

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Caracterización genómica de *Staphylococcus aureus* susceptibles a meticilina con efecto inóculo en Colombia**

**Fredi Giovanni Soto Guzmán**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias  
Bogotá, Colombia  
2022



# **Caracterización genómica de *Staphylococcus aureus* susceptibles a meticilina con efecto inóculo en Colombia**

**Fredi Giovanni Soto Guzmán**

**Proyecto de tesis para optar al título de:**

**Magister en Ciencias - Microbiología**

**Directora:**

PhD., Jinnethe Cristina Reyes Manrique

**Codirectora:**

M.Sc., María Teresa Jesús Reguero Reza

**Línea de Investigación:**

Biología Molecular de Agentes Infecciosos

**Grupo de Investigación:**

Unidad de Genética y Resistencia Antimicrobiana (UGRA) – Universidad El Bosque

**Universidad Nacional de Colombia**

**Facultad de Ciencias, Posgrado Interfacultades de Microbiología Bogotá, Colombia**

**2022**



*A la memoria de mi padre:*

*Carlos Alfonso Soto*

*1948 – 2021*

*A mi madre:*

*Cecilia Guzmán Guzmán*

*A la memoria de mi hermano:*

*Camilo Andrés Soto Guzmán*

*1988 – 1998*

*A mis hijos:*

*Juan Sebastián y María Carolina*

*Mis sobrinos:*

*María Alejandra y Cristian Camilo*

*A mi esposa:*

*Diana Carolina*

*A mi hermana:*

*Carolina*



# Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Fredi Giovanni Soto Guzmán

Bogotá D.C.

Fecha: noviembre 26 de 2021

## **Agradecimientos**

Agradezco a Dios y a María. A mis padres, por su esfuerzo y enseñanzas durante tantos años. A la Dra. Jinnethe Reyes, de UGRA – Universidad El Bosque, junto a todas las personas que trabajan en el laboratorio, en especial a la Dra. Betsy Castro. A la Dra. María Teresa Jesús Reguero y a la Dra. Martha Fontanilla, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional. A la Universidad Nacional de Colombia, por haberme permitido volver a sus aulas.

## Resumen

### **Caracterización genómica de *Staphylococcus aureus* susceptibles a meticilina con efecto inóculo en Colombia**

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es un microorganismo versátil, que puede ser colonizador de la piel y las mucosas de los vertebrados, siendo también capaz de causar enfermedades graves en los hospederos. Aunque se describe mundialmente el aumento de los aislamientos de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA por sus siglas en inglés), las cepas de *S. aureus* sensibles a meticilina (MSSA por sus siglas en inglés) continúan produciendo infecciones graves, que causan una morbimortalidad alta. La presencia de efecto inóculo a cefazolina es un fenómeno descrito desde hace aproximadamente 50 años, pero poco estudiado y comprendido. Comprobar que una infección por *S. aureus* meticilino sensible es causada por una cepa con presencia de este fenómeno de manera rápida, no es posible con metodología estándar y tampoco se conoce demasiado sobre los factores de resistencia y virulencia asociados en estas cepas. La presencia del efecto inóculo, puede hacer inútil el tratamiento con cefazolina cuando de forma empírica se utiliza o cuando con resultado del antibiograma, es reportada como sensible a este antibiótico, llevando a falla terapéutica.

El presente estudio tiene como objetivos: i) establecer la prevalencia de efecto inóculo a cefazolina en 186 aislamientos de MSSA provenientes de hemocultivos positivos (bacteriemia) de pacientes colombianos entre los años, 2011 a 2013, ii) identificar cambios genéticos específicos asociados al efecto inóculo en el operón *blaZ* e iii) identificar genes de resistencia a diferentes tipos de antibióticos y genes de virulencia en estas cepas.

Las MIC para Cz fueron determinadas con inóculos bacterianos estándar de  $5 \times 10^5$  UFC/mL y alto inóculo de  $5 \times 10^7$  UFC/mL, por microdilución en caldo BHI, que se dejaron en incubación por 24 horas a temperatura de 37°C. Se utilizaron rangos entre 0.0625 µg/mL, hasta 64 µg/ml. Se dejaban estas placas en incubación y se realizó la lectura e

interpretación adecuada. Este experimento se repitió tres veces con cada cepa y la observación de cada pozo fue realizada por tres observadores diferentes. Se consideró que existía el EICz en aquellas cepas con una concentración mayor o igual a 16  $\mu\text{g/mL}$ . El control de calidad se realizó utilizando cepas de referencia como i) la cepa TX0117, la cual es productora de alta cantidad de  $\beta$  - lactamasa tipo A con MIC de  $> 64 \mu\text{g/mL}$ ; ii) la cepa ATCC29213, cepa productora de pequeña cantidad de  $\beta$  - lactamasa tipo A con MIC de 2 a 4  $\mu\text{g/mL}$  y iii) la cepa ATCC25923, cepa  $\beta$  - lactamasa negativa con MIC de 0.25 a 0.5  $\mu\text{g/mL}$ . A estas cepas se les realizó la extracción de DNA, empleando el estuche comercial DNeasy Blood & Tissue Kit, Quiagen y la cuantificación del ADN genómico se realizó por fluorimetría empleando Qubit 2.0, la preparación de librerías se utilizó el estuche comercial Nextera XT (illumina); su verificación se hizo con fluorimetría (Qubit 2.0) y se empleó el equipo Agilent 2100 Bioanalyzer para su normalización y la secuenciación genómica se realizó en la plataforma illumina (MiSeq). Las lecturas de secuenciación fueron procesadas eliminando posibles contaminaciones y descartando lecturas de baja calidad mediante Trimmomatic; las lecturas fueron reensambladas con SPAdes y anotadas con RAST. Las búsquedas de cada genoma se realizaron con el programa BLASTX, contra las bases de datos ResFinder y VFDB. En la determinación de la secuenciación de *blaZ*, para identificar diferencias específicas de los aminoácidos en los residuos 128 – 216, se realizó a partir de un lineamiento múltiple de secuencias de la proteína con MUSCLE. El resistoma y el viruloma se realizó de acuerdo a la búsqueda en los genomas de 3078 genes de resistencia y 3659 de genes de virulencia en plataformas de información como ResFinder y Virulence factors database.

De los 186 aislamientos, 73 (39%) tenían presencia del efecto inóculo (EI) a cefazolina (Cz) [EICz], mientras que 113 aislamientos (61%) no lo tenían. Las  $\beta$  - lactamasas más asociadas a la presencia del EICz fueron la tipo A y la C y los alotipos BlaZ – 2 y BlaZ – 1 pertenecientes a los “complejos clonales (CC)” 30 y 8, respectivamente, adicional fueron los alotipos con mayor probabilidad de presentar el fenómeno estudiado. En las cepas sin EICz, se encontró que la  $\beta$  - lactamasa tipo B fue la más asociada a ausencia del fenotipo. Los alotipos más frecuentes fueron BlaZ – 3, BlaZ – 5 y BlaZ – 7 y los CC5, CC8 y CC1 fueron los más detectados en este grupo. En 24 de las 73 cepas con presencia del EICz, (32%) se encontró al menos un gen de resistencia a otros antibióticos como: *parC* para quinolonas, *rpoB* para rifampicina, *ant(9) - Ia* para aminoglicósidos, *tet(K)* para tetraciclinas

y *erm(A)* para macrólidos que no son antibióticos considerados de primera línea para el tratamiento de infecciones por MSSA. En ausencia del EICz, 93 de 113 cepas (82%), se encontró al menos un gen de resistencia de los ya mencionados, junto con otros como *fusB* de resistencia al ácido fusídico, *dfrA8* de resistencia al trimetoprim y más enzimas modificadores de aminoglicósidos como *aadD*, *aph(3') - III*, además, el gen *rpoB* no fue encontrado en este grupo de aislamientos sin el fenotipo. Los genes de virulencia muestran más diferencias entre los aislamientos con y sin presencia del efecto, pero la mayoría de ellas coinciden en la ausencia de genes como los asociados a la producción de leucocidinas como PVL, enterotoxinas, toxinas exfoliativas, coagulasa entre otros. En todas las cepas, se identificó el sistema regulador de genes accesorios (*agr*) y su relación con presencia o ausencia de EICz.

A partir de este trabajo se pudo concluir que la frecuencia del EICz en Colombia es de 39%, siendo las  $\beta$  - lactamasas tipo A y C y los alotipos BlaZ - 2 de la  $\beta$  - lactamasa tipo A y BlaZ - 1 de la  $\beta$  - lactamasa tipo C las más frecuentes. Se observó muy baja prevalencia de genes de resistencia a otros antibióticos diferentes de los B-láctamicos en las cepas con presencia de EICz. En cuanto a la virulencia, todas ellas presentaron gran cantidad y diversidad de genes. En cuanto a las cepas que presentaron ausencia del fenotipo correspondieron al 61% y esta se observó principalmente en aislamientos con  $\beta$  - lactamasa tipo B. Los alotipos BlaZ - 3, BlaZ - 5 y BlaZ - 7 fueron los más frecuentes en cepas sin EICz. Se encontraron genes de resistencia a otros antibióticos en mayor frecuencia y tenían gran cantidad y variedad de genes de virulencia en cepas sin presencia del EIC, lo cual muestra que no existe ninguna relación entre su perfil de resistencia y virulencia y la presencia del fenotipo. Finalmente, el sistema *agrIII* se relacionó más con la presencia de EICz, mientras que el sistema *agrII* se relacionó con la ausencia de EICz.

**Palabras claves:** *Staphylococcus aureus* meticilino sensible (MSSA), efecto inóculo, Cefazolina, Alotipo BlaZ, Colombia.



## Abstract

### **Genomic characterization of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* with inoculum effect in Colombia**

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is a versatile microorganism that colonizes the human skin and nasal mucous, as well as cause serious host infectious diseases. Although the increase of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) isolates is reported worldwide, the methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) continues to cause serious infections and high morbidity and mortality. The presence of cefazolin inoculum effect (CzIE) is a phenomenon described for approximately 50 years ago, but its mechanism is unknown. The presence of this phenomenon is not possible with standard methodology and neither is much known about the resistance and virulence factors associated with these strains. The presence of the CzIE may render treatment with cefazolin useless when it is used empirically or when as a result of the antibiogram is reported as sensitive leading to therapeutic failure.

The aims of this study are: i) to establish the prevalence of the CzIE in 186 MSSA isolates from bloodstream cultures (bacteremia) of Colombian patients between 2011 to 2013, ii) identify specific genetic changes associated with the CzIE in *blaZ* operon and iii) identify resistance genes to different antibiotics groups and virulence genes in these strains.

MICs for Cz were determined with standard bacterial inoculum of  $5 \times 10^5$  CFU/mL and high inoculum of  $5 \times 10^7$  CFU/mL, by microdilution in BHI broth, which were left in incubation for 24 hours at a temperature of 37°C. For all strains, 5 µL were served in plates with Cz. The initial concentration of the antibiotic was 10.000 µg/mL, from which dilutions were made to obtain concentrations of 0.0625 µg/mL, up to 64 µg/mL. Of each antibiotic preparation, 95 µL were taken. These plates were incubated for 24 hours and the appearance of a precipitate or where there was a significant turbidity of the same was observed. This experiment was repeated three times with each strain and the observation of each one was carried out by three different observers. EICz was considered to exist when a precipitate appeared at  $\text{MIC} \geq 16 \mu\text{g/mL}$ . These strains underwent nucleic acid extraction, libraries preparation and genomic sequencing. Three of the rows of the plates were used to collect control strains for high inoculum. The strains were TX0117: high – quantity producer type A  $\beta$  – lactamase with  $\text{MIC} > 64 \mu\text{g/mL}$ , ATCC29213: small – quantity producer type A  $\beta$  – lactamase with  $\text{MIC}$  is 2 to 4 µg/mL and ATCC25923, strain  $\beta$  – lactamase negative with

MIC of 0.25 to 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . DNA extraction was performed using the commercial DNeasy Blood & Tissue Kit, Quiagen. Genomic DNA quantification was performed by fluorometry using the Qubit 2.0 Fluorometer. Genomic libraries were prepared using the commercial Nextera XT kit (illumina). The verification was done with fluorometry (Qubit 2.0) and the Agilent 2100 Bioanalyser equipment was used for its normalization. Genomic sequencing was performed on the Illumina platform in MiSeq equipment, to obtain paired sequences of 250 nucleotides. Reading sequences were processed to remove library contamination and discard poor quality read by Trimmomatic. The readings were reassembled with SPAdes and annotated with RAST. The searches of each genome were carried out with the BLASTX program with ResFinder and VFDB databases. Sequencing of a *blaZ* fragment to identify aminoacidic differences at residues 128 – 216 was performed from a multiple lining of protein sequences with MUSCLE. The resistome and the virulome were performed according to the search in the genomes of 3078 resistance genes and 3659 genes of virulence from information platforms such as ResFinder and Virulence factor database.

Out of the 186 isolates, 73 (39%) had the presence of the CziE, while 113 isolates (61%) did not. The  $\beta$  - lactamases types more associated with the presence of the effect were types A and C and the allotypes BlaZ – 2 of  $\beta$  - lactamase type A and BlaZ – 1 of  $\beta$  - lactamase type C (belonging to clonal complex or “CC” 30 and 8, respectively), showed the highest probability of presenting the effect.

In strains without the effect, it was found that  $\beta$  - lactamase type B were the most associated with the absence of the effect. The most frequent allotypes were BlaZ – 3, BlaZ – 5 and BlaZ – 7. The CC5, CC8 and CC1 were the most isolated in this group.

Twenty - four of the 73 strains with EICz (32%), showed at least one gene for resistance to other antibiotics such as macrolides, lincosamides, aminoglycosides, tetracyclines and quinolones was found, which are not antibiotics considered first – line for the treatment of infections by MSSA. Most were found in isolates with type A  $\beta$  - lactamase. Some genes founded were *ParC* for quinolones, *rpoB* for rifampicin, *ant(9) – Ia* for aminoglycosides, *tet(K)* for tetracyclines and *ermA* for macrolides.

Ninety – three of the 113 strains without EICz, (82%), showed at least one resistance gene, to mor groups of antibiotics such as macrolides, lincosamides, aminoglycosides, tetracyclines, quinolones and fusidic acid. Most were found in isolates with type B  $\beta$  - lactamase. With the exception of *rpoB* gene that wasn't found in this group, along with those already mentioned, genes such fusidic acid resistance *fusB*, trimethoprim resistance *dfrA8* and other aminoglycosides modifying enzymes such as *aadD*, *aph(3')-III* were found. The virulence genes show more differences between the isolates with and without the presence of the effect, but most of them coincide in the absence of genes such as those associated with the production of leukocidins such as PVL, enterotoxins, exfoliative toxins, coagulase and others.

In all strains, the accessory gene regulatory system (*agr*) and its relationship with the presence or absence of EICz were identified.

#### Conclusions:

The frequency of EICz in the studied strains was 39%, being the type A and C  $\beta$  - lactamases, the most associated. The allotypes BlaZ – 2 of the type A  $\beta$  - lactamase and BlaZ – 1 of type C  $\beta$  - lactamase were the allotypes where the presence of EICz was found mainly.

The few genes for resistance to other antibiotics found in strains with presence of EICz were found in isolates with BlaZ – 2 allotype of the type A  $\beta$  - lactamase and BlaZ – 1 of type C  $\beta$  - lactamase. In addition, all of them present a large number and diversity of virulence genes. The absence of EICz was 61% and this was observed in isolates with type B  $\beta$  - lactamase mainly. The allotypes BlaZ – 3, BlaZ – 5 and BlaZ – 7 of type B  $\beta$  - lactamase were the allotypes where the absence of EICz was found more frequently.

More genes of resistance to other antibiotics were found in strains without the EICz in allotypes BlaZ – 3, BlaZ – 5 and BlaZ -7. Therefore, the absence of the EICz, does not mean the absence of other mechanism of antibiotic resistance.

The *agrIII* system was more related to the presence of EICZ, while the *agrII* system was related to the absence of EICz.

**Key words:** Methicillin – sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA), inoculum effect, Cefazolin, Allotype, Colombia.



# Contenido

RESUMEN .....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XXI
LISTA DE GRÁFICAS.....	XXIV
LISTA DE TABLAS .....	XXV
INTRODUCCIÓN.....	1
<b>1 CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Staphylococcus aureus .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Resistencia a antibióticos <math>\beta</math> - lactámicos en Staphylococcus aureus .....</b>	<b>4</b>
1.2.1 Operón blaZ y $\beta$ - lactamasas de S. aureus .....	6
<b>1.3 Regulación de la virulencia en S. aureus.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4 Genes de resistencia antibiótica en Staphylococcus aureus.....</b>	<b>16</b>
1.4.1 Resistencia a Glicopéptidos y lipopéptidos .....	16
1.4.2 Macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (MLS <sub>B</sub> ).....	19
1.4.3 Fluoroquinolonas.....	19
1.4.4 Sulfonamidas y trimetoprim .....	19
1.4.5 Aminoglicósidos.....	20
1.4.6 Tetraciclinas y gliciliclinas .....	20
1.4.7 Oxazolidinonas .....	21
1.4.8 Rifampicina .....	21
<b>1.5 Factores de virulencia en S. aureus .....</b>	<b>21</b>
1.5.1 Exotoxinas.....	22
<b>1.6 Otras citotoxinas .....</b>	<b>25</b>
1.6.1 Modulinas fenol solubles.....	25

<b>1.7</b>	<b>Superantígenos de <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	<b>26</b>
1.7.1	Superantígenos de células T .....	26
<b>1.8</b>	<b>Enterotoxinas estafilocócicas y enterotoxinas similares estafilocócicas</b> .....	<b>27</b>
<b>1.9</b>	<b>Toxina de síndrome de choque tóxico tipo 1</b> .....	<b>27</b>
<b>1.10</b>	<b>Superantígenos B</b> .....	<b>27</b>
<b>1.11</b>	<b>Enzimas citotóxicas</b> .....	<b>28</b>
1.11.1	$\beta$ - toxina ( $\beta$ - hemolisina).....	28
<b>1.12</b>	<b>Toxinas exfoliativas</b> .....	<b>29</b>
<b>1.13</b>	<b>Exoenzimas</b> .....	<b>29</b>
1.13.1	Coagulasas estafilocócicas: Coa y vWbp .....	29
1.13.2	Estafiloquinasa (Sak) .....	30
<b>1.14</b>	<b>Proteasas</b> .....	<b>30</b>
1.14.1	SspA o serina proteasa V8 y Cisteínas – proteasas .....	31
1.14.2	Metaloproteasa Aureolisina (Aur) y Hialuronidasa (HA) .....	31
<b>1.15</b>	<b>Lipasas</b> .....	<b>32</b>
<b>1.16</b>	<b>Polisacáridos capsulares (CP)</b> .....	<b>32</b>
<b>1.17</b>	<b>Sistemas de secreción bacteriana</b> .....	<b>34</b>
<b>1.18</b>	<b>Cefalosporinas. Cefazolina (Cz)</b> .....	<b>35</b>
<b>1.19</b>	<b>Efecto inóculo (EI) a Cefazolina</b> .....	<b>38</b>
1.19.1	Generalidades .....	38
1.19.2	Definición de EICz .....	38
1.19.3	Implicaciones del Efecto Inoculo .....	40
<b>1.20</b>	<b>Estado del arte</b> .....	<b>41</b>
<b>1.21</b>	<b>Justificación</b> .....	<b>47</b>
<b>1.22</b>	<b>Pregunta de investigación</b> .....	<b>48</b>
<b>1.23</b>	<b>Hipótesis</b> .....	<b>48</b>
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO 2. OBJETIVOS</b> .....	<b>49</b>
2.1	Objetivo general .....	49
2.2	Objetivos específicos .....	49
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA</b> .....	<b>51</b>

<b>3.1</b>	<b>Aislamientos bacterianos.....</b>	<b>51</b>
<b>3.2</b>	<b>Evaluación de efecto inóculo a cefazolina por microdilución en caldo.....</b>	<b>51</b>
3.2.1	Preparación del inóculo bacteriano.....	51
3.2.2	Preparación de las placas con antibiótico .....	52
<b>3.3</b>	<b>Secuenciación de Genoma Completo - WGS.....</b>	<b>53</b>
3.3.1	Extracción de ácidos nucleicos, preparación de librerías y secuenciación genómica .....	53
3.3.2	Ensamblaje y caracterización genómica .....	54
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Resultados generales.....</b>	<b>57</b>
<b>4.2</b>	<b>Características de las cepas de MSSA con presencia del EICz.....</b>	<b>58</b>
4.2.1	MSSA y Tipo de $\beta$ - lactamasa asociado al EICz. ....	58
4.2.2	Complejos clonales (CC) según tipo de $\beta$ - lactamasa y número de cepas de MSSA con EICz.....	59
4.2.3	Presencia de Alotipos BlaZ en cepas MSSA con EICz según el complejo clonal.....	59
4.2.4	Asociación del Sistema de genes accesorios reguladores ( <i>agr</i> ) en cepas de MSSA con EICz .....	61
<b>4.3</b>	<b>Características de las cepas de MSSA sin presencia del EICz.....</b>	<b>62</b>
4.3.1	MSSA y Tipo de $\beta$ - lactamasa asociado a la no presencia del EICz .....	62
4.3.2	Complejos clonales (CC) según tipo de $\beta$ - lactamasa y número de cepas de MSSA sin EICz .....	63
4.3.3	Presencia de Alotipos BlaZ en cepas MSSA sin EICz según el complejo clonal.....	64
4.3.4	Asociación del Sistema de genes accesorios reguladores ( <i>agr</i> ) en cepas de MSSA sin EICz .....	66
<b>4.4</b>	<b>Genes de resistencia a antibióticos en MSSA.....</b>	<b>67</b>
4.4.1	Genes de resistencia a antibióticos encontrados en cepas con presencia de EICz .....	68
4.4.2	Genes de resistencia a antibióticos encontrados en cepas sin presencia de EICz.....	69
<b>4.5</b>	<b>Genes de virulencia estudiados en MSSA.....</b>	<b>70</b>
4.5.1	Genes de virulencia encontrados en cepas con presencia de EICz.....	71
4.5.2	Genes de virulencia encontrados en cepas sin presencia de EICz.....	72
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>81</b>
<b>6.1</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>81</b>
<b>6.2</b>	<b>Recomendaciones .....</b>	<b>82</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>85</b>
<b>A.</b>	<b>ANEXO A. LISTA DE GENES DE VIRULENCIA.....</b>	<b>95</b>
<b>B.</b>	<b>ANEXO B. GENES DE VIRULENCIA ENCONTRADOS EN LOS AISLAMIENTOS CON PRESENCIA DE EICZ (N = 73) .....</b>	<b>99</b>

C. ANEXO C. GENES DE VIRULENCIA ENCONTRADOS EN AISLAMIENTOS SIN PRESENCIA DE EICZ (N = 113) .....	107
D. ANEXO D. GENES DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN AISLAMIENTOS CON PRESENCIA DE EICZ (N = 73) .....	115
E. ANEXO E. GENES DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN AISLAMIENTOS SIN PRESENCIA DE EICZ (N = 113) .....	117

## Lista de abreviaturas

*S. aureus*: *Staphylococcus aureus*

MSSA: Methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* metilino sensible o sensible a metilina, en idioma inglés)

MRSA: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* metilino resistente o resistente a metilina, en idioma inglés)

EI: Efecto inóculo

Cz: Cefazolina

EICz: Efecto inóculo a cefazolina

CC: Complejo clonal

MLST: Multilocus sequence typing (Tipificación multilocus de secuencias, en idioma inglés)

ST: Sequence typing (secuencia tipo o tipo de secuencia o perfil alélico, en idioma inglés)

MHC: Major Histocompatibility Complex (Complejo mayor de histocompatibilidad, en idioma inglés)

PBP2a: Penicillin – binding protein 2a (Proteína fijadora de Penicilina 2a, en idioma inglés)

kDa: kilodaltons

SCCmec: Staphylococcal cassette chromosome (Cassette cromosomal estafilocócico, en idioma inglés)

ADN: Ácido desoxirribonucleico

*agr*: accessory gene regulator (gen accesorio regulador, en idioma inglés)

mRNA: Messenger RNA (ácido ribonucleico mensajero, en idioma inglés)

AIP: péptido autoinducido

VISA: Vancomycin intermediate – resistant *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a vancomicina, en idioma inglés)

VRSA: Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina, en idioma inglés)

VRE: Vancomycin resistant enterococcus (*Enterococcus* resistentes a vancomicina, en idioma inglés)

VR – MSSA: Vancomycin – Resistant, Methicillin - Susceptible *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* meticilino sensible, vancomicino resistente, en idioma inglés)

CDC: Centers for Disease Control and Prevention (Centro para el control y prevención de infecciones, en idioma inglés)

MIC: Minimum inhibitory concentration (concentración inhibitoria mínima, en idioma inglés)

PCR: Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de polimerasa, en idioma inglés)

PAS: Penicilina anti – estafilocócica



## Lista de gráficas

	Página
Gráfica 1. Inducción de la síntesis de $\beta$ - lactamasas en <i>S. aureus</i> en presencia de un $\beta$ - lactámico.	4
Gráfica 2. Proteínas sensoras y represoras del operón <i>blaZ</i> implicadas en la aparición de resistencia a los $\beta$ - lactámicos	5
Gráfica 3. Estructura química de la Cefazolina	24
Gráfica 4. Números absolutos y porcentajes de presencia y ausencia de EICz en las 186 cepas de MSSA estudiadas	36
Gráfica 5. Tipo de $\beta$ - lactamasa, número absoluto y porcentaje en cepas con EICz	37
Gráfica 6. Sistema de genes accesorios reguladores ( <i>agr</i> ) en cepas con presencia de EICz, asociado al tipo de $\beta$ - lactamasa y alotipo <i>BlaZ</i>	40
Gráfica 7. Tipo de $\beta$ - lactamasa, número absoluto y porcentaje en los cepas sin EICz	41
Gráfica 8. Sistema de genes accesorios reguladores ( <i>agr</i> ) en cepas sin presencia de EICz, asociado al tipo de $\beta$ - lactamasa y alotipo <i>BlaZ</i>	46

## Lista de tablas

Tabla 1. Complejos clonales (CC) según tipo de  $\beta$  - lactamasa y número de cepas con presencia de EICz 38

Tabla 2. Alotipos BlaZ (según el complejo clonal y número) en cepas con EICz 39

Tabla 3. Complejos clonales (CC) según tpo de  $\beta$  - lactamasa y número de cepas sin EICz 42

Tabla 4. Alotipos BlaZ (según el complejo clonal y número) en cepas sin EICz 44



# Introducción

La resistencia a los antibióticos de uso común en los microorganismos más importantes es reconocida como una amenaza mundial a la salud pública humana. Los microorganismos multirresistentes han aparecido tanto en ambientes hospitalarios como en la comunidad, sugiriendo la presencia de reservorios de bacterias resistentes a los antibióticos en ambientes no hospitalarios. Las bacterias y su respuesta al ataque antibiótico, son ejemplos de su adaptación y evolución. Las más aptas sobreviven, y demuestran una plasticidad genética demostrada a través de la capacidad de presentar mutaciones del material genético o adquisición de material nuevo que le otorgue resistencia a prácticamente todos los antibióticos. Por lo tanto, entender las bases genéticas y bioquímicas de la resistencia a los antibióticos, es de gran importancia para diseñar estrategias que eviten su diseminación. Las infecciones causadas por estos microorganismos se asocian a aumento en la mortalidad e implican una carga económica enorme. (Munita & Arias, 2016). Muchos pacientes fallecen por infecciones debidas a microorganismos multirresistentes, sobre todo en países pobres o en vías de desarrollo. Sin embargo, países desarrollados como los Estados Unidos y el Reino Unido también tienen este problema; en estos países para el año 2004, el 60% de los aislamientos hospitalarios de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), ya eran resistentes a meticilina, causando morbimortalidad mucho mayor que la debida a los aislamientos meticilino sensibles. (Levy & Marshall, 2004).

El establecimiento de puntos de corte y susceptibilidad de un antibiótico contra un microorganismo en particular, recae en la actividad *in vitro* del antibiótico contra una cantidad medible de muestra bacteriana, combinada con algunos parámetros farmacológicos como la concentración del antibiótico en el sitio infectado, entre otros. La interpretación de los patrones de susceptibilidad puede variar de acuerdo al escenario clínico y el tipo de microorganismo: los factores como la concentración de un medicamento en un órgano específico, el establecimiento de puntos de corte diferentes para una bacteria según el sistema afectado (por ejemplo, en *Streptococcus pneumoniae* los puntos de corte

son diferentes para infecciones de sistema nervioso que para otras infecciones sistémicas), que la susceptibilidad *in vivo* ante un antibiótico puede variar de acuerdo al tamaño del inóculo, como el reportado en *S. aureus* con algunas cefalosporinas (cefazolina particularmente), son algunos factores que influyen en la interpretación de lo que se denomina susceptible o resistente. Son pocos los nuevos antibióticos que han sido sintetizados o descubiertos para el tratamiento de las infecciones por microorganismos Gram positivos como Gram negativos. Hay investigación limitada en la industria farmacéutica para el desarrollo de nuevos antibióticos y se conoce la existencia de mecanismos de resistencia a varios de ellos de introducción más reciente. (Seethaler et al., 2019). Para el caso específico de la falla terapéutica con cefazolina, es importante que el médico conozca la posibilidad de falla terapéutica con este antibiótico, en el tratamiento de infecciones profundas con alto inóculo. (Levy & Marshall, 2004).

# 1 Capítulo 1. Marco teórico

## 1.1 Staphylococcus aureus

Los *Staphylococcus*, son cocos Gram positivos productores de catalasa. En las preparaciones de extendidos de Gram, se observan esféricos (diámetro entre 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$ ), formando racimos. Son inmóviles, no formadores de esporas y anaerobios facultativos, con excepción de *Staphylococcus saccharolyticus*, que es un anaerobio obligado. Las colonias producidas luego de 18 a 24 horas de incubación son de un tamaño mediano que oscila entre 4 a 8 mm, de color crema amarillo o “color mantequilla”. Las especies de *Staphylococcus* pueden ser distinguidas gracias a la prueba de coagulasa, en el que la formación de un coágulo en muestras de suero se considera positivo. Los *Staphylococcus* que son coagulasa positiva son: *S. aureus*, *S. delphini*, *S. lutrae* y algunas especies de *S. hyicus*; con excepción de *S. aureus*, estas otras especies rara vez son aisladas en muestras de humanos, como sí ocurre en animales. (Monson, 2011). El genoma consiste en un cromosoma circular de aproximadamente 2,8 M de pares de bases, con profagos, plásmidos y transposones. Los genes que gobiernan la virulencia y la resistencia a los antibióticos, se encuentran tanto en el cromosoma como en elementos extracromosomales. (Lowy, 1998)

La pared celular está compuesta en 50% por peptidoglicano, que consiste en subunidades alternadas de N - acetilglucosamina y ácido N - acetilmurámico, unidos por enlaces tipo  $\beta$  - 1,4. Las cadenas de peptidoglicano, se unen de forma cruzada por cadenas de tetrapéptidos unidas al ácido N - acetilmurámico, a una pentaglicina, fenómeno que solo ocurre en *S. aureus*. El peptidoglicano puede tener en sí mismo, actividad de endotoxina, estimulando la liberación de citoquinas por parte macrófagos, puede activar el complemento y la agregación plaquetaria. Las diferencias en la estructura del peptidoglicano pueden contribuir a variaciones en la capacidad de causar enfermedades como la coagulación intravascular diseminada. Además, los ácidos teicóicos unidos de forma covalente a la

pared del peptidoglicano, son los mayores constituyentes de la pared de la bacteria. También presentan proteínas de superficie, que tienen capacidades antifagocíticas como la proteína A, que puede unirse a la porción Fc de las inmunoglobulinas. (Lowy, 1998; Otto, 2014).

