
***EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR
Y MECANISMOS DE
PATOGENÉNESIS DE
Staphylococcus aureus
RESISTENTES A METICILINA***

Implicancias de la colonización, transmisión e infección

Sobre pacientes que se internan

-2019-

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA



**Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e
Inmunología (CIBICI) CONICET
Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de
Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba,
Argentina.**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS QUÍMICAS**

Tesista: Bioquímico Esp. Danilo Andrés Barcudi.

Director: Dra. Claudia Sola.

2019

Director de tesis: Dra. Claudia Sola

Miembros de la comisión de tesis:

Dr. José Luis Bocco

Dra. Andrea Smania

Dra. M. Cecilia Becerra

Evaluador externo:

Dra. Sonia Gomez

Este trabajo de tesis contó con el apoyo del Consejo Nacional de Investigación y Tecnología de Argentina (CONICET), el Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad Nacional de Córdoba (FONCyT-UNC) y la Secretaría de Ciencia y Tecnología, de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-UNC).

A Silvina

A mis hijos...

“...Pero enseguida noté que si yo pensaba que todo era falso, yo, que pensaba, debía ser alguna cosa, debía tener alguna realidad; y viendo que esta verdad: *Pienso, luego existo* era tan firme y tan segura que nadie podría quebrantar su evidencia, la recibí sin escrúpulo alguno como el primer principio de la filosofía que buscaba”. **(R. Descartes, Discurso del Método)**

“El andar regala vida, el vagar regala abandono, diferencia que de asomo, tal vez lo invite a pensar, pero puedo asegurar que el que vive es uno solo. Andar y andar por andar es quedarse donde está, el hombre debe avanzar y aprender cuanto pueda, vive aquel que no se queda, el otro, el otro dura nomás”. **(J. Larralde, Herencia Pa’ un hijo Gaucho)**

AGRADECIMIENTOS

El haber llegado a esta instancia, me hace reflexionar en el hecho de que nada podría haber sido posible, si no hubiese contado con el apoyo de muchas personas, que seguramente, en estos pocos renglones no voy a poder incluir en su totalidad, pero aun así, no quiero dejar de agradecerles.

En primer lugar, mi directora de tesis, Dra. Claudia Sola, quien siempre me brindo todo su apoyo, me dio la posibilidad de unirme a su grupo de trabajo y a sus proyectos de investigación brindándome no solo calidad científica sino también calidad humana.

Quiero agradecer a los miembros de la comisión evaluadora de tesis, Dr. José Luis Bocco, Dra. Andrea Smania y Dra. María Cecilia Becerra, por su tiempo, dedicación y aportes para poder avanzar año a año en este proyecto.

A la Dra. Sonia Gomez, quien aceptó la tarea de ser evaluadora externa de este proyecto de tesis y por las correcciones finales que junto a la de los miembros de la comisión permitieron presentar un trabajo acabado y de calidad científica.

A los profesores del laboratorio 119-120, Dres. José Luis Bocco, Alex Saka, José Echenique, Cecilia Alvarez, Susana Genti, Graciela Panzetta, y Gastón Soria, de quienes aprendí un poco de cada uno, no solo de la parte científica, sino también de lo personal.

A mi gran compañera de mesada Ana Lia! de quien aprendí prácticamente todo el manejo del trabajo diario y con quien compartí muchísimos momentos de charlas, alegrías y tristezas, a mis queridos amigos Nubia, Cristian, Mariano y el flaco Emi, con quienes compartí almuerzos en donde la "filosofía barata y zapatos de goma" nos hacía volver al trabajo diario de la mejor manera!

Quiero agradecer particularmente a Paulo, mi gran instructor de la especialidad con quien comencé a estudiar el mundo bacteriológico y de quien aprendí las bases que me despertaron la curiosidad en la investigación científica, así como el excelente grupo humano y profesional del Hospital Pediátrico, especialmente Pato, Vale y Guille.

A los chicos del laboratorio 119-120, excelentes personas y profesionales, gracias por hacer el día a día, más fácil y agradable! Pablo, Cande, Flor, Ale G., MiniLU, Mari, Ruso, Andrea, Lucille, Anita, Lauri, Mariano, Lu Reyna, Nico, Emi, Mire, Nadia, Crico (por los debates de literatura), a las chicas de cultivo celular Gabi, Lau y Ale, por su paciencia y enseñanza en mi pasaje por cultivo. A todos aquellos que ya partieron a otros destinos, Meli, Hernan, jesi, magui y Ale moyano!

Quiero agradecer también a las chicas de posgrado, especialmente a Betina, por su paciencia y organización para que todo el proceso académico salga en tiempo y forma!

A todos los Hospitales que participaron en los proyectos involucrados en este trabajo de investigación, así como los integrantes del servicio de antimicrobianos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas Carlos G. Malbrán, especialmente a la Dra. Alejandra Corso.

Al grupo del Dr. Christian Magni, especialmente a Victor y Gabriela, por los ensayos en *G.mellonella*, realizados en el IBR de la ciudad de Rosario.

Al Instituto de Cálculo de la facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA, en especial a Ezequiel Sosa por su aporte en el análisis bioinformático y su disponibilidad en todo momento, a Darío Fernandez Do Porto y Adrián Turjansky.

Al grupo de investigación del Dr. Marcus Zervos, del Hospital Henry Ford y Wayne State University de Detroit, E.E. U.U., especialmente a Cecilia y su flia que me recibieron en mi pasantía para la capacitación en el análisis de WGS.

Agradezco a mis amigos de la vida Carlos, Turco, Lalo, Gonza, Maurito y Leo, con quienes disfruto cada vez que vuelvo a San Rafael de comer un asado, recordar viejas épocas y sentir que seguimos siendo las mismas personas a pesar del paso de los años!

A mis amigos “Cordobeses” del club del costillar, Dani, Tomas, Horacio, Fer, Dieguito, Leo, Mariano, José, Seba, Leito, David, Lucho, pulpo y Eze (Gracias por imprimir la tesis!), por siempre encontrar un motivo para juntarse a celebrar algo.

A los amigos que me dio la facu, Edu, Ferchu, Garny, Matuco, Fabri y Marquitos! Gracias por el apoyo y por las guitarreadas del recuerdo!

A mi gran Familia, el pilar fundamental de mi vida, mis padres, Rubén y Nora, por darme los dos regalos más importantes que puedo haber recibido, primero la vida y luego la libertad para vivirla. A mis hermanos Diego, Pame, Dario y David, por el amor, el ejemplo y la admiración que les tengo! A mi abuela Erci por las charlas, las historias que siempre disfruto mate de por medio, a mi tía Mirta por el cariño y las “baklawa” incomparables. A mis primos queridos javi y Esteban, por la unión más allá de las distancias y la felicidad de los reencuentros, a las primas y asociadas, Adri, Ale, Vero y Marianella y a mis sobrinos Karim, joaco, Emi, Nahiara, Farid, Antonella y Cata!

Finalmente, quiero agradecerle a Silvina, por la hermosa familia que hemos formado, por su paciencia (especialmente en esta última etapa) y el amor que nos mantiene unidos, haciendo que cualquier día gris parezca soleado.

A mi hijo Astor, la razón de mi vida, por la inigualable sensación de llegar a casa y que me reciba con un abrazo, haciendo que todo tenga sentido y sea posible.

Y a nuestro pequeño retoño que viene en camino, que sin siquiera conocerte ya te amamos y esperamos ansiosos!

Índice

1. ABREVIATURAS.....	I
2. RESUMEN.....	V
3. ABSTRACT	VIII
4. INTRODUCCIÓN	1
4.1 <i>Staphylococcus aureus</i> : CARACTERÍSTICAS GENERALES	2
4.2 ORGANIZACIÓN GENÓMICA.....	3
4.2.1 CORE CONSERVADO (CCN)	3
4.2.2 CORE VARIABLE (CV).....	3
4.2.3 GENOMA ACCESORIO (GA)	6
4.3 FACTORES DE VIRULENCIA (FV).....	12
4.3.1 COMPONENTES SUPERFICIALES	12
4.3.2 TOXINAS Y ENZIMAS EXTRACELULARES	15
4.3.3 OTROS FACTORES DE VIRULENCIA.....	20
4.4 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA	21
4.4.1 SISTEMA Agr (<i>accessory gene regulator</i>).....	22
4.5 MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE VIRULENCIA EN <i>S. aureus</i>	24
4.5.1 USO DE <i>Galleria mellonella</i> COMO MODELO DE VIRULENCIA COMPARATIVA	24
4.6 COLONIZACIÓN Y TRANSMISIÓN	25
4.6.1 COLONIZACIÓN	25
4.6.2 RESERVORIO Y TRANSMISIÓN	26
4.7 INFECCIONES POR <i>S. aureus</i>	28
4.8. EPIDEMIOLOGÍA GENERAL Y MOLECULAR DE <i>S. aureus</i>	28
4.8.1 MÉTODOS MOLECULARES DE TIPIFICACIÓN	29
4.9 MRSA: EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR.....	31
4.9.1 CLASIFICACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE MRSA	32
4.10 RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS.....	37

4.10.1 ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS.....	37
4.10.2 VANCOMICINA.....	38
4.10.3 LINEZOLID	39
4.10.4 DAPTOMICINA	40
4.10.5 TIGECICLINA	40
4.10.6 MUPIROCINA	41
4.10.7 AMINOGLUCÓSIDOS.....	42
4.10.8 MACRÓLIDOS, LINCOSAMIDAS Y ESTREPTOGRAMINAS.....	42
4.10.9 FLUOROQUINOLONAS (FQ).....	43
4.10.10 RIFAMPICINA	43
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	45
6. HIPÓTESIS	47
7. OBJETIVO GENERAL.....	48
7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
7.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS RELACIONADOS AL OBJETIVO GENERAL Etapa I	48
7.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS RELACIONADOS AL OBJETIVO GENERAL Etapa II ...	49
7.1.3 OBJETIVO ESPECÍFICO RELACIONADO AL OBJETIVO GENERAL Etapa III	49
8. RESULTADOS.....	50
8.1 RESULTADOS DE LA ETAPA I.....	51
8.1.1 RESULTADOS relacionados al objetivo específico <i>Ia</i> :.....	52
8.1.2 RESULTADOS relacionados al objetivo específico <i>Ib</i>	57
8.1.3 RESULTADOS relacionados al objetivo específico <i>Ic</i>	62
8.1.4 RESULTADOS relacionados al objetivo específico <i>Id</i>	65
8.1.5 CONCLUSIONES GENERALES DE LOS RESULTADOS DE LA ETAPA I	72
8.2 RESULTADOS DE LA ETAPA II.....	73
8.2.1 RESULTADOS relacionados al objetivo específico <i>IIa</i>	74
8.2.2 RESULTADOS relacionados al objetivo específico <i>IIb</i>	82
8.2.3 RESULTADOS del objetivo específico <i>IIc</i>	93

8.2.4 RESULTADOS relacionados al objetivo <i>IId</i>	100
8.2.5 CONCLUSIONES GENERALES DE LOS RESULTADOS DE LA ETAPA II	110
8.3 RESULTADOS DE LA ETAPA III.....	113
8.3.1 RESULTADOS relacionados al objetivo específico III <i>a</i>	114
8.3.2 RESULTADOS relacionados al objetivo específico III <i>b</i>	127
8.3.3 CONCLUSIONES GENERALES DE RESULTADOS III	130
9. DISCUSIÓN	131
10. MATERIALES Y MÉTODOS	153
10.1 Etapa I	153
10.1.1 Diseño del estudio	153
10.1.2. Procedimientos del estudio	156
10.1.2 DEFINICIONES UTILIZADAS EXCLUSIVAMENTE EN LOS RESULTADOS DE LA ETAPA I.....	158
10.1.2.1 Tipos de colonización de los pacientes	158
10.2 LISTA DE ABREVIATURAS Y DEFINICIONES UTILIZADAS EN LAS ETAPAS I, II y III	159
10.2.1 DEFINICIONES MICROBIOLÓGICAS PARA MRSA	159
10.2.2 DEFINICIONES GENOTÍPICAS PARA MRSA.....	159
10.2.2.1 GENOTIPOS CA-MRSA (CA-MRSA _G).....	159
10.2.3 DEFINICIONES EPIDEMIOLÓGICA DE LAS INFECCIONES SEGÚN SITIO DE ADQUISICIÓN DE LA CEPA (MRSA Y MSSA).	159
10.3 ETAPA II.....	160
10.3.1 Diseño del estudio y definición de caso.	160
10.3.2 Características de los hospitales	161
10.3.3 Algoritmo de trabajo	163
10.3.4 Aislamientos bacterianos y pruebas de sensibilidad antimicrobianas.....	164
10.4 ETAPA III.....	164
10.4.1 Objetivo específico <i>IIla</i>	164

10.4.2 Objetivo específico <i>IIIb</i>	170
10.5 TIPIFICACIÓN MOLECULAR.....	172
10.5.1 DETECCIÓN DEL GEN <i>mecA</i> y <i>mecC</i> POR PCR MULTIPLEX:.....	172
10.5.2 ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO o <i>pulsed-field gel electrophoresis</i> (PFGE):.....	173
10.5.3 TIPIFICACIÓN DE LA REGIÓN POLIMÓRFICA “X” DEL GEN <i>spa</i> :	176
10.5.4 TIPIFICACIÓN POR MLST:	177
10.5.5 DETERMINACIÓN DEL TIPO DE SCC <i>mec</i> (<i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i>).....	179
10.5.6 SUBTIPADO DEL <i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec IV</i>	181
10.5.7 DETECCIÓN POR PCR DE LA PRESENCIA DE GENES DE VIRULENCIA	183
10.5.8 SECUENCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO (<i>Whole-genome sequencing, WGS</i>)	184
10.5.9 DETECCIÓN POR PCR DEL GEN <i>Sspa</i>	185
10.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	185
11 BIBLIOGRAFÍA	187

1. ABREVIATURAS

A

Å: ángstrom

ACME: Elemento catabólico móvil de la arginina

ADM-C: hisopado nasal al ingreso

Agr: regulador global accesorio

ATBs: Antibióticos

B

Bp: pares de base

BPR: ceftobiprol

C

CACO: Infecciones de inicio en la comunidad asociadas a la comunidad

CAI: infecciones asociadas a la comunidad

CA-MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina asociado a la comunidad

CA-MRSA_G: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina asociado a la comunidad genotipificado

CC: complejo clonal

CCN: genoma core conservado

ccr: recombinasas del cassette cromosomal

CDC: Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades

CHL: Cloranfenicol

CIM: concentración inhibitoria mínima

CIP: Ciprofloxacina

CK10: citoqueratina 10 tipo I de humanos

CLSI: Instituto de normas clínicas y de laboratorio

CO: inicio en la comunidad

CPs: Polisacárido capsular

CPT: Ceftarolina

CV: CORE VARIABLE

D

DIS-C: hisopado nasal de egreso

E

Egc: Cluster de enterotoxina

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva

ERY: eritromicina

ETS: Toxina exfoliativa de *Staphylococcus*

EUCAST: Comité Europeo de pruebas de sensibilidad antimicrobiana

F

FnBP: Proteínas de unión a fibronectina

FQ: fluoroquinolonas

FV: Factores de virulencia

G

GA: genoma accesorio

GEN: gentamicina

GI: Islas genómicas

H

HACO: Infecciones asociadas al hospital de inicio en la comunidad

HAHO: Infecciones asociadas al hospital de inicio en el hospital

HAI: infecciones asociadas al hospital

HA-MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina asociado al hospital

HA-MRSA_G: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina asociado al hospital genotipificado

HGT: genes de transferencia horizontal

hl: hemolisina

HO: inicio en el hospital

HRF: factores de riesgo asociados al hospital

hVISA: sensibilidad intermedia a la vancomicina heterogénea

HVR: regiones hipervariables

I

IC: intervalo de confianza

IEC: cluster de evasión inmune

IS: secuencias de inserción

K

Kb: kilo base

KDa: kilo Dalton

L

LA-MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina asociado al ganado

M

mecA: gen que codifica para PBP2' confiriendo resistencia a meticilina

- Mecl: proteína represora de la expresión de *mecA*
- MecRI: proteína de traducción de señal para el gen *mecA*
- MGE: elementos genéticos móviles
- MHC: complejo mayor de histocompatibilidad
- MIN: Minociclina
- MLSB: macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B
- MLSBc: MLSB constitutivo
- MLSBi: MLSB inducible
- MLST: Tipificación por secuenciación de Múltiples Locus
- MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina
- MSCRAMMs: Componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas de matriz adhesiva
- MSSA: *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina
- N**
- NA: No aplicable.
- NBI: necesidad básica insatisfecha
- NGS: Secuenciación de última generación
- O**
- OR: Odd Ratio
- Orf*: marco de lectura abierta
- P**
- PBP: Proteína unidora de penicilina
- PC: Presión de colonización
- PFGE: Electroforesis en Campo Pulsado
- PL: Plásmido
- PMN: leucocitos polimorfonucleares
- PSM: modulinas solubles en fenol
- PVL: Leucocidina de Pantón-Valentine
- R**
- RIF: Rifampicina
- RNAIII*: efector de regulación genómica
- Rot*: represor de toxinas
- S**
- S. aureus*: *Staphylococcus aureus*
- SAg: superantígeno

SaPI_n: isla de patogenicidad

Sar: regulador accesorio de *Staphylococcus*

SCC_{mec}: Cassette Cromosomal de *Staphylococcus mec*

SE: Enterotoxinas de *Staphylococcus*

Smal: enzima tipo endonucleasa de restricción

SNPs: polimorfismo de nucleótidos simple

SpaA: Proteína A de *Staphylococcus*

SSSS: síndrome de la piel escaldada

ST: tipo secuencial

T

TE: elementos transponibles

TMS: Trimetoprima/Sulfametoxazol

Tn: transposones

tnp: transposasas

Tst: Toxina del shock tóxico de *Staphylococcus*

V

vanA: gen que confiere resistencia a vancomicina

VISA: sensibilidad intermedia a la vancomicina

VNTR: repeticiones en tandem de número variable

VRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a la vancomicina

VWF: factor de Von Willebrand

W

WGS: Secuenciación de genomas completos

W-INF: muestra de herida

SÍMBOLOS

βC-Φs bacteriófagos convertidores de β-hemolisina

φSa: integrasas de *Staphylococcus aureus*

2. RESUMEN

La diseminación de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) resistente a la meticilina (MRSA) es una preocupación mundial tanto en los hospitales (HA-MRSA) como en la comunidad (CA-MRSA). El conocimiento sobre cuándo y dónde se adquiere la colonización de MRSA y qué clones están involucrados, ayudaría a concentrar esfuerzos para la prevención de las infecciones adquiridas en el hospital por MRSA, especialmente en América Latina, donde los datos son escasos. Además, existe limitada evidencia de la prevalencia, epidemiología molecular y factores de riesgo (FR) para la colonización por MRSA al ingreso, discriminados por genotipos CA-MRSA y HA-MRSA (CA-MRSA_G y HA-MRSA_G). Por esto, en la primera parte de esta tesis, se llevó a cabo un estudio multicéntrico en 8 instituciones de Córdoba, durante 3 meses, con el fin de analizar las implicancias de la colonización por CA-MRSA_G, comparativamente con HA-MRSA_G y *S. aureus* sensibles a meticilina (MSSA), en los pacientes que se hospitalizan. De 1419 pacientes hospitalizados, se obtuvo una prevalencia de colonización por MRSA de 4,2% (n: 60) en la admisión, con mayor proporción en pediatría que en adultos (6,1% vs 2,5%), dada por una mayor proporción de CA-MRSA_G (4,8%) comparada con la de adultos (1,9%), $p=0,002$. Los clones MRSA más frecuentes en la admisión fueron, CA-MRSA_G: I-ST5-IV (n: 17, 28,3%), N-ST30-IV (n: 12, 20%), y HA-MRSA_G: C-ST100-IV (n: 9, 15%). Se identificaron FR para colonización por MRSA, discriminando FR para CA-MRSA_G de FR para HA-MRSA_G. Esta diferencia en los FR, implica diferentes orígenes y nichos de transmisión de ambos genotipos, y avala la importancia de conocer los genotipos prevalentes en una población, a la hora de llevar a cabo el “screening” de MRSA en la admisión, para implementar medidas de control de infección que reduzcan la transmisión y consecuentemente las infecciones adquiridas en el hospital. Se detectaron 10 casos de adquisiciones hospitalarias, todas ellas por CA-MRSA_G demostrando la circulación y adquisición de estas cepas dentro del hospital, donde los clones más frecuentes fueron: I-ST5-IV (n: 4, 40%), N-ST30-IV (n: 2, 20%), R-ST72-IV (n: 2, 20%), QQ-ST1649-IV (n: 1, 10%). Por lo tanto, se demostró que estos clones, se adquieren y probablemente se transmiten, causando infecciones adquiridas en los hospitales, siendo la comunidad el principal reservorio. Estas infecciones, son prevenibles y, por lo tanto, son objetivos para un programa de control de infecciones en el hospital y la comunidad.

A su vez, con el fin de estudiar la evolución en el tiempo de la epidemiología molecular de las infecciones por MRSA en nuestro país, desde los primeros estudios de vigilancia realizados por nuestro grupo de investigación, se llevó a cabo un estudio de carácter prospectivo multicéntrico a nivel nacional en abril de 2015, en 61 hospitales de 20 provincias. Se analizaron 668 casos de infecciones por *S. aureus*, utilizando definiciones epidemiológicas de las infecciones

causadas por MRSA, de acuerdo al origen de la infección, hospital (HO) o comunidad (CO). Se determinó una prevalencia nacional de MRSA de 51% con mayor proporción de CA-MRSA_G (88,6%) vs HA-MRSA_G (11,4%) $p < 0,0001$. Las cepas CA-MRSA_G estuvieron asociadas con menor tasa de resistencia a los antibióticos (ATBs) que las cepas HA-MRSA_G, con multiresistencia sólo en HA-MRSA_G. Un hallazgo de importancia fue la detección de resistencia a Ceftobiprol (8 aislamientos del clon Cordobés/Chileno) y a mupirocina (en el clon ST30-IVc) con resistencia de alto nivel. Se detectaron diferencias significativas regionales en la proporción de MRSA, desde el norte (72,9%), disminuyendo hacia el centro (48,4%) y en el sur (25,6%), con predominio de CA-MRSA 66%, 43% y 19,2% respectivamente. Estas diferencias se asociaron a la diseminación del clon ST30-IVc de norte a sur desplazando al clon ST5-IVa, y al clon HA-MRSA ST5-I. Se identificó una proporción significativamente mayor ($p = 0,0015$) de MRSA en pediatría (59%) que en adultos (47,2%), dada por una mayor proporción de CA-MRSA en pediatría (55,8%) que en adultos (38,8%) ($p < 0,0001$), siendo el clon ST30-IVc el más prevalente (62,5%), tanto en pediatría (70,9%) como en adultos (55,4%). A su vez, se determinó una mayor proporción de CA-MRSA_G que HA-MRSA_G tanto en infecciones CO (48,0% vs. 2,8%, $p < 0,0001$) como en las HO (38,6% vs. 13,2%, $p = 0,0009$) confirmando el desplazamiento de los clones HA-MRSA del ambiente hospitalario por los CA-MRSA. Este hecho estuvo principalmente relacionado a la propagación del clon ST30-IV con significativa mayor proporción en pediatría que en adultos, desplazando al clon HA-MRSA ST5-I y al CA-MRSA ST5-IVa. Al comparar los resultados de los estudios realizados en 2009 y en 2015, se identificaron proporciones comparables de MRSA (55% vs 51%). Este mantenimiento de las proporciones de MRSA fue consecuencia de un aumento significativo de la proporción de infecciones causadas por genotipos CA-MRSA_G (39% en 2009 a 45,2% en 2015) compensado por una disminución de aquellas causadas por los genotipos HA-MRSA_G (16% en 2009 vs. 5,8% en el 2015, $p < 0,0001$). Estos dos fenómenos concomitantes pero contrarios se evidenciaron principalmente a nivel hospitalario y en la población adulta, relacionado a la diseminación del clon ST-30-IV (33% en el 2009 y 62,2% en el 2015, $p < 0,0001$), desplazando al clon HA-MRSA ST5-I (18% vs 7%, $p < 0,0001$) y también al clon CA-MRSA ST5-IV (31% en el 2009 y 13,7% en el 2015, $p < 0,0001$). De la misma manera, se detectó una significativa disminución de la proporción de aislamientos resistentes a ciprofloxacina, eritromicina, clindamicina, y gentamicina entre los clones de MRSA. Este fenómeno en la comunidad estuvo asociada al desplazamiento del clon ST5-IVa por el clon ST30-IV, con menor resistencia a macrólidos y lincosaminas, mientras que en el hospital, estuvo asociado al desplazamiento de los clones ST5-I y ST5-IVa (que había ingresado previamente al ambiente hospitalario), por parte el ST30-IVc. Por lo tanto, este análisis longitudinal tiene consecuencias importantes a nivel de la resistencia a los ATBs y de esta manera en el establecimiento de los tratamientos empíricos en nuestro país.

Finalmente, en la tercera etapa, nos propusimos analizar características moleculares patogénicas y evolutivas, que pudieran de alguna manera explicar las capacidades diferenciales de diseminación de estos clones de MRSA. En primera instancia, se analizó la evolución molecular del Complejo clonal 5 (CC5) a través del secuenciamiento de genomas completos (WGS). Se seleccionó una muestra representativa (n: 20) de diferentes regiones del país, tanto MSSA como MRSA, recuperados a partir de infecciones asociadas a la comunidad (CA) y al hospital (HA) desde 1999 al 2015. Se pudo confirmar un ancestro común (AC) MSSA que data de 1937, el cual dio origen a la emergencia por un lado de los clones HA-MRSA y por el otro a los CA-MRSA. En el ámbito hospitalario emergieron a partir de un AC en el año 1956, tanto el clon Córdoba/Chileno ST5-I expandiéndose a partir de 1992, como la variante argentina del clon pediátrico ST100-IVNv a partir del año 1979.

En la comunidad, el AC MSSA evolucionó adquiriendo variaciones genéticas que posiblemente facilitaron su diseminación, como genes de FV como *pvl*, *sea* y *sep* en un fago del grupo ϕ Sa2 llamado phiSa119. Luego comenzó a expandirse aproximadamente en el año 1990, para dar un precursor MSSA que a partir del año 1991 divergió adquiriendo el SCCmec IVa y dando origen al clon CA-MRSA-ST5-IVa, *pvl*, *sea* y *sep* positivos, causando brotes epidémicos en las diferentes regiones del país. En una segunda instancia, se estudió la virulencia comparativa entre diferentes clones de MRSA, usando el modelo *Galleria mellonella*. Se seleccionaron aislamientos CA-MRSA_G (I-ST5-IVa-t311 y N-ST30-IVc-t019) y HA-MRSA_G (A-ST5-I-t149 y B-ST239-IIIa-t037) prevalentes en nuestro país. Los clones CA-MRSA, mataron una proporción significativamente mayor ($p < 0.001$) de larvas que los clones HA-MRSA.

Tanto el clon CA-MRSA ST5-IVa (*sea-sep-pvl*-Fago phiSa119) como el ST30-IVc (*egc-lukDE-bbp-cna*) adquirieron evolutivamente características patogénicas que podrían favorecer un mayor "fitness" avalando los resultados detectados en el modelo de *G. mellonella*. Lo que podría sustentar en parte el comportamiento de estos clones CA-MRSA en nuestro medio, desplazando a los clones HA-MRSA.

Como conclusión final, en esta tesis, se abordaron 3 aspectos cruciales de *S. aureus*, la portación, las infecciones y la evolución del complejo clonal más importantes en nuestro país. Los resultados aportan información genuina de importancia para ayudar al entendimiento de la evolución de los clones epidémicos que circulan en nuestro país y su relación con la resistencia a los antibióticos. Consecuentemente, proporciona datos que permiten el planteamiento de estrategias para el control y la transmisión de este patógeno tan importante a nivel mundial y para el control de la resistencia a los ATBs.

3. ABSTRACT

Dissemination of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) is a global concern both in the hospital (HA-MRSA) and in the community (CA-MRSA). Knowledge about when and where MRSA colonization is acquired and what clones are involved, would help to focus on the prevention of MRSA-acquired hospital infections, especially in Latin America, where data is scarce. In addition, there is limited evidence of prevalence, molecular epidemiology and risk factors for MRSA colonization upon admission, discriminated by CA-MRSA and HA-MRSA genotypes (CA-MRSA_G and HA-MRSA_G). In order to analyze the implications of colonization by CA-MRSA_G, comparatively with HA-MRSA_G and MSSA in patients who were hospitalized, in the first part of this thesis, a multicentric study was carried out in eight institutions of Córdoba, during 3 months. Of 1419 hospitalized patients, a prevalence of MRSA colonization of 4,2% (n: 60) was detected at admission, with a greater proportion in pediatrics than in adults (6,1% vs. 2,5%), due to a higher proportion of CA-MRSA_G (4,8%) compared to adults (1,9%), $p=0,002$. The most frequent MRSA clones at admission were CA-MRSA_G: I-ST5-IV (n: 17, 28,3%), N-ST30-IV (n: 12, 20,0%), and HA-MRSA_G: C-ST100-IV (n: 9, 15,0%). The identification of Risk factors (RF) was carried out for colonization by MRSA, discriminating by CA-MRSA_G and HA-MRSA_G. This difference in the RFs implies different origins and niches of transmission of both genotypes, and endorses the importance of knowing the prevalent genotypes in a population when carrying out the MRSA "screening" at admission to implement control measures of infection to reduce the transmission and consequently the acquired infections in hospitals. Ten cases of hospital acquisitions were detected, all of them by CA-MRSA_G demonstrating the circulation and acquisition of these strains within hospital. The most frequent clones were: I-ST5-IV (n: 4, 40%), N-ST30-IV (n: 2, 20%), R-ST72-IV (n: 2, 20%), QQ-ST1649-IV (n: 1, 10%). Therefore, it was demonstrated that these clones are acquired and probably transmitted, causing infections acquired in hospitals, with the community as the main reservoir. These infections are preventable and, therefore, are targets for an infection control program in hospitals and in the community as well.

