina en bacteriemias por <i>Staphylococcus aureus</i> .	107
CAPÍTULO 2: Aproximaciones al conocimiento de las bases moleculares implicadas en la sensibilidad disminuída a la vancomicina en <i>Staphylococcus aureus</i>	108
RESUMEN.....	113
ANEXOS	117
ANEXO 1: REACCIONES DE PCR UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO	117
ANEXO 2: OTROS PROTOCOLOS.....	134
BIBLIOGRAFÍA	153

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transferencia
ATCC	“American Type Culture Collection”
pb	Pares de bases
BHIA	“Brain Heart infusion agar”, agar cerebro corazón
BHIV3	BHIA con 3 µg/ml de VAN
BHIV4	BHIA con 4 µg/ml de VAN
BHIV5	BHIA con 5 µg/ml de VAN
BHIV6	BHIA con 6 µg/ml de VAN
CC	Complejo clonal
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CLSI	“Clinical and Laboratory Standards Institute”
Cq	Ciclo de cuantificación
Csp	Cantidad suficiente para
dNTPs	deoxiribonucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético
hVISA	<i>S. aureus</i> heteroresistente a vancomicina
kDa	Kilo Daltons
LPV	Leucocidina de Panton-Valentine
MHA	Mueller Hinton Agar
MHAT5	MHA con 5 µg/ml de TEI
MLST	“Multilocus sequence typing”, Tipificación por secuenciación de múltiples <i>loci</i>
NAcGln	N-Acetilglucosamina
NAcMur	N-Acilmurámico
NARSA	“Network on antimicrobial resistance in <i>Staphylococcus aureus</i> ”

NC	No corresponde
NRQ	“Normalized relative quantity”, Cantidad relativa normalizada
ON	“Overnight”
OXA	Oxacilina
PAP-AUC	“Population Analysis Profile, Area Under the Curve”
PBP	Proteína de unión a penicilina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en geles por campo pulsado
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
Rpm	Revoluciones por minuto
RRDR	Región determinante de resistencia a rifampicina del gen <i>rpoB</i>
RTqPCR	Retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
SAMR	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
SAMR-C	SAMR asociado a la comunidad
SAMR-H	SAMR asociado al ambiente hospitalario
SAMS	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a meticilina
SCC_{mec}	“Staphylococcal Chromosomal Cassette <i>mec</i> ”
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
ST	Secuenciotipo
TAE	Buffer Tris 40 mM, Ácido Acético 20 mM, EDTA 1 mM, pH = 8,00
TBE	Buffer Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH = 8,30
TE	Buffer Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH = 8,00
TEI	Teicoplanina
TES	Buffer Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH = 8,00, Sacarosa 50%
Tris	Buffer Tris: (hidroximetil) aminometano
UDP-NAcGln-fosfato	Uridin difosfato-NAcGln-fosfato
UDP-NAcMur-fosfato	Uridin difosfato-NAcMur-fosfato
UV	Ultravioleta
UFC/ml	Unidades formadoras de colonias por mililitro
VAN	Vancomicina
VISA	<i>S. aureus</i> con sensibilidad intermedia a VAN
VRSA	<i>S. aureus</i> con resistencia a VAN

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

***Staphylococcus aureus*: Características microbiológicas**

Staphylococcus aureus es un coco Gram positivo anaerobio facultativo, perteneciente a la familia *Staphylococcaceae*. Dentro de esta familia se encuentran agrupadas bacterias pertenecientes a los géneros: *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Jeotgaliococcus*, *Salinicoccus*, y *Nosocomiicoccus* (98).

Dentro del género *Staphylococcus* la especie que más frecuentemente se asocia con los seres humanos es *Staphylococcus aureus* (coagulasa positivo) y algunas especies de estafilococos coagulasa negativos (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus capitis* y *Staphylococcus haemolyticus*, entre otros) (43). En la observación microscópica se presentan formando tétradas o “racimos de uvas”, característica que le da el nombre al género (del griego “*staphylé*”); y esta se debe a que al dividirse, lo hacen en 3 planos ortogonales.

Las bacterias de la especie *S. aureus* son anaerobias facultativas, inmóviles, no esporuladas, fermentan manitol, toleran altas concentraciones de sal, son catalasa, coagulasa y DNAsa positivas, y además sensibles a novobiocina (98).

Por lo general no tienen exigencias nutricionales y pueden desarrollar en una gran variedad de medios de cultivos, dando colonias pequeñas, de color amarillo claro o blanco y la mayoría de las veces presentan hemólisis en agar sangre.

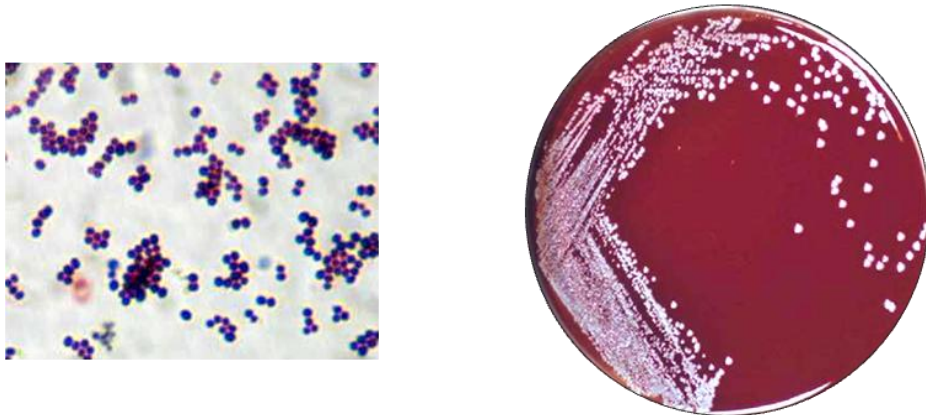


Fig. A. Tinción de Gram y aislamiento en agar sangre de un cultivo de *S. aureus*.

La pared celular de *Staphylococcus aureus*

La membrana plasmática en las bacterias Gram positivas está rodeada por la pared celular, una estructura importante para mantener la integridad y forma bacteriana, soporte de la presión osmótica

interna, pero así también lo suficientemente dinámica como para reestructurarse durante el crecimiento y la división celular. Ha sido implicada además en la interacción patógeno-hospedador, debido a que muropéptidos y diversas proteínas asociadas a la pared interaccionan con el sistema inmune. La pared celular está compuesta mayormente por peptidoglicano altamente entrecruzado, y está generalmente rodeada por una cápsula polisacárida.

El peptidoglicano es un heteropolímero formado por cadenas glucosídicas unidas por puentes peptídicos. Las cadenas glucosídicas alternan los aminoazúcares N-Acetilglucosamina (NAcGln) y N-Acilmurámico (NAcMur). Unido al grupo carboxilo de cada molécula de NAcMur hay un pentapéptido por lo general conformado de la siguiente manera: L-Ala-D-iso-Gln-Lys-D-Ala-D-Ala. En *S. aureus* un puente de 5 glicinas, que es específico de esta especie, conecta el grupo ϵ amino de la L-Lys de un pentapéptido con la penúltima D-Ala de otro. Estos puentes de pentaglicina son los responsables del entrecruzamiento de las cadenas de peptidoglicano (Fig. B). La capa de peptidoglicano tiene un grosor de entre 20 y 40 nm, y 80 a 90 % de los pentapéptidos están entrecruzados (44).

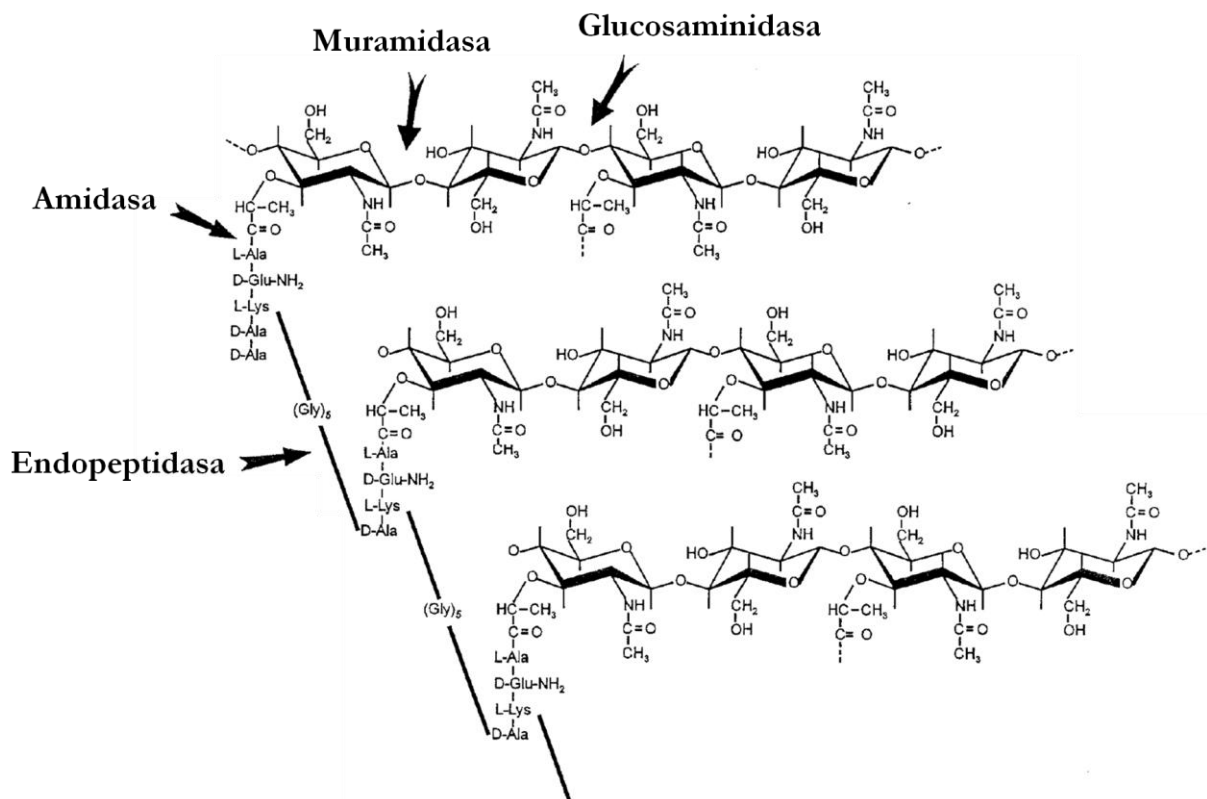


Fig. B. Estructura del peptidoglicano y blancos moleculares de los distintos tipos de peptidoglicano hidrolasas presentes en *S. aureus*. Adaptado de Giesbrecht y colaboradores (44).

Asociadas al peptidoglicano se encuentran además proteínas y otras moléculas, como los ácidos teicoicos y lipoteicoicos. Los ácidos teicoicos son polímeros de glicerolfosfato (ribitol) que se unen al peptidoglicano covalentemente, pueden tener D-Ala o NAcGln en su extremo y son responsables de otorgar carga negativa a la célula. Los ácidos lipoteicoicos son polímeros de glicerol fosfato unidos a un glicolípido que se ancla a la membrana plasmática.

Síntesis de la pared celular

La síntesis de la pared celular involucra distintas etapas (Fig. C). La primera, ocurre en el citoplasma e implica la síntesis de precursores activados (UDP-NAcGln-fosfato y UDP-NAcMur-pentapéptido-fosfato).

En una segunda etapa, que ocurre en la cara citoplasmática de la membrana celular, los precursores son transferidos al aceptor bactoprenol (una molécula lipofílica) para formar el lípido II que contiene al disacárido pentapéptido. Posteriormente se adicionan las 5 glicinas al disacárido pentapéptido y el bactoprenol permite la translocación de los precursores desde el citoplasma hacia el lado externo de la membrana.

La última etapa en la síntesis de peptidoglicano involucra la incorporación de los disacáridos pentapéptidos a las cadenas de peptidoglicano ya formadas en el espacio extracelular, mediante las reacciones de transglicosilación y transpeptidación. Las cadenas disacarídicas se alargan por reacciones de transglicosilación: se une NAcGln de una cadena con NAcMur del disacárido pentapéptido. Posteriormente, mediante reacciones de transpeptidación se realiza el entrecruzamiento de las cadenas: se une el penúltimo D-Ala de un pentapéptido a la glicina del puente de 5 Gly de otro y se elimina el último D-Ala libre del péptido por carboxipeptidación (122).

Las distintas etapas de la síntesis de peptidoglicano, así como también su remodelamiento, están altamente coordinados gracias al accionar de diversos genes y sus productos enzimáticos, algunos de los cuales son estudiados en esta tesis.

Proteínas de unión a penicilina (PBPs)

Las proteínas de unión a penicilina o PBPs (del inglés “penicillin binding proteins”) son proteínas asociadas a la membrana plasmática que catalizan la última etapa en la síntesis de pared

celular. Son las encargadas de realizar las reacciones de transglicosilación, transpeptidación y carboxipeptidación. De acuerdo a su peso molecular se clasifican en PBP's de alto peso molecular y PBP's de bajo peso molecular.

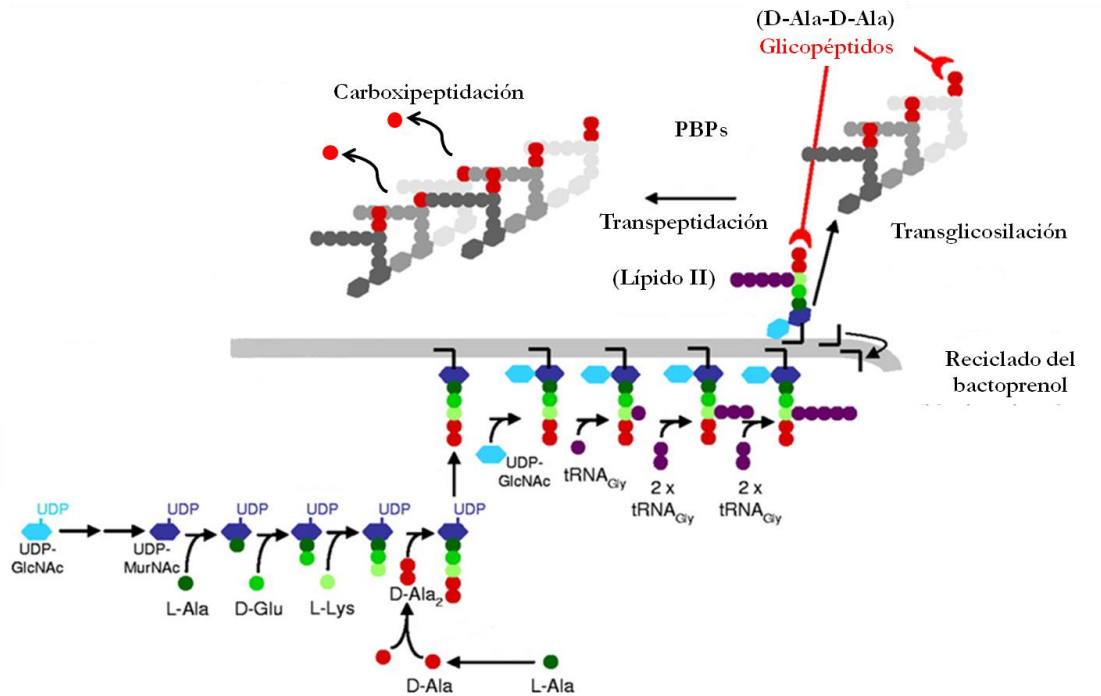


Fig. C. Esquema que muestra las distintas etapas en la síntesis del peptidoglicano. Adaptado de McCallum y colaboradores (88).

En *S. aureus* se encuentran 4 PBP's, denominadas PBP1 (85 kDa), PBP2 (81 kDa) y PBP3 (75 kDa), de alto peso molecular; y PBP4 de bajo peso molecular (45 kDa). Cada una de ellas tiene funciones específicas. PBP1 es esencial para la división y separación celular, tiene función transpeptidasa pero no pareciera cumplir un rol crucial en el entrecruzamiento del peptidoglicano (105, 106, 148). PBP2 también juega un rol esencial en el crecimiento bacteriano, es la única PBP bifuncional de *S. aureus* ya que posee un dominio transpeptidasa (TPasa) y un dominio transglicosilasa (TGasa) (139). Por otro lado, PBP3 posee función transpeptidasa, no pareciera ser esencial para la síntesis de peptidoglicano, pero se ha visto que mutantes defectivas presentan formas y tamaños celulares aberrantes (108). PBP4 es la única PBP de bajo peso molecular en *S. aureus* y posee actividad transpeptidasa y carboxipeptidasa siendo responsable del entrecruzamiento de peptidoglicano (90).

Peptidoglicano hidrolasas

Las peptidoglicano hidrolasas son un conjunto de enzimas con actividad hidrolítica sobre la pared bacteriana, encargadas del metabolismo del peptidoglicano durante el crecimiento bacteriano. Estas enzimas, con diferentes especificidades juegan un importante papel en la fisiología bacteriana. Un aspecto importante, que en muchos casos no ha sido suficientemente explorado es su regulación, dado que potencialmente pueden degradar completamente la pared y causar la lisis celular, por ello han sido denominadas autolisinas. Desempeñan roles importantes en el recambio y reciclaje de muropéptidos, en la separación celular y la lisis inducida por inhibidores de la síntesis de la pared celular. Además, se les ha asociado con el estado de competencia y la transformación génica, la formación de flagelos, esporulación y patogénesis.

S. aureus tiene distintos tipos de peptidoglicano hidrolasas: N-Acetil glucosaminidasas, N-Acetil muramidasa, endopeptidasas y amidasas (Fig. B) y existen diversos genes que las codifican, dentro de los cuales los más relevantes son *atl*, *sle1*, *lytM*, *lytH*, *lytA*, y *lytN*.

Atl (138 kDa) es la autolisina mayoritaria en esta especie, y posee dos dominios, uno con actividad N-acetilmuramil-L-alanina-amidasa (AM), y otro con actividad N-acetilglucosaminidasa (GL) que son separados posterior al clivaje proteolítico dando dos proteínas de 62 y 51 kDa (AM y GL respectivamente). Estas proteínas han sido involucradas en la separación celular, recambio de peptidoglicano y lisis inducida por antibióticos (4).

Sle1, es una proteína de 32 kDa con actividad N-acetilmuramil-L-alanina amidasa relacionada con la separación celular de las células en división (66). Otras autolisinas importantes son LytM (una glicil-glicino-endopeptidasa de 32 kDa) con rol importante en el crecimiento celular y LytH, LytA, y LytN (33, 50, y 46 kDa respectivamente) que tienen actividad N-acetilmuramil-L-alanina amidasa.

Las actividades y expresión de las autolisinas están finamente reguladas y se ha demostrado que el sistema autolítico de *S. aureus* es reprimido al alterar la síntesis de la pared celular con antibióticos β -lactámicos (4). Paradójicamente, ninguna de ellas pareciera ser esencial para el crecimiento bacteriano, dado que se han reportado mutantes dobles *atl/sle1* que continúan creciendo pero cuyas células no se separan (66). Probablemente esto se deba a la multiplicidad de proteínas de este tipo que cumplen funciones redundantes en *S. aureus*.

Regulación de la síntesis y metabolismo del peptidoglicano

En el genoma de *S. aureus* existen diversos genes codificantes de sistemas de dos componentes. Estas estructuras genéticas por lo general están compuestas por un gen que codifica para una proteína de membrana, sensor de tipo histidino-kinasa y otro gen que codifica para una proteína reguladora. Muchos de estos sistemas de dos componentes están involucrados en la regulación de factores de virulencia (*agr*, *arRS*, *srrAB*), autólisis (*lytSR*), y síntesis de la pared celular (*vraSR*, *walKR*, *graXRS*) actuando en respuesta a diversos estímulos ambientales y situaciones de estrés celular.

El operón *vraSR*: Este operón debe su nombre a que es inducido por vancomicina (del inglés “*vancomycin resistance associated*”) pero también por otros antibióticos que actúan a nivel de la pared celular (como los β -lactámicos), o que perturban la membrana plasmática (como la daptomicina). El sistema de dos componentes está compuesto por los genes *vraS* y *vraR*. *VraS* responde al estrés en la pared celular autofosforilándose y fosforilando subsecuentemente a *VraR*. *VraR* posteriormente se une a su propio promotor, amplificando la señal, y a los promotores de los genes que regula para activar o reprimir su transcripción. Dentro de los genes regulados por el operón *vraSR* se encuentran aquellos involucrados en la síntesis de pared celular o “cell wall stimulon”. Entre ellos podemos nombrar a los genes codificantes de PBP2 (encargada de la transpeptidación y transglicosilación), *MurZ* (una UDP-Acetilglucosamina enolpiruvato transferasa), *SgtB* (una transglicosilasa monofuncional), y *FmtC* (proteína relacionada con la autólisis y la metilino resistencia) (76). Las evidencias experimentales indican que el operón al ser activado, previene contra el daño en las envolturas celulares, aumentando la síntesis de la pared celular. Por ejemplo, sistema *VraSR* induce la expresión del gen *pbp2* en presencia de β -lactámicos o vancomicina. Sin embargo, pareciera que *pbp2* estaría regulado además por una vía alternativa e independiente aún no descripta hasta el momento (155).

Corriente arriba (o “upstream”) al gen *vraS* se encuentran dos genes más formando parte del operón, llamados *vraT* (o *yvqF*) y *vraU*. El gen *vraT* codifica para una proteína de membrana y recientemente se ha propuesto que actuaría sensando el estrés en la pared celular junto con *vraS* y *vraR* dando lugar a un sistema de 3 componentes (*vraTSR*). *VraT* sería necesaria para la activación del operón y la expresión de la resistencia a antibióticos activos sobre la pared celular (12, 88).

El operón *walKR*: El operón *walKR* (alternativamente llamado *yvfFG*) es también un sistema de dos componentes, en el cual *WalK* es la proteína sensor histidino-kinasa, y *WalR* la proteína reguladora. Se encuentra altamente conservado en diferentes especies (*S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pyogenes*), y a diferencia de otros sistemas de

dos componentes, resulta esencial para la viabilidad celular. Sin embargo, la organización estructural de este operón varía notablemente entre estas especies. En *S. aureus*, corriente abajo (o “downstream”) a los genes *walK* y *walR* se encuentran además los genes *yycH*, *yycI*, e *yycJ*.

Si bien hay gran variedad de genes regulados por este operón (relacionados con el estrés oxidativo y virulencia), su rol más significativo es el de la regulación de diversos genes del metabolismo y síntesis de la pared celular (de ahí su nombre “*wal*”, derivado del inglés “cell wall”). Entre estos genes se encuentran los codificantes de las autolisinas Atl, LytM y Sle1, y las transglicosilasas líticas IsaA y SceD (25, 26, 28).

El operón *graXRS*: Así como el operón *vraSR*, el operón *graXRS* debe su nombre a que fue asociado con la resistencia a glicopéptidos (del inglés “glycopeptide resistance associated”), dado que se vio aumentada su expresión en cepas con sensibilidad disminuida a vancomicina. GraS es la proteína sensor histidino-kinasa, GraR la reguladora, y GraX una proteína de función aún desconocida pero que se ha visto desempeña una función importante en la resistencia a péptidos antimicrobianos catiónicos (respuesta inmune innata del hospedador) (32).

Cuando este sistema se activa aumenta la expresión de genes determinantes de la carga neta positiva de la célula (el gen *mprF* y el operón *dlt*) evitando la unión de los péptidos catiónicos. El gen *mprF* se encarga de adicionar L-Lys a los fosfolípidos de membrana, y *dlt* de agregar D-Ala a los ácidos teicoicos. Asimismo, controla genes implicados en el metabolismo de la pared celular como *ssaA* (una amidasa), o el operón *tarM* (encargado de la glicosilación de los ácidos teicoicos) (33).

El locus *agr*

El locus *agr* (accessory gene regulator) es un sistema de “quórum sensing” que regula positivamente la transcripción de genes codificantes de proteínas extracelulares (exotoxinas) y negativamente la transcripción de genes codificantes de proteínas de superficie (adhesinas) durante la transición de fase exponencial a fase estacionaria del crecimiento bacteriano.

Este locus consiste en dos unidades divergentes de transcripción, dadas por los promotores P2 (RNAII) y P3 (RNAIII). El promotor P2 controla la expresión de un operón formado por 4 genes: *agrA*, *agrB*, *agrC* y *agrD*, que codifican un sistema de dos componentes (*AgrC* es el sensor y *AgrA* el regulador) y dos proteínas (*AgrB* y *AgrD*) en conjunto encargadas de producir y secretar un péptido autoinductor (AIP). Durante el crecimiento bacteriano, AIP se acumula en el ambiente extracelular y

al alcanzar una concentración umbral (“quórum sensing”) activa al sistema de dos componentes al unirse a AgrC, que luego activa a AgrA. La activación de AgrA produce la activación de la transcripción de su propio promotor (P2) amplificando la señal, y además de P3, que dirige la síntesis de RNAIII. RNA III es el efector encargado de la regulación de diversos genes (codificantes de adhesinas y exotoxinas), y codifica además para una δ -hemolisina (Fig. D) (140).

La producción de la δ -hemolisina puede entonces ser utilizada como marcador de la funcionalidad de este sistema. Se ha relacionado además, la pérdida de funcionalidad del locus *agr* con la habilidad para dar infecciones persistentes y la baja actividad hemolítica que poseen algunas cepas de *S. aureus* con sensibilidad disminuida a vancomicina (118).

El péptido AIP producido por una cepa de *S. aureus* determinada activa a su propio locus *agr* pero inhibe la expresión del locus *agr* de otras cepas, lo que podría estar relacionado con la lucha por la colonización de los sitios de infección. Este fenómeno se debe a polimorfismos en las secuencias de los genes *agrD*, la región codificante del extremo C-terminal en *agrB* y la región codificante del extremo N-terminal en *agrC* dando lugar a la clasificación en 4 grupos de *agr*, utilizada hoy día para la genotipificación de aislamientos de *S. aureus* (45).

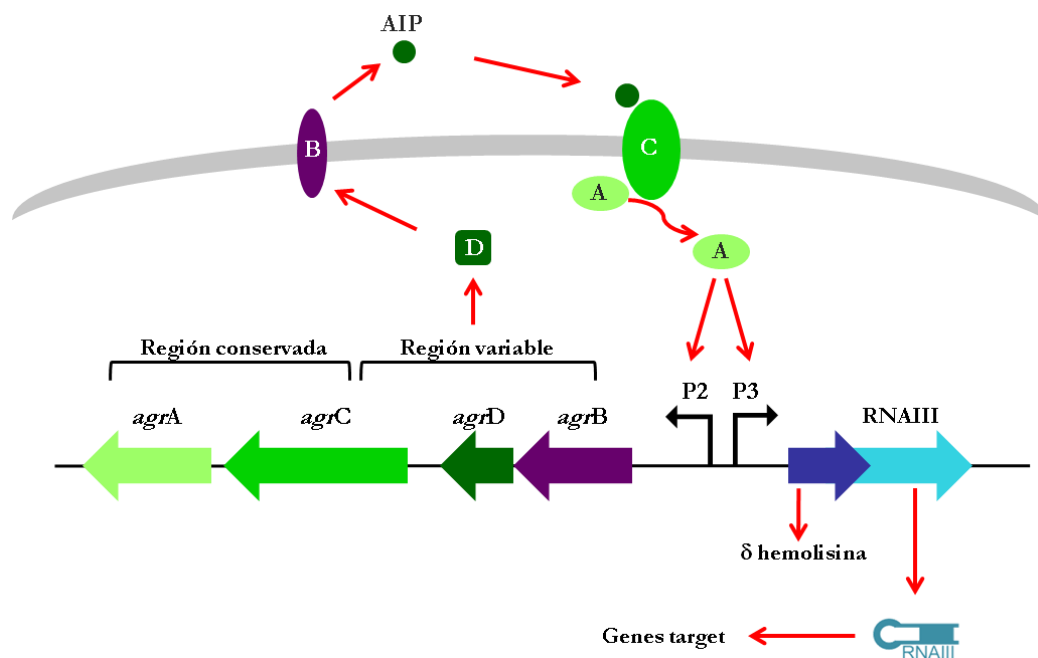


Fig. D. Esquema del locus *agr* y su funcionamiento. Adaptado de Traber y colaboradores (140).

***Staphylococcus aureus*: Importancia clínica**

S. aureus es un patógeno oportunista que causa enfermedad en el hombre y en los animales. A nivel mundial, es uno de los microorganismos más frecuentemente aislados tanto en infecciones nosocomiales como adquiridas en la comunidad, y las infecciones que causa han sido relacionadas con una alta morbilidad y mortalidad. Esto se debe a su habilidad para colonizar el huésped humano, a la presencia y expresión de importantes factores de virulencia, y a su capacidad de desarrollar resistencia a diversos antimicrobianos (21).

Puede producir diversas patologías con distinto grado de gravedad. Se aísla de infecciones de piel y partes blandas (forúnculos, celulitis, impétigo) mayormente en la comunidad, y puede ser aislado de infecciones de heridas quirúrgicas (superficiales o profundas). Sin embargo, este microorganismo llega a producir infecciones más severas tales como bacteriemias, endocarditis, osteomielitis, meningitis, neumonías y síndrome de shock tóxico. Las bacteriemias pueden estar relacionadas con el uso de catéteres y otros procedimientos invasivos. En otros casos, el foco originario de una bacteriemia puede estar relacionado con infecciones de piel y partes blandas, y menos frecuentemente con infecciones del aparato respiratorio. Las bacteriemias por *S. aureus* muchas veces son persistentes, con la concomitante extensión de los tratamientos antimicrobianos. Las infecciones metastásicas y endocarditis son complicaciones frecuentes. *S. aureus* además puede ser causante de intoxicaciones alimentarias, debido a la ingestión de la enterotoxina B producida por cepas toxigénicas.

Evolución de la resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus*

Los antibióticos de elección para el tratamiento de las infecciones por *S. aureus* son los antibióticos β -lactámicos como las penicilinas (en cepas no productoras de penicilinas), y oxazolilpenicilinas, meticilina o cefalosporinas de primera generación (en cepas resistentes a penicilinas que no presentan resistencia a meticilina/oxacilina). Estos agentes actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular al unirse irreversiblemente a las proteínas de unión a penicilina (PBPs), encargadas de las reacciones de transglicosilación y transpeptidación necesarias para la síntesis de la pared celular. Inicialmente *S. aureus* presentaba sensibilidad a estos antibióticos, pero poco tiempo después de que la penicilina fuera introducida en el mercado en la década del 40', emergieron las primeras cepas resistentes. La resistencia a penicilina en estos microorganismos se debe a la adquisición de un plásmido que contiene el gen *blaZ*, que codifica una penicilinasasa que degrada a

todas las penicilinas (penicilinas, aminopenicilinas y acilureidopenicilinas). Actualmente alrededor del 90% de los aislamientos son resistentes a la penicilina. Esta penicilinas es inhibida por los inhibidores de beta-lactamasas (IBL) tales como sulbactam, ácido clavulánico y tazobactam, siendo de gran utilidad clínica el uso combinado de aminopenicilinas más IBL (ampicilina:sulbactam, amoxicilina:ácido clavulánico, amoxicilina:sulbactam y piperacilina:tazobactam) en los aislamientos penicilino-resistentes-meticilino-sensibles.

Posteriormente, comenzaron a utilizarse β -lactámicos resistentes a la acción de las penicilinasas elaboradas por los estafilococos como meticilina y oxacilina, pero poco tiempo después, ocurrió la emergencia de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina/oxacilina (SAMR/SAOR). Resistencia de tipo cromosómica mediada por el gen *mecA* que determina la resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos, excepto a ceftarolina. Si bien inicialmente este problema se limitaba casi exclusivamente al ambiente hospitalario (SAMR-H), en los últimos quince años ha surgido como un patógeno emergente de la comunidad (SAMR-C), causando infecciones en piel y tejidos blandos, aunque también infecciones severas como neumonía necrotizante, osteomielitis y meningitis, principalmente en jóvenes sin los factores de riesgo conocidos para SAMR-H (94). Muchas veces los aislamientos de SAMR-C poseen los genes codificantes de la leucocidina de “Panton Valentine” (*luk-PV*). Este factor de virulencia es una citotoxina formadora de poros que produce muerte y destrucción de células del sistema inmune (81). Los genes *luk-PV* se encuentran principalmente en los aislamientos SAMR-C y menos frecuentemente en los aislamientos SAMR-H, por lo cual su detección suele usarse como marcador de este tipo de cepas.

La alta prevalencia en nuestro medio de SAMR-C, como causante de infecciones de piel y partes blandas llevó a que en el año 2011, la Sociedad Argentina de Infectología recomendara trimetoprima-sulfametoxazol (TMS), minociclina-doxiciclina o clindamicina en lugar de cefalotina en estas infecciones (84). Por otro lado, la vancomicina ha sido considerada el antimicrobiano de elección para el tratamiento de las infecciones severas causadas tanto por SAMR-H como SAMR-C (bacteriemias, osteomielitis, neumonías, etc.). Sin embargo, a partir de fines de la década del '90 se han reportado cepas de *S. aureus* con sensibilidad disminuida (VISA), cepas con resistencia heterogénea (hVISA), y cepas resistentes a vancomicina (VRSA) a partir del año 2000 lo que ha despertado una señal de alarma en todo el mundo (59).

Otras alternativas disponibles para el tratamiento de infecciones por SAMR son (además de vancomicina y otros glicopéptidos), linezolid, daptomicina, tigeciclina y ceftarolina (un antibiótico β -lactámico activo frente a cepas SAMR). No obstante, en los últimos años se han reportado casos de

resistencia a linezolid, daptomicina y ceftarolina (29, 52, 55, 83, 134); y se han podido incluso seleccionar in vitro mutantes resistentes a tigeciclina (Herrera M., XII Congreso Argentino de Microbiología; 2010). Estos hallazgos demuestran la extraordinaria capacidad que posee *S. aureus* para adaptarse a las distintas condiciones de su entorno.

Plasticidad genómica de *Staphylococcus aureus*

El genoma bacteriano de *S. aureus*, como todo genoma procariota, está compuesto por un genoma “core conservado” y un genoma “accesorio o variable” (compuesto a su vez por secuencias características de los distintos linajes genéticos de *S. aureus* y elementos genéticos móviles de ADN). Las funciones celulares más importantes (replicación, metabolismo, síntesis de ADN y ARN) están conservadas en la parte del genoma “core”. El genoma accesorio o variable contribuye con la extraordinaria plasticidad genómica que posee esta especie.

Dentro de los elementos móviles de ADN se pueden nombrar bacteriófagos (virus bacterianos), plásmidos (moléculas circulares de ADN con capacidad para autorreplicarse), islas genómicas de patogenicidad, cassettes cromosómicos y transposones. Gracias a ellos, este microorganismo está sujeto a cantidad de mutaciones, rearrreglos cromosómicos y transferencia horizontal de genes (transferencia de información genética entre células) que le permiten adaptarse a distintos entornos (34, 86, 87). Aparte de los elementos móviles de ADN, existen sistemas que pueden favorecer el desarrollo de mutaciones puntuales (como el sistema SOS). El sistema SOS es un regulador global compuesto por muchos genes que al activarse en respuesta a daños en el ADN trata de repararlos, utilizando para ello ADN polimerasas propensas a error, que pueden generar mutaciones puntuales, y contribuir en última instancia con el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos (19, 91, 136).

Dentro de los elementos móviles de ADN, los elementos transponibles (secuencias de inserción y transposones compuestos) representan un grupo importante. Las secuencias de inserción (IS) son pequeños elementos genéticos que se movilizan de forma autónoma (proceso denominado transposición), y su movilización puede causar diversas alteraciones genéticas, como la inactivación o modificación de la expresión de ciertos genes. Las IS presentan en cada extremo una secuencia repetida invertida (IR) y entre ellas 1 o varios genes *tnp*, necesario/s para la transposición. Los transposones compuestos, están flanqueados por IS en ambos extremos, entre las cuales pueden además llevar otros genes que movilizan de un lado a otro del genoma (100). Por ejemplo, el transposón Tn4001 está flanqueado en ambos extremos por la secuencia de inserción IS256 y lleva

genes de resistencia a antibióticos de la familia de los aminoglucósidos (*aac(2'')*-*aph(6'')*)(14). Los transposones Tn4003, Tn552 y Tn554 llevan genes de resistencia a trimetoprima (*dhfrA* y *thyE*), penicilina (el gen *blaZ*) y eritromicina (*ermA*) respectivamente (97, 115, 116). Estos elementos a su vez, al movilizarse pueden formar parte de elementos genéticos más grandes, como plásmidos o cassettes cromosomales (por ej. el SCC*mec*), contribuyendo aún más con la plasticidad genética y la diseminación de resistencia.

El SCC*mec* en *Staphylococcus aureus* meticilino resistente

La resistencia a meticilina en *S. aureus* se debe a la adquisición de un elemento móvil de ADN denominado *Staphylococcal Chromosomal Cassette mec* (SCC*mec*), que contiene varios genes y entre ellos al gen *mecA*, el cual codifica una proteína con afinidad disminuida a los antibióticos β -lactámicos, denominada PBP2a (78 kDa). A diferencia del gen *blaZ* cuyo producto confiere resistencia sólo a las penicilinas, el producto del gen *mecA* confiere resistencia a la gran mayoría de los antibióticos β -lactámicos; muchas veces además formando parte del SCC*mec* hay genes que confieren resistencia a antibióticos de otras familias.

En ausencia de antibióticos los dominios transpeptidasa (TPasa) y transglicosilasa (TGasa) de PBP2 participan en la síntesis de peptidoglicano. En presencia de antibióticos β -lactámicos, estos se unen al dominio TPasa de PBP2 (y del resto de las PBPs) impidiendo su función. En los aislamientos SAMR, PBP2a (que posee actividad TPasa y baja afinidad por los antibióticos β -lactámicos) actuaría cooperativamente con el dominio TGasa de PBP2, para poder continuar con la síntesis de peptidoglicano y el crecimiento celular (109).