Los *Staphylococcus sp* producen numerosas toxinas que están agrupadas de acuerdo a su mecanismo de acción; las citotoxinas  $\alpha$  inducen la formación de poros en células del sistema inmunológico y en otro tipo de células, por ejemplo en las epiteliales, con consecuente destrucción y daño celular que puede contribuir con las manifestaciones de sepsis. La toxina pirogénica, está estructuralmente relacionada con superantígenos y su función es unirse al MHC tipo II, causando una liberación masiva de citoquinas y proliferación de linfocitos T. Las enterotoxinas, cuyos dominios diferentes son responsables de dos enfermedades causadas como son la intoxicación alimentaria manifestada como vómito y diarrea, así como el síndrome de choque tóxico. (Lowy, 1998). La toxina tipo 1 del choque tóxico tiene una estructura similar a las enterotoxinas B y C; las toxinas exfoliativas, que incluyen a la toxina epidermolítica A y B, causan eritema y descamación grave de la epidermis como ocurre en el síndrome de piel escaldada. La toxina PVL (Panton - Valentine Leukocidin) es una toxina leucocitolítica, asociada epidemiológicamente con infecciones graves de piel. *S. aureus* también produce otras enzimas, como lipasas, proteasas, hialuronidasas, que tienen la capacidad de destruir tejidos, permitiendo la expansión del microorganismo a tejidos adyacentes a los que inicialmente infectó; puede contar también con la enzima coagulasa, que actúa como activador de la protrombina, convirtiendo fibrinógeno en fibrina. (Otto, 2014)

## 1.2 Resistencia a antibióticos $\beta$ - lactámicos en *Staphylococcus aureus*

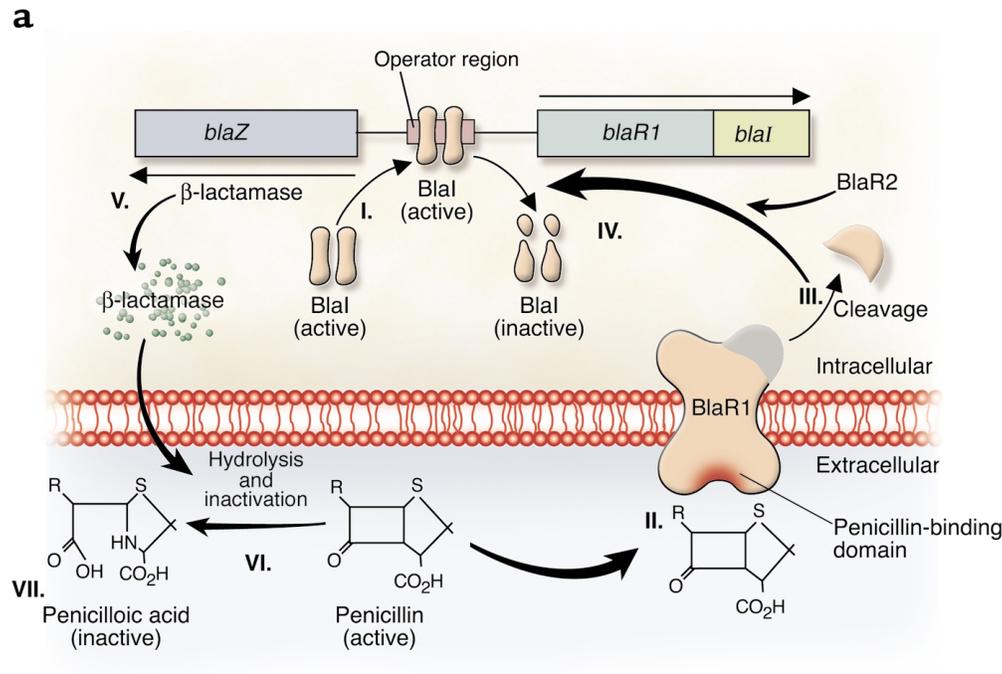
La resistencia a los antibióticos  $\beta$  - lactámicos en *Staphylococcus sp*, está mediada por dos mecanismos. El primero es la producción de  $\beta$  - lactamasas, enzimas que hidrolizan el anillo  $\beta$  - lactámico, inactivando al antibiótico y el otro mecanismo es a través de la expresión de proteínas fijadoras de penicilina 2<sup>a</sup> (PBP2a), que no son susceptibles a la inhibición por el  $\beta$  - lactámico. La resistencia en *S. aureus* a la penicilina, se describió desde 1942, pocos

años después del descubrimiento del antibiótico y para 1950, el 50% de las cepas de origen comunitario eran resistentes a la penicilina. En 1959, en el Reino Unido, se introdujo una penicilina semisintética, llamada meticilina, resistente a estas  $\beta$  - lactamasas, pero rápidamente aparecieron cepas resistentes, referidas como *S. aureus* meticilino resistentes. Las  $\beta$  - lactamasas son enzimas que se expresan a partir de la activación del operón *blaZ*. (Fuda, Fisher & Mobashery, 2005)

Fue Kirby quien descubrió en la mitad de la década de los años 40 del siglo pasado, que la resistencia a los  $\beta$  - lactámicos, estaba mediada por la ganancia de este operón *blaZ* que fue adquirido a través de un transposón de un plásmido grande y que puede además contener más genes de resistencia como a los aminoglicósidos y macrólidos (Kirby, 1944). Las  $\beta$  - lactamasas son enzimas extracelulares que se sintetizan cuando la bacteria es expuesta a un antibiótico  $\beta$  - lactámico. El operón *blaZ* se encuentra bajo el control de dos genes reguladores, el antirepresor *blaR1* y el gen represor *blaI*. Ocurrida la exposición al  $\beta$  - lactámico, la proteína BlaR1, molécula transmembrana que cumple función de receptor y sensor, se activa por sí misma y se cree que de forma directa o indirecta a través de una segunda proteína BlaR2, hidroliza a la proteína BlaI, (que se encuentra unida a la región del operador reprimiendo la transcripción del RNA de los genes *blaZ* y *blaR1-blaI*); una vez hidrolizada la proteína BlaI en fragmentos, se permite la transcripción de los genes *blaZ* y *blaR1-blaI*. (Zhang, Hackbarth, Chansky & Chambers; 2001). La transcripción del operón *blaZ*, da origen a la síntesis de  $\beta$  - lactamasas que hidrolizan e inactivan al antibiótico  $\beta$  - lactámico. La gráfica 1 presenta la inducción de la síntesis de  $\beta$  - lactamasas en *S. aureus* en presencia de un  $\beta$  - lactámico. (Lowy, 2003)

La proteína transmembranal BlaI tiene alto peso molecular y tiene dos dominios: el dominio N - terminal de aproximadamente 38 kDa, con hélices de tipo  $\alpha$  que atraviesan la membrana 4 veces, conformando 4 segmentos: TM1, TM2, TM3 y TM4. Estos segmentos transmembranales, se conectan a través de 3 asas (L1, L2, L3), donde L1 y L3 están expuestas en el citoplasma y L2 se encuentra por fuera del microorganismo. El dominio N - terminal es intracelular. El segundo dominio (C - terminal) pesa aproximadamente 27 kDa y es extracelular. Los  $\beta$  - lactámicos que se encuentran en el medio extracelular, reaccionan con el sitio activo serina del dominio C - terminal a través de una reacción de acilación, reacción que inicia la cascada de señalización intracelular, llevando a la derepresión del

operón *blaZ* con la posterior producción de  $\beta$  - lactamasas. (Fuda, Fisher & Mobashery, 2005).

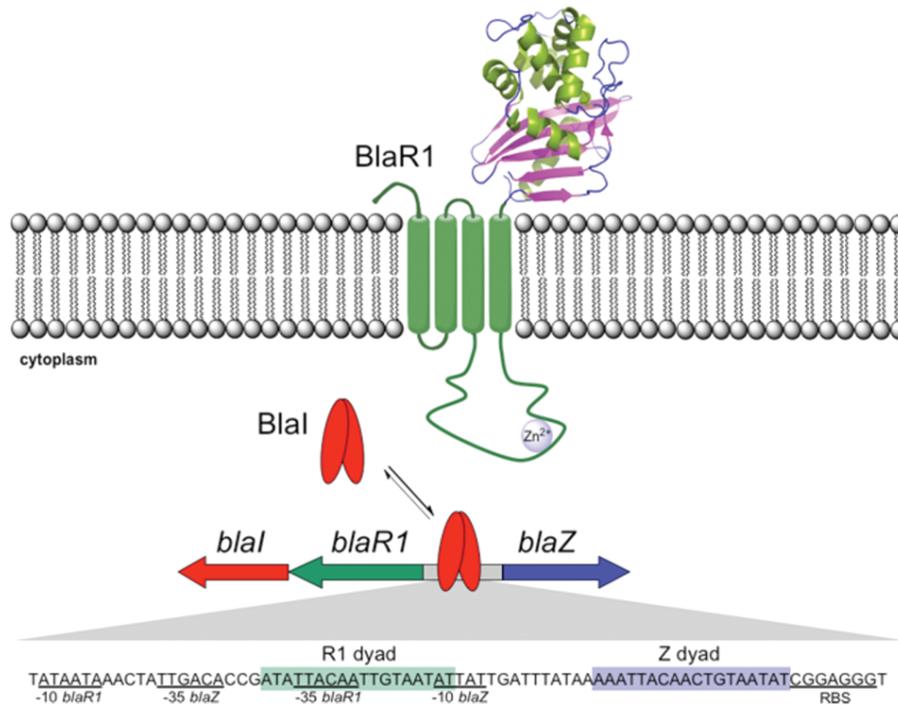


**Gráfica 1.** Inducción de la síntesis de  $\beta$  - lactamasas en *S. aureus* en presencia de un  $\beta$  - lactámico. (Lowy, 2003)

### 1.2.1 Operón *blaZ* y $\beta$ - lactamasas de *S. aureus*

En la mayoría de las cepas de *S. aureus*, el operón *bla* es un sistema inducible y altamente regulado, que manifiesta la resistencia a los antibióticos por la expresión de la  $\beta$  - lactamasa PC1 producto del gen *blaZ*. (Wilke et al; 2004). La expresión de la  $\beta$  - lactamasa PC1 está gobernada por una proteína transductor de señal, que detecta la presencia un antibiótico  $\beta$  - lactámico, denominada BlaR1. Esta proteína regula la transcripción de los genes de resistencia a los antibióticos, así como regula su propia transcripción (*gen blaR1*). Esta regulación ocurre a través de la derepresión de los genes necesarios por la actividad proteolítica del dominio citoplasmático de BlaR1. Este degrada a la proteína represora Blal (producto del gen *blaI*), llevando a la transcripción de los genes *blaI*, *blaR1* y *blaZ*. El operón *bla*, consta de dos sitios de unión distintos para el represor, denominados díada R1, (que

está corriente arriba del gen *blaR1*) y la díada Z (ubicada corriente arriba del gen *blaZ*). La gráfica 2, muestra las proteínas sensoras y represoras del operón *blaZ* implicadas en la aparición de resistencia a los  $\beta$  - lactámicos. (Llarrul, Prorok & Mobashery, 2010).



**Gráfica 2.** Proteínas sensoras y represoras del operón *blaZ* implicadas en la aparición de resistencia a los  $\beta$  - lactámicos. (Llarrul, Prorok & Mobashery, 2010).

Una díada se refiere a dos áreas de una cadena de ADN cuyas secuencias de pares de bases son repeticiones invertidas entre sí; a menudo se describen como palíndromos. Ejemplo: GAATAC y GTATTC, son complementos inversos entre sí. La díada R1 contiene 18 nucleótidos palindrómicos (ATATTACCATTGTAATAT), mientras que la díada Z, contiene 18 nucleótidos de un palíndromo imperfecto (AAATTACA AACTGTAATAT). Ambas se encuentran separadas por 13 nucleótidos. (Llarrul, Prorok & Mobashery, 2010). Las  $\beta$  - lactamasas de *S. aureus* codificadas por este gen *blaZ* constan de 281 aminoácidos; son enzimas inducibles que se encuentran en la mayoría de las cepas; pueden tener una ligera variación química y propiedades enzimáticas diferentes, y los genes que las codifican tanto para su estructura como para su control de actividad enzimática son portados por un plásmido extracromosomal. (Ambler, 1975)

---

Las  $\beta$  - lactamasas de *S. aureus* son similares a la mayoría de las enzimas encontradas en Gram positivos como *Bacillus cereus* y *Bacillus licheniformis*. Estas enzimas son inducibles y predominantemente extracelulares en cultivos con crecimiento exponencial, su secuencia de aminoácidos es muy parecida entre ellas de forma que es probable un origen ancestral único. Cuando son completamente inducidas, estas  $\beta$  - lactamasas constituyen hasta el 0.5% del peso seco de cultivo, y normalmente más del 80% de las enzimas son encontradas en los medios de cultivo. Por lo tanto, la mayoría de los problemas que rodean al aislamiento y la purificación de la enzima se refieren a métodos para lograr máxima expresión génica y la forma en que esta puede ser recolectada con éxito de la fracción sobrenadante de un cultivo bacteriano. (Ambler, 1975)

Cuatro variantes de las  $\beta$  - lactamasas de *S. aureus* han sido descritas, basados en métodos serológicos o fenotípicos, de las cuales se ha basado toda información sobre su secuencia tanto de aminoácidos como la de nucleótidos principalmente en la tipo A y de acuerdo a variaciones en algunos residuos la diferencia entre ellas. Las cuatro, pertenecen a la clasificación "A" de Ambler; todas difieren entre sí en las propiedades cinéticas de la hidrólisis para sustratos que incluyen a algunas cefalosporinas y a la nitrocefina. (Carvajal et al, 2020)

La actividad de la  $\beta$  - lactamasa tipo A, demuestra que es la más activa contra las penicilinas naturales (benzilpenicilina y fenoximetilpenicilina), porque tiene alta afinidad y rápida acción sobre su sustrato; estas propiedades están asociadas con la función fisiológica de la enzima que es proteger al microorganismo de la acción bactericida de la penicilina. La  $\beta$  - lactamasa tipo A, consiste en un polipéptido simple de 281 residuos de aminoácidos en cuyo extremo amino terminal se encuentra una lisina (Lys); su punto isoeléctrico se encuentra en un pH de 8.9. Destaca su alto contenido de aminoácidos polares y la gran diferencia entre el contenido de lisina (43 residuos) y arginina (4 residuos). Su actividad enzimática específica es de 315 unidades/ $\mu$ g de proteína. (Richmond, 1975)

Las secuencias de aminoácidos de las  $\beta$  - lactamasas son muy similares, sin embargo, los diferentes tipos (A – D) se determina de acuerdo la posición de los residuos en las posiciones 128 y 216 (Voladri, Tummuru & Kernodle; 1996); estos pequeños cambios logran diferencias en la cinética de hidrólisis de la benzilpenicilina, meticilina, cloxacilina y las

cefalosporinas de tipo C. En la publicación de 1965 de Richmond, se encontró que la  $\beta$ -lactamasa tipo B tenía baja afinidad enzimática hacia todas las penicilinas, lo que sugería que este tipo de enzima presentaba una menor eficiencia en proteger a la bacteria de la acción de la penicilina; se encontró que era activa solo un 15% respecto a las  $\beta$ -lactamasas tipo A y C frente a la benzilpenicilina y junto a la  $\beta$ -lactamasa tipo A, hidrolizaba dos veces más rápido a la metilicina frente a la tipo C. La  $\beta$ -lactamasa tipo C, hidrolizaba dos veces y medio más rápido a las cefalosporinas tipo C frente a lo que la hacía la tipo A. (Richmond, 1965)

En 1992, se publicó que las  $\beta$ -lactamasas tipo A, B y C, exhibían actividad enzimática comparable frente a la penicilina G, lo que es diferente respecto a lo encontrado en el experimento de Richmond, para la  $\beta$ -lactamasa tipo B. La  $\beta$ -lactamasa tipo D mostró una considerable menor velocidad de hidrólisis frente a la penicilina G respecto a otras  $\beta$ -lactamasas. Algunas  $\beta$ -lactamasas, muestran una eficiencia relativa de hidrólisis frente a algunas cefalosporinas. Por ejemplo,  $\beta$ -lactamasas tipo B y C muestran una eficiencia mayor para la cefaloridina y menor para la cefazolina, frente al observado para la  $\beta$ -lactamasa tipo A, que exhibe un importante efecto inóculo con la cefaloridina, la cefazolina y el cefamandol; de hecho  $\beta$ -lactamasa tipo A muestra una actividad 5 veces superior ante estos antibióticos respecto a las  $\beta$ -lactamasas tipo B y C. Estudios clínicos en animales con endocarditis por *S. aureus* metilino sensible, han demostrado que la  $\beta$ -lactamasa tipo A hidroliza hasta 25 veces de manera más eficiente a la cefazolina que a la cefalotina. (Zygmunt, Stratton & Kernodle, 1992).

La necesidad de detectar adecuadamente la presencia y producción de  $\beta$ -lactamasas en aislamientos clínicos, se hizo evidente luego del primer reporte de la aparición de estas enzimas en bacterias patógenas. Varios métodos fenotípicos, han sido investigados para la detección en diferentes microorganismos. Estos métodos incluyen la prueba de susceptibilidad por difusión en disco, el método de la hoja de trébol, el método de placa de almidón – yodo, y la prueba con una cefalosporina cromogénica (nitrocefina). El test de difusión en disco fue descrito en 1971 por Ericsson y Sherris, utilizando discos que contenían 10  $\mu$ g de oxacilina y 10  $\mu$ g de benzilpenicilina. En esta prueba se registra el diámetro de la zona de inhibición y la apariencia del borde de la zona para la

---

benzilpenicilina, demarcada claramente o con una disminución gradual del crecimiento. (Peterson et al; 1989)

En el método de la hoja de trébol, se inocula en una placa de agar sangre, de acuerdo al método de difusión en disco, una cepa de *Streptococcus pneumoniae* sensible a penicilina como indicador. Se coloca un disco de 1 $\mu$ g de benzilpenicilina en el centro de la placa y se extiende un inóculo de la cepa de prueba en cuatro direcciones hacia fuera del disco. Las placas son incubadas en CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C durante 18 a 24 horas. La prueba se considera positiva si la cepa indicadora crece con la cepa prueba en la zona de inhibición y como negativa si la zona de inhibición es circular, sin forma de trébol. Uno de los métodos más utilizados para la detección rápida de  $\beta$  - lactamasas, utiliza la cefalosporina cromogénica nitrocefina. Se utilizan discos de papel filtro impregnados con la cefalosporina, que se humedecen con agua o solución salina y se toma una pequeña muestra del microorganismo a estudiar con un asa, que luego se aplica sobre los discos. Si dentro de los 10 minutos posteriores (o 60 para el caso de *Staphylococcus sp*), el área donde se aplicaron las muestras del microorganismo cambia a un color rojo, se considera que hay producción de  $\beta$  - lactamasas. (Peterson et al; 1989)

Varios estudios han comparado la sensibilidad de estas pruebas fenotípicas, con métodos moleculares para la detección del operón *blaZ*; por ejemplo, un estudio en Bochum, Alemania, encontró que la sensibilidad para el método de los discos de nitrocefina, era de 37%, del 71% para el test de difusión en disco y de 67% para el método de la hoja de trébol. (Kaase et al; 2008).

Desde el año 2009, diferentes estudios de biología molecular enfocados en el operón *blaZ* (y en la enzima propiamente dicha), han permitido identificar un alto grado de diversidad del mismo, en la que se han encontrado diferentes cambios en la secuencia de aminoácidos, no solo en las las posiciones 128 y 216, (que se encuentran cerca al sitio catalítico), sino que además han permitido encontrar secuencias únicas que han permitido la clasificación en alotipos, siendo mucho más exacta que la conocida en A, B, C y D. Varios de estos estudios, se han enfocado en determinar la asociación entre los diferentes tipos de  $\beta$  - lactamasas, con alotipos específicos con presencia o ausencia del EICz. (Nannini et al, 2009; Carvajal et al).

El estudio publicado por el grupo de Rincón et al, presentó los resultados de una prueba colorimétrica rápida de detección de EICz, basada en las características cromogénicas del cambio que ocurre con la nitrocefina (de color amarillo a rojo) en presencia de una  $\beta$  – lactamasa, utilizando sobrenadantes bacterianos de MSSA, después de haber sido inducidos con ampicilina. Utilizando 689 aislamientos MSSA recuperados en hemocultivos y realizando la secuenciación del genoma a todos ellos, se buscó la presencia del operón *blaZ*, y se clasificó el tipo de  $\beta$  – lactamasa en A, B, C o D según el aminoácido en posición 128 y 216. En 257 aislamientos (37%) de los 689, se documentó la presencia de EICz y en ellos, la prueba con nitrocefina fue positiva en 212 aislamientos, dando una sensibilidad global del 82.5%. El estudio encontró una especificidad de la prueba de 88.9%. En los 257 aislamientos con presencia de EICz, la  $\beta$  – lactamasa más encontrada fue la tipo A (137 aislamientos, es decir el 53%), seguido de la  $\beta$  – lactamasa tipo C (101 aislamientos, es decir 39%), luego la tipo B (15 aislamientos, que corresponden al 6%) y finalmente la tipo D (4 aislamientos que aportaban el 2%). (Rincón et al; 2021)

En los 137 aislamientos con  $\beta$  – lactamasa tipo A (la más asociada a la presencia del EICz), la prueba con nitrocefina dio positiva en 127 de ellas (93%); en los 101 aislamientos con  $\beta$  – lactamasa tipo C, la prueba rápida dio positiva en 73 de ellas (72.3%). En aquellos con  $\beta$  – lactamasa tipo B (la menos asociada a presencia del EICz), pero de la que solo hubo 15 aislamientos, la prueba rápida fue positiva en 8 de ellas (53%). La explicación probable a la mayor sensibilidad de la prueba en aquellos aislamientos con  $\beta$  – lactamasa tipo A, se deba a la eficiente capacidad de hidrólisis de esta enzima a la nitrocefina, mientras que en aquellos con  $\beta$  – lactamasa tipo C y B, la eficiencia de la hidrólisis a esta cefalosporina es menor. Los resultados de este estudio son de gran utilidad pues permiten determinar de manera rápida (resultados en 3 horas o menos), con buena sensibilidad y especificidad, la presencia del EICz en aislamientos de MSSA, pues el método estándar puede tardar hasta 3 días, es más costoso, amerita personal entrenado y debe hacerse por triplicado. (Rincón et al; 2021)

### 1.3 Regulación de la virulencia en *S. aureus*

*S. aureus* tiene un comportamiento oportunista que cuenta con una compleja red de control de su virulencia y la forma como se relaciona con el ambiente en donde se encuentra. Una de las funciones de esta red, es detectar varias señales ambientales y responder alterando

---

la producción de factores de virulencia necesarios para la supervivencia en el hospedero, incluyendo adhesinas a la superficie celular, toxinas extracelulares, entre otras. Uno de los más estudiados es el sistema de genes accesorios reguladores (accessory gene regulator o *agr*), que un sistema de quorum sensing (sistema de comunicación y mecanismos de regulación de la expresión génica), que detecta la propia densidad de población y traduzca esta información a un patrón de expresión génica específico. (Horswill & Jenul, 2018)

Los “sistemas de dos componentes”, son sistemas de señalización externa que activan a la enzima histidina quinasa asociada a la membrana, llevando a la autofosforilación y posterior fosforilación del regulador de la respuesta. Una vez fosforilado, este regulador puede unirse a una “secuencia motivo” específica de ADN, llevando a la alteración de un blanco de gen de expresión. Una “secuencia motivo” (D’haeseller, 2006), son patrones recurrentes cortos de ADN que tienen función biológica. Con frecuencia indican una secuencia específica de unión para proteínas como nucleasas y factores de transcripción. Otros están involucrados en procesos importantes del RNA como la unión a ribosomas y otros con el mRNA, como la edición, poliadenilación, y finalización de la transcripción. (Horswill & Jenul, 2018). La señal detectada por el sistema *agr*, es un AIP, que puede tener 7 a 9 aminoácidos de longitud y contiene un anillo de tiolactona de 5 miembros, entre el extremo C – terminal y un residuo conservado de cisteína; el AIP se acumula en el ambiente extracelular y una vez alcanza un nivel crítico de concentración, el sistema se activa. *S. aureus* utiliza este sistema para adaptarse a los cambios y condiciones ambientales durante el crecimiento, así como para regular la virulencia. El sistema o el operón *agr*, consiste en dos transcritos adyacentes, llamados RNAII y RNAIII, cuya expresión es impulsada por los promotores P2 y P3 respectivamente. El transcrito RNAII es un operón de 4 genes, *agrBDCA*, que codifican para la maquinaria del quorum – sensing y el RNAIII es el mayor efector que regula la expresión de la mayoría de los genes diana dependientes de *agr*. (Horswill & Jenul, 2018)

El sistema *agr* fue descrito por primera vez en 1988 por Peng y colaboradores en el instituto de salud pública de Nueva York en cepas de *S. aureus*, pero luego se encontró que estaba ampliamente diseminado en otras especies de *Staphylococcus*. Este sistema cumple un papel muy importante como regulador de los factores de virulencia, formación de biocapas y como factor determinante de la resistencia a meticilina. Los loci de *agr* son sujetos de considerables secuencias de polimorfismos. Luego de clonar y secuenciar el locus de *agr*,

Peng identificó cuatro variantes (I a IV). AgrD es el péptido precursor ribosomal de AIP y es procesado proteolíticamente por AgrB, que es una peptidasa unida a la membrana. Este proceso lleva a la formación de un intermediario de tiolactona unido a enzima que, a través de un mecanismo poco conocido, transporta esta estructura a través de la membrana. (Horswill & Jenul, 2018). Una vez afuera gracias a la acción de la peptidasa SspB, AIP es detectado uniéndose al receptor que es AgrC, llevando a la autofosforilación de histidina, y esta señal se transmite al receptor de aspartato en el regulador de respuesta AgrA, que una vez fosforilado, puede unirse a los promotores P2 y P3 para llevar a cabo la expresión de RNAII y RNAIII. (Horswill & Jenul, 2018)

La expresión de RNAII, que codifica para todos los componentes del sistema *agr*, conduce efectivamente a un ciclo de retroalimentación positiva y que al ser autocatalítica es un sello distintivo de quorum – sensing, permitiendo que *S. aureus* produzca exotoxinas, aunque el crecimiento bacteriano sea lento. (Horswill & Jenul, 2018). Existen 4 tipos diferentes de AIP en *S. aureus*. Su longitud varía entre 7 aminoácidos (tipo III), 8 aminoácidos (tipo I y IV) hasta 9 aminoácidos (tipo II). Los tipos I y IV son los más conservados, difiriendo en solo un aminoácido y, por lo tanto, su función es intercambiable. La mayor divergencia entre los 4 tipos de AIP, se debe a una región muy variable que abarca el extremo C – terminal de *agrB*, todo el gen *agrD* y la región N – terminal de *agrC*. Las secuencias de aminoácidos de AIP en el *agr* I, II, III y IV son respectivamente: YSTCDFTM, GVNACSSLF, YINCDLFL y YSTCYFTM. (Tan et al., 2018)

El principal efector del sistema *agr*, es el RNAIII, un RNA regulador que también codifica para el gen de la delta – hemolisina (*hld*), también conocida como deltatoxina. Entre los genes regulados positivamente por RNAIII hay muchos factores de virulencia bien caracterizados que incluyen la alfa – toxina (Hla), serina proteasas (SplA a F), cisteína proteasas (ScpA, ScpB), gamma – hemolisina (Hlg), leucocidinas (LukAB, LukGH) y lipasa Geh. La alfa toxina es una de las toxinas reguladas más prominentes y es un determinante de virulencia importante en infecciones de piel, tejidos blandos, neumonía, infecciones endovasculares, artritis séptica y osteomielitis. (Horswill & Jenul, 2018; Tan et al., 2018). Por el contrario, algunas proteínas de la superficie, incluida la proteína A (Spa), la proteína secretora de la pared celular (LsaA) y los receptores de superficie (MnhA, MnhF y MnhG), están reguladas negativamente por RNAIII. La proteína A tiene un papel dominante en la

---

patogenicidad de varias infecciones causadas por *S. aureus* como neumonía, infecciones del torrente sanguíneo y artritis séptica. (Horswill & Jenul, 2018; Tan et al., 2018).

La regulación negativa de *agr*, de sus transcritos por modulinas solubles en fenol (o PSM, que son exoproteasas de membrana celular) y otros componentes de la superficie de membrana, han sido implicadas en la formación activa de biocapas, colonización bacteriana de dispositivos médicos como catéteres de accesos vasculares, catéteres urinarios y prótesis ortopédicas. Muchos investigadores han demostrado que la represión de *agr* es necesaria para la formación de biocapas, mientras que la activación del sistema es esencial para la ruptura o dispersión de las mismas. Algunos sistemas disfuncionales o mutantes de *agr* han sido aislados en infecciones asociadas a biocapas más espesas o gruesas. El sistema puede afectar el desarrollo de las biocapas de diferentes maneras; la adición de AIP puede reactivarlo, contribuyendo a la destrucción de las mismas, al aumentar la secreción de las proteasas extracelulares. Las cepas con *agr* II y III son las que más tienden a formar biocapas. (Tan et al., 2018)

El grupo *agr*I usualmente es encontrado en los complejos clonales (CC), tipo 8, 25, 22, 45 y 395. Los CC5, CC12 y CC15, usualmente tienen a *agr* II. CC30 con frecuencia se caracteriza por el *agr* III y CC121 tiene a *agr* IV. Las cepas con *agr* I están más fuertemente asociadas con MRSA de adquisición comunitaria (CA – MRSA), mientras que las cepas con el sistema *agr* II están más asociadas las cepas meticilino resistentes de adquisición hospitalaria (HA - MRSA). La resistencia a meticilina en aislamientos bovinos, es más prevalente cuando tienen el sistema *agr* I. Las cepas con *agr* I, II y III son la que portan el SCCmec, mientras que las cepas con *agr* IV no lo portan. No existe una clara relación entre el tipo de sistema *agr* con patologías específicas, pero es posible que la inconsistencia en estos reportes sea más el reflejo de las cepas predominantes en un punto geográfico específico (Tan et al., 2018). Son pocos los estudios que han buscado la asociación entre el tipo de  $\beta$  - lactamasa y el sistema *agr* con presencia de efecto inóculo a cefazolina en aislamientos de *S. aureus*. Uno de ellos fue el publicado por Lee y colaboradores (Lee et al., 2019), en el que se estudiaron 195 hemocultivos positivos para *S. aureus* de origen osteoarticular y de piel y tejidos blandos, en adultos coreanos. De los 195 aislamientos, *agr*I fue aislado en 67%, *agr*III en 16.2%, *agr*IV en 9,1% y *agr*II en 6.1% y en el 40% de los aislamientos con *agr*III exhibían efecto inóculo, portaban la  $\beta$  - lactamasa tipo A y mostraron

también mayor resistencia a clindamicina y a eritromicina. Otros aislamientos con efecto inóculo, tenían  $\beta$  - lactamasa tipo C. Ninguno con presencia del efecto tenían la  $\beta$  - lactamasa B o D. El *agrIII* se ha asociado también en algunos estudios con el síndrome de shock tóxico de origen menstrual y no menstrual, así como el *agrIV*, se ha asociado con la presencia de toxinas exfoliativas, en cepas con y sin efecto inóculo a cefazolina (Lee et al., 2019). *S. aureus* es una especie bacteriana que ha conservado su “Core genome” (genes presentes en todas las cepas de una especie) y su evolución ha sido llevada a cabo principalmente a través de las mutaciones y transferencia horizontal de genes. Los elementos móviles genéticos como los integrados a bacteriófagos (profagos), son uno de los principales contribuyentes a las diferencias entre cepas de *S. aureus*. Los genes que codifican para la toxina PVL (Panton - Valentine leucocidin) son un ejemplo de factores de virulencia encontrados en profagos, así como los que codifican para toxinas exfoliativas tipo A, las toxinas estafilocócicas inhibidoras del complemento (*scn*), la estafiloquinasa (*sak*), las inhibidoras de la quimiotaxis (*chp*) y las enterotoxinas codificadas por los genes *sea*, *selk2* y *selp*. (Horswill & Jenul, 2018)

Complejos clonales de *S. aureus*, pueden correlacionarse con diferentes tipos de *agr*. Por ejemplo el *agrI* se puede encontrar en CC8, CC25, CC22, CC45 y CC395. El *agrII* puede encontrarse en CC5, CC12 y CC15, mientras que *agrIII* se encuentra principalmente en el CC30. El CC121 porta casi siempre el *agrIV*. (Tan et al, 2018)

Los aislamientos con *agrII* y *agrIII* son los más asociados a la producción de biocapas, sobre todo *agrII*. El sistema *agrI* está más asociado con cepas CA – MRSA, mientras que el *agrII* se asocia más con cepas de adquisición hospitalaria. (Tan et al, 2018; Otto, Burhan, Yeh & Cheung; 2015)

Respecto a las toxinas y su relación con el sistema *agr*, se ha encontrado que por ejemplo, en el sistema *agrIV* más asociado con la expresión de genes para enterotoxinas como *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, *eta*, *etb*), mientras que en los sistemas I y II, no suele ocurrir la expresión de genes para enterotoxinas. Toxinas, adhesinas y superantígenos se asocian más a la presencia del sistema *agrI*. (Jarraud et al, 2002)

Elementos genéticos móviles como *SCCmec*, pueden mostrar cierta especificidad de acuerdo al tipo de *agr*, estando presentes en los *agrI*, II y III, pero no en el *agrIV*. (Tan et al, 2018)

Algunos estudios han demostrado relación entre el tipo de *agr* y un grupo de enfermedades en particular. Cepas con *agrIV*, se han relacionado con síndromes exfoliativos e impétigo bulloso y también con síndrome de choque tóxico. Infecciones como endocarditis bacteriana son causadas por cepas con *agrI* o *agrII*. (Tan et al, 2018; Jarraud et al, 2002)

Las islas de patogenidad, son otros elementos móviles que pueden codificar para toxinas pirógenas llamadas superantígenos. En ellas se incluyen los genes que codifican para la toxina de shock tóxico (*tsst*), enterotoxina B (*seb*) y la toxina similar a la proteína Q (*selq*). Los plásmidos tienen un papel importante en la adquisición de elementos de resistencia, pero poco en la adquisición de elementos de virulencia, por ejemplo, la toxina exfoliativa tipo B, enterotoxina D y la J. La maquinaria regulatoria y los factores de virulencia, son conocidos como genes accesorios, puesto que no son esenciales para el crecimiento normal del microorganismo. Estos elementos genéticos accesorios son codificados directamente en el cromosoma bacteriano o en elementos móviles como fagos, plásmidos e islas de patogenidad. (Horswill & Jenul, 2018)

## 1.4 Genes de resistencia antibiótica en *Staphylococcus aureus*

### 1.4.1 Resistencia a Glicopéptidos y lipopéptidos

La vancomicina es un antibiótico glicopéptido (producto natural producido por la actinobacteria *Amycolaptosis orientalis*, y descubierto en 1950) que inhibe la biosíntesis de la pared bacteriana, y es el medicamento de elección en infecciones graves por MRSA; cuando *S. aureus* exhibe aumento en la resistencia a vancomicina con MIC de 4 a 8 µg/ml, se denomina VISA. Las bases moleculares de los aislamientos VISA son poligénicas e involucran diferentes mutaciones en genes involucrados en la biosíntesis de la pared. Los *S. aureus* completamente resistentes a vancomicina (MIC ≥ 16 µg/ml), son denominados VRSA, fueron descubiertos por primera vez en 1997 (Srinivasan, Dick & Perl, 2002). La resistencia completa es otorgada por el grupo de genes *vanA*, que está presente en un plásmido. Aunque es un reto el tratamiento de estos microorganismos, son pocos los aislamientos descritos en el mundo, mientras que los VISA son mucho más frecuentes y

sus mecanismos de resistencia son menos comprendidos. Los elementos genéticos móviles juegan un papel importante en la capacidad de *S. aureus* para adaptarse al estrés medio ambiental, lo que incluye la exposición a los antibióticos. Los elementos genéticos móviles son uno de los medios principales de intercambio de información genética entre bacterias a través de la transferencia horizontal de genes. (McGuinness, Malachowa & DeLeo, 2017).