Moreover, in order to study the evolution over time of the molecular epidemiology of MRSA infections in our country, a multicenter prospective study was carried out in April 2015, in 61 hospitals which are distributed in 20 provinces, thus covering most area of the whole country. We analyzed 668 cases of *S. aureus* infections, using epidemiological definitions of infections, according to the origin of the infection, hospital (HO) or community (CO). A national prevalence of MRSA of 51% was determined with a higher proportion of CA-MRSA_G (88,6%) vs HA-MRSA_G (11,4%) $p < 0,0001$.

CA-MRSA_G strains were associated with a lower rate of resistance to antibiotics (ATBs) than HA-MRSA_G strains, with multiresistance only in HA-MRSA_G.

Importantly, we identified resistance to ceftobiprole (eight isolates of Cordobés/Chilean clone) and to mupirocin (in ST30-IVc clone) showing high level of resistance. Significant regional differences were detected in the proportion of MRSA, from the north (72,9%), decreasing towards the centre (48,4%) and towards the south (25,6%), with a predominance of CA-MRSA 66%, 43% and 19,2% respectively ($p < 0,0001$). These differences were associated with the dissemination of clone ST30-IVc from north to south, displacing ST5-IVa, and HA-MRSA ST5-I clones. A higher proportion of MRSA was identified in pediatrics (59%) than in adults (47,2%), $p = 0,0015$, due to a higher proportion of CA-MRSA in pediatrics (55,8%) than in adults (38,8%) ($p < 0,0001$), where ST30-IVc clone was the most prevalent (62,5%), both in pediatrics (70,9%) and in adults (55,4%). Moreover, a higher proportion of CA-MRSA_G than HA-MRSA_G was detected in both, CO (48,0% vs. 2,8%, $p < 0,0001$) and HO (38,6% vs. 13,2%, $p = 0,0009$) infections, confirming the displacement of HA-MRSA_G by CA-MRSA_G in the hospital environment. This fact was mainly related to the propagation of ST30-IV clone with higher proportion in pediatrics than in adults, displacing both, HA-MRSA ST5-I and CA-MRSA ST5-IVa clones. When comparing the results obtained in the 2009 and 2015 studies, comparable proportions of MRSA were identified (55% vs 51%). This maintenance in MRSA proportions was a consequence of a significant increase in the proportion of CA-MRSA_G infections (39%, 2009 to 45,2%, 2015) compensated by a decrease of HA-MRSA_G infections (16% in 2009 vs. 5,8% in 2015, $p < 0,0001$). These two concomitant but opposite phenomena were evidenced mainly at hospital environment and in adult population, related to the dissemination of ST-30-IV clone (33% in 2009 and 62,2% in 2015, $p < 0,0001$), displacing HA-MRSA ST5-I clone (18% vs 7%, $p < 0,0001$) and CA-MRSA ST5-IV clone (31% in 2009 and 13,7% in 2015, $p < 0,0001$). There were, also a significant decrease in the proportion of resistant isolates to ciprofloxacin, erythromycin, clindamycin, and gentamicin among MRSA clones. This phenomenon in the community was associated with the displacement of ST5-IVa clone by ST30-IV clone, with less resistance rates to macrolides and lincosamines, while in hospitals, it was associated with the displacement of ST5-I and ST5-IVa clones (that had previously entered to the hospital environment), by ST30-IVc clone. In conclusion, this longitudinal analysis provides important information of antibiotics resistance and in consequence to the establishment of empirical treatments in our country.

Finally, in the third part, we aimed to analyze pathogenic and evolutionary molecular characteristics, which would explain the differential capacities of dissemination among MRSA clones. In first instance, the molecular evolution of Clonal Complex 5 (CC5) was analyzed through whole genome sequencing (WGS). A representative sample (n: 20) was selected from different

regions of the country, both MSSA and MRSA, recovered from infections in the community (CA) and in the hospital (HA) from 1999 to 2015. A common MSSA ancestor was detected in 1937, which gave rise to the emergence of the HA-MRSA and on the other to the CA-MRSA clones. In 1956, a common ancestor in the hospital setting gave rise to, both the Córdoba/Chilean ST5-I clone expanding from 1992, and the Argentine variant of the pediatric clone ST100-IVNv from 1979. In the community the common MSSA ancestor evolved by acquiring genetic variations that possibly facilitated its dissemination, such as VF genes such as *pvl*, *sea* and *sep* in a phage of the ϕ Sa2 group called phiSa119. Then it began to expand approximately in 1990, to give an MSSA predecessor that from 1991 diverged acquiring the *SCCmecIVa* and giving rise to the CA-MRSA-ST5-IVa clone, with *pvl*, *sea* and *sep* positive, causing epidemic outbreaks in the different regions of the country. Finally, in a second instance, we studied the comparative virulence between different MRSA clones, using the *Galleria mellonella* (*G. mellonella*) model. We selected CA-MRSA_G (I-ST5-IVa-t311 and N-ST30-IVc-t019) and HA-MRSA_G (A-ST5-I-t149 and B-ST239-IIIAt037) isolates prevalent in our country. CA-MRSA clones exhibited greater virulence than the HA-MRSA clones ($p < 0,001$). In conclusion, both CA-MRSA ST5-IVa (*sea-seP-pvl*-Fago phiSa119) and ST30-IVc (*egc-lukDE-bbp-cna*) clones have acquired evolutionary pathogenic characteristics that could favor a greater fitness, thus endorsing the results of *G. mellonella* model. This could partially support the behavior of these CA-MRSA clones in our environment, displacing HA-MRSA clones.

In conclusion, in this thesis, we addressed three crucial aspects of *S. aureus*, colonization, infections and evolution of the most important clonal complex in our country. These results provide important information to contribute to the understanding of the evolution of the epidemic clones circulating in our country and its relationship with antibiotics resistance. Consequently, it provides data to establish strategies to control the transmission of this important pathogen and the control of antibiotic resistance worldwide.

4. INTRODUCCIÓN

4.1 *Staphylococcus aureus*: CARACTERÍSTICAS GENERALES

Robert Koch en 1878 fue el primero en identificar cocos Gram positivos y correlacionarlos con la presencia de enfermedades tales como abscesos. En 1880, Alexander Ogston observó que cocos en forma de racimos eran los causales de abscesos en humanos [1]. Louis Pasteur pudo corroborar las observaciones de Ogston al inyectar el pus obtenido de los mismos en ratones produciendo el mismo fenómeno [2], Ogston en 1882 denominó a estos organismos como *Staphylococcus* (del griego *staphyle* “racimo de uvas”) [1].

En 1884, el médico Alemán, Friedrich J. Rosenbach pudo diferenciar especies del género *Staphylococcus* en base a la pigmentación que presentaban las colonias, donde las más patogénicas denotaban un color dorado y las menos patogénicas un color blanco, proponiendo la nomenclatura de *S. aureus* (del latín aurum “oro”) y *Staphylococcus albus* (del latín albus “blanco”) respectivamente [3].

S. aureus pertenece al género *Staphylococcus* de la Familia *Staphylococcaceae*, orden *Bacillales* de la clase *Bacilli* [4]. Son cocos Gram positivos (0,5 a 1,5 μm de diámetro) que aparecen de manera aislada o bien formando parejas, tétradas, cadenas o grupos irregulares con configuración en racimo de uvas. Son bacterias inmóviles que no forman esporas y que generalmente presentan positiva la prueba de la catalasa, además de que a menudo carecen de cápsula o muestran una cápsula incompleta. La mayor parte de las especies son anaerobias facultativas [5]. Son mesófilos con un desarrollo óptimo a 30-37 °C. Además esta bacteria es capaz de desarrollar en un amplio rango de pH (4,8 a 9,4), resistir la desecación, y sobrevivir a temperaturas extremas de hasta 60 °C durante 30 min. También crece en medios con alto contenido de sal (7,5 a 10% de NaCl) debido a la presencia de osmoprotectores [5, 6].

S. aureus es uno de los principales patógenos en humanos, es responsable de una gran variedad de infecciones que varían en severidad, desde leves afecciones de piel y tejidos blandos, tales como impétigo, forunculosis, abscesos a infecciones que pueden comprometer la vida, como bacteriemia, neumonía necrotizante y shock tóxico [2, 7, 8]. Presenta una serie de características que le permiten ser un exitoso patógeno oportunista y persistir en el medio: i) Poseer un gran número de factores de virulencia, ii) colonizar individuos sanos, y persistir en materiales inertes formando biopelículas, iii) capacidad de adquirir resistencia a los ATBs, iv) capacidad de diseminarse con características epidémicas produciendo infecciones en diferentes áreas geográficas. Estas características son el resultado de una gran plasticidad genómica [9-12].

4.2 ORGANIZACIÓN GENÓMICA

S.aureus posee un ADN circular y contiene aproximadamente 2,8 millones de pares de bases que representan 2700 secuencias codificantes más ARNs estructurales y regulatorios. La estructura genómica de *S.aureus* está conformada por un genoma core (80-85% del total del genoma) que se divide en:

4.2.1 CORE CONSERVADO (CCN)

En el genoma core conservado (CCN) se alojan genes que codifican para funciones metabólicas y regulatorias esenciales así como también proteínas de superficie con funciones de adhesión tisular y estructurales, dichos genes son conservados en más del 95% de todas las cepas de *S.aureus*.

4.2.2 CORE VARIABLE (CV)

Representa el 10% del genoma *core*, encontrando aquí principalmente los genes Housekeeping, carbamato quinasa (*arcC*), Shikimato deshidrogenasa (*aroE*), Glicerol quinasa (*glpF*), Guanilato quinasa (*gmk*), Fosfato acetiltransferasa (*pta*), Triosafosfato isomerasa (*tpi*) y Acetil coenzyme A acetiltransferasa (*yqiL*), donde el patrón de variabilidad de los mismos definen los diferentes linajes o tipos secuenciales (ST), la mayoría de los genes de proteínas de superficie como las proteínas de adhesión MSCRAMMs (del inglés “microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules”), proteínas de evasión inmune (como *Spa*) proteínas capsulares (genes *capHIJK*), y reguladores globales de virulencia (*agr*, *trap* y *sarT*) [3, 13, 14].

4.2.2.1 ISLAS GENÓMICAS (GI)

Dentro del CV, se encuentran regiones altamente variables propensas a recombinación denominadas Islas genómicas (GI). Estas se integran de manera estable en la misma posición en todos los linajes de *S. aureus* [15]. No son móviles ya que carecen de integrasas, excisionasas, terminasas o secuencias repetitivas asociadas. Se han identificado 3 GI denominadas: vSa α , vSa β y vSa γ [16]. Las mismas exhiben una sorprendente diversidad entre cepas, cada una con familias variables de lipoproteínas, exotoxinas, serin proteasas y grupos de genes de enterotoxinas que conforman el cluster *egc* (*enterotoxin gene cluster: egc*), compuesto por genes para las enterotoxinas de *Staphylococcus* (SE) *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, y *seo* [3, 17]. Dicho cluster se aloja en la GI vSa β y es conservado en todas las cepas de los complejos clonales (CC) CC5, CC22, CC45 y CC25 y ausentes en los CC1, CC8, CC15 y CC395 [14].

La GI vSa γ , aloja un grupo de pequeños péptidos anfipáticos, denominadas modulinas solubles en fenol (PSM), de acuerdo a su estructura, se definen como tipo β (PSM β 1 y PSM β 2) y tipo α (PSM α 1, PSM α 2, PSM α 3, PSM α 4). Todos ellos forman una familia de péptidos secretados

que tienen como blanco de acción disminuir la respuesta de neutrófilos, eliminando de este modo la defensa celular primaria frente a *S. aureus*. De la misma manera, las PSM contribuyen a la formación de *biofilm* y a la diseminación del mismo [18, 19].

4.2.2.2 CLUSTER 2 DE EVASIÓN INMUNE (IEC2)

Es un gran cluster que contiene genes que codifican para proteínas involucrados en la evasión inmune (Figura 1) tales como *extracellular fibrinogen binding protein b (efb)*, *extracellular complement-binding (ecb)* y *staphylococcal complement inhibitor (scn-b/c)*, los cuales inhiben la respuesta inmune mediada por el complemento, *Formyl Peptide Receptor-like 1 Inhibitor (FLIPr)* y su homólogo *FLIPr-like* que actúan inhibiendo eficientemente la respuesta de fagocitos. Por último, el gen *hla*, el cual codifica para la toxina citotóxica α -hemolisina [15, 20, 21]

4.2.2.3 OTROS CLUSTERS Y GENES DE EVASIÓN INMUNE

Todas las cepas de *S.aureus* alojan en el CV al menos 3 genes que codifican para leucocidinas, *HlgAB*, *HlgCB* y *LukAB*, mientras que la γ -hemolisina (*hlgABC*) que es parte del locus denominado *sbi (second immunoglobulin-binding protein) /hlg* presenta diversidad genética y tiene como blanco de acción a los neutrófilos. Fuera del locus *sbi/hlg* se encuentra el gen *spa*, el cual codifica la proteína A, ubicua y variable dentro de *S.aureus.*, y tiene como función la evasión de la respuesta inmune mediada por anticuerpos y es un blanco molecular de tipificación bacteriana [22].

Figura 1 | Distribución de genes involucrados en la evasión inmune

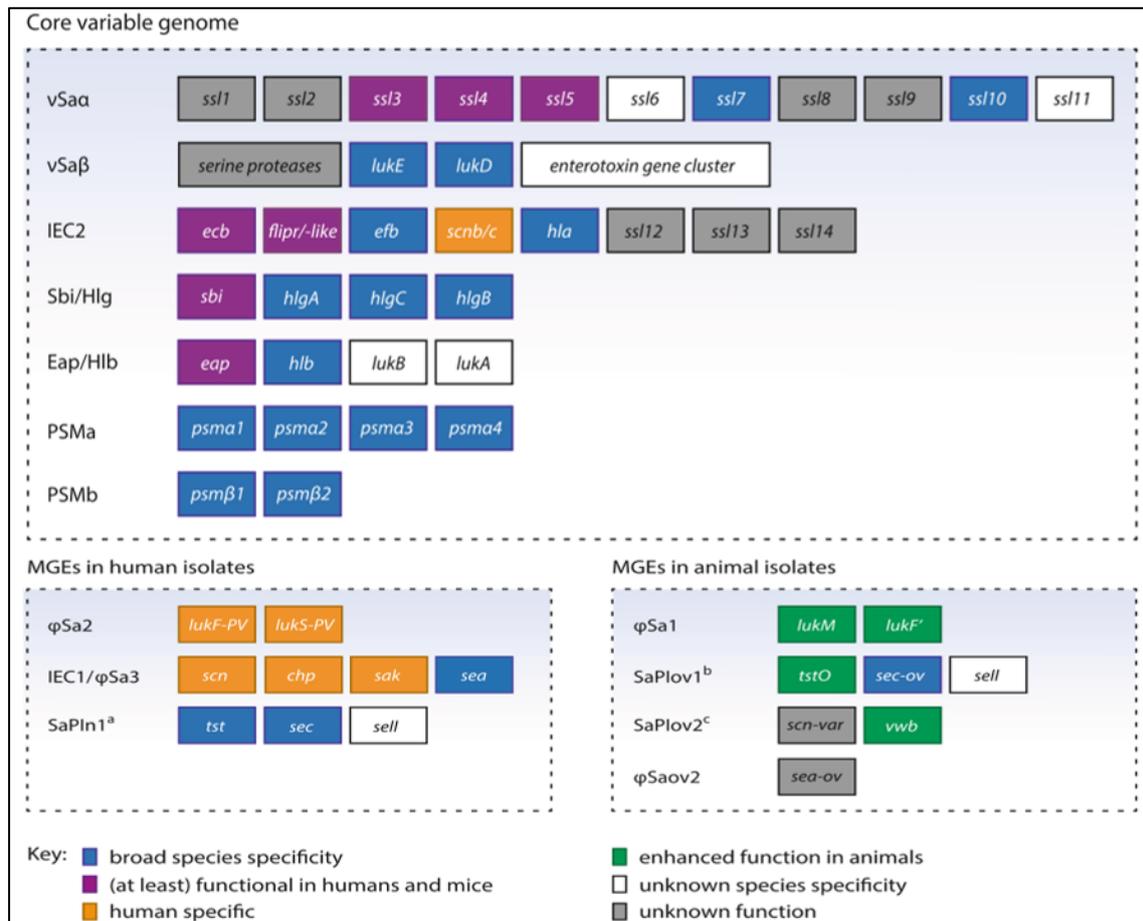


Fig.1. Distribución genómica y especificidad de especie de moléculas de evasión inmune de *S. aureus*. Los genes se encuentran en el genoma core variable (panel superior), en elementos genéticos móviles (MGE) específicos para aislados humanos (panel inferior izquierdo), o MGE específicos para aislados de animales (panel inferior derecho). Los colores indican la especificidad de especie funcional de las moléculas de evasión inmunológica codificadas por los genes mostrados. La especificidad amplia de la especie (azul) se asigna cuando una molécula de evasión es funcional en humanos, conejos y / o ratones, y en uno o más animales grandes (por ejemplo, cerdos, ovejas, cabras, ganado y caballos). La especificidad de las moléculas de evasión, al menos funcionales en humanos y ratones (púrpura) no se ha confirmado en otros animales hasta ahora. ^aSaPln1 (isla de patogenicidad) es un ejemplo de un superantígeno (SAG) que codifica SaPI presente en cepas humanas, los SaPI que codifican diferentes combinaciones de SAGs también se han descrito [23]. ^bSaPlov1, (Isla de patogenicidad en ovinos), comparte una estrecha homología con SaPIbov1, (isla de patogenicidad en bovinos), que codifica variantes bovinas de los mismos genes [24, 25]. ^cSaPlov2 comparte un grado considerable de homología con SaPIbov4, SaPIbov5 y SaPIeq1, que codifican variantes específicas del huésped de los mismos genes de evasión inmunológica [26]. Abreviaturas: *chp* (proteína inhibitoria de la quimiotaxis de *S. aureus*), *eap* (proteína de adherencia extracelular), *ecb* (proteína de unión al complemento extracelular), *efb* (proteína de unión al fibrinógeno extracelular), *fljpr* (proteína inhibitoria de FPR2), similar a *fljpr* (FPR2) similar a la proteína inhibitoria, *hla* (α-hemolisina), *hlb* (β-hemolisina), *hlg* (γ-hemolisina), *luk* (leucocidina), *psm* (modulina soluble en fenol), *sak* (quinasa de *Staphylococcus*), *sbi* (segunda inmunoglobulina proteína de unión), *scn* (inhibidor del complemento de *Staphylococcus*), *scnb/c* (inhibidor del complemento de *Staphylococcus B/C*), *scn-var* (variante del inhibidor del complemento de *Staphylococcus*), *se* (enterotoxina de *Staphylococcus*), *mar-ov* (enterotoxina A-ovina de *Staphylococcus*) *sel* (similar a la enterotoxina de *Staphylococcus*), *sec-ov* (enterotoxina C-ovina de *Staphylococcus*), *ssl* (proteína similar al superantígeno de *Staphylococcus*), *tst* (síndrome de choque tóxico toxina-1), *tstO* (síndrome de choque tóxico toxina-1-ovina), *vwb* (proteína de unión al factor de von Willebrand). Tomado de Bagnoli, F., R. Rappuoli, and G. Grandi, *Staphylococcus aureus: Microbiology, Pathology, Immunology, Therapy and Prophylaxis*. Vol. 409. 2018: Springer pag 446.

4.2.3 GENOMA ACCESORIO (GA)

El restante 15-20% del genoma se denomina genoma accesorio (GA) y está comprendido por elementos genéticos móviles (MGEs), los cuales se transfieren horizontalmente entre las cepas y juegan un rol crucial en la evolución de la virulencia de *S. aureus* así como también en la emergencia de nuevos clones [3, 8, 10, 15, 27, 28]. El proceso de transferencia de ADN de una bacteria a otra puede darse por transducción, conjugación o transformación [29]. De los estudios de secuenciación del genoma se puede concluir que especialmente los fagos a partir del proceso de transducción han tenido el mayor impacto en la evolución de *S. aureus* [30]. Los principales MGEs son:

4.2.3.1 ISLAS DE PATOGENICIDAD DE *S. aureus* (SaPIs)

Las islas de patogenicidad (SaPIs) son MGEs de entre 15-18 kb que juegan un rol significativo en la virulencia y patogenicidad de *S. aureus*, contiene genes que pueden ser transferidos horizontalmente mediante ciertos fagos [31]. Las SaPIs de aislamientos de *S. aureus* en humanos son 7, SaPI1, SaPI2 tipo I y SaPI2 tipo II, SaPI3 tipo I y SaPI3 tipo II, SaPI4 y SaPI5 y SaPI3 asociadas a infecciones en bovinos, SaPIbov1, SaPIbov2 y SaPIbov3 [3] (Figura 1). Las mismas pueden codificar para la toxina del shock tóxico (tst-1) y genes superantígenos especialmente *seb* y *sec* los cuales también están implicados en el shock tóxico de *Staphylococcus*, casi la totalidad de los aislamientos contienen al menos una SaPI, pudiendo contener hasta 2 y 3 en la mayoría de los mismos. De la misma manera, a través de la transmisión de SaPIs, también ha sido reportada la resistencia a ATBs, como en el caso de ácido fusídico [13].

En general, las SaPIs se encuentran integradas al cromosoma de la bacteria y la expresión de los genes codificados en ellas está reprimida por un regulador específico *StI*, el cual se une a una región de dos promotores divergentes inhibiendo la transcripción de los genes de SaPI. El ciclo de vida de SaPI comienza con la infección de los bacteriófagos o la activación de los bacteriófagos endógenos por el sistema de respuesta SOS, esta respuesta puede ser causada por estrés oxidativo, exposición a radiación UV o tratamiento con ATBs. Una vez que el bacteriófago es activado o la bacteria es infectada, las proteínas del bacteriófago se unen al represor *StI* permitiendo la transcripción de los genes de las SaPIs [32].

4.2.3.2 BACTERIÓFAGOS

Todos los bacteriófagos conocidos de *S. aureus* pertenecen al orden Caudivirales (fagos con cola), los cuales están compuestos por cápsula icosaédrica con ADN doble hebra y una cola filamentosa. [33]. Pueden transferir ADN horizontalmente de una célula bacteriana a otra a través de un proceso llamado transducción [29]. Están ampliamente diseminados en las cepas de *S. aureus*, presentando al menos uno o muchas de ellas hasta cuatro. Los mismos pueden ser

clasificados en familias basadas en la secuencia del gen de la integrasa (codificada en el bacteriófago) que determina el sitio de integración en el genoma bacteriano [13].

Los bacteriófagos pueden inyectar el ADN a una célula huésped ya sea integrándose en el cromosoma como profago (vía lisogénica) o a través de la generación de más partículas virales matando a la célula huésped (vía lítica), siendo la primera la vía más frecuente en *S.aureus* [29].

Los bacteriófagos pueden codificar diferentes factores de virulencia, entre ellos se puede mencionar a la enterotoxina A (*sea*), la leucocidina de Pantón-Valentine (PVL, codificada en el fago ϕ Sa2), asociada con infecciones severas, como así también a las proteínas inhibidoras del complemento (*scin*), proteínas inhibidoras de quimiotaxis (*chip*) y la quinasa de *staphylococcus* (*sak*) (alojadas en el IEC1 del fago ϕ Sa3, Figura 1). CHIPS es un modulador del receptor de quimioquinas bacterianas y específicamente se une a dos receptores de quimioquinas. CHIPS atenúa la respuesta del receptor C5a (C5aR), así como del receptor peptídico formilado de neutrófilos humanos. Esto da como resultado la inhibición de la quimiotaxis y de la activación de neutrófilos en respuesta a C5a y péptidos formilados. Este gen, como ya se mencionó, forma parte del locus de evasión inmune de *S.aureus* (IEC1), ubicado en diferentes bacteriófagos convertidores de β -hemolisina (β C- Φ s) del grupo de la integrasa ϕ Sa3. En el IEC1 se encuentra el gen (*scn*) codificante del inhibidor del complemento de *Staphylococcus* (SCIN), el gen *sak* codificante de la quinasa de *Staphylococcus* y los genes (*sea* y *sep*) que codifican las enterotoxinas A y P. Se han identificado siete variantes de IEC1 codificados en diferentes bacteriófagos ϕ Sa3 convertidores de β -hemolisina (β C- Φ s). Todas las variantes de IEC1 llevan *scn* y una combinación diferente de *sak*, *chp* y *sea* (o *sep*). Estos genes codifican moduladores inmunitarios específicos para humanos, que juegan un rol crucial en la adaptación al nicho humano como también en las infecciones humanas invasivas. Los genes del IEC se encuentran en casi todos los aislamientos humanos, pero sólo en algunos aislamientos de animales [34-36]. (Figura 1)

Los bacteriófagos, también están implicados con frecuencia en la movilización de islas de patogenicidad entre cepas. Un ejemplo de ello, es el fago 80 α que es capaz de escindir y transferir las islas de patogenicidad de *Staphylococcus* 1(SaPI1) a otras cepas de *Staphylococcus* spp [31].

4.2.3.3 PLÁSMIDOS (PL)

Uno o más plásmidos pueden estar alojados en aislamientos clínicos de *S.aureus*, históricamente pueden ser categorizados en tres clases principales en base a su organización física/genética y características funcionales: i) pequeños plásmidos (<5kb) con gran número de copias por bacteria que utilizan mecanismos circulares de replicación y codifican frecuentemente para uno o dos genes de resistencia, ii) grandes plásmidos replicativos (15-

30Kb) con bajo número de copias (de 4 a 5 por bacteria) y que pueden albergar una combinación de genes de resistencia que incluyen penicilinas, trimetoprima y aminoglucósidos, resistencia a metales pesados, detergentes y iii) grandes plásmidos conjugativos (>30kb), son aquellos que codifican su propia transferencia conjugativa, presentan un tipo de replicación particular (modo *theta*) y contienen principalmente genes codificantes de multiresistencia [13, 37].

Los plásmidos de *Staphylococcus* son divididos en 24 familias de acuerdo a las secuencias de los genes *rep* (proteínas de replicación) [38]. La gran variedad de plásmidos descritos hasta el momento en *S. aureus* juegan un rol importante en la evolución y en la adaptación a diferentes condiciones ambientales [37].

4.2.3.4 ELEMENTOS TRANSPONIBLES (TE)

Se definen como elementos transponibles (TE) específicamente a, secuencias de inserción (IS) y transposones (Tn).

Los Tn son secuencias relativamente cortas de ADN que codifican principalmente para determinantes de resistencia antimicrobiana. Los mismos, pueden moverse autónomamente ya que presentan integrasas que aseguran la integración tanto en el cromosoma bacteriano como en MGEs tales como plásmidos, Cassette Cromosomal de *Staphylococcus* (SCC) o SaPIs. Algunas integrasas son sitio específicas como es el caso de aquellas del Tn554. Este Tn554 lleva genes (*ermA*) de resistencia a MLSB (macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B) y a espectinomicina y a menudo, está asociado con los tipos de SCC*mec* II y III. En cambio, otros Tn se insertan aleatoriamente como es el caso del Tn551, también asociado (gen *ermB*) con la resistencia a MLSB [37].

Las IS, son generalmente pequeños elementos móviles entre 500 y 2500 pb que típicamente alojan uno o en algunos casos, dos genes que codifican para transposasas (*tnp*) que permiten la movilización de los mismos y pueden ser divididas en grupos basándose en su actividad. Las IS juegan un papel importante en la evolución del genoma ya que implican deleciones, inversiones o reorganizaciones del genoma bacteriano, llevando a cambios en la expresión de genes adyacentes que pueden inactivar o activar a los mismos [39]. Las IS pueden mover genes de resistencia como parte de un transposón compuesto. Como ejemplo puede mencionarse la IS256, que además de constituir el Tn compuesto Tn4001 forma un promotor híbrido para el operón de resistencia a aminoglucósidos (*aacA-aphD*) [2, 29, 39].

4.2.3.5 CASSETE CROMOSOMAL DE *Staphylococcus mec* (SCC*mec*)

La meticilina es un ATB semisintético desarrollado a finales de 1950 con el fin de tratar la resistencia a penicilina originada en 1942 [40]. El primer aislamiento de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) fue identificado en 1960 en el Reino Unido, siendo restringida inicialmente a

Europa. No obstante a principios de 1980, diferentes linajes exitosos emergieron en diversas áreas geográficas transformándose en un problema de salud pública [2].

El SCC*mec* es un MGE que aloja el gen *mecA* que codifica al determinante central de la resistencia a ATBs β -lactámicos alterando el sitio blanco de acción (PBP, “*Penicillin-binding protein*”). Este gen da origen a una PBP alternativa (PBP2a o PBP2’) de baja afinidad para la mayoría de las penicilinas semisintéticas incluyendo meticilina, nafcilina y oxacilina, así como la mayoría de las cefalosporinas con excepción de ceftarolina y ceftobiprol [2, 41].