Los distintos SCC*mec* de los aislamientos SAMR comparten 4 características principales: primero, poseen un complejo *mec* formado por el gen *mecA* y sus genes reguladores (*mecR* y *mecI*); en segundo lugar, poseen un complejo *ccr* formado por los genes de recombinasas *ccr*, responsables de la movilidad de este elemento; tercero, poseen repeticiones nucleotídicas directas e invertidas en ambos extremos del cassette; y por último, se integran en el cromosoma en la región *orfX*. Las regiones delimitadas entre los complejos *mec* y *ccr* se denominan regiones J (o “Junkyard”). Existen 3 regiones J: J1 (comprendida entre el complejo *ccr* y el cromosoma bacteriano), J2 (entre el complejo *mec* y *ccr*) y J3 (entre *orfX* y *mec*)(2).

A pesar de estas similitudes, como se puede ver en la figura E, las estructuras de los distintos elementos SCC*mec* son bastantes divergentes y estas diferencias se utilizan hoy día para la tipificación

molecular de los aislamientos de SAMR. Se han descrito diferentes tipos de SCC*mec* (I a XI), en base a la clase de complejo *mec* y al tipo de recombinasa (*ccr*) incluida en este cassette. El tamaño de estos elementos varía entre 20 y 65 kb (21, 27, 64, 68, 79, 126). El SCC*mec* tipo XI fue descubierto recientemente, y posee un gen *mecA* divergente (*mecA*_{LGA251}) que posee solo 70% de homología con el gen *mecA* de otros SCC*mec*. Debido a esto, en aquellos aislamientos SAMR que posean este elemento, el gen *mecA*_{LGA251} (posteriormente redenido *mecC* (62)) no es detectado por la reacción de PCR convencional para *mecA*, si bien son detectados por los cultivos de rutina para determinar la sensibilidad a antibióticos. Este genotipo fue inicialmente detectado en aislamientos recuperados de ganado, pero ha sido encontrado además en aislamientos provenientes de humanos en Inglaterra, Irlanda, Escocia, y Dinamarca (126).

En nuestro país, los SCC*mec* mas prevalentes actualmente son los SCC*mec* I, IV, y en menor medida el SCC*mec* V. Los SCC*mec* I (complejo *mec* de clase B, recombinasa A1B1) se encuentran asociados por lo general con clones de SAMR hospitalarios (SAMR-H); los SCC*mec* IV (complejo *mec* de clase B, recombinasa A2B2) y V (complejo *mec* de clase C, recombinasa C) se encuentran frecuentemente en los clones de SAMR adquiridos en la comunidad (SAMR-C).

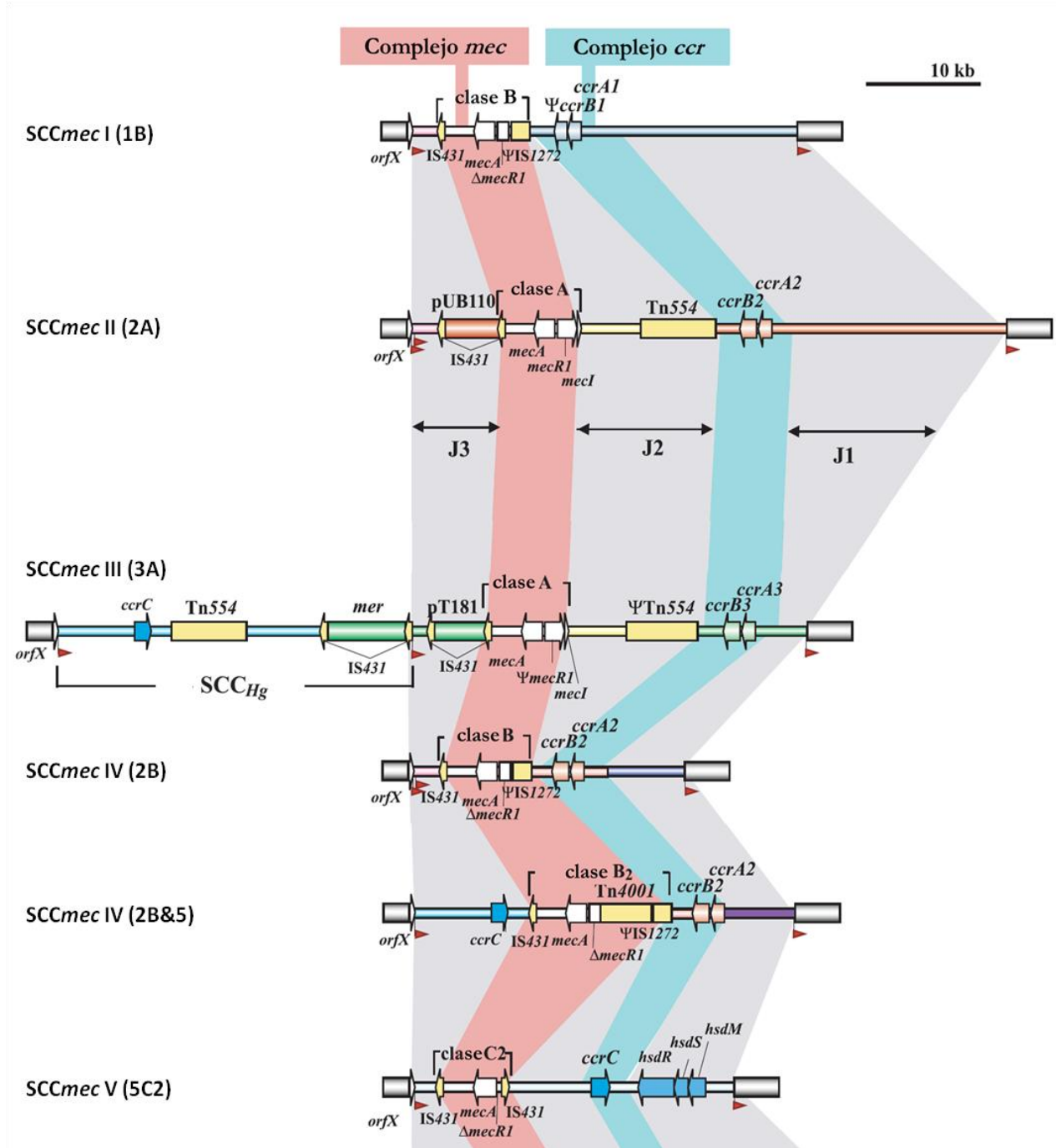


Fig. E. Estructuras de los SCC_{mec} I a V. Entre paréntesis se indica el tipo de recombinasa *ccr* con un número y el complejo *mec* con letra. Adaptado de Guidelines for Reporting Novel SCC_{mec} Elements. 2009 (2).

Epidemiología de las infecciones por *Staphylococcus aureus*

S. aureus se encuentra frecuentemente colonizando la piel de los seres humanos y de animales. Aproximadamente el 25-30% de los seres humanos son portadores de *S. aureus* sin presentar sintomatología, y las mucosas nasales son el sitio de colonización más frecuente (146).

Por lo general, un individuo se encuentra en riesgo de infección por su propia cepa colonizante. La transmisión de estas bacterias sin embargo se puede dar también de personas infectadas a no infectadas por medio del contacto con la piel o fómites, por mala higiene y en casos en los que la barrera de la piel ha sido comprometida. Estos factores son importantes en las infecciones de origen comunitario, mientras que otras condiciones como un sistema inmune deprimido, o algunas enfermedades de base pueden aumentar el riesgo de adquirir infecciones por SAMR en el ámbito hospitalario.

Tal como fue mencionado, las infecciones por SAMR poseen una alta morbilidad y mortalidad, y abarcan desde infecciones de piel y partes blandas, hasta infecciones más severas, como osteomielitis, artritis séptica, neumonía necrotizante y neumonía asociada a ventilador, endocarditis y bacteriemias. Se han reportado tanto en individuos jóvenes como en adultos.

Según la definición del CDC, las infecciones por SAMR adquiridas en la comunidad (SAMR-C) son aquellas en las cuales el inicio de la infección ocurre 48 hs antes de la admisión en el hospital y en individuos que no han tenido historia previa de hospitalización en el año anterior. Por otro lado, las infecciones hospitalarias por SAMR (SAMR-H) ocurren luego de las 48 hs del ingreso al hospital (36) o son aquellas que se detectan en individuos ambulatorios sometidos a cuidados de la salud. Las infecciones por aislamientos de SAMR-C representan un problema emergente que requiere la aplicación de medidas de control debido a la elevada virulencia y capacidad de diseminación de las cepas involucradas.

Muy recientemente, se ha reconocido la colonización de ganado por cepas SAMR y la transmisión zoonótica de tales cepas al hombre por contacto directo (SAMR-LA, del inglés “livestock associated”) (22).

Según datos de la OMS de 2014, actualmente más del 20% de las infecciones por *S. aureus* en todo el mundo son debidas a SAMR, llegando en algunas regiones al 80%. En nuestro país el porcentaje de SAMR es de alrededor del 50% (152).

Las diferencias encontradas en las distintas regiones y países se deben a la diseminación de distintos clones epidémicos de *S. aureus* (22). Las causas subyacentes a la aparición y desaparición de distintos clones de *S. aureus* en determinadas regiones a lo largo del tiempo aún son desconocidas, pero probablemente estén relacionadas con cambios en las terapias con antibióticos o los estilos de vida (21).

Epidemiología molecular para el estudio de SAMR

La aplicación de metodologías de tipificación molecular ha sido de gran ayuda para el estudio de la epidemiología y diseminación de las infecciones causadas por *S. aureus*, y más específicamente de SAMR-C y SAMR-H. La tipificación clonal de las especies bacterianas, utilizando marcadores moleculares, provee información sobre la distribución de los diferentes genotipos o clones en la población humana a lo largo del tiempo y en las diferentes áreas geográficas. Para ello se las puede estudiar mediante diferentes metodologías: algunas permiten comparar las diferencias de aislamientos recuperados en un período relativamente corto de tiempo y dentro de una misma región geográfica (evalúan la región variable del genoma), mientras que otras permiten comparar diferencias globales o a largo plazo (dado que evalúan el genoma conservado o “core”).

La electroforesis en gels por campo pulsado (PFGE), se basa en la digestión del ADN genómico con una enzima de corte poco frecuente y la posterior separación del mismo en un gel de agarosa mediante campos eléctricos pulsados de distinta orientación. El perfil de migración de bandas de ADN (pulsotipo) que se obtiene es característico de cada aislamiento. Esta técnica, ha sido considerada como el método con mayor poder discriminatorio de los actualmente disponibles, brinda información de utilidad tanto en estudios de epidemiología local como global y es el método elegido como referencia. La determinación del tipo de *spa* es otra técnica eficiente para la tipificación de aislamientos tanto como marcador en epidemiología local como global (50). Esta técnica implica la secuenciación de la región polimórfica X del gen que codifica para la proteína A (*spa*), que contiene un número variable de secuencias repetitivas de 24 pares de bases. Por otro lado, la tipificación mediante secuenciación de múltiples *loci* (Multilocus Sequence Typing, MLST) sirve como marcador de epidemiología global o a largo plazo. Este método se basa en la secuenciación de fragmentos de 7 genes conservados, que conforman el perfil alélico del aislamiento en estudio. Cada alelo se denomina con un número en particular, y cada perfil alélico se asocia a un número de secuenciotipo (ST). Los STs que difieren en menos de 3 alelos de diferencia se agrupan en complejos clonales (CC)(30, 50).

Utilizando las metodologías descriptas, se han tipificado distintos clones epidémicos a nivel mundial. Los clones epidémicos de SAMR más prevalentes se agrupan en relativamente pocos complejos clonales (CC1, CC5, CC8, CC22, CC30, CC45, CC59, y CC80). En Estados Unidos se describieron el clon USA400 (ST1 - SCC mec IV) perteneciente al CC1, y los clones NewYork/Japan (ST5 - SCC mec II), y clon pediátrico (ST5 - SCC mec IV), que pertenecen al CC5. Dentro del CC8 se encuentran los clones USA300 (ST8 - SCC mec IV) que reemplazó al USA400 diseminado en Estados Unidos, y COL (ST250 - SCC mec I) e Ibérico (ST247 - SCC mec I) que se encontraron en distintas partes de Europa. En el Reino Unido se hallaron clones pertenecientes al CC22 (clon EMRSA-15, ST22 - SCC mec IV), y al CC30 (clon EMRSA-16, ST36 - SCC mec II). En Oceanía, el CC30 está representado por el clon Southwest Pacific (ST30 - SCC mec IV)(22).

En nuestro laboratorio hemos documentado la prevalencia de un tipo clonal (ST5 - SCC mec IV - pulsotipo A - *spat311*) entre los aislamientos de SAMR-C recuperados en Centros de Salud de diferentes ciudades de nuestro país (período 2004-2006) (41). Con respecto a SAMR-H, en un estudio realizado en los hospitales de la UBA se detectó como clon prevalente, el “clon cordobés”, perteneciente al ST5 y SCC mec tipo I (período 2002-2003) en reemplazo del “clon brasilero” previamente diseminado (ST239 - SCC mec III) (40, 129). La identificación del ST5 en nuestro país, tiene una fuerte implicancia y debe ser considerado un alerta para el Sistema de Salud, considerando que este ST es característico de varios clones epidémicos de SAMR (clon pediátrico, clon NewYork/Japan, clon cordobés) y además es el mismo ST de la mayoría de los aislamientos resistentes a vancomicina descritos (VRSA) (41, 72, 132, 156). Recientemente sin embargo, hemos documentado la prevalencia de otro tipo clonal en aislamientos SAMR-C (ST30, pulsotipo C, SCC mec tipo IV, *spat019*) durante el período marzo de 2010-diciembre de 2011 en diversos centros de salud de Buenos Aires; el clon con ST30 es un clon que había sido descrito previamente en Oceanía y Uruguay (35).

Vancomicina

La vancomicina es un antibiótico de la familia de los glicopéptidos. Estos antibióticos son utilizados para el tratamiento de infecciones severas por bacterias Gram positivas pertenecientes a los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, y *Clostridium*, y la vancomicina junto con la teicoplanina, son los miembros más relevantes de la familia.

Fue descubierta en la década del 50' como metabolito secundario producido por *Streptomyces orientalis*, y a partir de 1970 se comenzó a utilizar para tratar por vía intravenosa infecciones severas producidas por *S. aureus* meticilino resistentes (SAMR).

La molécula de los glicopéptidos está formada por un core de dos estructuras lineales heptapeptídicas que son modificadas mediante glicosilación selectiva y de aminoácidos para generar los distintos compuestos de la familia (Fig. F). El hecho de que sean moléculas tan complejas (peso molecular mayor a 1300 g/mol) y que para su accionar requieran acceso directo al blanco molecular, explica que el espectro de acción de estos antibióticos sean las bacterias Gram positivas, dado que no pueden atravesar la membrana externa de bacterias Gram negativas (110).

El mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de peptidoglicano, específicamente por interacción del antibiótico con los terminales D-Ala-D-Ala de las cadenas no entrecruzadas de peptidoglicano en formación. La interacción con los terminales D-Ala-D-Ala implica la formación de 5 puentes de hidrógeno generando un complejo no covalente. De esta forma, se inhibe la acción de las enzimas que tienen como sustrato los precursores conteniendo D-ala-D-ala: las transpeptidasas (responsables del entrecruzamiento del peptidoglicano) y las transglicosilasas (responsables de la elongación de la cadena de peptidoglicano) (110).

En consecuencia, los glicopéptidos al interferir con el ensamblaje y crecimiento del peptidoglicano, tienen un efecto bactericida (137).

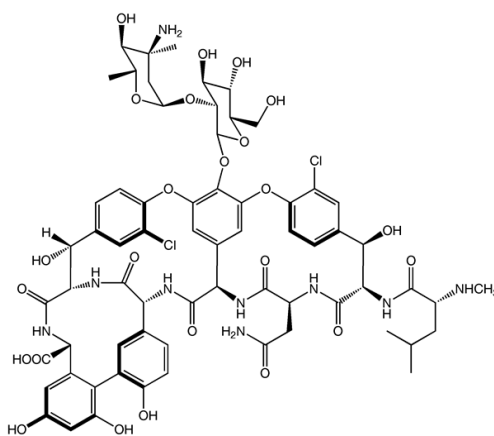


Fig. F. Estructura química de la molécula de vancomicina

Sin embargo, el tratamiento con vancomicina tiene algunas limitaciones: su efectividad in vivo muchas veces es más baja que in vitro, tiene baja penetración en algunos tejidos (como por ejemplo el pulmón), baja velocidad bactericida y puede provocar toxicidad renal. Además han aparecido casos de disminución de la sensibilidad al antibiótico. Por todo esto, cuando se utiliza vancomicina,

luego de hacer el diagnóstico y de confirmar la sensibilidad del microorganismo mediante la determinación de la CIM, se recomienda monitorear las concentraciones plasmáticas de la droga para evitar su toxicidad, ajustar la dosis y predecir su eficacia terapéutica (73, 82).

***Staphylococcus aureus* con sensibilidad disminuída a vancomicina**

La emergencia de *S. aureus* con sensibilidad disminuída a la vancomicina (VISA, concentraciones inhibitorias mínimas, (CIMs) entre 4 y 8 $\mu\text{g/ml}$) fue descrita por primera vez en Japón (56). Poco tiempo después, estos aislamientos fueron identificados con incidencia creciente en Estados Unidos y otros lugares del mundo, particularmente en pacientes tratados con vancomicina y con fracasos terapéuticos documentados (5, 59).

Según los puntos de corte del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Fig. G), los aislamientos sensibles a vancomicina (VSSA) presentan concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) menores o iguales a 2 $\mu\text{g/ml}$, pero en algunas cepas con esos valores de CIM, hay subpoblaciones con sensibilidad disminuída que se encuentran en una frecuencia de 10^{-6} o aún más baja (*S. aureus* con resistencia heterogénea a vancomicina o hVISA). La detección de estas cepas es un problema en el laboratorio clínico, dado que son catalogadas como sensibles mediante las metodologías comúnmente utilizadas. Estas metodologías utilizan inóculos que no logran detectar a la subpoblaciones resistentes: 5.10^4 UFC/pocillo para la determinación de la CIM por el método de microdilución, y 1.10^4 UFC/‘spot’ en el método de dilución en agar (5, 138). Aparentemente, y dado que se postula que el fenotipo VISA se alcanza por acumulación de mutaciones, estas cepas heterogéneas (hVISA) serían un estadio previo en la evolución de las cepas con resistencia intermedia a vancomicina (VISA) (60). Además, a partir del reconocimiento de las cepas hVISA y VISA, se ha postulado que las mismas serían responsables, en parte, de las fallas terapéuticas al tratamiento con vancomicina (5, 138). Las cepas de *S. aureus* resistentes a vancomicina (VRSA) son muy poco frecuentes a nivel mundial, presentan valores de CIM mayores o iguales a 16 $\mu\text{g/ml}$, y el mecanismo de resistencia se basa en la adquisición de un plásmido que contiene el gen *vanA* por conjugación con enterococos resistentes a vancomicina (95, 151).

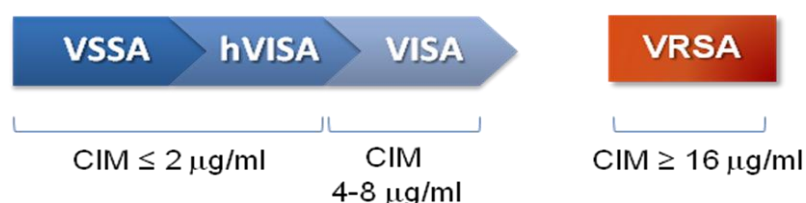


Fig. G. Puntos de corte del CLSI para vancomicina en *S. aureus*. (2012)

Detección de cepas VISA y hVISA en el laboratorio

Los aislamientos VISA son detectados mediante la determinación de la CIM tanto por microdilución en caldo, dilución en agar o mediante el método epsilométrico (Etest®, Biomerieux). Sin embargo, las subpoblaciones con sensibilidad disminuida en los hVISA no son detectadas por ninguna de estas metodologías y erróneamente son clasificadas como sensibles al antibiótico, lo que conlleva al fracaso terapéutico en los pacientes que padecen infecciones por estas cepas al ser tratados con vancomicina.

Las cepas VISA y hVISA pueden presentar características que las diferencian de un cultivo de *S. aureus* convencional, como variaciones de pigmentación y menor tamaño de las colonias, aunque a veces estas diferencias son muy sutiles. Otras veces pueden incluso crecer más lento generando mezcla de colonias de tamaños grandes y chicos, y variaciones de pigmentación dentro de un cultivo puro (Fig. H.)



Fig. H. Morfología de las colonias de un cultivo VISA en agar sangre luego de 48 hs de incubación.

Se han desarrollado una serie de metodologías de tamizaje o “screening” para detectar a las cepas hVISA que utilizan un alto inóculo (2.0 Mc Farland para el Macro Etest), medios de cultivos más ricos (agar cerebro corazón: BHI, o agar Mueller Hinton suplementado con sangre), y mayor tiempo de incubación (hasta 48 hs), para favorecer el desarrollo de las subpoblaciones con sensibilidad disminuida a vancomicina. El Macro Etest es una metodología de screening que utiliza un medio de cultivo rico (BHI), en lugar de MHA, un inóculo de 2.0 Mc Farland y 48 hs de incubación, respecto de la determinación de la CIM para vancomicina por Etest convencional (0.5 Mc Farland, 24 hs de incubación). Entre otros métodos propuestos están las placas de “screening” con distintas concentraciones de antibióticos, y el método de predifusión. En este último, dado que los glicopéptidos presentan difusión pobre en los medios de cultivo sólidos, se realiza la difusión del antibiótico a partir de tabletas conteniendo vancomicina o teicoplanina, durante 20-24 hs previo a la

siembra del inóculo, lo cual aumenta el tiempo de difusión de dichos antibióticos para mejorar la detección. Sin embargo, actualmente no existe un método de elección para la detección de cepas hVISA en los laboratorios clínicos, a pesar que diferentes autores han evaluado diferentes métodos con resultados no siempre coincidentes, quizás debido a la falta de estandarización de las técnicas nombradas (59).

El método “gold standard” y confirmatorio para la detección de cepas hVISA/VISA es el análisis poblacional, en el cual se siembran diluciones del microorganismo en estudio en placas de agar BHI conteniendo distintas concentraciones de vancomicina, para determinar el número de células que sobrevive a cada concentración. Wooton y colaboradores describieron una modificación en la cual se calcula el área bajo la curva del gráfico de análisis poblacional (PAP-AUC, abreviatura del inglés “Population Analysis Profile, Area Under the Curve”) de la cepa en estudio, y se la compara con el área que da la cepa control Mu3 (hVISA). Con este método se consideran VSSA a aquellas que presentan relación PAP-AUC/PAP-AUC Mu3 menor a 0,9, y hVISA a aquellas en las que la relación PAP-AUC/PAP-AUC Mu3 es mayor o igual a 0,9 (153). Sin embargo, aunque permite la detección de subpoblaciones que crecen a concentraciones mayores que la CIM, es un método demasiado laborioso y que no es óptimo para ser aplicado en los laboratorios clínicos.

Mecanismo implicado en la disminución de la sensibilidad a vancomicina en *Staphylococcus aureus*

El mecanismo responsable de la sensibilidad disminuida a la vancomicina en las cepas VISA aún no ha sido completamente elucidado. La transferencia del gen *vanA* por conjugación desde enterococos vancomicina resistentes es el mecanismo implicado en la emergencia de las cepas de *S. aureus* con alta resistencia a vancomicina (VRSA)(151). Sin embargo ninguno de los determinantes *van* han sido hallados en las cepas VISA descritas, excepto en dos cepas provenientes de un estudio de colonización nasal realizado en una unidad de cuidados intensivos de un hospital en India (8). Algunas de las características observadas en estas cepas son la disminución de la velocidad de crecimiento y un engrosamiento de la pared bacteriana con respecto a las cepas sensibles. Se ha postulado que el mayor grosor de la pared actuaría como “trampas de afinidad”, secuestrando moléculas de vancomicina. El análisis genómico de cepas VISA ha permitido identificar mutaciones y/o cambios en el nivel de expresión de genes involucrados en la biosíntesis de pared y otros genes del metabolismo intermedio que podrían asociarse a la resistencia observada. Entre estos, se pueden

nombrar los sistemas reguladores de dos componentes *vraSR*, *graSR*, *walKR* (7, 17, 59, 125). Recientemente, se ha descrito una asociación entre la disminución de la sensibilidad a vancomicina y mutaciones en el gen *rpoB*, que codifica para la subunidad B de la ARN polimerasa (150). Además, se ha demostrado en mutantes defectivas en el sistema de reparación del ADN, que una mayor frecuencia mutacional, podría favorecer la emergencia de mutaciones adaptativas en presencia de vancomicina (121) y explicaría la reversión de resistencia descrita en algunas cepas clínicas (11). Como se describió anteriormente, el locus *agr* (accessory gene regulator) de *S. aureus* codifica un sistema regulador de dos componentes encargado de la regulación positiva de la síntesis de exotoxinas y la regulación negativa de la síntesis de proteínas asociadas a la pared celular (adhesinas y proteínas de superficie) durante la fase exponencial tardía del crecimiento bacteriano. Se ha descrito que la pérdida de funcionalidad del locus *agr* podría conferir una ventaja adaptativa bajo presión selectiva de vancomicina, particularmente en cepas *agr* grupo II (119). Al no ser funcional este locus, la desregulación de factores de virulencia, permitiría la colonización y la persistencia de la infección evadiendo la respuesta inmune del hospedador.

Antibióticos utilizados para el tratamiento de infecciones por hVISA/VISA

Daptomicina: La daptomicina es un antibiótico lipopéptidico que actúa insertándose en la membrana plasmática en presencia de calcio, provocando eflujo de potasio, despolarización de la membrana y cambios en la síntesis proteica, de ADN y ARN, que llevan finalmente a la muerte de la célula. Fue aprobada para el tratamiento infecciones severas por *S. aureus* tales como bacteriemias, endocarditis, infecciones de piel y partes blandas complicadas. Pero esta droga no está indicada para las neumonías, dado que es inactivado por el surfactante pulmonar (82). Si bien es uno de los antibióticos recomendados para el tratamiento de infecciones por hVISA/VISA, varios autores han reportado la emergencia de sensibilidad disminuida a este antibiótico. Se han descrito además algunos casos en los que el aumento en la resistencia a vancomicina en cepas hVISA/VISA se acompaña de un aumento en la resistencia a daptomicina, encontrándose varios puntos en común que podrían explicar el mecanismo de resistencia en ambos, como mutaciones en los genes *dlt* y *mprF*, o cambios en la expresión de los operones *vraSR* y *walKR* (15, 18, 113).

Linezolid: Este antibiótico pertenece a la familia de las oxazolidinonas, y fue introducido en la práctica clínica en el año 2000. Está indicado para el tratamiento de infecciones complicadas de piel y partes blandas, y neumonías causadas por cocos Gram positivos (incluidas cepas hVISA/VISA)(82). El linezolid inhibe la síntesis de proteínas al unirse a la subunidad 50S de los

ribosomas bacterianos interactuando con el ARN ribosomal 23S y las proteínas ribosómicas L3, L4, y L22. Se han reportado casos de resistencia debido a mutaciones en los genes de estos sitios diana y también por la adquisición del gen *cfz* cuyo producto produce la metilación del ARNr 23S, y que se asocia por lo general a transposones y plásmidos (113).

Ceftarolina: La ceftarolina es una oximino-cefalosporina (cefalosporina de 4ta generación) que como tal inhibe la síntesis de la pared celular por unión a las PBPs, pero además también se une con alta afinidad a PBP2a, por lo que se puede utilizar para el tratamiento de infecciones por SAMR. Se administra en forma parenteral y fue aprobada para el tratamiento de infecciones complicadas de la piel y tejidos blandos. Sin embargo, recientemente se han reportado casos de heteroresistencia y alto nivel de resistencia a este antibiótico, por mutaciones en el gen *mecA* que impiden que el antibiótico se una a PBP2a (83, 113).

Tigeciclina: Es una glicilglicina que inhibe la síntesis de proteínas al inhibir alostéricamente la unión del ARNt en el sitio aceptor (subunidad A) de la subunidad ribosómica 30S. Su espectro de acción abarca bacterias Gram negativas y Gram positivas, y fue aprobada para el tratamiento de infecciones de piel y tejidos blandos, e infecciones abdominales complicadas (82). Algunos autores describen su utilización para el tratamiento de neumonías bacterianas de origen comunitario (113). Si bien aún no se han descrito casos de resistencia a este antibiótico en *S. aureus*, se han podido seleccionar mutantes resistentes in vitro (Herrera M., XII Congreso Argentino de Microbiología; 2010).

Otros antibióticos: Para el tratamiento de infecciones por hVISA/VISA se pueden utilizar también combinaciones de antibióticos más antiguos, como la rifampicina, gentamicina o trimetoprima-sulfametoxazol (TMS). Si las cepas son sensibles a daptomicina, se puede utilizar este antibiótico en combinación con gentamicina, rifampicina, o linezolid, o TMS (48, 82). Según las guías de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (“Infectious Diseases Society of América”, IDSA) sin embargo, no hay beneficio claro en utilizarlos en combinación con vancomicina e incluso se puede potenciar la nefrotoxicidad (asociación vancomicina+gentamicina), o hepatotoxicidad (vancomicina+rifampicina)(82).

Adicionalmente al tratamiento antibiótico, para una mayor respuesta a los tratamientos, y en vistas de reducir la posibilidad de selección de resistencia, debe hacerse un correcto control, drenaje y/o resección quirúrgica para eliminar aquellos sitios de infección de alto inóculo.

Hipótesis y justificación del estudio

Al iniciar este trabajo, disponíamos de dos pares de aislamientos recuperados durante el año 2009 en el Hospital de Clínicas José de San Martín de Buenos Aires provenientes de pacientes hospitalizados con fracaso terapéutico a vancomicina que padecieron endocarditis en un caso (104) y una infección osteoarticular en el otro, que fueron confirmados como hVISA por el método de análisis poblacional (PAP-AUC). Estos aislamientos formaron parte de los dos primeros hVISA reportados en nuestro país (104, 130). Posteriormente, Errecalde y colaboradores documentaron la aparición del primer caso de infección por una cepa VISA (31).

Debido a que *S. aureus* ha ido incrementando su perfil de resistencia a lo largo de los últimos años, y las opciones terapéuticas son actualmente limitadas, resulta necesario conocer la prevalencia de cepas hVISA entre pacientes con patologías severas que requieran tratamiento prolongado con glicopéptidos antes de decidir la antibioticoterapia y disponer de un método estandarizado que las detecte eficientemente. Al inicio de esta tesis no se habían realizado en nuestro país estudios epidemiológicos que documenten la incidencia de este fenómeno, su implicancia clínica, ni las características genóticas de las cepas emergentes. Dado que disponíamos de dos pares de aislamientos en los que se confirmó el fenotipo hVISA, era de esperar entonces, encontrar más casos que no serían detectados mediante determinaciones de rutina como la CIM por microdilución. Además, mediante la genotipificación de los aislamientos hVISA/VISA encontrados, postulamos evaluar si la emergencia de los mismos se debe a la diseminación de un clon en particular durante el período de estudio.

Por otra parte, el análisis de las bases moleculares implicadas en el desarrollo del fenotipo hVISA/VISA de los aislamientos encontrados permitirá contribuir con el conocimiento existente acerca del mecanismo involucrado en dicha resistencia, que aún no ha sido completamente elucidado. Los resultados obtenidos con los pares de aislamientos que motivaron este estudio habían indicado que los aislamientos recuperados luego de iniciado el tratamiento presentaban un valor de CIM determinada por Etest mayor al de los aislamientos originales (previos al tratamiento), y el fenotipo hVISA fue confirmado en ambos mediante análisis poblacional. Esta observación permite suponer que el fracaso terapéutico documentado en los 2 casos clínicos habría estado vinculado con la existencia de una población heterogénea compuesta por células sensibles y resistentes a la vancomicina. El desarrollo de este fenotipo podría deberse a un estado de hipermutabilidad asociado con cambios en el metabolismo del peptidoglicano, que serían responsables del fenómeno de resistencia observado.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El **objetivo general** de este trabajo es contribuir al conocimiento de diferentes aspectos vinculados a la disminución de la sensibilidad a la vancomicina en *S. aureus*.

Los **objetivos específicos** propuestos son:

1. Analizar la situación epidemiológica de *S. aureus* hVISA/VISA recuperados de pacientes con bacteriemias en el Hospital de Clínicas José de San Martín.
 - 1.1) Analizar la prevalencia y evaluar distintas metodologías para detectar hVISA/VISA.
 - 1.2) Evaluar el significado clínico de cepas hVISA en pacientes con múltiples episodios de bacteriemias por *S. aureus*.
 - 1.3) Analizar las características genotípicas de los aislamientos hVISA.

2. Estudiar las bases moleculares implicadas en la susceptibilidad disminuida a vancomicina en cepas VISA y hVISA.
 - 2.1) Caracterizar fenotípica y genotípicamente aislamientos hVISA y VISA.
 - 2.2) Analizar factores involucrados en la modificación del metabolismo del peptidoglicano.
 - 2.3) Evaluar la participación de un estado hipermutable en el desarrollo del fenotipo VISA.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos

1.1 Microorganismos utilizados para el estudio epidemiológico de la sensibilidad disminuida a vancomicina

Se realizó un estudio prospectivo observacional en el Hospital de Clínicas José de San Martín durante el período comprendido entre agosto de 2009 y noviembre de 2010 en el cual se estudiaron todos los aislamientos de *S. aureus* recuperados de hemocultivos de pacientes internados en el Hospital de Clínicas José de San Martín para el cumplimiento del objetivo 1.

Se incluyó la totalidad de aislamientos de *S. aureus* recuperados de pacientes con las patologías descritas. Inicialmente se estudió un aislamiento por paciente, pero en aquellos casos en que se recuperó *S. aureus* con posterioridad al tratamiento con vancomicina, se estudiaron además los aislamientos adicionales. Las cepas fueron conservadas a -70°C para su posterior caracterización.

1.2 Microorganismos utilizados para el estudio de las bases moleculares implicadas en la susceptibilidad disminuida a vancomicina en cepas VISA y hVISA

Para el cumplimiento del objetivo 2 se estudió un par de aislamientos hVISA recuperados en el Hospital de Clínicas José de San Martín en el año 2009. Los mismos provienen de un paciente que sufrió una infección osteoarticular, previo y posterior al tratamiento con vancomicina (D1 y D2 respectivamente). Las cepas fueron conservadas a -70°C para su posterior caracterización.

1.3 Microorganismos utilizados como control

En la Tabla 1 se describen las cepas utilizadas como control en los ensayos fenotípicos y genotípicos.

Tabla 1. Cepas utilizadas como controles, origen y características relevantes:

Cepa	Características relevantes	Origen
ATCC 25923	VSSA	ATCC
ATCC 29213	VSSA	ATCC
NRS2 (Mu3)	hVISA	NARSA
NRS1 (Mu50)	VISA	NARSA
NRS144 (RN4220)	Defecto parcial en el locus <i>agr</i> ; β -hemolisina (+), inductor de δ -hemólisis	NARSA
ATCC43300	<i>mecA</i> (+)	ATCC
NRS384 (USA 300)	<i>agr</i> I; SCC <i>mec</i> IV	NARSA
NRS70 (N315)	<i>agr</i> II; SCC <i>mec</i> II	NARSA
NRS123	<i>agr</i> III	NARSA
NRS153	<i>agr</i> IV	NARSA
NRS100 (COL)	SCC <i>mec</i> I	NARSA
Clon Cordobés	SCC <i>mec</i> I, ST5	Dra. Sola
Clon Brasileiro	SCC <i>mec</i> III	Dra. Predari
Clon Comunitario “Pulsotipo A”	SCC <i>mec</i> IV, ST5	Dra. Gardella(41)
Clon Comunitario “Pulsotipo C”	SCC <i>mec</i> IV, ST30	Dra. Gardella(41)
5	<i>luk-PV</i> (+)	Dra.von Spetch(147)

ATCC: American Type Culture Collection. NARSA: Network on antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*

2. Medios y condiciones de cultivo

Los microorganismos fueron conservados a -70°C y a -20°C en presencia de glicerol al 20%. Al momento de utilizarse se descongelaron y se sembraron en los medios de cultivo correspondientes, la incubación se realizó a 37°C y con agitación sino se indica de otra forma.

Los medios de cultivos utilizados (a los cuales se les agregó antibiótico cuando fue necesario) fueron los siguientes: Agar Tripteína-Soya (TSA (Britania), Agar Mueller-Hinton (AMH) (Difco Laboratories), Agar Sangre: TSA + 5% sangre ovina (Difco Laboratories), Agar cerebro infusión corazón (BHI): (Difco Laboratories), Caldo Tripteína Soya (TSB): (Britania), Caldo cerebro infusión corazón (BHI): (Difco Laboratories).

3. Técnicas utilizadas para el estudio de la sensibilidad a antibióticos

3.1 Concentración inhibitoria mínima (CIM)

Se determinó la CIM para los antibióticos detallados a continuación mediante el método de dilución en agar o microdilución (en casos particulares) según las recomendaciones del CLSI (1). Los antibióticos ensayados fueron: oxacilina (OXA), cefoxitina (FOX), ampicilina sulbactam (AMS), cefalotina (CEF), gentamicina (GEN), eritromicina (ERY), clindamicina (CLIN), tetraciclina (TET), tigeciclina (TIGE), rifampicina (RIF), trimetoprima-sulfametoxazol (TMS), ciprofloxacina (CIP), vancomicina (VAN), teicoplanina (TEI), linezolid (LZD).