La resistencia completa a vancomicina es conferida por el grupo de genes *vanA*, el cual se encuentra en el transposón Tn1546, que originalmente es una parte de un plásmido conjugativo de los VRE. La vancomicina interfiere con la síntesis de peptidoglicano en la etapa tardía al formar enlaces de hidrógeno no covalentes con el penúltimo residuo D – Ala – D – Ala, del recién sintetizado UDP – Mur – NAc (uridin difosfato – N – Acetil murámico), interrumpiendo así el ensamblaje del peptidoglicano. En última instancia, la síntesis de la pared celular se inhibe y los complejos vancomicina - pentapéptidos unidos, se acumulan dentro de la bacteria. (Storgios & Savchenko, 2020)

Dos eventos muy importantes son necesarios para que el grupo de genes *vanA* lleve a cabo la resistencia a la vancomicina; el primero es la hidrólisis del dipéptido D – Ala – D – Ala al que se une la vancomicina, y segundo, la síntesis del dipéptido D – Ala – D – Lac (lactato), dipéptido al que la vancomicina no puede unirse. El grupo de genes *vanA* está compuesto por *vanA*, *vanH*, *vanX*, *vanS*, *vanR*, *vanY* y *vanZ*. El grupo de genes es controlado por un sistema regulador – sensor de dos componentes codificado por *vanS* y *vanR*, que detectan la presencia de la vancomicina y activan la transcripción del grupo de genes en sí. Las proteínas *vanA* y *vanH* son las responsables de la síntesis del dipéptido D – Ala – D – Lac. VanA es una ligasa que cataliza la formación de enlaces éster del dipéptido D – Ala – D – Lac, y VanH es una deshidrogenasa que forma D – Lac al reducir el piruvato. La incorporación de D – Ala – D – Lac en el péptidoglicano lleva a que la bacteria no sea susceptible a la vancomicina. (McGuinness, Malachowa & DeLeo, 2017)

Aunque la mayoría de los casos de resistencia a vancomicina han sido descritos en *S. aureus* meticilino resistentes, se reportó la resistencia a vancomicina en un aislamiento de *S. aureus* meticilino sensible, en un hemocultivo de un paciente de Brasil en el año 2012, quien recibía tratamiento antibiótico con daptomicina (Panesso, 2012). En este hemocultivo, se documentaron dos cepas de *S. aureus*, la primera de ellas era sensible a todos los

antibióticos, mientras que el segundo aislamiento, reportó sensibilidad a la oxacilina, pero resistencia a la vancomicina, con MIC de 256  $\mu\text{g/ml}$ , además de tener resistencia a la gentamicina. Trece días antes, se habían recuperado dos aislamientos de MRSA, uno de ellos adicionalmente resistente a la vancomicina, (VR – MRSA), en hemocultivos del mismo paciente. Los aislamientos meticilino sensibles y los meticilino resistentes, tenían una MIC para daptomicina de 0.5  $\mu\text{g/ml}$ . El genoma de la cepa resistente a vancomicina y sensible a oxacilina (VR – MSSA), tenía 2'906.602 pares de bases y tres elementos extracromosomales, incluyendo un plásmido de 55.713 pares de bases idéntico al plásmido pBRZ01 que portaba al gen *vanA* de la cepa de MRSA con resistencia adicional a la vancomicina, así como a la enzima *aac(6')* – *aph(2'')*, que confería la resistencia a gentamicina. El análisis del Core genome de las cepas VR – MSSA y VR – MRSA mostró 20 diferencias de polimorfismo de un solo un nucleótido, lo que sugirió una relación genética estrecha y probablemente representa el mismo organismo que adquirió pRBZ01. El gen *vanA*, es funcional en la cepa VR – MSSA, que lleva a la producción (inducida por vancomicina) de D – Lac, eliminando al dipéptido D – Ala – D – Ala de la cadena de pentapéptido del peptidoglicano, así como se observa en los Enterococos. (Panesso et al., 2015)

En cuanto a los lipopéptidos, se conocen cepas resistentes de *S. aureus* a la daptomicina, aunque son poco frecuentes, y se ha sugerido como posibles mecanismos de resistencia, cambios en la membrana y la pared celular. Mutaciones en el gen *mprF* que codifica para la fosfatidil - lisil glicerol sintetasa, hiperproducen esta enzima, llevando a la no susceptibilidad por aumento de la repulsión eléctrica que impide el anclaje de la daptomicina a la bicapa lipídica. Cambios en los genes *rpoB* y *rpoC*, que codifican para las subunidades  $\beta$  y  $\beta'$  de la RNA polimerasa, han sido encontradas en cepas no susceptibles a daptomicina y las mutaciones observadas en estos genes, son diferentes a las observadas en cepas resistentes a la rifampicina. Las mutaciones aparecen luego de mucho tiempo de exposición al antibiótico, siendo la mutación A477D o A621E las que pueden reducir la susceptibilidad tanto a la daptomicina como a la vancomicina. (Lozano & Torres, 2017; Damon, Soussy & Courvalin, 1998)

### 1.4.2 Macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (MLS<sub>B</sub>)

La resistencia es frecuente a estos antibióticos en *S. aureus* por la presencia de genes *erm*, que codifican para metilasas, otorgando resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas del grupo B. Los más frecuentes son *ermA* y *ermC*, seguidos de *ermB*. Hay otros menos frecuentes, como el *ermT*, detectado en CC398 de origen porcino. Otros mecanismos menos comunes, como los mediados por los genes *msr(A)/msr(B)* y *mph(C)*, que codifican para bombas de expulsión y una fosfotransferasa respectivamente, confieren resistencia a macrólidos y estreptograminas. Los genes *Inu* codificantes de lincosamidas nucleotidiltransferasas, *vga* e *lsa* codificantes de transportadores ABC o *cfr* de una metiltransferasa. (Lozano & Torres, 2017; Foster, 2017)

### 1.4.3 Fluoroquinolonas

Los genes de resistencia a fluoroquinolonas se observan de manera frecuente en cepas de MRSA. La resistencia ocurre por mutaciones en las subunidades GrlA y GrlB (DNA topoisomerasas IV) y GyrA y GyrB (DNA girasa). Generalmente, las mutaciones responsables de resistencia en *S. aureus* suelen producirse primero en la proteína GrlA y posteriormente en GyrA. La resistencia a quinolonas involucra cambios en las topoisomerasas, que reducen la unión efectiva y elevada expresión de bombas endógenas de eflujo. En *Staphylococcus sp*, ParC es la topoisomerasa con mayor sensibilidad y es por lo tanto el blanco principal del antibiótico. La DNA girasa es menos sensible a la acción del medicamento. Los aislamientos clínicos que son altamente resistentes a las fluoroquinolonas con frecuencia presentan sobreexpresión de bombas de eflujo codificadas en el cromosoma. Estas bombas de eflujo como NorA, se encargan de la expulsión de moléculas hidrofílicas como ciprofloxacina y norfloxacina, mientras que NorB y NorC se encargan de moléculas hidrofóbicas como sparfloxacina y moxifloxacina. (Lozano & Torres, 2017; Foster, 2017)

### 1.4.4 Sulfonamidas y trimetoprim

La resistencia al sulfametoxazol, resulta de modificaciones de aminoácidos de la dihidropterato sintetasa (DHPS), que condensa el pterato en ácido p – aminobenzóico (pABA) a dihidropterado, que es un precursor del ácido fólico. Las modificaciones en esta

---

enzima, evitan la unión del antibiótico. El cambio asociado a resistencia a trimetoprim en *S. aureus*, se da en la DHFR (dihidrofolato reductasa) gracias a una sustitución en un aminoácido F98Y. (Lozano & Torres, 2017; Foster, 2017)

### 1.4.5 Aminoglicósidos

La resistencia es de frecuencia moderada y se produce por la acción de enzimas modificantes codificadas por los genes *aac(6)-Ie-aph(2)-Ia*, *ant(4)-Ia*, *aph(3)-IIIa* y *ant(6)-Ia*, *ant(3)-Ia*. Estos genes se han detectado en plásmidos y transposones, lo que favorece su diseminación. A nivel clínico, el gen *ant(4)-Ia*, es el más prevalente. La resistencia a la gentamicina y la neomicina es conferida por la enzima bifuncional acetiltransferasa – fosfotransferasa (*aacA – aphD*) codificada por el *Tn4001*, mientras que la resistencia a la neomicina es debida a la fosfotransferasa *aphA*, codificada por *Tn5405* o por una adeniltransferasa (*aadD*) gracias al plásmido *pUB110*. (Lozano & Torres, 2017; Foster, 2017)

### 1.4.6 Tetraciclinas y glicilciclinas

Es relativamente poco frecuente, pero se encuentra más en aislamientos de MRSA. La resistencia a tetraciclinas puede ser debida a un aumento del eflujo activo o a una protección del ribosoma. Hay dos bombas de eflujo de 14 pasos transmembranales llamadas TetA(K) y TetA(L), que intercambian un protón por una molécula de tetraciclina, contra gradiente. El gen *tet(M)*, confiere de resistencia cruzada a la tetraciclina, doxiciclina y minociclina. (Lozano & Torres, 2017; Foster, 2017). Para las glicilciclinas son muy pocos los casos documentados de cepas resistentes; un estudio se enfocó en la resistencia a la tigeciclina por cambios en el gen *rpsJ*, (Beabout et al; 2015) que codifica para la proteína ribosomal S10; el mecanismo por el que se otorgara resistencia no es claro, pero es posible que se deba a un cambio conformacional en el sitio de unión de la tigeciclina, impidiendo el acceso del antibiótico. (Foster, 2017)

### 1.4.7 Oxazolidinonas

La mayoría de las cepas de *S. aureus*, son sensibles al linezolid. Hay cepas que son resistentes y esta se debe sobre todo a mutaciones en el RNAr 23 y/o en proteínas ribosomales L3, L4 y L22. La mutación más habitual es G2576T, así como cambios en el gen *cfrr*, gen que puede diseminarse por localizarse en elementos genéticos móviles (Lozano & Torres, 2017; Foster, 2017). El gen *cfrr* también es responsable de la resistencia al cloranfenicol. Mutaciones en este gen llevan a la producción de una metiltransferasa que metila el carbono 8 en el aminoácido A2503 en la subunidad 23S del rRNA. Esta base está muy cerca al sitio de unión superpuesto de estos fármacos, evitando la unión a las moléculas. El tedizolid es resistente a las mutaciones en este gen. La resistencia al linezolid también puede darse por el determinante de resistencia transferible a oxazolidinonas y fenicoles (OptrA), que ha sido encontrado en *Enterococcus sp* de origen intestinal y de animales, así como en *Staphylococcus coagulasa* negativos, pero que no se ha reportado en *S. aureus*. Esta proteína aporta resistencia a linezolid y a tedizolid. (Lozano & Torres, 2017; Foster, 2017)

### 1.4.8 Rifampicina

Se han descrito al menos 8 mutaciones en siete posiciones de la región Rif (rifampin resistance – determining) del gen *rpoB* en *S. aureus*. Algunas de ellas como His481/Tyr y Asp471/Tyr, Arg484/His, Gln468/Arg, también se han encontrado en otros microorganismos como *E. coli* y *M. tuberculosis*. Las mutaciones en las posiciones 468 y 481 confieren alta resistencia a la rifampicina, por producir cambios en la subunidad  $\beta$  de la rRNA, impidiendo la unión a la RNA polimerasa. Hay mutaciones en los codones 94 a 144 en otros microorganismos como *E. coli*, que no son vistas en *S. aureus*. (Damon, Soussy & Courvalin, 1998; Goldstein, 2014).

## 1.5 Factores de virulencia en *S. aureus*

Este microorganismo tiene gran capacidad de producir enfermedad en vertebrados incluyendo humanos y animales, gracias a sus múltiples factores de virulencia que le permiten manipular y escapar a la respuesta inmunológica innata y adaptativa del hospedero (Tam & Torres, 2018). A continuación se describirán por funcionalidad estos factores de virulencia que pueden estar presentes en aislamientos de *S. aureus*.

## 1.5.1 Exotoxinas

Se han descrito más de 40 exotoxinas producidas por este microorganismo, muchas de ellas con funciones similares y gran parecido estructural. Las exotoxinas se clasifican en tres grandes grupos dependiendo de sus funciones conocidas: citotoxinas, superantígenos y enzimas citotóxicas. Las citotoxinas actúan sobre la membrana hospedera, llevando a lisis e inflamación. Los superantígenos median la liberación masiva de citoquinas impulsando la proliferación de los linfocitos T y B. Las enzimas citotóxicas secretadas dañan a las células de los mamíferos que afectan. Colectivamente, estas exotoxinas modulan el sistema inmunológico del hospedero y son críticos para la infección de *S. aureus*. (Tam & Torres, 2018; Zecconi & Scali, 2013).

### 1.5.1.1 Citotoxinas

#### 1.5.1.1.1 Toxinas $\beta$ formadoras de poros en forma de barril

$\alpha$  - **toxina**: es el prototipo de toxina formadora de poros y también es conocida como  $\alpha$  - hemolisina o Hla; es codificada por el gen *hla* como parte de un operón monocistrónico en el Core genome de *S. aureus*. La toxina forma poros heptaméricos en forma de barriles  $\beta$  en la membrana celular blanco, llevando a la lisis de la célula. El heptámero de  $\alpha$  - toxina recuerda una estructura similar a un champiñón, que tiene tres dominios: un dominio de capa extracelular, un dominio de tallo que forma el poro de barril  $\beta$  y un dominio de borde que le confiere especificidad al receptor. El poro del barril  $\beta$  se forma a partir de un preporo mediante un cambio conformacional de una subestructura de la toxina conocida como “amino – cierre” o “amino – cerrojo”. El papel crítico de este cerrojo, en la formación de poros del barril  $\beta$  se ejemplifica por una mutación de un solo aminoácido en His – 35, que interrumpe la estabilización interprotomérica evitando la formación de los poros e inactivando a la toxina. La  $\alpha$  - toxina causa lisis de muchos tipos celulares: eritrocitos, plaquetas, células endoteliales, células epiteliales y a algunos leucocitos. La toxina puede modular la respuesta celular a concentraciones subletales, llevando a la liberación de óxido nítrico desde las células epiteliales, favorece la salida de calcio al espacio extracelular, aumenta la producción de citoquinas, favorece la activación de caspasas en monocitos, así como aumenta la expresión de la proteína ADAM10 y de su proteasa, que lleva a la disrupción de la berrera epitelial. Nanogramos de la toxina pueden producir dermonecrosis

severa en conejos y ratones. La infusión endovenosa de la toxina es rápidamente fatal. (Tam & Torres, 2018; Zecconi & Scali, 2013).

#### **1.5.1.1.2 Toxinas formadoras de poros bicomponentes**

Estas toxinas están relacionadas con la  $\alpha$  - toxina, muestran homología en la estructura y tienen mecanismos de formación de poros similares, sin embargo, en contraste con la  $\alpha$  - toxina, estas tienen dos subunidades: la subunidad de elución rápida o F (del inglés “fast”) y la subunidad de elución lenta o subunidad S (del inglés S “slow”), nombradas en función de su comportamiento en cromatografía líquida. La subunidad S reconoce el sitio de unión a su receptor en la célula blanco y luego la subunidad F es reclutada para la dimerización. Esto es seguido por oligomerización con tres dímeros adicionales para formar un prepore octamérico en la membrana de la célula diana. A continuación, los dominios “tallo” del prepore, se extienden en el centro de la estructura, formando un poro en forma de barril  $\beta$  que se inserta en la membrana celular llevando a la lisis. La forma de estas toxinas bicomponentes también recuerda a un champiñón. Las células blanco de estas toxinas son los leucocitos y por lo tanto son llamadas comúnmente “leucocidinas”. Actualmente, cinco de las leucocidinas se asocian a infecciones humanas: LukSF-PV (originalmente conocida como la leucocidina Pantón – Valentine (PVL),  $\gamma$  - hemolisina AB y CB (HlgAB, HlgCB), LukED y LukAB (conocida también como LukHG). Otras como LukMF y LukPQ, están asociadas a infecciones en animales. Todas las leucocidinas muestran homología y secuencia muy parecida, siendo LukAB, la que muestra solo 30% de homología de sus aminoácidos con las otras. Muchas de estas leucocidinas, tienen efectos diferentes a la lisis celular, como aumento del calcio extracelular desde la célula hospedera, producción de citoquinas proinflamatorias. Muchas de las leucocidinas, estimulan la salida de potasio, activando caspasas, llevando a la apoptosis. (Tam & Torres, 2018)

#### **1.5.1.1.3 Leucocidina de Pantón Valentine (PVL)**

El locus *pvl* es codificado dentro de genoma de al menos seis profagos. (Tam & Torres, 2018). Es una leucocidina de dos componentes que pertenece a las familia de toxinas productoras de poros en forma de barril; el profago que la codifica, se encuentra adyacente a los genes *lukS* y *lukF*, que producen las toxinas LukS y LukF, que son necesarias para la actividad citolítica de la toxina. La mayoría de las cepas CA – MRSA tienen los genes *lukS* y *lukF*, mientras que muy pocas MSSA la tienen y no se encuentran en las cepas de

adquisición hospitalaria. Esta toxina causa lisis de los neutrófilos y tiene efectos proinflamatorios sustanciales a concentraciones tan bajas como 5 ng/mL, que contribuye a aumento de la infectividad como se observó en modelos de conejos. (Otto, 2013)

No todas los aislamientos con CA – MRSA contienen los genes *lukS* y *lukF*, y en ellas no se ha observado una disminución de la virulencia al compararlas con aquellas que sí tienen estos genes, como sí ocurre al comparar aislamientos sin presencia de otros genes que codifican para toxinas como  $\alpha$  - toxina o PSM $\alpha$  en la que la mencionada ausencia impacta en la virulencia del microorganismo disminuyéndola notoriamente. (Otto, 2012)

Aunque menos del 40% de los aislamientos clínicos en los Estados Unidos portan estos profagos, más del 90% de las cepas se asocian a neumonía necrosante e infecciones severas adquiridas en la comunidad. PVL destruye solamente a los leucocitos humanos y de conejo. La delección de este gen lleva a menos inflamación y daño en los tejidos. Concentraciones sub – líticas, pueden aumentar la fagocitosis y la muerte de las bacterias por los neutrófilos. (Zecconi & Scali, 2013). La toxina PVL no causa hemólisis. (Vasquez et al; 2020).

#### **1.5.1.1.4 $\gamma$ - hemolisina AB y CB (HlgAB, HlgCB)**

El locus de esta hemolisina, es parte del Core genome de *S. aureus* y se ha aislado en el 99% de los genomas secuenciados de esta bacteria. Este locus consta de tres genes: el gen *hlgA*, transcrito por su promotor, seguido de un operón que contiene los genes *hlgC* y *hlgB*, transcritos por un promotor diferente. HlgAB lisa eritrocitos, neutrófilos, monocitos y macrófagos humanos, pero no de ratones. HlgCB es una hemolisina que lisa células que expresan receptores C5aR1 y C5aR2, que son los mismos receptores de la toxina PVL. (Tam & Torres, 2018; Zecconi & Scali, 2013).

#### **1.5.1.1.5 LukED**

El locus *lukED* está presente en el 70% de los aislamientos de *S. aureus*. Esta toxina formadora de poros que destruye eritrocitos y neutrófilos maduros de humanos y de ratones, así como precursores hemocitopoyéticos. La hemólisis producida, permite al microorganismo aumentar su capacidad de adquisición de hierro. La toxina consta de dos monómeros: LukE y LukD. LukE, que en eritrocitos, se une al receptor DARC, facilitando la hemólisis. (Vasquez et al; 2020)

En leucocitos, LukE, se une a aquellos que expresan el receptor CCR5, como son los macrófagos, destruyéndolos, siendo este también un mecanismo de evasión de la respuesta inmunológica. Sin embargo, también puede destruir polimorfonucleares, que no expresan el receptor CCR5; la destrucción de estas células ocurre a través de su unión a los receptores CXCR1 y CXCR2, que están expresados también en la superficie de los monocitos, las células NK, los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Es una enzima capaz de inducir una respuesta proinflamatoria *in vivo*. (Alonzo & Torres; 2014)

#### 1.5.1.1.6 LukAB (también conocida como LukHG)

El locus *lukAB*, es parte del Core genome de *S. aureus* y se ha encontrado en el 99% de los aislamientos. La toxina se encuentra en abundancia durante la fase exponencial de crecimiento. La región C – terminal de LukA es crítica para la actividad de la toxina, pues mutaciones dentro de esta región causan inactividad de la toxina. A diferencia de otras leucocidinas que son secretadas como monómeros, LukAB es secretada como heterodímeros. Esta toxina tiene una gran potencia contra células de primates y de conejos, pero muy poca contra células de ratón. La toxina le permite a la bacteria, escapar de los neutrófilos y los monocitos, una vez han sido fagocitados. (Tam & Torres, 2018)

## 1.6 Otras citotoxinas

### 1.6.1 Modulinas fenol solubles

Pertencen a la familia de péptidos anfipáticos solamente encontrados en *Staphylococcus sp.* En *S. aureus*, estas toxinas son codificadas en tres loci en el Core genome: el operón *psm $\alpha$* , que codifica para PSM $\alpha$ 1 – 4, el operón *psm $\beta$* , que codifica para PSM $\beta$ 1 – 2 y *hld* que codifica para la  $\delta$  - toxina. A diferencia de las citotoxinas previas descritas, las PSM son secretadas en ausencia de un péptido señal, por lo tanto, la mayoría de los PSM aislados en *Staphylococcus sp.* contienen un N – formilmetionina terminal. Las PSM son secretadas por el transportador soluble en fenol de modulinas ABC. La ausencia de este transportador, lleva a la acumulación de dichas proteínas y lleva a la muerte celular. (Tam & Torres, 2018)

Las PSM se clasifican según su longitud. Las tipo  $\alpha$ , típicamente tienen 20 a 25 aminoácidos de longitud y tienen una carga neta neutra o positiva. PSM $\alpha$  y la  $\delta$  - toxina, son PSM $\alpha$ . Estas proteínas están enteramente formadas por  $\alpha$  - hélices. (Tam & Torres, 2018; Zecconi &

Scali, 2013). Las PSM $\beta$  son más largas, usualmente tienen 43 a 45 aminoácidos y la mayoría tienen cargas negativas. La estructura de estas consiste en tres  $\alpha$  - hélices, formando una estructura similar a la letra "v". Las PSM tienen múltiples papeles en la patogénesis producida por *S. aureus*, incluyendo la lisis celular, formación de biofilm e inmunomodulación. Muchas de ellas lisan células eucariotas independiente de la presencia de un receptor. Las bacterias fagocitadas producen PSM para lisar a los neutrófilos una vez y escapar. Las concentraciones subléxicas de las PSM tienen efectos inmunomoduladores en las células hospederas. Estas son detectadas por receptores FPR2 o receptor 2 del péptido formil, que es una proteína G trimérica de membrana, especializada en reconocer patrones moleculares asociados al patógeno (PAM's en inglés). FPR2 se expresa en las células inmunológicas, incluyendo neutrófilos, monocitos, macrófagos y células dendríticas inmaduras. Una vez es activado este receptor por las PMS, se induce una respuesta proinflamatoria que incluye la producción de citoquinas, quimiotaxis de neutrófilos y activación de leucocitos. Los PSM permiten la formación de biocapas. (Tam & Torres, 2018).

## 1.7 Superantígenos de *Staphylococcus aureus*

### 1.7.1 Superantígenos de células T

Estos representan una gran familia de exotoxinas producidas por *S. aureus*; su peso molecular oscila entre 19 a 30 kDa. Son resistentes al calor, proteólisis y a la desecación. Debido a su extrema estabilidad y alta toxicidad en humanos, algunas de ellas son clasificadas como agentes de bioterrorismo, por ejemplo, la enterotoxina B de *S. aureus*.

Los genes que codifican para estos superantígenos pueden ser encontrados en varios componentes del genoma; algunos genes como *seIX* y *seIW* hacen parte del Core genome. Los otros son codificados en diferentes elementos genéticos móviles, como bacteriófagos, plásmidos e islas de patogenicidad. La distribución de los superantígenos es altamente variable en el mismo elemento genético móvil encontrado en diferentes cepas.

Los superantígenos ejercen una propiedad mitogénica mediante el entrecruzamiento del V $\beta$  TCR en un linfocito T que tenga el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC II) sobre una célula presentadora de antígenos, llevando a la proliferación policlonal de células T. Luego de esta proliferación, ocurre una anergia de células T, cuando las células activadas

fallan en proliferación y/o se someten a apoptosis. Los superantígenos en *S. aureus* pueden ser divididos en tres grandes grupos: Enterotoxinas Estafilocócicas (SE), enterotoxinas similares Estafilocócicas (SE – I) y la toxina 1 del síndrome de choque tóxico (TSST – 1). (Tam & Torres, 2018).

## 1.8 Enterotoxinas estafilocócicas y enterotoxinas similares estafilocócicas

Hay 6 tipos diferentes de toxinas enterotóxicas en *S. aureus*: SEA a SEE y SEG. Fueron nombradas de acuerdo a la capacidad de producir vómito que es una característica típica de la intoxicación alimentaria por *S. aureus*. Su capacidad emética guarda relación con la presencia de un bucle disulfuro de 9 a 19 aminoácidos de longitud en la proteína. Las otras enterotoxinas son SE – I H a SE – I Y. Estas tienen actividad mitógena sobre las células T y no tienen actividad emética comprobada. (Tam & Torres, 2018)

## 1.9 Toxina de síndrome de choque tóxico tipo 1

El gen *tst* está codificado en varias islas de patogenicidad incluyendo SaPI1, SaPI2 y SaPIbov1. En 1984, se enfatizó en su asociación con el síndrome de choque tóxico, que es una enfermedad caracterizada por hipotensión, fiebre, exantema y descamación una a dos semanas después de iniciada la infección. Como lo define CDC, el síndrome de choque tóxico compromete al menos tres de los siguientes sistemas u órganos: gastrointestinal, muscular, membranas mucosas, renal, hepático, hematológico o de sistema nervioso central. El síndrome puede ser clasificado también como menstrual o no menstrual. El menstrual se asocia a la colonización vaginal o del cuello uterino con cepas productoras de la toxina y el uso de tampones para el ciclo menstrual. (Tam & Torres, 2018; Zecconi & Scali, 2013)

## 1.10 Superantígenos B

La proteína estafilocócica A o SpA, es el único superantígeno para las células B, que es conocido. La mayoría de los aislamientos clínicos contienen el gen *spa* en el Core genome. La proteína está compuesta por cinco dominios homólogos de unión a las inmunoglobulinas, que se pliegan en un paquete de tres hélices. Los dominios de unión de

las inmunoglobulinas, confieren a la SpA la habilidad de unirse a la porción Fc $\gamma$  de las inmunoglobulinas para prevenir la opsonización. Este dominio de unión a proteínas también le permite unirse a las células B, lo que lleva a su activación. El reconocimiento de antígenos convencionales por un receptor de las células B requiere el reconocimiento de antígenos en la región determinante de complementariedad. Por el contrario, la SpA ejerce su actividad mitógena al unirse a la región variable de la cadena pesada, alejándose de la región que determina la complementariedad, evitando el requisito de especificidad antigénica para la activación de células B. (Tam & Torres, 2018)

Durante la infección, SpA previene la opsonofagocitosis de la bacteria, atrapando las inmunoglobulinas, impidiendo la producción de anticuerpos específicos contra *S. aureus*. (Medina & Goldmann, 2018).

## 1.11 Enzimas citotóxicas

### 1.11.1 $\beta$ - toxina ( $\beta$ - hemolisina)

La toxina está codificada por el gen *hly*, que hace parte del Core genome. Sin embargo, debido a la presencia de un profago convertor *hly*, ( $\phi$ Sa3 y  $\phi$ Sa13) que interrumpen al gen, solo un número limitado de aislamientos en humanos producen la  $\beta$  - toxina. Estos profagos portan genes que codifican para factores de evasión de la respuesta inmunológica, como proteínas inhibidoras del complemento, inhibidores de la quimiotaxis y a la estafiloquinasa. La  $\beta$  - toxina es conocida como una hemolisina caliente/frío; este fenómeno único es el resultado que ocurren cuando los productos de hidrólisis de ceramidas a los 37°C, se mantienen unidos por fuerzas cohesivas en la membrana, pero cuando la temperatura disminuye a 4°C, se produce una separación de fases que condensa la ceramida en grupos y colapsa la bicapa lipídica, lo que da como resultado la presencia de invaginaciones en las membranas de los eritrocitos mediante microscopía electrónica. La toxina también aumenta la producción de biopelículas. Muestra una actividad hemolítica dependiente de la especie de acuerdo a la cantidad de esfingomielina que contienen los eritrocitos, por ejemplo, los de cabras, vacas y ovejas son muy sensibles a la toxina, los de humanos y conejos son de sensibilidad intermedia, mientras que los de ratones y perros son resistentes a la acción de la toxina. (Tam & Torres, 2018; Zecconi & Scali, 2013).

## 1.12 Toxinas exfoliativas

Conocidas también como toxinas epidermolíticas, son cuatro antigénicamente diferentes: ETA, ETB, ETC y ETD. Cada una de ellas es codificada por un elemento genético móvil: *eta*, codificado en el genoma de un fago que puede convertir cepas *eta* negativas, en cepas productora de la toxina. El gen *etb* es codificado por el plásmido pETB y *etd* es codificado como parte de una isla de patogenicidad. La toxina ETC fue purificada en un aislamiento de una infección de equinos, aunque su locus no ha sido descrito aún.

La mayoría de lo que se conoce, se sabe por la ETA y ETB; estas son la causa del síndrome de piel escaldada por *S. aureus* (SSSS), incluyendo la enfermedad de Ritter, la necrosis epidérmica tóxica, el impétigo bulloso. SSSS se observa sobre todo en neonatos, lactantes y adultos inmunocomprometidos. Los síntomas incluyen la aparición de vesículas y de descamación superficial de la piel. Las lesiones clásicamente son estériles porque la toxina puede ser distribuida a lo largo del torrente circulatorio desde un sitio distante para causar los síntomas. (Tam & Torres, 2018; Zecconi & Scali, 2013).

## 1.13 Exoenzimas

Coagulasa (Coa), proteína de unión al factor de von Willebrand (vWbp) y la estafiloquinasa (Sak), son cofactores producidos por *S. aureus*, que no tienen actividad enzimática en sí misma, pero que pueden activar zimógenos del hospedero.

Estas tres proteínas secuestran diferentes aspectos del sistema de coagulación del hospedero, manipulando así sus defensas innatas para promover la supervivencia y la diseminación bacteriana. (Tam & Torres, 2018; Zecconi & Scali, 2013).

### 1.13.1 Coagulasas estafilocócicas: Coa y vWbp

La capacidad de inducir la coagulación es una de las principales características de la clasificación de las especies de *Staphylococcus*. La mayoría de los *Staphylococcus sp* son coagulasa negativos, algunas pocas especies son coagulasa positivas como *S. aureus*, *S. intermedius* y algunas cepas de *S. schleiferi*.

Tanto *coa* como *vWb* son codificadas cromosómicamente; existen doce isoformas del gen *coa* que han sido identificadas, observándose alta variabilidad en el extremo N – terminal de cada una de las proteínas codificadas. En cambio, el gen *vWb*, está relativamente

conservado y solo se han descrito dos alelos. Ambas se unen a la protrombina en relación 1:1 para formar la estafilotrombina, que es altamente efectiva en convertir el fibrinógeno en fibrina. La actividad de la estafilotrombina no puede ser inhibida por los anticoagulantes comunes como la heparina o el EDTA. (Tam & Torres, 2018; Zecconi & Scali, 2013).

### 1.13.2 Estafiloquinasa (Sak)

Es un cofactor que captura a la plasmina para activar al plasminógeno de forma que pueda romper coágulos de fibrina, permitiendo la diseminación de la bacteria. Es producida en cepas lisogénicas de *Staphylococcus sp* y el profago que la codifica generalmente porta otros genes de virulencia como el de la enterotoxina A y de proteínas inhibidoras de la quimiotaxis. Sak una proteína de dominio único que consiste en una hélice  $\alpha$ , cinco láminas  $\beta$  plegadas y dos hebras  $\beta$  más cortas. Sak forma un complejo 1:1 con la plasmina, que es altamente efectivo en convertir el plasminógeno en plasmina. Sak es altamente específica de especie; es muy activa en el plasminógeno del humano, perro, cabra, conejo y oveja, pero es inactiva en el del ratón, el cerdo, la vaca y el búfalo. Sak logra facilitar la invasión del microorganismo a la piel, generando lesiones abiertas. Se sabe que la plasmina puede ayudar a cicatrizar y cerrar heridas, se sabe que cuando es activado por la proteína Sak, se promueve la diseminación del microorganismo. (Tam & Torres, 2018; Medina & Goldmann, 2018).