El SCC*mec* está compuesto por i) el complejo de genes *mec* con sus genes reguladores y IS asociadas, ii) un complejo de genes de recombinasas sitio específicas (*ccr*) que promueven la integración en un sitio *att* dentro de un marco de lectura abierta *orfX* cerca del origen de replicación del cromosoma de *S. aureus* y iii) las regiones J (*joining*), que se disponen a ambos lados de los complejos anteriores. Estas últimas constituyen elementos no esenciales y pueden portar determinantes adicionales de resistencia antimicrobiana. Las diferentes combinaciones entre los complejos anteriormente citados definen tipos de SCC*mec* mientras que diferencias, dentro del mismo complejo de genes *mec/ccr* y en las regiones “J” definen subtipos [42].

Complejo de genes *mec*

La expresión del gen *mecA* es regulada por dos proteínas, *Mecl* (proteína represora) y *MecRI* (proteína de traducción de señal). Cuando *Mecl* se une a la región promotora de *mecA*, la transcripción está reprimida, mientras que si un ATB β -lactámico se une al receptor de membrana *MecRI*, el polipéptido que tiene actividad de proteasa, degrada *Mecl* y como resultado lleva al incremento en la transcripción de *mecA*. El complejo de genes *mec* se clasifica en 5 clases basándose en las diferentes IS y los genes reguladores ya sean corriente arriba o corriente abajo del gen *mecA*:

1) **Clase A**, contiene el gen *mecA* y los genes reguladores *mecR1* y *mecl* completos, dispuesto río arriba del *mecA*, regiones hipervariables (HVR) y la IS431 río abajo del *mecA*. 2) **Clase B**, también contiene el gen *mecA* pero el regulador *mecR1* se encuentra truncado producto de la inserción de la IS1272 (río arriba del *mecA*) y la HVR y la IS431 río abajo del *mecA*. 3) **Clase C1**, contiene el gen *mecA*, el regulador *mecR1* se encuentra truncado pero aquí es por la inserción de una IS431 río arriba del *mecA*. 4) **Clase C2** de igual modo que la clase anterior las HVR y la IS431 dispuestas río abajo del *mecA*. 5) **Clase E**, presenta la estructura: *blaZ-mecALGA251-mecR1-mecl* [2, 42].

Complejo de genes de recombinasas (*ccr*)

Los genes *ccr*, así como los ORFs circundantes, conforman el complejo de genes *ccr*, donde muchos de los ORFs son de función desconocida.

Las recombinasas son similares a las integrasas de los bacteriófagos responsables de catalizar el clivaje, así como también el intercambio de ADN y recombinación de dos sitios de anclaje. Uno de estos sitios de anclaje se aloja en el *SCC (attSCC)* y el otro sitio se encuentra en el cromosoma bacteriano (*attB*), esto permite el intercambio de información genética para la adaptación a los cambios ambientales y de presión de selección de ATBs [42]. En *S. aureus* se han identificado tres genes *ccr* filogenéticamente distintos con una similitud de secuencia de ADN inferior al 50%: *ccrA*, *ccrB* y *ccrC*. De acuerdo con el sistema de nomenclatura propuesto, los nuevos genes *ccr* son definidos basándose en similitudes de secuencia de ADN de menos del 50%. Si sus secuencias de ADN muestran una identidad del 50 al 85%, se denominan nuevos alotipos del gen *ccr*. Sin embargo, si los genes *ccr* muestran más del 85% de identidad en el ADN, se les asigna el mismo alotipo. Varios alotipos de *ccrA* y *ccrB* (*ccrA1* a -7 y *ccrB1* a -7) se han identificado en base a su similitud de nucleótidos de entre 60% y 82% [42]. Hasta hace poco, todas las variantes de *ccrC* identificadas mostraban más del 87% de identidad y estaban ubicadas en el mismo alotipo; sin embargo, en el año 2015 informaron un nuevo gen *ccrC* que compartía una similitud de 62.6 a 69.4% con todas las secuencias de *ccrC* publicadas. Basado en el sistema de nomenclatura propuesto, fue nombrado *ccrC2* [43].

Regiones J

Las regiones J (*Joining regions*) comprenden componentes no esenciales y pueden contener determinantes para resistencia a ATBs adicionales. Basado en su localización dentro del *SCCmec* son clasificadas como J1, J2 y J3. La región J1 (formalmente denominada región L-C) está localizada entre la unión cromosomal derecha y los genes *ccr*, corriente arriba. La región J2 (formalmente denominada región C-M) se encuentra entre los genes del *ccr* y el complejo de genes *mec*. De manera similar, la región J3 (previamente conocida como I-R) está localizada entre el complejo de genes *mec* y la unión cromosomal izquierda, corriente abajo del gen *mec* [10, 44].

La región J1 frecuentemente incluye un número variable de ORFs y reguladores, mientras que la región J2 contiene elementos genéticos tales como integrasas o el transposon Tn554. La región J3 frecuentemente incluye resistencia a ATBs mediadas por plásmidos, como por ejemplo a tetraciclina, aminoglucósidos, etc. Las variaciones en las regiones J son la base para definir los diferentes subtipos de *SCCmec* [2]. Hasta el momento han sido descritos 13 *SCCmec*. (Figura 2)

Figura 2 | Diferentes tipos de SCCmec descritos hasta la fecha

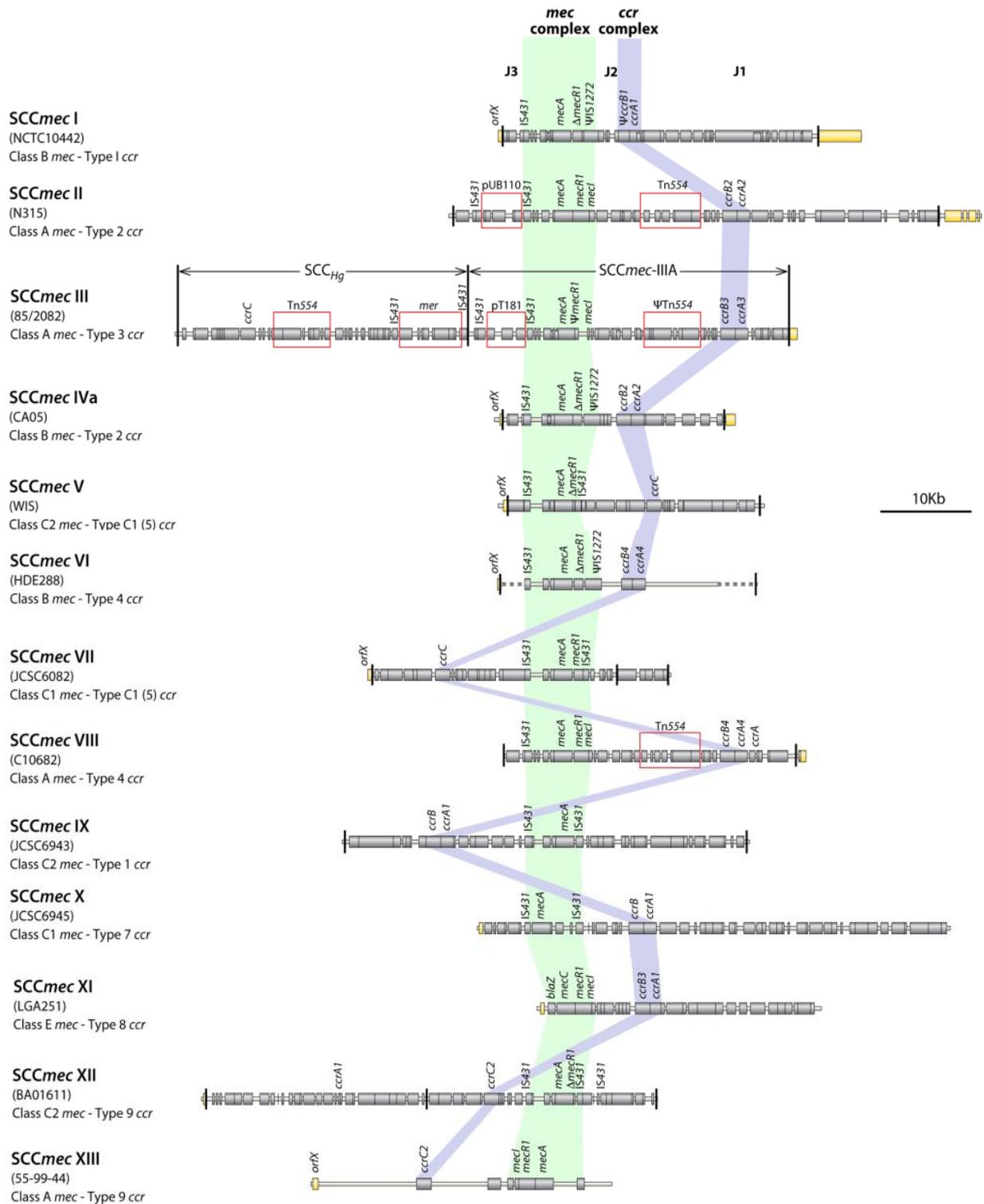


Figura 2. Ilustración esquemática de los tipos de SCCmec reportados. Hasta la fecha, se han identificado 13 tipos de SCCmec (I a XIII). Representaciones en escala del 13 SCCmec. El complejo del gen *mec* se indica con un sombreado verde, el complejo del gen *ccr* por un sombreado púrpura y las regiones J1, J2 y J3 rodeando los mismos. Los ORF dentro de los elementos SCCmec están representados por cuadros rojos, mientras que los ORF cromosómicos están representados por cuadros amarillos. Elementos importantes en las regiones J, como transposones y plásmidos, también están indicados. Diferentes combinaciones del complejo del gen *mec* y los complejos del gen *ccr*, y ocasionalmente, diferentes ubicaciones entre sí, dan lugar a los diferentes tipos de SCCmec. **Lakhundi, S.**

and K. Zhang, *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. Clin Microbiol Rev*, 2018. 31(4)

4.3 FACTORES DE VIRULENCIA (FV)

S. aureus es uno de los principales patógenos humanos, y parte de este éxito está dado por la capacidad de expresar un arsenal de factores de virulencia (FV) que le permite causar una amplia gama de infecciones. Entre ellos se encuentran proteínas de superficie que median la adherencia bacteriana a los tejidos del huésped, toxinas extracelulares secretadas y enzimas que destruyen células y tejidos del huésped y factores para evadir la respuesta inmune de éste, permitiendo el crecimiento y la propagación del microorganismo en el mismo [45].

La patogénesis de *S. aureus* es el resultado de la acción combinada de más de 50 factores de virulencia que son expresados coordinadamente durante las diferentes fases de la infección.

Si bien los FV están implicados en la patogénesis de *S. aureus*, también aportan a la caracterización molecular de determinados linajes. Los miembros de un clon individual, con el paso del tiempo, pueden diferenciarse a través de mutaciones puntuales, de recombinación y de adquisición o eliminación de MGEs (donde se encuentran contenidos la mayoría de los FV). Estas diferencias entre los FV de los aislamientos, así como también el estudio de la diversidad genética de cada uno de ellos y su relación con los diferentes linajes ayudan a identificar clones dominantes y tratar de explicar su comportamiento evolutivo, en un área determinada [46]. Además es posible asociarlos con características patogénicas de hábitat, así como también su capacidad de diseminación [47]. El conocimiento de estas características permite establecer estrategias de vigilancia para limitar la diseminación de los mismos.

También es destacable la utilidad de estos FV como marcadores diagnósticos y blancos terapéuticos [13, 45].

Los FV involucrados en la patogénesis de *S. aureus* pueden ser divididos en dos grandes grupos: i) componentes superficiales y ii) toxinas y enzimas extracelulares

4.3.1 COMPONENTES SUPERFICIALES

Dentro de los componentes superficiales podemos encontrar:

4.3.1.1 Polisacárido capsular (CPs)

La mayoría de las bacterias que causan infecciones invasivas, producen CPs, que les permite evitar la fagocitosis permitiendo la persistencia en el huésped. En el caso de *S. aureus*, el cual es un patógeno oportunista de importancia, las CPs son producidas por la mayoría de los aislamientos [8, 48]. Si bien se han descrito hasta el momento 13 serotipos capsulares diferentes, el serotipo 5 (CPs5) y el serotipo 8 (CPs8) son los predominantes en infecciones en humanos (entre un 25-50% de las cepas).

Los CPs son importantes en la evasión inmune, permitiendo que la bacteria evada la captación y fagocitosis. Los anticuerpos contra las CPs neutralizan la naturaleza antifagocítica de la cápsula y median eficazmente la captación y la muerte de los aislamientos encapsulados por fagocitos profesionales [15].

4.3.1.2 Polisacárido Extracelular (ECM)

S. aureus tiene la capacidad de producir una matriz de polisacáridos extracelular conocida como biofilm o biopelícula. La misma, es definida como una comunidad sésil formada por células bacterianas que están adheridas a un sustrato y unidas unas con otras, embebidas en una matriz compleja de macromoléculas que incluye proteínas, ADN extracelular (ADNe) y exopolímero autoproducido, cuya maquinaria de síntesis es codificada por un operón denominado *ica*. Este operón, si bien está presente en la mayoría de los aislamientos, su expresión varía entre cepas y según las condiciones de crecimiento [19]. Sin embargo, existe una vía independiente de *ica* para el desarrollo de biofilm [49]. En este mecanismo alternativo intervienen las proteínas de adhesión llamadas MSCRAMMs (del inglés: componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de matriz) [50].

La capacidad de formar biofilm le permite a *S. aureus* adherirse tanto a superficies vivas como a aquellas inertes, por lo tanto podría contribuir a prolongar una infección logrando persistencia de la bacteria en materiales protésicos o en infecciones del oído medio, osteomielitis, neumonía y fibrosis quística. En el interior del biofilm, las bacterias presentan una mayor resistencia a los antibióticos, a la opsonización por anticuerpos y a la fagocitosis, lo que explicaría el carácter crónico de estas infecciones así como también la capacidad de colonización y diseminación de MRSA [15, 48].

4.3.1.3 PROTEÍNAS SUPERFICIALES

La superficie de *S. aureus* está cubierta por una amplia variedad de adhesinas capaces de unir diferentes proteínas presentes en el huésped, ya sea en el plasma y/o en la matriz extracelular [8]. La mayoría de estas adhesinas pertenecen al grupo MSCRAMM, este acrónimo engloba todas aquellas proteínas con estructura y función similar y mecanismos comunes de unión al ligando realizado por dos dominios plegados similares a IgG adyacentes, este mecanismo se lo conoce como DLL (“*dock, lock, and latch mechanism*”) [49]. Dentro de este grupo se encuentran:

- Proteínas de unión a colágeno (*Cna*)

Como su nombre lo indica, es una proteína capaz de unirse al colágeno de la matriz extracelular, es también capaz de unirse a la proteína C1q de la vía clásica del complemento inhibiendo su activación, lo cual sería una estrategia potencial de evasión inmune [51].

- Proteínas de unión a fibronectina (FnBP, “fibronectin binding protein”)

S. aureus tiene la capacidad de promover la adherencia e invasión a células no fagocíticas (células epiteliales, endoteliales y queratinocitos) proveyéndole un nicho intracelular, donde la bacteria puede evadir la defensa del huésped. Este mecanismo de evasión está dado por las proteínas de unión a fibronectina (FnBPs) que se unen a la región $\alpha 5\beta 1$ de las integrinas (ampliamente distribuidas en células de mamíferos) [48, 52].

- Proteínas de unión a fibrinógeno/Factores de aglutinación (*Clumping factor A and B, ClfA y ClfB*)

Los factores de aglutinación A y B (*ClfA* y *ClfB*) se unen al fibrinógeno del hospedador y promueven la agregación de plaquetas.

ClfA es un factor de virulencia importante ya que está involucrado en una variedad de infecciones, promueve la adherencia al fibrinógeno soluble en la cadena γ y del C-terminal, permitiéndole colonizar y formar biopelículas, así como también evade la respuesta inmune mediada por complemento degradando el factor C3b [53].

ClfB es una de las proteínas de superficie mejor caracterizadas en la última década, sus características multifuncionales son bastante únicas a diferencia de *ClfA* que sólo se une a fibrinógeno. *ClfB* juega un rol importante en el establecimiento de la colonización nasal por la unión a la citoqueratina 10 tipo I de humanos (CK10) expresada en células epiteliales escamosas. También se une a la cadena α del fibrinógeno [54].

4.3.1.4 PROTEÍNA A (*spa*, “*Staphylococcus protein A*”)

La proteína A (Figura 3) es una proteína multifuncional de 42 kDa. Está presente en la superficie de todas las cepas de *S. aureus* unida covalentemente a la pared celular por medio de su extremo C-terminal. En su extremo amino-terminal, contiene 5 módulos homólogos (E, D, A, B, C), cada uno de los cuales consiste en un paquete único y separado de triple hélices que pueden unir una variedad de ligandos principalmente las inmunoglobulinas G y M (IgG e IgM). Localizada entre esta región y antes del sitio de anclaje a la pared celular, se encuentra una región llamada “Xr” que consiste en un número variable de secuencias repetidas cortas de 24 pb (*short sequence repeat, SSR*) seguido de una región constante denominada “Xc”. La secuenciación de esta región (Xr) polimórfica, el análisis del número de repeticiones y su variabilidad permite asignar distintos tipos *spa* (*t*) utilizado como marcador epidemiológico en la tipificación molecular, con un alto poder discriminativo [7, 49].

Figura 3 | Esquema de la Proteína A

Figura 3. Esquema de la proteína A. Se pueden observar los cinco dominios del paquete de triple hélice unido en tandem N-terminales (conocidos como EABCD) que se unen a IgG, seguido por la región Xr que contiene las secuencias repetitivas y la región Xc no repetitiva. *Adaptado de: Foster, T.J., et al., Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus. Nat Rev Microbiol, 2014. 12(1): p. 49-62.*

4.3.1.5 DETERMINANTES DE SUPERFICIE QUE REGULAN LA DISPONIBILIDAD DE HIERRO

El grupo de proteínas involucradas en el transporte de hierro son denominadas NEAT (*Near-iron transporter domain proteins*), y son las encargadas de captar el grupo hemo de la hemoglobina, el cual le permite a la bacteria sobrevivir dentro de un huésped donde el hierro está restringido. El grupo Hem es transportado por proteínas de la pared bacteriana denominadas Isd (*iron-regulated surface proteins*) al transportador de membrana y luego al citoplasma donde la enzima hemoxigenasa libera el hierro [55]. Dentro del grupo de proteínas Isd, se pueden destacar, la proteína IsdA que promueve la adhesión al epitelio escamoso favoreciendo la colonización nasal y por otro lado confiere resistencia a los lípidos bactericidas. IsdB, por otro lado, se une a las β -3integrinas y promueve la activación plaquetaria así como también la evasión inmune en mamíferos, mientras que IsdH ayuda en la evasión fagocítica promoviendo la degradación de la opsonina C3b del complemento [15, 55].

4.3.2 TOXINAS Y ENZIMAS EXTRACELULARES

4.3.2.1 ENZIMAS EXTRACELULARES

Muchas enzimas secretadas de *S. aureus* degradan las moléculas del huésped o interfieren con las cascadas de señalización o metabólicas del huésped, varias de estas enzimas son proteasas. Las proteasas degradan las proteínas del huésped, lo que lleva a la destrucción de los tejidos [56]. Dentro del grupo de enzimas extracelulares encontramos:

i) Aureolisina (*Aur*), es una proteasa que cliva un gran número de proteínas, incluida la Insulina B, más aún, esta proteasa inactiva las PSMs, así tiene un mayor impacto en el proceso de osteomielitis. **ii) Glutamil Endopeptidasa (*SspA*)**, la cual cliva los residuos glutamato involucrada en procesos de colonización/infección. Tanto *Aur*, *SspA* como las Staphopain A y B interfieren con los factores del complemento, permitiendo la evasión de la muerte bacteriana mediada por este mecanismo [57]. **iii) Toxina exfoliativa de *Staphylococcus* (ETS)**, corta específicamente cadherinas desmosómicas de las capas superficiales de la piel, dando lugar al

síndrome de la piel escaldada (SSSS), **iv) Colagenasa** que cliva el colágeno. **v) quinasa de *Staphylococcus***, es una enzima activadora del plasminógeno, que lleva a la descomposición de las mallas de fibrina aumentando la invasividad de la bacteria. **vi) Lipasas y nucleasas**, si bien su función en la patogénesis no es del todo conocida, posiblemente, las nucleasas podrían disminuir la actividad antibacteriana de las trampas extracelulares de neutrófilos (neutrophil extracellular traps “NETs”) las cuales contienen ADN del lisado de neutrófilos [58]. **vii) hialuronidasa**, destruye el ácido hialurónico (polisacárido que proporciona sostén a las células eucariotas) facilitando la diseminación del microorganismo por la matriz extracelular y **viii) Coagulasas**, se conocen dos tipos, la coagulasa de *Staphylococcus* y el factor de Von Willebrand (VWF), las cuales contribuyen en la formación de la malla de fibrina luego de unirse a la protrombina y otras proteínas del plasma, desencadenando la conversión de fibrinógeno a fibrina, inhibiendo la fagocitosis, formando abscesos y permitiendo la adhesión de *S. aureus* en infecciones asociadas con biopelículas [56].

4.3.2.2 TOXINAS CON ACTIVIDAD SOBRE MEMBRANA

S.aureus produce una variedad de potentes proteínas secretadas que actúan como citotoxinas, que juegan un rol importante en la patogénesis, disrupción de las uniones de adherencias celulares en las barreras epiteliales, alteración de los eventos de señalización intracelular, modulación de las respuestas inmunes del huésped y muerte de las células fagocíticas y no fagocíticas. Estas se dividen en tres grupos principales: Toxinas formadoras de poros, toxinas exfoliativas y superantígenos.

4.3.2.1.1 TOXINAS FORMADORAS DE POROS (PFTs)

Constituyen un grupo grande y clínicamente relevante de factores citolíticos, estas pequeñas proteínas secretadas de entre 32 y 40 KDa, unen receptores en la membrana plasmática de la célula huésped, que conduce al ensamblaje paso a paso de un oligómero de toxina, que resulta en la formación de un poro funcional de aproximadamente 25 Å que perfora la membrana plasmática y mata las células eucariotas por desregulación osmótica mediada por el flujo de Ca²⁺, K⁺, ATP y otras moléculas pequeñas a través del poro [59, 60]. Dentro de las PFTs encontramos:

Hemolisina-α (Hla o α-toxina)

Es un polipéptido de 33KDa, secretado por el 95% de las cepas clínicas de *S. aureus*, con acción en un amplio rango de células del hospedador, como eritrocitos, células epiteliales, células endoteliales, linfocitos T, monocitos y macrófagos. Hla es una toxina formada por una estructura de barril-β conformada por monómeros solubles en agua. Cuando la Hla se une a la célula blanco a través de su receptor de membrana ADAM10 (una desintegrina y metaloproteinasas), comienza a producir un oligómero que forma una estructura pre-poro que

ataca a la membrana celular por extrusión del barril- β a través de la bicapa lipídica para formar un canal transmembrana hidrófilico. Si bien la lisis celular se considera la consecuencia más importante de la acción de Hla, también produce alteración de las vías de señalización celular que afecta la proliferación celular, respuesta inflamatoria, secreción de citoquinas e interacción célula-célula [61, 62]. Más aún, resultados obtenidos por integrantes de nuestro laboratorio, pudieron demostrar que Hla induce la activación de la proto-oncoproteína c-jun, sugiriendo que este factor de transcripción podría desempeñar un papel en la respuesta celular contra las infecciones por *S. aureus* [63].

La expresión de *Hla* está controlada principalmente por el regulador global Agr (“*accessory gene regulator*”) a través del efector RNAIII, aunque también puede ser modulada por otros reguladores: SaeR, SarZ, ArlS (regulación positiva) y Rot, SarT (regulación negativa) [48].

Hemolisina- β (*Hlb*, Esfingomielinasa C)

Las esfingomielinasas son hidrolasas de diéster fosfóricos que escinden las esfingomielinas, el esfingolípido más abundante en la membrana de células eucariotas. Esta toxina se produce en grandes cantidades en cepas aisladas de mastitis bovina e infecciones crónicas de la piel humana. La hemolisina- β es citotóxica para los queratinocitos humanos, los leucocitos polimorfonucleares (PMN), los monocitos y los linfocitos T. Además inhibe la expresión de interleuquina-8 (IL-8) por las células endoteliales, contribuyendo al escape fagocómico y a la formación de biopelículas [62].

Hemolisina- γ (*Hlg*)

Al igual que HLa, Hlg es una toxina formadora de poros con estructura de barril- β , que afecta a eritrocitos de conejo y también presenta actividad sobre leucocitos provocando daño en la membrana de neutrófilos, monocitos y macrófagos. Esta toxina pertenece al grupo de las llamadas “toxinas de dos componentes” debido a que depende de que dos proteínas sean secretadas por *S. aureus*. Las mismas están constituidas por dos polipéptidos designados como F (*Fast*, HlgB) y S (*slow*, HlgA or HlgC) que se liberan como monómeros y se insertan en la membrana plasmática del huésped conduciendo a la formación del poro y liberación de iones produciendo finalmente la muerte de la célula [45].

Hemolisina δ (*Hld*)

La δ -hemolisina es codificada dentro de la secuencia codificante para RNAIII, el cual es molécula efectora del regulador global Agr [64]. Forma una hélice α anfipática, que actuaría como surfactante, provocando la lisis celular. Es miembro de la familia de péptidos secretados llamados Modulinas Solubles en Fenol (*Phenol-Soluble Modulins*, “PSMs”). Produce la lisis de eritrocitos y leucocitos, estimula la respuesta inflamatoria y contribuye al desarrollo y

diseminación de las infecciones asociadas a biofilm. Presenta una actividad citolítica moderada en comparación con PSM α que presenta pronunciada capacidad lítica [65].

Leucocidina de Pantón-Valentine (PVL)

PVL es una toxina de dos componentes proteicos de 32 kDa y 38 kDa denominados: "S", (elución lenta) y "F" (elución rápida), en función de su migración en la columna de celulosa. La toxina PVL es codificada por los genes *lukS-PV* and *lukF-PV* localizados en el profago ϕ Sa2 [66].

La producción de PVL por parte de la mayoría de las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) asociado a la comunidad (CA-MRSA) llevó a sugerir que la mayor virulencia de estas cepas estaba asociada a la expresión de esta toxina [67]. Diferentes trabajos clínicos y epidemiológicos han indicado una correlación entre la producción de PVL e infecciones de piel y tejidos blandos como también con neumonías necrotizantes y fascitis necrotizante en niños y adultos jóvenes [68-70]. Sin embargo otros estudios demostraron que clones CA-MRSA PVL-negativas no pierden su poder patogénico [70]. Por lo tanto, el rol de PVL en la patogénesis continúa siendo controversial. La diversidad de modelos animales utilizados en estos estudios y las diferentes especificidades de huéspedes de esta toxina (Ej. las células de conejo, son las más parecidas a las células humanas con respecto a la sensibilidad a esta toxina, pero son más sensibles a la toxina que las células de ratón), podrían explicar la discordancia en los resultados [15].

Leucocidina ED (LukED)

LukED fue identificada inicialmente hace más de una década. Sin embargo, los trabajos de investigación sobre esta leucotoxina son escasos. LukED ha demostrado actividad citolítica contra leucocitos y eritrocitos de conejo. Según datos epidemiológicos, LukED se encuentra ampliamente distribuida entre las cepas epidémicas de MRSA, lo que sugiere la contribución potencial de esta toxina en la patogenicidad [8, 15, 62].

Leucocidina AB (LukAB)

La leucocidina AB (LukAB, también conocida como LukHG) es el miembro más nuevo de las leucocidinas de dos componentes, fue descrita por dos grupos a fines de 2010 y principios de 2011 [71, 72]. Esta toxina codificada en el genoma core se encuentra en todas las cepas de *S. aureus* secuenciadas y tiene como blanco de acción las células fagocíticas humanas [15].

Modulinas Solubles en Fenol (PSMs)

Las modulinas solubles en fenol (PSM) fueron descubiertas en 1999 por *Mehlin et al.* en un cultivo de *S. epidermidis* [73]. Son un grupo de péptidos anfipáticos pequeños con estructura α -helicoidal. En *S. aureus*, se han descubierto al menos 7 PSM: PSM α 1 a PSM α 4 (codificados en el operón *psm α*), PSM β 1 y PSM β 2 (codificados en el operón *psm β*) y la δ -Hemolisina (dentro de

la secuencia codificante para RNAlII). Los genes *Psm*, se encuentran en el genoma core y codifican los péptidos de tipo β más cortos (20–25 aminoácidos) y los de tipo β más largos (44 aminoácidos) a través del clivaje pos-traducciona [18]. Entre los aislamientos clínicos de *S. aureus*, la producción de PSM es más abundante en cepas CA-MRSA que en MRSA asociado al hospital (HA-MRSA), y extremadamente alto en cepas de alta virulencia como el clon USA300 [74]. Las PSM se unen a la membrana citoplásmica de una manera no específica (sin receptor), lo que a su vez, conduce a la desintegración de la membrana. La tendencia de los PSM a agregarse en oligómeros, formando los poros de corta duración y su capacidad para facilitar la propagación en superficies o para estructurar biopelículas parecen ser los aspectos principales en la patogénesis [62].

4.3.2.1.2 TOXINAS CON ACTIVIDAD DE SUPERANTÍGENOS

Muchas cepas de *S. aureus* son capaces de producir superantígenos que causan graves toxinosis, como el síndrome de shock tóxico y la neumonía necrotizante.