La sensibilidad a vancomicina se determinó además mediante el método epsilométrico en agar Mueller Hinton (Etest®, Biomerieux). Brevemente, una suspensión del microorganismo a ensayar (correspondiente a 0,5 de McFarland) se sembró con hisopo en placas de agar Mueller Hinton de 4 mm de espesor. Posteriormente se aplicó sobre la placa una tira de Etest de vancomicina. Las placas se incubaron durante 24 hs a 35°C .

3.2 Ensayo por Difusión en agar, D-Test

En los aislamientos que fueron resistentes a eritromicina, se evaluó además el fenotipo de resistencia a macrólidos mediante la prueba de D-Test según recomendaciones del CLSI (1). Una suspensión del microorganismo a ensayar (correspondiente a 0,5 de McFarland) se siembra con

hisopo en placas de agar Mueller Hinton de 4 mm de espesor. Posteriormente se colocan los discos de antibiograma de eritromicina (15 µg) y clindamicina (2 µg) a una distancia de aproximadamente 20 mm y las placas se incuban a 35°C durante 18 hs. Si el aislamiento posee un fenotipo inducible (iMLS_B) debido a la expresión del gen *erm*, eritromicina actúa como inductor, y se produce achatamiento del halo (halo con forma de D) alrededor del disco de clindamicina; mientras que si no se observa achatamiento del halo de clindamicina posee un fenotipo M (eflujo). Si el aislamiento presenta resistencia a eritromicina y clindamicina posee un fenotipo constitutivo (cMLS_B).

3.3 Métodos de “screening” utilizados para la detección de la heteroresistencia a vancomicina

“Screening” en placas: Se evaluó la utilidad de placas de agar BHI con 3, 4, 5 y 6 µg/ml de vancomicina (BHIV3, BHIV4, BHIV5, BHIV6) y placas de MHA (Agar Mueller Hinton) con 5 µg/ml de teicoplanina (MHAT5), para la detección de cepas hVISA. Para ello se sembró 1 µl y 10 µl de una suspensión correspondiente a 0,5 de Mc Farland (1x10⁵ y 1x10⁶ UFC respectivamente). En las placas de MHAT5 se sembró 1 µl y 10 µl de una suspensión equivalente a 2,0 de Mc Farland (6x10⁵ y 6x10⁶ UFC respectivamente). Las placas se incubaron durante 48 hs a 35°C. Se consideró como positivo y probable hVISA/VISA a todo aislamiento que presentó crecimiento dentro de las 24/48 hs de incubación.

Macro Etest: A partir de un cultivo de 24 hs en BHIA, se preparó una suspensión en solución fisiológica del microorganismo en estudio correspondiente a 2,0 de Mc Farland y se sembraron 200 µl de en placas de BHIA de 4 mm de espesor. Posteriormente se aplicó sobre la placa una tira de Etest de vancomicina. Las placas se incubaron durante 48 hs a 35°C y se leyó el valor de concentración inhibitoria (este valor no es una verdadera CIM). Se consideró como probable hVISA/VISA a todo aislamiento que presentó un valor mayor o igual a 6 µg/ml en el Macro Etest.

Predifusión con tabletas Neo Sensitabs™ (Rosco Diagnostica): Se colocaron tabletas de vancomicina (VAN, 30 µg) y teicoplanina (TEI, 30 µg) en una placa de MHA de 4 mm de espesor. Los antibióticos se dejaron difundir a temperatura ambiente durante 2 hs y se removieron las tabletas. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 18-22 hs para que el antibiótico presente en el medio de cultivo continuase difundiendo, y luego de transcurrido ese tiempo, se sembró con hisopo una suspensión correspondiente a 0,5 de Mc Farland del microorganismo en

estudio. Las placas se incubaron 24 hs a 35°C y se leyeron los diámetros de los halos de inhibición. Se consideró como probable hVISA/VISA a todo aislamiento que presentó halos de VAN menores o iguales a 22 mm y/o halos de TEI menores a 20 mm (puntos de corte del fabricante).

Este método se utilizó además para determinar la sensibilidad a daptomicina (DAPTO, 30 µg); según los puntos de corte del fabricante, se consideran sensibles aquellos aislamientos con halo de inhibición ≥ 22 mm.

Se definieron probables hVISA a aquellos aislamientos que por al menos dos de estas metodologías de screening dieron positivas según los criterios ya descritos y posteriormente fueron confirmados mediante el método de análisis poblacional y área bajo la curva (PAP-AUC).

3.4. Análisis poblacional

El análisis poblacional se consideró el criterio definitivo para definir una cepa hVISA. A partir de cultivos de 16-18 horas a 37°C del aislamiento a estudiar, se realizaron diluciones seriadas 1:10 y se sembró un volumen determinado de cada una de ellas en placas de BHI conteniendo distintas concentraciones de vancomicina, en un rango de 0 a 16 µg/ml de la misma. Se incubaron a 37°C durante 48 horas y se procedió al recuento de las colonias. Se analizaron las curvas de logaritmo del número de UFC/ml en función de la concentración de vancomicina, y fueron clasificados como hVISA aquellos aislamientos que presentaron una relación de área bajo la curva (PAP-AUC) respecto del PAP-AUC de la cepa Mu3 mayor o igual a 0,9 (153). Los aislamientos VSSA presentan un valor de relación de área bajo la curva PAP-AUC respecto del PAP-AUC de la cepa Mu3 menor a 0,9, mientras que en los VISA este valor es mayor a 1,3.

4. Estudio de la estabilidad del fenotipo hVISA/VISA

La estabilidad del fenotipo hVISA/VISA fue evaluada mediante pasajes diarios consecutivos, de varias colonias seleccionadas al azar de cada cepa en estudio, en agar BHI y en BHI con concentraciones subinhibitorias de vancomicina. Los microorganismos se conservaron a -70°C para su posterior caracterización. Se determinó la CIM para vancomicina de los aislamientos recuperados a los 30 y 60 días y se comparó con el valor de CIM del aislamiento inicial (11).

5. Técnicas utilizadas para el estudio del ADN

5.1 Extracción de ADN

El ADN utilizado como templado en las reacciones de PCR fue obtenido utilizando el protocolo descrito por Harris y colaboradores (51) con algunas modificaciones.

Los microorganismos fueron cultivados en 4 ml de caldo BHI durante 24 hs, a 37°C. Las células se separaron por centrifugación a 17.000 g, y se lavaron con 1ml de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH = 8,00). Se centrifugaron nuevamente, y se resuspendieron en 100 µl de buffer TES (buffer TE + 50% sacarosa). Se trataron con lisozima (Sigma-Aldrich) (2 mg/ml) y lisostafina (Sigma-Aldrich) (0,3 mg/ml) durante una hora a 37°C.

Luego, se agregaron 40 µl de TE + Dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10% y 20 µl de EDTA 0,5 M pH = 8,00 y se mezcló suavemente por inversión.

Posteriormente se realizó tratamiento con RNAsa (Fermentas) (10 µg/ml) durante 50 min y Proteinasa K (Fermentas) (0,22 mg/ml) hasta ver clarificación, aproximadamente 40 min.

El lisado fue extraído con fenol-cloroformo (1:1), mezclando por inversión y luego centrifugando por 10 min. Se hicieron dos extracciones más, una con la mezcla fenol-cloroformo-isoamílico (24:24:1) y la última sólo con cloroformo.

El ADN fue precipitado con 1 ml de etanol 100% pre-enfriado y resuspendido en 200 µl de agua milliQ estéril.

5.2 Genotipificación

Caracterización genotípica de aislamientos resistentes a meticilina: En aquellos aislamientos que presentaron resistencia a oxacilina y/o a cefoxitina se evaluó genotípicamente la resistencia a meticilina mediante la amplificación por PCR del gen *mecA* (96), y asignación del tipo de SCC*mec* presente utilizando PCRs para amplificar el tipo de complejo *mec* y el complejo *ccr* (63, 67, 74, 93). Para la detección del transposón Tn4001 se utilizaron los primers descritos por Sola y colaboradores (131). Posteriormente se utilizó el producto de PCR de 550 bp que corresponde a un fragmento interno del gen *mecA* para generar sondas para southern blot. Se realizó la amplificación

de las regiones J1 y J2 de SCC_{mec} IV en D1-D2-D23C9-y D2P11 utilizando la PCR múltiple descrita por Milheirico y colaboradores (92).

Detección de los genes *luk-PV*: En los aislamientos meticilino resistentes también se realizó la detección por PCR de los genes *luk-PV* según lo descrito por Lina y colaboradores (81).

Genotipificación del locus *agr*: En los aislamientos meticilino resistentes se determinó además el/los grupo/s de especificidad de *agr*, así como la existencia de distintos alelos *agr*, definidos por el polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción de la región hipervariable de dicho locus. Se realizó una PCR múltiple descrita por Gilot et al para definir la prevalencia de los grupos de interferencia (45) y se amplificó además la región comprendida entre los genes *agrA* y *agrC* (*agrAC*), utilizando los primers descritos por Adhikari y colaboradores (3). Posteriormente se utilizó el producto de esta PCR para generar sondas para southern blot.

Tipificación mediante secuenciación de múltiples *loci* (Multilocus Sequence Typing, MLST): Se aplicó MLST con el objeto estudiar el origen y las relaciones evolutivas de cepas hVISA y VISA con clones de SAMR detectados en Argentina (41, 132). Para ello se amplificaron fragmentos de 7 genes metabólicos (*arc-aro-glp-gmk-pta-tpi-yqi*), los productos de PCR fueron purificados, y secuenciados.

Los diferentes alelos correspondientes a cada uno de los genes y el secuenciotipo correspondiente a cada aislamiento fueron identificados utilizando la base de datos de MLST de *S. aureus* (<http://www.mlst.net>)(30).

Polimorfismo del gen *spa*: Se realizó la amplificación por PCR, purificación y posterior secuenciación de la región polimórfica X del gen que codifica para la proteína A (*spa*). Este fragmento contiene un número variable de secuencias repetitivas de 24 pares de bases y es utilizado como un método eficiente para la tipificación de aislamientos tanto como marcador en epidemiología local como global (50). Los datos obtenidos se analizaron a través de la base de datos <http://www.ridom.de/spaserver>

Amplificación de IS256: Con el objetivo de generar sondas para realizar southern blot se amplificó por PCR el gen de la transposasa de IS256 utilizando los primers descritos por Valle y colaboradores (142).

Secuenciación de genes relacionados con modificaciones en la sensibilidad a vancomicina: Se realizó la amplificación por PCR, purificación y posterior secuenciación de los

sistemas de dos componentes implicados en la regulación y/o biosíntesis del péptidoglicano *vraSR*, *waKR* para buscar mutaciones que pudieran explicar el fenotipo de resistencia a vancomicina (65, 70). Adicionalmente, se amplificó y secuenció la región determinante de resistencia a rifampicina (RRDR) del gen *rpoB*, codificante de la subunidad B de la ARN polimerasa (6), para buscar mutaciones que permitan explicar el fenotipo de resistencia a rifampicina observado.

Los protocolos de todas las reacciones de PCR se describen en el anexo 1.

5.3 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa (0,8 al 1,5% en buffer TAE 1X (Tris 40 mM, Ácido Acético 20 mM, EDTA 1 mM, pH = 8,00, según el tamaño de los productos amplificados). Los geles se tiñeron con Bromuro de etidio 1 µg/ml y se fotografiaron para su posterior análisis con transiluminador UV, Molecular Imager GelDoc XR Sistem, Life Science Research, Bio-Rad.

5.4 Electroforesis en geles por campo pulsado (PFGE)

Se estudiaron los perfiles de macrorestricción obtenidos con *SmaI* de los probables hVISA y de la totalidad de aislamientos hVISA recuperados, según lo descrito por Chung et al (24). El ADN genómico fue digerido utilizando la enzima *SmaI* y 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 = 8,00) con pulsos de 5 segundos a 35 segundos con un voltaje de 6V/cm a 11.3°C durante 21 hs en un equipo de campo pulsado CHEF DRIII (Bio-Rad, Hercules, CA,USA). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio 0,5 µg/ml y se visualizaron en transiluminador UV, Molecular Imager GelDoc XR Sistem, Life Science Research, Bio-Rad. El protocolo detallado se encuentra en el anexo 2.

5.5 Southern blot

Se analizó por esta técnica la presencia del gen *mecA*, la región conservada del locus *agr* comprendida entre el gen *agrA* y *agrC* (*agrAC*), y el gen de la transposasa de IS256 (*tnp*).

Luego de realizar la electroforesis en campo pulsado de las cepas de interés, el gel se trató con HCl 0,2 M por 15 minutos para lograr la depurinización de los fragmentos de ADN, se lavó con agua destilada y posteriormente se realizaron 2 lavados de 15 minutos en una solución preparada con NaCl 3 M y NaOH 0,4 M para lograr la desnaturalización del ADN. Posteriormente, se realizó la transferencia del ADN a una membrana de nitrocelulosa, se hibridó con las correspondientes sondas y se realizó la detección de la señal según el protocolo descrito en el anexo 2.

5.6 Métodos y herramientas para el análisis de secuencias

Las secuencias fueron analizadas utilizando herramientas disponibles gratuitamente en diversos servidores como ExPASy (www.expasy.org), National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov), European Biotechnology Institute (www.ebi.ac.uk), etc. Entre los programas off-line utilizados, se menciona especialmente: Vector NTI 11.0 (análisis de secuencias y análisis de construcciones recombinantes).

6. Técnicas utilizadas para el estudio del ARN

6.1 Extracción de ARN

Se incubaron los microorganismos en caldo BHI hasta alcanzar fase exponencial ($DO_{620nm} = 0,5-0,7$), las células se trataron 1 hora con lisozima 15 mg/ml (SIGMA) y posteriormente se extrajo ARN utilizando TRIZOL® Reagent (Invitrogen) junto con el kit Pure Link® RNA Mini Kit (AMBION, USA). Luego de medir la concentración del mismo y de corroborar su integridad se eliminó la contaminación con ADN utilizando la enzima DNAsa I (Promega). Las muestras de ARN fueron conservadas a $-70^{\circ}C$ hasta su posterior utilización.

6.2 Retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RTqPCR)

Para analizar el nivel de expresión de determinado gen o genes en diferentes condiciones de crecimiento y/o comparar la transcripción del mismo en los distintos aislamientos se convirtió el ARN en ADNc mediante el uso de la enzima transcriptasa reversa M-MLV™ Reverse Transcriptase

(Invitrogen, USA). Posteriormente, a partir de una dilución 1/100 del ADNc se amplificaron por qPCR los genes de interés utilizando para ello la mezcla de reacción comercial SYBR[®] Select Master Mix (Applied Biosystems, USA) y un equipo 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA).

El ciclo umbral, ciclo de cuantificación o C_q “quantification cycle” es el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base, y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde.

Conociendo la eficiencia de la reacción de qPCR mediante la realización de una curva estándar se pudo relacionar los valores de C_q con el logaritmo de la cantidad inicial de molde (N_0), y posteriormente calcular las cantidades relativas normalizadas (NRQ) del gen de interés para cada muestra. Los genes de interés analizados fueron *pbp2*, *pbp4*, y *tnp*. Se realizó la normalización utilizando los genes de referencia *gyrB* y *pta* (13, 47, 53, 141, 142, 145).

Para descartar la contaminación de las muestras con ADN se realizó una reacción control sin transcriptasa reversa.

El ensayo fue realizado por triplicado para cada muestra y condición.

El protocolo detallado de la extracción de ARN y posterior RTqPCR se encuentra en el anexo 2.

7. Selección de mutantes con sensibilidad disminuida a vancomicina

El aislamiento D2, fue inoculado en caldo BHI con vancomicina en concentración ligeramente superior a la CIM (3 µg/ml) y luego incubado hasta la aparición de turbidez. El crecimiento y la pureza del cultivo desarrollado en dicho caldo de cultivo fueron confirmados sembrando en placas de agar BHI con y sin la misma concentración de vancomicina. Partiendo de una colonia crecida en la placa con antibiótico, se sembró un caldo con mayor concentración de vancomicina, y de esta forma se realizó el ciclo de pasajes seriados en caldo BHI con concentraciones crecientes de vancomicina. Las cepas fueron conservadas a -70°C. Partiendo de la misma cepa, D2, se realizaron de esta forma dos experimentos independientes.

8. Análisis de la morfología bacteriana y del grosor de la pared mediante microscopía electrónica de transmisión (MET)

La preparación y análisis de las muestras se realizó según el método descrito por Cui *et al* utilizando para ello cultivos en caldo BHI en fase exponencial ($DO_{620nm} = 0,5-0,7$)(16). En el anexo 2 se describe de forma detallada la preparación de las muestras y obtención de las grillas.

Estas grillas fueron observadas al MET Zeiss 10C y fotografiadas. Se realizó una evaluación morfométrica utilizando imágenes fotográficas con una magnificación de 7.000, 25.000, 50.000, 85.000, 63.000, 100.000 y 125.000X (según fue necesario) y se midió el grosor de la pared celular con el programa ImageJ. Se realizaron mediciones de 30 células en plano ecuatorial de división para cada cepa.

9. Análisis del peptidoglicano

Se realizó la purificación de peptidoglicano a partir de cultivos en caldo BHI en fase exponencial ($DO_{620nm} = 0,5-0,7$), utilizando el protocolo que se describe en el anexo 2, y posteriormente el mismo fue digerido con 0,18 mg/ml de mutanolisina (Sigma-Aldrich). Su composición y grado de entrecruzamiento fueron analizados mediante RP-HPLC. Los cromatogramas fueron analizados comparativamente y las fracciones que presentaron diferencias fueron seleccionadas para el análisis estructural de los muropéptidos mediante espectroscopia de masa con una adaptación del método descrito por Girardin (46).

10. Extracción de proteínas de membrana y análisis de las PBPs

Las fracciones de membrana se separaron por ultracentrifugación diferencial a partir de cultivos en caldo BHI en fase exponencial ($DO_{620nm} = 0,5-0,7$). Se midió la concentración de proteínas con el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se marcaron 100 μ g de proteínas con ampicilina fluorescente durante 30 min, se separaron mediante SDS-PAGE, y las PBPs se visualizaron con un escáner de fluorescencia (PhosphoImager, BioRad) (37). El protocolo detallado se describe en el anexo 2.

11. Estudio del sistema autolítico

Dado que las peptidoglicano hidrolasas se encuentran involucradas en la biosíntesis y remodelamiento de peptidoglicano, se realizaron ensayos de autólisis y se analizó el perfil de enzimas con actividad hidrolítica de peptidoglicano mediante la realización de zimogramas.

Curvas de crecimiento y ensayos de autólisis: Se diluyó 1/1000 un cultivo de 16 hs en caldo BHI y se lo incubó a 37°C con agitación midiendo la DO a 620 nm cada media hora hasta llegar a fase exponencial ($DO_{620\text{ nm}} = 0,5-0,7$). Las células se enfriaron sobre hielo, se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min, y se lavaron con buffer fosfato salino 50 mM pH = 7,00. Posteriormente se resuspendieron en este mismo buffer, y se incubaron a 37°C con agitación. La autólisis fue evaluada observando la disminución de la DO a 620 nm en función del tiempo.

Alternativamente se realizó el ensayo en presencia de un inductor de la autólisis (Tritón X-100). Para ello, se enfrió y centrifugó otra alícuota del mismo cultivo en fase exponencial como se describió anteriormente, y luego de realizar un lavado con agua, las células se resuspendieron en Triton X-100 0,01% - buffer glicina 50 mM pH = 8,00 y se incubaron a 37°C con agitación. La autólisis fue evaluada observando la disminución de la DO a 620 nm en función del tiempo (127).

Extracción de proteínas totales: Se diluyó 1/1000 un cultivo de 16 hs y se lo incubó a 37°C hasta llegar a fase exponencial ($DO_{620\text{ nm}} = 0,5-0,7$). Las células se centrifugaron a 4000 rpm (rotor GSA, Sorvall) durante 10 min a 4°C y se realizó un lavado con buffer fosfato 50 mM pH = 7,00. Se centrifugó a 4000 rpm (rotor GSA, Sorvall) durante 10 min a 4°C y se resuspendió en 3 ml de buffer fosfato conteniendo la siguiente mezcla: 100 µl de Lisostaphyn (Sigma-Aldrich) 1 mg/ml, 150 µl de Mutanolisina (Sigma-Aldrich) 12 U/µl, 20 µl de Benzonasa (DNAsa+RNAsa) (Sigma-Aldrich), 30 µl de buffer Tris ClH 50 mM pH = 7,20 y 3 µl de inhibidor de proteasas. Se incubó en hielo durante 2 horas, y se recuperaron del sobrenadante las proteínas totales luego de centrifugar a 10.000 rpm (rotor SS34, Sorvall) durante 10 min a 4°C.

Zimogramas: La concentración de proteínas fue medida con el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los extractos proteicos de los microorganismos en estudio (10 µg), se separaron en un gel de SDS-PAGE al 10% conteniendo 0,1% de peptidoglicano de la cepa D1. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 15 min en agua, y uno de 30 min en buffer Tris-ClH (pH = 7,50) - Tritón X-100 0,1% - CaCl₂ 10 mM - MgCl₂ 10 mM. El gel fue incubado luego en este mismo buffer a 37°C durante 16 hs para renaturalizar las

autolisinas, y las bandas resultantes fueron visualizadas mediante la tinción con Azul de Metileno 1% - KOH 0,01% (4).

12. Evaluación de la funcionalidad del locus *agr*

Se evaluó la actividad hemolítica mediante la observación de la producción de δ -hemolisina en agar sangre de carnero (140). A partir de cultivos de 24 hs en agar BHI se realizó una suspensión correspondiente a 0,5 de Mc Farland de cada microorganismo. Se sembró en el centro de una placa de agar sangre de carnero una estría de la suspensión de *S. aureus* RN4220, y perpendicularmente a ella se sembraron estrías de las suspensiones de los microorganismos a analizar y se dejaron incubando 24 hs a 37°C. *S. aureus* puede producir distintos tipos de hemolisinas (α , β y δ -hemolisina). La producción de β -hemolisina por la cepa RN4220 permite detectar la producción de δ -hemolisina debido a las interacciones entre ellas (β -hemolisina aumenta la lisis producida por δ -hemolisina, e inhibe la lisis producida por α -hemolisina). Dado que δ -hemolisina se transcribe conjuntamente con RNIII cuando el promotor P3 es activado por AgrA, de esta forma se puede evaluar la funcionalidad del locus *agr*. Se usó como control negativo la cepa N315, que no produce hemólisis.

13. Análisis de la frecuencia mutacional

Las cepas ATCC 29213, D1, D2, D23C9, o D2P11 (con y sin VAN) fueron incubadas en caldo BHI a 37°C con agitación constante hasta alcanzar fase exponencial ($DO_{620nm} = 0,5-0,7$). Se sembraron placas de BHIA para el recuento del número de células totales viables, y placas de BHIA con ciprofloxacina (CIP) (concentración igual a 4 veces la CIM) para el recuento de mutantes. Las placas de BHIA se incubaron 24 hs, y 48 hs aquellas que contenían BHIA+CIP. La frecuencia mutacional se expresó como el número de mutantes resistentes a CIP obtenidas respecto del total de viables, en cada alícuota procesada. Los experimentos se realizaron por triplicado (102).

14. Análisis estadístico de los datos

Todos los datos fueron analizados utilizando el software Infostat. Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.

Los datos se presentan como la media \pm ES cuando se aplican test estadísticos paramétricos, o como la mediana (mín.; máx.) en aquellos casos en los que se aplican test estadísticos no paramétricos.

Para el análisis de asociación entre sensibilidad antibiótica de los aislamientos de SAMR y SAMS recuperados de hemocultivos se utilizó el Test exacto de Fisher. Este mismo test se utilizó para analizar las bacteriemias persistentes y recurrentes y su asociación con la presencia de hVISA.

Se utilizó la prueba de Kruskal Wallis (test no paramétrico) para evaluar si los valores de grosor de la pared celular obtenidos por MET presentaban diferencias significativas en las cepas estudiadas, y el test de Dunn como test a posteriori.

Con el objeto de evaluar si había diferencia significativa en el nivel de expresión de los genes *pbp2*, *pbp4* y *tnp* entre los distintos aislamientos y además evaluar el efecto del tratamiento con concentraciones subinhibitorias de vancomicina (1/4 de la CIM) los datos de NRQ obtenidos por RTqPCR fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores, utilizando el test a posteriori de Duncan.

En todos los casos, $p < 0,05$ fue considerado significativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 1: Sensibilidad disminuída a vancomicina en bacteriemias por *Staphylococcus aureus*

Durante el período comprendido entre agosto de 2009 y noviembre de 2010 se realizó un estudio prospectivo observacional en el Hospital de Clínicas José de San Martín en el cual se estudiaron todos los aislamientos de *S. aureus* recuperados de hemocultivos de pacientes internados en dicho hospital. Inicialmente se estudió un aislamiento por paciente, pero en aquellos casos en los que se recuperó *S. aureus* con posterioridad al tratamiento con vancomicina, se estudiaron además los aislamientos adicionales. En total, 92 pacientes fueron incluidos en el estudio, y se recolectaron 104 aislamientos provenientes de un único o múltiples episodio/s de bacteriemias por *S. aureus*.

1.1 Evaluación de las bacteriemias por *Staphylococcus aureus*: sensibilidad a antibióticos y genotipos

Cuarenta y ocho de los 92 pacientes con bacteriemias por *S. aureus* incluidos en el estudio tuvieron infecciones por SAMS (55,2 %) con CIM₉₀ de oxacilina y cefoxitina: 0,5 y 4 µg/ml respectivamente, mientras que 44 pacientes padecieron infecciones por SAMR (47,8%) con CIM₉₀ de oxacilina y cefoxitina: 512 y 256 µg/ml respectivamente.

Los aislamientos SAMS fueron sensibles a cefalotina y ampicilina sulbactam con una CIM₉₀ de 1 y 2 µg/ml respectivamente.

La resistencia a oxacilina/meticilina (SAOR/SAMR) estuvo asociada a resistencia a gentamicina, eritromicina/clindamicina, y ciprofloxacina de manera significativa ($p < 0,001$, Fisher) (Tabla 1.1).

Al analizar los fenotipos de resistencia a macrólidos se observó que todos los aislamientos SAMS resistentes a eritromicina presentaron resistencia a clindamicina de tipo inducible, iMLS_B (9/9). Por el contrario, en el grupo SAMR, 20/26 (76,9%) presentaron resistencia constitutiva (cMLS_B), 5/26 (19,2%) el fenotipo inducible (iMLS_B) y un solo aislamiento (3,8%) presentó el fenotipo M de eflujo.

Todos los aislamientos resultaron sensibles a vancomicina, teicoplanina, linezolid, y tigeciclina (Tabla 1.1). Adicionalmente, se determinó la sensibilidad para daptomicina por el método de predifusión, y todos los aislamientos resultaron sensibles (halo ≥ 22 mm).

Tabla 1.1. Concentraciones inhibitorias mínimas de los aislamientos de *S. aureus* recuperados de hemocultivos.

Antibiótico	SAMS (n = 48)				SAMR (n = 44)				P
	(µg/ml)			%R ^b	(µg/ml)			%R ^b	
	Rango	CIM ₅₀	CIM ₉₀		Rango	CIM ₅₀	CIM ₉₀		
Gentamicina	0,063-128	0,25	32	12,5	<0,063->512	32	>512	61,4	<0,0001
Eritromicina	0,125->512	0,25	>512	18,75	0,125->512	>512	>512	59	0,0002
Clindamicina	<0,063-0,125	<0,063	0,063	18,75	<0,063->512	0,063	>512	56,8	0,0004
Tetraciclina	0,063-1	0,25	0,5	0	0,063-64	0,125	0,5	4,5	0,23
TMS ^a	0,25-1	1	1	0	0,25->512	1	2	4,5	0,23
Ciprofloxacina	0,063-8	0,25	1	8,3	0,063-256	8	64	59	<0,0001
Tigeciclina	0,125-1	0,25	0,5	0	0,063-1	0,25	1	0	-
Rifampicina	<0,002-0,008	0,004	0,016	0	<0,002-2	0,008	0,5	9,1	0,05
Vancomicina	0,5-2	1	1	0	0,5-2	1	1	0	-
Teicoplanina	0,25-4	0,5	1	0	0,125-2	1	1	0	-
Linezolid	1-4	2	2	0	1-2	2	2	0	-

SAMS: *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina. SAMR: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

^aTMS: Trimethoprima/Sulfamethoxazole, ^b%R: Porcentaje de aislamientos resistentes.

En los aislamientos SAMR se realizó además la detección de los genes *mecA* y *luk-PV*, caracterización del *SCCmec* y genotipificación del locus *agr* mediante reacciones de PCR.

Cuarenta y tres de los 44 aislamientos SAMR fueron *mecA* positivos. Los *SCCmec* más frecuentes fueron *SCCmec I* y *SCCmec IV* (40,9 y 38,6% respectivamente).

El grupo de *agr* más frecuente fue *agr* II (n=23; 52,3 %). Además, 9 aislamientos presentaron *agr* tipo I, 8 *agr* tipo III, 1 *agr* tipo II y III, y 3 no fueron tipificables.

Los genes *luk*-PV fueron detectados solo en 13 de 44 aislamientos, todos ellos en aislamientos con *SCCmec* IVa o *SCCmec* IVc.

El análisis por PFGE mostró que 14/18 aislamientos SAMR con *SCCmec* I estuvieron relacionados al clon Cordobés (pulsotipo D - ST5 - *SCCmec* I - *luk*-PV negativo) previamente descrito en ese hospital (40, 129). La mayoría de los aislamientos con *SCCmec* IV estuvieron relacionados con los clones de SAMR-C descritos en Argentina: pulsotipo C (ST30 - *SCCmec* IVc - *luk*-PV positivo) y pulsotipo A (ST5 - *SCCmec* IVa - *luk*-PV positivo) (9 y 5 aislamientos respectivamente) (Tabla 1.2) (35, 39, 41, 85, 131).

Tabla 1.2. Caracterización genotípica de los aislamientos SAMR según tipo de *SCCmec*, PFGE y MLST.

<i>SCCmec</i>	Nro de aislamientos	Pulsotipo de PFGE	ST ^a	Clon relacionado
I	14	D	5	Clon Cordobés (ST5-I)
	4	Otro	ND ^b	ND ^b
IVc	9	C	30	Clon Southwest Pacific (ST30-IV)
IVa	5	A	5	Clon CAA ^f (ST5-IV)
IV _{NV} ^d	2	B	100	Clon Pediátrico (ST100-IV)
IV _{var} ^e	1	E	72	USA700
V	2	Otro	ND ^b	ND ^b
III	1	Otro	ND ^b	ND ^b
NT ^c	6	Otro	ND ^b	ND ^b

^aST: Secuenciotipo. ^bND: no determinado. ^cNT: no tipable. ^dIV_{NV}: Se detectó el transposón Tn4001 integrado dentro del complejo *mec* de clase B. ^eIV_{var}: Se detectó el gen *tnp20* integrado dentro del complejo *mec* de clase B. ^fClon CAA: Clon de SAMR-C comunitario con pulsotipo A.

1.2 Metodologías para detección de hVISA. Prevalencia de hVISA y VISA en bacteriemias

En el análisis de la sensibilidad a vancomicina se incluyeron 104 aislamientos recuperados de los 92 pacientes con uno o más episodios de bacteriemia por *S. aureus*.

No se encontraron aislamientos VISA ni VRSA por el método de dilución en agar o por Etest. Todos los aislamientos fueron sensibles a teicoplanina con CIM menores o iguales a 4 µg/ml.

Por el método de dilución en agar, el valor de CIM de VAN por debajo del cual se agrupa al 90% de los datos (CIM₉₀) fue de 1 µg/ml tanto para aislamientos SAMS como SAMR (rango de valores comprendido entre 0,5 y 2 µg/ml). Sin embargo, el valor de CIM₉₀ de vancomicina por Etest fue de 1 y 1,5 µg/ml para aislamientos SAMS y SAMR respectivamente (rango de valores comprendido entre 0,38 y 2 µg/ml).

Se evaluaron las diferentes metodologías descritas en la sección anterior para la detección del fenotipo hVISA.

Once de los 104 aislamientos de *S. aureus* recuperados resultaron probables hVISA, siendo sólo 3 de ellos confirmados como verdaderos hVISA por PAP-AUC; dos de los hVISA fueron SAMR y uno SAMS (Tabla 1.3). Todos los hVISA presentaron valores de CIM por Etest entre 1,5 y 2 µg/ml.

Los aislamientos detectados como posibles hVISA presentaron diferentes comportamientos en los métodos de “screening”. Veintisiete aislamientos desarrollaron en al menos 1 metodología de screening. Las placas de screening con antibiótico fueron probadas con dos inóculos bacterianos distintos (10 µl y 1 µl). Utilizando 10 µl se encontraron 19 aislamientos positivos en MHAT5 (uno de ellos hVISA), 15 aislamientos positivos en BHIV3 (dos de ellos hVISA), y dos aislamientos positivos en BHIV4. Por otro lado, al utilizar un inóculo de 1 µl se encontró sólo 1 aislamiento positivo en MHAT5 y 3 aislamientos positivos en BHIV3 (siendo uno de ellos hVISA). Ningún aislamiento fue positivo en las placas de screening BHIV5 y BHIV6 (con ninguno de los inóculos utilizados).

La técnica de macro Etest detectó los 3 aislamientos hVISA (considerando un punto de corte ≥ 6 µg/ml). Además, se detectó un aislamiento con un valor de macro Etest de 6 µg/ml, pero fue negativo por otras metodologías, razón por la cual no fue considerado como probable hVISA. Se

analizó igualmente por el método PAP-AUC y se confirmó que verdaderamente no era hVISA (PAP-AUC/PAP-AUC $\mu_3 = 0,56$).

Por el método de predifusión se detectaron 2 de los 3 hVISA, y sólo 2 fueron falsos positivos. Es notorio que el aislamiento hVISA que no fue detectado con el método de predifusión dio un valor de halo para TEI de 20 mm, cercano al punto de corte (< 20 mm). Mediante el método de referencia no se definieron como hVISA los aislamientos 57748, SAMR-C (*SCC_{mec} V*), y 53735, SAMR-H (*SCC_{mec} I*), con halo para la predifusión de TEI de 11 mm y 10 mm respectivamente, con crecimiento en MHAT5 y uno de ellos también en BHIV3, (PAP-AUC/PAP-AUC de μ_3 fue 0,37 y 0,49 respectivamente). Ambos resultaron positivos con metodologías que utilizan teicoplanina para la detección de hVISA.

Los tres aislamientos confirmados como hVISA (recuperados de los pacientes A, B y C) presentaron valores de CIM por Etest mayor al determinado por el método de dilución en agar y cercanos al punto de corte (1,5 o 2 $\mu\text{g/ml}$). Además, fueron detectados por más de un método de “screening”.

Las características fenotípicas y genotípicas de los 11 aislamientos detectados como posibles hVISA se detallan en la tabla 1.3.

Probables hVISA		CIM (µg/ml)		E-test VAN (µg/ml)	Macro Etest VAN (µg/ml)	Placas de screening 48 hs (10 µl)					Predifusión, diámetro del halo (mm)		<u>PAP-AUC</u> PAP-AUC Mu3	Interpretación
Aislamiento	Características genotípicas	VAN	TEI			MHAT5	BHIV3	BHIV4	BHIV5	BHIV6	VAN 30 µg	TEI 30 µg		
55703	SCC _{mec} I <i>agr</i> II, <i>luk</i> -PV ⁻	1	1	1,5	6	-	-	-	-	-	22	25	1,05	hVISA
55576	SCC _{mec} IV _{NV} <i>agr</i> II, <i>luk</i> -PV ⁻	1	1	2	6	+	+	-	-	-	24	20	0,96	hVISA
53079	SAMS	2	4	2	6	-	+	-	-	-	20	13	1,02	hVISA
53735	SCC _{mec} I <i>agr</i> II, <i>luk</i> -PV ⁻	1	2	1	4	+	+	-	-	-	24	10	0,49	VSSA
57748	SCC _{mec} V <i>agr</i> NT, <i>luk</i> -PV ⁻	1	2	1	4	+	+	-	-	-	25	11	0,37	VSSA
54467	SCC _{mec} I <i>agr</i> II, <i>luk</i> -PV ⁻	1	1	0,75	4	+	+	-	-	-	28	26	0,39	VSSA
54925	SAMS	1	1	0,75	3	-	+	+	-	-	28	27	0,49	VSSA
55133	SCC _{mec} I <i>agr</i> II, <i>luk</i> -PV ⁻	1	1	1	3	+	+	-	-	-	30	27	0,36	VSSA
56617	SCC _{mec} I <i>agr</i> II, <i>luk</i> -PV ⁻	1	0,5	0,5	4	+	+	+	-	-	28	27	0,36	VSSA
58269	SAMS	1	1	1	4	+	+	-	-	-	24	20	0,52	VSSA
55262	SCC _{mec} NT <i>agr</i> II, <i>luk</i> -PV ⁻	0,5	0,5	0,5	4	+	+	-	-	-	25	24	0,32	VSSA

Tabla 1.3 Características fenotípicas y genotípicas de los aislamientos probables hVISA y aquellos confirmados como hVISA por el método patrón.

1.3 Aislamientos hVISA y su asociación con bacteriemias recurrentes/persistentes

Los aislamientos hVISA fueron recuperados de tres pacientes de un total de 92 (3,3%) que sufrieron bacteriemias por *S. aureus* durante 2009-2010 en el Hospital de Clínicas.