## 1.14 Proteasas

*Staphylococcus sp* codifica para tres familias de proteasa secretoras: metaloproteasas, cisteína proteasas y serina proteasas. Colectivamente tienen roles en la adquisición de nutrientes, diseminación bacteriana y evasión de la respuesta inmunológica. Actualmente se sabe que *S. aureus* puede producir doce proteasas: una metaloproteasa (aureolisina o Aur), dos cisteína – proteasas (ScpA y SspB) y nueve serina – proteasas. Estas serina – proteasas incluyen a las siguientes: proteasa V8 (SspA), serina – proteasas similares A a F (SplA a SpIF), ETA y ETB. (Tam & Torres, 2018; Medina & Goldmann, 2018).

### 1.14.1 SspA o serina proteasa V8 y Cisteínas – proteasas

El gen que codifica SspA (*sspA*) es parte de un operón serina – proteasa (*ssp*), que consiste en tres genes: *sspA*, *sspB* y *sspC*.

SspA contribuye a la evasión del sistema inmunológico y a la diseminación de la bacteria, destruyendo proteínas propias y del hospedero. SspA rompe las uniones de fibrinógeno sobre la superficie de la bacteria, reduciendo la adhesión bacteriana, facilitando la diseminación por ruptura de las biocapas. SspA puede degradar al inhibidor de la  $\alpha$ 1 – proteinasa, a la interleucina 6 (IL – 6) y a las inmunoglobulinas, de forma que puede evitar la opsonización y modula la respuesta inmunológica del hospedero. Puede destruir a los neutrófilos una vez la bacteria ha sido fagocitada. ScpA es codificada por el operón cisteína – proteasa (*scp*). ScpA daña la elastina de los tejidos conjuntivos, destruye el surfactante pulmonar, así como al receptor CXCR2 de los leucocitos. Promueve además la fuga capilar activando el sistema de kinina/kallicreína del plasma, llevando a la hipotensión. SspB degrada al péptido LL – 37, promoviendo la supervivencia bacteriana. Destruye a los receptores CD11b y CD31, que son importantes para la activación y supervivencia de los fagocitos; al destruir estos receptores, SspB inhibe la fagocitosis al disminuir la habilidad de los leucocitos de detectar a los microorganismos. Ambas cisteínas – proteasas, destruyen biocapas. (Tam & Torres, 2018; Medina & Goldmann, 2018).

### 1.14.2 Metaloproteasa Aureolisina (Aur) y Hialuronidasa (HA)

Esta proteína activa a SspA, degrada al factor de aglutinación B (ClfB), destruye al péptido LL – 37, destruye a las proteínas C3, C3a y C3b del complemento, no permitiendo la formación del complejo de ataque de la membrana, promoviendo la supervivencia bacteriana. El papel de las serina – proteasas similares A a F (SplA a SplF) no es claro en la patogénesis en el humano, pero parecen estar relacionadas con la inflamación de la vía aérea y la aparición de asma, así como en el estado portador nasal de *S. aureus*. La hialuridasa solo es producida por *S. aureus* y *S. hyicus*. Favorece la diseminación de la bacteria al romper la matriz de ácido hialurónico extracelular y las biocapas. La piel y los pulmones son las dos localizaciones más frecuentes y abundantes del ácido hialurónico. (Tam & Torres, 2018; Zecconi & Scali, 2013)

## 1.15 Lipasas

*S. aureus* puede producir dos fosfolipasas: la  $\beta$  - toxina y el fosfatidilinositol – específica fosfolipasa C (PI – PLC). Promueve la supervivencia de la bacteria en eritrocitos y neutrófilos humanos. *S. aureus* tiene dos lipasas: SAL1 y SAL2. Ambas son producidas como pro – enzimas e hidrolizan triglicéridos de cadenas cortas, ácidos grasos, mono y diglicéridos. Sin embargo, su rol en la patogénesis de la enfermedad no es clara. En altas dosis causan agregación de los leucocitos y disminuyen su capacidad de fagocitosis. En modelos murinos, estas lipasas promueven la formación de abscesos y de biocapas. (Tam & Torres, 2018)

## 1.16 Polisacáridos capsulares (CP)

*S. aureus* está rodeada de polisacáridos capsulares (CP), que son importantes para la patogénesis de la infección. Existen 13 serotipos de polisacáridos, pero la mayoría de los aislamientos expresan los polisacáridos tipo 5 y 8 (CP5 y CP8). La encapsulación permite la evasión de la respuesta del sistema inmunológico; la cápsula es un componente extracelular que puede extenderse a cientos de micras de la superficie celular, y está compuesta básicamente de largas cadenas de polisacáridos capsulares, que enmascaran las proteínas de superficie que son las encargadas de iniciar la respuesta inmune adaptativa del hospedero. Una sola especie bacteriana puede producir numerosos a capsulares, estructuralmente distintos, formando las bases para su serotipificación. La expresión de (CP5, CP8), evade la muerte bacteriana por opsonización o fagocitosis. Los polisacáridos capsulares son poco inmunogénicos, pero cuando se conjugan con otras proteínas, estimulan de forma robusta la respuesta inmunológica dependiente de linfocitos T, sin importar la edad del individuo infectado. Ensayos para la producción de vacunas contra *S. aureus*, contienen proteínas conjugadas con CP5 y CP8. Estos polisacáridos se han encontrado tanto en cepas causantes de infección, como aquellas que colonizan o son comensales. Se han encontrado en cepas de humanos, vacas, conejos, cerdos, caballos y aves de corral. (Visansirikul, Koldziej & Dmenchenko, 2020)

Desde 1982, Karakawa y Vann, desarrollaron un sistema de clasificación de los CP, basándose en la especificidad inmunológica. De acuerdo a la morfología de las colonias,

los CP pueden ser divididos en dos grupos: los serotipos 1 y 2, son clasificados como polisacáridos mucoides, ya que son fuertemente encapsulados y las colonias dan aspecto mucoso. Los CP de los serotipos 3 a 12 son clasificados como “microcapsulados”, porque la cápsula es delgada y las colonias no son mucoides (O’Riordan & Lee, 2004). Las cepas de los serotipos 1 y 2 resisten *in vitro* la opsonofagocitosis por neutrófilos humanos. En suero no inmune, fragmentos del complemento (C3b) y los anticuerpos dirigidos a los componentes de la pared de *S. aureus*, se depositan en la pared celular bacteriana debajo de la capa capsular, que impide la interacción entre C3b o la inmunoglobulina unida a la pared celular y los receptores de estas moléculas en las células fagocíticas, evadiendo la captación fagocítica. Estudios realizados en peritoneo de ratones, mostraron que las cepas mucoides, no son fagocitadas de forma efectiva, se replican libremente y además tienen la capacidad de producir toxinas como la  $\alpha$  - toxina, llevando a mortalidad del ratón en menos de 48 horas. (O’Riordan & Lee, 2004; Keinhörster, George, Weindenmaier & Wolz, 2019)

La estructura química trisacárida de CP8 fue establecida en 2005 y es la siguiente:

→ 3) – O – (ácido 2 – acetamido – 4 – O – acetil – 2 – deoxi -  $\beta$  - D – manopiranosil – urónico) – (1 → 3) – O – (2 – acetamido – 2 – deoxi -  $\alpha$  - L – fucopiranosil) – (1 → 3) – 2 – acetamido – 2 – deoxi -  $\alpha$  - L – fucopiranosil – (1 →) (Visansirikul, Koldziej & Dmenchenko, 2020). La estructura de CP8 y CP5 es muy parecida, solo distinguiéndose por el tipo de enlace que ocurre entre los azúcares en el sitio de la O – acetilación de los residuos de ácido manosaminurónico (Keinhörster, George, Weindenmaier & Wolz, 2019).

Las colonias de cepas de *S. aureus* con CP5 y 8, son indistinguibles de aquellas que no tienen cápsula. Los primeros estudios de Karakawa, sugirieron que estos polisacáridos ofrecían a las cepas, resistencia a la fagocitosis y a la muerte por neutrófilos. En condiciones diferentes de cultivo, por ejemplo, durante el crecimiento de fase logarítmica, los anticuerpos y la opsonización lograron la muerte de las cepas y esto posiblemente es debido a que, en esta fase de crecimiento logarítmico, la expresión de los polisacáridos es prácticamente ausente (O’Riordan & Lee, 2004). Dependiendo del tipo de infección, la presencia o ausencia de polisacárido capsular ha sido ventajosa para el microorganismo. La presencia de los CP aumenta la virulencia en modelos murinos de bacteriemia, artritis séptica, abscesos y heridas quirúrgicas. En contraste, cepas sin CP se han encontrado en casos de osteomielitis, fibrosis quística y mastitis, lo que provee evidencia que la pérdida

de los CP puede también ser una ventaja para la aparición de infecciones crónicas. (Keinhorster, George, Weindenmaier & Wolz, 2019)

## 1.17 Sistemas de secreción bacteriana

Las bacterias exportan proteínas a través de las membranas utilizando una gama de maquinaria de transporte. El sistema de secreción tipo VII (T7SS), originalmente descrito en *Mycobacterium sp*, se encuentra también en varios *phylum* bacterianos. Los sistemas de secreción bacteriana que median el transporte de proteínas están clasificados en seis tipos: I a VI. En Gram positivos, los sistemas de secreción flagelar, Sec y Tat fueron los que inicialmente descritos y de los que se creía, eran los responsables de todo el transporte de proteínas, hasta el que fue descubierto el sistema especializado de secreción, ESX – 1 en *M. tuberculosis*. Este sistema llamó la atención porque es el responsable de exportar una proteína inmunogénica abundante, llamada ESAT – 6 (early secreted antigen target 6, también llamada EsxA. El papel de ESX – 1 juega un papel importante en la virulencia de *M. tuberculosis* y varios de sus efectores interfieren en las funciones celulares e inmunológicas del hospedero, principalmente modular las respuestas de los macrófagos y de las células T. Después de haber descrito el sistema de secreción tipo VI en las micobacterias, diferentes análisis genómicos determinaron que debía existir un sistema similar en diversos grupos de Gram positivos. (Unnikrishnan, Constantinidou, Palmer, & Pallen, 2017; Green & Meccas, 2016)

En *S. aureus*, este sistema es conocido como Ess (por ESAT – 6 Secretion system), y es necesario como factor de virulencia en modelos de abscesos murinos, neumonía e infecciones de piel y tejidos blandos, así como está asociado a la persistencia de infección. Los genes *ess* muestran altos niveles de regulación positiva durante la infección crónica por *S. aureus* en pacientes con fibrosis quística, lo que sugiere un papel similar en la infección persistente en humanos. (Unnikrishnan, Constantinidou, Palmer, & Pallen, 2017). La maquinaria Ess comprende 6 componentes importantes, incluyendo una proteína extracelular, una proteína citoplasmática y cuatro proteínas de membrana. El componente más abundante es EsxA, una proteína secretada que pertenece a las proteínas WXG100 (Sutcliffe, 2011), que forman un homodímero. EsxA muestra un alto grado de conservación de su secuencia entre los aislamientos de *S. aureus* y es requerido para la secreción de

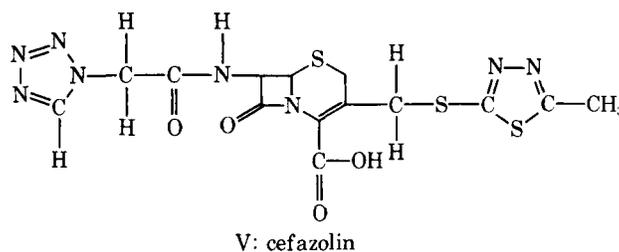
otros sustratos de Ess, implicándolo fuertemente como un componente extracelular central. La segunda proteína soluble EsaB, que alberga un pliegue similar a la ubiquitina y parece regular la maquinaria de Ess. Las 4 proteínas de membrana clave incluyen EssA, EssB, EssC y EsaA. Aunque se requiere de EssA para la secreción de los sustratos, EsaA parece ser dependiente de cada cepa. Las estructuras de rayos X disponibles para los dominios solubles de EssB y EssC. EssB tiene un dominio citoplasmático con un pliegue pseudoquinasa, pero carece de motivos de unión al ATP y no puede unirse a análogos de ATP. No se conoce bien la función de los dominios de EssC. (Unnikrishnan, Constantinidou, Palmer, & Pallen, 2017). EsaD es el único sustrato al que se le ha asignado una función. Análisis de cepas mutantes para *esaD*, indican que *esaD* es un factor accesorio adicional para la secreción de otros sustratos Ess. Se encontró que EsaD es una gran toxina antibacteriana del tipo VII con su dominio nucleasa y el extremo C terminal que se dirige al DNA de cepas sensibles de *S. aureus*. EsaG es una antitoxina EsaD, que se une al dominio nucleasa de EsaD, protegiendo a la célula productora de auto – intoxicación. La introducción de EsaG en una cepa sensible de *S. aureus*, ofrece una protección significativa contra la muerte mediada por EsaD. (Unnikrishnan, Constantinidou, Palmer, & Pallen, 2017).

## 1.18 Cefalosporinas. Cefazolina (Cz)

Las cefalosporinas son antibióticos derivados del hongo *Cephalosporium acremonium*; tres compuestos separados, cefalosporinas C, N y P fueron aislados del hongo, pero solo la cefalosporina C, fue la que demostró actividad amplia bactericida contra diferentes Gram positivos y Gram negativos. Los primeros sintetizados fueron cefalotina, cefaloridina y cefaloglicina. Su mecanismo de acción es similar al de las penicilinas, inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana, acumulando nucleótidos que contienen residuos de uridina 5 – pirofosfato y derivados del ácido N - acetilmurámico. Las bacterias susceptibles se convierten en filamentos largos y protoplastos. (Kariyone, Harada, Kurita & Takano, 1970). La cefazolina (Cz), es un antibiótico semisintético, derivado del ácido 7-aminocefalosporánico, con estructura química compleja, que muestra actividad parecida contra Gram positivos y mayor actividad contra Gram negativos, al ser comparada con cefalotina y la cefaloridina. No tiene actividad contra Gram negativos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* indol positivo, *Enterobacter sp*, *S. marcescens*, *Enterococcus sp*, *B. fragilis*, *Acinetobacter sp*. La Cz es sintetizada como sal de sodio lo que la hace muy soluble

en agua y le permite mantener su actividad y estabilidad hasta por 5 días. Por ejemplo, cuando se diluye en solución acuosa al 25% mantiene una actividad y estabilidad del 85% frente a la cepa ATCC 6633 de *Bacillus subtilis* y del 92% cuando se diluye en solución acuosa al 5%. Es un antibiótico estable frente a cepas de *S. aureus* productoras de penicilinasas, metilino sensibles. (Nishida et al., 1970; Weinstein, 1980)

A diferencia de la cefalotina, Cz no es metabolizada. Alcanza una concentración en suero de 30 a 40 µg/ml cuando se aplican 500 mg por vía intramuscular y su concentración declina hasta 3 µg/ml o menos luego de 8 horas. Se excreta sin cambios por vía urinaria en las próximas 24 horas de haber sido aplicada. Es una de las cefalosporinas con mayor unión a proteínas séricas, 85%, mientras que la cefalotina se une en un 65%. Alcanza adecuadas concentraciones en diferentes tejidos como endocardio, huesos, líquido pleural y bilis, pero no atraviesa la barrera hematoencefálica siendo muy pobre su concentración en líquido cefalorraquídeo. No se detecta en leche materna. (Weinstein, 1980).



**Gráfica 3.** Estructura química de la Cefazolina (Nightingale, Greene, Quintiliani, 1975)

Actualmente es ampliamente utilizada en la profilaxis pre - quirúrgica en muchos hospitales del mundo y continúa siendo útil en el tratamiento de infecciones en sitios diferentes a sistema nervioso central causadas por especies de *Streptococcus* sensibles (incluyendo *Streptococcus pneumoniae*), *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *S. aureus* y *Klebsiella sp* sensibles. (Nishida et al., 1970; Weinstein, 1980). Es un medicamento generalmente bien tolerando, puede aplicarse por vía intramuscular con mínimo dolor en comparación a otras cefalosporinas como ceftriaxona; puede producir flebitis; pocas veces asociada a toxicidad renal y puede tener reacción alérgica cruzada grave con β - lactámicos como penicilinas. (Nishida et al., 1970; Weinstein, 1980)

En infecciones localizadas o en bacteriemias causadas por MSSA, la Cz y las PAS, han sido los antibióticos de elección para su tratamiento. La Cz es más segura en términos de toxicidad y reacciones adversas a medicamentos frente a las PAS, pero su efectividad puede verse afectada por el EICz, pudiendo llevar a la cronificación de estas infecciones (como las osteomielitis) o a aumento en la mortalidad, por ejemplo en el caso de infecciones del torrente circulatorio, bacteriemias, artritis sépticas, endocarditis, entre otros, en las que esta puede alcanzar hasta el 50% si no son tratadas adecuadamente. Diferentes revisiones sistemáticas (Weis et al, 2019), han comparado la evidencia que existe entre la Cz contra las PAS para el tratamiento de infecciones por MSSA. En estos, se ha comparado la mortalidad a 30 días, a 90 días y las tasas de recaídas o de cronificación de la infección, entre otros indicadores. A pesar de la heterogeneidad de los estudios, esta revisión concluye que la mortalidad a los 90 días es menor en el grupo de pacientes tratados con Cz, que fue de 18.1%, en comparación al grupo de pacientes con tratados con PAS, que fue de 25.1%. Aunque la calidad de la evidencia es baja, destacan que la Cz no se asocia a aumento de la mortalidad a 90 días. Respecto a la mortalidad a los 30 días la revisión concluye que es menor en comparación a los tratados con PAS, aunque el número de pacientes que recibieron Cz fue mucho mayor (Mortalidad de 9.1% en Cz vs 12.3% en PAS). Esta revisión menciona la incertidumbre en definir cuál grupo de antibióticos se relaciona con menor posibilidad de cronificación y/o recaídas en la infección debido a la baja calidad de los estudios. La nefrotoxicidad también se describe como menor en los pacientes tratados con Cz. (Weis et al; 2019)

Otra revisión sistemática (Bidell, Patel & O'Donnell, 2018), aunque destaca que la diversidad y calidad de los estudios es muy amplia, menciona que la mortalidad a los 90 días, la persistencia de la bacteriemia y el fracaso terapéutico fueron menores en los tratados con Cz, así como fue menor el número de pacientes que debieron suspender el tratamiento por efectos adversos como toxicidad en comparación a los tratados con penicilinas PAS. Los porcentajes de mortalidad fueron de 18.1% en el grupo de Cz y de 25.1% en el grupo de PAS (porcentajes iguales que en la revisión de Weis et al). La persistencia en la bacteriemia fue de 4.8% en el grupo de Cz y de 5.5% en el grupo de penicilinas PAS, pero no como se observa, esta fue muy poco significativa. Tampoco hace afirmación que soporte que la recurrencia de la infección sea menor en uno u otro grupo. (Bidell, Patel & O'Donnell, 2018).

## 1.19 Efecto inóculo (EI) a Cefazolina

### 1.19.1 Generalidades

La importancia del fenómeno del EI fue descrita por primera vez en 1940 por diferentes investigadores. Fildes encontró un EI asociado con la actividad antimicrobiana del mercurio. (Fildes, 1940). Lowell y colaboradores, observaron que al aumentar el inóculo de *Streptococcus pneumoniae* y era traslado a un medio que contenía sulfapirina, esta cepa que inicialmente era susceptible, podía crecer libremente. Luria escribió el EI con penicilina frente a especies de *Staphylococcus*. (Luria, 1946). Kirby y Dubos demostraron el EI con penicilina frente a *Mycobacterium tuberculosis*. (Brook, 1989). El ha sido observado en varios modelos animales de infecciones de alta carga bacteriana como endocarditis y neumonía, además de haber sido estudiado en humanos con endocarditis. (Reymann, Hooley & Cobbs, 1978). Los microorganismos estudiados con mayor frecuencia productores de  $\beta$  - lactamasas, incluye a MSSA que utiliza  $\beta$  - lactamasas de tipo A o C; Gram negativos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*. Dada la diversidad de la producción de  $\beta$  - lactamasas producidas por los microorganismos Gram negativos, el tipo de  $\beta$  - lactamasa evaluada ha variado desde aquellas de relativo espectro reducido, como TEM o SHV a aquellas de espectro extendido o carbapenemasas. (Lenhard & Bulman, 2019)

### 1.19.2 Definición de EICz

Es el fenómeno de la atenuación en la actividad antibacteriana de un antibiótico cuando el inóculo utilizado en las pruebas de susceptibilidad está por encima del estandarizado. Se observa el aumento en la MIC de un antibiótico, cuando el número de microorganismos en el inóculo aumenta. (Brook, 1989; Reymman, Hooley & Coobs, 1978). Ocurre generalmente con los antibióticos  $\beta$  - lactámicos en relación a microorganismos productores de  $\beta$  - lactamasas. Este efecto se presenta con las cefalosporinas de primera y segunda generación frente a *S. aureus* y es menos frecuente con quinolonas, cefoxitin y aminoglicósidos. El efecto también sucede con antibióticos  $\beta$  - lactámicos en diferentes especies de *Enterobacterales* y *Pseudomonas*, siendo variable con las cefalosporinas y no se presenta con aminoglicósidos, quinolonas, imipenem y cloranfenicol. (Brook, 1989)

Los test de susceptibilidad antibiótica son parte integral de la valoración microbiológica y son útiles en la selección de la mejor terapia; están dirigidos a correlacionar la susceptibilidad *in vitro*, que se determina a través de la incorporación de antibióticos en un medio de cultivo, observando el efecto inhibitorio o el efecto letal a diferentes concentraciones del fármaco, con la concentración clínica alcanzada del antibiótico. Los test varían, pero la mayoría son llevados a cabo por métodos de dilución o a través de la medida de una zona de inhibición del crecimiento de un microorganismo alrededor de un disco de papel que contiene una concentración conocida del antibiótico. La cantidad de antibiótico que inhibirá el crecimiento visible de un microorganismo, es la concentración mínima inhibitoria o MIC. (Zapun, Contreras-Martel & Vernet, 2008). Esto se realiza a partir de un medio inicial de cultivo (Brook, 1989) y se utiliza un inóculo estándar en los test de dilución en caldo de  $5 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) y en una dilución en agar es de  $10^4$  UFC/mL. Tanto caldos como agares, son utilizados para determinar MIC (Brook, 1989). Los resultados *in vitro* de las pruebas, varían de un laboratorio a otro, dependiendo de la preparación del antibiótico, del tamaño del inóculo, de la duración, de la temperatura de incubación, de la definición de los puntos finales de inhibición, el medio de crecimiento, la concentración de cationes y el pH del medio, por lo que es deseable utilizar un método estándar en el que todas esas variables se encuentren controladas. A pesar de controlarse diferentes variables, como el pH del medio, esto no necesariamente refleja una situación clínica. Por ejemplo, para el caso de la gentamicina, los test de susceptibilidad a pH de 7.4 pueden indicar una considerable actividad, pero en un ambiente ácido de una infección purulenta, la actividad del fármaco puede disminuirse notoriamente. (Weinstein, 1980; Brook, 1989)

Algunas bacterias son reportadas como susceptibles cuando se utiliza un bajo inóculo (menores de  $10^4$  UFC/mL), pero luego pueden ser reportadas como marcadamente resistentes cuando el inóculo supera  $10^6$  UFC/mL. Inóculos mayores a  $10^7$  UFC/mL, hacen metodológicamente difícil determinar los puntos finales y la selección de la MIC se vuelve subjetiva. Este fenómeno, se ha estudiado sobre todo en *S. aureus*, en el que la destrucción del antibiótico por la presencia de las  $\beta$  - lactamasas es en gran parte, responsable del fenómeno. Sin embargo, también puede suceder específicamente con otros antibióticos debido a la emergencia de cepas mutantes o a la destrucción por otras enzimas diferentes a  $\beta$  - lactamasas. El significado terapéutico del EI es incierto. La relevancia clínica de los resultados de MIC obtenidos cuando los inóculos se encuentran entre  $10^4$  a  $5 \times 10^5$  UFC/mL

pueden ser cuestionados debido a que, en la mayoría de los sitios infectados, hay una cantidad de bacterias mucho mayor. (Brook, 1989). A pesar de la falta de claridad alrededor del EI en los  $\beta$  - lactámicos, parece probable que una combinación de varios mecanismos contribuyen *in vitro* e *in vivo* a que este se presente, siendo la producción de  $\beta$  - lactamasas la más prevalente.

### 1.19.3 Implicaciones del Efecto Inoculo

La determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* y la presencia de EI, puede aportar información acerca de la eficacia de los tratamientos antibióticos en infecciones que involucran un volumen grande de bacterias como sucede en los abscesos. Otros factores pueden influir en el resultado clínico, por ejemplo, la presencia de microorganismos resistentes, la insuficiente concentración del antibiótico en los tejidos infectados, interacciones con otros medicamentos o el desarrollo de un absceso. Los antibióticos también pueden ser incapaces de esterilizar un absceso si los microorganismos involucrados se encuentran en estado estacionario y no se multiplican. (Lenhard & Bulman, 2019). El ambiente de un absceso es desfavorable para muchos antibióticos, por ejemplo, la cápsula del mismo puede interferir con la penetración del antibiótico y el pH ácido, junto a la presencia de proteínas fijadoras o inactivadoras del medicamento como las  $\beta$ -lactamasas, pueden inutilizar al antibiótico. El ambiente ácido y anaerobio de un absceso es particularmente deletéreo para los aminoglicósidos. Un pH ácido, con alta osmolaridad en un ambiente anaerobio, puede desarrollarse en un sitio infectado, sin la presencia de un absceso como tal. Esto puede ocurrir en infecciones donde hay presencia de isquemia y necrosis como las úlceras infectadas en pie diabético; el efecto puede volverse un factor importante en el manejo de infecciones que involucran una alta densidad bacteriana y concentraciones elevadas de  $\beta$  - lactamasas así como de otras enzimas inactivadoras, llevando a una degradación más efectiva del antibiótico. (Brook, 1989; Lenhard & Bulman, 2019)

Con los resultados mencionados en las dos revisiones sistemáticas consultadas (Weis et al, 2019; Bidell, Patel & O'Donnell, 2018), sobre Cz y PAS para el tratamiento de las infecciones localizadas o sistémicas por MSSA, el uso de Cz parece recomendarse y superar al de las PAS, pero es probable que estas revisiones, no hubieran tenido en cuenta

estudios clínicos de fracaso terapéutico ante la existencia del efecto (una de ellas menciona de forma superficial la existencia del EICz, Weis et al, 2019), y si no fueron tenidos en cuenta, las conclusiones de las mismas, no serían confiables. Ante la duda de la recomendación del tratamiento con Cz vs PAS para infecciones con probabilidad de cronificación como las osteomielitis por MSSA (que son de alto inóculo bacteriano) y si se suma la posibilidad de EICz, la utilidad de la cefazolina como primera línea de tratamiento, podría ponerse en entredicho pues dejaría de ser una opción de tratamiento adecuado, que llevaría a inicio tardío de otros medicamentos más adecuados, siendo esta demora uno de los principales factores de riesgo asociados a la cronificación de la enfermedad. (Urish & Cassat; 2020)

## 1.20 Estado del arte

Miller y colaboradores realizaron un estudio prospectivo en el que se incluyeron a 77 pacientes adultos admitidos en tres hospitales argentinos, de los que se obtuvieron 89 aislamientos de MSSA en hemocultivos. En estos, se determinó la MIC utilizando el inóculo estándar ( $10^5$  UFC/mL) y el alto inóculo ( $10^7$  UFC/mL) (Miller et al, 2018). Se definió EI como el incremento a una MIC  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$  cuando fue probado con el alto inóculo. En 42 pacientes, los aislamientos tuvieron presencia de EI y a través de análisis univariado, se encontró que estos pacientes tenían aumento en la mortalidad a los 30 días, siendo más probable cuando la infección del torrente circulatorio estaba asociada al uso de catéter venoso central y en casos de origen de bacteriemia de origen desconocido. En estos pacientes se utilizó la dosis máxima permitida de cefazolina para casos de infecciones graves (2 g endovenosos cada seis horas), ajustando la dosis a la tasa de filtración glomerular. La confirmación de MIC fue determinada de manera triplicada y leída por tres observadores diferentes. Se utilizaron cepas controles: *S. aureus* TX0117 (cepa con efecto inóculo positivo productora de  $\beta$  - lactamasa tipo A), *S. aureus* ATCC 29213, (cepa sin efecto inóculo positivo productora de  $\beta$  - lactamasa tipo A) y *S. aureus* ATCC 25923 (cepa *blaZ* negativo). Las bibliotecas de DNA genómico, fueron preparadas utilizando el kit NexteraXT (Illumina)<sup>TM</sup> y la secuenciación del genoma completo se realizó con lecturas de 250 pares de bases utilizando el secuenciador Illumina MiSeq.<sup>TM</sup> La tipificación de la proteína BlaZ fue llevada a cabo identificando los aminoácidos localizados en las posiciones 128 a 216. Aquellos pacientes infectados con cepas que mostraron presencia del efecto, tuvieron una significativa mortalidad mayor a los 30 días, comparados con aquellos cuyas

cepas no presentaban la presencia del efecto (39.5% vs 15.2%, con  $P = 0.034$ ). Otras variables como edad, creatinina que fueron incluidas en el análisis multivariado, no influyeron en la mortalidad a 30 días. Treinta y seis de los aislamientos con presencia del efecto, mostraron que portaban a la  $\beta$  - lactamasa tipo A, seguidos de 8 con la  $\beta$  - lactamasa tipo C, en tercer lugar, tres aislamientos con la  $\beta$  - lactamasa tipo B y finalmente un aislamiento con la  $\beta$ -lactamasa tipo D (este último no se había reportado en estudios previos). (Miller et al., 2018)

Nannini et al, en el año 2009 publicaron un estudio cuyo objetivo era determinar la frecuencia de CzEI como una medida de producción de alto nivel de las  $\beta$  - lactamasas presentes en los aislamientos de MSSA estudiados. Para esto tomaron 98 cepas de MSSA aisladas de pacientes argentinos con diferentes infecciones graves como hemocultivos en pacientes en hemodiálisis, infecciones de piel y tejidos blandos, neumonía adquirida en el hospital y endocarditis. La MIC para Cz fue determinada por el método de microdilución en caldo, utilizando caldo Müller - Hinton II, según las recomendaciones de la CLSI. Para bajo inóculo se utilizó una concentración de  $5 \times 10^4$  UFC/mL, inóculo estándar  $5 \times 10^5$  UFC/mL, intermedio de  $5 \times 10^6$  UFC/mL y alto inóculo  $5 \times 10^7$  UFC/mL. De igual manera, como en el estudio de Miller y colaboradores, se definió EI como el incremento de  $MIC \geq 16 \mu\text{g/mL}$  cuando fue probado con el alto inóculo. A todas las muestras se les realizó extracción de ADN a las que les fue realizada PCR utilizando “primers” o cebadores diseñados a amplificar la región de 355 pares de bases (pb) dentro de la estructura del operón *blaZ*. La comparación de cada tipo de  $\beta$  - lactamasa producida fue determinada por los aminoácidos presentes en la posición 128 y 216 codificada por el operón *blaZ*; para la  $\beta$  - lactamasa tipo A, se encuentra treonina en la posición 128 y serina en la posición 216; para la  $\beta$  - lactamasa tipo B, se encuentra lisina en la posición 128 y asparagina en la posición 216; para la  $\beta$  - lactamasa tipo C, se encuentra treonina en la posición 128 y asparagina en la posición 216 y para la  $\beta$  - lactamasa tipo D, se encuentra alanina en la posición 128 y serina en la posición 216. El análisis de la secuencia de la región de 355 pb que contiene los residuos 128 y 216 dentro del operón *blaZ*, en los 98 aislamientos, mostró que el 25.5% tenían la  $\beta$  - lactamasa tipo A, 15.3% la  $\beta$  - lactamasa tipo B, 45.9% la  $\beta$  - lactamasa tipo C. Ninguno tenía la  $\beta$  - lactamasa tipo D y 13.2% no tenían el operón *blaZ*. Diecinueve de los 98 aislamientos presentaron el efecto a Cz, dos de ellos mostrando crecimiento con concentración de  $64 \geq$

$\mu\text{g/mL}$ . El análisis de secuenciación de estos 19 aislamientos (3 con bacteriemia, 2 con endocarditis, 8 con neumonía adquirida en el hospital y 6 con infecciones profundas de piel y tejidos blandos), mostró que 9 tenían  $\beta$  - lactamasa tipo A y 10  $\beta$  - lactamasa tipo C. Nueve de los 25 aislamientos con  $\beta$  - lactamasa tipo A y 10 de los 45 aislamientos con  $\beta$  - lactamasa tipo C, mostraron la presencia del efecto, hecho que resalta que no solo es el tipo de  $\beta$  - lactamasa lo que determina la presencia del efecto inóculo a cefazolina, sino también la cantidad de  $\beta$  - lactamasa producida. Ninguna de las cepas productoras de  $\beta$  - lactamasa tipo B mostró el efecto. (Nannini et al., 2009)

Wang et al, investigaron la prevalencia local del EICz y la asociación con las  $\beta$  - lactamasas en MSSA, producidas por el operón *blaZ* en una zona de Chicago. Cuatro centros médicos de la ciudad contribuyeron con los aislamientos. La MIC para Cz fue determinada a las 24 horas por el método de microdilución en caldo utilizando un inóculo estándar de  $5 \times 10^5$  UFC/mL y otro de alto inóculo de  $5 \times 10^7$  UFC/mL, definiendo alto inóculo como el aumento mayor o igual a 4 veces de MIC entre el inóculo estándar y el alto inóculo o una MIC para cefazolina  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$  cuando se utilizó el alto inóculo. Fueron incluidos 269 aislamientos de MSSA. Todos con excepción de uno solo, fueron susceptibles a la Cz con inóculos estándar, y el 97% seguían siendo susceptibles frente al alto inóculo. El 73% de los aislamientos (196 muestras) fueron positivas para el operón *blaZ*, siendo la  $\beta$  - lactamasa tipo C la más codificada (40%), seguido del tipo A (23%), tipo B (9%) y en último lugar el tipo D (1%). Se observó el efecto en 45 aislamientos positivos (23%) para el operón *blaZ*; de ellos 25 tenían la  $\beta$  - lactamasa tipo C, luego la  $\beta$  - lactamasa tipo A con 17 aislamientos y 2 con la  $\beta$  - lactamasa tipo B. El estudio revela que la prevalencia de EI es baja en la zona metropolitana de Chicago, aunque las conclusiones no pueden ser generalizadas, pues plantean la posibilidad de cambios clonales que circulan de acuerdo a la estacionalidad propia de la región. No fue incluido en el estudio, el estado clínico ni las enfermedades de base de los pacientes, lo que hace difícil medir el impacto clínico del estudio ya que no fue objetivo del estudio. (Wang et al., 2018).