Los superantígenos producen una estimulación masiva y no específica de la proliferación de células T, por unión inespecífica del complejo entre el Ag expuesto por la célula presentadora (monocito macrófago) a través de las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y el receptor del LT (TCR), no en las zonas de reconocimiento específico, sino en las adyacentes, y se activan numerosos clones de distinta especificidad antigénica, esta actividad se conoce como superantígeno. La activación de un gran número de clones de linfocitos T hace liberar de forma masiva a citoquinas por linfocitos y macrófagos. La activación por el mecanismo de los superantígenos puede activar entre el 5% y el 30% de toda la población de células T, mientras que el mecanismo de activación por medio de antígenos convencionales activa entre el 0,01% y el 0,1% de las células T.[75]

Por lo tanto, estos superantígenos inician una tormenta de citoquinas que conduce a un síndrome similar a la sepsis. La mayoría de los superantígenos son pequeñas proteínas secretadas de 20–28 kDa de tamaño y comparten propiedades bioquímicas y estructurales similares [70]. Dentro de este grupo podemos encontrar:

Enterotoxinas de *Staphylococcus* (SEs)

Las SEs forman parte de la familia de superantígenos termoestables y gastrointestinales tolerantes a proteasas. Su distribución es variable entre las cepas de *S. aureus* y están reguladas por múltiples vías que a menudo se superponen bajo la influencia de factores ambientales [18]. Cuando los alimentos se contaminan con *S. aureus*, éste crece en una alta densidad celular provocando la producción de SEs. Los pacientes desarrollan dolor abdominal, diarrea intensa y vómitos [76]. A la fecha, hay más de 20 SEs identificadas, las cuales se diferencian por su heterogeneidad antigénica (SEA-SEE, SEG-SEJ, SEL-SEQ y SER-SET) [62].

Toxina del Síndrome del Shock Tóxico 1 (TSST-1)

El superantígeno más famoso de *S. aureus*, es la toxina del síndrome de shock tóxico (TSST), con un tamaño de 22 kD, causa el síndrome de shock tóxico (TSS) al estimular la liberación de IL-1, IL-2, TNF- α y otras citoquinas. El TSS es una enfermedad grave y potencialmente mortal conocida principalmente por el brote asociado con el uso de tampones en la década de 1980. A diferencia de los superantígenos de enterotoxinas, TSST no causa vómitos. TSST están presentes en sólo un pequeño número de cepas de *S. aureus* [56].

4.3.2.1.3 TOXINAS EXFOLIATIVAS

Toxina epidermolítica o exfoliativa (ETs)

Las toxinas exfoliativas (ET), también conocidas como toxinas epidermolíticas, son serin proteasas extremadamente específicas secretadas por *S. aureus*. Estas proteasas reconocen e hidrolizan las cadherinas del desmosoma en las capas superficiales de la piel. Están asociadas con el clivaje de uniones de queratinocitos y adhesión célula-célula en la epidermis del huésped, lo que puede inducir la descamación de la piel y la formación de ampollas [62]. Las ETs son las responsables del síndrome de la piel escaldada por *Staphylococcus* (SSSS), una enfermedad que afecta predominantemente a los neonatos, bebés y adultos con insuficiencia renal e inmunodeficiencia. Los individuos afectados experimentan ampollas en la piel, descamación, deshidratación y secuelas secundarias [45]. Los principales ETs que se conocen hasta el momento son la toxina exfoliativa A / B / C / D (ETA, ETB, ETC, ETD). ETA y ETB son los más implicados en humanos, mientras que la ETC sólo fue aislada de una infección de caballo y no se encontró asociación con enfermedades humanas. La ETD sólo se identificó en 2002 en una muestra clínica [62].

4.3.3 OTROS FACTORES DE VIRULENCIA

4.3.3.1 ELEMENTO CATABÓLICO MÓVIL DE LA ARGININA (ACME)

Es un MEG que podría tener implicancias en el crecimiento, la transmisión y la patogénesis de CA-MRSA. Fue identificado a partir de la secuenciación del genoma de una cepa MRSA USA300 [77]. Existe una alta prevalencia de este elemento en *Staphylococcus epidermidis* lo que sugiere que es de esta especie donde fue adquirido [70].

El ACME se integra corriente abajo del *SCCmec* y usa el mismo sitio de anclaje que éste para la integración dentro de *orfX*. Es flanqueado por secuencias repetidas y los genes de la recombinasa (*ccr*) del *SCCmec* catalizan la integración y la escisión de la ACME del cromosoma [78]. Los grupos de genes principales identificados en ACME incluyen los genes *arc* (arginina desaminasa, *arcA*, *arcB*, *arcC* y *arcD*) y los genes *opp* (operón de oligopéptido permeasa *opp-3A*, *opp-3B*, *opp-3C*, *opp-3D* y *opp-3E*) y los genes *speG* [70].

La actividad de la arginina deaminasa estaría implicada en la producción de amonio y ATP, facilitando la colonización por neutralización del ambiente ácido generado sobre la piel. Por lo que se cree que este factor promueve la colonización, el crecimiento y la supervivencia del clon USA300 en la piel humana. Además la depleción del pool de arginina presente en la piel, provocaría una deficiente formación de Óxido Nítrico, molécula implicada en la respuesta inmune innata y adaptativa del huésped. El operón *opp* codifica un oligopéptido o transportador de metales. El gen *speG* codifica una espermidina acetiltransferasa que confiere la habilidad de sobrevivir a altos niveles de poliaminas como espermidina y espermina, producto del metabolismo de la arginina, elaboradas en la piel de seres humanos y tóxicas para las bacterias que no portan los genes *speG* [79].

El ACME está casi exclusivamente asociado al clon USA300 [78, 79], el cual es el clon CA-MRSA más prevalente en América del Norte. A partir del año 2005, se comenzaron a detectar infecciones asociadas a este clon en países de sud América, el mismo fue denominado variante latinoamericana (USA300-VL) por estar altamente relacionados al clon Norte Americano con la diferencia de no presentar el ACME entre sus aislamientos [80, 81]. Luego se pudo corroborar que no se trató de una diseminación desde América del norte sino que presentan un origen divergente [82].

Si bien el ACME ha sido encontrado en la gran mayoría de los aislamientos del clon USA300, estudios posteriores indican que entre el 9-15% de los aislamientos USA300 no portan este elemento. Además se han reportado algunas variantes genéticas del mismo. Los alotipos ACME se definen por la presencia o ausencia de los grupos de genes *arc* y *opp-3* [USA 300: **tipo I**, *arc* (+) *opp-3*(+)/ **tipo II**, *arc*(+) *opp-3*(-)/ **tipo III**, *arc*(-) *opp-3*(+)]. También, se ha detectado una variante del ACME USA300, denominada ACME truncada de tipo II que carece de los genes *opp3* y *CopA* (codifica una ATPasa transportadora de cobre ubicada cerca de *opp3*), en un pequeño número de otros linajes de MRSA tales como ST1-IVa, ST5-II, ST5-IV, ST5-V, ST22-IVa, ST22-IVh, ST59 -IVa, ST97-V y ST239-III [83].

4.4 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA

La capacidad de *S. aureus* para causar un espectro diverso de enfermedades humanas refleja su capacidad para adaptarse tanto al entorno como a los huéspedes y sugiere que la patogénesis de las infecciones por *S. aureus* es un proceso complejo que resulta de una interacción de los sistemas reguladores que responden a múltiples señales externas del entorno del huésped y de la población bacteriana. *S. aureus* utiliza estas señales para modular la expresión de un gran número de genes, incluidos los factores de virulencia, para adaptarse a las

condiciones ambientales cambiantes [84]. Una de las estrategias más eficientes para modular genes de virulencia es a través del sistema de transducción de señales de dos componentes (TCS). Dicho sistema normalmente consiste en una histidina quinasa (HK) unida a la membrana y una proteína reguladora de la respuesta citosólica requerida para inducir la adaptación transcripcional [85]. Se han descrito 16 TCS con un TCS adicional presente en el *SCCmec* [28].

4.4.1 SISTEMA Agr (*accessory gene regulator*)

El regulador Agr (Figura 4) actúa como un mecanismo de detección de quorum sensing que reacciona frente a la densidad bacteriana facilitando así la expresión preferencial de adhesinas de superficie durante la fase exponencial de crecimiento (densidad celular baja) y modificando la expresión de las exoproteínas durante las fases de crecimiento post-exponencial y estacionaria (densidad celular elevada) [48].

El locus *agr* tiene un tamaño de 3.5 kb y consta de dos unidades transcripcionales divergentes, RNAII y RNAIII, cuya transcripción está dirigida por los promotores P2 y P3, respectivamente. El locus RNAII contiene cuatro genes, *agrB*, *agrD*, *agrC* y *agrA*. La transcripción de *agrD* codifica un péptido precursor de la señal del quorum extracelular de Agr, llamado péptido autoinducido (AIP). El producto del gen *agrB* codifica para una endopeptidasa transmembrana responsable de la exportación del AIP. Los genes *agrC* y *agrA* codifican un sistema de transducción de señales de dos componentes que incluye un sensor de histidina quinasa, AgrC, una proteína transmembrana que se fosforila en la unión de AIP y su regulador de respuesta asociado, AgrA. Al activarse por la fosforilación dependiente de AgrC, AgrA se une a la región promotora P2 para RNAII y la región promotora P3 para RNAIII, así como a los promotores que controlan la expresión de los péptidos PSM α y PSM β independientes a RNA III (Figura 4) [64].

Durante la fase de crecimiento exponencial donde la densidad celular es baja, *agr* activa la expresión de proteínas de adherencia mientras que la expresión de exotoxinas está reprimida principalmente por *Rot* (*repressor of toxins*), que pertenece a la familia de reguladores transcripcionales *Sar* (*Staphylococcal accessory regulator*). Una vez que el crecimiento bacteriano llega a la fase estacionaria, el sistema *agr* comienza a transcribir los genes de RNAIII a través del P3 y de esta manera, por un lado actúa a nivel de *Rot* y este deja de reprimir la transcripción de exotoxinas y por el otro inhibe la transcripción de proteínas de adherencia [48, 64].

En *S. aureus*, se han caracterizado cuatro grupos alélicos de *agr* (numerados I a IV) que generalmente inducen la actividad *agr* dentro de un grupo e inhiben la actividad *agr* entre grupos. La actividad inhibitoria de estos grupos *agr* representa una forma de interferencia

bacteriana que afecta la expresión de genes de virulencia [86]. Además como el locus *agr* pertenece al core variable, hay una fuerte asociación a linajes clonales y cada Complejo Clonal (CC) pertenece exclusivamente a un grupo *agr*, por lo cual es utilizado como un marcador molecular para su genotipificación [87].

Figura 4 | Sistema de regulación *agr* (*accessory gene regulator*)

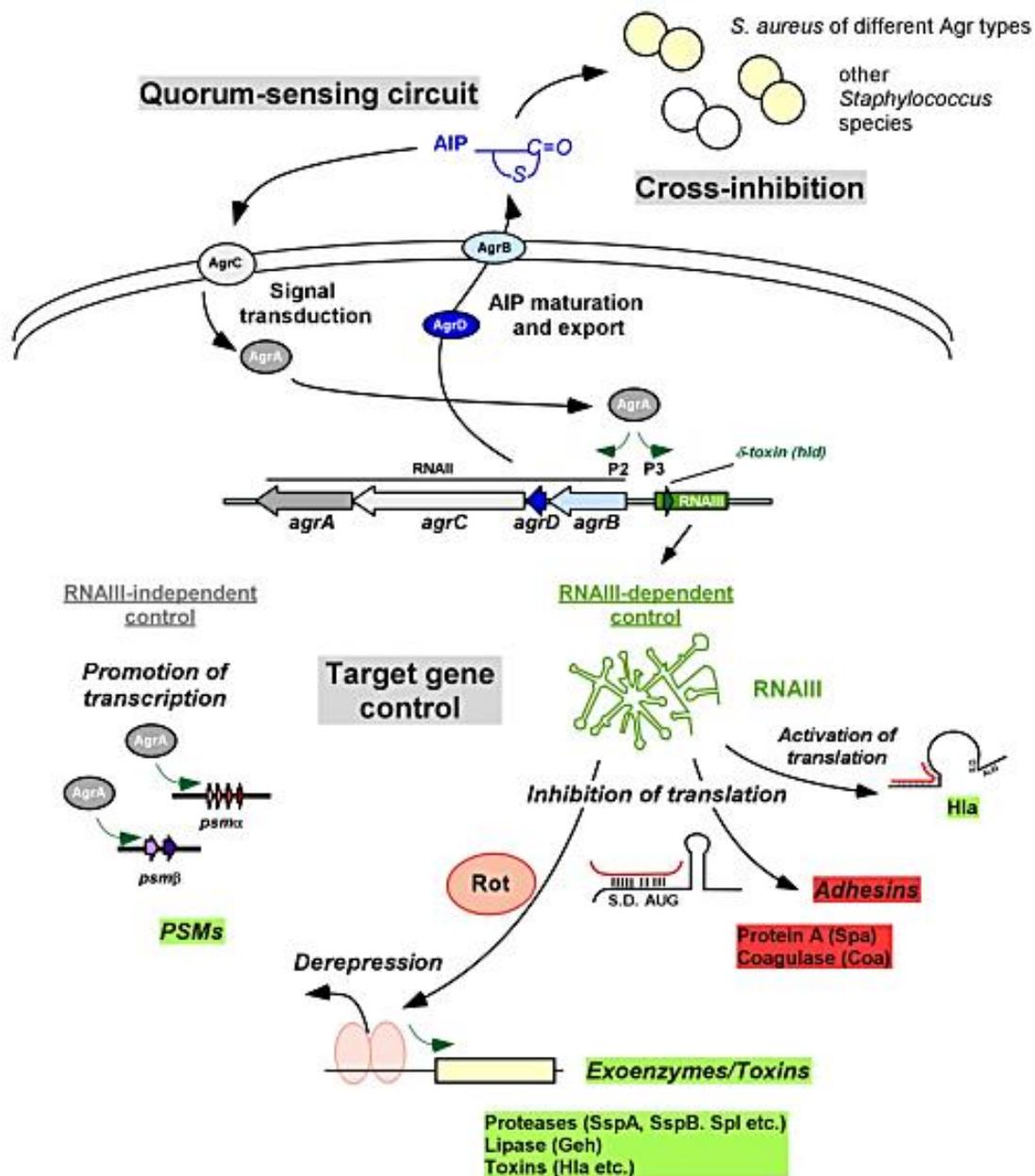


Fig. 4 Control de Agr en *S. aureus*. El sistema de quorum sensing se muestra en la parte superior izquierda. La señal AIP se produce a partir del precursor de AgrD por la maduración y exportación de AgrB. A una determinada densidad bacteriana, AIP activa el sistema de dos componentes AgrC-AgrA y AgrA fosforilada activa la transcripción del promotor P2, lo que resulta en la regulación de retroalimentación positiva. Una característica importante de Agr es la especificidad de grupo, que resulta en una inhibición cruzada, es decir, la inhibición de la actividad de Agr, en cepas que pertenecen a otros grupos de especificidad de Agr y otras especies (arriba a la derecha). La mayoría de los blancos de Agr se regulan a través de RNAIII, cuya transcripción aumenta con AgrA, a través

del promotor P3. RNAIII también contiene el gen para la δ -toxina (*hld*). RNAIII controla los genes blancos, en la mayoría de los casos, inhibiendo la traducción, como la proteína A, mientras que la inhibición de la traducción del represor Rot conduce a la derepresión de la transcripción de muchas de las toxinas clásicas de Agr, como la α -toxina. AgrA también aumenta la transcripción de los operones *psmA* y *psm β* , que codifican péptidos PSM, en un modo independiente de RNAIII. Tomado de **Le, K.Y. and M. Otto, Quorum-sensing regulation in Staphylococci-an overview. Front Microbiol, 2015. 6: p. 1174**

4.5 MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE VIRULENCIA EN *S. aureus*

Los modelos animales deben imitar, con la mayor similitud posible a los escenarios clínicos vistos en pacientes, para permitir que los resultados experimentales se traduzcan a la atención clínica correspondiente [88]. Los ratones han sido utilizados ampliamente para identificar los factores de virulencia de la bacteria y los componentes del hospedador importantes para la patogénesis en las infecciones por *S. aureus*. Se han desarrollado modelos de ratón para varias enfermedades clínicas importantes, que incluyen: peritonitis, neumonía, sepsis, infección de la piel y tejidos blandos, endocarditis, abscesos, osteomielitis, artritis y colonización nasal [89]. Sin embargo, si bien los modelos animales de infección han demostrado ser invaluable en la determinación de los factores de virulencia bacteriana, los modelos de invertebrados han ganado mayor atención como una alternativa viable a los modelos tradicionales de infección en mamíferos.

4.5.1 USO DE *Galleria mellonella* COMO MODELO DE VIRULENCIA COMPARATIVA

La larva de la polilla de la cera, *Galleria mellonella* (*G. mellonella*), se utiliza cada vez más para estudiar una serie de patógenos humanos importantes, como las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como también hongos patógenos [90-92]. Usar un modelo de insecto tiene una serie de ventajas sobre los modelos tradicionales de mamíferos y por ser un invertebrado, *G. mellonella* no está sujeta a las limitaciones éticas de los modelos de mamíferos. Además, las larvas se pueden mantener fácilmente, se pueden infectar mediante inyección sin anestesia, someterse a un tratamiento previo con inhibidores químicos y mantener la incubación a 37 °C, temperatura a la cual ocurren las infecciones en el ser humano. La mayor comprensión del sistema inmunológico de *G. mellonella* también ha ayudado en la caracterización de este organismo como modelo, ya que si bien los insectos no tienen un sistema inmunitario adaptativo como el que se encuentra en los mamíferos, sí tienen un sofisticado sistema de defensa celular y humoral que incluye la producción de péptidos antimicrobianos. Los hemocitos son los mediadores principales de las defensas celulares y son el tipo de célula más numeroso que se encuentra en la hemolinfa. Estas células son fagocitos profesionales y realizan funciones similares a los macrófagos y neutrófilos humanos al captar y degradar bacterias en un compartimento fago-lisosomal [93].

4.6 COLONIZACIÓN Y TRANSMISIÓN

4.6.1 COLONIZACIÓN

S. aureus también forma parte del microbioma humano, se reconocen tres estados: persistente, intermitente y no colonizado. *S. aureus* puede colonizar de forma persistente y asintomática el vestíbulo nasal de aproximadamente un 20-30% de la población humana. El resto de la población está potencialmente colonizada de forma intermitente y la mayoría de los individuos están expuestos al organismo de forma transitoria a lo largo de su vida [94]. Otros sitios normalmente colonizados incluyen la piel, el perineo, la faringe, el tracto gastrointestinal, la vagina y las axilas [95]. El hecho de que *S. aureus* se encuentre en múltiples sitios del cuerpo, y que muchos estudios sólo busquen la portación nasal arroja variabilidad en la comprensión de la importancia de los estados de portación.

S. aureus puede entrar en contacto con la mucosa nasal y luego interactuar con ligandos de células epiteliales como la loricrina y la citoqueratina 10 (K10). La prevalencia de colonización varía según la región geográfica, la edad, el género y la etnia [96]. La portación es más alta entre los recién nacidos (hasta 70%) pero disminuye en la niñez, debido probablemente a la competencia con otras bacterias presentes en la nasofaringe [97]. Hay otro pico en la adolescencia seguido de una disminución en la edad adulta temprana. La colonización persistente se observa con más frecuencia en niños que en adultos y la conversión de colonización persistente a transitorio o no colonizado ocurre con mayor frecuencia en la adolescencia [95, 98]. También se ha encontrado que las tasas de portación son más altas en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 1, usuarios de drogas intravenosas, pacientes en hemodiálisis, pacientes quirúrgicos, pacientes con VIH-SIDA y pacientes con defectos cualitativos o cuantitativos en la función leucocitaria [99]. Los estudios de portación persistente son más difíciles de determinar, pero entre adultos relativamente sanos, las enfermedades crónicas de la piel, la infección reciente de la piel, el sexo masculino y el hecho de no fumar se asocian con una mayor tasa de colonización nasal [98].

Existe evidencia ya sea directa o indirecta de una asociación entre la inmunidad del huésped y la portación nasal de *S. aureus*, los polimorfismos en los genes inmunitarios que codifican la lectina de unión a manosa, el receptor tipo Toll 2 (TLR2), el receptor de glucocorticoides, la proteína C reactiva, la región promotora de la β -defensina 1 (DEFB1) y la interleuquina-4 (IL-4) están asociados con un mayor riesgo para la portación nasal de *S. aureus* [94].

La colonización por *S.aureus* aumenta significativamente el riesgo de infecciones, se ha descrito que la posibilidad de desarrollar infecciones por *Staphylococcus* asociadas a la atención sanitaria es de tres a seis veces mayor entre los portadores nasales con una gran carga bacteriana comparado con los no portadores o con los portadores de una carga bacteriana baja [100, 101]. Estudios clínicos describen un riesgo significativamente mayor de bacteriemia entre los portadores, y citan riesgos relativos de 1.2 a 21.7 veces en cohortes de pacientes con contacto regular con el ámbito hospitalario, especialmente con presencia de dispositivos invasivos. En estas condiciones, la mayoría (> 80%) de las bacteriemias nosocomiales fueron causadas por la cepa de colonización endógena [98].

La colonización con cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) confiere un mayor riesgo de invasión e infección posterior en pacientes hospitalizados que las cepas sensibles a la meticilina (MSSA) y se asocia con una mayor morbilidad y mortalidad [102]. Aproximadamente, entre el 15 y 25% de los pacientes hospitalizados con MRSA desarrollan una infección posterior por MRSA durante su hospitalización o dentro de los 18 meses [103], Por lo tanto dado el vínculo entre la colonización y la enfermedad, las estrategias para prevenir la colonización nasal son un método atractivo para controlar la infección por *S. aureus* [98].

Una medida de importancia para el control de infecciones y transmisión de bacterias dentro del ámbito hospitalario es la presión de colonización, la cual se define como la proporción de pacientes colonizados con un organismo en particular en un área geográfica definida dentro de un hospital durante un período de tiempo específico. Por lo tanto, la presión de colonización se puede usar para cuantificar la carga de bacterias resistentes a los antibióticos en una unidad hospitalaria y también puede representar una estimación de la probabilidad de transmisión cruzada de bacterias resistentes a los antibióticos dentro de la unidad. Por ejemplo, el riesgo de transmisión es probablemente mayor cuando el 80% de los pacientes ya están colonizados que cuando sólo el 10% de los pacientes están colonizados. Por lo tanto, la presión de colonización puede potencialmente proporcionar un método para ajustar la carga de bacterias resistentes a los antibióticos mientras se evalúan las asociaciones independientes de otros factores causales hipotéticos con la adquisición de bacterias resistentes a los antibióticos en estudios epidemiológicos [104, 105].

4.6.2 RESERVORIO Y TRANSMISIÓN

La asociación de la colonización nasal por *S. aureus* y la infección se describió por primera vez en la década de 1930. Desde 1930, la epidemiología ha cambiado drásticamente, y MRSA ha alcanzado niveles epidémicos en hospitales y comunidades [106]. Después del nacimiento, las manos son el vector principal para la transmisión de *S. aureus* desde las superficies hasta la nariz

[107], luego también la transmisión puede ocurrir a través del contacto piel con piel entre personas o con fómites contaminados [98]. Los principales reservorios de MRSA de los cuales el humano tomará contacto son: i) los hospitales, tanto en las superficies de las instalaciones así como también el personal de trabajo [99, 108, 109], ii) la comunidad, donde la prevalencia de MRSA está dada, debido en gran parte a la epidemia de cepas de MRSA asociadas a la comunidad (CA-MRSA) [110], y iii) el medio ambiente, principalmente animales tanto domésticos como de producción [111, 112].

Es importante destacar, que incluso el contacto comprobado con el microorganismo no necesariamente resulta en una colonización posterior, y ciertos hospedadores no son portadores. En un estudio, sólo una minoría de pacientes con infección cutánea por *S. aureus* demostrada por cultivo previo permaneció colonizada con el organismo en la fase de convalecencia, y sólo el 25% de los contactos de sus hogares fueron colonizados [113]. Por otro lado, estudios empíricos han demostrado que las instituciones no hospitalarias (residencias) son reservorios importantes para la transmisión de MRSA. Estas instalaciones con individuos que residen por un período sustancial, como las instalaciones de cuidado a largo plazo, residencias geriátricas y las instituciones correccionales, se consideran de un riesgo particularmente alto [114]. Consecuentemente, la tasa de prevalencia de colonización por MRSA puede ser tan alta como del 52% en hogares de ancianos en los Estados Unidos, significativamente mayor que el del 1,5% en la población general [115-117].

Actualmente, existen controversias en torno a la elección de la estrategia óptima para la detección de portadores de MRSA y de esta manera disminuir su transmisión. La pesquisa universal en todas las admisiones hospitalarias es costosa y puede no ser rentable, especialmente en instituciones con baja prevalencia de MRSA. Por lo tanto, varios investigadores han tratado de identificar los factores de riesgo para colonización por MRSA. Estos factores de riesgo, dependen de factores geográficos, factores de la cepa y de los huéspedes. Se pueden mencionar, el uso de antibióticos dentro de los 3 a 6 meses anteriores al ingreso hospitalario, hospitalización en los últimos 12 meses, sexo masculino, edad avanzada, presencia de catéter central permanente, infecciones de piel o tejido blando al ingreso, traslado de otra institución, residencia de cuidado a largo plazo, diabetes y presencia de inmunocompromiso [118].

Cuando un paciente es detectado como positivo a la portación de MRSA, el paso a seguir consiste en el aislamiento de contacto con o sin des-colonización nasal con mupirocina. Si bien este antibiótico es el de elección para este propósito, existe preocupación por las crecientes tasas de resistencia debido al uso indiscriminado del mismo [119, 120].

4.7 INFECCIONES POR *S. aureus*

Si bien la colonización de *S. aureus* no es perjudicial para el huésped, en ciertas oportunidades, este microorganismo puede violar las defensas innatas del huésped y obtener acceso a tejidos más profundos, causando una variedad de infecciones superficiales e invasivas [121]. Por ejemplo, en individuos sanos de la comunidad, *S. aureus* con frecuencia causa infecciones menores de la piel y tejidos blandos como impétigo, foliculitis y abscesos cutáneos. Las infecciones más raras pero graves en la comunidad incluyen piomiositis, fascitis necrotizante y neumonía necrotizante, mientras que en el ámbito hospitalario, *S. aureus* puede iniciar infecciones en sitios quirúrgicos o desde dispositivos médicos implantados, como válvulas cardíacas artificiales, catéteres, prótesis articulares e implantes ortopédicos [95, 121, 122]. Durante la bacteriemia, *S. aureus* circula en la sangre y puede diseminarse y afectar órganos vitales, causando endocarditis, osteomielitis e infecciones descendentes del tracto urinario [8].

Además de las problemáticas en torno a la salud pública, las infecciones por *S. aureus* conllevan una alta carga socioeconómica tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo [123], agravando aún más la situación con la aparición de "superbacterias" resistentes a múltiples antibióticos, principalmente MRSA y *S. aureus* resistente a la vancomicina (VRSA) [124].

En los Estados Unidos, el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) define a las infecciones asociadas a la comunidad (CAI) como casos de Infecciones de inicio en la comunidad (CACO) en pacientes sin factores de riesgo asociados al hospital (HRF) en el año previo. Por otro lado, las infecciones asociadas al hospital (HAI) se define como aquellas que incluyen: (i) infecciones de inicio hospitalario independientemente de la presencia de HRF (HAHO) e (ii) infecciones de inicio en la comunidad que ocurren en pacientes con al menos un HRF (HACO) [125].

A su vez, el CDC estima que ocurren aproximadamente 80.461 infecciones severas por MRSA cada año, lo que lleva a 11 285 muertes, mientras que los costos de atención médica de una sola infección por MRSA pueden ser tan altos como U\$D 34657 [124], planteando un grave problema al sistema sanitario.

4.8. EPIDEMIOLOGÍA GENERAL Y MOLECULAR DE *S. aureus*

La epidemiología es el estudio de la distribución y los determinantes de estados o eventos (en particular de enfermedades) relacionados con la salud y la aplicación de esos estudios al control de enfermedades y otros problemas de salud. Hay diversos métodos para llevar a cabo investigaciones epidemiológicas: la vigilancia y los estudios descriptivos se pueden utilizar para

analizar la distribución, y los estudios analíticos permiten analizar los factores determinantes [126]. La epidemiología, apoyada en el método científico y con la concurrencia de otras disciplinas, tales como la bioestadística y la genética, entre otras, se convierte en una herramienta básica en el área de la prevención de las enfermedades y una fuente de información importante en la formulación de las políticas de salud pública [127].

La Epidemiología Molecular es una disciplina que permite abordar los estudios a través de la utilización de técnicas moleculares, combinando la epidemiología analítica con métodos avanzados de laboratorio. La caracterización de los aislamientos es importante para desarrollar estrategias locales adecuadas de tratamiento.

Los clones bacterianos son células genéticamente idénticas o con pequeñas diferencias que descienden de un antepasado común. Con el paso del tiempo, los miembros de un clon individual pueden diferenciarse a través de mutaciones puntuales, de recombinación y de adquisición o delección de elementos genéticos móviles, dando origen a una amplia diversidad genética y fenotípica [2].

El éxito de *S. aureus* como colonizador y como patógeno se debe en gran parte a la capacidad de adaptación a diferentes entornos, gracias a la adquisición de ADN por genes de transferencia horizontal (HGT) y a la propagación clonal [15]. A través de HGT, *S. aureus* puede usar un amplio y flexible repertorio de determinantes de colonización, factores de evasión inmunológica y toxinas, y puede evolucionar rápidamente en respuesta al mayor desafío para el mundo microbiano en los últimos 70 años: la introducción de antibióticos [29, 39].