Con el objeto de analizar la posible asociación de hVISA con casos de bacteriemias múltiples, se revisó cuántos pacientes tuvieron más de un episodio de bacteriemia durante el período de estudio, y en el caso de recuperarse algún aislamiento hVISA se analizó en qué momento se presentó.

Las bacteriemias múltiples incluyeron bacteriemias persistentes y recurrentes. Se definieron como bacteriemias persistentes por *S. aureus* (PBSA) a aquellas cuya duración fue de más de 7 días a pesar del tratamiento, y bacteriemias recurrentes por *S. aureus* (RBSA) a aquellas que se presentaron luego de una infección por *S. aureus* que curó o con hemocultivos de control negativos.

De los 92 pacientes, 11 presentaron múltiples episodios de bacteriemias, y 81 pacientes presentaron un único episodio. Se recuperaron aislamientos hVISA en 2/11 pacientes con múltiples episodios de bacteriemias (ambos hVISA se recuperaron en el segundo episodio) y en 1/81 pacientes con único episodio. Estos resultados indican que los hVISA estuvieron significativamente asociados con múltiples episodios de bacteriemia ($p = 0,037$, Fisher).

Breve descripción de las bacteriemias asociadas a hVISA

El **paciente A**, presentó una bacteriemia asociada a catéter por SAMR que fue tratada con vancomicina (primer aislamiento, 55603, VSSA). Intratratamiento se recuperó un segundo aislamiento SAMR (55703, hVISA), siendo considerada esta situación clínica una bacteriemia persistente. El paciente no tuvo historias previas de infecciones por *S. aureus* ni tratamientos con glicopéptidos. En la figura 1.1 A se puede observar que el aislamiento 55703 (hVISA) presenta un aumento del área bajo la curva del análisis poblacional (PAP-AUC) al compararlo con el primer aislamiento 55603 (VSSA).

Por el contrario, el **paciente B** tuvo historia de infecciones previas por *S. aureus* y tratamientos con vancomicina. En esta ocasión presentó una bacteriemia recurrente ya que se obtiene el aislamiento SAMR 55343 de sangre de un episodio de bacteriemia sin foco conocido tratado con vancomicina y hemocultivos de control negativo; y posterior episodio de bacteriemia donde se obtuvo un segundo aislamiento SAMR (55576) que fue considerado hVISA. También en este caso se observa un área bajo la curva por PAP-AUC de la cepa 55576 mayor que el aislamiento original 55343 (VSSA) (Fig 1.1 B).

Ambos pacientes (paciente A y B) fallecieron y los estudios de clonalidad de los pares de aislamientos recuperados antes y después del tratamiento con vancomicina mostraron que las cepas fueron isogénicas en el mismo paciente, pero diferentes entre los pacientes A y B (Fig. 1.1).

En el **paciente C**, el aislamiento hVISA recuperado fue un SAMS proveniente de un único episodio de bacteriemia secundaria a parotiditis, que luego de tratamiento con antibióticos β -lactámicos, tuvo buena evolución. Este paciente no requirió tratamiento con vancomicina por tratarse de una cepa sensible a oxacilina.

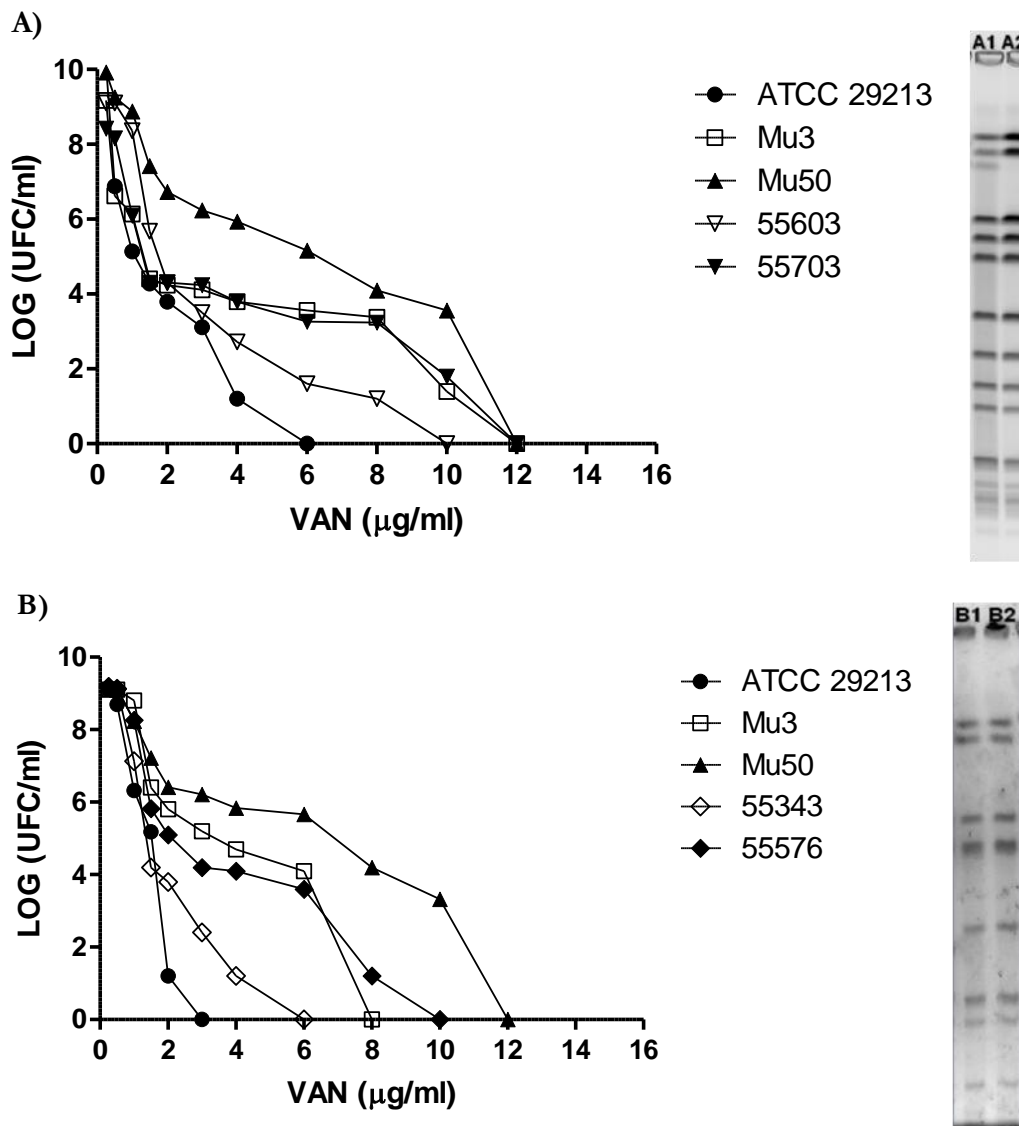


Fig. 1.1. Análisis poblacional y PFGE de los hVISA recuperados de múltiples episodios de bacteriemias por *S. aureus*. ●ATCC 29213, □ Mu3 y ▲Mu50. A) Aislamientos recuperados del paciente A: ▽55603 (primer aislamiento, A1, PAP-AUC: 0,73) y ▼55703 (aislamiento recuperado luego del tratamiento con vancomicina, A2, PAP-AUC: 1,05). B) Aislamientos recuperados del paciente B: ◇55343 (primer aislamiento, B1, PAP-AUC: 0,47) y ◆55576 (aislamiento recuperado luego del tratamiento con vancomicina, B2, PAP-AUC: 0,96).

1.4 Caracterización genotípica de los hVISA y probables hVISA

La caracterización molecular de los aislamientos detectados como probables hVISA se completó mediante PFGE. En el gel se incluyeron como controles cepas de los clones circulantes de SAMR en nuestro país (clon Cordobés, clon comunitario con pulsotipo A y el clon comunitario con pulsotipo C) (Figura 1.2).

Con el fin de estudiar el origen y las posibles relaciones evolutivas de las cepas hVISA encontradas con clones de SAMR detectados en Argentina como prevalentes, se completó la caracterización genotípica de estas cepas mediante la determinación del secuenciotipo por MLST y la secuenciación del gen codificante de la proteína A (*spa*).

Los hVISA encontrados pertenecen a distintos genotipos. Estas características pueden verse tanto en la figura 1.2 como en la tabla 1.4. El aislamiento 55703 (ST5 - SCC*mec* I - *agr* II - *luk-PV* negativo) fue caracterizado como *spa* λ 149 - pulsotipo D, mostrando que este aislamiento es un subtipo del clon Cordobés, previamente descrito como prevalente en el Hospital de Clínicas (40). El aislamiento 55576 (ST100 - SCC*mec* IV_{NV} - *agr* II - *luk-PV* negativo) fue caracterizado como *spa* λ 002 - pulsotipo B, presenta el transposón Tn4001 insertado dentro del complejo *mec* de clase B y está relacionado con el clon pediátrico argentino descrito por Sola y colaboradores (131). El aislamiento 53079 fue caracterizado como SAMS - *spa* λ 267 y pertenece al ST97 de MLST, un secuenciotipo predominante en *S. aureus* aislados de bovinos con mastitis, y también descrito en Argentina como causante de osteomielitis (78).

Tabla 1.4. Características genotípicas de los aislamientos hVISA encontrados en el estudio y de los tipos clonales prevalentes.

Aislamiento	SCC <i>mec</i>	Perfil alélico (<i>arc-aro-glp-gmk-pta-tpi-yqi</i>)	ST	CC	<i>spa</i> tipo
555703	I	1-4-1-4-12-1-10	5	5	λ 149
55576	IV	1-65-1-4-12-1-10	100	5	λ 002
53079	NC	3-1-1-1-1-5-3	97	97	λ 267
Clon Cordobés	I	1-4-1-4-12-1-10	5	5	λ 149
Clon CA Pulsotipo A	IV	1-4-1-4-12-1-10	5	5	λ 311
Clon CA Pulsotipo C	IV	2-2-2-2-6-3-2	30	30	λ 019

ST: secuenciotipo. CC: Complejo Clonal. NC: no corresponde. Clon CA: clon comunitario

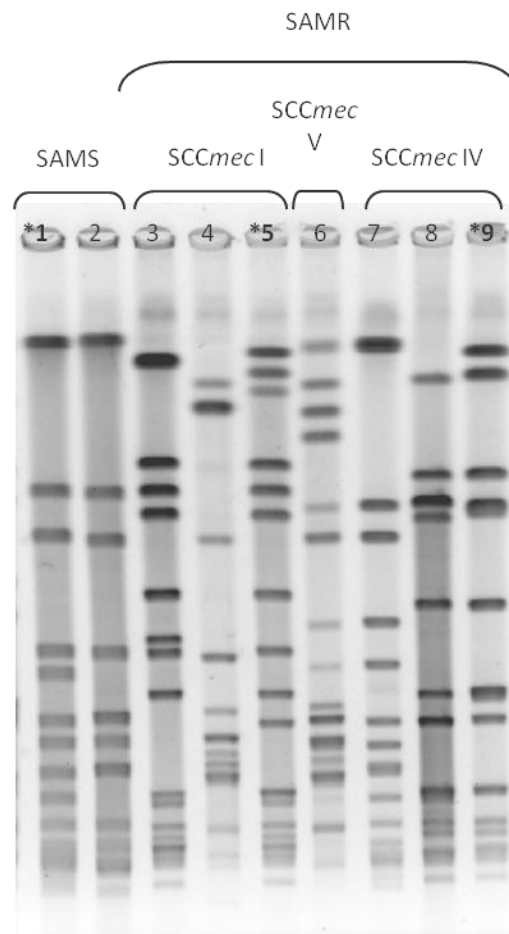


Fig 1.2. Análisis de la clonalidad por PFGE de algunos de los aislamientos detectados como probables hVISA y comparación con los clones prevalentes. Calle 1: 53079, calle 2: 55146, calle 3: Clon Cordobés, calle 4: 53735, calle 5: 55703, calle 6: 57748, calle 7: Clon ST30-SCC*mec* IV-pulsotipo C, calle 8: Clon ST5 SCC*mec* IV-pulsotipo A, calle 9: 55576. ***Aislamiento confirmado como hVISA**

DISCUSIÓN

En este estudio, se describe por primera vez la prevalencia y caracterización molecular de aislamientos hVISA en el Hospital de Clínicas José de San Martín de Buenos Aires, durante 2009-2010. No se encontraron aislamientos VISA y los hVISA fueron poco frecuentes (3,3% de las bacteriemias por *S. aureus*, 4,5% de las causadas por SAMR). Este valor es bajo si se compara con los obtenidos por investigadores de otros países. Por ejemplo, en un estudio multicéntrico llevado a cabo en Turquía durante 2009 y 2010, la frecuencia de hVISA fue de 13 % en las bacteriemias por SAMR (120). En Corea, los porcentajes fueron incluso mayores, se encontraron en el 37,7% de las bacteriemias por SAMR de un hospital durante 2008-2010 (103). Sin embargo, los valores encontrados en nuestro estudio son similares a los encontrados en Taiwan (80).

Como ha sido revisado por Howden y van Hal hay una importante variación en la prevalencia de las cepas hVISA reportada en las distintas regiones geográficas, según la población de pacientes estudiada, y también pueden ocurrir cambios en los porcentajes de hVISA a lo largo del tiempo en determinadas instituciones. Algunas veces, estas variaciones se deben a las diferentes metodologías de screening y confirmación empleadas para definir a las cepas hVISA (59, 143).

En Argentina las cepas hVISA fueron detectadas por primera vez en 2009 (una de ellas en el Hospital de Clínicas) (104, 130), aproximadamente 10 años después de la aparición de los primeros casos en el resto del mundo. Teniendo en cuenta esto, y considerando el impacto de las políticas de uso de los antibióticos es difícil predecir tendencias en la epidemiología de las cepas hVISA a futuro, por lo que será necesario continuar con la vigilancia epidemiológica de estas cepas en esta y otras instituciones de nuestro país.

Las alternativas terapéuticas para pacientes que presenten infecciones por cepas SAMR - hVISA podrían ser daptomicina, linezolid o tigecilina, considerando que los porcentajes de resistencia a estos antibióticos aún son bajos (113) y que en el período de estudio analizado todos los aislamientos resultaron sensibles a estos antibióticos.

La selección de un método que sea óptimo para detectar los aislamientos hVISA es difícil y es también tema de mucho debate. Las dificultades tienen que ver siempre con la población bacteriana bajo estudio, la sensibilidad y la especificidad de las técnicas. En última instancia, dado que no existe un único método de elección siempre se debe recurrir al análisis poblacional PAP-AUC como método confirmatorio.

Si bien varios autores obtienen resultados aceptables al utilizar las placas de screening con antibiótico, en nuestro caso, las mismas no resultaron de utilidad para la detección de hVISA. Las placas de BHIV3 detectaron dos de los 3 hVISA, pero también tuvieron un alto número de falsos positivos, en coincidencia con lo descripto previamente por otros autores (75). Asimismo, se obtuvo un gran número de falsos positivos con las placas de MHAT5; y la utilización de 1 µl de inóculo en lugar de 10 µl no fue de utilidad, dado que disminuyó el número de falsos positivos detectados, pero así también el de verdaderos hVISA.

Entre los probables hVISA identificados mediante las metodologías de screening, se encontraron dos aislamientos que fueron detectados con las placas de MHAT5 y las tabletas de predifusión de teicoplanina, pero no con los métodos que utilizan vancomicina. Esto puede deberse a que, si bien muchas veces los aislamientos VISA y hVISA también presentan disminución en la sensibilidad a teicoplanina (otro glicopéptido), lo contrario no necesariamente es así. Es decir, no todos los aislamientos con sensibilidad disminuída a teicoplanina son hVISA/VISA.

Se ha descripto que la técnica de macro Etest es bastante precisa para detectar hVISA (144). El punto de corte del fabricante es 8 µg/ml, pero el máximo valor obtenido entre todos los aislamientos recuperados en el estudio fue 6 µg/ml (n=4), incluyendo los 3 hVISA, y un aislamiento que sólo resultó positivo por este test y posteriormente no confirmado como hVISA. Por lo tanto, un punto de corte de 6 µg/ml podría resultar de mayor utilidad a la hora de detectar este fenotipo.

La técnica de predifusión con tabletas ha sido descripta para la detección de la resistencia a colistín y la detección de cepas con sensibilidad disminuída a daptomicina y vancomicina (10, 71, 101). Sin embargo, a pesar de que no es un método costoso y podría ser una alternativa simple para la detección de hVISA en la clínica, no había sido evaluado sino hasta hace muy poco tiempo (128). En nuestro caso, los resultados obtenidos con esta metodología fueron aceptables, ya que se detectaron 2/3 hVISA y solo hubo dos falsos positivos. Por lo tanto, la técnica de macro Etest y la de predifusión con tabletas podrían ser útiles como técnicas de screening en la clínica teniendo en cuenta su relación costo/beneficio. Para poder corroborar esto sin embargo, serían necesarios más estudios en nuestro país que evalúen la utilidad de dichas técnicas con un mayor número de aislamientos.

Los valores de la CIM determinada por Etest en las 3 cepas hVISA, son mayores a los obtenidos por el método de dilución en agar y se encuentran más cercanos al punto de corte. Esta observación es coincidente con resultados de otros grupos de investigación (111, 117). Sumado a esto, dos de los 3 casos estuvieron asociados a mortalidad. El uso de la vancomicina para el tratamiento de

bacteriemias por SAMR con CIMs de vancomicina cercanas al punto de corte ($2 \mu\text{g/ml}$), es bastante controversial. Algunos autores han demostrado una relación entre las CIMs de vancomicina elevadas ($\geq 1,5 \mu\text{g/ml}$ por Etest) y fracaso terapéutico con vancomicina (133, 135, 149), mientras que otros autores no observaron asociación (77, 124). De todas formas, se continúa recomendando vancomicina para el tratamiento de las bacteriemias por SAMR cuya CIM de VAN sea $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ por Etest, y los cambios que se realicen en esta terapia deben ser guiados por la respuesta clínica del paciente (82).

A pesar de que aún no hay un método de elección que resulte factible de ser aplicado de rutina en el laboratorio de bacteriología, la combinación de E-test de VAN $> 1 \mu\text{g/ml}$, macro E-test $\geq 6 \mu\text{g/ml}$ y el método de predifusión con tabletas de VAN y/o TEI, podría ser utilizada como alerta frente a la presencia de un probable aislamiento hVISA el cual requeriría posterior confirmación.

Aunque el fenotipo hVISA ha sido descrito principalmente en aislamientos SAMR, también ha sido descrito en SAMS (9, 42, 104). En el caso de las cepas hVISA recuperadas en este estudio, 2/3 fueron SAMR mientras que 1/3 fue SAMS. Además, no estuvieron asociadas con la diseminación de un clon en particular, dado que los genotipos de los hVISA encontrados son distintos, por lo cual dicha emergencia se ha producido como resultado de eventos independientes. En otros casos sin embargo, la diseminación es clonal y los valores de prevalencia altos (42).

De todas formas, es de destacar que dos de estas cepas, pertenecen al mismo complejo clonal (el complejo clonal 5). El complejo clonal 5 (CC5) está ampliamente diseminado en Argentina y en el mundo (22, 38, 131), posee elevada epidemividad y virulencia, sumado a que los aislamientos VRSA encontrados pertenecen al ST5 (72). La elevada prevalencia y extraordinaria plasticidad genómica de este linaje podría explicar la amplia proporción de aislamientos hVISA, VISA y VRSA (61, 72).

Aunque el clon ST30 - *SCC_{mec} IVc* - pulstipo C, recientemente descrito como la principal causa de infecciones por SAMR-C en Argentina (35, 85), fue uno de los más frecuentes en el estudio, no se encontraron cepas hVISA con este genotipo. En consecuencia, teniendo en cuenta que estas cepas podrían tener una etiología poligénica, la emergencia del fenotipo hVISA en cepas de este nuevo clon prevalente deberá ser determinada en el futuro.

Resulta interesante, que uno de los hVISA encontrados es metilino sensible y el paciente no fue tratado con vancomicina. Por tanto, las modificaciones que lleven al desarrollo de hVISA no necesariamente podrían adquirirse en presencia de la presión selectiva de la vancomicina, sino que podrían ser el resultado de la influencia de otros factores. Relacionado a esto, se ha realizado un

estudio retrospectivo en Japón donde se reporta la emergencia de cepas hVISA antes de la introducción de vancomicina como tratamiento (154). Se ha descrito además la selección del fenotipo hVISA/VISA *in vitro* en cepas tratadas con otros antibióticos, como rifampicina, o concentraciones subinhibitorias de antibióticos β -lactámicos (69, 114, 150).

Durante el período del estudio, fue posible concluir que aunque no siempre los episodios de recurrencia y persistencia de bacteriemias por *S. aureus* se relacionan con la presencia de cepas hVISA, estas resultaron más frecuentes en estas situaciones clínicas. Adicionalmente, y en concordancia con lo descrito por varios autores, dos de las tres cepas hVISA fueron seleccionadas luego del tratamiento con vancomicina (59). Entonces, la emergencia de este fenotipo debe ser especialmente atendido en pacientes con dichas situaciones clínicas.

Como una limitación del estudio cabe destacar que el pequeño número de cepas hVISA encontradas resulta insuficiente para generalizar conclusiones acerca de los métodos adecuados para la detección de este fenotipo. Nuestras observaciones deberán ser corroboradas con un mayor número de cepas en futuros estudios de vigilancia en entornos clínicos argentinos. Sin embargo, estos resultados constituyen una importante contribución al conocimiento fenotípico, genético y clínico de la epidemiología de las cepas hVISA teniendo en cuenta que es el primer estudio de este tipo realizado en nuestro país.

Capítulo 2: Aproximaciones al conocimiento de las bases moleculares implicadas en la sensibilidad disminuída a la vancomicina en *Staphylococcus aureus*

Este capítulo del trabajo de tesis fue desarrollado estudiando un par de aislamientos recuperado de un paciente internado en el Hospital de Clínicas José de San Martín durante enero-marzo del año 2009, que sufrió una infección osteoarticular con mala respuesta terapéutica luego de 40 días de tratamiento con vancomicina. Se estudiaron las cepas aisladas antes y después del tratamiento con esta droga (D1 y D2 respectivamente).

Caso Clínico

Un paciente masculino de 30 años con leucemia mieloide aguda M4 (desde 2007), en remisión completa y plan de trasplante alógeno de médula ósea, consulta por dolor de tobillo derecho de 40 días de evolución, e impotencia funcional 48 hs previas. Se le diagnosticó en otro centro asistencial sepsis con probable foco articular, y recibió tratamiento con Piperacilina/Tazobactam. Posteriormente fue derivado al Hospital de Clínicas, donde se le tomaron hemocultivos y se realizó una punción articular. Del líquido articular se aisló *S. aureus* SAMR (D1) con concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM) de vancomicina (VAN): 0,5 µg/ml y 16 µg/ml respectivamente. Se indicó VAN (30 mg/kg/día) y 5 días de amikacina. Se le realizó una artrotomía con limpieza quirúrgica, y se tomaron hemocultivos de control que resultaron negativos. Al tratamiento antimicrobiano se agregó rifampicina durante 15 días. El paciente presentó evolución tórpida con persistencia de registros febriles y con secreción purulenta; se suspendió la rifampicina y se agregó clindamicina durante 24 días. Luego de 40 días de tratamiento con vancomicina se realizaron varias limpiezas quirúrgicas, de donde se aisló SAMR D2, cuya CIM de VAN fue 1,0 µg/ml y la CBM 128 µg/ml. Se agregó ciprofloxacina durante 10 días. Se diagnosticó osteomielitis de tobillo por resonancia magnética nuclear y se descartó endocarditis por medio de ecocardiograma transesofágico. Se rotó el tratamiento antibiótico a linezolid y levofloxacina y se indicó cámara hiperbárica. El paciente presentó buena evolución clínica.

Selección de mutantes con mayor resistencia a vancomicina

A partir del aislamiento D2, fue posible seleccionar en dos experimentos independientes mutantes con sensibilidad disminuída a vancomicina (VISA). Uno de ellos llegó a desarrollar en

caldo BHI con concentraciones de vancomicina de hasta 9 $\mu\text{g/ml}$ (D23C9) y el otro en hasta 11 $\mu\text{g/ml}$ de vancomicina (D2P11).

Al evaluar comparativamente el crecimiento de los cuatro aislamientos (D1, D2, D23C9, y D2P11) siguiendo el aumento de DO a 620 nm, se pudo determinar que la fase de latencia, adaptación o “fase lag” difiere entre ellos pero luego alcanzan velocidades de crecimiento similares. La cepa D1 presenta una fase de latencia de 120 min, D2 de 150 min, y los mutantes D23C9 y D2P11 poseen una fase de latencia mucho mas larga (270 y 360 min respectivamente). Además, el mutante D23C9 se caracteriza por formar acúmulos bacterianos durante su crecimiento y presenta gran adhesión a los recipientes en los que se cultiva.

2.1 Sensibilidad a los antibióticos de D1, D2 y mutantes D23C9 y D2P11

Tanto los aislamientos clínicos como los mutantes seleccionados fueron analizados con algunos de los métodos de screening y confirmatorios aplicados en el Capítulo 1 de este trabajo. Si bien los aislamientos clínicos se mostraron como sensibles al determinar la CIM a vancomicina, se vió que el valor determinado por Etest es mayor al determinado por microdilución y dieron resultados positivos en varios test de screening: BHIV3, macro Etest y predifusión (Tabla 2.1). Ambos aislamientos clínicos fueron catalogados como hVISA mediante análisis poblacional (PAP-AUC), y además la cepa D2 presenta un aumento en el área bajo la curva respecto de la cepa original D1.

Los mutantes presentan un aumento en la CIM para vancomicina respecto de la cepa parental D2, y son catalogados como VISA (CIM = 4-8 $\mu\text{g/ml}$). Presentaron además un aumento del área bajo la curva en el análisis poblacional (PAP-AUC) respecto de la cepa D2. (Tabla 2.1, Fig. 2.1)

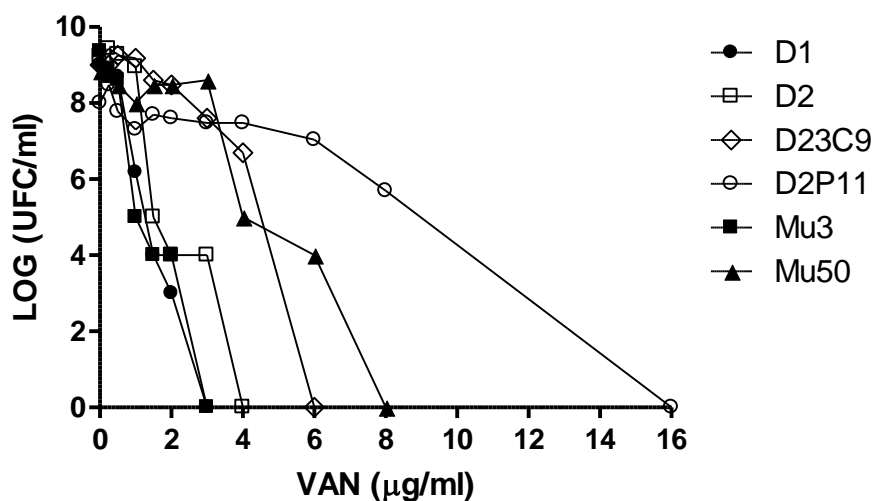


Fig. 2.1. Análisis poblacional PAP-AUC de los aislamientos clínicos D1, D2, y los mutantes seleccionados D23C9, y D2P11.

Tabla 2.1. Sensibilidad a antibióticos por CIM por microdilución, Etest, metodologías de screening y análisis poblacional (PAP-AUC).

	D1	D2	D23C9	D2P11
CIM VAN ($\mu\text{g/ml}$)	0,5	1	4	8
CIM VAN (Etest) ($\mu\text{g/ml}$)	2	3	ND	ND
Macro Etest VAN ($\mu\text{g/ml}$)	6	8	ND	ND
BHIV3	-	+	ND	ND
Predifusión VAN/TEI (diámetro del halo, mm)	22/18	20/22	6/5	0/14
PAP-AUC/PAP-AUC Mu3	0,98	1,48	2,81	5,7
Interpretación	hVISA	hVISA	VISA	VISA
CIM OXA ($\mu\text{g/ml}$)	128	2	8	32
Predifusión DAPTO (diámetro del halo, mm)	30	30	22	18
CIM DAPTO (Etest) ($\mu\text{g/ml}$)	ND	0,38	0,5	1
CIM RIF ($\mu\text{g/ml}$)	8	4	1	2

VAN: vancomicina. OXA: oxacilina. DAPTO: daptomicina. RIF: rifampicina. ND: no determinado.

Las cepas SAMR D1 y D2 que resultaron hVISA presentaron resistencia simultánea a gentamicina (dato no mostrado) y rifampicina. Los mutantes obtenidos D23C9 y D2P11 además de mostrar un incremento de la resistencia a vancomicina, mantuvieron la resistencia a gentamicina y por el contrario mostraron una disminución de la CIM de rifampicina y un gradual aumento de la CIM de daptomicina (Tabla 2.1). Otro aspecto llamativo fue que al comparar la cepa D1 francamente oxacilino-resistente (CIM 128 $\mu\text{g/ml}$) con la cepa D2, luego de la presión selectiva ejercida *in vivo* por el tratamiento con vancomicina, disminuye la CIM de OXA a 2 $\mu\text{g/ml}$; sin embargo los mutantes D23C9 y D2P11 presentan un aumento inesperado de la resistencia a oxacilina, respecto de la cepa parental D2, pero sin alcanzar el nivel de resistencia de la cepa D1.

Estabilidad del fenotipo hVISA/VISA en D2 y los mutantes seleccionados

Se analizó si el fenotipo hVISA/VISA era estable, es decir si luego de pasajes seriados en medio sin vancomicina se mantenía el nivel de resistencia. Para ello se determinó la CIM para vancomicina

por microdilución a los aislamientos luego de 30 y 60 días de pasajes en medio de cultivo sin antibiótico.

Tabla 2.2. CIM para vancomicina determinada luego de pasajes diarios en medio sin antibiótico.

Cepa	CIM VAN ($\mu\text{g/ml}$)		
	Día 0	Día 30	Día 60
D2	1	1	1
D23C9	4	4	4
D2P11	8	8	2

No hubo diferencias en el valor de la CIM para la cepa D2 (hVISA) y uno de los mutantes (VISA). En el caso del mutante D2P11 (VISA), la CIM disminuyó 2 diluciones luego de 60 pasajes en medio sin antibiótico, lo que significaría que la cepa se habría vuelto sensible a vancomicina (VSSA), según los puntos de corte del CLSI ($\leq 2 \mu\text{g/ml}$).

Sin embargo, dado que la determinación de la CIM no permite diferenciar entre hVISA y VSSA se exploró en el mutante D2P11 luego de 60 días de pasaje (D2P11p60) la sensibilidad a vancomicina por el método de predifusión con tabletas. Los valores de diámetro del halo fueron 20 mm y 20 mm para vancomicina y teicoplanina respectivamente. Estos valores indicarían que el mutante D2P11p60 no sería VSSA sino hVISA (teniendo en cuenta el punto de corte ≤ 22 mm para VAN y < 20 mm para TEI). Por otro lado, para corroborar si la cepa D2 (hVISA) se volvía más sensible a vancomicina luego de 60 días de pasaje se realizó también el ensayo de predifusión con tabletas. No se encontraron variaciones en los diámetros del halo descriptos en la tabla 2.1.

2.2 Caracterización genotípica

La clonalidad de las cuatro cepas fue demostrada por PFGE (Fig. 2.2), en el que se vio además la aparición de una banda adicional en el mutante D2P11 y cambio en 3 bandas en el mutante D23C9 (aparición de 2 bandas, desaparición de una) con respecto al perfil de las cepas clínicas D1 y D2.

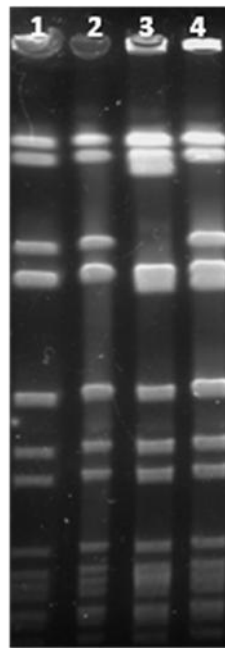


Fig. 2.2. PFGE.
Calle 1: D1
Calle 2: D2
Calle 3: D2 3C9
Calle 4: D2 P11

En las 4 cepas se verificó la presencia del gen *mecA*. Mediante las metodologías convencionales no se pudo asignar un tipo de *SCCmec*. Sin embargo, mediante mapeo por PCR se detectó la presencia del transposón Tn4001 “downstream” a los genes *mecA*- Δ *mecRI*, pero no pudieron detectarse los genes de la recombinasa (*csr*) ni se pudieron amplificar por PCR las regiones J1/J2 del *SCCmec* IV (Fig 2.3).

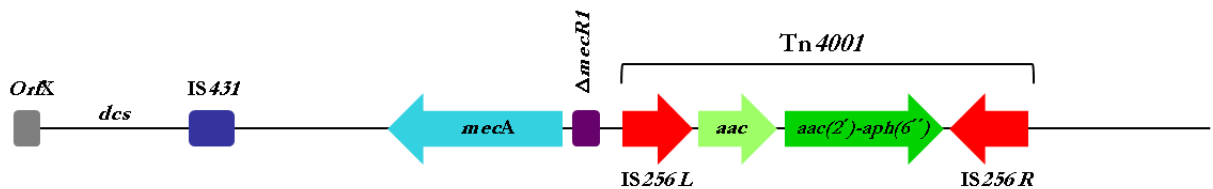


Fig. 2.3. Esquema del *SCCmec* de las cepas en estudio.

Las cepas son *luk*-PV negativas, presentan un *spa* tipo *t002* y pertenecen al secuenciotipo 100 de MLST. El locus *agr* sin embargo, no pudo ser caracterizado en el mutante D23C9 (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Características genotípicas del locus *agr* del par de aislamientos y los mutantes seleccionados.

	D1	D2	D23C9	D2P11
Grupo de <i>agr</i>	II	II	NT	II
<i>agrAC</i>	+	+	+	+

NT: no tipificable.

2.3 La pared celular y el metabolismo del peptidoglicano

Grosor de la pared celular

Se realizó un análisis morfométrico del grosor de la pared celular de las cepas en estudio mediante microscopía electrónica de transmisión.

Luego de analizar entre 20 y 30 mediciones tomadas, se vieron diferencias significativas entre los valores del grosor de la pared celular de las cepas en estudio ($p < 0,0001$, Kruskal Wallis). Para las cepas D2, D23C9 y D2P11 estos valores fueron significativamente mayores que los de D1 y la cepa sensible ATCC 29213 ($p < 0,05$, Test a posteriori de Dunn) (Fig. 2.4 y Fig. 2.5).

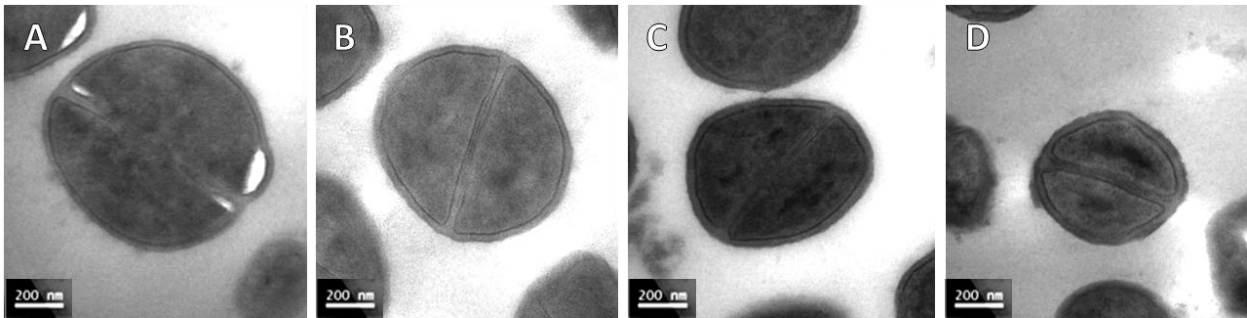


Fig. 2.4. Microscopía electrónica de transmisión. Fotos tomadas a 50.000X. A: D1, B: D2, C: D23C9, D: D2P11.

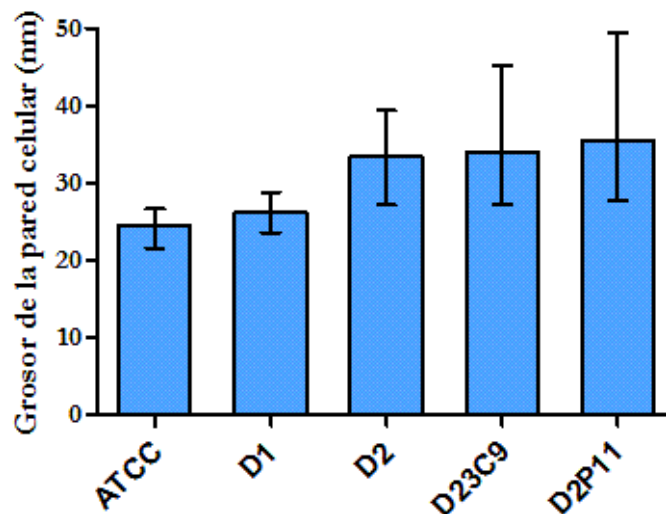


Fig. 2.5. Grosor de la pared celular (nm), expresado como la mediana de las mediciones realizadas sobre 20-30 células. ATCC (24,57 nm), D1 (26,19 nm), D2 (33,41 nm), D23C9 (34,07 nm), D2P11 (35,54 nm). Las barras de error representan el rango de valores de los datos.