Chong et al, realizaron un estudio prospectivo en Corea del Sur, a partir de 220 muestras de hemocultivos positivos para MSSA entre agosto de 2008 y Julio de 2011 en un centro médico de tercer nivel de atención en la ciudad de Seúl y su objetivo era evaluar la influencia del EICz en estos aislamientos, definiéndolo como el aumento de 4 veces más en la MIC

entre el inóculo estándar y el alto inóculo, resultando en una cepa no susceptible. Fueron secuenciadas todas las cepas en búsqueda del operón *blaZ* y este fue encontrado en 92 de los 220 aislamientos. La  $\beta$  - lactamasa tipo C fue la más común (53%), seguida de la  $\beta$  - lactamasa tipo B (20%) y por último la  $\beta$  - lactamasa tipo A (17%). El efecto se observó en 13% de los aislamientos con el operón *blaZ*, siendo más pronunciado en aquellos que tenían la  $\beta$  - lactamasa tipo A. Setenta y siete pacientes de los 220 del estudio, recibieron Cz como terapia antibiótica definitiva. Solo en 10 se documentó que la bacteriemia era causada por cepas que mostraban EICz, pero falla terapéutica como la mortalidad a los 12 y 30 días no fue estadísticamente significativa al compararla con los casos de pacientes que tenían bacteriemias por cepas que no tenían el efecto a Cz. (Chong et al., 2015)

El estudio de McNeil et al, en el que se estudió la presencia de EICz en aislamientos de MSSA en pacientes pediátricos con infecciones osteoarticulares, es un claro ejemplo del impacto que puede tener este fenómeno en una patología de consulta frecuente y grave, considerando que para su tratamiento, se necesitan prolongados esquemas antibióticos (actualmente se sugieren cuatro a seis semanas de tratamiento), cirugías y lavados quirúrgicos frecuentes, (con los riesgos anestésicos y los inherentes a la cirugía en sí misma como sangrado, re - intervención e infección adicional del sitio operatorio) y que puede haber complicaciones adicionales como infecciones a distancia (por ejemplo embolismos sépticos, endocarditis, entre otros), necesidad de transfusiones, ventilación mecánica y estancias en unidades de cuidado intensivo entre otras, y para las que a pesar de todo lo realizado y de haber logrado el control de la infección tanto clínica como microbiológicamente, muchos pacientes recaen en la infección o ésta se vuelve crónica. En el estudio, se obtuvieron hemocultivos positivos para MSSA, a partir de focos osteoarticulares (artritis séptica, osteomielitis y abscesos subperiósticos) de pacientes pediátricos (rango de edad 5.4 a 12.2 años), de dos hospitales de Texas, entre junio de 2011 y diciembre de 2018. Definiendo EICz como el valor de MIC  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$  utilizando inóculos de  $10^7$  UFC/mL, fueron estudiados 250 casos, en los que el 14.4% presentaron el efecto (36 aislamientos); a estos les fue caracterizado el gen regulador accesorio *agr*. La mayoría de los aislamientos con el efecto, (25 de 36), presentaban también resistencia a clindamicina, estaban asociados a *agrIII* y en este grupo de pacientes, se encontraron más casos de osteomielitis crónica, necesitaron más lavados quirúrgicos y presentaron mayor dificultad en el control de la fuente de infección. Se hizo secuenciación genómica en los 36

aislamientos con el EICz para determinar el ST y los tipos de  $\beta$  - lactamasa. La mayoría de los aislamientos pertenecían al ST30 (19 de 36), seguido de ST8 (5 de 36). Entre el ST30, 15 de los 19 aislamientos, tenían el gen regulador accesorio *agrIII*. Veintisiete de los 36 aislamientos (75%), tenían la  $\beta$  - lactamasa tipo A, seguida de la  $\beta$  - lactamasa tipo C (8 de 36, 22.2%) y la  $\beta$  - lactamasa tipo B se encontró en un solo aislamiento (2.7%). No se encontró el tipo D. En los ST30, la  $\beta$  - lactamasa tipo A fue la más frecuente (18 de 19) mientras que todos los ST8, tenían la  $\beta$  - lactamasa tipo C. En el estudio se destaca la presencia de resistencia a clindamicina en los aislamientos con presencia del efecto inóculo. Los autores del estudio, alertan sobre la necesidad de un seguimiento estricto a los pacientes que reciben terapia empírica con cefazolina por los riesgos anotados, aunque apoyan su uso empírico debido a que es más segura que las penicilinas anti - estafilocócicas, de más fácil administración, pues requiere menos dosis diarias y además permite el cambio casi siempre a cefalexina, cefalosporina de primera generación oral mejor tolerada que la dicloxacilina, que produce más irritación gástrica, requiere administrarse con estómago vacío y necesita administrarse más veces al día, lo que lleva a que los cuidadores o padres de los pacientes, no continúen el tratamiento o los niños lo rechacen, facilitando las recaídas o que el tratamiento quede incompleto. (McNeil et al., 2020)

En 2013, Rincón et al, documentaron una prevalencia de EICz de 36% (en 131 de 364), en aislamientos de MSSA en hemocultivos tomados de pacientes de diferentes hospitales de Suramérica, incluyendo hospitales colombianos. (Rincón et al., 2013).

En 2012, Livorsi et al, encontraron una prevalencia de 27% (50 de 185) en aislamientos de hemocultivos tomados durante un año en diferentes hospitales afiliados a la Universidad de Emory (Atlanta, Estados Unidos), siendo la  $\beta$  - lactamasa tipo A la más aislada en cepas con presencia del EICz, en 33 de las 50 cepas (66%). (Livorsi et al., 2012)

La clasificación por alotipos BlaZ de las  $\beta$  - lactamasas de MSSA con y sin presencia de EICz fue publicado por Carvajal y colaboradores; se estudiaron 690 aislamientos en sangre, tomados en pacientes de varios países de Latinoamérica (Argentina, Colombia, Ecuador, Chile, Perú, Brasil, Guatemala, México y Venezuela). En todos se determinó la MIC para cefazolina utilizando inóculos estándar ( $10^5$  UFC/mL) y como altos inóculos ( $10^7$  UFC/mL). Todos fueron susceptibles a cefazolina utilizando inóculos estándar, pero frente al alto inóculo, el 48% de los aislamientos mostraron EICz, siendo las cepas colombianas y argentinas, las que de forma individual tuvieron los porcentajes más altos de resistencia.

Los aislamientos de Brasil y Chile fueron los que menos frecuencia presentaron. A los 690 aislamientos se les realizó la secuenciación genómica del operón *blaZ*; en 49 de estos, las secuencias estaban incompletas o presentaron codones prematuros de parada o exhibían lecturas heterogéneas que sugerían poblaciones diversas, por tanto, no fueron tenidos en cuenta, quedando 641 aislamientos. De estos, 517 (81%) portaban el operón *blaZ*, de los que 172 tenían la  $\beta$  - lactamasa tipo A (33%), 149 tenían la  $\beta$  - lactamasa tipo B (29%), 190 la  $\beta$  - lactamasa tipo C (37%) y 5 la  $\beta$  - lactamasa tipo D (1%). (Carvajal et al. 2020). El EICz se observó de acuerdo al tipo de  $\beta$  - lactamasa de la siguiente manera: 134 de los 172 (78%) con  $\beta$  - lactamasa tipo A, 15 de los 149 (10%) con  $\beta$  - lactamasa tipo B, 100 de los 190 (53%) de la  $\beta$  - lactamasa tipo C y 4 de los 5 (80%) de la  $\beta$  - lactamasa tipo D; por tanto, 253 de las 517 (48%), muestras tenían EICz (48%), considerándose como un fenómeno de alta prevalencia. (Carvajal et al. 2020).

El estudio también agrupó a los aislamientos en complejos clonales, siendo CC30 el que contenía a 89 de los 253 aislamientos (35%) con presencia de EICz. La secuencia de aminoácidos de las enzimas BlaZ ( $\beta$  - lactamasas), permitió encontrar 43 sustituciones diferentes, entre los aislamientos con presencia del EICz como aquellos en los que no lo tenían, permitiendo la clasificación en 29 alotipos. Los más frecuentes fueron BlaZ – 1 y BlaZ – 2. BlaZ – 1, de la  $\beta$  - lactamasa tipo C y BlaZ – 2, de la  $\beta$  - lactamasa tipo A, mostraron aproximadamente una correlación de 50% y 96% con la presencia del EICz respectivamente. De los dos alotipos, BlaZ – 2, fue el que más asociación tuvo. Los alotipos BlaZ – 3 y BlaZ – 5, ambos con  $\beta$  - lactamasa tipo B, se asociaron a la ausencia del EICz. Se encontraron tres sustituciones de aminoácidos que mostraron asociación estadísticamente significativa con la presencia del EICz. Las sustituciones fueron A9V, E112A y G145E. Estas sustituciones no se encontraron en el sitio activo de la enzima y no es claro el efecto de estos cambios en la cinética enzimática. A9V se encontró en el péptido señal de 216 genomas, E112A se encontró en 115 genomas y G145E fue identificada en 237 aislamientos con el EICz. Ninguna de estas sustituciones fue encontrada en el sitio activo de la enzima. La presencia de una lisina en la posición 119 de la enzima BlaZ, se relacionaba con la ausencia del EICz. (Carvajal et al., 2020).

## 1.21 Justificación

Actualmente la mortalidad por infecciones graves, con focos profundos o a distancia, debidas a *S. aureus* se encuentra entre el 20 a 30%. (Jung & Rieg, 2018). Toda bacteriemia por este microorganismo debe considerarse significativa y debe recibir tratamiento adecuado y oportuno; solo en 2% de los hemocultivos positivos para *S. aureus* se consideran contaminación; la persistencia de la fiebre y la bacteriemia son variables relevantes para el seguimiento, la duración del tratamiento y el pronóstico; es importante identificar y erradicar puertas de entrada de la infección, así como focos profundos o a distancia; los tratamientos para las infecciones no complicadas del torrente circulatorio no pueden ser inferiores a dos semanas y para el caso de infecciones complicadas, el tratamiento puede alcanzar las seis semanas de tratamiento. (Jung & Rieg, 2018; Wong et al., 2016). La discusión sobre la mejor terapia para las infecciones profundas o graves por MSSA, inició en la década del 70 del siglo pasado, cuando se comparó a la Cz con la meticilina y a la nafcilina, encontrando que la nafcilina era más resistente a la hidrólisis por las  $\beta$  - lactamasas y que carecía de un EI. Luego de esto, las fallas en el tratamiento con Cz en pacientes con endocarditis por MSSA, fueron asociadas a cepas que producían  $\beta$  - lactamasas que degradaban con facilidad al antibiótico; estas cepas mostraron la presencia de EI. En casos no complicados, el tratamiento con Cz puede ser equivalente a las penicilinas anti – estafilocócicas. (Song et al., 2019; Rindone & Mellen, 2018)

La Cz es uno de los antibióticos más utilizados como primera línea en el tratamiento de las infecciones profundas o invasivas, causadas por MSSA ya que en ocasiones, las penicilinas anti – estafilocócicas, no se encuentran disponibles y el tratamiento con antibióticos como los glicopéptidos (vancomicina o teicoplanina), se ha asociado a aumento en la mortalidad. La vancomicina es inferior a las penicilinas anti – estafilocócicas y a la Cz para el tratamiento definitivo de las infecciones graves incluyendo bacteriemia por MSSA; su uso para este microorganismo, se asocia a aumento en la tasa de infección, reinfección, falla bacteriológica y mortalidad. (Miller et al., 2018). Además, ofrece algunas ventajas sobre las penicilinas anti – estafilocócicas: se administra menos veces al día, requiere menos volumen para rápida dilución para infusión endovenosa, es más fácil su cambio a un tratamiento parecido por vía oral, tiene muy pocas interacciones con otros medicamentos, puede diluirse en agua y tiene menos probabilidad de producir reacciones graves en pacientes con antecedente de alergia a  $\beta$  - lactámicos. Su costo es similar al de las

---

penicilinas anti – estafilocóccicas, aunque es un poco menos estable al medio ambiente (24 horas a temperatura ambiente, en comparación a 96 horas para las penicilinas anti – estafilocóccicas). (Creech et al., 2016)

Como se mencionó en apartes anteriores, existen muchas publicaciones en las que habiendo utilizado cefazolina para el tratamiento de infecciones severas y de alto inóculo por MSSA, se documentó falla terapéutica que estaba relacionada con el tipo específico de operón *blaZ* de los aislamientos que presentaron el fenómeno. La cefazolina es uno de los antibióticos de mayor uso en los hospitales colombianos para el tratamiento de infecciones por MSSA; por lo tanto, es necesario realizar estudios que permitan conocer la frecuencia del fenómeno en cepas colombianas, y describir las asociaciones genéticas encontradas en estas: tipo de  $\beta$  - lactamasa, alotipos, complejos clonales, genes de virulencia y resistencia, pues conociendo este efecto, se puede determinar la utilidad de la cefazolina como terapia antimicrobiana empírica y definitiva en infecciones graves por este microorganismo.

## 1.22 Pregunta de investigación

¿Cuáles son las características genómicas de los MSSA aislados en hemocultivos de pacientes colombianos en los años 2011 a 2013 que presentan EICz?

## 1.23 Hipótesis

Las  $\beta$  - lactamasas tipo A tipo C son responsables del EICz en MSSA con mayor frecuencia en Colombia.

## **2 Capítulo 2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo general**

Establecer las características genómicas de cepas de MSSA con EICz provenientes de pacientes con bacteriemia en Colombia.

### **2.2 Objetivos específicos**

- 1. Establecer la prevalencia de EICz en cepas de MSSA provenientes de pacientes con bacteriemia en Colombia entre 2011 a 2013.**
- 2. Identificar cambios genéticos específicos asociados al efecto inóculo en el operón *blaZ* que pudieran relacionarse con este fenotipo.**
- 3. Identificar el resistoma y el viruloma de cepas de MSSA provenientes de pacientes con bacteriemia en Colombia.**



## **3 Capítulo 3. Metodología**

### **3.1 Aislamientos bacterianos**

Se evaluaron ciento ochenta y seis (186) cepas de MSSA, recuperadas de hemocultivos de pacientes colombianos de tres hospitales entre el año 2011 y 2013. Los aislamientos se encuentran en el cepario de la Unidad de Genética y Resistencia Antimicrobiana (UGRA) de la Universidad el Bosque, en la ciudad de Bogotá D.C., a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Estos aislamientos fueron descongelados utilizando un asa metálica esterilizada a la llama, para tomar una pequeña cantidad del producto, para ser sembrados por agotamiento en cajas de agar BHI, que luego se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Se confirmó su género y especie, junto con la presencia del gen *mecA* por PCR convencional (Martineau et al, 2000).

### **3.2 Evaluación de efecto inóculo a cefazolina por microdilución en caldo**

#### **3.2.1 Preparación del inóculo bacteriano**

Se tomaron tres colonias de cada cepa, que fueron diluidas en 10 cc de caldo BHI. Estos caldos fueron servidos en tubos Falcon de 15 centímetros cúbicos. Una vez realizada la dilución de todas las cepas, los tubos se dejaron parcialmente tapados para permitir la entrada de oxígeno a temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  en un agitador o “shaker” por 24 horas. Al obtener el cultivo correspondiente durante toda la noche (overnight) que corresponde a  $5 \times 10^8$  UFC/mL y para el inóculo estándar de  $5 \times 10^5$  UFC/mL, se realizó una dilución 1/100 y posteriormente se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de este cultivo en las placas con antibiótico. Para el alto inóculo se colocan 5  $\mu\text{L}$  en la placa a partir del overnight para obtener la concentración de alto inóculo ( $5 \times 10^7$  UFC/mL).

### 3.2.2 Preparación de las placas con antibiótico

Se utilizó Cz (Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA), con concentración de 10.000 µg/mL y a partir de la misma, se realizaron operaciones aritméticas para determinar la cantidad de antibiótico necesario para preparar las diluciones seriadas en un rango de 0.06 a 64 µg/mL, seleccionadas teniendo en cuenta los puntos de corte sensible y el rango de las cepas de referencia ATCC. Se marcaron todas las placas a utilizar (en cada placa máximo se evaluaron siete muestras) con el número de placa, el nombre del antibiótico, la concentración máxima que se preparó para el antibiótico y la fecha del día de preparación. Posteriormente, se disponen todos los tubos cónicos necesarios para la preparación de las diluciones con el siguiente razonamiento: se define la concentración necesaria para el primer tubo de la serie de diluciones, mediante el cálculo de la concentración de antibiótico necesaria, si se debe añadir 95 µL de dicha concentración y si el volumen final serán 100 µL. Se utilizó la siguiente fórmula matemática:

$$V_i * C_i = V_f * C_f$$

Con los siguientes datos y ejemplo:

$$V_i = 95 \mu\text{L}$$

$C_i$  = desconocido

$$V_f = 100 \mu\text{L}$$

$C_f$  = concentración del antibiótico necesaria para obtener la concentración más alta, donde  $V_i$  es un valor desconocido,  $C_i$  es 95 µL,  $C_f$  es 64 µg/mL (que es la concentración deseada) y  $V_f$  es 100 µL; el resultado de esta ecuación es:  $V_i = 67,36 \mu\text{g/mL}$ . Una vez realizado estos cálculos, se realizó posteriormente las 11 diluciones en base 2 en tubos falcón estériles con caldo Mueller Hinton II (ajustado con cationes) y un control de crecimiento con Mueller Hinton libre de antibiótico, con ayuda de un reservorio estéril y de una pipeta multicanal, se adicionaron 95 µL de cada concentración de antibiótico a cada columna de la microplaca. Una vez servido el antibiótico, de cada tubo de caldo BHI con microorganismo, se sirvieron en sentido horizontal, 5 µl de cada cepa. En el control de calidad de cada placa, tres de las filas se utilizaron para evaluar cepas control. Estas cepas son las siguientes: i) TX0117: cepa con fenotipo de alto inóculo conocido, productora de β - lactamasa tipo A cuya MIC es >64 µg/mL; ii) ATCC29213: cepa con baja producción de β - lactamasa tipo A con una MIC

de 2 a 4  $\mu\text{g/mL}$  y iii) ATCC25923: Cepa negativa, no productora de  $\beta$  - lactamasa con una MIC de 0.25 a 0.5  $\mu\text{g/mL}$ . Las placas se dejaron en incubación por 24 horas para lectura por tres diferentes observadores.

La lectura consistió en determinar la MIC observando el crecimiento en todos y cada uno de los pozos, tomando como MIC aquel pozo donde hubiera cambio importante en el tamaño del “botón” de crecimiento bacteriano y la turbidez obtenida en los mismos, y que fuera constante en los siguientes pozos. Se consideró presencia de EICz cuando la MIC es  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ . A todas las cepas se les determinó por triplicado la concentración mínima inhibitoria estándar y alto inóculo para Cz. A las cepas consideradas con presencia del EICz se les realizó la extracción de ácidos nucleicos, preparación de librerías y secuenciación genómica.

### **3.3 Secuenciación de Genoma Completo - WGS**

#### **3.3.1 Extracción de ácidos nucleicos, preparación de librerías y secuenciación genómica**

La extracción de ADN genómico de las cepas de MSSA se realizó empleando el estuche comercial DNeasy Blood & Tissue Kit, Quiagen, de acuerdo a indicaciones del fabricante incluyendo un pre - tratamiento de las células bacterianas. Las bacterias se recuperaron en agar BHI y el ADN se aisló a partir de un cultivo (5 mL de caldo BHI) incubado por 18 horas que fue tratado con 0.2 mg/mL de lisostafina por una hora a 37°C. Posteriormente, se siguió el protocolo recomendado por el fabricante. La cuantificación del ADN genómico se realizó por fluorometría empleando el Fluorometro Qubit 2.0. Las librerías genómicas fueron preparadas empleando el estuche comercial Nextera XT (illumina), de acuerdo a indicaciones del fabricante. La verificación de las librerías genómicas se realizó por fluorometría con el equipo Qubit 2.0 y empleando el sistema de Agilent 2100 Bioanalyzer para su posterior normalización. La secuenciación se realizó en plataforma illumina en el equipo MiSeq, empleando la química V3 (illumina) con el fin de obtener secuencias pareadas de 250 nucleótidos.

### 3.3.2 Ensamblaje y caracterización genómica

Las lecturas de secuenciación fueron procesadas para eliminar contaminación proveniente de la preparación de librerías y descartar lecturas de baja calidad mediante Trimmomatic (Bolger, Lohse & Usadel, 2014). Posteriormente se ensamblaron *de novo* con SPAdes (Bankevich et al., 2012) y fueron anotadas con RAST (Ovebeek et al., 2014)

Cada genoma fue caracterizado para identificar la presencia de elementos genéticos asociados a resistencia y virulencia. Las búsquedas se realizaron con el programa BLASTX (Camacho et al., 2009), contra las bases de datos ResFinder (Voladri & Kernodle, 1998) y VFDB (Zankari et al., 2012), y se seleccionaran aquellos hits que presenten más del 95% de identidad y una cobertura de más del 80% con la secuencia de referencia.

La secuenciación de un fragmento de *blaZ* (de 355 pares de bases dentro del gen *blaZ* para identificar supuestas diferencias de los aminoácidos en los residuos 128 – 216, se realizó a partir de un alineamiento múltiple de las secuencias de esta proteína con MUSCLE. (Edgar, 2004).

La detección de genes de resistencia se llevó a cabo en todas las cepas con y sin presencia del EICz, siguiendo la metodología descrita en el estudio de Martineau, que tuvo como objetivo desarrollar una PCR múltiple para la detección de genes relevantes de resistencia en cepas de *S. aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, para comparar los resultados de esta PCR con los métodos microbiológicos estandarizados previamente de susceptibilidad e identificación. En el estudio, se utilizaron 206 cepas de *S. aureus* y 188 de *S. epidermidis*. Los genes de resistencia antibiótica de interés fueron: *mecA*, *aac(6') – aph(2'')*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA* y *blaZ*. (Martineau et al, 2000).

Los genes de mantenimiento o “housekeeping genes” son genes requeridos para el mantenimiento basal o mínimo de las funciones celulares y que son esenciales para la existencia de una célula, independiente de su función específica en el tejido u organismo. Por tanto, se espera que se expresen en todas las células de un organismo en condiciones normales, sin importar el tipo de tejido, etapa del desarrollo, estado de ciclo celular o señal externa (Eisenberg & Levanon, 2013). La caracterización de estos genes de mantenimiento se realiza gracias a la tipificación de secuencias multilocus o MLST (por sus siglas en inglés), que es un procedimiento inequívoco para caracterizar los aislamientos de especies bacterianas utilizando las secuencias de fragmentos internos de generalmente siete genes. Se utilizan fragmentos internos de cada gen, ya que estos se pueden secuenciar con

---

precisión en ambas cadenas utilizando un secuenciador de ADN automatizado. Para cada gen de mantenimiento, las diferentes secuencias presentes dentro de una especie bacteriana se asignan como alelos distintos y para aislado, los alelos en cada uno de los siete loci, definen un perfil alélico o el tipo de secuencia (ST). (Maiden, 2006).

En un complejo clonal (CC), se agrupan diferentes ST parecidos genéticamente, que comparten al menos cinco de los siete genes de mantenimiento. Estas poblaciones no están influidas por intercambios genéticos horizontales, es decir, por la transferencia de material genético entre bacterias que no necesariamente comparten una célula madre común, mediante procesos de transformación, transducción o conjugación. (Gupta & Maiden, 2001).

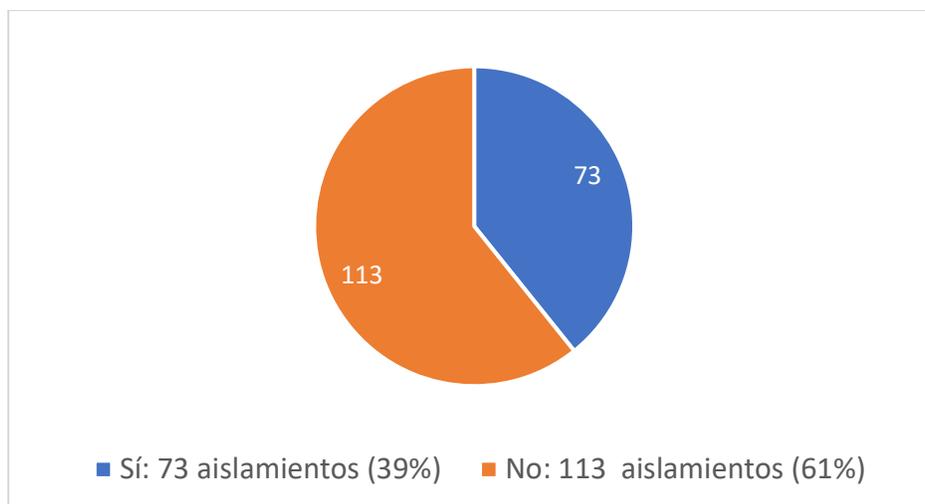


## 4 Capítulo 4. Resultados

### 4.1 Resultados generales

Se evaluaron ciento ochenta y seis (186) cepas de MSSA, recuperadas en hemocultivos de pacientes colombianos de tres hospitales entre el año 2011 y 2013. De las 186 cepas, 42 fueron obtenidas de hemocultivos tomados de pacientes provenientes de un hospital de la ciudad de Pereira, Departamento de Risaralda, y el resto (144 cepas), se obtuvieron de hemocultivos de dos instituciones ubicadas en Bogotá, Distrito Capital. En 15 de las 42 cepas de pacientes de la ciudad de Pereira, se encontró la presencia de EICz (36%) y en las 27 restantes no se encontró este efecto (64%); en 58 de las 144 de las cepas de Bogotá se encontró presencia del EICz (40%).

Por lo tanto, de las 186 cepas estudiadas, 73 (39%) tenían presencia del EICz y 113 (61%) no lo tenían (Gráfica 4).



**Gráfica 4.** Números absolutos y porcentajes de presencia y ausencia del EICz en las 186 cepas de MSSA estudiadas

## 4.2 Características de las cepas de MSSA con presencia del EICz

Se estudiaron 73 (39%) cepas con presencia del EICz y a continuación se presentan los resultados en detalle.

### 4.2.1 MSSA y Tipo de $\beta$ - lactamasa asociado al EICz.

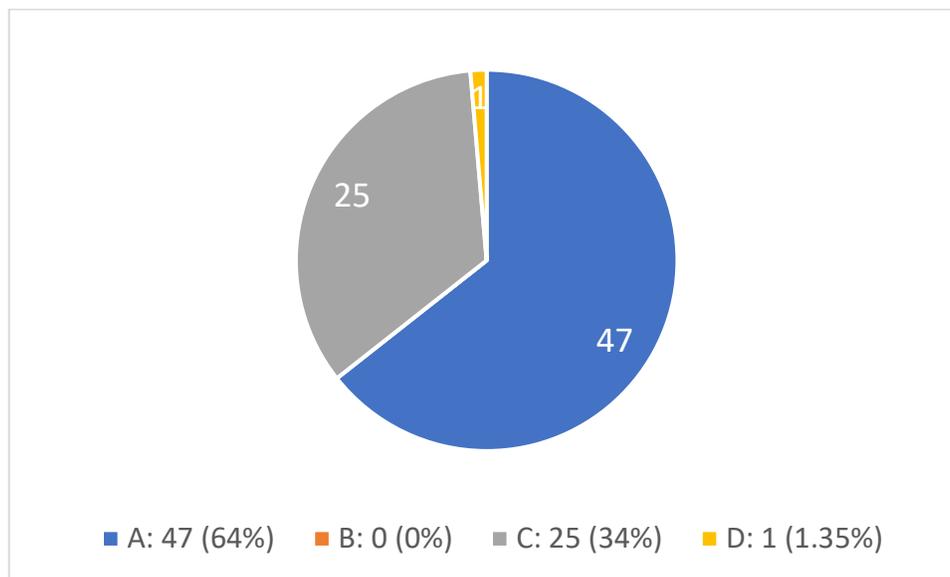
En las setenta y tres (73) cepas estudiadas con presencia del EICz, la  $\beta$  - lactamasa tipo A fue la más frecuente, seguida del tipo C, luego el tipo D y por último la B, enzima de la que no hubo aislamientos. A continuación, se presenta el número de cepas y su porcentaje (Grafica 5).

$\beta$  - lactamasa tipo A: 47 aislamientos (64%)

$\beta$  - lactamasa tipo B: 0 aislamientos (0%)

$\beta$  - lactamasa tipo C: 25 aislamientos (34%)

$\beta$  - lactamasa tipo D: 1 aislamiento (1.35%)



**Gráfica 5.** Tipo de  $\beta$  - lactamasa, número absoluto y porcentaje en las cepas con EICz

### 4.2.2 Complejos clonales (CC) según tipo de $\beta$ - lactamasa y número de cepas de MSSA con EICz

De acuerdo a la epidemiología molecular, que en la actualidad es una de las características más importantes en aislamientos de *S. aureus*, se muestra en la Tabla 1 cuales de los complejos clonales según el tipo de  $\beta$  - lactamasa se presentaron y con qué frecuencia en las cepas de MSSA con EICz.

$\beta$ - lactamasa (n)	Complejo clonal (CC): n (%)
<b>A</b> (47)	CC30: 37 (79%) CC45: 3 (6%) CC8: 3 (6%) No definido: 4 (9%)
<b>C</b> (25)	CC1: 5 (20%) CC15: 3 (12%) CC5: 6 (24%) CC8: 9 (36%) No definido: 2 (8%)
<b>D</b> (1)	CC8: 1 (100%)

**Tabla 1.** Complejos clonales (CC) según tipo de  $\beta$  - lactamasa y número de cepas MSSA con presencia de EICz.

El complejo clonal con mayor número de aislamientos fue el CC30, que se encontró dentro de los que poseían la  $\beta$  - lactamasa tipo A. El CC8 se encontró en los tres grupos de  $\beta$  - lactamasa con EICz, siendo más frecuente en los aislamientos con  $\beta$  - lactamasa tipo C (9 de 25, es decir en 36%), y en el único aislamiento con  $\beta$  - lactamasa tipo D.

### 4.2.3 Presencia de Alotipos BlaZ en cepas MSSA con EICz según el complejo clonal.

El alotipo más frecuente encontrado y asociado con el efecto en los complejos clonales que tenían la  $\beta$  - lactamasa tipo A fue el BlaZ - 2 (37 de 47, es decir 79%) y en menor número el BlaZ - 4 (5 de 37, es decir 14%). El alotipo BlaZ - 2 solo se encontró en los complejos clonales con  $\beta$  - lactamasa tipo A. Para los que tenían la  $\beta$  - lactamasa tipo C, el alotipo más frecuente fue el alotipo BlaZ -1, que se encontró en 4 de los 5 complejos clonales (23 de

25, es decir 92%), seguido del alotipo BlaZ – 13, que no fue encontrado en otros complejos clonales. El alotipo BlaZ – 1 sólo se encontró en complejos clonales con  $\beta$  - lactamasa tipo C. El alotipo encontrado en el aislamiento de la  $\beta$  - lactamasa tipo D, fue BlaZ – 12, que no se encontró en los otros grupos de  $\beta$  - lactamasas tipo A o C (Tabla 2).