4.8.1 MÉTODOS MOLECULARES DE TIPIFICACIÓN

La capacidad de *S. aureus* para causar una amplia variedad de infecciones, para propagarse tanto al hospital como a la comunidad y para causar brotes, ha requerido el desarrollo de técnicas moleculares para poder distinguir los diferentes clones y poder implementar estrategias de vigilancia y comprender la epidemiología de *S. aureus*. Las técnicas moleculares utilizadas en el análisis de *S. aureus* se detallan a continuación:

4.8.1.1 Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE)

Se basa en la generación de fragmentos de gran tamaño de más de 40 Kb a partir de ADN tratado con enzimas de restricción de cortes poco frecuentes (en el caso de *S. aureus* es la enzima *Sma*I), esto genera la división del ADN en pocos fragmentos (entre 10-30). Posteriormente, se los somete a la acción de un campo eléctrico que varía periódicamente, de modo que al aplicar el primer campo las moléculas de ADN se reorientan avanzando en dirección del polo positivo. La aplicación de un segundo campo eléctrico, con una orientación diferente al primero, obliga al ADN a cambiar su conformación y a reorientarse nuevamente para avanzar en dirección del segundo campo eléctrico. El tiempo requerido para esta reorientación es

dependiente de la longitud de la molécula, o sea de su peso molecular. Las moléculas grandes tardan más tiempo en alinearse y en comenzar la migración a través del gel, de lo que tardan las moléculas más pequeñas. Mientras que los campos eléctricos que se alternen tengan la misma intensidad y voltaje, la migración final del ADN será en línea recta y el patrón final será la suma de todos los avances en zigzag que ha realizado la molécula. De esta manera, se obtienen patrones de restricción que representan el ADN cromosómico bacteriano distribuido en pocas bandas con moviidades electroforéticas distintas. Para la interpretación de esta técnica, existen una serie de criterios establecidos desde el año 1995 por Tenover y cols. [128], los cuales son utilizados para entender si aislamientos clínicos epidemiológicamente relacionados también lo están a nivel genético [2], pudiendo de esta manera confirmar una cadena de transmisión. El PFGE es una herramienta útil para estudiar la epidemiología local, como en el caso de un brote, mostrando un poder discriminatorio más alto que otros métodos de tipificación.

4.8.1.2 Tipificación por secuenciación de Múltiples Locus (MLST)

El método se basa en la secuenciación de los fragmentos internos de 7 genes *Housekeeping*; luego se analizan las secuencias con la ayuda del software y la base de datos en el sitio web de MLST (<http://saureus.mlst.net>) para obtener un número de alelo para cada gen. La sucesión de los alelos de los siete genes origina un perfil alélico definido tipo de secuencia (ST). Usando el algoritmo eBURST (www.eburst.mlst.net), los ST que compartan al menos 5 alelos se agrupan en complejos clonales (CC). Las ventajas de MLST son su reproducibilidad, portabilidad y su nomenclatura universal, de modo que los datos de ST pueden ser comparados fácilmente [129]. No obstante, presenta un bajo poder discriminatorio debido a que es una técnica que analiza genes altamente conservados en el genoma de *S. aureus*.

4.8.1.3 Tipificación del gen de la proteína A (*Spa typing*)

El gen *spa*, que codifica la proteína A, tiene una longitud de aproximadamente 2.150 pb y codifica tres regiones: la región de unión a Fc, la región polimórfica X y la región C-terminal. La región X, también llamada región de repetición, consiste en repeticiones en tandem de número variable (VNTR). Estos VNTR contienen de 2 a 15 secuencias repetitivas que consisten en 21 a 27 pb (principalmente 24 pb), que son polimórficas y diversas debido a las deleciones y duplicaciones de las repeticiones y en ocasiones, debido a mutaciones puntuales. El polimorfismo se refleja en el número y el orden de las secuencias repetitivas [2, 130]. El método está respaldado por un servidor central de *spa* (<https://spaserver.ridom.de/>) que actualmente alberga 18512 tipos de *spa*. El poder discriminativo de la tipificación de *spa* es menor que el de PFGE pero mayor que el de MLST[131].

4.8.1.4 Tipificación del Cassette cromosomal *mec* (*SCCmec*)

Este método se basa en la identificación de los diferentes elementos estructurales del *SCCmec*; por lo tanto, sólo puede ser utilizada para clasificar aislamientos de MRSA. La tipificación del *SCCmec* se realiza dirigiendo la búsqueda de sus elementos claves, el complejo de genes *mec* y el tipo de complejo de recombinasas (*ccr*) [44].

4.8.1.5 Secuenciación de genomas completos (WGS)

La secuenciación de genomas completos, es la técnica más reciente de tipificación de variaciones de ADN para cualquier organismo. La secuenciación de última generación (del inglés *Next-generation sequencing* “NGS”), provee un método costo-efectivo de identificación para variaciones en todo el genoma, presenta una clara ventaja sobre la tradicional secuenciación de Sanger, con la capacidad de generar millones de lecturas (*reads*) aproximadamente de entre 35 a 700 pb de longitud. La construcción del genoma puede realizarse con dos metodologías, el ensamblado *de novo* y el mapeo contra secuencias de referencia. En el ensamblado *de novo*, múltiples *reads* son ensamblados mediante solapamiento de regiones basándose en algoritmos matemáticos, mientras que en el mapeo, los *reads* son ordenados contra una secuencia de referencia. WGS es una herramienta extremadamente poderosa y muy atractiva para fines epidemiológicos [2]. Ofrece la mejor resolución posible para poder discriminar cepas y para el análisis filogenético, puede producir información sobre la matriz antigénica, la virulencia y la resistencia a los antibióticos, prediciendo fenotipos de interés a partir de un análisis bioinformático (*in silico*) [132].

Los principales problemas con WGS se basan en la reproducibilidad de los resultados obtenidos con diferentes plataformas, la disponibilidad de herramientas bioinformáticas rápidas y fáciles, la armonización de los análisis bioinformáticos y el desarrollo de una nomenclatura común y una base de datos de acceso abierto [132]. Con respecto a *S. aureus*, WGS puede mostrar diferencias entre las cepas indistinguibles por el PFGE, el método más discriminativo utilizado hasta ahora [133].

4.9 MRSA: EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

Un problema importante asociado con *S. aureus* es el notable nivel de adquisición de resistencia contra múltiples clases de antibióticos, lo que complica el tratamiento. En 1940 se introduce la penicilina en el tratamiento clínico y rápidamente, en 1942, se detectó la primera cepa de *S. aureus* resistente a la penicilina [40]. Esta resistencia, en un principio, tuvo una baja incidencia pero en pocos años su prevalencia aumentó rápidamente principalmente debido a la

diseminación del clon denominado “Arcaico” (fago tipo 80/81, luego identificado como ST250). Este clon adquirió la capacidad de producir una penicilinasa codificada en un plásmido, que hidrolizaba el anillo β -lactámico inactivando el principio activo del antibiótico. Consecuentemente, a fines de la década de 1950 se desarrolló un antibiótico β -lactámico semisintético llamado meticilina que era estable a la penicilinasa conservando la acción bactericida.

En 1961, en un hospital del Reino Unido, son detectadas las primeras cepas resistentes a meticilina, MRSA (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*). Este tipo de resistencia abarca todo el grupo de antibióticos beta-lactámicos y sus derivados y fue detectada por primera vez en el clon “Arcaico” [134]. En un principio, estas cepas de MRSA se diseminaron por el Reino Unido, luego en Europa y finalmente en el resto del mundo convirtiéndose en endémicas, ocasionando infecciones en los hospitales, ya sea en pacientes internados o de la comunidad pero con contacto previo con el hospital. Estos últimos presentaban alguno de los siguientes factores de riesgo para infección adquirida en el hospital o relacionadas a la atención sanitaria (HRFs) [125]: i) hospitalización en el año previo, ii) historia de colonización o infección por MRSA, iii) intervenciones quirúrgicas, iv) hemodiálisis, v) residencia en instituciones de cuidado crónico [125, 135]. Progresivamente, estas cepas fueron adquiriendo resistencia a otros grupos de antibióticos no β -lactámicos usados comúnmente en la práctica clínica [136].

4.9.1 CLASIFICACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE MRSA

4.9.1.1 MRSA asociado al Hospital (*Healthcare-Associated MRSA “HA-MRSA”*)

HA-MRSA describe el comportamiento epidemiológico de determinadas cepas de MRSA que son específicamente exitosas en entornos hospitalarios. También pueden ser endémicos en ciertos institutos de atención de la salud, causando niveles epidémicos de infecciones que normalmente están por encima del umbral de la tasa de infección por *S. aureus* [2]. Durante dos décadas después de la aparición del MRSA, estas cepas se limitaron a hospitales de Europa y más tarde también en los Estados Unidos. Como se mencionó anteriormente, la mayoría de las infecciones por MRSA fueron causadas por el clon arcaico (ST250, CC8), el cual desapareció gradualmente en la década de 1980 para ser reemplazado por nuevos clones pandémicos [41, 129].

La nomenclatura original de los clones de HA-MRSA incluía el área geográfica donde los clones fueron recuperados por primera vez o donde se diseminaron y clasificados en base a sus características genéticas determinadas con los métodos de tipificación estándares antes mencionados.

Los 5 complejos clones más prevalentes en todo el mundo entre los aislamientos de HA-MRSA son:

CC8	Clon arcaico (ST250-SCC <i>mecl</i> -PVL ⁻ reportado en el Reino Unido desde 1960)
	Clon Ibérico (ST247-SCC <i>mecl</i> A/PVL ⁻ ; reportado en España desde 1989)
	Clon Brasileño (ST239-SCC <i>mecl</i> III A-PVL ⁻ reportado en Brasil desde 1992)
	Clon húngaro (ST239-SCC <i>mecl</i> III-PVL ⁻ reportado en Hungría desde 1993)
CC5	Clon Pediátrico (ST5-SCC <i>mecl</i> IV-PVL ⁻ , reportado en Portugal desde 1992)
	Clon New York/Japón (ST5-SCC <i>mecl</i> II-PVL ⁻ , reportado en EEUU desde 1998)
CC30	Clon EMRSA-16 (ST36-SCC <i>mecl</i> II-PVL ⁻ , reportados en UK desde 1993)
CC22	Clon EMRSA-15 (ST22-SCC <i>mecl</i> IV-PVL ⁻ reportado en UK desde 1990)
CC45	Clon Berlín (ST45-SCC <i>mecl</i> IVa-PVL ⁻ , reportado en Alemania desde 1998)

La mayoría de ellos se denominaron clones pandémicos ya que han sido diseminados internacionalmente, ocasionando infecciones intrahospitalarias por diferentes regiones geográficas (Figura 5).

Hoy en día, la nomenclatura más aceptada de los clones circulantes se basa en el tipo ST-SCC*mecl* y el CC correspondiente. De hecho, un sólo CC puede incluir clones de MRSA con diferente distribución geográfica que puede asociarse con diferentes SCC*mecl* y posiblemente otras características como determinantes de resistencia a antibióticos o factores de virulencia (por ejemplo presencia o ausencia de PVL) [131, 137].

Los clones están en continua evolución, ya que en algunos casos, pueden ser desplazados por clones emergentes en una determinada área geográfica y luego de un determinado tiempo pueden reaparecer [41]. El intercambio y la difusión de clones y linajes entre diferentes entornos y países se están produciendo a un ritmo acelerado producto de la globalización, como es el caso del clon MRSA New York/Japón (NY/J) el cual fue el más prevalente en España durante una década para ser desplazado por el clon MRSA Brasileño, el cual, a su vez luego fue desplazado por el clon EMRSA-16 [138]. De la misma manera, en América del Sur el clon más diseminado fue el Brasileño (ST239-SCC*mecl*III A-PVL⁻) que se aisló en todo Brasil y se extendió a varios países más, como Argentina, Chile, Colombia, Ecuador, Paraguay, Perú y Uruguay [139, 140]. Sin embargo, en el año 1999, en Argentina, a partir de un estudio de vigilancia, llevado a cabo por nuestro grupo [141, 142], se observó que la mayoría de las infecciones hospitalarias por HA-MRSA, en Córdoba, eran provocadas por un clon epidémico que fue denominado clon Cordobés/Chileno (ST5-SCC*mecl*-PVL⁻), que si bien era multirresistente a antibióticos, conservaba sensibilidad a trimetoprima/sulfametoxazol (TMS), lo cual permitió un cambio en la terapia empírica local. Con el correr de los años el clon HA-MRSA Cordobés /Chileno comenzó

a desplazar al clon brasileiro (ST239-IIIa) y actualmente predomina en distintos países de América Latina, como Argentina, Chile, Paraguay y Colombia [143].

Figura 5 | Distribución geográfica de los principales Complejos clonales HA-MRSA

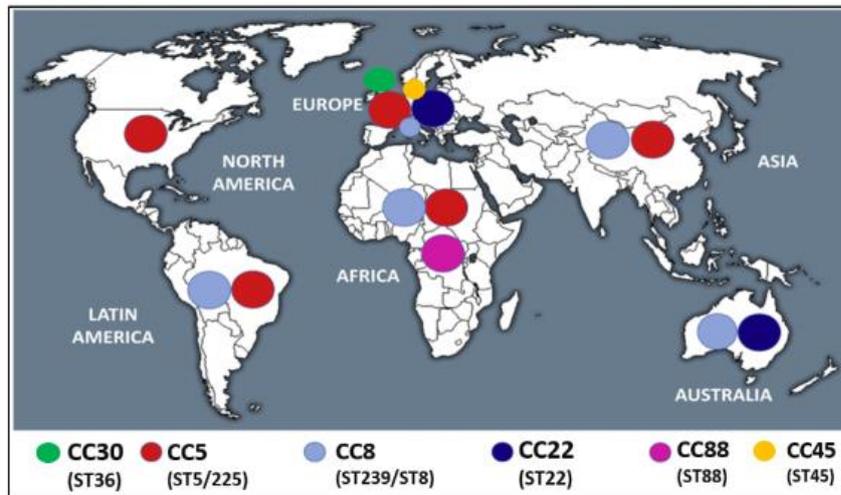


Figura 5. Esquema de la emergencia y distribución mundial de los principales linajes de HA-MRSA. Adaptado de M.Aires-de Sousa. *Clinical Microbiology and Infection* 23(2017)373e380

4.9.1.2 MRSA asociado a la comunidad (*Community-Associated MRSA "CA-MRSA"*)

En la década de 1990, la epidemiología de MRSA cambió dramáticamente debido a la aparición de nuevos linajes MRSA en la comunidad, denominados CA-MRSA (Community-Associated MRSA), que causaban infecciones entre individuos sanos. Pronto se demostró que estaban asociados con linajes genéticamente distintos, y aparentemente no relacionados con las cepas HA-MRSA. Las infecciones fueron limitadas a brotes en diferentes partes del mundo como en la comunidad indígena del Oeste de Australia y en EE.UU (Minnesota y Dakota del Norte), donde cuatro niños sanos murieron de sepsis y neumonía necrotizante entre 1997 y 1999. Poco tiempo después, numerosos linajes de CA-MRSA surgieron en todos los continentes, y en la actualidad, CA-MRSA está asociado con más de 20 linajes genéticos distintos distribuidos en todo el mundo [144, 145].

La definición de CA-MRSA utilizada por el CDC desde el año 2000 es, la de una infección por MRSA en una persona que no tiene ninguno de los factores de riesgo asociados al cuidado de la salud mencionados anteriormente para HA-MRSA [146].

Cuando se realizó el estudio de los aislamientos CA-MRSA, se observó que conservaban sensibilidad a la mayoría de los ATBs utilizados en la práctica clínica y resistencia sólo a los β -lactámicos, a diferencia de los clones HA-MRSA circulantes que se presentaban como multirresistentes. El análisis a nivel genético y molecular evidenció que los CA-MRSA presentaban los *SCCmec* más pequeños (*SCCmec* IV, V, VII) y en el 95% de los casos presentaban el fago portador de los genes que codifican para la toxina PVL [147].

Otra característica destacada de las cepas CA-MRSA fue la capacidad de causar enfermedad en individuos sanos, sin factores de riesgo, ocasionando principalmente infecciones de piel y tejidos blandos, pero también se reportaron infecciones severas e invasivas como neumonías necrotizantes y sepsis fatal sobre todo en adultos jóvenes y niños [144]. Estas características asociaron a las cepas CA-MRSA con una mayor virulencia que las HA-MRSA, debido a la expresión de nuevos determinantes de virulencia como la PVL y PSMs, así como también la sobreexpresión dirigida por el regulador global Agr de factores de virulencia preexistentes [74].

La distribución geográfica de CA-MRSA es variable y específica de continente (Figura 6), pero cinco linajes principales de CA-MRSA son predominantes a nivel mundial, incluyendo ST1-IV (WA-1, USA400), ST8-IV (USA300), ST30-IV (clon del Pacífico suroccidental), ST59-V (clon de Taiwán) y ST80-IV (clon europeo). Entre estos últimos, ST8-IV y ST30-IV pueden considerarse pandémicos, ya que se han aislado repetidamente de todos los continentes [144].

En América del Sur, las infecciones asociadas a la comunidad han crecido considerablemente, los clones más comúnmente descritos se identificaron como CA-MRSA pertenecientes a CC5, CC8 y CC30 en Brasil, Argentina, Colombia y Uruguay [2].

En Argentina, estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación [148] evidenciaron que la proporción de infecciones por CA-MRSA en niños había aumentado desde el año 2001, alcanzando una prevalencia global del 62% de las infecciones por *S. aureus* asociadas a la comunidad totales (38% de los cuales eran infecciones invasivas) en las regiones del centro, este y norte de Argentina durante el año 2007 [149]. Este aumento significativo en el tiempo, se asoció con la aparición y propagación de un clon CA-MRSA, caracterizado como ST5-SCCmecIVa-PVL⁺ [148, 149] del mismo linaje (ST5) que el clon epidémico hospitalario, sugiriendo la emergencia de ambos, a partir de un ancestro común exitoso sensible a meticilina (MSSA).

En los últimos años, las cepas CA-MRSA, se han extendido a los hospitales, desplazando a las cepas HA-MRSA convencionales. Este fenómeno significó, según la definición antes mencionada, que en los hospitales, la verdadera prevalencia de este patógeno que se originó en la comunidad podría haber sido subestimada. En consecuencia, algunos autores ahora prefieren una definición basada en las características genéticas de estas cepas CA-MRSA, ya que tiene un perfil genético único, patrón de resistencia a los antibióticos, presentación, epidemiología y tratamiento [2].

La entrada de las cepas CA-MRSA a los hospitales podría traer fuertes implicancias clínicas y para la salud pública debido a la mayor virulencia con respecto a las cepas HA-MRSA. En un estudio realizado por nuestro grupo de investigación, donde se analizaron las infecciones de

inicio en el hospital (HO) tanto por cepas HA-MRSA como por CA-MRSA, se observó un patrón comparable con respecto a la mayoría de las variables clínicas y los factores involucrados en la transmisión nosocomial entre los pacientes infectados por genotipos CA-MRSA vs aquellos infectados por genotipos HA-MRSA. Estos hallazgos sugirieron que una vez que las cepas CA-MRSA ingresan al hospital, se comportan de manera similar a las de HA-MRSA [150].

Figura 6 | Distribución geográfica de clones CA-MRSA

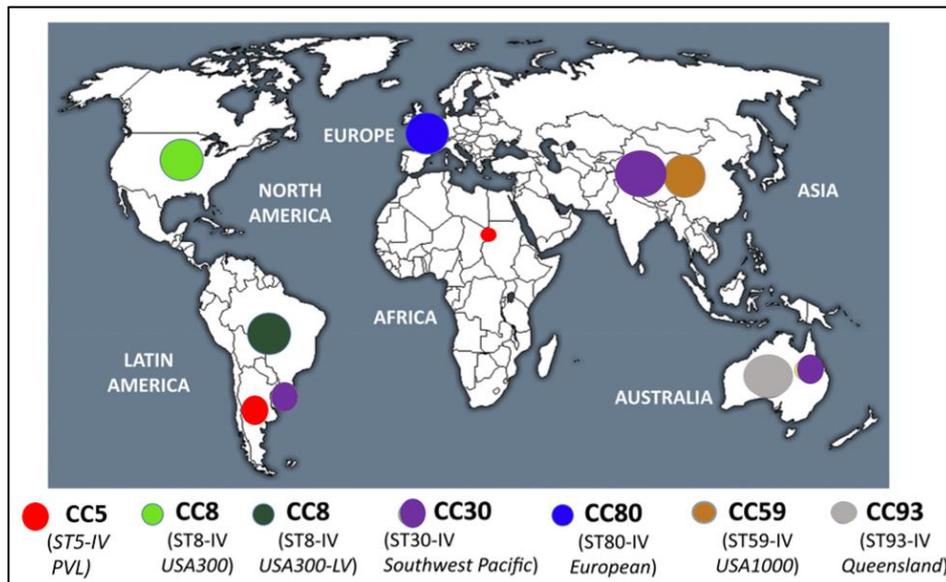


Fig.6| Esquema de la distribución geográfica de los principales linajes CA-MRSA. Adaptado de *M.Aires-de- Sousa.Clinical Microbiology and Infection 23(2017)373e380*

4.9.1.3 MRSA asociado al ganado (*Livestock-associated MRSA* "LA-MRSA")

Recientemente se ha establecido que el ganado representa un reservorio de MRSA [151]. El primer reporte de infecciones por MRSA en animales fue un caso de mastitis bovina en Bélgica a principios de los años 1970. Progresivamente los reportes de casos de infección por MRSA y la colonización en animales de compañía y de cadena alimentaria han ido aumentando, mostrando a MRSA como un importante patógeno veterinario y zoonótico. La tipificación molecular ha demostrado que algunos linajes en animales son específicos del hospedador, mientras que otros son capaces de colonizar o infectar una gran variedad de animales, incluidos los humanos. El caso más notable es el ST398, que se encontró inicialmente entre los cerdos, y posteriormente se detectó en varios animales de compañía y de cadena alimenticia, pero también en humanos. [111].

S. aureus es actualmente una de las principales causas de infecciones en el ganado vacuno, lo que representa una gran carga económica para la industria láctea. Se cree que algunos linajes de MRSA reportados en vacas son específicos para bovinos, como CC130, ST425

y CC1943. La detección de ST398 como un importante clon en la leche recuperada en el contexto de la mastitis bovina en Bélgica confirmó que este clon también ha surgido en el ganado bovino [152].

Una de las características particulares de los aislados de MRSA, fue la detección en 2011 de un nuevo determinante genético que confiere resistencia a la meticilina en *S. aureus*, el cual fue denominado como *mecC*, el cual comparte un 70% de homología con el gen *mecA*. El mismo codifica a una proteína PBP2a con sólo un 63% de identidad a la PBP2a original (codificada por el gen *mecA*). Este gen *mecC* fue identificado entre los aislamientos bovinos y humanos del Reino Unido y Dinamarca, contenido en una cepa que se denominó como LGA251 [153]. El *mecC* es parte del SCC*mec* tipo XI, no confiere resistencia a los antibióticos distintos de los b-lactámicos, en contraste con los aislamientos CC398, que con mayor frecuencia son resistentes a la tetraciclina [111].

4.10 RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

Como ya se mencionó, *S. aureus* tiene una capacidad única para adquirir rápidamente resistencia a los antibióticos o a prácticamente cualquier molécula antimicrobiana que se haya desarrollado. La resistencia a menudo es adquirida por MGEs de otras especies o géneros, aunque las mutaciones cromosómicas también contribuyen a la resistencia a algunos antibióticos. Los MGEs permiten la adquisición de grupos pre-constituidos de genes que concuerdan con un rasgo de resistencia (por ejemplo, el complejo *mec* o el complejo *vanA* para la resistencia a la meticilina o vancomicina, respectivamente). Por otro lado, las mutaciones cromosómicas pueden proporcionar resistencia a los antibióticos nuevos o sintéticos que no tienen análogos naturales y para los cuales los determinantes de resistencia no están disponibles en la naturaleza (por ejemplo, para linezolid) [15].

Los mecanismos y los determinantes genéticos que conducen a la resistencia a los agentes más comunes utilizados para tratar las infecciones por *Staphylococcus* han sido estudiados exhaustivamente [136]. A continuación se detallan las resistencias más relevantes con respecto al tratamiento clínico de *S. aureus*.

4.10.1 ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

Los β -lactámicos inhiben el crecimiento bacteriano al interferir con el ensamblaje de la pared celular. Se unen al punto activo de una serie de enzimas de membrana, que en general poseen actividad de transpeptidasas, endopeptidasas, carboxipeptidasas o transglicosilasas, reciben el nombre de PBP (por Penicillin Binding Protein) y son responsables de la introducción de los precursores del peptidoglucano en la pared. El anillo de los β -lactámicos mimetiza el

sustrato de las PBP (D-ala D-ala) lo que genera que la unión del β -lactámicos a la PBP impida el paso de la transpeptidación, como consecuencia se interrumpe el ensamblaje de la pared celular [136].

Como se mencionó anteriormente, las cepas de *S. aureus* resistentes a la penicilina surgieron poco después de la introducción del antibiótico a principios de los años 1940, a través de una β -lactamasa que hidroliza el enlace crítico β -lactámico bloqueando la actividad antibacteriana del fármaco. Luego se crearon variantes semisintéticas que no eran sustratos para la β -lactamasa, como la oxacilina. Poco después se introdujo la metilina y al año siguiente surgió la Metilino resistencia (MRSA) codificada por el gen *mecA*, alojado en el *SCCmec*, el cual da como producto, una PBP2a de menor afinidad a la metilina y todo el grupo de los β -lactámicos, los cuales son los más eficaces contra las infecciones por *S. aureus* [154]. Sin embargo, en los últimos años, se han creado antibióticos β -lactámicos con actividad en MRSA, tal es el caso de las cefalosporinas de 5^{ta} generación ceftarolina fosamil y ceftobiprol [155], ambas, aprobadas para el tratamiento de neumonías por *S.aureus* adquiridas en el hospital (no asociadas a ventilación mecánica) y neumonía de la comunidad.

La actividad de estos nuevos β -lactámicos frente a la resistencia por PBP2a tendrían un doble sitio de acción, por un lado en un sitio alostérico que produciría un cambio conformacional sobre el sitio activo, y por otro, en el propio sitio activo. A pesar de estos nuevos avances, ya se han detectado cepas de MRSA resistentes a ceftarolina, la cual estaría asociada a mutaciones que interrumpen la comunicación del sitio alostérico con el sitio activo [156, 157].

4.10.2 VANCOMICINA

Los glicopéptidos como vancomicina y teicoplanina han sido el pilar del tratamiento para MRSA durante 30 años [158], actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular por unión a las subunidades D-Ala-D-Ala en los monómeros del peptidoglucano de microorganismos Gram (+). Los aislamientos con sensibilidad disminuida a la vancomicina se describieron por primera vez en Japón en 1997 [159], y luego en varios países. Estos aislamientos, en su mayoría MRSA, mostraron un espectro de concentraciones inhibitorias mínimas de vancomicina (CIM) que van desde la sensibilidad límite hasta la resistencia total. Entre estos extremos, se encontraron los aislados con sensibilidad intermedia a la vancomicina (VISA) y aquellos que aún son sensibles pero que contienen una población minoritaria con sensibilidad intermedia (VISA heterogénea o hVISA) [136].

Tanto el *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), como el *European Committee on antimicrobial susceptibility testing* (EUCAST) definen como sensibles a los aislamientos de *S. aureus* con una CIM para vancomicina de ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ y como no sensibles a los aislamientos que presentan una CIM de ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$. Para aislamientos con una CIM entre 4 y 8 $\mu\text{g/ml}$, el CLSI los

considera como de sensibilidad intermedia (VISA) a la vancomicina y aquellos con una CIM ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$, como resistentes (VRSA) [160], sin embargo, el EUCAST considera resistente a cualquier aislamiento con CIM ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/).

Las cepas VISA se asocian con una pared celular engrosada que atrapa la vancomicina antes de que alcance el objetivo molecular que es el peptidoglucano naciente en el lado interno de la pared celular. Diferentes mutaciones o expresión de genes que están relacionados con la síntesis de la pared celular, se asocian con la aparición de VISA de cepas parentales sensibles *in vitro* o *in vivo*, en particular, los polimorfismos tipo I y tipo II del locus regulador global *agr* o alteraciones de su función se han asociado con el desarrollo de VISA y hVISA [161]. Aunque VISA y hVISA han surgido en todos los linajes principales de MRSA, incluyendo CA-MRSA USA300 y también en MSSA, se han encontrado especialmente en CC5 y CC8 [15].

En el 2002 se reportó, en EE.UU el primer aislamiento resistente a vancomicina con una CIM >32 $\mu\text{g/ml}$ [162], el mecanismo estaba mediado por la adquisición horizontal del gen *vanA*, alojado en el transposon Tn1546, originalmente parte de un plásmido conjugativo de *Enterococcus* spp., resistente a vancomicina (VRE). Desde entonces, se han reportado un total de 13 aislamientos en los Estados Unidos [163].

Se requieren dos eventos claves para la resistencia a vancomicina mediada por el operón *vanA*: 1) hidrólisis del dipéptido D-Ala-D Ala precursores de peptidoglucano, que se unen a vancomicina, y 2) síntesis de D-Ala-D lactato, que no puede unirse a la vancomicina [164].