Un hallazgo interesante fue que en las muestras del mutante D23C9 se visualizó un fondo colmado de restos celulares probablemente debido a la lisis celular, hecho que se evidencia en las fotos de la figura 2.6. Este fenómeno no fue observado en las muestras de las otras cepas.

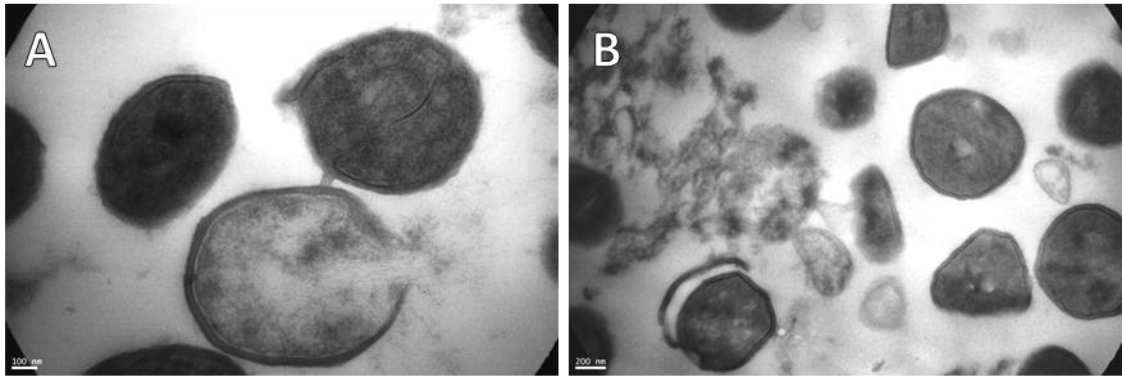


Fig. 2.6. Microscopía electrónica de transmisión del mutante D23C9. Fotos tomadas a 80.000X (A) y 50.000X (B).

Análisis comparativo de la composición del peptidoglicano

El perfil de elución de los muropéptidos de las 4 cepas fue similar, pero se encontraron diferencias en las cantidades relativas de dos picos en las cepas D2, D23C9 y D2P11 al compararlas con la cepa original D1.

El análisis de la composición de los picos que mostraron diferencias se realizó mediante espectrometría de masa. Se observó un incremento en el área bajo la curva de un muropéptido con tiempo de retención de 47 minutos, correspondiente con un monómero disacárido pentapéptido con puente de 5 glicinas. El segundo pico cuantitativamente diferente presentó una disminución en el área bajo la curva de un muropéptido con tiempo de retención de 64 minutos. El análisis estructural reveló identidad con un tetrámero de disacárido pentapéptido con puentes de 5 glicinas (Fig. 2.7., 2.8., y 2.9. Tabla 2.4.).

Fig. 2.7. Perfiles de elución de muropéptidos por HPLC. A: D1, B: D2, C: D23C9, D: D2P11.
Las flechas muestran los picos que presentan diferencias.

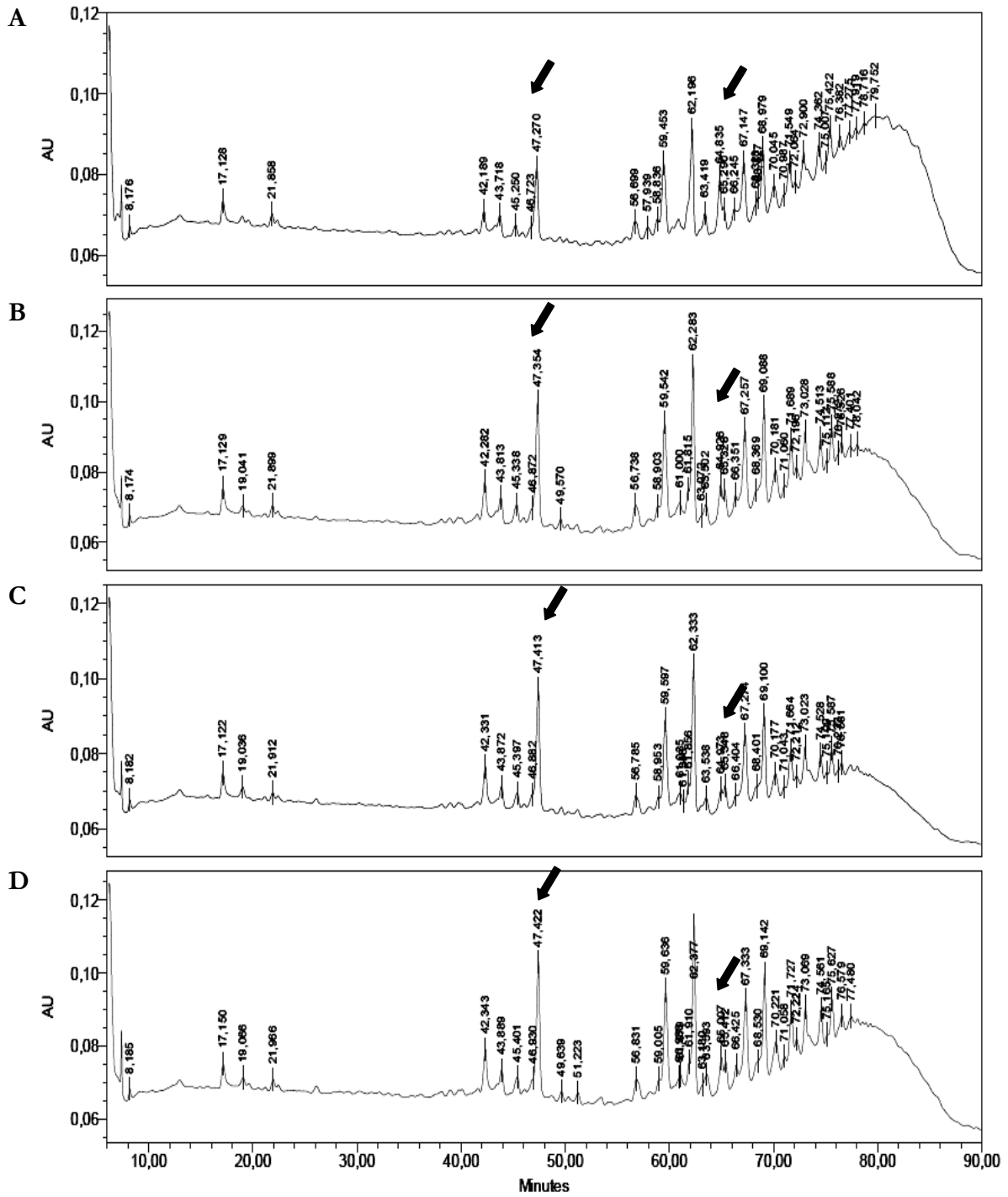


Tabla 2.4. Área y % de área de los picos que presentaron diferencias.

TR (min)	Área				% Área total en cromatograma			
	D1	D2	D2 3C9	D2 P11	D1	D2	D2 3C9	D2 P11
47	423518	842629	775369	858342	7,64	10,45	13,06	11,28
64	353892	232403	127738	249301	6,38	2,88	2,15	3,28

TR: tiempo de retención

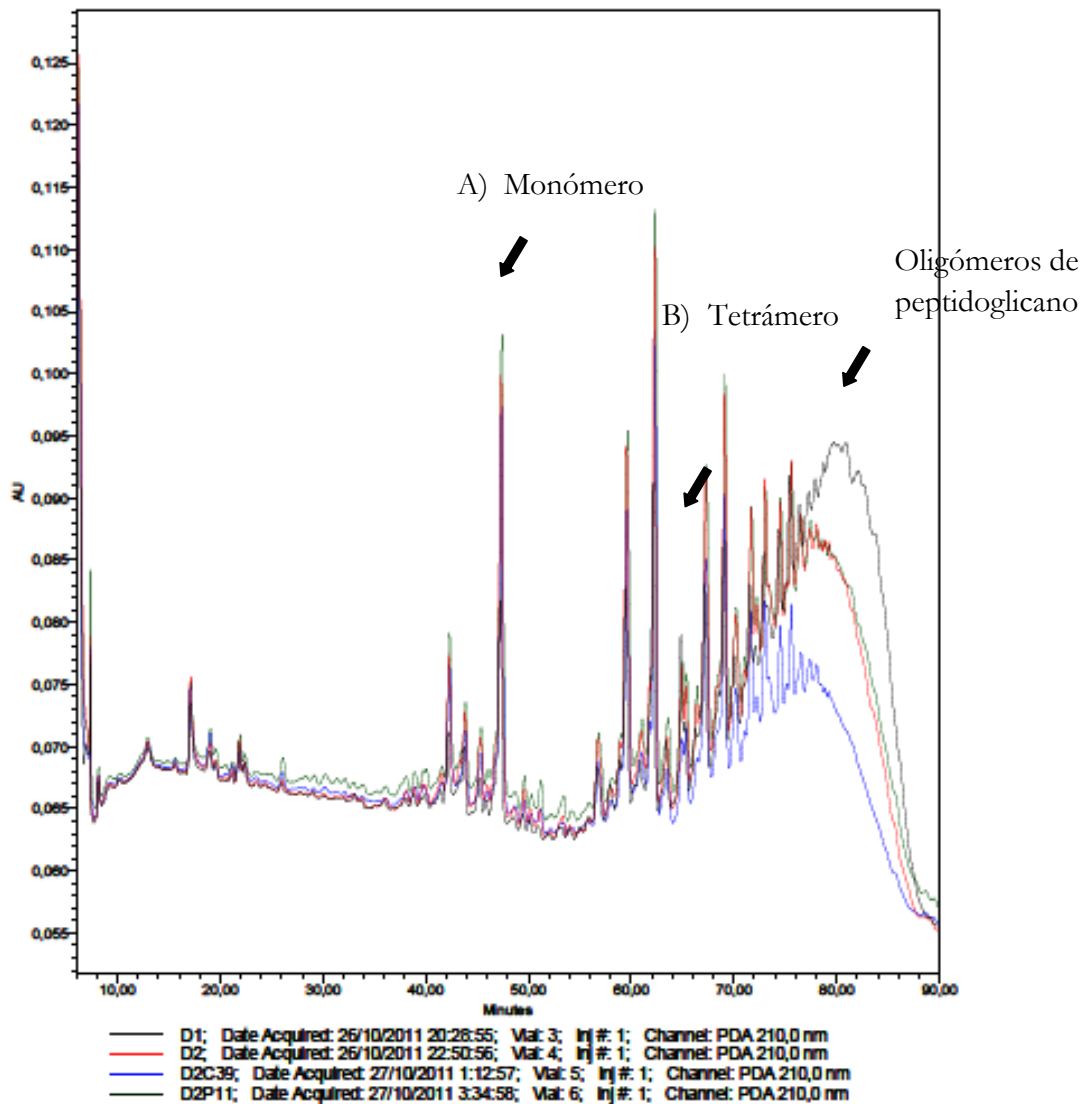


Fig. 2.8. Perfiles de elución de muropéptidos por HPLC. Las flechas muestran los picos que presentan diferencias y la región donde eluyen los oligómeros de peptidoglicano.

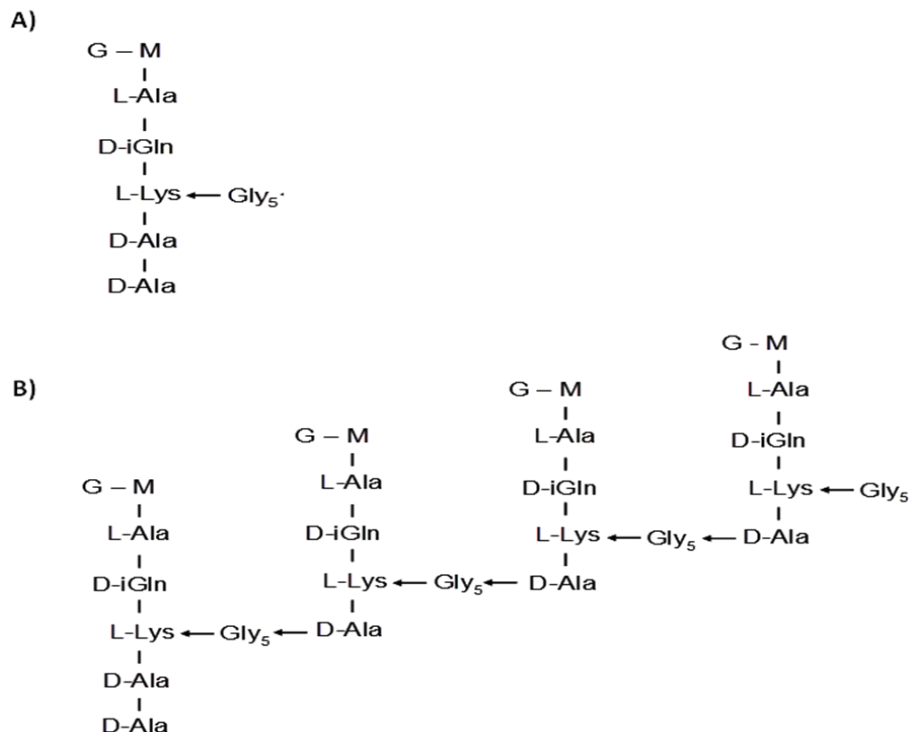


Fig. 2.9. Estructuras resueltas por espectroscopía de masa de los muropéptidos que eluyeron a 47 min (A), y 64 min (B). G=N-Acetilglucosamina, M=N-Acilmurámico.

Como puede verse además en la figura 2.7 y 2.8, el final del cromatograma muestra diferencias en las mismas cepas. Se puede ver como el área debajo de esta región es menor en las cepas D2, D2P11 y D23C9 en comparación con D1. Esta región del cromatograma se corresponde con oligómeros más entrecruzados de peptidoglicano que no terminan de resolver y eluyen juntos.

Perfil de Proteínas de membrana y perfil de PBPs

Se realizó un gel de SDS-PAGE para evaluar el perfil de proteínas de membrana y se vieron cambios en distintas proteínas en los cuatro aislamientos (Fig. 2.10).

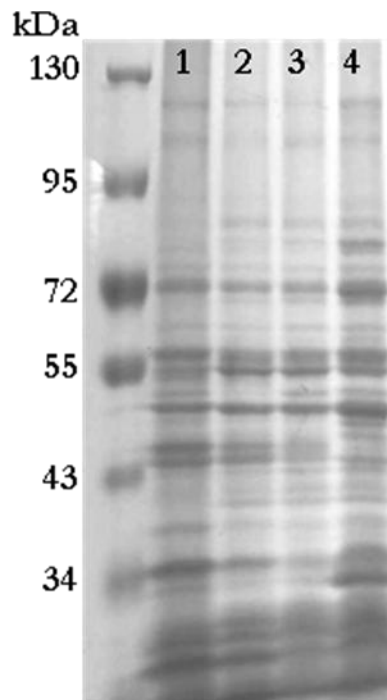


Fig. 2.10. Perfil de proteínas de membrana. Gel de SDS-PAGE al 7,5% teñido con Coomassie blue. Se sembraron 200 μg de proteína en cada calle. Calle 1: D1; calle 2: D2; calle 3: D23C9; calle 4: D2P11.

En las bacterias las proteínas de membrana tienen funciones diversas, como el transporte y secreción pero también se incluyen muchas enzimas que participan en la síntesis tanto de la membrana como del peptidoglicano. En este grupo se hallan las PBP's con sus diferentes actividades enzimáticas. Para analizar si estas diferencias se debían a cambios en las las PBP's, se incubaron las proteínas de membrana con ampicilina fluorescente durante 30 min, y luego de realizar un gel de SDS-PAGE, las PBP's fueron visualizadas con un escáner de fluorescencia (PhosphoImager, BioRad). Se encontró que la banda que se corresponde con la migración de PBP2 y PBP2a (81 kDa y 78 kDa respectivamente) presentó mayor intensidad en las cepas D2 y D23C9 y D2P11. No se pudo visualizar correctamente la banda correspondiente a PBP4 (45 kDa) (Fig. 2.11 A).

Para evaluar si el aumento de intensidad en esa banda se debía a PBP2 o PBP2a, se preincubaron las proteínas con ampicilina 200 μM durante 10 min previo al agregado de ampicilina fluorescente.

Incubando durante tiempos cortos, la ampicilina sin marcarse se une covalentemente a todas las PBP's, excepto a PBP2a (ya que esta tiene baja afinidad por los β -lactámicos). Al incubar posteriormente con ampicilina fluorescente durante más tiempo (30 minutos) la única PBP que se

marca es PBP2a. La mayor intensidad de banda vista en la cepa clínica D2 y sus mutantes derivados podría deberse entonces a una mayor expresión de PBP2 (Fig. 2.11 B).

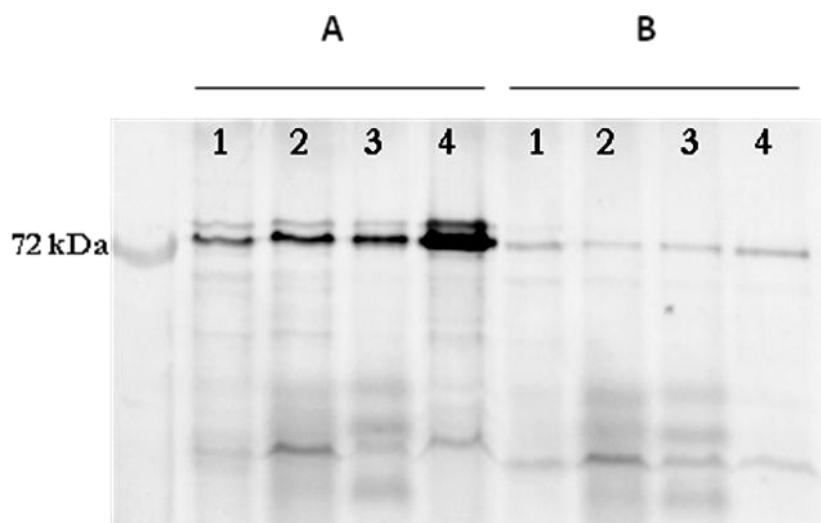


Fig. 2.11. Perfil de PBPs. Gel de SDS-PAGE al 10%. Se sembraron 100 μg de proteína en cada calle. Calle 1: D1; calle 2: D2; calle 3: D23C9; calle 4: D2P11. **A:** Proteínas incubadas 30 min a 37°C con ampicilina fluorescente 25 μM . **B:** Proteínas incubadas 10 min a 37°C con ampicilina 200 μM y luego 30 min a 37°C con ampicilina fluorescente 25 μM . Las PBPs fueron visualizadas en un escáner de fluorescencia.

Análisis de la expresión de genes codificantes de PBPs

Se realizó RTqPCR para evaluar cambios en la expresión de los genes *pbp2* y *pbp4* (involucrados en la síntesis de peptidoglicano) en las distintas cepas. Se analizó además el efecto de concentraciones subinhibitorias de vancomicina ($\frac{1}{4}$ de la CIM) sobre la transcripción de estos genes.

Se encontró diferencia significativa en el nivel de expresión de los genes *pbp2* y *pbp4* ($p=0,013$ y $p=0,040$ respectivamente, ANOVA). Las cepas D2, D23C9, y D2P11 presentan mayor nivel expresión del gen *pbp2* que D1 ($p<0,05$, Duncan). Este resultado coincide con el obtenido al analizar la expresión de las PBPs con ampicilina fluorescente. Se encontró además, que el mutante D23C9, presenta menor nivel de expresión del gen *pbp4* ($p<0,05$, Duncan).

El tratamiento con $\frac{1}{4}$ de la CIM de vancomicina no produjo efecto significativo en el nivel de expresión de ninguno de los dos genes evaluados ($p=0,4026$ y $p=0,3985$, para *pbp2* y *pbp4* respectivamente, ANOVA) (Fig. 2.12).

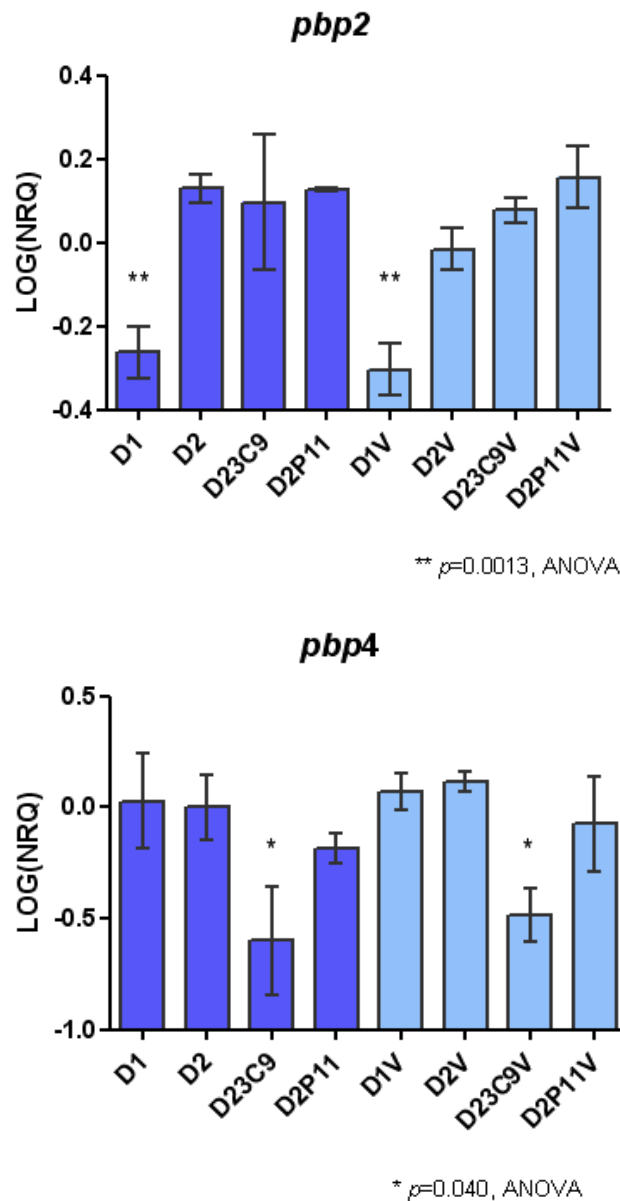


Fig. 2.12. Nivel de expresión de los genes *pbp2* y *pbp4* por RTqPCR. Cuando se indica la letra V junto a los nombres de las cepas, corresponden a cultivos incubados con vancomicina en concentración equivalente a $\frac{1}{4}$ de la CIM. NRQ: Cantidad relativa normalizada. Las barras representan la media de 3 determinaciones.

Ensayos de autólisis

La activación del sistema autolítico de las cepas se analizó en buffer fosfato 50 mM pH=7,00 (Fig. 2.13 A) y en presencia de tritón X-100 (un inductor de la autólisis) (Fig. 2.13 B). Los aislamientos clínicos mostraron perfil de autólisis similar, mientras que el mutante D2P11 en presencia tritón tuvo menor actividad autolítica. El mutante D23C9 mostró mayor actividad autolítica en ambos casos, incluso al no estar inducida la autólisis.

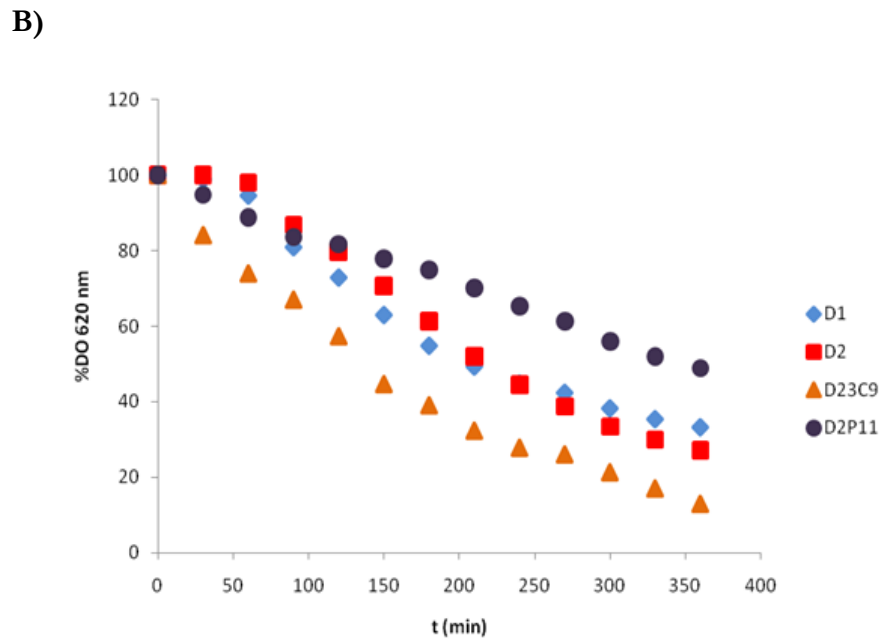
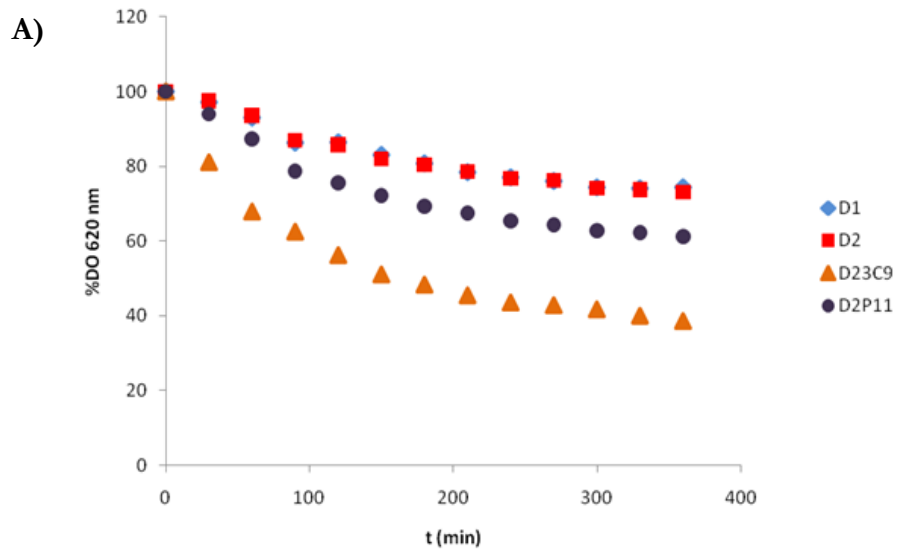


Fig. 2.13 A) Ensayo de autólisis en buffer fosfato 50 mM pH=7,00. **B)** Ensayo de autólisis en Tritón X-100 0,01%, buffer glicina 50 mM pH = 8,00. Los resultados se expresaron como % de la DO a 620 nm respecto de la DO inicial.

Perfil de peptidoglicano hidrolasas

Se evaluó el perfil de las peptidoglicano hidrolasas (autolisinas) mediante la realización de un zimograma utilizando como sustrato peptidoglicano extraído de la cepa D1 (Fig. 2.14).

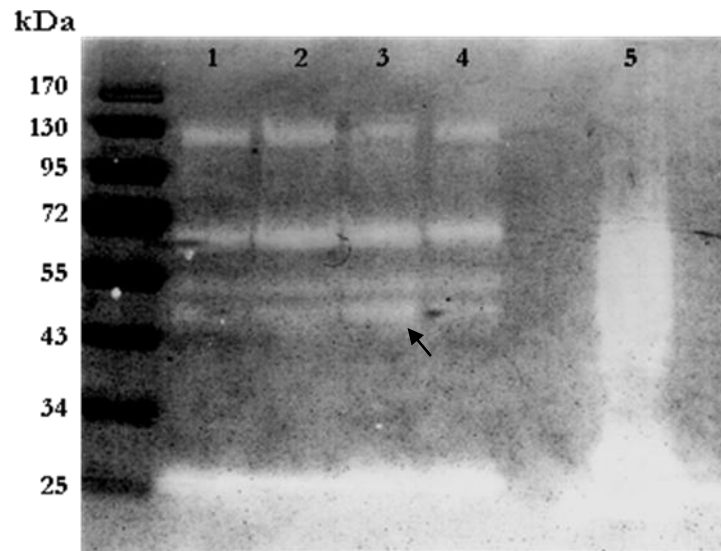


Fig. 2.14. Zimograma. Gel de SDS-page al 10%, con peptidoglicano de la cepa D1 al 0,2%. Se sembraron 10 μ g de proteína en cada calle. Calle 1: D1; calle 2: D2; calle 3: D23C9; calle 4: D2P11; calle 5: control lisostafina (25kDa).

Si bien el patrón de autolisinas en las cepas D1-D2 y los mutantes seleccionados es similar, para el mutante D23C9 se vio un incremento en una banda de peso molecular entre 43 y 55 kDa (Fig. 2.14, flecha), compatible con la glucosaminidasa (GL) de 51 kDa generada por clivaje de la autolisina Atl.

2.4 Eventos genéticos relacionados con el desarrollo del fenotipo hVISA/VISA.

Mutaciones asociadas a modificaciones en la sensibilidad a Vancomicina

Varios autores han descripto mutaciones en determinados genes involucrados en la biosíntesis de pared y otros genes del metabolismo intermedio que podrían asociarse a la resistencia en cepas hVISA/VISA (7, 17, 59, 125).

Para evaluar si las cepas en estudio presentaban algunas de esas mutaciones, se amplificaron por PCR y se secuenciaron los operones *waSR* y *walKR* y sus promotores; y un fragmento correspondiente a la RRDR del gen *rpoB*.

No se encontraron mutaciones en ninguno de los dos operones involucrados con la síntesis de pared celular ni en sus promotores. Sin embargo, se encontró en las 4 cepas una sustitución en el gen *rpoB* que provoca el cambio aminoacídico H481N. Este cambio confiere resistencia a rifampicina (RIF) y ya había sido asociado a cepas hVISA/VISA (57). Los mutantes D23C9 y D2P11 son más sensibles a RIF que la cepa parental D2. Por lo tanto, es posible que estas cepas posean alguna mutación en una región del gen *rpoB* localizada por fuera de la estudiada (RRDR) que explique el cambio en la resistencia.

Análisis de la frecuencia mutacional

Dado que la resistencia a CIP está asociada a mutaciones puntuales en su sitio blanco, es posible plantear que la existencia de un estado de hipermutabilidad esté vinculado a un incremento en el número de mutaciones en genes asociados a la resistencia. Para evaluar la existencia de dicho estado en los aislamientos hVISA y los mutantes seleccionados VISA, se determinó la frecuencia de mutación como se describió en materiales y métodos. Este ensayo se realizó además para cultivos incubados en presencia de concentraciones subinhibitorias de VAN (1/4 de la CIM en cada cepa) para evaluar si la vancomicina en concentraciones subinhibitorias podría aumentar la frecuencia mutacional. En ninguna de las 4 cepas se vio aumento de la frecuencia mutacional, ni tampoco en presencia de VAN (Tabla 2.5).

Tabla 2.5. Frecuencia mutacional de las cepas incubadas en presencia o ausencia de vancomicina (1/4 de la CIM). La frecuencia mutacional está expresada como el número de mutantes resistentes a CIP recuperadas respecto de las viables totales. Se muestra la media de 3 determinaciones.

Aislamiento	Frecuencia mutacional	Frecuencia mutacional + VAN 1/4 MIC
ATCC 29213	$5,11 \times 10^{-8}$	$7,19 \times 10^{-8}$
D1	$5,32 \times 10^{-8}$	$3,44 \times 10^{-7}$
D2	$1,18 \times 10^{-7}$	$2,1 \times 10^{-7}$
D23C9	$<1 \times 10^{-8}$	$<1 \times 10^{-8}$
D2P11	$1,57 \times 10^{-7}$	$4,71 \times 10^{-8}$

Movilización de IS256 en cepas clínicas y sus mutantes

Considerando los cambios en la sensibilidad a oxacilina en las cepas en estudio y la imposibilidad para caracterizar completamente el SCC_{mec} mediante las PCRs que se utilizan convencionalmente, se pretendió explorar posibles cambios en la movilidad del fragmento que contiene el gen *mecA* utilizando una sonda específica para este gen. Dado que se encontró el transposón Tn4001 dentro del complejo *mec*, se utilizó también una sonda específica para IS256. Adicionalmente, se utilizó una sonda para la región *agrAC* del locus *agr* dado que, como se describió antes, el locus *agr* de una de los mutantes no fue tipificable.

El perfil de hibridación correspondiente al gen *mecA* fue idéntico en las cuatro cepas. Sin embargo, se vio un aumento en el número de bandas que hibridan con la sonda de IS256 en el aislamiento recuperado posterior al tratamiento con vancomicina (D2) y en los mutantes seleccionados (D23C9, D2P11).

En el mutante D23C9 se vio además el cambio en el perfil de hibridación de *agrAC* (Fig. 2.15). En este mutante no pudo ser genotipificada la región variable del locus *agr* por PCR (Tabla 2.3).

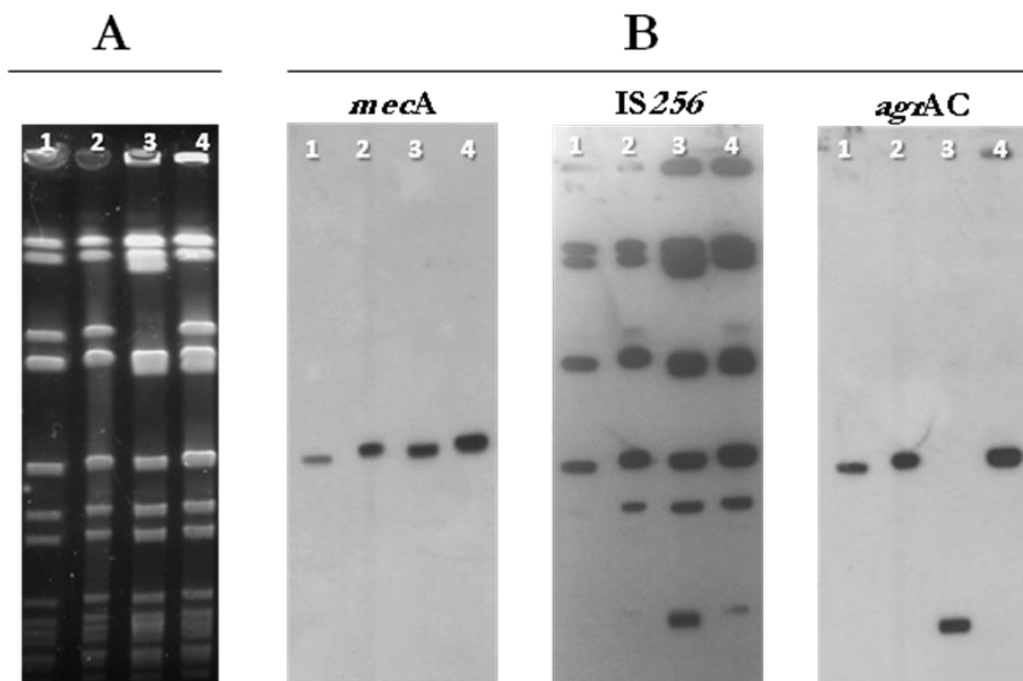


Fig. 2.15. A) Electroforesis en gel por campo pulsado. B) Southern blot. Calle 1: D1, calle 2: D2, calle 3: D23C9, calle 4: D2P11

Análisis de la expresión del gen codificante de la transposasa de IS256

Se realizó RTqPCR para evaluar cambios en la expresión del gen codificante de la transposasa de IS256 (*tnp*) en las distintas cepas. Se analizó además el efecto de concentraciones subinhibitorias de vancomicina (1/4 de la CIM) sobre la transcripción de este gen.

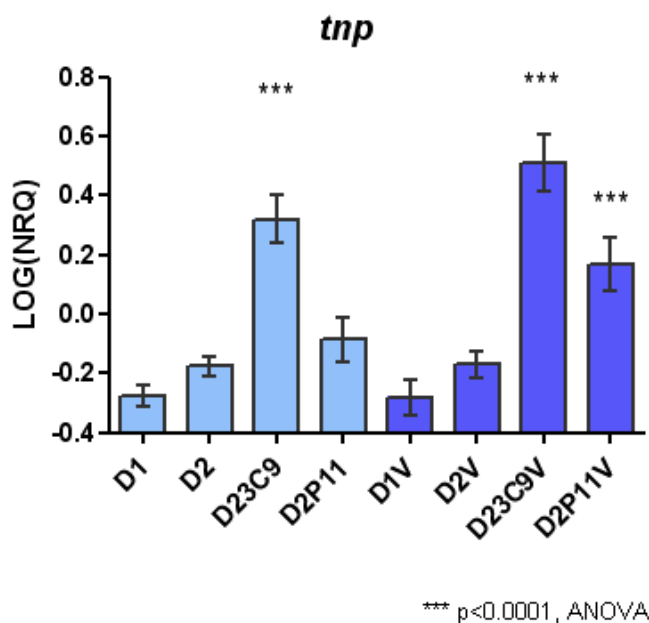


Fig. 2.16 Nivel de expresión del gen *tnp* por RTqPCR. Cuando se indica la letra V junto a los nombres de las cepas, corresponden a cultivos incubados con vancomicina en concentración equivalente a 1/4 de la CIM.

NRQ: Cantidad relativa normalizada. Las barras representan la media de 3 determinaciones.

Se encontró diferencia significativa en el nivel de expresión del gen *tnp* ($p < 0.0001$, ANOVA). Hay una expresión significativamente mayor de *tnp* en el mutante D23C9 ($p < 0.05$, Duncan), y se ve como las cepas D2 y D2P11 muestran con clara tendencia mayores niveles de expresión del gen *tnp* que la cepa D1, si bien el análisis estadístico no lo toma como significativo. Esto se correlaciona con los resultados obtenidos en el southern blot (Fig. 2.15 B y Fig. 2.16).