$\beta$ - lactamasa (n)	CC (n)	Alotipo: n (%)
<b>A</b> (47)	CC30 (37)	BlaZ – 2: 35 (95%) BlaZ – 17: 2 (5%)
	CC45 (3)	BlaZ – 4: 3 (100%)
	CC8 (3)	BlaZ – 4: 2 (67%) BlaZ – 10: 1 (33%)
	No definido (4)	BlaZ – 2: 2 (50%) BlaZ – 14: 2 (50%)
<b>C</b> (25)	CC1 (5)	BlaZ – 1: 5 (100%)
	CC15 (3)	BlaZ – 1: 3 (100%)
	CC5 (6)	BlaZ – 1: 6 (100%)
	CC8 (9)	BlaZ – 1: 9 (100%)
	No definido (2)	BlaZ – 13: 2 (100%)
<b>D</b> (1)	CC8 (1)	BlaZ – 12: 1 (100%)

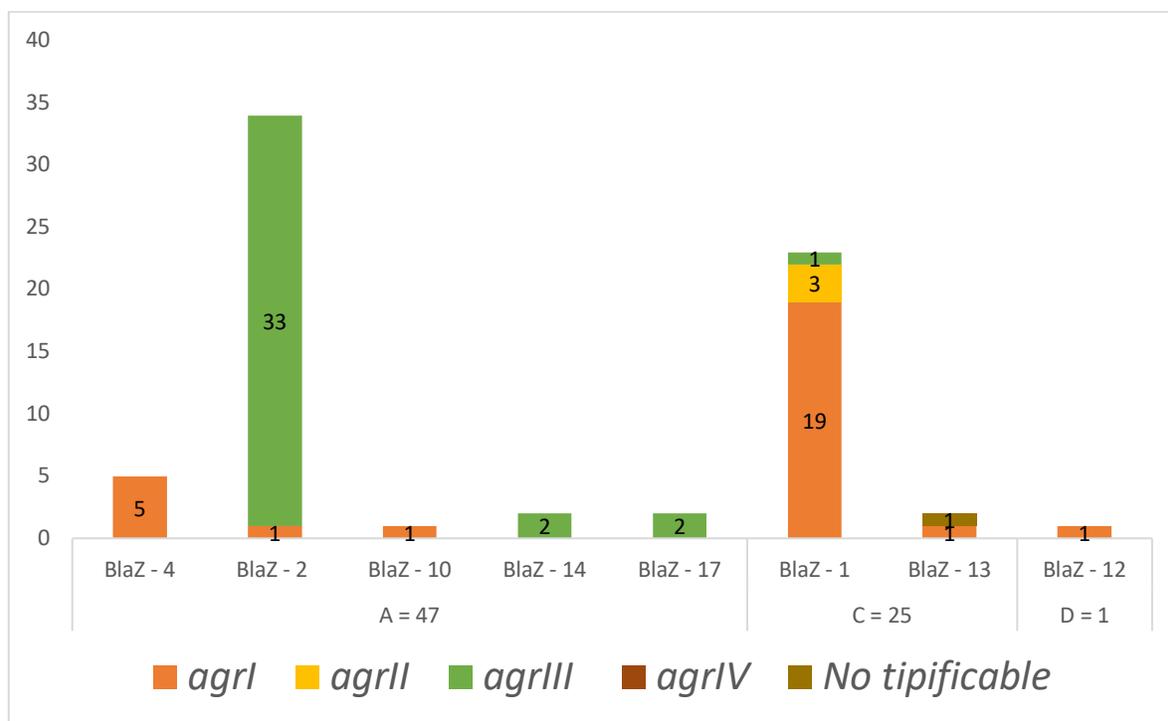
**Tabla 2.** Alotipos BlaZ (según el complejo clonal y número) en cepas con EICz

### 4.2.4 Asociación del Sistema de genes accesorios reguladores (*agr*) en cepas de MSSA con EICz

En la gráfica 6 se observan los resultados del tipo de *agr* presente, donde en siete de las 47 cepas con  $\beta$  - lactamasa tipo A (15%), presentaron *agrI*, mientras que 37 de las 47 cepas (79%) tenían *agrIII* y de este último sistema, las 37 pertenecían al CC30. Hubo tres cepas (6%), en las que no se tipificó el tipo de *agr*. En ambos *agr* y en las que no se tipificó, el alotipo BlaZ – 2 aparece como el más frecuente, pues 37 de las 47 cepas (79%), eran de este alotipo y 33 de ellas tenían el *agrIII* (89%).

En 20 de las 25 cepas con  $\beta$  - lactamasas tipo C (80%), se encontró *agrI*, mientras que 3 de las 25 cepas (12%), tenían *agrII*. Una sola cepa (4%), tenía *agrIII*, y en una sola más (4%), no se tipificó el tipo de *agr*. Con excepción del aislamiento en el que no se pudo determinar el tipo de *agr*, el alotipo más frecuente fue BlaZ - 1, pues 23 de las 25 cepas (92%) tenían este *agr*, y de ellas, 19 tenían el *agrI*.

Todas las cepas con *agrI*, en las tres  $\beta$  - lactamasas encontradas (A, C y D) fueron encontrados en cepas del CC8. No hubo cepas con sistema *agrIV*.



**Gráfica 6.** Sistema de genes accesorios reguladores (*agr*) en cepas con presencia de EICz, asociado al tipo de  $\beta$  - lactamasa y alotipo BlaZ

### **4.3 Características de las cepas de MSSA sin presencia del EICz**

Se estudiaron 113 (61%) cepas, los cuales no presentaron el efecto inoculo a cefazolina y a continuación se presentan los resultados en detalle.

#### **4.3.1 MSSA y Tipo de $\beta$ - lactamasa asociado a la no presencia del EICz**

Dentro de las cepas en las que se detectó algún tipo de  $\beta$  - lactamasa, de manera interesante, se encontró la  $\beta$  - lactamasa tipo B (que no fue encontrada en los que sí tenían el efecto) en la mayoría de los MSSA sin EICz: 37 cepas (33%) de 113. La tipo C, A y finalmente la tipo D, se presentaron en menor número. En 33 cepas (29%), dentro de los cepas sin EICz, como se esperaba, no fue detectada algún tipo de  $\beta$  - lactamasa, considerándose como una de las frecuencias más altas. (Grafica 7 en la siguiente página). A continuación, se presentan las frecuencias detalladas:

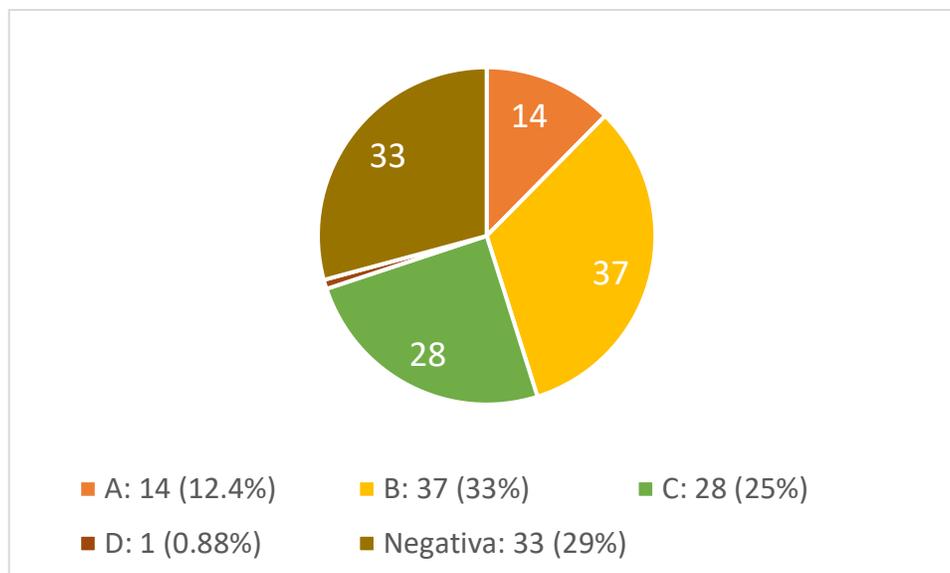
$\beta$  - lactamasa tipo A: 14 aislamientos (12.4%)

$\beta$  - lactamasa tipo B: 37 aislamientos (33%)

$\beta$  - lactamasa tipo C: 28 aislamientos (25%)

$\beta$  - lactamasa tipo D: 1 aislamiento (0.88%)

$\beta$  - lactamasa negativa: 33 aislamientos (29%)



**Gráfica 7.** Distribución por número de aislamientos de MSSA sin EICz y por Tipo de  $\beta$  - lactamasa.

### 4.3.2 Complejos clonales (CC) según tipo de $\beta$ - lactamasa y número de cepas de MSSA sin EICz

Los complejos clonales (CC) encontrados según el tipo de  $\beta$  - lactamasa y el número de cepas para cada complejo en las cepas sin EICz inóculo fueron:

$\beta$ - lactamasa (n)	Complejo clonal (CC): n (%)
A (14)	CC45: 5 (36%)
	CC5: 5 (36%)
	CC8: 4 (28%)
B (37)	CC1: 3 (8%)
	CC22: 1 (3%)
	CC45: 1 (3%)
	CC5: 13 (35%)
	CC8: 7 (19%)
	No definido: 12 (32%)
	CC1: 9 (32%)

C (28)	CC15: 5 (18%) CC45: 1 (4%) CC5: 5 (18%) CC8: 4 (14%) No definido: 4 (14%)
D (1)	CC45: 1 (100%)
Negativa (33)	CC1: 7 (21%) CC15: 2 (6%) CC45: 5 (16%) CC5: 8 (24%) CC8: 6 (18%) No definido: 5 (15%)

**Tabla 3.** Complejos clonales (CC) según tipo de  $\beta$  - lactamasa y número de cepas sin EICz

En todos los grupos de  $\beta$  - lactamasas de aislamientos sin EICz, se encontró el CC45, CC8, CC5 y complejos no definidos. CC45 fue encontrado en los que sí tenían el efecto en los aislamientos con  $\beta$  - lactamasa tipo A, pero solo en 3 casos. CC8 también fue encontrado en cepas con y sin EICz. No se documentó la presencia de CC30 en cepas sin EICz.

#### 4.3.3 Presencia de Alotipos BlaZ en cepas MSSA sin EICz según el complejo clonal.

El único alotipo de los aislamientos con  $\beta$  - lactamasa tipo A fue BlaZ – 4, pues las 14 cepas la tenían (100%). El alotipo más frecuente con  $\beta$  - lactamasa tipo B fue BlaZ – 5, con 13 de los 37 (35%), seguido del alotipo BlaZ – 3 con 12 aislamientos (32%) y el alotipo BlaZ – 7 con 5 aislamientos (13%). Los alotipos BlaZ – 5 y BlaZ – 3 fueron encontrados solamente en aislamientos sin presencia del EICz. Para los aislamientos con  $\beta$  - lactamasa tipo C, el alotipo más frecuente fue el BlaZ – 1, que fue hallado en 25 de las 28 cepas (89%). Este alotipo también fue el más frecuente en los aislamientos con EICz que tenían la  $\beta$  - lactamasa tipo C. Para el único aislamiento con  $\beta$  - lactamasa tipo D, el alotipo fue BlaZ –

12, así como se observó en las cepas con EICz. Todos estos resultados se observan con mayor claridad en la siguiente tabla 4:

<b><math>\beta</math> - lactamasa (n)</b>	<b>CC (n)</b>	<b>Alotipo: n (%)</b>
<b>A (14)</b>	CC45 (5)	BlaZ – 4: 5 (100%)
	CC5 (5)	BlaZ – 4: 5 (100%)
	CC8 (4)	BlaZ – 4: 4 (100%)
<b>B (37)</b>	CC1 (3)	BlaZ – 9: 2 (66%) BlaZ – 11: 1 (33%)
	CC22 (1)	BlaZ – 3: 1 (100%)
	CC45 (1)	BlaZ – 25: 1 (100%)
	CC5 (13)	BlaZ – 5: 13 (100%)
	CC8 (7)	BlaZ – 3: 5 (71%) BlaZ – 8: 1 (14%) BlaZ – 9: 1(14%)
	No definido (12)	BlaZ – 11: 1 (8%) BlaZ – 3: 6 (50%) BlaZ – 7: 5 (42%)
<b>C (28)</b>	CC1 (9)	BlaZ – 1: 8 (89%) BlaZ – 24: 1 (11%)
	CC15 (5)	BlaZ – 1: 5 (100%)
	CC45 (1)	BlaZ – 1: 1 (100%)
	CC5 (5)	BlaZ – 1: 5 (100%)

	CC8 (4)	BlaZ – 1: 4 (100%)
	No definido (4)	BlaZ – 1: 2 (50%) BlaZ – 13: 2 (50%)
<b>D (1)</b>	CC45 (1%)	BlaZ – 12: 1 (100%)
<b>Negativa (33)</b>	CC1 (7) CC15 (2) CC45 (5) CC5 (8) CC8 (6) No definido (5)	Negativo

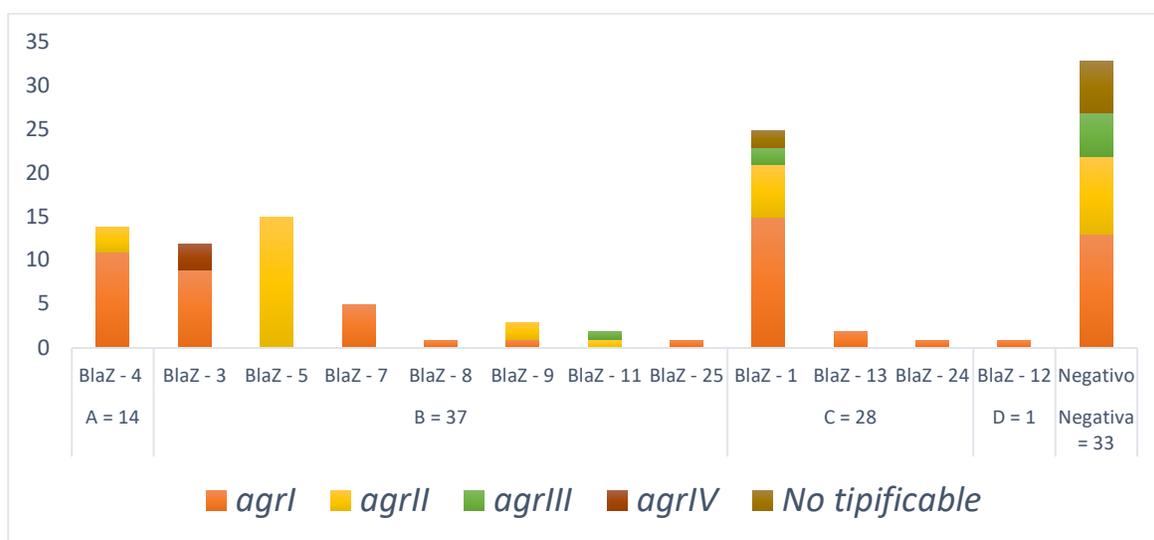
**Tabla 4.** Alotipos BlaZ (según el complejo clonal y número) en cepas sin EICz

#### 4.3.4 Asociación del Sistema de genes accesorios reguladores (*agr*) en cepas de MSSA sin EICz

En la gráfica 8 se evidencian la asociación del tipo *agr* en MSSA sin EICz, donde once de las 14 cepas (79%) con  $\beta$  - lactamasa tipo A, tenían el sistema *agrI*, y las otras 3 (21%), tenían el *agrII*. Todas las 14 cepas, eran del alotipo BlaZ – 4. Diecisiete de las 37 cepas (47%) con  $\beta$  - lactamasa tipo B, tenían el *agrI*, siendo los alotipos más frecuentes BlaZ – 3 con 9 cepas (53%), seguido de BlaZ – 7 con 5 aislamientos (29%); menos frecuentes fueron BlaZ – 8, BlaZ – 9 y BlaZ – 25 con un aislamiento para cada uno. Dieciséis de las 37 cepas (43%) con  $\beta$  - lactamasa tipo B tenían el *agrII*, siendo los alotipos más frecuentes BlaZ – 5 con 13 aislamientos (81%), BlaZ – 9 con dos aislamientos (13%) y BlaZ – 11 con un solo aislamiento. Uno de los 37 aislamientos (3%) con  $\beta$  - lactamasa tipo B, tenía el *agrIII* y su alotipo fue BlaZ – 11. Tres de los 37 aislamientos (8%) con  $\beta$  - lactamasa tipo B, tenían el *agrIV*, siendo el único alotipo identificado BlaZ – 3. Estas fueron las únicas cepas en las que se encontró el *agrIV* del total de cepas del estudio.

Dieciocho de las 28 cepas (64%) con  $\beta$  - lactamasa tipo C, tenían el *agrI*, y de ellos, siendo el alotipo BlaZ – 1 el más frecuente pues 15 de las 18 cepas, pertenecían a este alotipo. Seis de las 28 cepas (22%), tenían el *agrII* y el único alotipo era BlaZ – 1. Dos de las 28 cepas (7%), tenían el *agrIII*, siendo BlaZ – 1 el único alotipo. En las últimos dos cepas no

se pudo tipificar el tipo de *agr*, pero de nuevo, el alotipo presente fue BlaZ – 1. La única cepa con  $\beta$  - lactamasa tipo D, tenía el *agrI* y su alotipo fue BlaZ – 12. Trece de las 33 cepas (39%) sin  $\beta$  - lactamasa detectada, tenían el *agrI*, nueve (27%) tenían el *agrII*, 5 (15%), el *agrIII* y en 6 (18%) no se tipificó *agr*. El *agrII* se encontró en todas las  $\beta$  - lactamasas, exceptuando la D y en las cepas sin  $\beta$  - lactamasa. CC5 y CC15 son los más frecuentes. Nuevamente aparece BlaZ – 4 en la  $\beta$  - lactamasa tipo A el alotipo más frecuente, así como BlaZ – 1 en la  $\beta$  - lactamasa tipo C. El *agrIII* se encontró en cepas con  $\beta$  - lactamasa tipo B, C y sin  $\beta$  - lactamasa. No hay CC en común, pero de nuevo, BlaZ – 1 fue alotipo presente en las cepas con  $\beta$  - lactamasa tipo C y el *agrIV* se encontró en cepas con  $\beta$  - lactamasa tipo B y sin  $\beta$  - lactamasa.



**Gráfica 8.** Sistema de genes accesorios reguladores (*agr*) en cepas sin presencia de EICz, asociado al tipo de  $\beta$  - lactamasa y alotipo BlaZ

#### 4.4 Genes de resistencia a antibióticos en MSSA

La resistencia antibiótica, describe o explica la capacidad heredada o adquirida de los microorganismos, de crecer a altas concentraciones de un antibiótico, independiente de la duración de tratamiento y es cuantificado por la MIC del antibiótico de interés particular. (Brauner, Fridman, Gefen & Balaban, 2016). En las 186 cepas, se buscaron 21 genes de resistencia a otros antibióticos; se analizó su frecuencia por cada grupo de  $\beta$  - lactamasa,

asociados a los alotipos BlaZ correspondientes para cada una de ellas. Los genes estudiados fueron los siguientes:

- **Genes de resistencia a quinolonas: *GyrA* y *ParC***
- **Gen de resistencia para rifampicina: *rpoB***
- **Genes para resistencia a aminoglicósidos: *aac (3) – II*, *aac (6') - aph (2'')*, *aaD*, *ant (9) – Ia*, *aph (2'')* – Ia, *aph (3') – III***
- **Genes de resistencia al trimetoprim: *dfrA8***
- **Genes de resistencia a eritromicina y macrólidos: *ermA*, *ermC*, *ermT*, *mph(c)*, *msr(A)***
- **Gen de resistencia para lincosamidas: *Inu(a)***
- **Gen de resistencia para ácido fusídico: *fusB***
- **Gen de resistencia para sulfonamidas: *sul2***
- **Genes de resistencia para tetraciclinas: *tet(K)*, *tet(M)*, *tet(S/M)***

Las tablas que muestran los genes de resistencia encontrados en las 186 cepas, asociados a cada  $\beta$  - lactamasa y sus alotipos correspondientes, se muestra de forma independiente en las que presentaron y en las que no presentaron EICz, en la sección de anexos del presente estudio (Anexo D y E).

#### **4.4.1 Genes de resistencia a antibióticos encontrados en cepas con presencia de EICz**

En las cepas con presencia de EICz, fueron pocos los genes de resistencia encontrados a otros antibióticos; en 24 de las 73 cepas (32%), se documentó al menos un gen de resistencia a antibióticos. Once de las 24 cepas (46%), tenían la  $\beta$  - lactamasa tipo A, siendo encontrados en ellos, 4 cepas con el gen de resistencia a quinolonas *ParC*, un aislamiento con el gen de resistencia a rifampicina *rpoB*, 4 cepas del gen de resistencia a aminoglicósidos (*ant(9)-Ia*, un aislamiento para el gen de resistencia a antifolatos *dfrA*, así como un aislamiento del gen de resistencia a macrólidos *ermA*. Siete de los once, eran del alotipo BlaZ – 2, tres del alotipo BlaZ – 4 y uno del alotipo BlaZ – 1.

Diez de las 24 cepas (42%), tenía la  $\beta$  - lactamasa tipo C, siendo encontrados en ellos, 4 cepas con el gen de resistencia a aminoglicósidos *aph(3')-III*, un aislamiento para los genes de resistencia a tetraciclinas *tet(M)*, *tet(S/M)* y cuatro cepas para el gen *tet(K)*. Todos estos, fueron encontrados en el alotipo BlaZ – 1. Tres de las 24 cepas (12%), tenían la  $\beta$  - lactamasa tipo D, encontrándose genes de resistencia para aminoglicósidos (*aph(3')-III*), para macrólidos (*msr(A)*) y tetraciclinas *tet(K)*, cada uno de ellos con un aislamiento. Su único alotipo era BlaZ – 12.

Por lo tanto, las cepas con presencia del EICz de  $\beta$  - lactamasa tipo A, también eran las que más genes de resistencia portan, a otros antibióticos de uso frecuente para el tratamiento de infecciones por *S. aureus* como macrólidos, Trimetoprima-Sulfametoxazol, rifampicina y aminoglicósidos. Las cepas con  $\beta$  - lactamasa tipo C portaban menos genes de resistencia para antibióticos de uso poco frecuente para el tratamiento de infecciones por *S. aureus* como las tetraciclinas.

#### **4.4.2 Genes de resistencia a antibióticos encontrados en cepas sin presencia de EICz**

En 93 de 113 cepas (82%), se documentó al menos un gen de resistencia a antibióticos. Diecinueve de las 93 cepas (20%), tenían la  $\beta$  - lactamasa tipo A y su único alotipo BlaZ – 4; en ellos se encontró un aislamiento del gen *GyrA* y 5 para *ParC*, ambos genes de resistencia a quinolonas, cinco cepas con presencia de los genes *mph(C)* y *msr(A)*, ambos genes de resistencia a macrólidos, y un aislamiento para el gen *tet(K)*, gen de resistencia a tetraciclinas. Veintitrés de las 93 cepas (25%), tenían la  $\beta$  - lactamasa tipo B; se encontraron 14 cepas con el gen *GyrA* (12 para el alotipo BlaZ – 3, uno para el BlaZ – 5, y uno para BlaZ – 11), 5 con el gen *ParC* (uno para cada uno de los alotipos, BlaZ – 3, BlaZ – 5, BlaZ – 8, BlaZ – 11 y BlaZ – 25). Estos son genes otorgan resistencia a quinolonas; dos aislamientos del alotipo BlaZ – 9 portaban el gen de resistencia a macrólidos *erm(A)*, un aislamiento del alotipo BlaZ – 7 portaba el gen de resistencia a macrólidos *erm(T)* y uno del alotipo BlaZ – 11, portaba el gen de resistencia a lincosamidas *Inu(A)*.

Veinte de las 93 cepas (21%), tenían la  $\beta$  - lactamasa tipo C, siendo el alotipo BlaZ – 1 en el que con más frecuencia se encontraron genes de resistencia a antibióticos; en aislamientos con este alotipo, se encontraron los genes, *ParC*, *aac(6') – aph(2'')*, *aph(2'') –*

*1a*, *Inu(A)*, con un aislamiento, *aadD* con 3 aislamientos y el gen *tet(K)* con y aislamientos; el gen *aph(3') – III*, se encontró en 4 cepas. Solo hubo dos aislamientos del alotipo BlaZ – 24 con los genes *aadD* y *tet(K)*. Para los aislamientos con la  $\beta$  - lactamasa tipo D (y su único alotipo BlaZ – 12), solo hubo 3 aislamientos de los 93 (3%), con algún gen de resistencia a antibióticos: un caso para *ParC*, uno para *fusB* y uno para *tet(K)*. Veintiocho de las 93 cepas (30%), se trataron de aislamientos sin presencia de  $\beta$  - lactamasa; en ellos se encontró un aislamiento con los genes *GyrA*, *aac(3') – II*, *erm(C)* y *sul2*. Hubo dos cepas con el gen *ant(9) – Ia*, tres con el gen *erm(A)*, cuatro con los genes *mph(C)*, *msr(A)*, *tet(K)*, y siete con gen *ParC*.

En las cepas sin presencia del EICz, principalmente en aquellos con  $\beta$  - lactamasa tipo B y sin  $\beta$  - lactamasa, los genes de resistencia a antibióticos son frecuentes y afectan a todos los grupos de antibióticos estudiados y que son utilizados para el tratamiento de infecciones por *S. aureus* en mayor o menor frecuencia como los aminoglicósidos, sulfametoxazol, ácido fusídico, quinolonas, macrólidos, lincosamidas, tetraciclinas. No se documentaron cepas con el gen *rpoB* que otorga resistencia a la rifampicina, antibiótico ocasionalmente utilizado en asociarse con otros grupos de antibióticos para el tratamiento de infecciones graves por *S. aureus*.

## 4.5 Genes de virulencia estudiados en MSSA

La virulencia es una propiedad microbiana, que abarca todo lo que contribuye a que algunos microorganismos sean patógenos. A diferencia de los rangos individuales como cápsulas o toxinas, que pueden ser determinantes singulares del comportamiento microbiano, la virulencia debe definirse en el contexto de un hospedero susceptible. La virulencia es reflejo del resultado de la interacción hospedero – microorganismo en un hospedero susceptible, antes que un rasgo microbiano estable o predecible. (Casadevall & Pirofski, 2010)

Los genes se agruparon de acuerdo a su función similar en:

- **Genes relacionados con hemolisinas y leucocidinas. Por ejemplo: *hlgA*, *lukF-PV*, *hld***
- **Genes relacionados con adhesinas y proteínas de unión a superficies celulares o al fibrinógeno. Por ejemplo: *fnbA*, *cna*, *icaA*, *clfA*, *clfB***

- **Genes relacionados con la síntesis de los polisacáridos capsulares. Por ejemplo: *cap8A, cap8P***
- **Genes relacionados con la evasión del sistema inmunológico. Por ejemplo: *aur, spa, hysA***
- **Genes relacionados con la extracción de hierro del eritrocito como fuente de crecimiento del microorganismo. Por ejemplo: *isdA, isdB, isdC***
- **Genes relacionados con enterotoxinas, estafiloquinasa y exfoliatinas. Por ejemplo: *sea, seb, eta, etb, seb, seh*.**
- **Gen relacionado con el síndrome de choque tóxico: *tsst – 1*.**
- **Genes relacionados con el sistema de secreción tipo VII. Por ejemplo: *esxA, essA, esaA, essB*.**
- **Genes relacionados con procoagulación e hipercoagulabilidad. Por ejemplo: *vWbp, coa***
- **Genes relacionados con inhibición del complemento y la quimiotaxis: *chp, scn***
- **Genes relacionados con el sistema de secreción tipo VII que hacen parte del sistema toxina – antitoxina. Por ejemplo: *esaG1 a esaG9*.**

La lista completa de los 94 genes de virulencia estudiados en las 186 cepas y las tablas que los agrupan, asociados a cada  $\beta$  - lactamasa y a sus alotipos correspondientes, se presenta de forma independiente en aquellas que tenían presencia y ausencia de EICz, en la sección de anexos del estudio (Anexo A, B y C)

#### **4.5.1 Genes de virulencia encontrados en cepas con presencia de EICz**

En las cepas con presencia de EICz todos los grupos de genes descritos fueron encontrados en aquellos con  $\beta$  - lactamasa tipo A (particularmente en el alotipo BlaZ – 2) y  $\beta$  - lactamasa tipo C (principalmente en el alotipo BlaZ – 1). También fue muy parecida la ausencia de algunos genes en ambos grupos, por ejemplo: ambos grupos poseían genes relacionados con hemolisinas, (por ejemplo, *hglA*), pero muy pocos tenían genes para leucocidinas, (por ejemplo, *LukS* y *LukF* de la toxina PVL), exfoliatinas (por ejemplo, *eta* y *etb*) y enterotoxinas (por ejemplo, *seb*, *sed* y *seh*). Los genes relacionados con la síntesis de polisacáridos capsulares, metabolismo y extracción del hierro, sistema VII, inhibición del

complemento - quimiotaxis, sistema toxina – antitoxina, se presentaron de manera similar en ambas  $\beta$  - lactamasas.

Algunos genes se encontraron más en un alotipo que en el otro; ejemplo: *aur* (gen relacionado con inhibición del sistema inmunológico), y los genes relacionados con hipercoagulabilidad como *vWbp*, *coa*, fueron más frecuentes en los aislamientos con  $\beta$  - lactamasa tipo C en el alotipo BlaZ – 1, frente al alotipo BlaZ – 2 de las cepas con  $\beta$  - lactamasa tipo A. El gen *tsst – 1* (del síndrome de choque tóxico), solo se encontró en cepas con  $\beta$  - lactamasa tipo A en el alotipo BlaZ – 2 y no se encontró en aquellos con  $\beta$  - lactamasa tipo C. En los aislamientos con  $\beta$  - lactamasa tipo D, (alotipo BlaZ – 12), se encontró al menos un gen de todos los grupos mencionados, con excepción de los relacionados con enterotoxinas, leucocidinas, exfoliatinas y los relacionados con el sistema de secreción tipo VII que hacen parte del sistema toxina – antitoxina.

#### **4.5.2 Genes de virulencia encontrados en cepas sin presencia de EICz**

En las cepas sin presencia de EICz, todos los grupos de genes descritos fueron encontrados en cepas con  $\beta$  - lactamasa tipo A (particularmente en el alotipo BlaZ – 2), con  $\beta$  - lactamasa tipo B (sobre todo en los alotipos BlaZ – 3 y BlaZ – 5),  $\beta$  - lactamasa tipo C (principalmente en el alotipo BlaZ – 1), siendo muy llamativo que casi todos los genes (90 de 94) se encontraron en cepas sin  $\beta$  - lactamasa. Los genes relacionados con hemolisinas (por ejemplo *hlgA*, *hglC*, *hglC*), adhesinas (por ejemplo, *icaA*, *icaD* o *icaB*), metabolismo y extracción del hierro, (por ejemplo, *IsdF* o *IsdG*) sistema VII de secreción (por ejemplo, *esaE*, *esaD*, *esxD*), inhibición de la respuesta inmunológica y quimiotaxis, (por ejemplo, *scn*, *chp*) son muy parecidos en los aislamientos con  $\beta$  - lactamasa tipo A (alotipo BlaZ – 2), con  $\beta$  - lactamasa tipo B (alotipos BlaZ – 3 y BlaZ – 5),  $\beta$  - lactamasa tipo C (alotipo BlaZ – 1), y en las cepas sin  $\beta$  - lactamasa.

Hay algunas diferencias también; fueron más frecuentes los genes *aur* y los relacionados con el sistema de secreción VII que hacen parte del sistema toxina – antitoxina, en los que tenían  $\beta$  - lactamasa tipo C (alotipo BlaZ – 1) y en las cepas sin  $\beta$  - lactamasa, pero no en los que tenían  $\beta$  - lactamasa tipo A. También fue muy parecida la escasa presencia de algunos genes en los grupos con  $\beta$  - lactamasa tipo A, B y C. Por ejemplo: fue poco

---

frecuente encontrar genes relacionados con leucocidinas, exfoliatinas, enterotoxinas, síndrome de choque tóxico y con procoagulación/hipercoagulabilidad.

En cepas con  $\beta$  - lactamasa tipo D, (alotipo BlaZ – 12), se encontró al menos un gen de todos los grupos mencionados, con excepción de los relacionados con enterotoxinas, leucocidinas, exfoliatinas, los relacionados con el sistema de secreción tipo VII que hacen parte del sistema toxina – antitoxina, síndrome de choque tóxico, procoagulación/hipercoagulabilidad, evasión del sistema inmunológico, muy pocos tenían genes para algunas adhesinas y proteínas de unión a superficies celulares.



## 5 Capítulo 5. Discusión

La prevalencia establecida de EICz en cepas de MSSA aislados en hemocultivos en el presente estudio fue de 39%. Esta prevalencia se considera alta, concordante con otras publicaciones como la de Carvajal (Carvajal et al., 2020), en la que se encontró un 48% de prevalencia, Rincón (Rincón et al., 2013), en la que se encontró 36%, con excepción del estudio de Chong (Chong et al., 2015), en el que se encontró una frecuencia de 13%, aunque en este último estudio, la prevalencia fue determinada con un número menor de muestras analizadas en comparación a los dos estudios anteriores mencionados. Las  $\beta$  - lactamasas más asociadas con la presencia de EICz también fueron las de tipo A y C, como también se había reportado en estudios previos, por ejemplo, Miller (Miller et al., 2018), Naninni (Naninni et al., 2009), Carvajal (Carvajal et al., 2020), Rincón (Rincón et al., 2013) y Chong (Chong et al., 2015).

Según la epidemiología molecular realizada y en concordancia con la publicación de Carvajal y colaboradores (Carvajal et al., 2020), en el presente estudio los CC más asociados al EICz fueron el CC30 con alotipo BlaZ – 2 dentro del grupo con  $\beta$  - lactamasa tipo A, y aunque no hubo un CC predominante en los aislamientos con la  $\beta$  - lactamasa tipo C, el alotipo más frecuente fue BlaZ – 1. Se observó que el CC8 está presente en los tres grupos de aislamientos con  $\beta$  - lactamasa (A, C y D), con presencia del efecto. El que existan CC y alotipos iguales en cepas con  $\beta$  - lactamasas A y C con presencia del EICz permite afirmar que estas  $\beta$  - lactamasas se asocian en porcentajes que oscilan entre el 35 a 65% a la probabilidad de presentar el efecto, siendo más frecuente en cepas con  $\beta$  - lactamasa tipo A.