Este mecanismo de resistencia ha sido descrito en casos aislados, pero no se ha diseminado y actualmente es excepcional, probablemente debido a una pérdida de aptitud biológica (*fitness*) de las cepas que lo poseen. Sin embargo, a la fecha, se han publicado 17 casos de VRSA [15], 13 en los Estados Unidos (principalmente en Michigan), uno en India, Irán, Brasil y , el más reciente, en 2013 en Portugal [165], siendo el único detectado en Europa.

4.10.3 LINEZOLID

Linezolid pertenece a una nueva clase de antibióticos, las oxazolidinonas, introducidas en la práctica médica en 2000. Linezolid ejerce su acción antibacteriana al unirse a la subunidad 23S del dominio V del ribosoma bacteriano, inhibiendo así la síntesis de proteínas [166]. Está indicado para el tratamiento de la neumonía nosocomial y de las infecciones complicadas de la piel. Linezolid es activo frente a casi del 100% de cepas de *S. aureus*.

Los mecanismos de resistencia a linezolid se deben a cambios estructurales del RNAr 23S o de algunas proteínas de la subunidad ribosómica 50S o a la adquisición del gen *cfr* (*Chloramphenicol Florfenicol Resistance*), alojado en un plásmido, que codifica una metiltransferasa del RNAr 23S. Esta última, además, confiere resistencia cruzada a otros

fármacos que se unen en el mismo sitio, incluyendo cloranfenicol, lincosamidas (es decir, clindamicina) y estreptograminas A [136].

Aunque linezolid es un fármaco sintético y no se esperaría ningún reservorio natural de genes de resistencia, en 2001 se reportó el primer aislamiento de *S. aureus* resistente a linezolid en los EE. UU, en un paciente que había recibido tratamiento con este ATB durante 1 mes [167].

4.10.4 DAPTOMICINA

La daptomicina es un antibiótico lipopeptídico natural introducido en 2003 en los Estados Unidos y en 2005 en Europa para el tratamiento de infecciones de la piel, tejidos blandos y bacteriemia [168].

Su mecanismo de acción es probablemente multifacético y no totalmente comprendido. Es una molécula aniónica que requiere la presencia de iones de calcio para estar activa, el complejo daptomicina-calcio se inserta en la membrana celular bacteriana causando despolimerización y permeabilización con fugas de pequeños iones y muerte celular [169]. La pared celular probablemente representa otro blanco de acción, ya que los aislamientos resistentes presentan una pared celular engrosada [136].

La resistencia parece estar asociada con una acumulación progresiva de mutaciones en algunos genes de *S. aureus*. Las mutaciones más comunes ocurren en *mprF*, que codifica para una enzima bifuncional involucrada en el metabolismo de la membrana celular. Las mutaciones de *mprF* están asociadas con un aumento determinante de la ganancia en función de la carga positiva relativa de la membrana celular que conduce a una disminución de la inserción del complejo calcio-daptomicina [170]. Poco después de la introducción de la daptomicina en el uso clínico, se informaron fallos en el tratamiento debido a la aparición de *S. aureus* resistente a la daptomicina, especialmente en pacientes tratados por endocarditis, donde la carga bacteriana es probablemente alta. Sin embargo, a pesar del uso creciente en la práctica clínica en los últimos años, los informes sobre la emergencia de resistencia a daptomicina siguen siendo esporádicos [15].

4.10.5 TIGECICLINA

Tigeciclina es una tetraciclina semisintética de tercera generación, capaz de unirse a la subunidad ribosomal 30s, inhibiendo la síntesis de proteínas y en consecuencia, el crecimiento de las bacterias. La concentración de tigeciclina en los macrófagos alveolares y en leucocitos polimorfonucleares es al menos 20 veces superior a la concentración extracelular. Si bien este antimicrobiano posee excelente distribución en los tejidos, alcanza concentraciones más bajas en suero [136].

Fue aprobada en 2005 para el tratamiento de infecciones causadas por patógenos resistentes a múltiples fármacos, incluido el MRSA. La tigeciclina es considerablemente más potente que la tetraciclina y puede funcionar en bacterias que expresan resistencia a la tetraciclina [136].

El principal mecanismo de resistencia de las tetraciclinas, se debe a la protección ribosomal y a la actividad de bombas de eflujo [171].

Han habido muy pocos informes de resistencia a la tigeciclina en aislamientos clínicos de *S. aureus*. Es probable que esto se deba al uso controlado de drogas, pero la exposición prolongada indudablemente dará como resultado una resistencia clínicamente significativa. Se ha informado la selección de resistencia a la tigeciclina en *S. aureus* como resultado del paso en serie de cultivos bacterianos en concentraciones crecientes de fármacos [136].

4.10.6 MUPIROCINA

Mupirocina, Bactroban o ácido pseudomónico, es un fármaco derivado del ácido crotonico extraído inicialmente de *Pseudomonas fluorescens* en 1971. Es un metabolito secundario producido en fase estacionaria, que inhibe la síntesis de proteínas mediante la unión a la isoleucil-ARNt sintetasa (*IleRS*) [172].

El antibiótico mupirocina se usa ampliamente como agente tópico para reducir la portación nasal de MRSA por parte de los pacientes y el personal del hospital. También está indicado como un agente tópico para tratar infecciones de la piel [136].

Existen dos tipos de resistencia en mupirocina, la baja resistencia a la mupirocina se debe a mutaciones que causan sustituciones de aminoácidos en la molécula blanco que impiden que el antibiótico se una con eficiencia. La resistencia de alto nivel se debe a los determinantes de MupA transmitidos por el plásmido que codifica una enzima *IleRS* intrínsecamente alterada que permite eludir el blanco sensible.

Según las pruebas de sensibilidad a los antibióticos, hay tres grupos de sensibilidad a mupirocina para los aislamientos de *S. aureus*. A una CIM de $\leq 4 \mu\text{g} / \text{ml}$, estos aislamientos son sensibles, a las CIM de $8\text{--}64 \mu\text{g} / \text{ml}$ son de resistencia de bajo nivel, y la CIM de $\geq 512 \mu\text{g} / \text{ml}$ se refiere a la resistencia de MUP de alto nivel [173].

La resistencia a mupirocina fue identificada inmediatamente después de su introducción. En *S. aureus*, se reportó por primera vez en 1987 en el Hospital St Thomas [174]. La frecuencia de resistencia a la mupirocina es diferente entre las cepas clínicas de MRSA (de 0% a 65%), que se correlaciona con el uso en los hospitales. Sin embargo, esta prevalencia es desconocida en pacientes pediátricos debido a los pocos estudios que se han realizado [172].

4.10.7 AMINOGLUCÓSIDOS

Los aminoglucósidos son los únicos antibióticos dirigidos a los ribosomas que son bactericidas. Esto se debe a su mecanismo de acción único para provocar una mala lectura durante la traducción. Son fármacos dirigidos a la subunidad 30S, entre ellos podemos mencionar: gentamicina, Kanamicina, tobramicina, neomicina y amikacina, de los cuales la gentamicina y la neomicina son clínicamente relevantes para el tratamiento de infecciones por *Staphylococcus*. La neomicina se usa por vía tópica para prevenir o tratar infecciones de la piel y en ungüentos nasales como alternativa a la mupirocina para la descolonización de los portadores [136]. La gentamicina se introdujo en la década de 1970 para combatir las infecciones nosocomiales graves causadas por *S. aureus*, pero su uso se vio comprometido por la aparición de resistencia de alto nivel codificada por elementos genéticos móviles. La resistencia a la gentamicina y a la neomicina se confiere por una acetiltransferasa-fosfotransferasa bifuncional (*aacA-aphD*) transportado por el Tn4001, que cuando se sobreexpresa también otorga resistencia a amikacina [175, 176]. Por otro lado, la adeniltransferasa de 256 aa, codificada en el gen *aadD*, confiere resistencia a kanamicina, neomicina y tobramicina. El mismo está alojado en el plásmido pUB110, que puede integrarse en el SCCmec II a través de la IS431. Otra enzima asociada a resistencia a aminoglucósidos es una fosfotransferasa codificada por el gen *aph* (alojada en el Tn5405) que media la resistencia a Kanamicina, neomicina y amikacina [171].

4.10.8 MACRÓLIDOS, LINCOSAMIDAS Y ESTREPTOGRAMINAS

Hoy en día, los macrólidos como la eritromicina, no se usan ampliamente para combatir las infecciones por *Staphylococcus* en el mundo desarrollado, pero tienen un papel importante en las infecciones por MSSA. Los macrólidos semisintéticos claritromicina, azitromicina y telitromicina se usan clínicamente para tratar infecciones causadas por bacterias distintas de *S. aureus*. Por lo tanto, los *Staphylococcus* comensales en humanos se expondrán a macrólidos y esto puede contribuir a que la resistencia a la eritromicina se encuentre comúnmente en aislamientos clínicos [136].

Dentro de las estreptograminas, pristinamicina es un antibiótico que se ha utilizado en Europa desde la década de 1970 para tratar las infecciones por *S. aureus*. Está compuesto por dos moléculas PIA y PIIA que actúan de forma sinérgica. Synercid está compuesto de derivados semisintéticos de las moléculas de pristinamicina llamadas dalfopristina A (derivadas de PIIA) y quinupristina B (derivadas de PIA). Su solubilidad mejorada permite su administración por vía intravenosa. Fue introducido en 1999 para tratar infecciones causadas por MRSA [177]. El sitio de unión en la subunidad ribosomal 50S para eritromicina se solapa con el sitio de unión de los

macrólidos más nuevos, así como las lincosamidas (principalmente clindamicina), que no están relacionadas estructuralmente y los antibióticos estreptogramina B.

La modificación por metilasa reduce la unión de las tres clases de antibióticos, lo que resulta en resistencia contra los macrólidos, lincosamidas y antibióticos de estreptogramina B (MLSB). En general, los genes que codifican estas metilasas han sido designados como *erm*, con las siguientes clases descritas: A, B, C, F, T, Y, y 33, siendo *ermA* y *ermC* los genes mayormente asociados a resistencia de estos grupos de antibióticos [178]. Las cepas de *Staphylococcus* que son resistentes a la eritromicina, pueden ser sensibles a la clindamicina y dan una zona de inhibición en forma de D alrededor del disco de clindamicina con un aplanamiento hacia la eritromicina (un fenotipo MLSB inducible o MLSBi). Los aislamientos resistentes tanto a la eritromicina como a la clindamicina se conocen por tener un fenotipo de resistencia constitutiva MLSB (MLSBC). En ambos fenotipos el gen más frecuentemente involucrado es *ermC* [179].

4.10.9 FLUOROQUINOLONAS (FQ)

Las fluoroquinolonas (FQ) son la clase de antimicrobianos completamente sintéticos más exitosos. El mayor avance en el desarrollo de estos fármacos fue el descubrimiento de que la fluoración en la posición C6 mejoraba el espectro y la potencia de la molécula prototipo ácido nalidíxico [136]. Han habido varias generaciones de fluoroquinolonas en las que se han introducido moléculas con sustituciones adicionales que han mejorado la potencia y la farmacocinética como es el caso de ciprofloxacina. Los blancos moleculares para las fluoroquinolonas en *S. aureus* son (i) ADN girasa que produce cortes de doble cadena de ADN para reducir la tensión molecular causada por el superenrollamiento y (ii) topoisomerasa IV que promueve la decatenación del cromosoma después de la replicación [171]. Ambas enzimas son heterotetrámeros de las subunidades A y B, *gyrA* y *gyrB* en la girasa de ADN, *parC* y *parE* en la topoisomerasa IV. Mutaciones puntuales en estas subunidades, llevan rápidamente a la resistencia a fluoroquinolonas [136].

4.10.10 RIFAMPICINA

La rifampicina es un antibiótico bactericida de amplio espectro que se dirige específicamente a las ARN polimerasas procarióticas. Se une a la subunidad B aproximadamente a 12 Å del sitio activo de la enzima. Si bien, no impide que la ARN polimerasa se una al promotor e inicie la transcripción, ésta es bloqueada en la etapa del primer enlace fosfodiéster ribonucleótido. Tanto en infecciones por *S. aureus*, como por otros patógenos de importancia clínica, la monoterapia con rifampicina es problemática debido a la rápida aparición de mutantes resistentes de alto nivel en un sólo paso. Las mutaciones dan como resultado sustituciones de aminoácidos en y alrededor del sitio de unión del fármaco que reducen la afinidad por el objetivo

[136]. Al igual que con el linezolid, la resistencia a rifampicina está asociada con mutaciones en el gen *rpoB* que codifica para la subunidad β de la ARN polimerasa [171].

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La exposición de un individuo a *S. aureus* puede dar como resultado dos escenarios. Por un lado, la colonización del mismo, la cual puede ser transitoria o persistente, y por otro lado, el individuo puede colonizarse y luego desarrollar una infección subsiguiente por la bacteria en cuestión. Este último, es un proceso complejo y dependiente de múltiples factores, tales como factores de la cepa bacteriana (linaje, factores de virulencia, tipo de clon), factores del huésped (grupo etario, estado inmunológico, etc) y factores ambientales (ambiente hospitalario, comunidad, región geográfica).

Una mayor prevalencia de colonización en la admisión hospitalaria por MRSA tiene mayor riesgo de infección nosocomial, esto ha sido extensamente estudiado en cepas HA-MRSA en diferentes trabajos alrededor del mundo. En América Latina, muy poco se sabe de la prevalencia, factores de riesgo y estado de portación de MRSA en el momento de la admisión hospitalaria, menos aún la discriminación entre cepas CA-MRSA y HA-MRSA [180]. Por lo tanto, el conocimiento de estos factores en la epidemiología local, permitiría establecer estrategias para el control de la transmisión y diseminación de los clones circulantes en nuestro país, tanto en el ambiente hospitalario como en la comunidad.

En Argentina, según los estudios de vigilancia realizados por nuestro grupo de investigación a partir del año 2000, se observó que la mayoría de las infecciones hospitalarias por MRSA (HA-MRSA) eran provocadas por un clon epidémico multirresistente a antibióticos, denominado clon Cordobés/Chileno (ST5-SCC*mec* I). El mismo fue identificado en nuestro laboratorio y había desplazado a un clon pandémico preexistente (clon Brasileño ST239-SCC*mec* IIIA) [141, 142]. Posteriormente, en el año 2005 se detecta la emergencia de un nuevo clon, pero ahora en la comunidad, identificado por nuestro grupo como clon epidémico CA-MRSA del mismo linaje (ST5) que el clon epidémico hospitalario, pero con el SCC*mec* tipo IV. Estas características moleculares avalaron la hipótesis sobre la emergencia de ambos clones, a partir de un clon ancestral de MSSA ST5 exitoso [148]. En el año 2007 se encontró a este clon CA-MRSA ST5-SCC*mec*-IV-t311 en pacientes pediátricos que tuvieron relación con el ambiente hospitalario en el año previo, lo que indirectamente indicaba que el mismo estaría siendo introducido en los hospitales. Consecuentemente, se planteó un proyecto a nivel nacional en el año 2009 con el fin de analizar la situación en todo el país. Se detectó 55% de prevalencia nacional de MRSA, con predominio de genotipos CA-MRSA (39%) sobre HA-MRSA (16%). Además, las cepas CA-MRSA causaron el 16 % de las infecciones nosocomiales por MRSA [150]. La variación epidemiológica identificada entre las infecciones de inicio en el hospital, especialmente en pediatría, consistió en el ingreso a los hospitales, del clon CA-MRSA ST5-IV-PVL⁺, desplazando al clon epidémico HA-

MRSA Cordobés/Chileno (ST5-SCC*mec* I). Así mismo, entre las infecciones de inicio en la comunidad, se detectó mayor proporción de MRSA (58%) que entre aquellas de inicio en el hospital (49%). Esto obedeció a la diseminación de dos clones de CA-MRSA: el ST5-IV-PVL⁺ y el ST30-IVc-PVL⁺, con marcadas diferencias regionales y por grupos etarios. Cabe destacar que en este estudio se detectó por primera vez una cepa que pertenece a la variante USA300 ST8-IVa PVL⁺ ACME⁺, causante de la epidemia por CA-MRSA en EEUU.

En virtud de estos hallazgos, resulta claro que se plantea un panorama muy serio para la salud pública, que puso de relieve la necesidad de analizar la evolución de la situación epidemiológica detectada en el estudio previo [150] intensificando la vigilancia epidemiológica de las infecciones por MRSA, tanto en pacientes de la comunidad como en pacientes hospitalizados en nuestro país. La vigilancia molecular de las infecciones por MRSA en el tiempo permitirá abordar diferentes preguntas, como: ¿Ambos clones CA-MRSA se diseminan en la comunidad, o uno puede desplazar a otro?, ¿Aparece un nuevo clon?, ¿pueden diseminarse de igual manera en el ambiente hospitalario?, ¿Qué consecuencias tendría un cambio clonal en la elección del tratamiento antibiótico o en el tipo y gravedad de las infecciones producidas?

Además, con respecto a la transmisión de estas cepas CA-MRSA en los hospitales se plantean interrogantes que todavía no están dilucidados: i) ¿El paciente ingresa colonizado a la institución hospitalaria y desarrolla una infección endógena en un tiempo superior a las 48 hs? ii) ¿El paciente ingresa no colonizado y se coloniza en el hospital para luego desarrollar la infección? Sólo en la última situación sería una infección adquirida en el hospital, que podría prevenirse y controlarse con las medidas de control de infecciones hospitalarias. Consecuentemente, para orientar las estrategias de control de su transmisión, es indispensable dilucidar y brindar mayor conocimiento acerca de cómo y dónde se adquieren estas cepas CA-MRSA.

Consecuentemente, otros interrogantes sobre las capacidades diferenciales de estos clones de MRSA epidémicos, que surgen en este trabajo de tesis son: ¿existen diferencias respecto a los genes de virulencia que portan estos clones CA-MRSA epidémicos y el resto de los clones de MRSA? ¿El linaje ST5, que posiblemente es a partir del cual emergieron dos clones epidémicos en nuestro país, adquirió características moleculares en su evolución que facilitaron la transmisión de estos clones o que sustentan su virulencia?

6. HIPÓTESIS

Con los antecedentes anteriormente expuestos, se propone como hipótesis que la prevalencia de infecciones por genotipos CA-MRSA a nivel nacional podría ser superior a la detectada en el estudio nacional del año 2009. Esto estaría relacionado a la entrada y diseminación en el ambiente hospitalario de los clones CA-MRSA (principalmente el clon ST5-*SCCmec*-IV-*t311*) desplazando a los clones tradicionales HA-MRSA (Cordobés/Chileno ST5-*SCCmec* I y Brasileiro ST239-*SCCmec*-IIIA) en nuestro país. Esta diseminación puede estar asociada a dos circunstancias: i) la alta prevalencia de colonización en la admisión hospitalaria de las cepas CA-MRSA, ejerciendo mayor presión de colonización, lo que facilita mayor adquisición y transmisión de estas cepas en los hospitales, con el consiguiente aumento de las infecciones hospitalarias causadas por CA-MRSA, ii) el mantenimiento del reservorio natural de estas cepas en la comunidad relacionado a la diseminación de ambos clones CA-MRSA: ST30-*SCCmec* IV-*t019* y ST5-*SCCmec*-IV-*t311*, con la posibilidad de la emergencia de nuevos clones epidémicos o a la diseminación del clon USA300 ST8-IVa. Este último, está diseminado en los Estados Unidos, en nuestro país hasta este momento, es un clon esporádico.

Estos cambios clonales traerían consecuencias tanto en la elección del tratamiento antibiótico empírico a utilizar en Argentina, como en el tipo y gravedad de las infecciones producidas.

Estos clones CA-MRSA presentarían características moleculares particulares, algunas de ellas adquiridas en su evolución y relacionadas a una capacidad de colonización y/o virulencia asociada a un mayor *fitness* bacteriano, que les permitiría persistir y diseminarse, desplazando a otros clones o también ser desplazados por otros clones, en un ambiente determinado como la comunidad o el hospital.

7. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente trabajo de tesis es determinar la evolución molecular de las infecciones por MRSA en nuestro país y analizar el efecto de las cepas CA-MRSA en forma comparativa con las cepas HA-MRSA y MSSA en la colonización por MRSA, transmisión y subsiguientes infecciones en pacientes hospitalizados. Además se pretende analizar características moleculares del CC5 y la virulencia comparativa entre los diferentes clones en relación a su comportamiento epidémico. Por lo tanto a este objetivo general lo abordamos en tres etapas:

I. Analizar las implicancias de la colonización por CA-MRSA, comparativamente con la colonización por HA-MRSA y MSSA, en los pacientes que se hospitalizan en instituciones asistenciales de Ciudad de Córdoba (República Argentina).

II. Determinar la evolución clínica y molecular de las infecciones por MRSA en nuestro país (2009-2015).

III. Analizar la evolución molecular del CC5 a través de WGS y la virulencia comparativa de los diferentes clones de MRSA en un modelo animal, en una posible asociación con el comportamiento epidémico.

7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A fin de abordar el objetivo general planteado se propusieron objetivos específicos relacionados a cada una de las etapas definidas:

7.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS RELACIONADOS AL OBJETIVO GENERAL Etapa I

Analizar las implicancias de la colonización por CA-MRSA, comparativamente con la colonización por HA-MRSA y MSSA, en los pacientes que se hospitalizan en instituciones asistenciales de Ciudad de Córdoba (República Argentina).

Ia. Establecer la prevalencia de colonización por *S. aureus* (CA-MRSA, HA-MRSA Y MSSA) en pacientes adultos y pediátricos que se hospitalizan.

Ib. Determinar los factores de riesgo de colonización con cepas de *S. aureus* (CA-MRSA, HA-MRSA Y MSSA) en pacientes adultos y pediátricos que se hospitalizan.

Ic. Analizar en cada grupo de pacientes, la tasa de adquisición hospitalaria de MRSA (por CA- MRSA vs HA- MRSA) y consecuentemente la tasa de infecciones adquiridas en el hospital.

Id. Realizar la caracterización molecular junto al perfil de resistencia antibiótica de los aislamientos de MRSA, para determinar la epidemiología molecular de la colonización en el ingreso y la adquisición nosocomial de los clones circulantes.

7.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS RELACIONADOS AL OBJETIVO GENERAL Etapa II

Determinar la evolución clínica y molecular de las infecciones por MRSA en nuestro país.

Ila. Establecer la PREVALENCIA nacional, además del perfil de resistencia antimicrobiana de *S. aureus* meticilino resistente (MRSA) en infecciones asociadas al ámbito hospitalario (HA-MRSA) y a la comunidad (CA-MRSA).

Ilb. Analizar y comparar las características moleculares de los MRSA adquiridos en la comunidad y en el hospital según las regiones (Norte, Centro y Sur) y según grupo etario (pediatría y adultos)

Ilc. Analizar el PATRON CLINICO- EVOLUTIVO DOMINANTE actual en nuestro medio, de las infecciones causadas por MRSA en sus diferentes localizaciones y sitio de comienzo (comunidad u hospital) en pacientes pediátricos y adultos.

Ild. Determinar la evolución de la epidemiología clínica y molecular de las infecciones por MRSA en el país, tanto a nivel hospitalario como de la comunidad comparativamente con el estudio previo (2009).

7.1.3 OBJETIVO ESPECÍFICO RELACIONADO AL OBJETIVO GENERAL Etapa III

Analizar la evolución molecular del CC5 a través de WGS y la virulencia comparativa de los diferentes clones de MRSA un modelo animal, en una posible asociación con el comportamiento epidémico

Illa. Analizar la evolución del complejo clonal 5 (CC5) en nuestro país a través del secuenciamiento de genomas completos (WGS).

Illb. Analizar en forma comparativa la virulencia de los clones MRSA (CA-MRSA y HA-MRSA) más prevalentes en nuestro país, utilizando el modelo en invertebrados de *Galleria mellonella*.

8. RESULTADOS

8.1 RESULTADOS DE LA ETAPA I

Analizar las implicancias de la colonización por CA-MRSA, comparativamente con la colonización por HA-MRSA y MSSA, en los pacientes que se hospitalizan en instituciones asistenciales de Ciudad de Córdoba (República Argentina).

1a. Establecer la prevalencia de colonización por *S. aureus* (CA-MRSA_G, HA-MRSA_G Y MSSA) en pacientes adultos y pediátricos que se hospitalizan.

1b Determinar los factores de riesgo de colonización con cepas de *S. aureus* (CA-MRSA_G, HA-MRSA_G Y MSSA) en pacientes adultos y pediátricos que se hospitalizan.

1c. Analizar en cada grupo de pacientes, la tasa de adquisición hospitalaria de MRSA (por CA-MRSA_G vs HA-MRSA_G) y consecuentemente la tasa de infecciones adquiridas en el hospital.

1d. Realizar la caracterización molecular junto al perfil de resistencia antibiótica de los aislamientos de MRSA, para determinar la epidemiología molecular de la colonización en el ingreso y la adquisición nosocomial de los clones circulantes.

8.1.1 RESULTADOS relacionados al objetivo específico la:

Establecer la prevalencia de colonización por *S. aureus* (CA-MRSA_G, HA-MRSA_G Y MSSA) en pacientes adultos y pediátricos que se hospitalizan.

Como se describe en detalle en Materiales y Métodos, a fin de establecer la Prevalencia de colonización por *S. aureus* (CA-MRSA_G, HA-MRSA_G Y MSSA) en pacientes adultos y pediátricos que se hospitalizan, se realizó un estudio en 8 instituciones de Córdoba, Argentina. Las características de los Hospitales involucrados se describen a continuación en la Tabla 1

Durante el período de estudio, un total de 1419 pacientes fueron examinados al ingreso al hospital, de los cuales 534 fueron admitidos y estuvieron internados por ≥ 3 días. La mediana de edad de los 1419 pacientes fue de 24 años (desde 1 mes a 99 años), con una distribución homogénea, donde 670 pacientes fueron pediátricos (<19 años) (47.2%), mientras que los restantes 749 fueron adultos (52.8%). Con respecto a la distribución de acuerdo al sexo, 614 pacientes fueron femeninos (43.3%) y 805 masculinos (56.7%) (Características demográficas descriptas en el análisis de Factores de Riesgo para colonización por MRSA (Tabla 2, página 57).

Del total de pacientes, en 438 (30.9%, IC 95%: 28.6% a 33.4%) se aisló *S. aureus* al momento del ingreso, de los cuales 60 (4.2%, IC 95%: 3.3% a 5.4%) portaron MRSA. Esta proporción fue significativamente mayor ($p=0.0008$) en pacientes pediátricos (6,1%, IC 95%: 4,5% a 8,2%) que en adultos (2,5%, IC 95%: 1,6% a 3,9%). La prevalencia de MRSA en la admisión varió de acuerdo a los hospitales de 1.6% a 11.0% (Tabla 1).

Tres pacientes presentaron infecciones de inicio en la comunidad (CO) o importadas desde la comunidad, de los cuales uno presentó cultivos de colonización para MRSA negativos en la admisión y sólo se detectó el MRSA de la muestra clínica.

De acuerdo a los métodos de tipificación utilizados, se pudo determinar que la mayoría de los pacientes con MRSA en la admisión (46/60, 76.7%) se clasificaron como CA-MRSA_G, mientras que 14 (23.3%) como HA-MRSA_G. (Tabla 3). Considerando todos los casos (n: 1419, 670 pacientes pediátricos y 749 adultos), el 3,2% (n: 46) estuvo colonizado por CA-MRSA_G con una proporción significativamente mayor en pediatría (4,8% para pediatría vs 1,9% para adultos, $p=0,002$), y el restante 1% (n: 14) por HA-MRSA_G sin diferencias significativas por grupo etario (1.3% para pediatría vs 0.7% para adultos, $p=0.19$) (Figuras 7 y 8)

Tabla 1. Características de los Hospitales de Córdoba involucrados en el proyecto, Córdoba, 2014.

Hospital/ Especialidad	N° de camas	Admisión anual 2014	Total de pacientes analizados n: 1419	N°. (%) Pacientes positivos para colonización por <i>S.aureus</i> en la admisión		Adquisición de MRSA en pacientes admitidos por ≥ 3 días ^a		
				Total n: 438	MRSA n: 60	Pacientes admitidos por ≥ 3 días n: 534	N°. (%) de pacientes con adquisición de MRSA	Adquisición de MRSA /1000 días paciente ^b
H1 Adultos y Niños	106	6520	499	86 (17,2)	8 (1,6)	148	0 (0,0)	0
H2 Niños	70	2280	179	77 (43,0)	10 (5,6)	83	4 (4,9)/ 1inf ^c	6,7
H3 Adultos	36	1930	56	9 (16,1)	1 (1,8)	45	0 (0,0)	0
H4 Adultos	80	1984	48	10 (20,8)	1 (2,1)	18	1(5,9)	5,1
H5 Niños	228	6550	266	99 (37,2)	16 (6,0)	67	2 (3,4)/ 1inf ^c	5,5
H6 Adultos	81	2668	130	55 (42,3)	6 (4,6)	22	1 (5,0)/ 1inf ^c :	2,5
H7 Niños	60	1896	168	75 (44,6)	10 (5,9)	100	2 (2,1)	4,3
H8 Adultos y Niños	131	2510	73	27 (37,0)	8 (11,0)	51	0 (0,0)	0
Total	792	26338	1419	438 (30,9) 95% CI:28,6- 33,4	60 (4,2) 95% CI:3,3-5,4	534	10 (1,96)/ 3inf ^c 95% CI:1,1-3,5	2,3

^a Pacientes analizados en la admisión de cada hospital, los cuales permanecieron internados por ≥ 3 días.

^b Adquisición de *S. aureus*/1000 días paciente (no colonizados por MRSA en la admisión).

^c Número de pacientes con infecciones adquiridas por MRSA.