Por otro lado, el tratamiento con concentraciones subinhibitorias de vancomicina (1/4 de la CIM) produce un efecto significativo en la expresión del gen *tnp* ($p = 0.0335$, ANOVA). Los mutantes D23C9 y D2P11 al ser incubados en estas condiciones muestran tener niveles de expresión de *tnp* significativamente mayores que al ser incubadas sin antibiótico, y estos niveles son significativamente mayores que los de la cepa parental D2 ($p < 0.05$, Duncan).

La funcionalidad del locus *agr* en cepas hVISA y VISA isogénicas

La producción de δ -hemolisina por las cepas D1, D2 y el mutante D2P11 indican la funcionalidad del locus *agr*. Sin embargo, el otro mutante, D23C9, poseería un locus *agr* no funcional dado que no mostró ningún tipo de hemólisis, como en el caso de la cepa control N315 (Fig. 2.17). En dicho mutante, no pudo tipificarse el locus *agr* al realizar la PCR múltiple de la región variable. Luego de realizar mapeo por PCR y secuenciación, se determinó que este fenotipo se debe a la inserción de IS256 dentro del gen *agrB*.

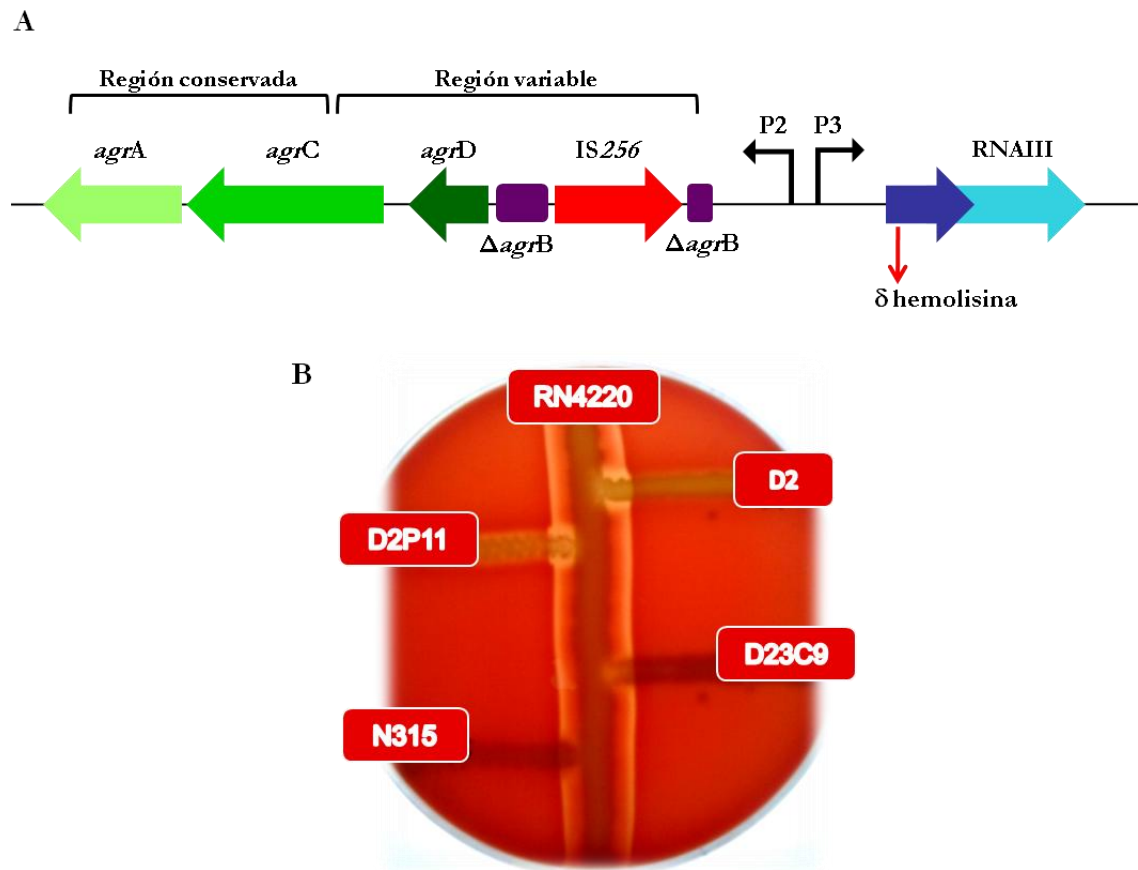


Fig. 2.17. Esquema del locus *agr* en el mutante D23C9 (A). Ensayo de funcionalidad de dicho locus (B).

DISCUSIÓN

Se estudió un par de aislamientos proveniente de un paciente que sufrió una infección osteoarticular, previo y posterior al tratamiento con vancomicina durante 40 días (D1 y D2 respectivamente). Asimismo, este paciente en el curso de su tratamiento con vancomicina fue tratado con diversos antibióticos hasta que logró resolver la infección.

El fracaso terapéutico en el caso D1-D2 está relacionado con la existencia de una población heterogénea compuesta por células sensibles y resistentes a vancomicina (hVISA). Teniendo en cuenta la diversidad de factores que podrían estar involucrados (sistema inmune del paciente, características propias del microorganismo y del tratamiento antibiótico, etc), se podría decir que las cepas hVISA podrían ser tanto una causa, como una consecuencia del fracaso terapéutico con vancomicina y este es un punto muy debatido por algunos investigadores (143).

La cepa D2 posee un valor de CIM de 1 $\mu\text{g/ml}$ (VSSA de acuerdo al CLSI). Según los puntos establecidos por Wooton y colaboradores, el valor de PAP-AUC de D2 respecto del PAP-AUC de la cepa control Mu3 indicaría que se trata de una cepa VISA (esta relación es mayor a 1,3). Sin embargo para la definición de las cepas VISA el criterio que se prioriza es el valor de CIM y su categorización de acuerdo al CLSI. Es por esto que se definió a la cepa D2 como hVISA, tomando en cuenta los resultados de ambas metodologías.

Mediante pasajes seriados con vancomicina fue posible seleccionar mutantes con sensibilidad disminuida (VISA) a partir de un aislamiento clínico que presentaba una población con resistencia heterogénea (D2), demostrando la implicancia de los hVISA como precursores de cepas VISA. De manera similar, varios autores lograron seleccionar el fenotipo VISA in vitro a partir de un aislamiento sensible (107), y en algunos casos se dispone de toda una serie de aislamientos clínicos isogénicos que muestran la adquisición gradual de la resistencia durante el curso del tratamiento con vancomicina (127). Debería considerarse entonces que es posible seleccionar una cepa VISA intratamiento con vancomicina, pero obviamente esto dependerá del fondo genético de cada cepa, las características del tratamiento y de la situación particular de cada paciente.

El aumento en un muropéptido monomérico y la disminución de su correspondiente tetrámero que fue encontrada tanto en la cepa clínica D2 como en las mutantes derivadas al analizar la composición del peptidoglicano por HPLC, sugiere una disminución en su entrecruzamiento, respecto de la cepa original D1 (mas sensible a vancomicina). En el mutante D23C9 esta disminución de entrecruzamiento fue más notoria, y esto se pudo correlacionar con una menor

expresión del gen *pbp4*. Este gen codifica para la única PBP con actividad carboxipeptidasa que posee *S. aureus* (PBP4) y cumple un rol importante en el entrecruzamiento de las cadenas de peptidoglicano. Adicionalmente, se corroboró en las mismas cepas (D2 y los mutantes derivados) un aumento de grosor de la pared celular y un aumento en la expresión del gen *pbp2* que se correlacionarían con un aumento de la síntesis de peptidoglicano. Los cambios en la expresión de los genes *pbp2* y *pbp4* no parecen ser inducidos por la presencia de vancomicina en concentraciones de 1/4 de la CIM según los resultados de RTqPCR.

Estos hallazgos no difieren respecto de los descriptos previamente para cepas hVISA y VISA (59), y reafirman la hipótesis planteada inicialmente. Las bases moleculares implicadas en el desarrollo de este fenotipo estarían entonces relacionadas a una modificación en el metabolismo del peptidoglicano. Frente al estrés antibiótico se produciría un aumento de la síntesis de la pared celular, y un menor entrecruzamiento de la misma, que dejaría más sitios D-Ala-D-Ala libres a los que se uniría la vancomicina, limitando su llegada hacia el septo bacteriano y evitando su acción bactericida.

Sin embargo, a diferencia de lo reportado por otros grupos de investigación, no se encontraron mutaciones que pudieran estar causando alteraciones en los operones *vra*TSR ni *wal*KR (relacionados con la síntesis y homeostasis de la pared celular). Los cambios observados en el peptidoglicano de las cepas estudiadas, podrían entonces ser originados por una modificación en la expresión de tales sistemas. Por ejemplo, un aumento en la expresión de los genes *vra*T o *vra*S llevarían a una activación del operón *vra*TSR, y posterior aumento de la expresión del gen *pbp2* (que es regulado por este sistema) y de la resistencia a vancomicina, tal como se vio en las cepas estudiadas en este capítulo.

Alternativamente, estos cambios podrían ser originados por diversos factores. Si bien no se vio un aumento en la frecuencia mutacional seleccionando en placas con ciprofloxacina y sólo se encontró una mutación en el gen *rpo*B que podría relacionarse con las resistencias observadas (57), no es posible desestimar (o ignorar) posibles mutaciones puntuales en otros genes que ya han sido asociados con la resistencia a glicopéptidos y otros antibióticos, o aún más, mutaciones todavía no descriptas en otros loci.

Resulta de interés el hecho de que si bien los aislamientos clínicos y los mutantes obtenidos in vitro son isogénicos, y presentan varias características fenotípicas/genotípicas comunes a los hVISA/VISA reportados mundialmente, hay muchas otras características que los distinguen.

A pesar de que una reducida funcionalidad del locus *agr* ha sido asociada con la disminución de la sensibilidad a vancomicina (119), nuestros resultados muestran que a partir de una misma cepa parental pueden obtenerse mutantes con niveles de resistencia a vancomicina comparables independientemente de la funcionalidad de dicho locus. Entonces, el desarrollo del fenotipo VISA, parecería ser independiente de este locus, o bien podría alcanzarse por distintos mecanismos, teniendo en cuenta que en eventos independientes se podrían seleccionar mutaciones distintas.

El hecho de que los factores que favorecen el desarrollo de cepas hVISA/VISA sean posiblemente diversos, se correlaciona muy bien con la variedad de mutaciones observadas que llevan a fenotipos similares, pero no completamente idénticos en estas cepas.

Este concepto se podría aplicar también para explicar las diferencias en los perfiles de autólisis, y/o el hecho de que el fenotipo hVISA/VISA haya sido estable en algunas cepas y en otra no (como en el caso de D2P11). Muchos autores sugieren que las cepas VISA presentan disminución de la velocidad de autólisis y en algunas el fenotipo no es estable (11, 59), pero en nuestro caso a partir de la misma cepa parental se obtuvieron mutantes que presentan diferencias en estas características. El mutante D23C9 presenta autólisis más rápida (evidente además al visualizar las fotos de microscopía electrónica) y una banda de mayor actividad hidrolítica en el zimograma de peptidoglicano que se correspondería con la mayor expresión de la isoforma GL de la autolisina mayoritaria Atl. Los efectos de la presión selectiva ejercida por vancomicina parecen ser más bien azarosos, pero en conjunto, llevan a un aumento de la resistencia a este antibiótico probablemente gracias a cambios en el metabolismo del peptidoglicano.

Además de las diferencias ya descritas, la presión ejercida por vancomicina (tanto *in vitro* como *in vivo*) produjo cambios en la sensibilidad a otras familias de antibióticos. Por ejemplo, en las cepas clínicas D1-D2, y las mutantes seleccionadas (D23C9, D2P11), el aumento de la resistencia a vancomicina se vio asociado además a cambios en la resistencia a oxacilina (que también actúa a nivel de la síntesis de la pared celular), rifampicina (actúa a nivel de la síntesis de ARN) y daptomicina (actúa a nivel de la membrana plasmática). Varios autores ya han reportado al aumento de la resistencia a daptomicina junto con vancomicina (15, 18, 113). Si bien la disminución en la resistencia a oxacilina también fue reportada en cepas VISA (3, 112), es particularmente interesante como aumenta dicha resistencia en los mutantes.

Estudios previos en *S. aureus* han demostrado que a partir de una población heteroresistente a β -lactámicos es posible seleccionar poblaciones más homogéneas que expresan mayor nivel de meticilino resistencia, en paralelo con un aumento de la frecuencia mutacional, y activación del

sistema SOS (19, 20, 136). Por tanto, se podría postular que un estado de hipermutabilidad estaría implicado en un incremento en el número de mutaciones puntuales en genes asociados a las resistencias observadas. Un aumento en la transposición de secuencias de inserción (IS) podría contribuir con dicho estado de hipermutabilidad. En el futuro se deberán realizar experimentos que permitan determinar la implicancia de diversos mecanismos (transposición, mutaciones puntuales, regulación de la expresión de genes) en el cambio de resistencia a antibióticos observado D2 y los mutantes.

El análisis por MLST mostró que las cepas D1-D2 pertenecen al ST100 dentro del complejo clonal 5, y este genotipo coincide con el de un aislamiento hVISA del mismo hospital (aislamiento 55576 del estudio prospectivo del capítulo 1). Al realizar la comparación de los pulsotipos de PFGE y el secuenciotipo obtenido por MLST con los clones circulantes se observa que estas cepas están relacionadas con el clon pediátrico argentino (ST100 - SCC_{mec} IV_{NV}) (131). Sin embargo, a diferencia del aislamiento 55576, la tipificación completa del SCC_{mec} no pudo realizarse por métodos tradicionales, probablemente debido a reordenamientos genéticos del SCC_{mec}. Curiosamente, un SCC_{mec} con estructura compleja de tipo “mosaico” se ha descrito previamente en la cepa SAMR ZH47, que también posee $\Delta mecR1$ interrumpido por el transposón Tn4001 y pertenece al ST100 (54), lo que podría indicar que los reordenamientos genéticos son bastante comunes en cepas pertenecientes a este linaje.

Utilizando una sonda específica para IS256 se pudo demostrar que las diferencias observadas en el PFGE de las mutantes seleccionadas, podrían explicarse debido a un aumento en la transposición de este elemento en presencia de la presión selectiva del antibiótico; esto fue corroborado adicionalmente al analizar la expresión del gen *tnp* de IS256 por RTqPCR. Se detectó la inserción de IS256 dentro del gen *agrB* en el mutante D23C9 y se demostró que esta mutación restringe la funcionalidad del locus *agr*. Simultáneamente con este trabajo de tesis, Nagel y colaboradores describieron en una cepa de laboratorio, que en presencia de vancomicina, aumenta la frecuencia de transposición de la secuencia de inserción IS256 (99).

Este trabajo describe por primera vez el aumento de la transposición de IS256 en una cepa de origen clínico hVISA del ST100 seleccionada in vivo posterior al tratamiento con antibióticos, y en sus mutantes seleccionados in vitro. Existen escasos reportes que describen inserciones de IS256 en cepas VISA, siendo todas ellas pertenecientes a otros linajes genéticos (ST239 y ST247) (65, 89). Como ya se ha mencionado, el ST100 es parte del complejo clonal 5 (CC5), el cual se encuentra ampliamente distribuido en Argentina (40, 41, 131).

El aumento en la trasposición de IS256 asociado con la progresión al fenotipo hVISA en la cepa D2 indicaría que este fenómeno se puede dar también en el entorno clínico. Adicionalmente, se demostró un aumento de la expresión del gen de la transposasa de IS256 al incubar los mutantes VISA (D23C9 y D2P11) con concentraciones subinhibitorias de VAN (1/4 de la CIM). Es decir, la trasposición de esta secuencia de inserción fue estimulada no sólo por concentraciones cercanas a la CIM (que dieron lugar a la selección de D2 y sus mutantes), sino también por concentraciones subinhibitorias del antibiótico. El aumento de la trasposición podría llegar a tener lugar entonces, en aquellas situaciones clínicas donde no se alcanzan las concentraciones de antibiótico adecuadas: regímenes terapéuticos subóptimos, o tratamiento de infecciones en tejidos donde la droga tiene pobre distribución y penetración.

Como fue sugerido anteriormente, el estrés antibiótico puede derivar en una activación/auto activación de la trasposición de IS256 (99, 123). Por lo tanto, la presión selectiva de vancomicina y otros antibióticos durante largos períodos de tratamiento podría aumentar la frecuencia de trasposición de este elemento y en última instancia, desencadenar reordenamientos genéticos que podrían estar involucrados en el desarrollo de la resistencia a vancomicina. Sin embargo, puede que el aumento en la trasposición de IS256 sea un fenómeno paralelo al desarrollo de la resistencia a este antibiótico.

En futuros experimentos valdría analizar la expresión del factor de transcripción SigB, su regulador *rsbU* y la implicancia de estos en el desarrollo del fenotipo hVISA/VISA. SigB es un factor de transcripción que se activa en respuesta al estrés celular (por ejemplo, en presencia de vancomicina), y recientemente ha sido involucrado en la regulación de la trasposición de IS256, del locus *agr*, de la autólisis, de la formación de biofilm mediada por IS256, (23, 58, 142). Quizás este análisis logre explicar los cambios observados a nivel del locus *agr*, el perfil de las peptidoglucano hidrolasas, así como también en el patrón de resistencia a antibióticos.

No parecería existir un único mecanismo implicado en el desarrollo del fenotipo hVISA/VISA. Teniendo en cuenta los resultados del capítulo 1 de esta tesis y los de otros investigadores, *S. aureus* pertenecientes a distintos genotipos pueden dar lugar al desarrollo del fenotipo hVISA/VISA, ya sea luego del tratamiento con vancomicina o incluso con otros antibióticos (61, 69, 114, 150). Considerando además los resultados analizados en el presente capítulo, se podría postular, que durante el curso del tratamiento de una infección por *S. aureus*, diversos antibióticos (en concentraciones subinhibitorias y/o cercanas a la CIM) provocan un estrés celular independientemente del genotipo de la cepa que se trate. Este estrés provocado por los antibióticos

estaría actuando de diferentes maneras: seleccionando variantes resistentes (subpoblaciones preexistentes o nuevas) y generando variabilidad genética y fenotípica al desencadenar eventos mutacionales (aumento de la transposición de secuencias de inserción, activación del sistema SOS, mutaciones puntuales, cambios en la expresión génica) que contribuirían con la plasticidad genética y evolución de *S. aureus*. La diversidad de fenómenos mutacionales desencadenados generaría diversidad de efectos, entre los que se encuentran los cambios en el metabolismo del peptidoglicano que contribuyen en última instancia con el desarrollo de cepas hVISA/VISA. Esta hipótesis deberá ser corroborada en el futuro analizando posibles relaciones entre los factores mencionados anteriormente

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

CAPÍTULO 1: Sensibilidad disminuída a vancomicina en bacteriemias por *Staphylococcus aureus*

- En el período 2009-2010 en el Hospital de Clínicas José de San Martín, no se encontraron aislamientos VISA ni VRSA y la frecuencia de aparición de los hVISA es baja (3,3%).
- La mayoría de los hVISA y VISA reportados emergen a partir de cepas de SAMR, sin embargo en nuestro estudio se describió una cepa hVISA sensible a meticilina. Este resultado remarca la importancia de realizar la búsqueda de hVISA tanto en aislamientos SAMR como SAMS.
- Los hVISA encontrados son genótipicamente distintos, por lo tanto la emergencia de estas cepas no se debe a la diseminación de un clon en particular en el período estudiado.
- Las placas de “screening” con antibiótico no resultaron de utilidad para la detección de cepas hVISA.
- No se pudo proponer un único método de elección para la detección de cepas hVISA en los laboratorios clínicos, pero la combinación de métodos (E-test de VAN > 1 µg/ml, macro E-test ≥ 6 µg/ml y el método de predifusión con tabletas de VAN y/o TEI) podría utilizarse como alerta frente a la presencia de un probable hVISA que posteriormente deberá ser confirmado mediante análisis poblacional.
- Dos de las 3 cepas hVISA estuvieron asociadas a bacteriemias recurrentes y/o persistentes por *S. aureus*, por lo tanto la posible presencia de estas cepas deberá ser tomada en cuenta especialmente en dichas situaciones clínicas.

CAPÍTULO 2: Aproximaciones al conocimiento de las bases moleculares implicadas en la sensibilidad disminuída a la vancomicina en *Staphylococcus aureus*

- Se comprobó que el fracaso terapéutico con vancomicina en el caso D1-D2 está relacionado con la existencia de una población heterogénea compuesta por células sensibles y resistentes a vancomicina (hVISA).
- Mediante pasajes seriados con vancomicina fue posible seleccionar mutantes con sensibilidad disminuida (VISA) a partir de una población con resistencia heterogénea (hVISA).
- Los mutantes seleccionados presentaron distinto antibiograma. La presión ejercida por VAN produjo cambios en la sensibilidad a otras familias de antibióticos.
- El fenotipo hVISA/VISA fue estable excepto en el mutante D2P11 (disminución de la CIM a VAN a los 60 días).
- Una de las cepas hVISA (D2) y sus mutantes derivados presentan aumento del grosor de la pared celular y un aumento en la expresión del gen *pbp2*.
- El aumento en un muropéptido monomérico y la disminución de su correspondiente tetrámero en D2 y en los mutantes derivados, indica una disminución en el entrecruzamiento del peptidoglicano para estas cepas, respecto de la cepa original D1. Esta disminución, mas marcada en D23C9, se correlaciona con la disminución de la expresión del gen *pbp4* y se asociaría a un mayor número de terminales D-Ala-D-Ala.
- Los mutantes muestran distintos perfiles de autólisis. El mutante D23C9 presenta autólisis más rápida y una banda de mayor actividad hidrolítica en el zimograma de peptidoglicano que se correspondería con la mayor expresión de la isoforma GL de la autolisina mayoritaria Atl.
- Las bases moleculares implicadas en el desarrollo de cepas VISA o hVISA estarían relacionadas a una modificación en el metabolismo del peptidoglicano.
- No se vieron cambios en la frecuencia mutacional por el método tradicional (mide mutaciones puntuales relacionadas con la resistencia a ciprofloxacina), ni mutaciones en los operones *vraSR* y *walKR* . Sin embargo, las 4 cepas poseen una mutación en el gen *rpoB* (H481N), que otros autores han relacionado con el fenotipo hVISA/VISA.

- Se encontró además un aumento en el número de copias de IS256 en D2 y sus mutantes derivadas, que se correlaciona con un aumento en la expresión del gen de la transposasa (*tnp*). La expresión de este gen se ve aumentada en presencia de concentraciones subinhibitorias de vancomicina en los mutantes VISA.
- Reportamos un aumento en el número de copias de IS256 asociado con la selección de cepas hVISA/VISA, indicando que la presión con VAN podría aumentar la frecuencia de transposición y ser responsable de la eventual pérdida de funcionalidad del locus *agr*.

RESUMEN

RESUMEN

Staphylococcus aureus es un patógeno oportunista que causa enfermedad en el hombre y en los animales. A nivel mundial, es uno de los microorganismos más frecuentemente aislados tanto en infecciones nosocomiales como adquiridas en la comunidad.

El perfil de resistencia a antibióticos de *S. aureus* se ha ido incrementando a lo largo de los últimos años, limitando cada vez más las opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones por estos microorganismos. A partir de fines de la década del '90 se han reportado cepas de *S. aureus* con sensibilidad disminuida a vancomicina (VISA), y cepas con resistencia heterogénea (hVISA), lo que ha despertado una señal de alarma en todo el mundo. El mecanismo responsable de la resistencia en las cepas hVISA/VISA aún no ha sido completamente elucidado. Sumado a esto, la detección del fenotipo hVISA en el laboratorio es dificultosa, y a pesar de que se han desarrollado metodologías de screening, siempre se deben confirmar con el método de análisis poblacional (PAP-AUC) que es demasiado laborioso para ser aplicado en la práctica clínica.

En nuestro país los primeros casos de hVISA/VISA se describieron en el año 2009. En este trabajo se describe por primera vez la prevalencia y la caracterización molecular de aislamientos hVISA en un hospital de Buenos Aires (Argentina) y se evalúan distintas metodologías para su detección. Adicionalmente, se estudian las bases moleculares posiblemente implicadas en la susceptibilidad disminuida a vancomicina en cepas clínicas hVISA y mutantes VISA obtenidos *in vitro*.

No se encontraron aislamientos VISA y el fenotipo hVISA ocurrió en el 3,3% de las bacteriemias por *S. aureus* durante 2009-2010 en el Hospital de Clínicas José de San Martín. Aún siendo un valor de prevalencia bajo, el impacto clínico de estas cepas es preocupante, dado que se encontró una asociación entre el fenotipo hVISA y episodios múltiples de bacteriemias.

Luego de evaluar distintas metodologías para la detección de este fenotipo, se propuso la combinación de métodos (CIM por Etest $> 1 \mu\text{g/ml}$, macro Etest $\geq 6 \mu\text{g/ml}$, y predifusión con tabletas) para alertar de un posible hVISA en aquellos laboratorios en donde no se puede realizar la metodología de PAP-AUC de rutina, especialmente en casos de bacteriemias persistentes/recurrentes por *S. aureus*.

Los resultados de la caracterización molecular indican que los hVISA son genéticamente diferentes, si bien los dos hVISA meticilino resistentes (SAMR) se relacionan con clones previamente diseminados en nuestro país. Además se pudieron seleccionar distintos fenotipos VISA

a partir de un mismo fondo genético, por lo que la etiología es más bien azarosa, y probablemente poligénica.

Se confirmó en estas cepas un aumento del grosor de la pared celular y disminución en el entrecruzamiento de peptidoglicano. Las bases moleculares implicadas en el desarrollo de cepas VISA o hVISA estarían relacionadas a una modificación en el metabolismo del peptidoglicano.

Adicionalmente, se encontró un aumento de la transposición de la secuencia de inserción IS256 asociada al fenotipo hVISA/VISA. La presión selectiva ejercida por los antibióticos durante períodos prolongados de tratamiento podría aumentar la frecuencia de transposición de IS256, y contribuir en última instancia con el desarrollo de resistencia a vancomicina.

No parecería existir un único mecanismo implicado en el desarrollo del fenotipo hVISA/VISA. Se podría postular entonces, que el estrés provocado por los antibióticos estaría actuando de diferentes maneras: seleccionando variantes resistentes y además generando variabilidad genética y fenotípica al favorecer eventos mutacionales (un aumento de la transposición de IS256 probablemente acompañado por un aumento en las mutaciones puntuales). Estos diversos cambios genéticos serían responsables de la modificación en el metabolismo del peptidoglicano relacionada a la disminución de la sensibilidad a vancomicina en cepas hVISA y VISA.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO 1: REACCIONES DE PCR UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO

✓ AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES *mecA* (96) Y *luk-PV* (81)

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del amplicón (pb)
<i>3'mecA</i>	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	550
<i>5'mecA</i>	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	
<i>luk-PV-1</i>	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	443
<i>luk-PV-2</i>	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC	

Mezcla de reacción: Volumen final 50 μ l

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (μ l)	Concentración final
H ₂ O	-	23	csp 50
Oligonucleótido F	5 mM	8	0,8 μ M
Oligonucleótido R	5 mM	8	0,8 μ M
Buffer	10 x	5	1 x
Cl ₂ Mg	50 mM	2,5	2,5 mM
dNTP	10 mM	2,5	500 μ M
ADN	50 ng/ μ l	1	50 ng
Taq pol	5 U/ μ l	0,2	1 U

Mezcla de reacción para un volumen final de 50 μ l: se colocan 49 μ l de la master-mix en cada tubo de PCR y se agrega 1 μ l de ADN. Se realizó "Hot-start", se agrega la *Taq*-polimerasa (5 U/ μ l) a los 5 min de annealing (1 U por reacción).

Protocolo de ciclado:

95°C – 5 min

52°C – 15 min → a los 5 min agregar la *Taq* polimerasa

72°C – 1 min

95°C – 1 min	} 30 ciclos
52°C – 1 min	
72°C – 1 min	

72°C – 10 min

✓ **TIPIFICACIÓN DEL *SCCmec***- **DETECCIÓN DEL TIPO DE COMPLEJO *mec*****Detección del complejo *mec* clase A (67)**

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del amplicón (pb)
mI-1	AATGGCGAAAAAGCACAACA	480
mI-2	GACTTGATTGTTTCCTCTGTT	
mcR-2	CGCTCAGAAATTTGTTGTGC	1597
mcR-3	ATCTCCACGTTAATTCATT	

Mezcla de reacción: Volumen final 50 µl

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µl)	Concentración final
H ₂ O	-	23	csp 50
Oligonucleótido F	10 µM	2	0,4 µM
Oligonucleótido R	10 µM	2	0,4 µM
Buffer	10 x	5	1 x
Cl ₂ Mg	50 mM	1,5	1,5 mM
dNTP	10 mM	2,5	500 µM

ADN	50 ng/ μ l	1	50 ng
Taq pol	5 U/ μ l	0,2	1 U

Protocolo de ciclado:

95°C – 5 min

95°C – 30 seg

52°C – 1 min

72°C – 1 min

} 30 ciclos

72°C – 10 min

Detección del complejo *mec* clase B (Esta tesis)

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del amplicón (pb)
IS1272	ATTTTGGGT*TTCACTCGGAT	565
<i>mecR1</i>	CAAATATTAAGAACGTGTT	

Mezcla de reacción: Volumen final 50 μ l

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (μ l)	Concentración final
H ₂ O	-	24	csp 50
IS1272	5 μ M	8	0,8 μ M
<i>mecR1</i>	5 μ M	8	0,8 μ M
Buffer	10 x	5	1 x
Cl ₂ Mg	50 mM	1,5	1,5 mM
dNTP	10 mM	2,5	500 μ M
ADN	50 ng/ μ l	1	50 ng
Taq pol	5 U/ μ l	0,2	1 U

Mezcla de reacción para un volumen final de 50 μ l: se colocan 49 μ l de la master-mix en cada tubo de PCR y se agrega 1 μ l de ADN. Se realizó "Hot-start", se agrega la *Taq*-polimerasa (5 U/ μ l) a los 5 min de annealing (1 U por reacción).

Protocolo de ciclado

95°C – 5 min

55°C – 15 min \longrightarrow a los 5 min agregar la *Taq*

72°C – 1 min

95°C – 1 min
55°C – 1 min
72°C – 1 min

} 30 ciclos

72°C – 10 min

Detección del transposón Tn4001 integrado en el SCCmec (131)

Olignucleótido	Secuencia	Región amplificada	Tamaño del amplicón (pb)
Tn4001-3F Tn4001-3R:	ACCAAACCCGACAACACTACA GTGTCGTAAAGCTGCGCTCA	<i>mecA</i> -IS256L	1298
Tn4001-1F Tn4001-1R	GCCAATCGCTTAATTGGAGCCG ACTTCATCTTCCCAAGGCTCTGT	IS256L- <i>aac(2')-aph(6'')</i>	709

Mezcla de Reacción: Volumen final: 50 μ l

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (μ l)	Concentración final
H ₂ O	-	29,3	csp 50
Olignucleótido -F	10 μ M	4	0,8 μ M
Olignucleótido -R	10 μ M	4	0,8 μ M
Buffer	10 x	5	1 x
Cl ₂ Mg	25 mM	5	12,5 mM

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (μ l)	Concentración final
dNTP	10 mM	1,5	300 μ M
ADN	50 ng/ μ l	1	50 ng
Taq pol	5 U/ μ l	0,2	1 U

Protocolo de ciclado:

94°C – 5 min

94°C – 30 seg

50°C – 30 seg

72°C – 1 min 30seg

72°C – 4 min

} 30 ciclos

Determinación del complejo *mec* clase C2 (74)

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del amplicón (pb)
mA7	ATATACCAAACCCGACAACACTACA	804
iS2	TGAGGTTATTCAGATATTTTCGATGT	

Mezcla de reacción: Volumen final 50 μ l

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (μ l)	Concentración final
H ₂ O	-	31,8	csp 50
mA7	10 μ M	4	0,8 μ M
iS2	10 μ M	4	0,8 μ M
Buffer	10 x	5	1 x
Cl ₂ Mg	25 mM	3	1,5 mM
dNTP	10 mM	2	400 μ M
ADN	50 ng/ μ l	1	50 ng
Taq pol	5 U/ μ l	0,2	1 U

Protocolo de ciclado:

94°C – 5 min

94°C – 1 min

50°C – 1 min

72°C – 1 min

} 30 ciclos

72°C – 10 min

- DETERMINACIÓN DEL COMPLEJO *ccr***Determinación del tipo de complejo *ccrAB*(63)**

Oligonucleótido	Secuencia	Complejo <i>ccr</i>	Tamaño del amplicón (pb)
<i>ccr</i> -β2 <i>ccr</i> -α2	ATTGCCIT*GATAATAGCCITCT AACCTATATCATCAATCAGTACGT	<i>ccrAB</i> 1	700
<i>ccr</i> -β2 <i>ccr</i> -α3	ATTGCCIT*GATAATAGCCITCT TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	<i>ccrAB</i> 2	1000
<i>ccr</i> -β2 <i>ccr</i> -α4	ATTGCCIT*GATAATAGCCITCT GCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT	<i>ccrAB</i> 3	1600

Mezcla de reacción: Volumen final: 50 µl

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µl)	Concentración final
H ₂ O milliQ	-	6,8	-
Buffer	10 x	5	1 x
Cl ₂ Mg	50 mM	2,5	2,5 mM
dNTP	10 mM	2,5	500 µM
<i>ccr</i> -β2	5 µM	8	0,8 µM
<i>ccr</i> -α2	5 µM	8	0,8 µM
<i>ccr</i> -α3	5 µM	8	0,8 µM

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (μ l)	Concentración final
ccr- α 4	5 μ M	8	0,8 μ M
ADN	50 ng/ μ l	1	-
Taq pol	5 U/ μ l	0,2	1 U

Protocolo de ciclado:

94°C – 5 min

94°C – 30 seg

50°C – 1 min

72°C – 1 min

72°C – 5 min

} 30 ciclos

Detección de la recombinasa ccrC (93)

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del amplicón (pb)
ccrC F2	GTACTCGTTACAATGTTTGG	449
ccrC R2	ATAATGGCTTCATGCTTACC	

Mezcla de reacción: Volumen final 50 μ l

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (μ l)	Concentración final
H ₂ O	-	28,3	csp 50
ccrC F2	10 μ M	4	0,8 μ M
ccrC R2	10 μ M	4	0,8 μ M
Buffer	10 x	5	1 x
Cl ₂ Mg	25 mM	5	2,5 mM
dNTP	10 mM	2,5	500 μ M
ADN	50 ng/ μ l	1	50 ng
Taq pol	5 U/ μ l	0,2	1 U

Protocolo de ciclado:

94°C – 5 min

94°C – 1 min

50°C – 1 min

72°C – 2 min

72°C – 2 min

} 30 ciclos

✓ **MULTIPLEX PARA SUBTIPIFICAR EL SCC_{mec} IV (92)**

Oligonucleótido	Secuencia	Especificidad	Tamaño del amplicón (pb)
ccrB2 F ccrB2 R	CGAACGTAATAACATTGTTCG TTGGCWATTTTACGATAGCC	<i>ccr</i> B2 (control interno)	203
J IVa F J IVa R	ATAAGAGATCGAACAGAAGC TGAAGAAATCATGCCTATCG	Tipo IVa	278
J IVb F J IVb R	TTGCTCATTTTCAGTCTTACC TTACTTCAGCTGCATTAAGC	Tipo IVb	336
J IVc F J IVc R	CCATTGCAAATTTCTCTTCC ATAGATTCTACTGCAAGTCC	Tipo IVc y IVe	483
J IVd F J IVd R	TCTCGACTGTTTGCAATAGG CAATCATCTAGTTGGATACG	Tipo IVd	575
J IVg F J IVg R	TGATAGTCAAAGTATGGTGG GAATAATGCAAAGTGGAACG	Tipo IVg	792
J IVh F J IVh R	TTCCCTCGTTTTTCTGAACG CAAACACTGATATTGTGTCG	Tipo IVh	663

Mezcla de reacción: Volumen final: 50 μ l

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (μ l)	Concentración final
H ₂ O milliQ	-	Csp 50	-
Buffer	10 x	5	1 x
Cl ₂ Mg	25 mM	3	2,5 mM
dNTP	10 mM	0,5	500 μ M
ccrB2 F	10 μ M	2	0,4 μ M
ccrB2 R	10 μ M	4	0,8 μ M
J IVa F	10 μ M	1	0,2 μ M
J IVa R	10 μ M	1	0,2 μ M
J IVb F	10 μ M	1	0,2 μ M
J IVb R	10 μ M	1	0,2 μ M
J IVc F	10 μ M	2	0,4 μ M
J IVc R	10 μ M	2	0,4 μ M
J IVd F	10 μ M	4	0,8 μ M
J IVd R	10 μ M	4	0,8 μ M
J IVg F	10 μ M	4	0,8 μ M
J IVg R	10 μ M	4	0,8 μ M
J IVh F	10 μ M	4	0,8 μ M
J IVh R	10 μ M	4	0,8 μ M
ADN	50 ng/ μ l	1	-
Taq pol	5 U/ μ l	0,2	1 U

Protocolo de ciclado:

94°C – 5 min

94°C – 30 seg

48°C – 30 seg

72°C – 2 min

72° C – 4 min

} 30 ciclos

✓ **MULTIPLEX PCR PARA DETERMINAR EL GRUPO DE *agr*.** (45)

Oligonucleótido	Secuencia	Grupo de <i>agr</i>	Tamaño del amplicón (pb)	Cepas control
<i>Pan agr1</i>	ATGCACATGGTGCACATGC GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT	I	441	NRS 384
<i>Pan agr2</i>	ATGCACATGGTGCACATGC TATTACTAATTGAAAAGTGGCCATAGC	II	575	NRS 156
<i>Pan agr3</i>	ATGCACATGGTGCACATGC GTAATGTAATAGCTTGTATAATAATACCCAG	III	323	NRS 123
<i>pan agr4</i>	ATGCACATGGTGCACATGC CGATAATGCCGTAATACCCG	IV	659	NRS 153

Mezcla de reacción: Volumen final: 25 µl

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µl)	Concentración final
H ₂ O milliQ	-	csp 25	-
Buffer	10 x	2,5	1 x
Cl ₂ Mg	50 mM	2,5	5 mM
dNTP	10 mM	0,5	200 µM
Pan	10 µM	0,75	0,3 µM
<i>agr1</i>	10 µM	0,75	0,3 µM
<i>agr2</i>	10 µM	0,75	0,3 µM
<i>agr3</i>	10 µM	0,75	0,3 µM
<i>agr4</i>	10 µM	0,75	0,3 µM
ADN	50 ng/µl	1	-
Taq pol	5 U/µl	0,25	1,25 U

Protocolo de ciclado:

94°C – 5 min

94°C – 30 seg

55°C – 30 seg

72°C – 1 min

72°C – 10 min

} 26 ciclos

✓ **POLIMORFISMO DEL GEN *spa*(50)**

Oligonucleótido	Secuencia
<i>spa</i> -1113f	TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC
<i>spa</i> -1514r	CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT

Mezcla de reacción: Volumen final: 50 µl

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µl)	Concentración final
H ₂ O	-	29	csp 50
<i>spa</i> -1113f	10 µM	5	0,5 µM
<i>spa</i> -1514r	10 µM	5	0,5 µM
Buffer	10 x	5	1 x
Cl ₂ Mg	50 mM	2,5	2,5 mM
dNTP	10 mM	2	400 µM
ADN	50 ng/µl	1	50 ng
Taq pol	5 U/µl	0,2	1 U

Protocolo de ciclado:

94°C – 5 min

94°C – 45 seg

58°C – 45 seg

72°C – 1 min 30 seg

72°C – 10 min

} 26 ciclos

✓ **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* (Acetyl coenzima A acetyltransferase). Los cebadores que se utilizaron son los descriptos para este fin por Enright y colaboradores (30).