En cepas con presencia de EICz, el alotipo más frecuente para las cepas con  $\beta$  - lactamasa tipo A fue BlaZ – 2 (79%), seguido de BlaZ – 4 (14%). El alotipo más frecuente en las cepas

con  $\beta$  - lactamasa tipo C fue BlaZ – 1, en un 92%. Respecto a los hallazgos de genes de resistencia antibiótica, en las cepas de *S. aureus* con presencia de EICz del estudio, se encontró que estas portaban pocos genes de resistencia (24 de 73 cepas, es decir, 32%) a otros antibióticos; por tanto, la presencia del efecto no necesariamente limita que en un escenario clínico, estas puedan ser tratadas con antibióticos diferentes a  $\beta$  – lactámicos, incluyendo a la oxacilina, aunque esto dependerá del contexto del paciente, el tipo de infección que lo afecte, así como de la farmacocinética del antibiótico que se escoja, si dichos genes son expresados. Por ejemplo, si un paciente tiene una infección de sistema nervioso central, no sería adecuado escoger un macrólido o una tetraciclina si el microorganismo es *S. aureus*, aunque sea sensible *in vitro*. Las mutaciones en genes que codifican para los sitios blanco de acción de antibióticos generalmente reservados para infecciones graves y de difícil tratamiento como quinolonas y rifampicina no fueron frecuentes en estas cepas.

En cuanto a la presencia de genes de virulencia, los alotipos que más tenían presencia de EICz también eran los que más tenían genes de virulencia: BlaZ – 2 en  $\beta$  - lactamasa tipo A, BlaZ – 1 en  $\beta$  - lactamasa tipo C con la detección de genes como *hlgA*, *hld*, *cap8A*, *spa*, *tsst -1*. En un contexto clínico, probablemente las infecciones causadas por estos alotipos, pudieron haberse asociado a un efecto patógeno mayor, según las condiciones del hospedero infectado. Estos datos de determinantes de resistencia y virulencia, se convierten en unos de los pocos reportados, ya que no son muy buscados en este tipo de aislamientos de MSSA en un país como Colombia.

En los aislamientos con presencia de EICz, el sistema *agrI* fue el más frecuente en los aislamientos con  $\beta$  - lactamasa tipo C (80%); el sistema *agrIII* fue el más encontrado en las cepas con  $\beta$  - lactamasa tipo A (79%), de las cuales lo que también se observó en el estudio de Lee y colaboradores, que es de los pocos estudios que relaciona la presencia de EICz con el tipo de  $\beta$  - lactamasa y el sistema *agr*. (Lee et al., 2019). Hay coincidencia con la literatura consultada, (Tan et al, 2018), en que el sistema *agrI* encontrado en la mayoría de los aislamientos con EICz y sin importar el tipo de  $\beta$  - lactamasa estén dentro del CC8. También hay coincidencia con que la mayoría de los que tenían el *agrIII*, se encontraron en el CC30 de la  $\beta$  - lactamasa tipo A, donde por el número de aislamientos, hay asociación entre  $\beta$  - lactamasa tipo A, CC30, *agrIII*, alotipo BlaZ – 2 y posibilidad de presentar EICz.

Una infección por una cepa con estas características moleculares probablemente pueda causar infecciones supurativas graves como endocarditis, neumonía necrosante o infecciones crónicas por producción de biofilm.

En los aislamientos sin presencia de EICz, la  $\beta$  - lactamasa tipo B es la que con mayor frecuencia se aisló, siendo el CC45, CC8 y CC5 los complejos clonales más encontrados; estos tres complejos clonales también se encontraron en cepas con presencia del efecto. Los alotipos más frecuentes en esta  $\beta$  - lactamasa tipo B fueron BlaZ – 3 (32%) y BlaZ – 5 (35%). Para la  $\beta$  - lactamasa tipo C, en aislamientos sin EICz, el alotipo aislado más frecuente también fue BlaZ – 1. Este hallazgo junto al hecho de que varios CC iguales (45, 8 y 15) con y sin EICz hayan sido aislados, permite afirmar que debe existir otras características adicionales de la cinética enzimática como cambios de aminoácidos en zonas diferentes al sitio o sitios catalíticos activos de la enzima, la presencia de otros factores que regulan la virulencia del microorganismo, por ejemplo, el sistema *agr* u otros “sistemas de dos componentes” como el operón para el sistema SaeRS (que codifica para cuatro genes que son *saeP*, *saeQ*, *saeR* y *saeS* y que también está relacionado con la producción de exotoxinas), o con el sistema SrrAB, que le ofrece resistencia al microorganismo ante antisépticos como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que ayuden a explicar la presencia o ausencia del efecto en estos aislamientos. (Horswill & Jenul, 2018).

La presencia de más genes de resistencia antibiótica en las cepas sin presencia del EICz, (93 de 113 aislamientos, es decir 82%), puede ser un limitante en el tratamiento de infecciones causadas por estos microorganismos en casos en los que no se tenga cefazolina o no sea tolerada la oxacilina u otra PAS, pero esto también dependerá del contexto clínico del paciente y el tipo de infección que lo afecta, si estos genes son expresados. La ausencia del efecto, no las hace necesariamente susceptibles a otros tipos de antibióticos, pudiendo ser más difícil la escogencia de un tratamiento antibiótico adecuado.

También hay similitud en los genes de virulencia encontrados y los no encontrados en los aislamientos sin EICz, sin importar la presencia o ausencia de  $\beta$  - lactamasa. No se puede afirmar que un grupo de genes presentes o ausentes, se relacione más con una  $\beta$  – lactamasa en particular, por ejemplo, todos comparten la alta prevalencia de genes relacionados con hemolisinas, adhesinas y proteínas de unión a células y fibrinógeno,

evasión del sistema inmunológico, metabolismo y extracción del hierro, sistema de secreción tipo VII, inhibición del complemento y la quimiotaxis, así como del sistema toxina – antitoxina. Por tanto, aunque son un poco más heterogéneos que los aislamientos con presencia del EICz, estos aislamientos portan muchos y variados genes de virulencia y que sumado a la presencia de más genes de resistencia a otros antibióticos, en un contexto clínico, estas cepas sin EICz pueden causar daño severo en el hospedero y su erradicación podría llegar a ser difícil o más demorada, al tratarse de microorganismos con multirresistencia antibiótica en caso de no tener disponible Cz o estar contraindicado su uso o el de una PAS, en caso de expresión de estos genes.

Hay coincidencia con los CC encontrados en los diferentes tipos de *agr*, para los aislamientos sin presencia de EICz de acuerdo a la literatura consultada, (Tan et al, 2018), siendo el sistema *agrI* el más encontrado (en 60 de las 113 cepas, es decir, 53%), tanto en aquellos que tenían cualquiera de las 4  $\beta$  - lactamasas (sobre todo en la B y C), como en las que no se detectó  $\beta$  - lactamasa. El CC encontrado en todas las  $\beta$  - lactamasas con *agrI* fue CC45. El sistema *agrII* se encontró en cepas con  $\beta$  - lactamasa tipo A, B, C y sin  $\beta$  - lactamasa, específicamente en el 30% de las 113 cepas sin EICZ, pero sobre todo en aquellos con  $\beta$  - lactamasa tipo B y en las que no tenían  $\beta$  - lactamasa. El CC5 y CC15 fueron los complejos más frecuentes. En las cepas con efecto, este sistema fue muy poco aislado. Los *agrIII* y *agrIV* se encontraron en cepas con  $\beta$  - lactamasa tipo B y en aquellas sin  $\beta$  - lactamasa, pero con menos frecuencia. Aunque los 4 sistemas *agr* pueden encontrarse en estas cepas, el sistema *agrII* fue el más asociado a la ausencia del efecto, pues los otros tres, son compartidos de manera similar en las cepas con y sin presencia del EICz. Solo en cepas sin EICz, se encontró el sistema *agrIV*. No se puede afirmar con seguridad que algún tipo específico de *agr* se asocie con mayor probabilidad a la ausencia del EICz; aunque hubo varios aislamientos del tipo II (también presentes en cepas con EICz), hubo muchos con *agrI* en cepas sin presencia del EICz, como sucedió en aquellas con EICz. Sí podría afirmarse que el sistema *agrIII* rara vez se encuentra en aislamientos sin EICz.

En el estudio, la presencia de la  $\beta$  - lactamasa tipo D no predice ni descarta la presencia de EICz, pues fueron muy pocas las cepas encontradas con esta  $\beta$  - lactamasa: un aislamiento para el grupo con efecto y uno para el grupo sin presencia del efecto.

Los conceptos de virulencia y resistencia antibiótica no siempre se expresan simultáneamente y pueden no estar relacionados. El desconocimiento de la presencia del EICz en cepas de MSSA, impactará en un escenario clínico de forma negativa en el desenlace, ya que el antibiótico será inefectivo (si este es el escogido como terapia empírica), permitiendo que el microorganismo, continúe expresando sus genes de virulencia, pudiendo causar daños irreversibles o graves, incluyendo la muerte.

Varios estudios que destacan la importancia y relevancia clínica de las infecciones que ocurren por cepas de MSSA que tienen EICz. Los primeros reportes de este fracaso terapéutico con Cz, se publicaron en la década de los años 70 del siglo XX, por ejemplo, en la publicación de Bryant y Alford en 1977, reportaron dos casos de pacientes infectados por MSSA, tratados con cefazolina en los que hubo falla en la curación con este antibiótico. El primero paciente era un hombre de 27 años que se aplicaba narcóticos por vía endovenosa, y quien consultó a un servicio de urgencias por fiebre, malestar general, taquipnea (aumento de la frecuencia respiratoria) y dolor pleurítico (dolor en el tórax que se presenta con la inspiración profunda). Previo al inicio de antibióticos, se solicitaron hemocultivos y radiografía de tórax. En los hemocultivos se aisló MSSA y en la radiografía de tórax se observó una neumonía bilateral que luego progresó a neumatoceles (espacio lleno de gas dentro del parénquima pulmonar). Recibió cefazolina por 52 días, pero doce horas después de haber terminado el tratamiento, la fiebre reapareció, se encontró de nuevo a MSSA y además por presencia de esplenomegalia dolorosa, le fue extirpado el bazo, cuyos cultivos fueron positivos para MSSA; se hizo cambio de Cz por nafcilina. En el segundo caso, a un hombre de 41 años que también se inyectaba narcóticos por vía endovenosa, se le hizo diagnóstico de endocarditis con compromiso de la válvula aórtica y posible neuro infección asociada. La respuesta a la cefazolina no fue adecuada y necesitó el cambio de tratamiento antibiótico; se suspendió la cefalosporina y se le inició cloranfenicol junto con meticilina. Fue llevado a valvuloplastia y en los cultivos se encontró MSSA. (Bryant & Alford, 2007)

Nannini, Singh y Murray, en el año 2003, describieron un caso de un adulto de 48 años quien en el posoperatorio tardío (3 meses después), de cirugía de bypass coronario e implantación de un desfibrilador automatizado, ingresa a hospitalización por dos semanas de fiebre, disnea y escalofríos. Previo al inicio de un tratamiento antibiótico, le fueron

---

solicitados dos hemocultivos; el esquema empírico fue vancomicina y rifampicina. Una vez fueron identificados los hemocultivos como MSSA, esta terapia se suspendió y se cambió a cefazolina; por el antecedente de cirugía cardíaca, se le realizó un ecocardiograma transesofágico que reportó vegetaciones en la válvula aórtica; se dio de alta luego de 8 días de tratamiento intrahospitalario, pero 11 días después regresó por un cuadro clínico similar, encontrándose que la vegetación aórtica era más grade y que en los hemocultivos nuevamente se había obtenido MSSA. Por pruebas fenotípicas, se encontró que la cepa tenía EICz y por secuenciación genómica, se determinó que era gran productora de la  $\beta$ -lactamasa tipo A, lo que representó evidencia de la inactivación de la Cz en infecciones de alto inóculo cuando el efecto está presente y que, en él, hay relación con el tipo de  $\beta$ -lactamasa presente. (Nannini, Singh & Murray, 2003).

Recordando el estudio de McNeil et al, del 2020, en el que se estudió la presencia de EICz en aislamientos de MSSA en pacientes pediátricos con infecciones osteoarticulares. En los aislamientos de MSSA con EICz fue más frecuente la cronificación y la reaparición de la infección, así como fue en estas cepas donde más se encontraron genes de resistencia a otros antibióticos como clindamicina. (McNeil et al., 2020)

El presente estudio destaca que estos aislamientos con y sin presencia del EICz, portan en mayor o menor medida genes de resistencia a otros antibióticos, pero particularmente, muestra la alta prevalencia de genes de virulencia, que podría ser la explicación a las consecuencias negativas en el hospedero cuando este se infecta con alguna cepa y no se inicia de forma temprana el tratamiento antibiótico adecuado o se inicia un antibiótico inadecuado.

## **6 Capítulo 6: Conclusiones y recomendaciones**

### **6.1 Conclusiones**

- 1. La frecuencia del EICz en las cepas estudiadas fue del 39%, siendo las la  $\beta$  – lactamasas tipo A y C, las más asociadas. Los alotipos BlaZ – 2 de la  $\beta$  – lactamasa tipo A y BlaZ – 1 de la  $\beta$  – lactamasa tipo C (pertenecientes al CC30 y CC8 respectivamente), fueron los alotipos con mayor probabilidad de presentar el fenómeno estudiado.**
- 2. En las cepas con presencia de EICz, se documentaron pocos genes de resistencia a otros antibióticos, siendo los más frecuentes, los relacionados con enzimas modificadoras de aminoglicósidos, tetraciclinas, macrólidos y lincosamidas. Estos genes fueron encontrados en cepas con alotipos BlaZ – 2 de la  $\beta$  – lactamasa tipo A y BlaZ – 1 de la  $\beta$  – lactamasa tipo C.**
- 3. La presencia de la  $\beta$  – lactamasas tipo B y la ausencia de  $\beta$  – lactamasa, se asociaron con ausencia de EICz. Los CC5, CC8 y CC1 fueron los más aislados en este grupo. Los alotipos BlaZ – 3, BlaZ – 5 y BlaZ – 7, fueron los más asociados a la ausencia del EICz. El alotipo BlaZ – 1, de las cepas con  $\beta$  – lactamasas tipo C, también se encontró en cepas sin presencia de EICz, por tanto, debe existir otras características no establecidas en el estudio que las distinguen de las que sí presentan el efecto.**
- 4. La presencia de la  $\beta$  – lactamasa tipo D, no permite establecer la presencia ni la ausencia de EICz, por su baja frecuencia de aislamiento.**

5. Las cepas sin presencia de EICz portaban más genes de resistencia antibiótica respecto a aquellas que sí tenían el efecto. Se encontraron genes de resistencia a quinolonas, aminoglicósidos, tetraciclinas, macrólidos y lincosamidas. Esto puede hacer difícil escoger un tratamiento adecuado en un contexto clínico cuando a pesar de la ausencia del fenómeno, no se dispone de Cz o existe contraindicación para su uso o no hay posibilidad de usar una penicilina antiestafilocócica como la oxacilina, si estos genes son además expresados.
6. Los sistemas *agrI* y *agrIII* fueron los sistemas de regulación de genes accesorios más encontrados en las cepas con presencia de EICz, pero para el caso particular de *agrI*, no se puede afirmar que sea exclusiva ya que también se encontró en cepas sin EICz. El sistema *agrIII* parece relacionarse más con la presencia de EICz, mientras que el sistema *agrII* se relacionó más con la ausencia de EICz.
7. En ambos grupos de aislamientos con presencia y sin presencia del EICz, se encontraron múltiples y variados genes de virulencia que en un escenario clínico podrían producir daños graves en el hospedero, llevando a ser posiblemente catalogadas como de difícil tratamiento, si estos genes también son expresados.

## 6.2 Recomendaciones

1. Dar a conocer la existencia de este fenómeno al personal médico en formación y a aquellos que se enfrentan a casos de pacientes con infecciones graves por MSSA pues es un fenómeno poco conocido, poco enseñado, que puede llevar a complicaciones graves si se utiliza Cz bajo el concepto de tratarse de un microorganismo sensible; el desconocimiento del EICz, puede llevar al uso de otros tratamientos antibióticos de mayor espectro como glicopéptidos, quinolonas, rifampicina, cuando la respuesta microbiológica a la Cz o la evolución clínica no es adecuada. El uso de estos antibióticos de mayor

espectro no es garantía de mejoría clínica ni microbiológica, (recuérdese la mala respuesta del tratamiento de MSSA con glicopéptidos), pues puede aumentarse la morbimortalidad, la toxicidad, las estancias intrahospitalarias, la presión sobre la microbiota del paciente y la posibilidad de adquisición de infecciones adicionales de origen intrahospitalario por el uso inadecuado de antibióticos.

2. Continuar con el estudio o encontrar nuevos métodos diagnósticos que permitan reconocer rápidamente la presencia del efecto, de manera que se pueda definir si la Cz es el mejor tratamiento antibiótico para infecciones causadas por este microorganismo. Si el efecto está presente, se podría iniciar otro tratamiento antibiótico adecuado de manera más rápida.
3. Realizar estudios en el que se determine la presencia o la ausencia del efecto, en cepas aisladas de diferentes sistemas anatómicos o líquidos corporales infectados, (pulmonar, de piel y tejidos blandos, osteoarticular, asociada a dispositivos intravasculares, endocarditis, meningitis, entre otros), su asociación con la edad del paciente (adultos y pediátricos), sexo del paciente, la evolución de los marcadores inflamatorios como proteína C reactiva (PCR) o procalcitonina, asociación con resistencia a otros antibióticos, complicaciones secundarias (cronificación de la infección o infecciones a distancia), evolución clínica, necesidad y número de procedimientos quirúrgicos, tiempo de estancia en unidades de cuidado intensivo, origen comunitario o nosocomial y el desenlace final del paciente incluyendo mortalidad.



## 7 Bibliografía

Alonzo F, Torres VJ. (2014). The bicomponent Pore-forming Leucocidins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Jun;78(2)199-230.doi:10.1128/MMBR.00055-13

Ambler R.P. (1975). The aminoacid sequence of *Staphylococcus aureus* penicillinase. *Biochem J*. 151(2): 197 – 218

Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin A V., Sirotnik A V., Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*. 19:455–477

Beabout K, Hammerstrom TG, Pérez AM, Magalhaes BF, Prater AG, Clements TP, Arias CA, Saxer G, Shamooy Y. (2015). The ribosomal S10 protein is a general target for decreased tigecycline susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 5:5561 – 5566. doi: 10.1128/AAC.00547-15

Bolger AM, Lohse M, Usadel B. (2014) Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114–2120

Brauner A., Fridman O., Gefen O., Balaban N.Q. (2016). Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat Rev Microbiol*. Apr;14(5): 320 – 330. doi: 10.1038/nrmicro.2016.34.

Brook, I. (1989). Inoculum effect. *Reviews in Infectious Diseases*, 11(3), 361-368

---

Bryant R.E., Alford R.H. (1977). Unsuccessful treatment of staphylococcal endocarditis with cefazolin. *JAMA*. Feb 7; 237(6): 569 – 70.

Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL. (2009). BLAST plus: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 10:1

Carvajal LP, Rincón S, Echeverri AM, Porras J, Ríos R, Ordoñez KM, Seas C, Gómez-Villegas SI, Díaz L, Arias CA, Reyes J. (2020). Novel insights into the classification of staphylococcal  $\beta$ -lactamases in relation to the cefazolin inoculum effect. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 64: e02511-19

Casadevall A., Pirofski L.A. (2010). On Virulence. *Virulence*. Jan – Feb; 1(1):2

Chong YP., Park SJ., Kim ES., Bang KM., Kim SH., Lee SO., Choi SH., Jeong JY., Woo JH., Kim YS. (2015) Prevalence of *blaZ* gene types and the cefazolin inoculum effect among methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* blood isolates and their association with multilocus sequence types and clinical outcome. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Feb;34(2): 349-55. doi: 10.1007/s10096-014-2241-5.

Creech CB, Wood JB, Thomsen I. (2016) Best Practices for Treatment of Invasive Methicillin – susceptible *Staphylococcus aureus* Infections: The Case of Oxacillin. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. Dec;5(4):480 – 482. doi: 10.1093/jpids/piw052

Cui L, Isii T, Fukuda M, Ochiai T, Neoh H, Camargo ILB Da C, Watanabe Y, Shoji M, Hiramatsu K. (2010). An *RpoB* Mutation Confers Dual Heteroresistance to Daptomycin and Vancomycin in *S. aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54: 5222–33

D'haeseleer P. (2006). What are DNA sequence motifs? *Nature Biotechnology*. Apr;24(4):423-5

Damon HA, Soussy CJ, Courvalin P. (1998). Characterization of Mutations in the *rpoB* Gene That Confer Rifampin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Oct;42(10):2590-4

Edgar RC. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acid Research* 32:1792–1797.

Eisenberg E., Levanon E.Y. (2013). Human Housekeeping genes, revisited. *Trends Genet.* Oct;29(10): 569 - 74

Fildes, P. (1940). The mechanism of the anti-bacterial action of mercury. *British Journal of Experimental Pathology*, 21(2), 67

Foster TJ. (2017). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiology Reviews*. May 1;41(3):430-449

Fuda CC, Fisher JF., Mobashery A. (2005)  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptative resistance of a plastic genome. *Cellular Molecular Life Sciences*. 62. 2617-2633.

Goldstein PB. (2014). Resistance to rifampicin: a review. *The Journal of Antibiotics*. 67, 625–630

Green ER, Mecsas J, (2016). Bacterial secretion systems: an overview. *Microbiology Spectrum*. 4(1): VMBF.0012-2015.

Horswill AR, Jenul C. (2018). Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *Microbiology Spectrum*. 2018 February; 6(1): doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0031.

Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Meugnier H, Forey F, Lina G, Nesme X, Ettiène J, Vandenesch F. (2002). Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background, virulence factors, *agr* Groups (alleles) and Human disease. *Infection and Immunity*. Feb;70(2):632 – 41.doi: 10.1128/IAI.70.2.631-641.2002

Jung N., Rieg S. (2018). Essentials in the management of *S. aureus* bloodstream infections. *Infection*. Aug: 46(4): 441-442.

---

Kaase M, Lenga S, Friederich S, Szabados F, Sakinc T, Kleine B, Gatermann SG. (2008). Comparison of phenotypic methods for penicillinase detection in *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*. Jun;14(6): 614-6.

Kariyone, K., Harada, H., Kurita, M., & Takano, T. (1970). Cefazolin, a new semisynthetic cephalosporin antibiotic. I. *Journal of Antibiotics*, 23(3), 131-136

Keinhorster D, George SE, Weindenmaier C, Wolz C. (2019). Function and regulation of *Staphylococcus aureus* wall teichoic acids and capsular polysaccharides. *International Journal of Medical Microbiology*. Sep;309(6):151333

Kirby WM. (1944). Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant *Staphylococci*. *Science*. Jun 2;99(2579): 452 – 3.

Llarrul, L., Prorok M., Mobashery S. (2010). Binding of the Gene Repressor Blal to the *bla* Operon in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*, 49, 7975 – 7977

Lenhard, J. R., & Bulman, Z. P. (2019). Inoculum effect of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Journal of Antimicrobials and Chemotherapy*, 74(10), 2825-2843

Lee S, Choe PG, Song KH, Park SW, Kim HB., Kim NJ, Kim EC, Park WB, Oh M. (2011). Is cefazolin inferior to Nafcillin for Treatment of Methicillin – susceptible *Staphylococcus aureus* bacteriemia? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Nov;55(11): 5122-6. Doi:10.1128/AAC.00485-11

Lee OS, Lee S, Park S, Lee JE, Lee SH. (2019). The cefazolin inoculum effect and the presence of type A *blaZ* Gene according to *agr* Genotype in Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Infections and Chemotherapy*. Dec; 51(4): 376-385

Levy S., Marshall B. (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*. Dec;10(12 Suppl): S122-9.

Liu B, Zheng D, Jin Q, Chen L, Yang J. (2019). VFDB 2019: A comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Research*. 47:D687–D692

Livorsi DJ, Crispell E, Satola SW, Burd EM, Jerris R, Wang YF, Farley MM. (2012). Prevalence of *blaZ* Gene types and the Inoculum Effect with Cefazolin among Bloodstream Isolates of Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. p.4474 – 4477. Vol. 56. Number 8

Lowy F. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *The New England Journal of Medicine*. Vol. 339, No. 8. August 20. 520-532

Lowy F. (2003) Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*; 111 (9): 1265-1273.

Lozano C, Torres C. (2017). Actualización en la resistencia antibiótica en Gram positivos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 35(Supl 1):2-8

Luria, S. E. (1946). A test for penicillin sensitivity and resistance in *Staphylococcus*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 61(1), 46-51

Maiden M.C. (2006). Multilocus sequence typing bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 60: 561 - 88

Medina E, Goldmann O. (2018). *Staphylococcus aureus* strategies to evade the host acquired immune response. *International Journal of Medical Microbiology*. Aug;308(6): 625 – 630

Martineau F., Picard F.J., Lansac N., Ménard C., Roy P.H., Ouellette M., Bergeron M.G. (2000). Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Feb;44(2): 231 – 8.

McGuinness, W.A., Malachowa N., DeLeo F. (2017). Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale J Biol Med*. 90, pp. 269 – 281

---

McNeil JC, Sommer LM, Boyle M, Hogan P, Vallejo JG, Hultén KG, Flores AR, Kaplan SL, Fritz S. (2020). Cefazolin inoculum effect and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* osteoarticular infections in children. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 64: e00703-20.

Miller W.R., Seas C., Carvajal L.P., Diaz L., Echeverri A.M., Ferro C., Rios R., Porras P., Luna C., Gotuzzo E., Munita J.M., Nannini E., Carcamo C., Reyes J., Arias C.A. (2018). The cefazolin Inoculum Effect is Associated with increased mortality in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Open Forum Infectious Diseases*. Volume 5, Issue 6, June, ofy123

Monson LS. (2011). "Staphylococci". En Mahon CR., Lehman DC., Manuselis G (ed.). *Textbook of Diagnostic Microbiology*. 4<sup>th</sup> edition. p. 316 – 329. Maryland, Missouri. Elsevier.

Munita JM., Arias C. (2016) Mechanism of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*. April;4(2). doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.

Nannini EC., Singh KV., Murray BE. (2003). Relapse of Type A  $\beta$  - lactamase – producing *Staphylococcus aureus* Native Valve Endocarditis during Cefazolin Therapy: Revisiting the Issue. *Clinical Infectious Diseases*. 2003; 37:1194 - 8

Nannini E, Stryjewski ME, Singh KV, Rude TH., Corey GR., Fowler VG Jr., Murray BE. (2009) Inoculum Effect with Cefazolin among Clinical Isolates of Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: Frequency and Possible Cause of Cefazolin treatment Failure. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. Aug. 53(8); 3437-41.

Nightingale CH., Greene DS., Quintiliani. (1975) Pharmacokinetics and clinical use of cephalosporin antibiotics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Dec;64(12):1899-926. doi: 10.1002/jps.2600641202

Nishida, M., Matsubara, T., Murakawa, T., Mine, Y., Yokota, Y., Goto, S., Kuwahara, S. (1970). Cefazolin, a new semisynthetic cephalosporin antibiotic. II. *Journal of Antibiotics*, 23(3), 137-148

- Nulens, E., Stobberingh, E.E., van Dessel, H., Sebastian, S., van Tiel, F.H., Beisser, P.S., Deurenberg, R.H., (2008). Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates collected in a Dutch university hospital between 1999 and 2006. *Journal of Clinical Microbiology*. 46, 2438–2441
- O’Riordan K, (2004). Lee JC. *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. *Clinical Microbiology Reviews*. 17(1): 218. DOI: 10.1128/CMR.17.1.218-234.
- Otto M. (2012). MRSA virulence and spread. *Cell Microbiology*. October; 14(10): 1513 – 1521.doi:10.1111/j.11462.5822.2012.01832.x.
- Otto M. (2013). Community – associated MRSA: what makes them special? *International Journal of Medical Microbiology*. August; 303(0): 324-330.doi:10.1016/j.ijmm.2013.02.007
- Otto M. (2014) *Staphylococcus aureus* toxins. *Current Opinion in Microbiology*. February; 32-37 doi: 10.1016/j.mib.2013.11.004
- Otto M, Burhan AK., Yeh AJ., Cheung GY. (2015). Investigational therapies targeting quorum – sensing for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections. *Expert Opinion in Investigation Drugs*. May;24(5): 689 – 704. doi: 10.1517/13543784.2015.1019062.
- Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Xia F, Stevens R. (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research*. 42:206–214.
- Panesso D., Planet P.J., Díaz L, Hugonnet J.E., Tran T.T., Narechania A, Munita J.M., Rincón S, Carvajal L.P., Reyes J, Londoño A, Smith H, Sebra R, Deikus G, Weinstock G.M., Murray B.E, Rossi F, Arthur M, Arias C.A. (2015). Methicillin – susceptible, Vancomycin – Resistant *Staphylococcus aureus*, Brazil. *Emerg Infect Dis*. Oct; 21(10): 1844 – 8.
- Peterson A, C, Eliasson I, Kamme C, Miörner H. (1989). Evaluation of Four Qualitative Methods for Detection of Beta – lactamase Production in *Staphylococcus* and *Micrococcus* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. Vol.8, No. 11, p 962 – 967

---

Reymann, M. T., Hooley, H. P Jr., Cobbs, C.G. (1978). Persistent Bacteremia in Staphylococcal Endocarditis. *American Journal of Medicine*. Vol 65, 729-737.

Richmond, M. H. (1965). Wild – type variants of Exopenicillinase from *Staphylococcus aureus*. *Biochem Journal*. Mar;94(3): 584 – 93.

Richmond, M. H. (1975).  $\beta$  - Lactamase (*Staphylococcus aureus*). *Methods Enzymol*. 43:664 – 672

Rincón S., Reyes J., Carvajal L., Rojas N., Cortés F., Panesso D., Guzmán M., Zurita J., Adachi J.A., Murray B.E., Nannini E.C., Arias C.A. (2013). Cefazolin high – inoculum effect in methicillin – susceptible *Staphylococcus aureus* from South American hospitals. *J Antimicrobial Chemother*. Dec;68(12): 2773 – 8.

Rincón S, Carvajal LP, Gomez-Villegas SI, Echeverri AM, Rios R, Dinh A, Pedroza C, Ordoñez KM, Nannini E, Sun Z, Fowler VG, Murray BE, Miller WR, Palzkill T, Diaz L, Arias CA, Reyes J. (2021). A test for rapid detection of the cefazolin inoculum effect in methicillin – susceptible *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 59:e01938 - 20.

Seethaler M., Hertlein T., Wecklein B., Ymeraj A., Ohlsen K., Hilgeroth A. (2019). Novel Small-molecule Antibacterial against Gram-positive Pathogens of *Staphylococcus* and *Enterococcus* species. *Antibiotics*. 8, 210: doi:10.3390/antibiotics8040210

Song KH., Sook In J., Lee S., Sohee P, Kim EU., Park KH., Park WB., Choe PG., Kim YK., Kwak YG., Kim YS., Jang HC., Kiem S., Kim HI., Kim HB. (2019). Inoculum effect of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* against broad-spectrum beta-lactam antibiotics. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Jan;38(1):67-74. doi: 10.1007/s10096-018-3392-6.

Srinivasan, A., Dick, J.D., Perl T.M. (2002). Vancomycin Resistance in Staphylococci. *Clin Microbiol Rev*. Jul;15(3): 430 – 8.

Storgios P.J., Savchenko A. (2020). Molecular mechanism of vancomycin resistance. *Protein Science*; 29: 654 – 669.

Sunetra G., Maiden C.J. (2001). Exploring the evolution of diversity in pathogen populations. *Trends Microbiol.* Apr;9(4): 181 - 5

Sutcliffe I. (2011). New insights into the distribution of WXG100 protein secretion systems. *Antoine van Leeuwenhoek.* 99: 127 -131

Tam K, Torres V. (2018). *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. *Microbiology Spectrum* 7(2): GPP3-0039-2018

Tan L, Li SR, Jiang B, Hu XM and Li S (2018) Therapeutic Targeting of the *Staphylococcus aureus* Accessory Gene Regulator (*agr*) System. *Frontiers in Microbiology.* 9:55. doi: 10.3389/fmicb.2018.00055

Unnikrishnan M, Constantinidou C, Palmer T, Pallen MJ. (2017). The Enigmatic Esx Proteins: Looking Beyond Mycobacteria. *Trends in Microbiology.* Mar;25(3): 192 – 204

Urish KL., Cassat JE. (2020). *Staphylococcus aureus* osteomyelitis: bone, bugs and surgery. *Infection and Immunity.* Jun 22; 88(7): e00932-19. doi: 10.1128/IAI.00931-19

Vasquez MT., Lubkin A, Reyes T, Day CJ, Lacey K, Jennings MP., Torres VJ. (2020). Identification of a domain critical for *Staphylococcus aureus* LukED receptor targeting and lysis of erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry.* Dec 11; 295(50): 17241 - 17250

Visansirikul S, Kolodziej SA, Dmenchenko AV. (2020). *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides: a structural and synthetic perspective. *Organic and Biomolecular Chemistry Journal.* Feb 7;18(5): 783-798.