Figura 7 | Proporciones de MRSA (CA-MRSA_G y HA-MRSA_G) y MSSA en los distintos grupos etarios

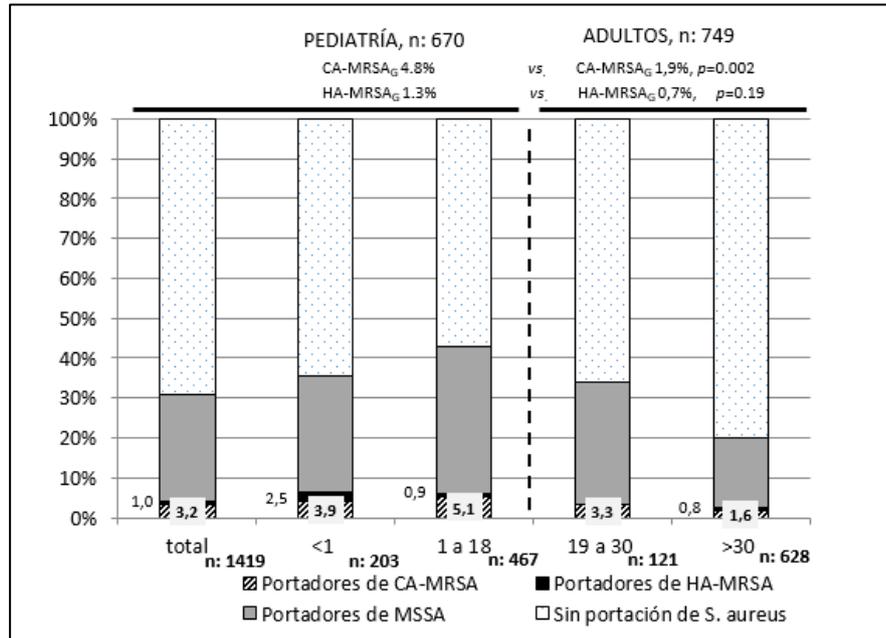


Fig.7. Se describen las proporciones de MRSA (CA-MRSA y HA-MRSA) y MSSA, en los diferentes grupos de edades, la línea discontinuada muestra el limite de pediatría que equivale a <19 años.

Figura 8 | Proporciones de los diferentes grupos etarios colonizados por S. aureus, MRSA (CA-MRSA_G y HA-MRSA_G) y pacientes que adquirieron MRSA (CA-MRSA_G).

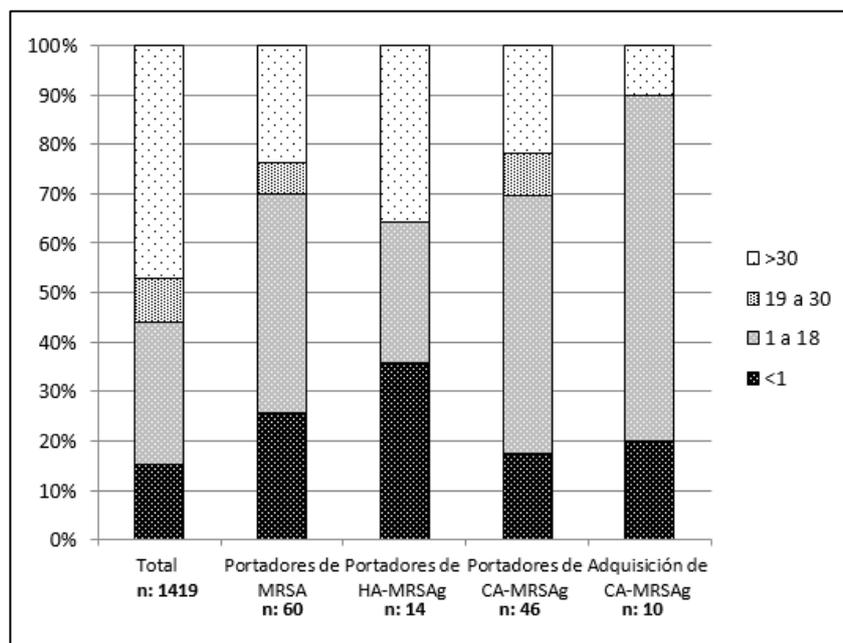


Fig.8. Se describen los diferentes grupos de edades entre los portadores de MRSA, portadores de CA-MRSA_G en la admisión, portadores de HA-MRSA_G en la admisión y pacientes que adquirieron CA-MRSA_G en el hospital.

Los sitios anatómicos más comunes para la colonización por MRSA fueron, el nasal (63.3%) y faringe (43.3%). La colonización exclusivamente no nasal se encontró en el 35% de los pacientes colonizados (21/60), 28% (17/60) de los pacientes sólo en faringe y 7% (4/60) sólo en la piel de la región inguinal. Además, 17% (10/60) de los pacientes tuvieron colonización en 2 sitios [12% (7/60) en nasal-faringe, 5% (3/60) en nasal-región inguinal] y 3% (2/60) en los tres sitios anatómicos analizados (Figura 9).

Es importante destacar que si se considera que 38 (2.8%) de 1419 pacientes fueron positivos para el hisopado nasal, 55 (3.9%) fueron positivos cuando se incluyó el hisopado faríngeo y 60 (4.2%) fueron positivos cuando se incluyó hisopado inguinal, la sensibilidad del hisopado nasal sólo fue del 63.3% (95% CI 49.9-75.4) para ser utilizado como único sitio de búsqueda (Figura 9).

Figura 9| Distribución de los aislamientos de colonización en la admisión, entre sitios nasales y extra-nasales

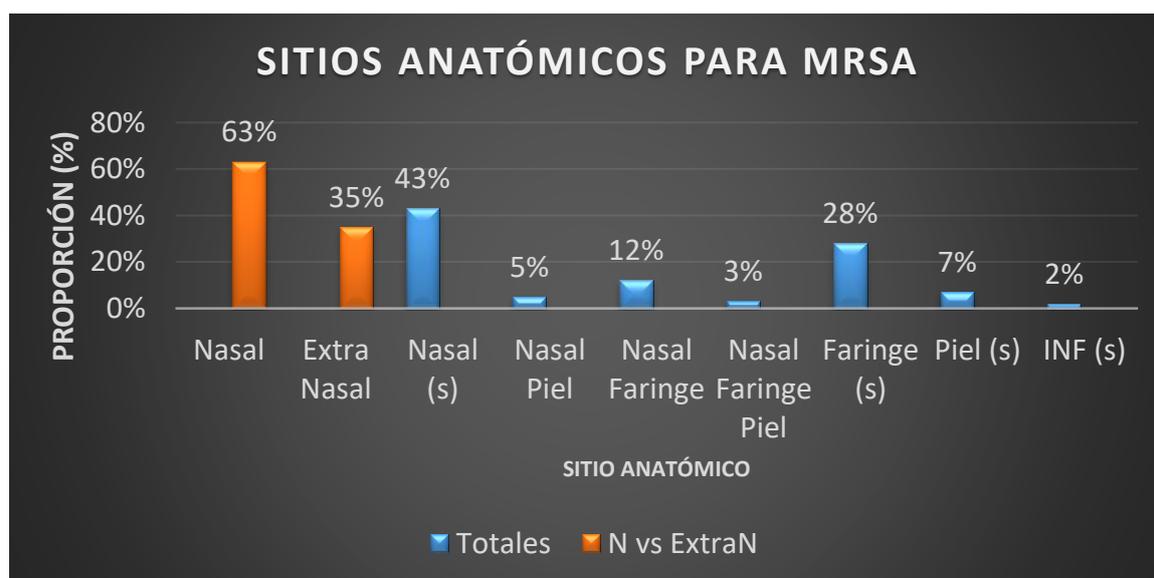


Fig.9. Se describen los diferentes sitios anatómicos de colonización en la admisión. (s) Sólo, INF, Infección.

Tabla 3 | Portación de MRSA (CA-MRSA_G y HA-MRSA_G): Colonización en admisión y adquisición por grupo de edad en ocho Hospitales, Córdoba, Argentina, Oct-Dic 2014.

Grupo De edad (años)	Total de Pacientes. n: 1419	N°(% ,95% IC) de pacientes positivos para colonización por <i>S. aureus</i> en admisión				Ptes. Admitidos n: 534	N°(% ,95% IC) de Pacientes positivos para MRSA (CA-MRSA _G y HA-MRSA _G) en la admisión			PC por MRSA (CA-MRSA _G y HA-MRSA _G) ^b , %,(95% IC)			Adquisición de MRSA		
		Total n: 438	MRSA n: 60	CA-MRSA _G n: 46	HA-MRSA _G n: 14		MRSA n: 26	CA-MRSA _G n: 22	HA-MRSA _G n: 4	PC por MRSA ^b	CP por CA-MRSA _G ^b	CP por HA-MRSA _G ^b	PC por CA-MRSA _G Vs. HA-MRSA _G P, OR(95% IC)	N°(% ,95% IC) de pacientes en riesgo de adquisición de MRSA	Adquisición de MRSA/1000 días paciente ^c
Total	1419	438 (30.9, 28.6-33.4)	60 (4.2, 3.3-5.4)	46 (3.2, 2.3-4.2)	14 (1.0, 0.6-1.6)	534	26 (4.9, 3.4-7.1)	22 (4.1, 3.1-5.2)	4 (0.7, 0.3-1.3)	12.9, (11.9-13.9)	11.3 (10.4-12.3)	1.74 (1.4-2.2)	<0.0001 7.8 (5.6-9.2)	10 (1.9, 1.1-3.5)	2.3
< 19 Pediatría	670	272 (40.6; 36.9-44.4)	41 (6.1, 4.5-8.2)	32 (4.8, 3.3-6.7)	9 (1.3, 0.6-2.5)	269	19 (7.1, 5.0-10.8)	16 (5.9, 4.3-7.9)	3 (1.1, 0.5-2.2)	16.9, (15.1-18.7)	14.1 (12.5-15.8)	1.5 (1.0-2.2)	<0.0001 10.9 (7.2-16.4)	9 (3.6, 2.1-6.7)	5.3
≥ 19 adultos	749	166 (22.2; 19.4-25.3)	19 (2.5, 1.6-3.9)	14 (1.9, 1.0-3.1)	5 (0.7, 0.2-1.6)	265	7 (2.6, 1.3-4.9)	6 (2.3, 1.4-3.6)	1 (0.4, 0.1-1.2)	10.1, (8.9-11.3)	10.4 (9.3-11.6)	0.9 (0.6-1.3)	<0.0001 12.3 (8.1-18.7)	1 (0.4, 0.1-2.0)	0.4
Ped. vs. ad., P value, OR (95% IC)		<i>p</i> <0,0001 2.4 (1.90-3.02)	<i>p</i> =0,0008 2.5 (1.45-4.33)	<i>p</i> =0,002 2.6 (1.41-4.93)	<i>p</i> =0,19		<i>p</i> =0.016 2.8 (1.19-6.62)	<i>p</i> =0.03 2.7 (1.08-6.88)	<i>p</i> =0.62	<i>p</i> <0,0001 1.8 (1.52-2.18)	<i>p</i> =0.0005 1.39 (1.16-1.68)	<i>p</i> =0.1		<i>p</i> =0.02 9.1 (1.62-51.57)	<i>p</i> =0.0017 13.6 (2.42-75.93)

CA-MRSA_G y HA-MRSA_G. Genotipos de *S. aureus* resistentes a meticilina asociado a la comunidad y al hospital

^a Pacientes pesquisados en la admisión para cada hospital permaneciendo hospitalizados por ≥ 3 días

^b PC: Presión de colonización definida con la siguiente tasa: Número de días de paciente con MRSA importado + MRSA adquiridos en el número total de días de internación del total de los pacientes en todo el período de estudio [104, 105]

^c Adquisición de *S. aureus*/1000 días paciente (no colonizados por MRSA en admisión).

8.1.2 RESULTADOS relacionados al objetivo específico *1b*

Determinar los factores de riesgo de colonización con cepas de *S. aureus* (CA-MRSA_G, HA-MRSA_G Y MSSA) en pacientes adultos y pediátricos que se hospitalizan

Para poder detectar si existen factores de riesgo para estar colonizado por MRSA, y de esta forma poder dirigir la búsqueda en dicho grupo de pacientes, a partir de los datos agrupados de los 8 hospitales se llevó a cabo un análisis univariado con 22 variables socio-demográficas. Se encontraron 12 asociadas significativamente con la colonización o infección por MRSA en el ingreso, con razones de probabilidad (*Odds Ratio, OR*) que oscilaron entre 2,10 y 13,8. Los datos se detallan en la tabla 2. Todas aquellas variables que dieron asociación significativa, fueron luego incluidas en un análisis multivariado, donde sólo 7 de las 12 variables permanecieron asociadas de forma independiente con la portación de MRSA en la admisión, con un OR que oscila de 2,11 a 11,59 (Tabla 4).

Curiosamente, se obtuvieron asociaciones de acuerdo al genotipo de MRSA. Los portadores de cepas CA-MRSA_G, en comparación con los no colonizados por CA-MRSA_G, se asociaron de forma independiente con la edad <19 años (OR 2.92), presencia de al menos una Necesidad Básica Insatisfecha (NBI) (OR 2.00), historia de infección/colonización por MRSA (OR 6.57), residencia en geriátrico/centro de rehabilitación (OR 10.69) y uso previo de antibióticos (OR, 1.94) (Tabla 4). Por otro lado, los pacientes que presentaron enfermedades respiratorias crónicas como el asma (OR, 7.9), con historial de infección/colonización por MRSA (OR 7,8) y la presencia de dispositivos médicos (OR, 18,43) fueron más propensos a ser colonizados por cepas HA-MRSA_G en el momento de la admisión (Tabla 4).

Para evaluar la utilidad de los diversos factores de riesgo utilizados para aumentar la eficacia del cultivo de vigilancia en la admisión para el MRSA, se analizó la sensibilidad, la especificidad y la carga de detección de diferentes combinaciones de factores de riesgo (Tabla 5). Los resultados mostraron que el criterio de selección con la mayor especificidad fue el de pacientes con antecedentes de MRSA en los últimos 12 meses (especificidad, 99,5%, IC 95%: 98,9%-99,8%), mientras que el criterio con mayor sensibilidad fue el de pacientes con cualquiera de los siguientes 4 factores de riesgo: al menos una NBI, exposición previa a los antibióticos, presencia de asma como enfermedades respiratorias crónicas y grupo etario <19 años, (sensibilidad de 98,3% IC 95%: 91,1% a 99,9%, pero con una carga de detección del 73,9%). La carga de detección varió en consecuencia de 1.3% a 73.9% (Tabla 5).

Tabla 2 | Análisis univariado de los factores de riesgo asociados a la portación de MRSA, CA-MRSA_G y HA-MRSA_G en la admisión, Córdoba, Argentina.

Factores de Riesgo	Total de pacientes N: 1419	MRSA: No.(%) de pacientes			CA-MRSA _G : No.(%) de pacientes			HA-MRSA _G : No.(%) de pacientes		
		Coloniza- dos con MRSA n: 60	No coloniza- dos con MRSA n: 1359	P valor/ univariado de MRSA OR (95% IC)	Coloniza- dos con CA-MRSA _G n: 46	No colonizados con CA- MRSA _G n: 1373	P valor/ Univariado de CA- MRSA _G OR (95% IC)	Coloniza- dos con HA-MRSA _G n: 14	No Colonizados con HA- MRSA _G n: 1405	P valor/ Univaria- do de HA- MRSA _G OR (95% IC)
Variables socio-demográficas										
Edad, media de años ± SD/ Mediana (rango)	31,2 ± 29,5 24 (0,1-99)	20,9 ± 27,0 5,5 (0,1- 97)	31,7 ± 29,5 55 (0,1-99)	0,006	20,4 ± 26,3 6 (0,1-97)	31,6 ± 29,5 25 (0,1-99)	0,011	22,5 ± 30,25 2,5 (0,3- 79)	31,3 ± 29,5 24 (0,1-99)	0,26
Grupo de edad, < 19	670 (47,2)	41 (68,3)	629(46,3)	0,0009 2,50 (1,45-4,33)	32 (69,6)	638(46,5)	0,002 2,63 (1,41-4,9)	9 (64,3)	661(47,0)	0,28
Proporción femenina	614 (43,3)	27 (43,2)	587 (43,2)	0,80 0,0045	21 (45,7)	593 (43,2)	0,42 0,001	6 (42,9)	608 (43,2)	0,59
NBIs (al menos una) ^a	512 (36,1)	32 (53,3)	480 (35,3)	2,10 (1,25-3,50)	27 (58,7)	485 (35,3)	2,60 (1,44-4,83)	5 (35,7)	507 (36,1)	0,6
Enfermedades de base ^d	604 (42,6)	30 (50,0)	574 (42,2)	0,28	18 (40,9)	586 (42,6)	0,37	12 (85,7)	592 (42,1)	0,001 8,24 (2,11- 32,2)
Enf.Respiratorias crónicas Asma ^e	49 (3,5)	6 (10,0)	43 (3,2)	0,015 3,40 (1,43-8,10)	3 (6,8)	46 (3,3)	0,21	3 (21,4)	46 (3,3)	0,001 8,1 (2,35- 27,6)
Enfermedad obstructiva pulmonar (EPOC)	23 (1,6)	2 (3,3)	21 (1,5)	0,25	0 (0)	23 (1,7)	NA	2 (14,3)	21 (1,5)	0,02 10,9 (2,65- 45,6)
Enfermedad cardíaca Diabetes mellitus Cáncer	182 (12,8) 95 (6,7) 48 (3,4)	6 (10,0) 4 (6,7) 2 (3,3)	176 (13,0) 91 (6,7) 46 (3,4)	0,69 1,00 0,98 0,004	2 (4,5) 3 (6,5) 2 (4,3)	180 (13,1) 92 (6,7) 46 (3,4)	0,09 0,95 0,66 0,022	4 (28,6) 1 (7,1) 0 (0)	178 (12,7) 94 (6,7) 48 (3,4)	0,08 0,62 NA
Lesión de piel presente	89 (6,3)	9 (15,0)	80 (5,9)	2,82 (1,36-5,84)	7 (15,2)	82 (6,0)	2,83 (1,25-6,36)	2 (14,3)	87 (6,2)	0,21
Contacto previo con Hospital										
Al menos un factor de riesgo asociado al hospital	552 (38,9)	30 (50,0)	522 (38,4)	0,08	19 (41,3)	533 (38,8)	0,78	11 (78,6)	541 (38,5)	0,004 5,9 (1,76- 19,5)
1-Hospitalización en los últimos 12 meses	376 (26,5)	17 (28,3)	359 (26,4)	0,80	9 (19,6)	367 (26,7)	0,31	8 (57,1)	368 (26,8)	0,009 3,76 (1,34- 10,50)
2-Historia de infección/colonización por MRSA	11 (0,8)	4 (6,7)	7 (0,5)	0,001 13,8 (4,16-45,7)	2 (4,3)	9 (0,7)	0,04 6,9 (1,66-28,6)	2 (14,3)	9 (0,6)	0,005 25,9 (5,77- 115,1)
3-cirugía en los últimos 12 meses	177 (12,5)	7 (12,1)	170 (12,5)	0,92	4 (9,1)	173 (12,6)	0,49	3 (21,4)	174 (12,4)	0,40
4-Hemodialis en los últimos 12 meses	9 (0,6)	1 (1,7)	8 (0,6)	0,23	1 (2,3)	8 (0,6)	0,16	0 (0)	9 (0,6)	NA
6- Residencia en geriátrico centro de rehabilitación	18 (1,3)	4 (6,7)	14 (1,0)	0,006 6,32 (1,91-20,94)	3 (6,5)	15 (1,1)	0,018 6,32 (1,91-2,9)	1 (7,1)	17 (1,2)	0,16
Presencia de dispositivo médico ^c	279 (19,7)	21 (35,0)	258 (19,0)	0,0023 2,63 (1,34-5,14)	9 (19,6)	270 (19,7)	0,58	12 (85,7)	267 (19,0)	<0,0001 25,6 (6,53- 100,1)
Catéter de uso prolongado	118 (8,3)	11 (19,0)	107 (7,9)	0,002 2,63 (1,34-5,14)	5 (10,9)	113 (8,2)	0,58	6 (42,9)	112 (8,0)	<0,0001 8,6 (3,06- 24,5)
Catéter urinario	133 (9,4)	13 (21,7)	120 (8,8)	0,0026 2,86 (1,52-5,8)	4 (8,7)	129 (9,4)	0,56	9 (64,3)	124(8,8)	<0,0001 18,6 (6,40- 54,0)

Contacto previo con Antibióticos en los últimos 12 meses	440 (31,0)	30 (50,0)	410 (30,2)	0,0012 2,31 (1,38-3,87)	21 (45,7)	419 (30,6)	0,035 1,91 (1,10-3,43)	9 (64,3)	431 (30,7)	0,007 4,07 (1,41-11,7)
Cualquier β-lactámico	284 (20,0)	21 (35,0)	263 (19,4)	0,005 2,24 (1,30-3,86)	16 (34,8)	268 (19,5)	0,015 2,20 (1,19-4,10)	5 (35,7)	279 (19,9)	0,14
Cualquier quinolona	44 (3,1)	2 (3,4)	42 (3,1)	0,87	0 (0)	44 (3,2)	NA	2 (14,3)	42 (3,0)	0,07

-CA-MRSA_G y HA-MRSA_G Genotipos de MRSA asociado a la comunidad y al hospital.

-Variables asociadas con los genotipos de MRSA, CA-MRSA_G y HA-MRSA_G con P valor ≤ 0.05 en el análisis univariado en negrita.

-NA: No aplicable.

a Las necesidades básicas insatisfechas se definieron de acuerdo con la metodología utilizada por el INDEC [INDEC 1984, 2001 y 2010] y se consideraron como indicadores directos de la pobreza (CEPAL 2013). Los hogares con necesidades básicas insatisfechas son hogares que presentan al menos uno de los siguientes indicadores de privación: 1- hacinamiento: hogares con más de 3 personas por cada habitación de la casa [181], 2-Vivienda: hogares con algún tipo inconveniente de vivienda (incluye : habitación de alquiler, hotel o pensión, las plazas, los locales o viviendas no construidas para vivienda, las casas móviles, viviendas precarias u otro tipo de vivienda, que excluye la casa y el apartamento) [182].3-Condiciones sanitarias: hogares que viven en una casa sin ningún tipo de aseo.[183] 4-Asistencia escolar: hogares que tienen al menos un hijo en edad escolar (de 6 a 12 años) que no asiste a la escuela, 5-Capacidad de subsistencia: aquellos hogares con cuatro o más personas por miembro empleado (excluido el servicio doméstico), cuyo jefe del hogar no tiene educación primaria.

b Pacientes con al menos una de las siguientes enfermedades subyacentes: Enfermedades respiratorias crónicas: asma y enfermedad pulmonar obstructiva (EPOC), enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedad hepática o renal, diabetes mellitus, enfermedad crónica del sistema nervioso central, inmunodeficiencias (VIH, SIDA y reumatoide artritis).

c Presencia de / pacientes con al menos un factor de riesgo asociado a la atención médica (HRF) según los criterios de los CDC [125]

d Pacientes con la presencia de al menos un dispositivo médico (dispositivo permanente a largo plazo, catéter venoso central, catéter urinario) al ingreso o en los últimos 12 meses.

Tabla 4| Regresión logística multivariable de los factores de riesgo asociados con la portación de MRSA en admisión (así como los genotipos CA-MRSA_G y HA-MRSA_G), Córdoba, Argentina.

Factores de Riesgo	P valor/Multivariado OR (95% CI) de MRSA	P valor/Multivariado OR (95% CI) de CA-MRSA _G	P valor/Multivariado OR (95% CI) de HA-MRSA _G
Variables Socio-demográficas			
Grupo de edad, < 19	<0,0001/4,07 (2,14-7,74)	0,004/ 2,92 (1,40-6,01)	
NBIs (al menos una)	<0,0001/ 3,35 (1,80-6,22)	0,032/ 2,00 (1,06-3,78)	
Enfermedades de Base			
Asma	0,032/ 2,91 (1,10-7,77)		0,021/ 7,91 (1,37-45,6)
Contacto previo con el Hospital			
Historia de Colonización/infección por MRSA	0,001/ 10,83 (2,68-43,65)	0,025/ 6,57(1,26-34,15)	0,029/ 7,8 (1,23-49,4)/
Residencia en geriátrico o centro de rehabilitación	<0,0001/ 11,59 (3,04-44,14)	0,001/10,69(2,53-45,01)	
Presencia de dispositivos médicos	0,017/ 2,11 (1,14-3,09)		0,001/ 18,43 (3,10-109,1)
Exposición previa a antibióticos (en el último año)	0,009/ 2,19 (1,22-3,92)	0,039/ 1,94 (1,06-3,66)	

CA-MRSA_G y HA-MRSA_G Genotipos de MRSA asociado a la comunidad y al hospital. IC: intervalo de confianza, OR, odds ratio (razón de probabilidades). Los casilleros coloreados de negro corresponden a variables asociadas a la portación de genotipos HA-MRSA_G y los coloreados con gris claro las asociadas a portación de CA-MRSA_G y las gris oscuro a portación de ambos genotipos.

Las necesidades básicas insatisfechas se definieron de acuerdo con la metodología utilizada por el INDEC [INDEC 1984, 2001 y 2010] y se consideraron como indicadores directos de la pobreza (CEPAL 2013). Los hogares con necesidades básicas insatisfechas son hogares que presentan al menos uno de los siguientes indicadores de privación: 1- hacinamiento: hogares con más de 3 personas por cada habitación de la casa, 2-Vivienda: hogares con algún tipo inconveniente de vivienda (incluye : habitación de alquiler, hotel o pensión, las plazas, los locales o viviendas no construidas para vivienda, las casas móviles, viviendas precarias u otro tipo de vivienda, que excluye la casa y el apartamento), 3-Condiciones sanitarias: hogares que viven en una casa sin ningún tipo de aseo, 4-Asistencia escolar: hogares que tienen al menos un hijo en edad escolar (de 6 a 12 años) que no asiste a la escuela, 5-Capacidad de subsistencia: aquellos hogares con cuatro o más personas por miembro empleado (excluido el servicio doméstico), cuyo jefe del hogar no tiene educación primaria.

Tabla 5| Eficiencia y carga de los criterios de screening seleccionados para los cultivos de vigilancia de MRSA en la admisión en los diferentes centros médicos.

Criterio de riesgo para el screening de admisión	Exactitud ^a		Carga de screening ^b % (n)
	Sensibilidad % (95% IC)	Especificidad % (95% IC)	
Criterio simple de screening			
1-grupo de edad, < 19	68,3 (55,0 a 79,7)	53,7 (51,0 a 56,4)	47,2(670)
2-NBIs (al menos una) ^c	53,3 (40,0 a 66,3)	64,2 (62,1 a 67,3)	36,5 (518)
Enfermedades de base			
3-Enfermedad crónica respiratoria Asma	10,0 (3,8 a 20,5)	96,8 (95,8 a 97,7)	3,5 (49)
Contacto previo con el hospital			
4-Historia de infección/colonización por MRSA	6,7 (1,8 a 16,2)	99,5 (98,9 a 99,8)	0,8 (11)
5-Residencia geriátrico o Centro de rehabilitación	6,7 (1,8 a 16,2)	98,9 (98,3 a 99,4)	1,3 (18)
6-Presencia de dispositivos médicos ^d	35,0 (23,1 a 48,3)	81,1(78,8 a 83,1)	19,7 (279)
7-Exposición previa a ATBs	50,0 (36,8 a 63,2)	69,8 (67,3 to 72,2)	31,0 (440)
Criterios múltiples de screening			
Cualquiera de los tres criterios: NBIs (al menos una), Previa exposición a antibióticos, Asma	90,0 (79,5 a 96,2)	43,9 (41,2 a 46,6)	57,1(817)
Cualquiera de los tres criterios: NBIs (al menos una), Previa exposición a antibióticos, edad < 19	96,7 (88,7 a 99,6)	27,6 (25,2 a 29,9)	73,4 (1042)
Cualquiera de los cuatro criterios: NBIs (al menos una), Previa exposición a antibióticos, Asma, edad < 19	98,3 (.91,1 a 99,9)	27.2 (24,9 a 29,6)	73,9 (1048)

^a Sensibilidad: Porcentaje de portadores de MRSA que serían seleccionados para el screening de admisión. Especificidad, porcentaje de no portadores de MRSA que NO serían seleccionados para screening en la admisión.

^b Carga de screening: Porcentaje de todas las admisiones que serían seleccionadas para screening de admisión.

8.1.3 RESULTADOS relacionados al objetivo específico Ic

Analizar en cada grupo de pacientes, la tasa de adquisición hospitalaria de MRSA (por CA-MRSA_G vs HA-MRSA_G) y consecuentemente la tasa de infecciones adquiridas en el hospital.

Para poder determinar la tasa de adquisición hospitalaria, el análisis se limitó a los 534 pacientes que ingresaron por ≥ 3 días. No hubo diferencias estadísticas entre este grupo de pacientes y los ingresados por <3 días (n: 885), con respecto al sexo [en el grupo de pacientes que ingresaron por ≥ 3 días fueron mujeres: 43.4% (n: 232) y en el grupo de $>$ de 3 días, fueron mujeres 43.2% (n: 382), $p=0.96$] y edad [Media \pm SD / mediana (rango); $31.2 \pm 31.7 / 18$ (0.1-99) y $31.1 \pm 28.1/26$ (0.1-97), respectivamente, $p=0.92$, 269 (50.4%) y 410 (46.3%) fueron pediátricos (<19 años), respectivamente, $p = 0.20$] Entre los 534 pacientes, 162 (30,3%, IC 95%: 26,4% a 34,3%) fueron colonizados por *S. aureus* al ingreso y 26 (4,9%, IC 95%: 3,4% a 7,1%) por MRSA [22 (4,1 %) CA-MRSA_G y 4 (0.7%) HA-MRSA_G] (Tabla 3), con porcentajes más altos en pediatría que en adultos (7.1% vs. 2.6%, $p = 0.016$) relacionado a la mayor prevalencia de CA-MRSA_G en pediatría que en adultos (5,9% frente a 2,3%, $p = 0,03$, (tabla 3).