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño de la secuencia a analizar (pb)
<i>arc up</i> <i>arc dn</i>	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	456
<i>aro up</i> <i>aro dn</i>	ATCGGAAATCCTATTTACATTC GGTGTGTGATTAATAACGATATC	456
<i>glp up</i> <i>glp dn</i>	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	465
<i>gmk up</i> <i>gmk dn</i>	ATCGTTTTATCGGGACCATC TCATTAACTACAACGTAATCGTA	429
<i>pta up</i> <i>pta dn</i>	GTAAAATCGTATTACCTGAAGG GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA	474
<i>tpi up</i> <i>tpi dn</i>	TCGTTCAATCTGAACGTCGTGAA TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC	402
<i>yqi up</i> <i>yqi dn</i>	CAGCATAACAGGACACCTATTGGC CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	516

Mezcla de reacción: Volumen final: 25 μ l

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (μ l)	Concentración final
H ₂ O	-	15	csp 25
Oligonucleótido F	10 μ M	2,5	1 μ M
Oligonucleótido R	10 μ M	2,5	1 μ M
Buffer	10 x	2,5	1 x
Cl ₂ Mg	50 mM	1,25	2,5 mM
dNTP	10 mM	1,25	500 μ M
ADN	50 ng/ μ l	1	50 ng
Taq pol	5 U/ μ l	0,2	1 U

Protocolo de ciclado: *Para los genes *arc* y *tpi* se usó una temperatura de annealing de 50 °C

94°C – 5 min

94°C – 1 min

55°C* – 30 seg

72°C – 30 seg

72°C – 10 min

} 30 ciclos

✓ **AMPLIFICACIÓN DE *agrAC*:**

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
<i>agrS3</i>	GATTTAAGTCGCAGTATTGGT	1200	(3)
<i>agrS4</i>	ACGCGTCATATTTAATTTTGT		

Mezcla de reacción: Volumen final: 25 µl

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µl)	Concentración final
H ₂ O milliQ	-	csp 25	-
Buffer	10 x	2,5	1 x
Cl ₂ Mg	50 mM	5	5 mM
dNTP	10 mM	0,5	200 µM
<i>agrS3</i>	10 µM	0,75	0,3 µM
<i>agrS4</i>	10 µM	0,75	0,3 µM
ADN	50 ng/µl	1	-
Taq pol	5 U/µl	0,25	1,25 U/µl

Protocolo de ciclado:


94°C – 5 min

94°C – 30 seg

50°C – 30 seg

72°C – 1 min 30 seg

72°C – 10 min


 30 ciclos
✓ **AMPLIFICACIÓN DE IS256**

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
IS256-1	CCGACAAAGTCAACGAAA	922	(142)
IS256-2	GGCTGATGTTTGATTGGG		

Mezcla de reacción: Volumen final: 25 µl

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µl)	Concentración final
H ₂ O milliQ	-	csp 25	-
Buffer	10 x	2,5	1 x
Cl ₂ Mg	25 mM	5	5 mM
dNTP	10 mM	0,5	200 µM
IS256-1	10 µM	0,75	0,3 µM
IS256-2	10 µM	0,75	0,3 µM
ADN	50 ng/µl	1	-
Taq pol	5 U/µl	0,25	1,25 U

Protocolo de ciclado:

94°C – 5 min
 94°C – 30 seg
 50°C – 30 seg
 72°C – 1 min 30 seg
 72°C – 10 min

} 30 ciclos

✓ **BÚSQUEDA DE MUTACIONES EN REGULADORES DE LA SÍNTESIS DE PARED CELULAR**

Oligonucleótido	Secuencia	Región amplificada	Referencia
YycFG F YycFG R	TAAAGATCTAAGAAAAGAGGTTTATGCAAA CATGGCGCCGAGTAGCGCTAAAATGACAGA	Operón <i>walKR</i> (2616 pb)	(65)
PycFG F PycFG R	ATCCAAGAGGATAGGCATTTT GCATCATTACCATCGTATGCAC	<i>walKR</i> , promotor (721)	(65)
SeqFWalKR SeqR1WalKR SeqR2WalKR	TGGATATTTCTCCAACAACATGAG GCACTTCACGACATACTCCATAC CACGACGCTCACGTTCAAC	Sec operon <i>walKR</i>	Esta tesis
SA1700-03F SA1700-03R	TGCAATCATTTCATCAGCGTAG GTAAAGCGGTGCATAATACAG	Operón <i>vraSR</i> (3645 pb)	(70)
SA1701F SA1701R	TCCATTTCTCGTTCTGTAAGC TTGCGACGGATGAGGTTATG	<i>vraS</i> (1885 pb)	(70)
upvraS dnvraS	TGGTGTAGAAGCGACGACTCAG GTTAAGTCAATATGTAGGTCGCC	sec operon <i>vraSR</i>	Esta tesis

Mezcla de reacción: Volumen final: 50 μ l

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (μ l)	Concentración final
H ₂ O milliQ	-	csp 50	-
Buffer LHF*	10 x	5	1 x
dNTPs	10 mM	2,5	500 μ M
Oligonucleótido -F	10 μ M	4	0,8 μ M
Oligonucleótido -R	10 μ M	4	0,8 μ M
ADN	50 ng/ μ l	1	-
Taq LHF pol*	2,5 U/ μ l	0,25	0,625 U

*Taq LHF polimerasa (INBIO HIGHWAY): Amplificación con alta fidelidad de fragmentos largos.
El Buffer de reacción contiene MgCl₂.

Protocolo de ciclado: Las temperaturas de annealing fueron 50° para *walKR*, y 55° para *vraSR*.

94°C – 5 min

94°C – 1 min

50°C – 1 min

72°C – 3 min 30 seg

72°C – 10 min

} 30 ciclos

✓ **BÚSQUEDA DE MUTACIONES EN *rpoB*(6)**

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del amplicón (pb)
rpoB-F3	AGTCTATCACACCTCAACAA	702
rpoB-F4	TAATAGCCCCGCACCAGAATCA	

Mezcla de reacción: Volumen final: 25 μ l

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (μ l)	Concentración final
H ₂ O milliQ	-	csp 25	-
Buffer	10 x	2,5	1 x
Cl ₂ Mg	25 mM	5	5 mM
dNTPs	10 mM	0,5	200 μ M
rpoB-F3	10 μ M	0,75	0,3 μ M
rpoB-F4	10 μ M	0,75	0,3 μ M
ADN	50 ng/ μ l	1	-
Taq pol	5 U/ μ l	0,2	1 U

Protocolo de ciclado:

94°C – 5 min

94°C – 30 seg

50°C – 30 seg

72°C – 1 min

72°C – 4 min

} 30 ciclos

ANEXO 2: OTROS PROTOCOLOS

✓ ELECTROFORESIS EN GEL POR CAMPO PULSADO (PFGE)

Se realizó según el método descrito por Chung y colaboradores (24). Brevemente, se tomaron 3 o 4 colonias de un cultivo de 24 hs y se incubaron en 5 ml de caldo BHI a 35°C por 16-18 hs en agitación; 1 ml de ese cultivo fue centrifugado a 9000 xg por 2 minutos y el pellet fue resuspendido en 1 ml de buffer PIV (Tris 10 mM pH = 8,00, NaCl 1M). Luego se ajustó la concentración bacteriana a una DO_{620nm} de 5 unidades; 200 μ l de esa suspensión bacteriana termostaticada a 42°C se transfirieron a un eppendorf conteniendo 200 μ l de agarosa de bajo punto de fusión al 1,5% termostaticada a 42°C. Se mezcló rápidamente y se armaron los bloques de agarosa o “plugs” en los moldes correspondientes (BioRad). Se dejó solidificar a temperatura ambiente y luego a -20°C durante 5 minutos. Una vez solidificados, los bloques fueron removidos de sus moldes e incubados a 37°C durante toda la noche en buffer de lisis EC (Tris 6 mM pH = 8,00, NaCl 1 M, EDTA 100 mM pH = 8,00, Deoxicolato-Na 0,2%, Laurilsarcosina-Na 0,5%, Brij-58 0,5%, RNAsa A (Fermentas) 50 μ g/ml, Lisozima (Sigma-Aldrich) 100 μ g/ml, y Lisostaphina (Sigma-Aldrich) 50 μ g/ml). Luego, la solución de lisis fue reemplazada por buffer ES-P (EDTA 0,25 M pH = 9,00, Laurilsarcosina-Na 0,5% + Proteinasa K (Fermentas) (1 mg/ml)) y los bloques de agarosa incubados a 50°C durante al menos 17 hs. Al día siguiente, la solución ES-P fue descartada y los “plugs” transferidos a tubos conteniendo 10 ml de buffer TE (10 mM, EDTA 1 mM, pH = 8,00) para los lavados. Se realizaron 6 lavados de 30 minutos cada uno.

El ADN fue digerido utilizando la enzima SmaI (15 U/plug) a 25°C durante toda la noche y los fragmentos de ADN fueron resueltos en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 0,5X (Tris 44,5 mM, Ácido Borico 44,5 mM, EDTA 1 mM, pH = 8,30) con pulsos de 5 seg a 35 seg a un voltaje de 6V/cm a 11,3°C durante 21 hs en un CHEF DRIII (BioRad, Hercules, CA, USA).

✓ SOUTHERN BLOT

Transferencia a membrana HybondTM-N+: Luego de cortar la membrana del tamaño apropiado equilibrar en buffer de transferencia (NaOH 8 mM, NaCl 3 M) durante 15 min se procedió a ensamblar el equipo de transferencia. Para ello se colocó en un recipiente con buffer de transferencia un puente de papel secante, el gel, y por encima la membrana. Se cubrió con los 2 papeles blot saturados en buffer de transferencia (Extra Thick Blot Biorad), y uno seco y con aproximadamente 80 papeles de filtro todos cortados del mismo tamaño. El equipo se completó

cubriendo con un vidrio y un peso apropiado, y se realizó la transferencia durante toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, como control de la transferencia, el gel de agarosa volvió a teñirse con bromuro de etidio 0,5 µg/ml y a visualizarse con transiluminador UV, Molecular Imager GelDoc XR Sistem, Life Science Research, Bio-Rad. La membrana se lavó en buffer fosfato 0,25 M pH = 7,00 y el ADN transferido se fijó covalentemente a la membrana por calor, incubando a 80°C en estufa durante 10 minutos (49).

Preparación de sondas: Se llevó a cabo la hibridación de la membrana con sondas específicas para *mecA*, *agrAC* e IS256. Las sondas se obtuvieron por marcación al azar de los productos de PCR específicos para cada gen con digoxigenina, para lo cual se siguieron las recomendaciones del kit comercial DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche Applied Science, Germany). Para ello, previamente se desnaturalizaron 16 µl del ADN a marcar (producto de PCR) con concentración entre 10 ng y 3 µg, calentando en baño de agua a 100°C durante 10 minutos y luego se enfrió rápidamente en hielo (2 min.). La desnaturalización completa es esencial para el marcado. Se homogeizó bien el vial 1 Dig-High Prime y se agregaron 4 µl de ADN desnaturalizado. Se mezcló y luego de hacer spin se dejó incubando toda la noche a 37°C. La reacción de marcación fue finalizada calentando a 65°C por 10 min.

Hibridación y detección: El revelado de la hibridación también se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del comerciante. Se calculó la T° de Hibridación con la siguiente fórmula:

$$T_m: 49,82 + 0,41. (\% \text{ CG}) - (600/\text{longitud de la sonda en pb})$$

$$T^\circ \text{ óptima: } T_m - 20 \text{ a } 25^\circ\text{C.}$$

Posteriormente se precalentó el volumen apropiado de DiG Easy Hyb (10 ml cada 100 cm² de membrana), y se pre-hibridó la membrana durante 30 minutos con agitación. Se utilizaron 25 ng de sonda por cada ml de DiG Easy Hyb, y se desnaturizó calentando 5 minutos a ebullición y enfriando rápidamente en hielo. Luego se agregó la sonda desnaturalizada a DiG Easy Hyb. (3,5 ml por cada 100 cm² de membrana) y se mezcló. Se descartó la solución de pre-hibridación y se agregó la sonda. Luego de realizar la hibridación durante 4 hs a la T° calculada, con agitación en horno de hibridación se procedió a realizar lavados (3 veces durante 5 minutos en SSC 2 X, SDS 0,1 % a 15-25°C en agitación; 3 veces durante 15 minutos en constante agitación con SSC 0,5 X, SDS 0,1 %, previamente precalentado a 65°C).

Para la detección Inmunológica se humedeció brevemente la membrana en washing buffer (1-5 minutos), se bloqueó durante 30 minutos en “blocking solution”, y se incubó 30 minutos en 20 ml

de antibody solution (diluído 1:10.000 en “blocking solution”). Se lavó 2 veces durante 15 minutos en washing buffer, y se equilibró 2 a 5 minutos en detection buffer. La membrana se colocó sobre film y luego de 5 min a 15-25°C, se incubó 10 minutos a 37°C para aumentar la reacción luminiscente. Se reveló exponiendo en película fotográfica.

Reactivos adicionales al Kit:

- Washing Buffer: Ácido Maleico 0,1 M - NaCl 0,15 M - pH = 7,50 - Tween 20 0,3 % v/v.
- Maleic Acid Buffer: Ácido Maleico 0,1 M - NaCl 0,15 M - pH = 7,50 ajustar con NaOH.
- Detection Buffer: Tris-HCl 0,1 M - NaCl 0,1 M - pH = 9,50.
- SSC 20X: NaCl 3 M - Citrato de Sodio 300 mM pH = 7,00.

✓ MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)

La preparación y análisis de las muestras se realizó según el método descrito por Cui *et al* utilizando para ello cultivos en caldo BHI en fase exponencial ($DO_{620nm} = 0,5-0,7$)(16). El material se fijó en glutaraldehído al 2,5% en buffer fosfato 0,1 M pH = 7,40 por 3 hs sobre hielo, luego se lavó dos veces durante 10 minutos en mismo buffer y se fijó en tetróxido de osmio al 1%. Luego se lavó en agua destilada, se fijó y contrastó con acetato de uranilo al 5% en agua destilada por 2 hs. Posteriormente se deshidrató realizando pasajes por alcohol 50, 70, 96, y 100 % (2 veces, 15 minutos), y finalmente por óxido de propileno 2 veces. Se incluyó en resina Durcupan®, dejándose polimerizar 3 días a 60°C.

Así se obtuvieron los tacos que se cortaron en el ultramicrotomo Reichert-Jung con navaja de vidrio. Se obtuvieron cortes de 0,5 micrones que se tiñeron con azul de toluidina y se observaron al microscopio óptico.

Luego se eligieron las áreas para repetir el corte, esta vez de 70 a 90 nanómetros que se levantaron en grillas de cobre y se contrastaron con citrato de plomo (método de Reynolds).

Estas grillas fueron observadas al MET Zeiss 10C y se tomaron fotografías. Se realizó una evaluación morfométrica utilizando imágenes fotográficas con una magnificación de 7.000, 25.000, 50.000, 85.000, 63.000, 100.000 y 125.000X (según fue necesario) y el grosor de la pared celular fue medido con el programa ImageJ. Se realizaron mediciones de 30 células en división para cada cepa.

Se utilizó la prueba de Kruskal Wallis para evaluar si los valores de grosor de la pared celular presentaban diferencias significativas en las cepas estudiadas, y el test de Dunn como test a posteriori. Una $p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativa.

✓ ANÁLISIS DEL PEPTIDOGLICANO

Purificación de peptidoglicano: Se diluyó 1/100 un cultivo de 16 hs y se lo incubó a 37°C hasta llegar a fase exponencial (DO a 600 nm de 0,5-0,7). Las células se centrifugaron a 6000 rpm (rotor GSA, Sorvall) durante 10 min a 4 °C y se resuspendieron en 20 ml de agua milliQ fría para minimizar la hidrólisis del peptidoglicano por las autolisinas endógenas. Se agregó por goteo esta suspensión a 20 ml de SDS 8% a 100°C en agitación durante 1 h, y se centrifugó durante 20 min a 20.000 rpm (rotor SS34, Sorvall). El tratamiento con SDS elimina las proteínas contaminantes, y las lipoproteínas unidas no covalentemente.

El pellet fue lavado 5-10 veces con agua milliQ hasta eliminar el SDS (centrifugando a 100.000 g, 60 min en ultracentrífuga), y el peptidoglicano polimérico (que es insoluble) fue resuspendido en 20 ml de Buffer Fosfato 20 mM, NaCl 7 mM, pH = 6,90 e incubado 2 a 3 horas a 20°C con 200 µg/ml de alfa-amilasa (Roche) para remover glúcidos.

Se centrifugó 60 min a 100.000 g, el pellet fue resuspendido en 20 ml de buffer Tris 100 mM pH = 8,00 y se incubó 2 a 3 horas a 25°C con 200 µg/ml de tripsina (Roche) para remover las proteínas unidas covalentemente. Luego de centrifugar en idénticas condiciones, el pellet fue resuspendido en 20 ml de buffer Tris 100 mM pH = 7,50 e incubado 2 a 3 horas a 40°C con 500 µg/ml de pronasa (Roche) para inactivar la tripsina.

El pellet obtenido luego de centrifugar 60 min a 100.000 g, fue lavado 2 veces con agua milliQ fría, y resuspendido en 20 ml de Acido Fluorhídrico 49% e incubado con agitación 48 hs a 4°C para eliminar los polisacáridos unidos covalentemente (ácidos teicoicos, cápsula, etc).

Finalmente, se centrifugó a 100.000 g durante 60 min, y se realizaron 2 lavados con 20 ml de LiCl 8M, 2 lavados con 20 ml de EDTA 0,1 M pH = 8,00 para eliminar contaminantes polipeptídicos, y 2 lavados con agua milliQ. El pellet se liofilizó.

Digestión del peptidoglicano y separación de los muropéptidos por HPLC: Una suspensión 8 mg/ml de peptidoglicano en agua milliQ, fue digerido con 0,18 mg/ml de

mutanolisina (Sigma-Aldrich) en buffer fosfato 0,2 M pH = 6,50 durante 16 hs a 37°C con agitación. Se inactivó la enzima durante 5 minutos a 100°C, se centrifugó, filtró y liofilizó el sobrenadante. Los muropéptidos resultantes fueron resuspendidos en ácido trifluoroacético pH = 2,00, y separados mediante HPLC, en una columna de fase reversa C18 a 25°C utilizando un gradiente lineal empezando con ácido trifluoroacético pH = 2,00, hasta Acetonitrilo 60 % durante 140 minutos. Los muropéptidos eluidos fueron detectados por absorción a 210 nm, e identificados mediante espectroscopía de masa (matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico 10 mg/ml en ácido cítrico 0,1 M).

✓ PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA Y ANÁLISIS DE LAS PBP_s

Extracción de proteínas de membrana: Se diluyó 1/1000 un cultivo de 16 hs y se lo incubó a 37°C hasta llegar a fase exponencial ($DO_{620\text{ nm}} = 0,5-0,7$). Las células se centrifugaron a 8000 rpm (rotor GSA, Sorvall) durante 10 min a 10°C y se realizaron dos lavados con buffer fosfato 50 mM pH = 7,00. Se centrifugó a 4000 rpm (rotor GSA, Sorvall) durante 20 min a 4°C y se resuspendió en 30 ml de buffer fosfato conteniendo la siguiente mezcla: 100 µl de Lisostaphyn (Sigma-Aldrich) 1 mg/ml, 150 µl de Mutanolisina (Sigma-Aldrich) 12 U/µl, 20 µl de Benzonasa (DNAsa+RNAsa) (Sigma-Aldrich), 30 µl de buffer Tris ClH 50 mM pH = 7,20 y 3 µl de inhibidor de proteasas. Se incubó en hielo durante 15-30 min, y se continuó la disrupción celular utilizando un homogeneizador de alta presión. Se centrifugó a 4000 rpm (rotor GSA, Sorvall) durante 20 min a 4°C para eliminar las células que no habían sido lisadas y luego a 10.000 rpm (rotor GSA, Sorvall) durante 10 min a 4°C. El sobrenadante recuperado se centrifugó a 20.000 rpm (rotor SS34, Sorvall) durante 2 horas a 4°C (2 veces). Del pellet se recuperaron las proteínas de membrana, que fueron resuspendidas en 500 µl de buffer fosfato 100 mM pH = 7,00 - MgCl₂ 2 mM - glicerol 5% - PMSF 0,1 mM. Fueron alicuotadas y conservadas a -20°C hasta su uso.

Marcado de las PBP_s con ampicilina: Se midió la concentración de proteínas con el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se marcaron 100 µg de proteínas con ampicilina fluorescente 25 µM durante 30 min. Alternativamente, las proteínas se incubaron 10 min a 37°C con ampicilina 200 µM para bloquear todas las PBP_s (excepto PBP2a) y luego 30 min a 37°C con ampicilina fluorescente 25 µM.

Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE): Las muestras se resolvieron en geles de SDS-PAGE al 10% (para el análisis de las PBP_s con ampicilina fluorescente)

a 200 V durante 40 min con el sistema Mini Protean II (Bio-Rad Laboratories, USA). Para el análisis del perfil de proteínas se sembraron 200 µg de proteínas en un gel al 7,5% en una cuba Protean (Bio-Rad Laboratories, USA) a 6 mA ON a 4°C. Como marcador de peso molecular se utilizaron 5 µl de PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, #SM0671). Se utilizó como buffer electrodo: 25 mM Tris, 192 mM glicina, SDS 0,1% pH = 8,30.

Preparación de la muestra

Reactivo	Cantidad (µl)
Buffer Muestra*	5
Muestra de proteína	3 – 20
Agua destilada	csp. 40
Hervir 5 min. Centrifugar a 1300 rpm 1 min. Sembrar 12 µl en el gel.	

* Buffer Muestra: Tris-HCl 0,25 M pH = 6,80, SDS 8%, 2-mercaptoetanol 20%, azul de bromofenol 0,008%, glicerol 40%.

Armado de geles de poliacrilamida

Reactivos	Gel de apilado	Gel de corrida	Gel de corrida
	(6%)	(7,5%)	(10%)
	Volumen (ml)		
Acrilamida 30%/Bisacrilamida 0.8%	2,4	7,4	5
Buffer de separación 4X (Tris 1,5 M, pH = 8,80)	-	7,4	3,7
Buffer de apilado 4X (Tris 0,5 M, pH = 6,80)	3	-	-
SDS 10%	0,12	0,3	0,15
Agua destilada	6,4	14,6	6,1
Persulfato de amonio (APS) 10%	0,12	0,3	0,15
TEMED	0,012	0,03	0,015
Volumen final	12 ml	30 ml	15 ml

Revelado de las PBPs: Las PBPs fueron visualizadas exponiendo el gel de SDS-PAGE en un escáner de fluorescencia (PhosphoImager, BioRad).

Revelado con Coomassie Blue: Se colocó el gel en un recipiente adecuado agregando cantidad suficiente de solución colorante para cubrir el mismo y se calentó en microondas 20 segundos a máxima potencia. Se colocó en agitación mecánica hasta enfriado y la operación fue repetida 2 veces más, sin cambiar la solución colorante. Se descartó la Solución colorante y se colocó cantidad necesaria de solución decolorante para cubrir el gel, se calentó en microondas 20 segundos a máxima potencia y se colocó en agitación mecánica hasta enfriado. La operación fue repetida 2 veces más, cambiando la solución decolorante cada vez. Se descartó la solución decolorante y se agregó agua para cubrir el gel.

Solución colorante	
Reactivo	Cantidad (%)
Solución colorante madre*	45
Agua destilada	45
Ácido acético	10

*Solución colorante madre: Coomassie blue 1,25 g, metanol 225 ml.

Solución decolorante	
Reactivo	Cantidad (%)
Metanol	45
Agua	45
Ácido acético	10

✓ **“MÍNIMA INFORMACIÓN PARA LA PUBLICACIÓN DE EXPERIMENTOS DE PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL” (MIQE)**

“Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments”

Se presenta toda la información diseñada de acuerdo a las guías MIQE como esencial (E)(13). La información deseada (D) fue agregada si estaba disponible.

Diseño experimental

Definición de los grupos experimentales y controles (E)

- Las cepas de *S. aureus* fueron cultivadas en caldo Cerebro Infusión Corazón (BHI, DIFCO) a 37°C.

- Todos los cultivos se realizaron inoculando 50 µl de un cultivo de 16 hs (incubado en 10 ml de BHI a 37°C, 180 rpm) en 50 ml de caldo BHI que posteriormente fue incubado a 37°C con agitación (180 rpm) hasta llegar a fase exponencial ($DO_{620\text{ nm}} = 0,5-0,7$).

Microorganismos: Dos aislamientos clínicos de *S. aureus* con resistencia heterogénea a vancomicina (hVISA) recuperados de un paciente con infección osteoartroarticular, previo y posterior al tratamiento con vancomicina durante 36 días (D1 y D2 respectivamente), y dos mutantes derivados de D2 con sensibilidad intermedia a vancomicina (VISA) (D23C9 y D2P11) que fueron seleccionados presencia de concentraciones crecientes de vancomicina en dos experimentos independientes. Además de cultivar en caldo BHI (grupo control), estas cuatro cepas se cultivaron en caldo BHI con vancomicina en una concentración igual a $\frac{1}{4}$ de la CIM de cada una (grupo tratado).

Número dentro de cada grupo (E).

- Se realizaron 3 cultivos de cada una de las cepas de *S. aureus* en las condiciones estudiadas (D1, D2, D3C9, D2P11).

Ensayo llevado a cabo por un servicio o en el laboratorio del investigador? (D)

- Fue llevado a cabo en el laboratorio del investigador.

Muestra**Descripción (E)**

- Se tomaron las muestras en fase exponencial de crecimiento, todos los cultivos se realizaron inoculando 50 μ l de un cultivo de 16 hs (incubado en 10 ml de BHI a 37°C, 180 rpm) en 50 ml de caldo BHI que posteriormente fue incubado a 37°C con agitación (180 rpm) hasta llegar a fase exponencial ($DO_{620\text{ nm}} = 0,5-0,7$).

Volumen/masa de muestra procesada (D)

- 2 ml, en fase exponencial.

Micro disección o macro disección (E)

- No corresponde.

Procedimiento de procesado (E)

- Las células (2 ml de cultivo) fueron colectadas por centrifugación durante 3 min a 13.000 x g, descartando el sobrenadante.

Si se congeló - cómo y cuán rápidamente? (E)

- No corresponde.

Si se fijó - cómo y cuán rápidamente? (E)

- No corresponde.

Condiciones de almacenamiento de la muestra y duración (E)

- Se realizó la extracción de ARN inmediatamente después de recolectar las muestras.

Extracción de ácidos nucleicos**Procedimiento y/o instrumentos (E)**

- Los pellets bacterianos fueron resuspendidos en 100 μ l de Lizozyma 15 mg/ml (SIGMA), incubados 1 hora a 37°C y centrifugados 1 min at 13.000 x g, el sobrenadante fue descartado.

- El ARN fue extraído utilizando TRIZOL® Reagent (Invitrogen) junto con el kit Pure Link® RNA Mini Kit (AMBION, USA) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Nombre del kit y detalles de alguna modificación (E)

- TRIZOL® Reagent (Invitrogen) junto con el kit Pure Link® RNA Mini Kit (AMBION, USA).

Detalle del tratamiento con DNAsa o RNAsa (E)

- DNAsa I (RQ1 RNase free DNase, Promega) fue utilizada de acuerdo al protocolo que recomienda al fabricante.

- Las muestras fueron tratadas con 3 U DNAsa I/1 µg ARN/37°C/60 min.

Evaluación de la contaminación (ADN o ARN) (E)

- La contaminación con ADN fue evaluada realizando una reacción de qPCR para el gen de referencia *pta* a las muestras de ARN y comparando con las muestras de ADNc.

- Las muestras de ARN fueron diluidas de la misma forma que las muestras de ADNc y los Cq resultantes fueron comparados.

- Se aceptaron como libres de contaminación con ADN a aquellas muestras de ARN que no daban una señal detectable por qPCR o con una diferencia mayor a 10 Cq entre ARN y ADNc.

Cuantificación de ácidos nucleicos (E)

- La concentración de ARN fue cuantificada midiendo la absorbancia a 230, 260 and 280 nm (A_{230} , A_{260} , A_{280}) usando NanoDrop™ 1000 EspectroPhotometer (Thermo Scientific).

Instrumento y método (E)

- Se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 EspectroPhotometer (Thermo Scientific) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Pureza (A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230}) (D)

- Una relación $A_{260}/A_{280} = 1,8-2,1$ fue indicativa de buena pureza (baja contaminación con proteínas).

- Una relación $A_{260}/A_{230} > 1$ fue indicativa de buena pureza (baja contaminación con isotiocianato de guanidina).

Rendimiento (D)

- El rendimiento de la extracción de ARN fue de 8 µg a 20 µg.

Integridad del ARN: método/instrumento (E)

- La integridad del ARN fue verificada electroforéticamente en un gel de agarosa 1,5% teñido con bromuro de etidio.

RIN/RQI o Cq de transcritos 3' y 5' (E)

- No corresponde.

Ensayo de inhibición (E)

- No corresponde.

TRANSCRIPCION REVERSA**Condiciones completas de reacción (E)**

- M-MLV™ Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) fue utilizada de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

- 1 µl de random primers 50 µM (Invitrogen, USA), 1 µl de dNTP Mix 10 mM (Invitrogen, USA), 4 µl de First-Strand Buffer 5 X (Invitrogen, USA), 2 µl de DTT 0.1 M (Invitrogen, USA), 1 µl (40 U) de RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor (Invitrogen, USA), 1 µl (200 U) de M-MLV™ Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA), 10 µl de ARN (0,5 µg).

- Perfil térmico de la retro transcripción: 65°C durante 5 min (mix de primers, dNTPs y ARN), enfriamiento rápido en hielo, 37°C por 2 min, 25°C por 10 min, 37°C por 50 min y 70°C por 15 min.

Cantidad de ARN y volumen de reacción (E)

- 10 µl de ARN (0,5 µg de ARN), volumen de reacción: 20 µl.

Priming oligonucleótidos (si son específicos de genes) y concentración (E)

- Random primers 50 µM (Invitrogen, USA).

Reverse transcriptase y concentración (E)

- M-MLVTM Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA), 200 U.

Temperatura y tiempo (E)

- 65°C durante 5 min (mix de primers, dNTPs y ARN), enfriamiento rápido en hielo, 37°C por 2 min, 25°C por 10 min, 37°C por 50 min y 70°C por 15 min.

Cqs con o sin transcripción reversa (D)

- Cq con transcripción reversa < 40; Cq sin transcripción reversa: no detectado o con diferencia mayor a 10 Cq respecto de las muestras con transcripción reversa.

Condiciones de almacenamiento de ADNc (D)

- En freezer (-20°C).

INFORMACION DE LOS GENES ANALIZADOS POR qPCR**Símbolo del gen (E)**

gyrB, *pta*, *pbp2*, *pbp4*, *tnp*.

Número de acceso de la secuencia (E)

gyrB YP_498613.1, *pta* YP_499142.1, *pbp2* ABD30552.1, *pbp4* ABD29781.1, *tnp* AJ416751.1.

Tamaño del amplicón (E)

gyrB 121 pb, *pta* 121 pb, *pbp2* 85pb, *pbp4* 140pb, *tnp* 85pb.

Búsqueda in silico de especificidad (BLAST, etc.) (E)

- No corresponde.

Localización de cada primer por exón o intrón (si corresponde) (E)

- No corresponde, procariota.

Que variantes de splicing son detectadas? (E)

- No corresponde, procariota.

Oligonucleótidos para qPCR

Secuencias de los oligonucleótidos (E)

Nombre	Secuencia	Referencia
<i>gyrB</i> F	CCAGGTAAATTAGCCGATTGC	(141)
<i>gyrB</i> R	AAATCGCCTGCGTTCTAGAG	
<i>pta</i> F	AAAGCGCCAGGTGCTAAATTAC	(141)
<i>pta</i> R	CTGGACCAACTGCATCATATCC	
<i>pbp2</i> F	CGGTGCTGAAACTTATTCACAATA	(47)
<i>pbp2</i> R	AGTGTATGAGGTGTAAAGCCGTAA	
<i>pbp4</i> F	GCACCTTCCAATGAAAAGTTG	Esta tesis
<i>pbp4</i> R	GTAACGACTGCTAGAGACTATGCC	
<i>tnp</i> Fw	GGATTTCGAAGACGCCTTTCAA	(142)
<i>tnp</i> Rv	GATTCAGTCGTTCAATTAGATGGTACTC	

Localización e identidad de alguna modificación (E)

- No corresponde.

PROTOCOLO de qPCR

Condiciones completas de reacción (E)

- La mezcla de reacción consistió en 10 µl de SYBR[®] Select Master Mix 2 X (Applied Biosystems, USA), 0,3 µl de cada primer 10 µM (150 nM final), 4,4 µl de agua milliQ libre de nucleasas y 5 µl de ADNc (dilución 1:100) – volumen final = 20 µl.

- El protocolo de ciclado consistió en un hold a 50°C durante 2 min, 95°C durante 2 min, seguido de 40 ciclos de 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C.

- Se realizó el análisis por curvas de melting luego de cada corrida.

Volumen de reaccion y cantidad de ADNc/ADN (E)

- Volumen total de reacción: 20 μ l, volumen de ADNc: 5 μ l del diluido 100 veces luego de RT-PCR.

Concentración de oligonucleótidos, (sonda), Mg^{2+} y dNTP (E)

- 150 nM de cada primer, Mg^{2+} y dNTPs fueron componentes de la mezcla comercial SYBR[®] Select Master Mix (Applied Biosystems, USA), cuya concentración es desconocida.

Identidad de la polimerasa y concentración (E)

- AmpliTaq[®] DNA Polymerase - componente de la mezcla comercial SYBR[®] Select Master Mix (Applied Biosystems, USA), cuya concentración es desconocida.

Fabricante e identidad del buffer/kit (E)

- SYBR[®] Select Master Mix (Applied Biosystems, USA).

Aditivos (SYBR Green I, DMSO, etc.) (E)

- No corresponde.

Fabricante de las placas/tubos y número de catálogo (D)

- MicroAmp[®] Optical 96-Well Reaction Plate (número de catálogo 4306737, Applied Biosystems, USA).

- MicroAmp[®] Optical 96-384 Well Optical Adhesive films (número de catálogo 4360954, Applied Biosystems, USA).

Parámetros de termo ciclado completos (E)

- El programa de termo ciclado consistió en un hold a 50°C durante 2 min, 95°C durante 2 min, seguido de 40 ciclos por 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C. Curva de melting de 60°C a 95°C.

Setup de la reacción (manual/robótica) (D)

- Manual.

Fabricante del equipo de qPCR (E)

- 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA).

VALIDACION de qPCR**Especificidad (gel, secuencia, fusión, o digestión) (E)**

- Se realizó un análisis de la curva de melting.

Para SYBR Green I, Cq del NTC (E)

- No hubo señal en el NTC o $Cq > 37$.

Curvas de calibración con pendiente m, intersección y, R^2 y eficiencia de la PCR (E) calculada a partir de la pendiente (E)

Gen	m	y	R^2	E
<i>gyrB</i>	- 3,292	33,016	0,996	101,277
<i>Pta</i>	- 3,373	31,944	0,996	97,916
<i>pbp4</i>	- 3,179	34,455	0,998	106,35
<i>pbp2</i>	- 3,509	32,344	0,993	92,737
<i>Tnp</i>	- 3,475	32,511	0,998	93,993

Rango dinámico lineal (E)

- Se realizaron 5 puntos de una curva de diluciones seriadas al décimo (10^0 - 10^{-5} , el número de copias reales es desconocido) con ADNc.