Voladri R.K., Kernodle D.S. (1998). Characterization of a chromosomal gene encoding type B  $\beta$  - lactamase in phage group II isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* Dec;42(12): 3163 – 8.

Wang S., Gilchrist A., Loukitcheva A., Plotkin B.J., Sigar IM., Gross AE., O'Donnell JN., Pettit N., Buros A., O'Driscoll T., Rhodes NJ., Bether C., Segreti J., Charnot-Katsikas A., Singh K., Scheetz MH. (2018). Prevalence of a Cefazolin Inoculum Effect Associated with *blaZ*

---

Genes Types among Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* Isolates from Four Major Medical Centers in Chicago. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. Jul 27;62 (8).

Weinstein, A. (1980). The Cephalosporins: Activity and Clinical use. *Drugs* 19: 137-154.

Wilke M, Hills TL., Zhang HZ., Chambers HF., Strynadka CJ. (2004). Crystal Structures of the Apo and Penicillin-acylated Forms of the BlaR1 B-lactam Sensor of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 279, No. 45. Nov 5, pp. 47278 – 47287.

Wong D., Wong T., Romney M., Leung V. (2016). Comparative effectiveness of  $\beta$ -lactam versus vancomycin empiric therapy in patients with methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) bacteremia. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. Apr 26; 15:27. doi: 10.1186/s12941-016-0143-3

Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67:2640–2644.

Zapun A., Contreras-Martel C., Vernet T. (2008) Penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactam resistance. *FEMS Microbiology Reviews* 32. 361-385

Zecconi A, Scali F. (2013). *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. *Immunology Letters*. Feb;150(1-2): 12-22

Zhang HZ., Hackbarth CJ., Chansky KM., Chambers HF. (2001). A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta – lactams in *Staphylococci*. *Science*. 291: 1962 – 1965.

Zygmunt D., Stratton C., Kernodle D. (1992). Characterization of Four  $\beta$  - lactamases Produced by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother*. Feb;36(2): 440 – 5.

## A. Anexo A. Lista de genes de virulencia

- (hlgA) gamma-hemolysin chain II precursor*
- (hlgC) gamma-hemolysin component C*
- (hlgB) gamma-hemolysin component B*
- (lukF-PV) Pantone-Valentine leukocidin chain F precursor*
- (lukS-PV) Pantone-Valentine leukocidin chain S precursor*
- (ebp) cell surface elastin binding protein*
- (sdrC) Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein*
- (sdrD) Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein*
- (sdrE) Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein*
- (fnbB) fibronectin-binding protein B*
- (fnbA) fibronectin-binding protein A*
- (icaR) ica operon transcriptional regulator IcaR*
- (icaA) N-acetylglucosaminyltransferase, involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis*
- (icaD) intercellular adhesion protein D, involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis*
- (icaB) N-deacetylase, involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis*
- (icaC) intercellular adhesion protein C, involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis*
- (clfA) Clumping factor A, fibrinogen-binding protein*
- (clfB) Clumping factor B, adhesin*
- (cna) collagen adhesin precursor*
- (hld) delta-hemolysin*
- (hly/hla) Alpha-Hemolysin precursor*
- (sspC) Staphostatin B*
- (sspB) staphopain cysteine proteinase SspB*
- (sspA) serine protease; V8 protease; glutamyl endopeptidase*
- (cap8A) capsular polysaccharide synthesis enzyme*
- (cap8B) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8B*
- (cap8C) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8C*
- (cap8D) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8D*
- (cap8E) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8E*
- (cap8F) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8F*

---

(cap8G) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8G  
(cap8H) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8H  
(cap8I) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8I  
(cap8J) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8J  
(cap8K) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8K  
(cap8L) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8L  
(cap8M) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8M  
(cap8N) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8N  
(cap8O) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8O  
(cap8P) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8P  
(spa) Immunoglobulin G binding protein A precursor  
(aur) zinc metalloproteinase aureolysin  
(hysA) hyaluronate lyase precursor  
(geh) glycerol ester hydrolase  
(isdB) iron-regulated surface determinant protein B, haemoglobin receptor  
(isdA) iron-regulated surface determinant protein A  
(isdC) iron-regulated surface determinant protein C  
(isdD) iron-regulated surface determinant protein D  
(isdE) iron-regulated surface determinant protein E  
(isdF) iron-regulated surface determinant protein F, ATP-binding-cassette-type transmembrane transporter  
(srtB) NPQTN specific sortase B  
(isdG) iron-regulated surface determinant protein G  
(sea) staphylococcal enterotoxin A precursor  
(selq) staphylococcal enterotoxin G precursor  
(selk) staphylococcal enterotoxin K precursor  
(sak) Staphylokinase precursor  
(hlyb) beta-hemolysin  
(map) extracellular proteins Map  
(eta) exfoliative toxin A  
(etb) exfoliative toxin B  
(seb) staphylococcal enterotoxin B  
(seh) staphylococcal enterotoxin H precursor  
(sed) staphylococcal enterotoxin D precursor  
(tsst-1) toxic shock syndrome toxin-1  
(essA) type VII secretion system protein EssA, monotopic membrane protein  
(esxA) type VII secretion system secreted protein EsxA  
(esaA) type VII secretion system protein EsaA  
(esaB) type VII secretion system protein EsaB  
(essB) type VII secretion system protein EssB, monotopic membrane protein  
(essC) type VII secretion system protein EssC, FtsK/SpolIIE family ATPase  
(esxC) type VII secretion system secreted protein EsxC

---

*(esxB)* type VII secretion system secreted protein EsxB  
*(vWbp)* secreted von Willebrand factor-binding protein precursor  
*(coa)* staphylocoagulase precursor  
*(adsA)* Adenosine synthase A  
*(sbi)* IgG-binding protein SBI  
*(chp)* chemotaxis-inhibiting protein CHIPS  
*(scn)* complement inhibitor SCIN  
*(lip)* triacylglycerol lipase precursor  
*(lukD)* leukotoxin  
*(sell)* staphylococcal enterotoxin L precursor  
*(sec)* staphylococcal enterotoxin C precursor  
*(esaE)* type VII secretion system chaperone protein  
*(esxD)* type VII secretion system secreted protein EsxD  
*(esaD)* type VII secretion system secreted protein, a nuclease toxin EsaD  
*(esaG1)* antitoxin protein EsaG  
*(esaG4)* antitoxin protein EsaG homolog  
*(esaG2)* antitoxin protein EsaG homolog  
*(esaG3)* antitoxin protein EsaG homolog  
*(esaG5)* antitoxin protein EsaG homolog  
*(esaG6)* antitoxin protein EsaG homolog  
*(esaG7)* antitoxin protein EsaG homolog  
*(esaG8)* antitoxin protein EsaG homolog  
*(esaG9)* antitoxin protein EsaG homolog



## B. Anexo B. Genes de virulencia encontrados en los aislamientos con presencia de EICz (n = 73)

GEN	A = 47					C = 25		D = 1
	BlaZ-2 (37)	BlaZ-4 (5)	BlaZ-10 (1)	BlaZ-14 (2)	BlaZ-17 (2)	BlaZ-1 (23)	BlaZ-13 (2)	BlaZ-12 (1)
<i>(hlgA) gamma-hemolysin chain II precursor</i>	37	5	1	2	2	23	0	1
<i>(hlgC) gamma-hemolysin component C</i>	36	5	1	2	2	23	0	1
<i>(hlgB) gamma-hemolysin component B</i>	37	5	1	2	2	23	2	1
<i>(lukF-PV) Panton-Valentine leukocidin chain F precursor</i>	0	1	0	0	0	2	2	0
<i>(lukS-PV) Panton-Valentine leukocidin chain S precursor</i>	0	1	0	0	0	2	2	0
<i>(ebp) cell surface elastin binding protein</i>	36	3	1	0	2	22	0	1
<i>(sdrC) Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein</i>	1	1	1	0	0	12	0	0

GEN	A = 47					C = 25		D = 1
	BlaZ-2 (37)	BlaZ-4 (5)	BlaZ-10 (1)	BlaZ-14 (2)	BlaZ-17 (2)	BlaZ-1 (23)	BlaZ-13 (2)	BlaZ-12 (1)
<i>(sdrD)</i> Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein	1	2	1	0	0	3	2	1
<i>(sdrE)</i> Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein	1	5	0	2	0	23	0	1
<i>(fnbB)</i> fibronectin-binding protein B	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>(fnbA)</i> fibronectin-binding protein A	1	1	0	0	0	1	0	0
<i>(icaR)</i> ica operon transcriptional regulator IcaR	32	5	1	2	2	22	1	1
<i>(icaA)</i> N-acetylglucosaminyltransferase, involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis	36	5	1	2	2	23	2	1
<i>(icaD)</i> intercellular adhesion protein D, involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis	37	5	1	2	2	23	2	1
<i>(icaB)</i> N-deacetylase, involved in polysaccharide intercellular adhesin (PIA) synthesis	37	5	1	2	2	20	2	1
<i>(icaC)</i> intercellular adhesion protein C, involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis	35	5	1	2	2	23	2	1
<i>(clfA)</i> Clumping factor A, fibrinogen-binding protein	0	0	0	0	0	2	0	0

GEN	A = 47					C = 25		D = 1
	BlaZ-2 (37)	BlaZ-4 (5)	BlaZ-10 (1)	BlaZ-14 (2)	BlaZ-17 (2)	BlaZ-1 (23)	BlaZ-13 (2)	BlaZ-12 (1)
<i>(clfB)</i> Clumping factor B, adhesin	0	0	0	0	0	4	0	0
<i>(cna)</i> collagen adhesin precursor	8	0	0	0	2	5	1	0
<i>(hld)</i> delta-hemolysin	35	5	1	0	2	20	1	1
<i>(hly/hla)</i> Alpha-Hemolysin precursor	36	5	1	2	2	23	2	1
<i>(sspC)</i> Staphostatin B	37	5	1	2	2	23	2	1
<i>(sspB)</i> staphopain cysteine proteinase SspB	37	5	1	2	2	23	2	1
<i>(sspA)</i> serine protease; V8 protease; glutamyl endopeptidase	37	5	1	0	2	19	2	1
<i>(cap8A)</i> capsular polysaccharide synthesis enzyme	35	5	1	2	2	23	2	1
<i>(cap8B)</i> capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8B	36	5	1	2	2	23	2	1
<i>(cap8C)</i> capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8C	37	5	1	2	2	23	2	1
<i>(cap8D)</i> capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8D	37	3	1	2	2	14	2	1
<i>(cap8E)</i> capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8E	37	5	1	2	2	23	2	1
<i>(cap8F)</i> capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8F	37	5	1	2	2	23	2	1

GEN	A = 47					C = 25		D = 1
	BlaZ-2 (37)	BlaZ-4 (5)	BlaZ-10 (1)	BlaZ-14 (2)	BlaZ-17 (2)	BlaZ-1 (23)	BlaZ-13 (2)	BlaZ-12 (1)
<i>(cap8G) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8G</i>	37	5	1	2	2	23	2	1
<i>(cap8H) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8H</i>	33	0	0	0	2	14	0	0
<i>(cap8I) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8I</i>	35	3	0	0	2	14	0	0
<i>(cap8J) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8J</i>	35	3	0	0	2	14	0	0
<i>(cap8K) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8K</i>	35	3	0	0	2	14	0	0
<i>(cap8L) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8L</i>	37	5	1	2	2	23	2	1
<i>(cap8M) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8M</i>	37	5	1	2	2	23	2	1
<i>(cap8N) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8N</i>	37	5	1	2	2	23	2	1
<i>(cap8O) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8O</i>	37	5	1	2	2	23	2	1
<i>(cap8P) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8P</i>	37	5	1	2	2	23	2	1
<i>(spa) Immunoglobulin G binding protein A precursor</i>	34	4	0	2	2	18	0	1
<i>(aur) zinc metalloproteinase aureolysin</i>	2	2	1	2	0	23	2	1

GEN	A = 47					C = 25		D = 1
	BlaZ-2 (37)	BlaZ-4 (5)	BlaZ-10 (1)	BlaZ-14 (2)	BlaZ-17 (2)	BlaZ-1 (23)	BlaZ-13 (2)	BlaZ-12 (1)
<i>(hysA) hyaluronate lyase precursor</i>	0	0	0	0	0	5	0	0
<i>(geh) glycerol ester hydrolase</i>	35	5	1	2	2	23	0	1
<i>(isdB) iron-regulated surface determinant protein B, haemoglobin receptor</i>	32	5	1	2	2	23	0	1
<i>(isdA) iron-regulated surface determinant protein A</i>	1	2	1	2	0	23	0	1
<i>(isdC) iron-regulated surface determinant protein C</i>	37	5	1	2	2	23	2	1
<i>(isdD) iron-regulated surface determinant protein D</i>	37	5	1	2	2	23	0	1
<i>(isdE) iron-regulated surface determinant protein E</i>	37	5	1	2	2	23	2	1
<i>(isdF) iron-regulated surface determinant protein F, ATP-binding-cassette-type transmembrane transporter</i>	37	5	1	2	2	23	2	1
<i>(srtB) NPQTN specific sortase B</i>	37	5	1	2	2	23	2	1
<i>(isdG) iron-regulated surface determinant protein G</i>	37	5	1	2	2	23	2	1
<i>(sea) staphylococcal enterotoxin A precursor</i>	22	0	0	0	0	10	0	0
<i>(selq) staphylococcal enterotoxin G precursor</i>	0	1	0	2	0	3	0	0

GEN	A = 47					C = 25		D = 1
	BlaZ-2 (37)	BlaZ-4 (5)	BlaZ-10 (1)	BlaZ-14 (2)	BlaZ-17 (2)	BlaZ-1 (23)	BlaZ-13 (2)	BlaZ-12 (1)
<i>(selk) staphylococcal enterotoxin K precursor</i>	0	1	0	2	0	3	0	0
<i>(sak) Staphylokinase precursor</i>	32	5	1	2	2	18	2	1
<i>(hly) beta-hemolysin</i>	37	5	1	2	2	23	2	1
<i>(map) extracellular proteins Map</i>	0	2	1	0	0	9	0	1
<i>(eta) exfoliative toxin A</i>	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>(etb) exfoliative toxin B</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>(seb) staphylococcal enterotoxin B</i>	0	0	0	2	0	1	0	0
<i>(seh) staphylococcal enterotoxin H precursor</i>	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>(sed) staphylococcal enterotoxin D precursor</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>(tsst-1) toxic shock syndrome toxin-1</i>	33	0	0	0	2	0	0	0
<i>(essA) type VII secretion system protein EssA, monotopic membrane protein</i>	36	5	1	2	2	23	2	1
<i>(esxA) type VII secretion system secreted protein EsxA</i>	36	5	1	2	2	23	2	1
<i>(esaA) type VII secretion system protein EsaA</i>	37	5	1	2	2	22	2	1
<i>(esaB) type VII secretion system protein EsaB</i>	37	5	1	2	2	23	2	1
<i>(essB) type VII secretion system protein EssB, monotopic membrane protein</i>	37	5	1	2	2	23	2	1

GEN	A = 47					C = 25		D = 1
	BlaZ-2 (37)	BlaZ-4 (5)	BlaZ-10 (1)	BlaZ-14 (2)	BlaZ-17 (2)	BlaZ-1 (23)	BlaZ-13 (2)	BlaZ-12 (1)
<i>(essC) type VII secretion system protein EssC, FtsK/SpoIIIE family ATPase</i>	1	5	1	2	0	16	2	1
<i>(esxC) type VII secretion system secreted protein EsxC</i>	1	5	1	2	0	16	2	1
<i>(esxB) type VII secretion system secreted protein EsxB</i>	1	5	1	2	0	16	2	1
<i>(vWbp) secreted von Willebrand factor-binding protein precursor</i>	0	2	1	2	0	10	0	1
<i>(coa) staphylocoagulase precursor</i>	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>(adsA) Adenosine synthase A</i>	37	1	1	0	2	23	0	1
<i>(sbi) IgG-binding protein SBI</i>	1	2	1	2	0	16	0	1
<i>(chp) chemotaxis-inhibiting protein CHIPS</i>	27	4	0	2	2	5	0	1
<i>(scn) complement inhibitor SCIN</i>	29	4	1	2	2	21	2	1
<i>(lip) triacylglycerol lipase precursor</i>	37	5	1	2	2	23	2	1
<i>(lukD) leukotoxin</i>	1	2	1	2	0	23	0	1
<i>(sell) staphylococcal enterotoxin L precursor</i>	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>(sec) staphylococcal enterotoxin C precursor</i>	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>(esaE) type VII secretion system chaperone protein</i>	2	5	1	2	0	16	2	1

GEN	A = 47					C = 25		D = 1
	BlaZ-2 (37)	BlaZ-4 (5)	BlaZ-10 (1)	BlaZ-14 (2)	BlaZ-17 (2)	BlaZ-1 (23)	BlaZ-13 (2)	BlaZ-12 (1)
<i>(esxD) type VII secretion system secreted protein EsxD</i>	2	5	1	2	0	16	2	1
<i>(esaD) type VII secretion system secreted protein, a nuclease toxin EsaD</i>	0	0	0	0	0	7	0	0
<i>(esaG1) antitoxin protein EsaG</i>	0	0	0	0	0	10	0	0
<i>(esaG4) antitoxin protein EsaG homolog</i>	0	0	0	0	0	7	0	0
<i>(esaG2) antitoxin protein EsaG homolog</i>	0	0	0	0	0	7	0	0
<i>(esaG3) antitoxin protein EsaG homolog</i>	0	0	0	0	0	7	0	0
<i>(esaG5) antitoxin protein EsaG homolog</i>	0	0	0	0	0	7	0	0
<i>(esaG6) antitoxin protein EsaG homolog</i>	0	0	0	0	0	4	0	0
<i>(esaG7) antitoxin protein EsaG homolog</i>	0	0	0	0	0	7	0	0
<i>(esaG8) antitoxin protein EsaG homolog</i>	0	0	0	0	0	5	0	0
<i>(esaG9) antitoxin protein EsaG homolog</i>	0	0	0	2	0	3	0	0

## C. Anexo C. Genes de virulencia encontrados en aislamientos sin presencia de EICz (n = 113)

GEN	A = 14				B = 37				C = 28			D = 1	Negativa Negativo (33)
	BlaZ-4 (14)	BlaZ-3 (12)	BlaZ-5 (13)	BlaZ-7 (5)	BlaZ-8 (1)	BlaZ-9 (3)	BlaZ-11 (2)	BlaZ-25 (1)	BlaZ1 (25)	BlaZ-13 (2)	BlaZ-24 (1)	BlaZ-12 (1)	
<i>(hlgA) gamma-hemolysin chain II precursor</i>	14	11	13	5	1	3	2	1	26	0	1	1	31
<i>(hlgC) gamma-hemolysin component C</i>	14	12	13	5	1	3	2	1	26	0	1	1	30
<i>(hlgB) gamma-hemolysin component B</i>	14	12	13	5	1	3	2	1	28	2	1	1	33
<i>(lukF-PV) Panton-Valentine leukocidin chain F precursor</i>	2	0	0	0	1	1	0	0	2	2	0	0	5
<i>(lukS-PV) Panton-Valentine leukocidin chain S precursor</i>	2	0	0	0	1	1	0	0	2	2	0	0	5
<i>(ebp) cell surface elastin binding protein</i>	9	8	13	4	1	3	1	0	26	0	1	1	27
<i>(sdrC) Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein</i>	3	0	1	2	1	2	0	0	14	0	1	0	12

GEN	A = 14				B = 37					C = 28			D = 1	Negativa Negativo (33)
	BlaZ-4 (14)	BlaZ-3 (12)	BlaZ-5 (13)	BlaZ-7 (5)	BlaZ-8 (1)	BlaZ-9 (3)	BlaZ-11 (2)	BlaZ-25 (1)	BlaZ1 (25)	BlaZ-13 (2)	BlaZ-24 (1)	BlaZ-12 (1)		
<i>(sdrD)</i> Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein	3	0	0	4	1	1	0	0	5	2	0	0	12	
<i>(sdrE)</i> Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein	12	7	12	2	1	1	1	1	20	0	1	1	24	
<i>(fnbB)</i> fibronectin-binding protein B	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	5	
<i>(fnbA)</i> fibronectin-binding protein A	2	1	3	0	0	0	0	0	4	0	0	0	7	
<i>(icaR)</i> ica operon transcriptional regulator IcaR	14	11	13	5	1	3	2	1	28	2	1	1	31	
<i>(icaA)</i> N-acetylglucosaminyltransferase, involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis	14	12	13	5	1	3	2	1	28	2	1	1	33	
<i>(icaD)</i> intercellular adhesion protein D, involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis	14	12	13	5	1	3	2	1	28	2	1	1	33	
<i>(icaB)</i> N-deacetylase, involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis	14	12	13	5	1	3	2	1	22	2	1	1	30	
<i>(icaC)</i> intercellular adhesion protein C, involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis	14	12	13	5	1	3	2	1	28	2	1	1	32	
<i>(clfA)</i> Clumping factor A, fibrinogen-binding protein	0	0	0	1	0	0	0	0	4	0	0	0	6	
<i>(clfB)</i> Clumping factor B, adhesin	0	2	0	0	0	1	0	0	5	0	0	0	7	
<i>(cna)</i> collagen adhesin precursor	2	3	0	0	0	0	0	0	7	1	0	0	0	

GEN	A = 14				B = 37					C = 28			D = 1	Negativa
	BlaZ-4 (14)	BlaZ-3 (12)	BlaZ-5 (13)	BlaZ-7 (5)	BlaZ-8 (1)	BlaZ-9 (3)	BlaZ-11 (2)	BlaZ-25 (1)	BlaZ1 (25)	BlaZ-13 (2)	BlaZ-24 (1)	BlaZ-12 (1)	Negativo (33)	
<i>(hld) delta-hemolysin</i>	14	9	12	5	1	3	2	1	28	2	1	1	31	
<i>(hly/hla) Alpha-Hemolysin precursor</i>	14	12	13	5	1	3	2	1	28	2	1	1	33	
<i>(sspC) Staphostatin B</i>	14	12	13	5	1	3	2	1	28	2	1	1	33	
<i>(sspB) staphopain cysteine proteinase SspB</i>	14	12	13	5	1	3	2	1	28	2	1	1	33	
<i>(sspA) serine protease; V8 protease; glutamyl endopeptidase</i>	12	10	11	4	1	3	2	1	26	2	1	1	29	
<i>(cap8A) capsular polysaccharide synthesis enzyme</i>	14	11	13	5	1	3	2	1	28	2	1	1	32	
<i>(cap8B) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8B</i>	14	12	13	5	1	3	2	1	28	2	1	1	33	
<i>(cap8C) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8C</i>	14	12	13	5	1	3	2	1	28	2	1	1	33	
<i>(cap8D) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8D</i>	10	12	13	5	1	2	2	1	24	2	1	1	27	
<i>(cap8E) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8E</i>	14	12	13	5	1	3	2	1	28	2	1	1	33	
<i>(cap8F) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8F</i>	14	12	13	5	1	3	2	1	28	2	1	1	33	
<i>(cap8G) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8G</i>	14	12	13	5	1	3	2	1	28	2	1	1	33	
<i>(cap8H) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8H</i>	2	3	0	4	0	0	0	0	20	0	1	0	11	
<i>(cap8I) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8I</i>	7	6	0	4	0	0	0	1	21	0	1	1	16	

GEN	A = 14				B = 37					C = 28			D = 1	Negativa Negativo (33)
	BlaZ-4 (14)	BlaZ-3 (12)	BlaZ-5 (13)	BlaZ-7 (5)	BlaZ-8 (1)	BlaZ-9 (3)	BlaZ-11 (2)	BlaZ-25 (1)	BlaZ1 (25)	BlaZ-13 (2)	BlaZ-24 (1)	BlaZ-12 (1)		
<i>(cap8J) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8J</i>	7	6	0	4	0	0	0	1	21	0	1	1	16	
<i>(cap8K) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8K</i>	7	6	0	4	0	0	0	1	21	0	1	1	16	
<i>(cap8L) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8L</i>	14	12	13	5	1	3	2	1	28	2	1	1	33	
<i>(cap8M) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8M</i>	14	12	13	5	1	3	2	1	28	2	1	1	33	
<i>(cap8N) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8N</i>	14	12	13	5	1	3	2	1	28	2	1	1	33	
<i>(cap8O) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8O</i>	14	12	13	5	1	3	2	1	28	2	1	1	33	
<i>(cap8P) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8P</i>	14	12	13	5	1	3	2	1	28	2	1	1	33	
<i>(spa) Immunoglobulin G binding protein A precursor</i>	11	2	11	4	1	1	0	0	18	0	0	0	20	
<i>(aur) zinc metalloproteinase aureolysin</i>	9	8	13	4	1	3	2	0	27	2	1	0	28	
<i>(hysA) hyaluronate lyase precursor</i>	0	5	0	0	0	0	0	0	10	0	1	0	6	
<i>(geh) glycerol ester hydrolase</i>	14	12	13	5	1	3	2	1	26	0	1	0	31	
<i>(isdB) iron-regulated surface determinant protein B, haemoglobin receptor</i>	14	12	13	5	1	3	2	1	26	0	1	1	31	
<i>(isdA) iron-regulated surface determinant protein A</i>	9	9	13	4	1	3	1	0	25	0	1	1	26	

GEN	A = 14				B = 37					C = 28			D = 1	Negativa
	BlaZ-4 (14)	BlaZ-3 (12)	BlaZ-5 (13)	BlaZ-7 (5)	BlaZ-8 (1)	BlaZ-9 (3)	BlaZ-11 (2)	BlaZ-25 (1)	BlaZ1 (25)	BlaZ-13 (2)	BlaZ-24 (1)	BlaZ-12 (1)	Negativo (33)	
<i>(isdC) iron-regulated surface determinant protein C</i>	14	12	13	5	1	3	2	1	28	2	1	1	33	
<i>(isdD) iron-regulated surface determinant protein D</i>	14	12	13	5	1	3	2	1	26	0	1	1	31	
<i>(isdE) iron-regulated surface determinant protein E</i>	14	12	13	5	1	3	2	1	28	2	1	1	33	
<i>(isdF) iron-regulated surface determinant protein F, ATP-binding-cassette-type transmembrane transporter</i>	14	12	13	5	1	3	2	1	28	2	1	1	33	
<i>(srtB) NPQTN specific sortase B</i>	14	12	13	5	1	3	2	1	28	2	1	1	33	
<i>(isdG) iron-regulated surface determinant protein G</i>	14	12	13	5	1	3	2	1	28	2	1	1	33	
<i>(sea) staphylococcal enterotoxin A precursor</i>	1	2	2	0	0	0	0	0	7	0	0	0	3	
<i>(selq) staphylococcal enterotoxin G precursor</i>	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	5	
<i>(selk) staphylococcal enterotoxin K precursor</i>	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	5	
<i>(sak) Staphylokinase precursor</i>	14	12	13	4	1	2	2	1	20	2	1	1	29	
<i>(hly) beta-hemolysin</i>	14	12	11	5	1	3	2	1	28	2	1	1	33	
<i>(map) extracellular proteins Map</i>	4	0	0	0	1	1	0	0	4		0	0	5	
<i>(eta) exfoliative toxin A</i>	0	2	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	2	
<i>(etb) exfoliative toxin B</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>(seb) staphylococcal enterotoxin B</i>	1	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	5	

GEN	A = 14				B = 37					C = 28			D = 1	Negativa
	BlaZ-4 (14)	BlaZ-3 (12)	BlaZ-5 (13)	BlaZ-7 (5)	BlaZ-8 (1)	BlaZ-9 (3)	BlaZ-11 (2)	BlaZ-25 (1)	BlaZ1 (25)	BlaZ-13 (2)	BlaZ-24 (1)	BlaZ-12 (1)	Negativo (33)	
<i>(seh) staphylococcal enterotoxin H precursor</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	5	
<i>(sed) staphylococcal enterotoxin D precursor</i>	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	
<i>(tsst-1) toxic shock syndrome toxin-1 (essA) type VII secretion system protein EssA, monotopic membrane protein</i>	1	3	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	
<i>(esxA) type VII secretion system secreted protein EsxA</i>	14	12	13	5	1	3	1	1	28	2	1	1	33	
<i>(esaA) type VII secretion system protein EsaA</i>	14	12	13	5	1	3	2	1	28	2	1	1	33	
<i>(esaB) type VII secretion system protein EsaB</i>	14	12	13	5	1	3	2	1	28	2	1	1	33	
<i>(essB) type VII secretion system protein EssB, monotopic membrane protein</i>	13	12	13	5	1	3	2	1	28	2	1	1	31	
<i>(essC) type VII secretion system protein EssC, FtsK/SpoIIIE family ATPase</i>	14	11	13	4	1	3	2	1	15	2	0	1	30	
<i>(esxC) type VII secretion system secreted protein EsxC</i>	14	11	13	4	1	3	2	1	15	2	0	1	30	
<i>(esxB) type VII secretion system secreted protein EsxB</i>	14	11	13	4	1	2	2	1	16	2	0	1	30	
<i>(vWbp) secreted von Willebrand factor-binding protein precursor</i>	4	0	0	0	1	1	0	0	7	0	0	0	11	
<i>(coa) staphylocoagulase precursor</i>	0	0	0	4	0	0	0	0	3	0	0	0	7	

GEN	A = 14				B = 37					C = 28			D = 1	Negativa
	BlaZ-4 (14)	BlaZ-3 (12)	BlaZ-5 (13)	BlaZ-7 (5)	BlaZ-8 (1)	BlaZ-9 (3)	BlaZ-11 (2)	BlaZ-25 (1)	BlaZ1 (25)	BlaZ-13 (2)	BlaZ-24 (1)	BlaZ-12 (1)	Negativo (33)	
<i>(adsA)</i> Adenosine synthase A	6	9	0	4	1	3	1	0	24	0	1	0	16	
<i>(sbi)</i> IgG-binding protein SBI	9	0	12	4	1	1	0	0	12	0	0	0	22	
<i>(chp)</i> chemotaxis-inhibiting protein CHIPS	10	9	11	1	1	1	1	1	7	0	0	1	17	
<i>(scn)</i> complement inhibitor SCIN	13	12	13	1	1	2	2	1	25	2	0	1	29	
<i>(lip)</i> triacylglycerol lipase precursor	14	12	13	5	0	2	2	1	28	2	1	1	33	
<i>(lukD)</i> leukotoxin	9	8	13	4	1	1	1	0	25	0	1	0	25	
<i>(sell)</i> staphylococcal enterotoxin L precursor	1	7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
<i>(sec)</i> staphylococcal enterotoxin C precursor	1	7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
<i>(esaE)</i> type VII secretion system chaperone protein	14	11	13	4	1	3	2	1	15	2	0	1	30	
<i>(esxD)</i> type VII secretion system secreted protein EsxD	14	11	13	4	1	3	2	1	16	2	0	1	30	
<i>(esaD)</i> type VII secretion system secreted protein, a nuclease toxin EsaD	5	7	13	0	0	2	2	0	8	0	0	0	15	
<i>(esaG1)</i> antitoxin protein EsaG	5	0	13	0	0	2	1	0	13	0	0	0	15	
<i>(esaG4)</i> antitoxin protein EsaG homolog	2	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	5	
<i>(esaG2)</i> antitoxin protein EsaG homolog	2	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	5	
<i>(esaG3)</i> antitoxin protein EsaG homolog	2	4	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	5	

GEN	A = 14				B = 37					C = 28			D = 1	Negativa Negativo (33)
	BlaZ-4 (14)	BlaZ-3 (12)	BlaZ-5 (13)	BlaZ-7 (5)	BlaZ-8 (1)	BlaZ-9 (3)	BlaZ-11 (2)	BlaZ-25 (1)	BlaZ1 (25)	BlaZ-13 (2)	BlaZ-24 (1)	BlaZ-12 (1)		
<i>(esaG5) antitoxin protein EsaG homolog</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	5	
<i>(esaG6) antitoxin protein EsaG homolog</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	2	
<i>(esaG7) antitoxin protein EsaG homolog</i>	2	2	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	3	
<i>(esaG8) antitoxin protein EsaG homolog</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4	
<i>(esaG9) antitoxin protein EsaG homolog</i>	4	0	12	4	0	2	0	0	6	0	0	0	15	

## D. Anexo D. Genes de Resistencia antibiótica en aislamientos con presencia de EICz (n = 73)

GEN	A = 47					C = 25		D = 1
	BlaZ-2 (37)	BlaZ-4 (5)	BlaZ-10 (1)	BlaZ-14 (2)	BlaZ-17 (2)	BlaZ-1 (23)	BlaZ-13 (2)	BlaZ-12 (1)
<i>GyrA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>ParC</i>	1	3	0	0	0	0	0	0
<i>rpoB</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>aac(3)-II</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>aac(6')-aph(2'')</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>aadD</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>ant(9)-Ia</i>	4	0	0	0	0	0	0	0
<i>aph(2'')-Ia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>aph(3')-III</i>	0	0	0	0	0	4	0	1
<i>blaZ</i>	35	5	1	2	2	23	2	1
<i>dfrA8</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>erm(A)</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>erm(C)</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>erm(T)</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>fusB</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>lnu(A)</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>mph(C)</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>msr(A)</i>	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>sul2</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>tet(K)</i>	0	0	0	0	0	4	0	1
<i>tet(M)</i>	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>tet(S/M)</i>	0	0	0	0	0	1	0	0