- Las reacciones fueron lineales en el rango 10^0 - 10^{-4} para los genes *pta* y *gyrB*, y 10^{-1} - 10^{-4} para los genes *pbp2*, *pbp4*, y *tnp*.

- Todas las reacciones cubren a gran rango de valores de Cq.

- Los valores de Cq obtenidos durante los experimentos estuvieron en este rango.

Variación de Cq en límite de detección (E)

- No determinado.

Evidencia de límite de detección (E)

- No determinado.

Para multiplex, eficiencia y LOD de cada ensayo (E)

- No corresponde.

ANALISIS DE DATOS

Programa para analizar qPCR (fuente, versión) (E)

7500 Software (Applied Biosystems, USA, version 2.0.6)

Método de determinación de C_q (E)

- 2^{da} máxima derivada.

Identificación de outlier y disposición (E)

- No determinado.

Resultados para NTCs (E)

- Sin señal en NTC o C_q > 37.

Justificación del número y elección de genes de referencia (E)

- Identificación de genes de referencia: se utilizaron genes de referencia (*gyrB* y *pta*) previamente descritos para *S. aureus* (141).

- Se eligió la combinación de dos genes de referencia como más estables siguiendo el parámetro M y el CV%. Los 2 genes de referencia tuvieron que cumplir que el valor M sea menor a 0,5 y tener CV menor a 25% cuando se los comparó entre sí (145).

Descripción del método de normalización (E)

- Se realizó el cálculo de las cantidades relativas (RQ) de cada gen y de los genes de referencia teniendo en cuenta la eficiencia de la reacción de qPCR calculada a partir de la curva estándar. Con estos datos, posteriormente se calcularon las cantidades relativas normalizadas (NRQ) de cada gen de interés. Se realizó normalización a la media geométrica de los RQ de los genes de referencia (53, 145).

Número y estadio de las replicas técnicas (RT o qPCR) (E)

- Dos replicas técnicas en la qPCR.

Repetibilidad (variación intra ensayo) (E)

-La desviación estándar de los duplicados fue menor a 0.5.

Métodos estadísticos para significancia de los resultados (E)

-ANOVA de dos factores.

Software (fuente, versión) (E)

- Infostat. Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. 2012. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
2. **(IWG-SCC), I. W. G. o. t. C. o. S. C. C. E.** 2009. Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:4961-7.
3. **Adhikari, R. P., G. C. Scales, K. Kobayashi, J. M. Smith, B. Berger-Bachi, and G. M. Cook.** 2004. Vancomycin-induced deletion of the methicillin resistance gene *mecA* in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* **54**:360-3.
4. **Antignac, A., K. Sieradzki, and A. Tomasz.** 2007. Perturbation of cell wall synthesis suppresses autolysis in *Staphylococcus aureus*: evidence for coregulation of cell wall synthetic and hydrolytic enzymes. *J Bacteriol* **189**:7573-80.
5. **Appelbaum, P. C.** 2007. Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int J Antimicrob Agents* **30**:398-408.
6. **Aubry-Damon, H., C. J. Soussy, and P. Courvalin.** 1998. Characterization of mutations in the *rpoB* gene that confer rifampin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:2590-4.
7. **Avison, M. B., P. M. Bennett, R. A. Howe, and T. R. Walsh.** 2002. Preliminary analysis of the genetic basis for vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* strain Mu50. *J Antimicrob Chemother* **49**:255-60.
8. **Banerjee, T., and S. Anupurba.** 2012. Colonization with vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains containing the *vanA* resistance gene in a tertiary-care center in north India. *J Clin Microbiol* **50**:1730-2.
9. **Bobin-Dubreux, S., M. E. Reverdy, C. Nervi, M. Rougier, A. Bolmstrom, F. Vandenesch, and J. Etienne.** 2001. Clinical isolate of vancomycin-heterointermediate *Staphylococcus aureus* susceptible to methicillin and in vitro selection of a vancomycin-resistant derivative. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:349-52.
10. **Boyen, F., F. Vangroenweghe, P. Butaye, E. De Graef, F. Castryck, P. Heylen, M. Vanrobaeys, and F. Haesebrouck.** 2010. Disk prediffusion is a reliable method for testing colistin susceptibility in porcine *E. coli* strains. *Vet Microbiol* **144**:359-62.
11. **Boyle-Vavra, S., S. K. Berke, J. C. Lee, and R. S. Daum.** 2000. Reversion of the glycopeptide resistance phenotype in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:272-7.
12. **Boyle-Vavra, S., S. Yin, D. S. Jo, C. P. Montgomery, and R. S. Daum.** 2013. *VraT/YvqF* is required for methicillin resistance and activation of the *VraSR* regulon in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **57**:83-95.
13. **Bustin, S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. W. Pfaffl, G. L. Shipley, J. Vandesompele, and C. T. Wittwer.** 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* **55**:611-22.
14. **Byrne, M. E., D. A. Rouch, and R. A. Skurray.** 1989. Nucleotide sequence analysis of IS256 from the *Staphylococcus aureus* gentamicin-tobramycin-kanamycin-resistance transposon Tn4001. *Gene* **81**:361-7.
15. **Cafiso, V., T. Bertuccio, D. Spina, S. Purrello, F. Campanile, C. Di Pietro, M. Purrello, and S. Stefani.** Modulating activity of vancomycin and daptomycin on the

expression of autolysis cell-wall turnover and membrane charge genes in hVISA and VISA strains. *PLoS One* **7**:e29573.

16. **Cui, L., H. Murakami, K. Kuwahara-Arai, H. Hanaki, and K. Hiramatsu.** 2000. Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:2276-85.
17. **Cui, L., H. M. Neoh, M. Shoji, and K. Hiramatsu.** 2009. Contribution of *vraSR* and *graSR* point mutations to vancomycin resistance in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:1231-4.
18. **Cui, L., E. Tominaga, H. M. Neoh, and K. Hiramatsu.** 2006. Correlation between Reduced Daptomycin Susceptibility and Vancomycin Resistance in Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:1079-82.
19. **Cuirolo, A., K. Plata, and A. E. Rosato.** 2009. Development of homogeneous expression of resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains is functionally associated with a beta-lactam-mediated SOS response. *J Antimicrob Chemother* **64**:37-45.
20. **Chambers, H. F., Archer, G.L., Fawcett, P. and Karr, M.** 2005. Fluoroquinolone (FQ) Enhanced Expression of Resistance Phenotype of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). ICAAC05.
21. **Chambers, H. F., and F. R. Deleo.** 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* **7**:629-41.
22. **Chatterjee, S. S., and M. Otto.** 2013. Improved understanding of factors driving methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic waves. *Clin Epidemiol* **5**:205-17.
23. **Chen, H. Y., C. C. Chen, C. S. Fang, Y. T. Hsieh, M. H. Lin, and J. C. Shu.** Vancomycin activates sigma(B) in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* resulting in the enhancement of cytotoxicity. *PLoS One* **6**:e24472.
24. **Chung, M., H. de Lencastre, P. Matthews, A. Tomasz, I. Adamsson, M. Aires de Sousa, T. Camou, C. Cocuzza, A. Corso, I. Couto, A. Dominguez, M. Gniadkowski, R. Goering, A. Gomes, K. Kikuchi, A. Marchese, R. Mato, O. Melter, D. Oliveira, R. Palacio, R. Sa-Leao, I. Santos Sanches, J. H. Song, P. T. Tassios, and P. Villari.** 2000. 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. *Microb Drug Resist* **6**:189-98.
25. **Delaune, A., S. Dubrac, C. Blanchet, O. Poupel, U. Mader, A. Hiron, A. Leduc, C. Fitting, P. Nicolas, J. M. Cavaillon, M. Adib-Conquy, and T. Msadek.** 2012. The WalkR system controls major staphylococcal virulence genes and is involved in triggering the host inflammatory response. *Infect Immun* **80**:3438-53.
26. **Delaune, A., O. Poupel, A. Mallet, Y. M. Coic, T. Msadek, and S. Dubrac.** 2011. Peptidoglycan crosslinking relaxation plays an important role in *Staphylococcus aureus* WalkR-dependent cell viability. *PLoS One* **6**:e17054.
27. **Deurenberg, R. H., and E. E. Stobberingh.** 2008. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* **8**:747-63.
28. **Dubrac, S., P. Bisicchia, K. M. Devine, and T. Msadek.** 2008. A matter of life and death: cell wall homeostasis and the WalkR (YycGF) essential signal transduction pathway. *Mol Microbiol* **70**:1307-22.
29. **Endimiani, A., M. Blackford, E. C. Dasenbrook, M. D. Reed, S. Bajaksouszian, A. M. Hujer, S. D. Rudin, K. M. Hujer, V. Perreten, L. B. Rice, M. R. Jacobs, M. W. Konstan, and R. A. Bonomo.** 2011. Emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* after prolonged treatment of cystic fibrosis patients in Cleveland, Ohio. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:1684-92.

30. **Enright, M. C., N. P. Day, C. E. Davies, S. J. Peacock, and B. G. Spratt.** 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **38**:1008-15.
31. **Errecalde, L., P. Ceriana, P. Gagetti, M. Erbin, A. Duarte, J. R. M, D. Cuatz, A. Corso, and S. Kaufman.** 2013. First isolation in Argentina of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with intermediate susceptibility to vancomycin and nonsusceptibility to daptomycin. *Rev Argent Microbiol* **45**:99-103.
32. **Falord, M., G. Karimova, A. Hiron, and T. Msadek.** 2011. GraXSR proteins interact with the *VraFG* ABC transporter to form a five-component system required for cationic antimicrobial peptide sensing and resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **56**:1047-58.
33. **Falord, M., U. Mader, A. Hiron, M. Debarbouille, and T. Msadek.** 2011. Investigation of the *Staphylococcus aureus* GraSR regulon reveals novel links to virulence, stress response and cell wall signal transduction pathways. *PLoS One* **6**:e21323.
34. **Feng, Y., C. J. Chen, L. H. Su, S. Hu, J. Yu, and C. H. Chiu.** 2008. Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev* **32**:23-37.
35. **Fernandez, S., L. de Vedia, M. J. Lopez Furst, N. Gardella, S. Di Gregorio, M. C. Ganaha, S. Prieto, E. Carbone, N. Lista, F. Rotrying, M. E. Stryjewski, and M. Mollerach.** 2013. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST30-SCCmec IVc clone as the major cause of community-acquired invasive infections in Argentina. *Infect Genet Evol* **14**:401-5.
36. **Fridkin, S. K., J. C. Hageman, M. Morrison, L. T. Sanza, K. Como-Sabetti, J. A. Jernigan, K. Harriman, L. H. Harrison, R. Lynfield, and M. M. Farley.** 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. *N Engl J Med* **352**:1436-44.
37. **Galleni, M., B. Lakaye, S. Lepage, M. Jamin, I. Thamm, B. Joris, and J. M. Frere.** 1993. A new, highly sensitive method for the detection and quantification of penicillin-binding proteins. *Biochem J* **291 (Pt 1)**:19-21.
38. **Gardella, N., S. Fernandez, S. Di Gregorio, A. Cuirolo, G. Gutkind, and M. Mollerach.** [Comparative study of clones from isolates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prevalent in Argentina]. *Rev Panam Salud Publica* **30**:665-6.
39. **Gardella, N., S. Murzicato, S. Di Gregorio, A. Cuirolo, J. Dese, F. Crudo, G. Gutkind, and M. Mollerach.** 2011. Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among healthy children in a city of Argentina. *Infect Genet Evol* **11**:1066-71.
40. **Gardella, N., R. Picasso, S. C. Predari, M. Lasala, M. Foccoli, G. Benchetrit, A. Famiglietti, M. Catalano, M. Mollerach, and G. Gutkind.** 2005. 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. *Rev Argent Microbiol* **37**:156-60.
41. **Gardella, N., M. von Specht, A. Cuirolo, A. Rosato, G. Gutkind, and M. Mollerach.** 2008. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, eastern Argentina. *Diagn Microbiol Infect Dis* **62**:343-7.
42. **Garnier, F., D. Chainier, T. Walsh, A. Karlsson, A. Bolmstrom, C. Grelaud, M. Mounier, F. Denis, and M. C. Ploy.** 2006. A 1 year surveillance study of glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* strains in a French hospital. *J Antimicrob Chemother* **57**:146-9.
43. **Garrity, G. M., Holt, J.G.** 2001. The road map to the manual 2nd ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer Verlag, New York, NY.

44. **Giesbrecht, P., T. Kersten, H. Maidhof, and J. Wecke.** 1998. Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:1371-414.
45. **Gilot, P., G. Lina, T. Cochard, and B. Poutrel.** 2002. Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. *J Clin Microbiol* **40**:4060-7.
46. **Girardin, S. E., I. G. Boneca, L. A. Carneiro, A. Antignac, M. Jehanno, J. Viala, K. Tedin, M. K. Taha, A. Labigne, U. Zahringer, A. J. Coyle, P. S. DiStefano, J. Bertin, P. J. Sansonetti, and D. J. Philpott.** 2003. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* **300**:1584-7.
47. **Goldstein, F., J. Perutka, A. Cuirolo, K. Plata, D. Faccone, J. Morris, A. Sournia, M. D. Kitzis, A. Ly, G. Archer, and A. E. Rosato.** 2007. Identification and phenotypic characterization of a beta-lactam-dependent, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:2514-22.
48. **Gould, I. M.** 2013. Treatment of bacteraemia: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA). *Int J Antimicrob Agents* **42 Suppl**:S17-21.
49. **Green, M. R. S., J.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* . 4th Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
50. **Harmsen, D., H. Claus, W. Witte, J. Rothganger, D. Turnwald, and U. Vogel.** 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *J Clin Microbiol* **41**:5442-8.
51. **Harris-Warrick, R. M., Y. Elkana, S. D. Ehrlich, and J. Lederberg.** 1975. Electrophoretic separation of *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**:2207-11.
52. **Hayden, M. K., K. Rezai, R. A. Hayes, K. Lolans, J. P. Quinn, and R. A. Weinstein.** 2005. Development of Daptomycin resistance in vivo in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **43**:5285-7.
53. **Hellemans, J., G. Mortier, A. De Paepe, F. Speleman, and J. Vandesompele.** 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* **8**:R19.
54. **Heusser, R., M. Ender, B. Berger-Bachi, and N. McCallum.** 2007. Mosaic staphylococcal cassette chromosome *mec* containing two recombinase loci and a new *mec* complex, B2. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:390-3.
55. **Hiramatsu, K.** 1998. The emergence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Japan. *Am J Med* **104**:7S-10S.
56. **Hiramatsu, K., H. Hanaki, T. Ino, K. Yabuta, T. Oguri, and F. C. Tenover.** 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* **40**:135-6.
57. **Hiramatsu, K., Kayayama, Y., Matsuo, M., Aiba, Y., Saito, M., and T. Hishinuma, Iwamoto, A.** 2014. Vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* **2**:12.
58. **Houston, P., S. E. Rowe, C. Pozzi, E. M. Waters, and J. P. O'Gara.** Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. *Infect Immun* **79**:1153-65.
59. **Howden, B. P., J. K. Davies, P. D. Johnson, T. P. Stinear, and M. L. Grayson.** 2010. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* **23**:99-139.

60. **Howden, B. P., A. Y. Peleg, and T. P. Stinear.** 2013. The evolution of vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogenous-VISA. *Infect Genet Evol* **21**:575-82.
61. **Howe, R. A., A. Monk, M. Wootton, T. R. Walsh, and M. C. Enright.** 2004. Vancomycin susceptibility within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Emerg Infect Dis* **10**:855-7.
62. **Ito, T., K. Hiramatsu, A. Tomasz, H. de Lencastre, V. Perreten, M. T. Holden, D. C. Coleman, R. Goering, P. M. Giffard, R. L. Skov, K. Zhang, H. Westh, F. O'Brien, F. C. Tenover, D. C. Oliveira, S. Boyle-Vavra, F. Laurent, A. M. Kearns, B. Kreiswirth, K. S. Ko, H. Grundmann, J. E. Sollid, J. F. John, Jr., R. Daum, B. Soderquist, and G. Buist.** 2012. Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. *Antimicrob Agents Chemother* **56**:4997-9.
63. **Ito, T., Y. Katayama, K. Asada, N. Mori, K. Tsutsumimoto, C. Tiensasitorn, and K. Hiramatsu.** 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1323-36.
64. **Ito, T., Y. Katayama, and K. Hiramatsu.** 1999. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:1449-58.
65. **Jansen, A., M. Turck, C. Szekat, M. Nagel, I. Clever, and G. Bierbaum.** 2007. Role of insertion elements and *yycFG* in the development of decreased susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* **297**:205-15.
66. **Kajimura, J., T. Fujiwara, S. Yamada, Y. Suzawa, T. Nishida, Y. Oyamada, I. Hayashi, J. Yamagishi, H. Komatsuzawa, and M. Sugai.** 2005. Identification and molecular characterization of an N-acetylmuramyl-L-alanine amidase Sle1 involved in cell separation of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **58**:1087-101.
67. **Katayama, Y., T. Ito, and K. Hiramatsu.** 2001. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1955-63.
68. **Katayama, Y., T. Ito, and K. Hiramatsu.** 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:1549-55.
69. **Katayama, Y., H. Murakami-Kuroda, L. Cui, and K. Hiramatsu.** 2009. Selection of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* by imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:3190-6.
70. **Kato, Y., T. Suzuki, T. Ida, and K. Maebashi.** 2010. Genetic changes associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*: predominance of amino acid substitutions in YvqF/VraSR. *J Antimicrob Chemother* **65**:37-45.
71. **Katz, B. D., S. A. Luperchio, and G. M. Thorne.** 2008. Detection of daptomycin-nonsusceptible strains using the Neo-Sensitab prediffusion method. *Diagn Microbiol Infect Dis* **61**:315-20.
72. **Kobayashi, S. D., J. M. Musser, and F. R. DeLeo.** Genomic analysis of the emergence of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *MBio* **3**.
73. **Kollef, M. H.** 2007. Limitations of vancomycin in the management of resistant staphylococcal infections. *Clin Infect Dis* **45 Suppl 3**:S191-5.
74. **Kondo, Y., T. Ito, X. X. Ma, S. Watanabe, B. N. Kreiswirth, J. Etienne, and K. Hiramatsu.** 2007. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:264-74.

75. **Kosowska-Shick, K., L. M. Ednie, P. McGhee, K. Smith, C. D. Todd, A. Wehler, and P. C. Appelbaum.** 2008. Incidence and characteristics of vancomycin nonsusceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Hershey Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:4510-3.
76. **Kuroda, M., H. Kuroda, T. Oshima, F. Takeuchi, H. Mori, and K. Hiramatsu.** 2003. Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **49**:807-21.
77. **Lalueza, A., F. Chaves, R. San Juan, M. Daskalaki, J. R. Otero, and J. M. Aguado.** 2010. Is high vancomycin minimum inhibitory concentration a good marker to predict the outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia? *J Infect Dis* **201**:311-2; author reply 312-3.
78. **Lattar, S. M., L. P. Tuchscher, D. Centron, K. Becker, S. C. Predari, F. R. Buzzola, D. A. Robinson, and D. O. Sordelli.** 2012. Molecular fingerprinting of *Staphylococcus aureus* isolated from patients with osteomyelitis in Argentina and clonal distribution of the *cap5(8)* genes and of other selected virulence genes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31**:2559-66.
79. **Li, S., R. L. Skov, X. Han, A. R. Larsen, J. Larsen, M. Sorum, M. Wulf, A. Voss, K. Hiramatsu, and T. Ito.** Novel types of staphylococcal cassette chromosome *mec* elements identified in clonal complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:3046-50.
80. **Lin, S. Y., T. C. Chen, F. J. Chen, Y. H. Chen, Y. I. Lin, L. K. Siu, and P. L. Lu.** 2012. Molecular epidemiology and clinical characteristics of hetero-resistant vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* bacteremia in a Taiwan Medical Center. *J Microbiol Immunol Infect* **45**:435-41.
81. **Lina, G., Y. Piemont, F. Godail-Gamot, M. Bes, M. O. Peter, V. Gauduchon, F. Vandenesch, and J. Etienne.** 1999. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* **29**:1128-32.
82. **Liu, C., A. Bayer, S. E. Cosgrove, R. S. Daum, S. K. Fridkin, R. J. Gorwitz, S. L. Kaplan, A. W. Karchmer, D. P. Levine, B. E. Murray, J. R. M, D. A. Talan, and H. F. Chambers.** 2011. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clin Infect Dis* **52**:e18-55.
83. **Long, S. W., R. J. Olsen, S. C. Mehta, T. Palzkill, P. L. Cernoch, K. K. Perez, W. L. Musick, A. E. Rosato, and J. M. Musser.** 2014. PBP2a Mutations Causing High-Level Ceftaroline Resistance in Clinical Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **58**:6668-74.
84. **López Furst, M. J.** 2011. *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina en la comunidad: la emergencia de un patógeno. *Medicina (Buenos Aires)* **71**:585-586.
85. **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.** 2013. Prospective Multicenter Study of Community-Associated Skin and Skin Structure Infections due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Buenos Aires, Argentina. . *Plos One*. in press.
86. **Malachowa, N., and F. R. DeLeo.** 2010. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol Life Sci* **67**:3057-71.
87. **Maslanova, I., J. Doskar, M. Varga, L. Kuntova, J. Muzik, D. Maluskova, V. Ruzickova, and R. Pantucek.** 2013. Bacteriophages of *Staphylococcus aureus* efficiently package various bacterial genes and mobile genetic elements including SCC*mec* with different frequencies. *Environ Microbiol Rep* **5**:66-73.

88. **McCallum, N., P. S. Meier, R. Heusser, and B. Berger-Bachi.** 2011. Mutational analyses of open reading frames within the *wraSR* operon and their roles in the cell wall stress response of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:1391-402.
89. **McEvoy, C. R., B. Tsuji, W. Gao, T. Seemann, J. L. Porter, K. Doig, D. Ngo, B. P. Howden, and T. P. Stinear.** 2013. Decreased vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus* caused by IS256 tempering of WalkR expression. *Antimicrob Agents Chemother* **57**:3240-9.
90. **Memmi, G., S. R. Filipe, M. G. Pinho, Z. Fu, and A. Cheung.** 2008. *Staphylococcus aureus* PBP4 is essential for beta-lactam resistance in community-acquired methicillin-resistant strains. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:3955-66.
91. **Michel, B.** 2005. After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us. *PLoS Biol* **3**:e255.
92. **Milheirico, C., D. C. Oliveira, and H. de Lencastre.** 2007. Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome *mec* type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: 'SCC*mec* IV multiplex'. *J Antimicrob Chemother* **60**:42-8.
93. **Milheirico, C., D. C. Oliveira, and H. de Lencastre.** 2007. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:3374-7.
94. **Moran, G. J., A. Krishnadasan, R. J. Gorwitz, G. E. Fosheim, L. K. McDougal, R. B. Carey, and D. A. Talan.** 2006. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *N Engl J Med* **355**:666-74.
95. **Moravvej, Z., F. Estaji, E. Askari, K. Solhjoui, M. Naderi Nasab, and S. Saadat.** 2013. Update on the global number of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) strains. *Int J Antimicrob Agents* **42**:370-1.
96. **Murakami, K., W. Minamide, K. Wada, E. Nakamura, H. Teraoka, and S. Watanabe.** 1991. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **29**:2240-4.
97. **Murphy, E., L. Huwyler, and C. de Freire Bastos Mdo.** 1985. Transposon Tn554: complete nucleotide sequence and isolation of transposition-defective and antibiotic-sensitive mutants. *EMBO J* **4**:3357-65.
98. **Murray, P. M.** 2011. *Manual of Clinical Microbiology*. 10^o Edición. ASM press, Washington DC.
99. **Nagel, M., T. Reuter, A. Jansen, C. Szekat, and G. Bierbaum.** 2011. Influence of ciprofloxacin and vancomycin on mutation rate and transposition of IS256 in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* **301**:229-36.
100. **Nagy, Z., and M. Chandler.** 2004. Regulation of transposition in bacteria. *Res Microbiol* **155**:387-98.
101. **Nielsen S.V., C. J. B.** 2005. Detection of decreased susceptibility to glycopeptides in *S. aureus* using tablet (disc) prediffusion. 15th Eur. Cong. Clin. Microbiol. Inf. Dis. (ECCMID).
102. **O'Neill, A. J., J. H. Cove, and I. Chopra.** 2001. Mutation frequencies for resistance to fusidic acid and rifampicin in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* **47**:647-50.
103. **Park, K. H., E. S. Kim, H. S. Kim, S. J. Park, K. M. Bang, H. J. Park, S. Y. Park, S. M. Moon, Y. P. Chong, S. H. Kim, S. O. Lee, S. H. Choi, J. Y. Jeong, M. N. Kim, J. H. Woo, and Y. S. Kim.** 2012. Comparison of the clinical features, bacterial genotypes and outcomes of patients with bacteraemia due to heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and vancomycin-susceptible *S. aureus*. *J Antimicrob Chemother* **67**:1843-9.

104. **Perazzi, B., N. Bello, M. Mollerach, C. Vay, M. B. Lasala, and A. Famiglietti.** 2011. Endocarditis caused by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin: a case report. *J Med Case Rep* **5**:292.
105. **Pereira, S. F., A. O. Henriques, M. G. Pinho, H. de Lencastre, and A. Tomasz.** 2009. Evidence for a dual role of PBP1 in the cell division and cell separation of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **72**:895-904.
106. **Pereira, S. F., A. O. Henriques, M. G. Pinho, H. de Lencastre, and A. Tomasz.** 2007. Role of PBP1 in cell division of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **189**:3525-31.
107. **Pfeltz, R. F., V. K. Singh, J. L. Schmidt, M. A. Batten, C. S. Baranyk, M. J. Nadakavukaren, R. K. Jayaswal, and B. J. Wilkinson.** 2000. Characterization of passage-selected vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of diverse parental backgrounds. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:294-303.
108. **Pinho, M. G., H. de Lencastre, and A. Tomasz.** 2000. Cloning, characterization, and inactivation of the gene *pbpC*, encoding penicillin-binding protein 3 of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **182**:1074-9.
109. **Pinho, M. G., S. R. Filipe, H. de Lencastre, and A. Tomasz.** 2001. Complementation of the essential peptidoglycan transpeptidase function of penicillin-binding protein 2 (PBP2) by the drug resistance protein PBP2A in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **183**:6525-31.
110. **Pootoolal, J., J. Neu, and G. D. Wright.** 2002. Glycopeptide antibiotic resistance. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**:381-408.
111. **Prakash, V., J. S. Lewis, 2nd, and J. H. Jorgensen.** 2008. Vancomycin MICs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates differ based upon the susceptibility test method used. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:4528.
112. **Reipert, A., K. Ehlert, T. Kast, and G. Bierbaum.** 2003. Morphological and genetic differences in two isogenic *Staphylococcus aureus* strains with decreased susceptibilities to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:568-76.
113. **Rincon, S., D. Panesso, L. Diaz, L. P. Carvajal, J. Reyes, J. M. Munita, and C. A. Arias.** 2014. [Resistance to "last resort" antibiotics in Gram-positive cocci: The post-vancomycin era]. *Biomedica* **34 Suppl 1**:191-208.
114. **Roch, M., P. Clair, A. Renzoni, M. E. Reverdy, O. Dauwalder, M. Bes, A. Martra, A. M. Freydiere, F. Laurent, P. Reix, O. Dumitrescu, and F. Vandenesch.** 2014. Exposure of *Staphylococcus aureus* to subinhibitory concentrations of beta-lactam antibiotics induces heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **58**:5306-14.
115. **Rouch, D. A., L. J. Messerotti, L. S. Loo, C. A. Jackson, and R. A. Skurray.** 1989. Trimethoprim resistance transposon Tn4003 from *Staphylococcus aureus* encodes genes for a dihydrofolate reductase and thymidylate synthetase flanked by three copies of IS257. *Mol Microbiol* **3**:161-75.
116. **Rowland, S. J., and K. G. Dyke.** 1989. Characterization of the staphylococcal beta-lactamase transposon Tn552. *EMBO J* **8**:2761-73.
117. **Sader HS, R. P., Jones RN.** 2009. Nine-hospital study comparing broth microdilution and Etest method results for vancomycin and daptomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**:3162-5.
118. **Sakoulas, G., G. M. Eliopoulos, R. C. Moellering, Jr., C. Wennersten, L. Venkataraman, R. P. Novick, and H. S. Gold.** 2002. Accessory gene regulator (*agr*) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:1492-502.
119. **Sakoulas, G., R. C. Moellering, Jr., and G. M. Eliopoulos.** 2006. Adaptation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the face of vancomycin therapy. *Clin Infect Dis* **42 Suppl 1**:S40-50.

120. **Sancak, B., S. Yagci, D. Gur, Z. Gulay, D. Ogunc, G. Soyletir, A. N. Yalcin, D. O. Dundar, A. W. Topcu, F. Aksit, G. Usluer, C. Ozakin, H. Akalin, M. Hayran, and V. Korten.** 2013. Vancomycin and daptomycin minimum inhibitory concentration distribution and occurrence of heteroresistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* blood isolates in Turkey. *BMC Infect Dis* **13**:583.
121. **Schaaff, F., A. Reipert, and G. Bierbaum.** 2002. An elevated mutation frequency favors development of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:3540-8.
122. **Scheffers, D. J., and M. G. Pinho.** 2005. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**:585-607.
123. **Schreiber, F., C. Szekat, M. Josten, H. G. Sahl, and G. Bierbaum.** 2013. Antibiotic-induced autoactivation of IS256 in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **57**:6381-4.
124. **Schweizer, M. L., J. P. Furuno, G. Sakoulas, J. K. Johnson, A. D. Harris, M. D. Shardell, J. C. McGregor, K. A. Thom, and E. N. Perencevich.** 2011. Increased mortality with accessory gene regulator (*agr*) dysfunction in *Staphylococcus aureus* among bacteremic patients. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:1082-7.
125. **Shoji, M., L. Cui, R. Iizuka, A. Komoto, H. M. Neoh, Y. Watanabe, T. Hishinuma, and K. Hiramatsu.** walk and clpP mutations confer reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:3870-81.
126. **Shore, A. C., E. C. Deasy, P. Slickers, G. Brennan, B. O'Connell, S. Monecke, R. Ehricht, and D. C. Coleman.** 2011. Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:3765-73.
127. **Sieradzki, K., and A. Tomasz.** 2003. Alterations of cell wall structure and metabolism accompany reduced susceptibility to vancomycin in an isogenic series of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **185**:7103-10.
128. **Silveira, A. C., G. E. Sambrano, T. G. Paim, J. Caierao, C. M. Cordova, and P. A. d'Azevedo.** 2014. Is prediffusion test an alternative to improve accuracy in screening hVISA strains and to detect susceptibility to glycopeptides/lipopeptides? *Diagn Microbiol Infect Dis*.
129. **Sola, C., G. Gribaudo, A. Vindel, L. Patrino, and J. L. Bocco.** 2002. Identification of a novel methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic clone in Cordoba, Argentina, involved in nosocomial infections. *J Clin Microbiol* **40**:1427-35.
130. **Sola, C., R. O. Lamberghini, M. Ciarlantini, A. L. Egea, P. Gonzalez, E. G. Diaz, V. Huerta, J. Gonzalez, A. Corso, M. Vilaro, J. P. Petiti, A. Torres, A. Vindel, and J. L. Bocco.** 2011. Heterogeneous vancomycin-intermediate susceptibility in a community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic clone, in a case of Infective Endocarditis in Argentina. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **10**:15.
131. **Sola, C., H. Paganini, A. L. Egea, A. J. Moyano, A. Garnerio, I. Kevric, C. Culasso, A. Vindel, H. Lopardo, and J. L. Bocco.** 2012. Spread of Epidemic MRSA-ST5-IV Clone Encoding PVL as a Major Cause of Community Onset Staphylococcal Infections in Argentinean Children. *PLoS One* **7**:e30487.
132. **Sola, C., H. A. Saka, A. Vindel, and J. L. Bocco.** 2008. Emergence and dissemination of a community-associated methicillin-resistant Pantone-Valentine leucocidin-positive *Staphylococcus aureus* clone sharing the sequence type 5 lineage with the most prevalent nosocomial clone in the same region of Argentina. *J Clin Microbiol* **46**:1826-31.
133. **Soriano, A., F. Marco, J. A. Martinez, E. Pisos, M. Almela, V. P. Dimova, D. Alamo, M. Ortega, J. Lopez, and J. Mensa.** 2008. Influence of vancomycin minimum inhibitory

- concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. Clin Infect Dis **46**:193-200.
134. **Stryjewski, M. E., and G. R. Corey.** 2014. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolving pathogen. Clin Infect Dis **58 Suppl 1**:S10-9.
 135. **Takesue, Y., K. Nakajima, Y. Takahashi, K. Ichiki, M. Ishihara, Y. Wada, T. Tsuchida, M. Uchino, and H. Ikeuchi.** 2011. Clinical characteristics of vancomycin minimum inhibitory concentration of 2 µg/ml methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with bacteremia. J Infect Chemother **17**:52-7.
 136. **Tattevin, P., L. Basuino, and H. F. Chambers.** 2009. Subinhibitory fluoroquinolone exposure selects for reduced beta-lactam susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and alterations in the SOS-mediated response. Res Microbiol **160**:187-92.
 137. **Tenover, F. C.** 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am J Infect Control **34**:S3-10; discussion S64-73.
 138. **Tenover, F. C., and R. C. Moellering, Jr.** 2007. The rationale for revising the Clinical and Laboratory Standards Institute vancomycin minimal inhibitory concentration interpretive criteria for *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis **44**:1208-15.
 139. **Tomasz, A. I. V. A. F., R. P. Novick, J. J. Ferretti, D. A. Portnoy, and J. I. Rood (ed.).** 2006 The staphylococcal cell wall. Gram-positive pathogens, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.:p. 443–455.
 140. **Traber, K. E., E. Lee, S. Benson, R. Corrigan, M. Cantera, B. Shopsin, and R. P. Novick.** 2008. *agr* function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. Microbiology **154**:2265-74.
 141. **Valihrach, L., and K. Demnerova.** 2012. Impact of normalization method on experimental outcome using RT-qPCR in *Staphylococcus aureus*. J Microbiol Methods **90**:214-6.
 142. **Valle, J., M. Vergara-Irigaray, N. Merino, J. R. Penades, and I. Lasa.** 2007. sigmaB regulates IS256-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotypic variation. J Bacteriol **189**:2886-96.
 143. **van Hal, S. J., and D. L. Paterson.** 2011. Systematic review and meta-analysis of the significance of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates. Antimicrob Agents Chemother **55**:405-10.
 144. **van Hal, S. J., M. C. Wehrhahn, T. Barbagiannakos, J. Mercer, D. Chen, D. L. Paterson, and I. B. Gosbell.** 2011. Performance of various testing methodologies for detection of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in bloodstream isolates. J Clin Microbiol **49**:1489-94.
 145. **Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman.** 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol **3**:RESEARCH0034.
 146. **von Eiff, C., K. Becker, K. Machka, H. Stammer, and G. Peters.** 2001. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. N Engl J Med **344**:11-6.
 147. **von Specht, M., N. Gardella, P. Tagliaferri, G. Gutkind, and M. Mollerach.** 2006. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community-acquired meningitis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **25**:267-9.
 148. **Wada, A., and H. Watanabe.** 1998. Penicillin-binding protein 1 of *Staphylococcus aureus* is essential for growth. J Bacteriol **180**:2759-65.
 149. **Wang, J. L., J. T. Wang, W. H. Sheng, Y. C. Chen, and S. C. Chang.** 2010. Nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteremia in Taiwan: mortality analyses and the impact of vancomycin, MIC = 2 mg/L, by the broth microdilution method. BMC Infect Dis **10**:159.
 150. **Watanabe, Y., L. Cui, Y. Katayama, K. Kozue, and K. Hiramatsu.** 2011. Impact of *rpoB* mutations on reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol **49**:2680-4.

151. **Weigel, L. M., D. B. Clewell, S. R. Gill, N. C. Clark, L. K. McDougal, S. E. Flannagan, J. F. Kolonay, J. Shetty, G. E. Killgore, and F. C. Tenover.** 2003. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* **302**:1569-71.
152. **WHO.** 2014. Antimicrobial resistance. Global report on surveillance. World Health Organization.
153. **Wootton, M., R. A. Howe, R. Hillman, T. R. Walsh, P. M. Bennett, and A. P. MacGowan.** 2001. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *J Antimicrob Chemother* **47**:399-403.
154. **Yamakawa, J., M. Aminaka, K. Okuzumi, H. Kobayashi, Y. Katayama, S. Kondo, A. Nakamura, T. Oguri, S. Hori, L. Cui, T. Ito, J. Jin, H. Kurosawa, K. Kaneko, and K. Hiramatsu.** Heterogeneously vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA) emerged before the clinical introduction of vancomycin in Japan: a retrospective study. *J Infect Chemother* **18**:406-9.
155. **Yin, S., R. S. Daum, and S. Boyle-Vavra.** 2006. *VraSR* two-component regulatory system and its role in induction of *pbp2* and *vraSR* expression by cell wall antimicrobials in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:336-43.
156. **Zhu, W., N. C. Clark, L. K. McDougal, J. Hageman, L. C. McDonald, and J. B. Patel.** 2008. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with Inc18-like *vanA* plasmids in Michigan. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:452-7.