Durante la estadía hospitalaria, diez pacientes adquirieron MRSA, todos ellos fueron negativos para la colonización en la admisión, con una edad media y mediana [Media SD / mediana (rango)] de $8,6 \pm 13,8 / 3.0$ (0,8-45) años. La mayoría (90,0%, n: 9) de estos pacientes que adquirieron MRSA fueron pediátricos (<19 años), 6 de sexo masculino y 4 de sexo femenino. Al realizar la caracterización molecular, todos los MRSA adquiridos fueron CA-MRSA_G (Tabla 7). De estos 10 pacientes, 7 se detectaron por colonización en el momento del alta hospitalaria y 3 tuvieron infecciones adquiridas y se identificaron a partir de muestras clínicas (Figura 10 y Tabla 6). De estos pacientes infectados, un paciente también tenía el hisopado nasal positivo y permaneció colonizado al alta después del tratamiento con antibióticos sistémicos con la misma cepa (Figura 10 y Tabla 6).

El número total de días que los pacientes permanecieron en el hospital fue de 4250 (1686 y 2564 para pacientes pediátricos y adultos, respectivamente), lo cual da una tasa global de adquisición de MRSA (todos caracterizados como CA-MRSA_G) de 2,3 por 1.000 días-paciente (IC 95%: 1,5 a 3,4 por 1.000 días-paciente), siendo significativamente mayor entre los pacientes pediátricos que en los adultos (5,3 frente a 0,4 por 1.000 días-paciente) (Tabla 3). Las tasas de adquisición de MRSA para un hospital individual oscilaron entre 0 y 6.7 por 1.000 días-paciente (Tabla 1). Además, la prevalencia general de colonización/infección por MRSA a través de la adquisición, definida como el porcentaje de pacientes en riesgo (no colonizados con MRSA al

ingreso) que adquirieron MRSA, fue de 1.96% (IC 95%, 1.0% a 3.4%), 3,6% para pediatría frente a 0,4% para pacientes adultos, $p = 0,02$ (Tabla 3).

Tabla 6| Diagrama del análisis longitudinal de pacientes ingresados por ≥ 3 días, en ocho hospitales, octubre-diciembre, 2014, Córdoba, Argentina.

No.	Estado de MRSA en Admisión n:26	MRSA adquirido en el hospital n:10	Descolonización	Colonización de MRSA en el alta n: 17
1	COLONIZACIÓN			COLONIZACIÓN
2	COLONIZACIÓN			COLONIZACIÓN
3	COLONIZACIÓN			COLONIZACIÓN
4	COLONIZACIÓN			COLONIZACIÓN
5	COLONIZACIÓN			COLONIZACIÓN
6	COLONIZACIÓN			COLONIZACIÓN
7	COLONIZACIÓN			COLONIZACIÓN
8	COLONIZACIÓN			COLONIZACIÓN
9	COLONIZACIÓN		ESPONTANEA	
10	COLONIZACIÓN		ESPONTANEA	
11	COLONIZACIÓN		ESPONTANEA	
12	COLONIZACIÓN		ESPONTANEA	
13	COLONIZACIÓN		ESPONTANEA	
14	COLONIZACIÓN		ESPONTANEA	
15	COLONIZACIÓN		ESPONTANEA	
16	COLONIZACIÓN		ESPONTANEA	
17	COLONIZACIÓN		ESPONTANEA	
18	COLONIZACIÓN		ESPONTANEA	
19	COLONIZACIÓN		ESPONTANEA	
20	COLONIZACIÓN		ESPONTANEA	
21	COLONIZACIÓN		ESPONTANEA	
22	COLONIZACIÓN		ESPONTANEA	
23	COLONIZACIÓN		ESPONTANEA	
24	INFECCIÓN Y COLONIZACIÓN			COLONIZACIÓN
25	INFECCIÓN Y COLONIZACIÓN		POS-TRATAMIENTO	
26	INFECCIÓN SIN COLONIZACIÓN		POS-TRATAMIENTO	
27		COLONIZACIÓN		COLONIZACIÓN
28		COLONIZACIÓN		COLONIZACIÓN
29		COLONIZACIÓN		COLONIZACIÓN
30		COLONIZACIÓN		COLONIZACIÓN
31		COLONIZACIÓN		COLONIZACIÓN
32		COLONIZACIÓN		COLONIZACIÓN
33		COLONIZACIÓN		COLONIZACIÓN
34		INFECCIÓN Y COLONIZACIÓN		COLONIZACIÓN
35		INFECCIÓN SIN COLONIZACIÓN	POS-TRATAMIENTO	
36		INFECCIÓN SIN COLONIZACIÓN	POS-TRATAMIENTO	
37-534				
total		10	19	17

Tabla.6. Se muestran los cambios longitudinales de los 534 pacientes que permanecieron internados por > de 3 días, los MRSA en la admisión, los adquiridos en el hospital, aquellos que se descolonizaron ya sea por el tratamiento recibido o espontáneamente, y aquellos que se mantuvieron colonizados hasta el alta hospitalaria.

Por otro lado, se analizó la presión de colonización (PC) de MRSA, la cual varió enormemente entre los hospitales (de 0,35% a 33,7%). Las tasas de PC general de MRSA en todos los hospitales durante todo el período del estudio fueron del 12,9% (IC 95%: 11,9% a 13,9%), [16,9% para pediatría y 10,1% para pacientes adultos, $p < 0,0001$]. Además, la PC de CA-MRSA_G fue significativamente más alto (11,3%, 14,1% para pacientes pediátricos vs. 10,4% para pacientes adultos, $p = 0,0005$), que el CP de HA-MRSA_G (1,7%, 1,5% para pediatría vs. 0,9% para pacientes adultos, $p = 0,1$) (Tabla 3).

Las adquisiciones de MRSA en la población del estudio fueron equilibradas mediante la descolonización espontánea (Figura 10). De los 26 portadores de MRSA, tanto los positivos al ingreso, así como los que fueron adquiridos en el hospital durante ≥ 3 días, el 34,6% (n: 9, 8 CA-MRSA_G y 1 HA-MRSA_G) permanecieron colonizados hasta el alta, incluido un paciente con infección de inicio en la comunidad (CO) de piel y partes blandas (SSTI), después del tratamiento sistémico con clindamicina (Figura 10). Los 15 restantes, (12 CA-MRSA_G y 3 HA-MRSA_G) se descolonizaron espontáneamente y 2 casos de infecciones CO (CA-MRSA_G) se descolonizaron después del tratamiento antibiótico sistémico. En consecuencia, de los 534 pacientes ingresados durante ≥ 3 días, 17 (3,2%) fueron colonizados por MRSA al alta [16 (3,0%) con CA-MRSA_G y 1 (0,2%) con HA-MRSA_G] (Figura 10 y Tabla 6).

Para estimar si hubo una diferencia en la transmisibilidad entre los tipos de cepas, comparamos las proporciones de las cepas CA-MRSA_G y HA-MRSA_G entre los pacientes con MRSA importado frente a los MRSA adquiridos. Las cepas CA-MRSA_G representaron 22 de las 26 cepas de MRSA (84,6%) identificadas en el ingreso, pero todas las cepas (100,0%) adquiridas en el hospital fueron CA-MRSA_G. Es importante destacar que, de los 4 portadores HA-MRSA_G al ingreso, tres (75%) fueron descolonizados espontáneamente al momento del alta. En contraste, de los 22 portadores CA-MRSA_G, sólo nueve (41%) fueron espontáneamente descolonizados al alta.

8.1.4 RESULTADOS relacionados al objetivo específico *Id*

Realizar la caracterización molecular junto al perfil de resistencia antibiótica de los aislamientos de MRSA, para determinar la epidemiología molecular de la colonización en el ingreso y la adquisición nosocomial de los clones circulantes.

Un total de 94 cepas de MRSA se analizaron genéticamente a partir de 79 pacientes colonizados: 60 de la admisión, 10 adquisiciones y 9 pacientes positivos en el alta del hospital, que habían permanecido colonizados durante la estancia en el hospital. Las características moleculares dadas por: complejo clonal (CC) y tipo secuencial (ST), según lo definido por MLST, tipo y subtipo según PFGE, tipos *spaA* y *SCCmec*, presencia de genes *pvl*, alotipo *agr*, perfil de genes de virulencia junto con el patrón de resistencia a los antimicrobianos de todas las cepas CA-MRSA_G y HA-MRSA_G (tanto las de la admisión como las adquiridas) se muestran en la Tabla 7 y en la Figura 10. Los aislamientos recuperados de cada paciente a lo largo del tiempo (ingreso y alta) y en los diferentes sitios anatómicos del huésped (faringe-nasal, nasal-inguinal y nasal-faringe-inguinal) fueron genéticamente indistinguibles por PFGE, MLST, *spaA* y caracterización de *SCCmec*, por lo tanto, se describió una sola cepa de MRSA por paciente en la Tabla 7.

De los 60 aislamientos de MRSA recuperados al ingreso, en proporciones descendentes, 17 (28,3%) pertenecen al clon CA-MRSA PFGE tipo I-ST5-IV (IVa, n: 16 o IVc, n: 1); 12 (20,0%) al genotipo CA-MRSA_G PFGE tipo N-ST30-IV (IVc, n: 8 o IVa, n: 4); 9 (15,0%) a la variante Argentina del clon pediátrico HA-MRSA_G, C-ST100-IV (IVNv n: 8 y NT n: 1), los restantes aislados de MRSA pertenecen a los siguientes genotipos: CA-MRSA_G R-ST72-IVc (n: 8, 13,3%); HA-MRSA A-ST5-I (n: 4; 6,7%); CA-MRSA_G D-ST97-IV [(IVc, n: 3 o IVa, n: 1), n: 4; 6,7%]; CA-MRSA_G USA300 ST8-IV-VL (n: 3; 5,0%). Sólo un aislamiento de cada uno de los siguientes genotipos: HA-MRSA_G USA600-AA-ST45-IIv; CA-MRSA_G W-ST59-IVa y CA-MRSA_G Y-ST509-IVa. Entre ellos, se encuentran los tres genotipos CA-MRSA asociados a infecciones importadas: 1- I1-ST5/CC5-IVa-*t311/pvl* (Infección de piel y tejidos blandos del tipo abscesos y celulitis, en un niño de 1 mes. La cepa había sido detectada en el sitio nasal en el ingreso y el paciente permaneció colonizado hasta el alta hospitalaria después del tratamiento ATB sistémico, caso evaluado también por secuenciamiento del genoma completo, WGS), 2- I4-ST5/CC5-IVa-*t311/pvl* (bacteriemia complicada con abscesos pulmonares y cerebrales y sepsis, de 24 años), 3- N4-ST30/CC30-IVc-*t019/pvl* (conjuntivitis en un niño de 1 año). (Tablas 6 y 7 y Figura 10).

Cuando se estratificó por edad, la proporción de colonización del clon CA-MRSA_G ST5-IVa fue mayor en pediatría que en adultos (2,1%, 14/670, vs 0,4%, 3/749, $p = 0,0054$) (Tabla 7).

Tabla 7 | Prevalencia y características moleculares de los aislados de MRSA importados y adquiridos, Córdoba, Argentina

Nombre tradicional de cada clon	Clon Cordobés /chileno	USA600 / CMRSA 1	Variante Argentina del clon pediátrico	Relacionado a LA-MRSA CC97	Clon CA-MRSA en Argentina similar a USA800	Clon Southwes t Pacific (SWP) USA1100	Clon CA-MRSA en Corea del Sur similar a USA700	USA300-VL Variante latinoamericana	Clon Asian-Pacific / USA1000	ST207-IV	ST1649-IV	
MRSA en admisión, n: 60												
Genotipo a n (%)	HA-MRSA _G 14(23)			CA-MRSA _G 46(76.7)								
n (%) de MRSA en admisión (n: 60) / (%) de cada genotipo, HA-MRSA _G (n: 14) o CA-MRSA _G (n: 46)	4(7/29)	1(2/7)	9(15/64)	4(6,7/8,7)	17(28/37)	12(20/26)	8(13/17)	3(5/7)	1(2/2)	1(2/2)	0(0)	
n (%) del total ^b de la población (n: 1419)	4(0,28)	1 (0,07)	9(0,62)	4(0,28)	17(1,20)	12(0,84)	8(0,56)	3(0,21)	1 (0,07)	1 (0,07)	0(0)	
n (%) en pediatría ^b (n: 670)	2(0,29)	0	7(1,04)	2(0,29)	14(2,10)	7(1,04)	6(0,90)	1(0,15)	1(0,15)	1(0,15)	0(0)	
n (%) de adultos ^b (n: 749)	2(0,26)	1(0,13)	2(0,26)	2(0,26)	3(0,40)	5(0,70)	2(0,26)	2(0,26)	0	0	0(0)	
Pediatría vs. adultos, p-valor, OR (95% CI)	0,91	NA	0,12	0,91	0,0054 5,3 (1,6-17,1)	0,34	0,20	0,89	NA	NA		
MRSA adquiridos n: 10												
Genotipo a n (%)	CA-MRSA _G 10(100.0)											
n (%) total de MRSA adquiridos				1 (10,0)	4(40,0)	2(20,0)	2(20,0)					1(10,0)
Total de MRSA, n: 70												
Genotipo a n (%)	HA-MRSA _G 14(20.0)			CA-MRSA _G 56(80.0)								
n (%) total de MRSA, n: 70	4(5,8)	1(1,4)	9(12,8)	5(7,2)	21(30)	14(20)	10(14)	3(4,4)	1(1,4)	1(1,4)	1(1,4)	
Tipo de PFGE ^a	A	AA	C	DD	I	N	R	USA300-VL	W	Y	QQ	
Subtipo de PFGEa n(%)	A5 1(25) A93 1(25) A94 1(25) A95 1(25)	AA1 1(100)	C1 2(22) C15 3(33) C30 2(22) C7 2(22)	DD1 2(40) DD11 1(20) DD17 1(20) DD19 1(20)	I1f 12(57) I4f 3(14) I44 2(10) I2 2(10) I29 1(6) I68 1(6)	N4f, g 9(64) N41 2(14) N42 2(14) N30g 1(7)	R1 7(70) R6 3(30)	USA300-23 2(67) USA300-3 1(33)	W1 1(100)	Y4 1(100)	QQ1g 1(100)	
ST/CC	5/5	45/45	100/5	97/97	5/5	30/30	72/8	8/8	59/59	207/50 9	1649/5	
Tipo de SCCmecA n(%)	I 5(100)	IIv 1	IVnv 8(89) NT 1	IVc 3(60) IVa 2(40)	IVa 19(91) IVc 2(10)	IVc 10(71) IVa 4(29)	IVc 10(100)	IVc 2(67) IVb 1	IVa 1	IVa 1	IVc 1	
RIDOM tipo spaA ^a : n (%)	t149 4(100)	t2233	t002 9(100)	t359 2(50) t938, t9638, t3380	t311 15(72) t002 5(24) t2049 1	t019 10(71) t238 3(21) t3378 1	t148 9(90) t3169 1	t304 2(67) t008 1	t437	t525	t701	
Pvl a n(%)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	15(72)	10(71)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	
Tipo agr	2	1	2	1	2	3	1	1	1	3	1	
Perfil de genes de virulencia: n (%)	<i>egc-lukDE</i>	<i>egc-lukDE</i>	<i>egc-lukDE</i>	<i>lukDE</i>	<i>sea-egc-lukDE</i> 15(71) <i>egc-lukDE</i> 6(29)	<i>egc-lukDE-bbp-cna</i>	<i>egc-lukDE</i>	<i>lukDE-seq-sed-sej-bsa</i> 2(67) <i>lukDE-sea-sec-bsa</i> 1(33)	<i>LukDE</i>	<i>egcd-cna</i>	<i>lukDE-seb-sea-bsa-cna</i>	
Resistencia a no-β-Lactámicos (%)	GEN(75) CLIC (75) ERY(75) CIP(75)	CLIC(100) ERYC(100) CIP(100)	CIP(44) CLIC(33) ERY(33) GEN(78) RIF(33)		CIP(5) CLII(38) ERYI(38) GEN(19)	CIP(7) GEN (7)	GEN(20.0) CLII(30.0) ERYI(30.0)		CLIC(100) ERYC(100)		TMS(100)	

CC: Complejo Clonal, ST: tipo secuencial, tipo/subtipos de PFGE: tipo y subtipos de electroforesis en gel de campo pulsado, Tipo de spa RIDOM: tipo de proteína A (spa) de *Staphylococcus* asignado a través de las bases de datos RIDOM (<http://spaserver.ridom.de>); SCCmec: tipo de cassette cromosomal mec de *Staphylococcus* (SCCmecNT: no fue posible determinar una clase de complejo mec o un tipo de ccr), pvl: genes de la leucocidina de Pantón-Valentine (*lukS-PV-lukF-PV*), Tipo agr, tipo de alotipo regulador accesorio, NA: No aplicable a n. (%): número y porcentaje de cepas con esta característica molecular [Tipo genético, tipo PFGE, subtipo PFGE o tipo spa o tipo SCCmec o genes pvl] de cada clon de MRSA en cada grupo de aislados (MRSA importado, adquirido y total). El (%) no se expresa cuando sólo se detectó un aislado con esta característica.

^b **n (%)**: número y porcentaje de la población total (n: 1419), pediatría (n: 670) o adultos (n: 749) colonizados por cada genotipo. ^c **Perfil de los genes de virulencia**: Las enterotoxinas: *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seh*, *sej*, *egc* (*seg-sei-sem-sen-seo*) y *sek*; toxina del síndrome de shock tóxico (TSST-1): *tst*; toxinas exfoliativas: *eta* y *etb*; leucocidina: *lukE-lukD* y la clase F leucocidina: *lukM*; bacteriocina (*bsa*), adhesinas: para colágeno (*cna*) y para la proteína de unión a sialoproteína ósea (*bbp*), se analizaron la proteína de superficie *sasX* (*sasX*) y el gen *arcA* (indicador del elemento móvil catabólico arginina, ACME) y se indican (el número y el % de aislamientos positivos, se expresan cuando no todos los aislamientos albergan este factor de virulencia).

^d El locus *egc* parece estar presente en una variante o forma truncada con sólo los genes *sem*, *sei* y *seo* detectables.

^e La resistencia a los antibióticos no β -lactámicos (%), se indica de la siguiente manera: gentamicina (GEN), eritromicina (ERY), clindamicina (CLIC y CLII: resistencia constitutiva e inducible a macrólidos, lincosamida y estreptogramina B, respectivamente), Ceftarolina (CPT), Ciprofloxacina (CIP), Rifampicina (RIF), Trimetoprima / Sulfametoxazol (TMS), Minociclina (MIN) y Cloranfenicol (CHL), (%) de cepas resistentes a estos antibióticos dentro de cada genotipo se indica cuando se detectó en más de un aislamiento.

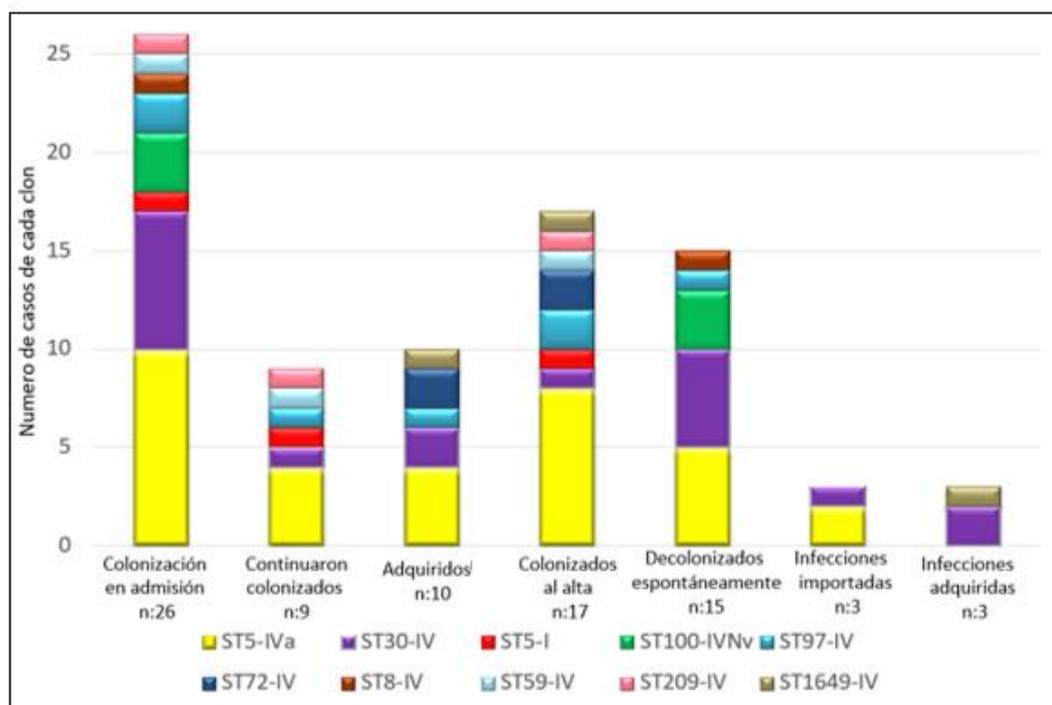
^f. Subtipos por PFGE que causaron infecciones importadas o detectadas en el ingreso al hospital.

^g. Subtipos por PFGE que causaron infecciones adquiridas en el hospital.

De los 9 pacientes que permanecieron colonizados hasta el alta: 8 (88,9%) fueron colonizados por genotipos CA-MRSA_G, entre los cuales el 50% (4/8 aislamientos) pertenecieron al genotipo I-ST5-IVa, (todos los pacientes colonizados fueron pediátricos). Los 4 aislamientos restantes caracterizados como CA-MRSA_G pertenecieron, cada uno, a genotipos diferentes descritos a continuación: N-ST30-IVc y D-ST97-IVc en pacientes adultos; W-ST59-IVa y Y-ST509-IVa, en dos pacientes pediátricos. Sólo 1 de los 9 pacientes que permanecieron colonizados hasta el alta (11.1%) estaba colonizado por un genotipo HA-MRSA_G: A-ST5-I (Figura 10).

Los 10 aislamientos de MRSA adquiridos se caracterizaron como CA-MRSA_G, (Tabla 7), entre los cuales, los 7 que se detectaron por colonizar a los pacientes en el momento del alta hospitalaria presentaron los siguientes genotipos CA-MRSA_G: I-ST5-IV, n: 4/10, 40%; (3 asociados al SCCmec IVa y el t311, que portaban los genes *pvl* y uno con el SCCmec IVc y el t002), R-ST72-IVc, n: 2/10, 20%, y D-ST97-IVc 1/10, 10%. Los 3 genotipos CA-MRSA que causaron infecciones adquiridas fueron los siguientes: 1-N30-ST30/CC30-IVc-t019/*pvl* (infección de sitio quirúrgico en un paciente adulto de 45 años), 2-QQ1-ST1649/CC6-IVc-t701 (meningitis post-quirúrgica en un niño de 5 años que permaneció colonizado hasta el alta hospitalaria a pesar del tratamiento antibiótico sistémico) y 3-N4-ST30/30-IVc-t019/*pvl* (osteomielitis hematógena aguda, en un niños de 3 años)(Tabla 6, Tabla 7 y Figura 7).

Figura 10| Cambios longitudinales de los clones MRSA



De los seis casos de infecciones mostradas en la Tabla 6 y la Figura 10, tres casos fueron causadas por el clon ST30-IVc-PVL+ [1 caso de infección importada (CO) y 2 casos de infecciones adquiridas en el hospital (HO)] y tuvieron hisopados de colonización negativos, es decir sólo se detectaron en muestras clínicas positivas para MRSA.

Utilizando la metodología del Secuenciamiento de genomas completos (WGS), se analizó un caso particular. Un paciente (CIBICI3867) recién nacido en el hospital H8, ingresó a la institución un día después de su fecha de nacimiento por ictericia neonatal. El paciente se expuso durante 3 días a luminoterapia y fue dado de alta después de un tratamiento exitoso. 5 días después del alta hospitalaria, el paciente fue readmitido, esta vez en la unidad de cuidados intensivos con lesiones de piel bullosa en todo el cuerpo. Los médicos tomaron hisopados nasales, faríngeos e inguinales, así como también de la secreción de la lesión y se indicó tratamiento empírico con cefalotina y gentamicina. Los cultivos fueron positivos para MRSA en la muestra de hisopado nasal al ingreso (ADM-C) y de la lesión (W-INF). Luego de 4 días de pruebas microbiológicas, se cambió el tratamiento a clindamicina intravenosa durante 3 días, después de este período y con mejoría clínica, el paciente fue dado de alta del hospital (al octavo día de internación) y en la muestra de hisopado nasal (DIS-C) se detectó también MRSA. La caracterización molecular de las tres muestras arrojaron los mismos resultados, lo que indicaba que se trataban del mismo clon CA-MRSA_G I1-ST5-IVa, spa-t311 con genes *pv*+. En este caso, se utilizó el WGS para confirmar, por un lado, si se trataba de la misma cepa con la que había

ingresado el paciente y luego permaneció hasta el alta (evolución en el tiempo) y por el otro, comparar las cepas de colonización e infección en el mismo paciente (diversidad entre colonización e infección). Los resultados revelaron que estos aislamientos pertenecían al mismo subtipo por WGS, debido a que las diferencias de SNPs eran menos de 40, lo que confirma la presencia de un sólo subtipo a lo largo del tiempo y que la infección fue causada por colonización endógena previa (Figura 11A).

Figura 11 | Comparación por Secuenciación de genomas completos de los aislamientos del mismo paciente a lo largo del tiempo.

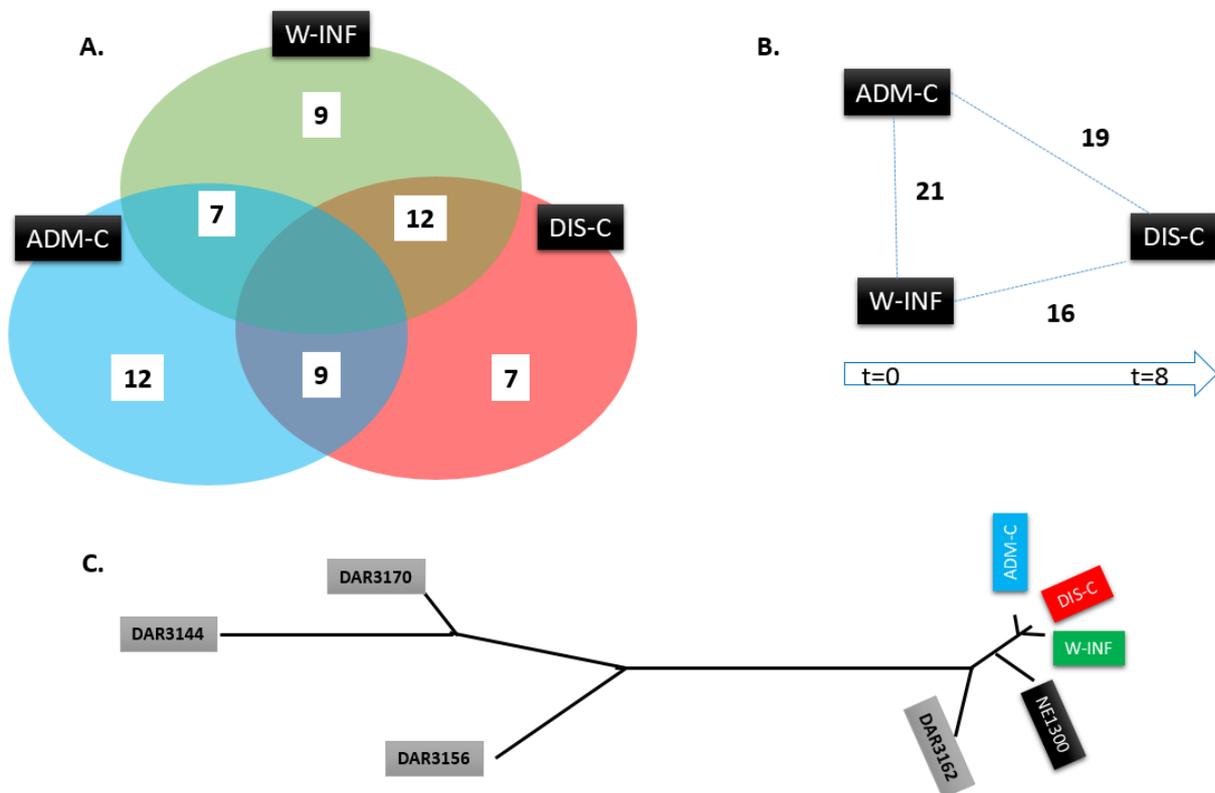


Fig.11. (A) Diagrama de Venn que muestra los alelos compartidos y diferentes entre las muestras. Por ejemplo, la posición 123299 de la secuencia NC_002745.2, en la cual hay una T, es una G en ADM-C (hisopado nasal al ingreso) y A en DIS-C (hisopado nasal en el alta) y W-INF (hisopado de la lesión), lo que significa que es una de las 12 mutaciones exclusivas en ADM-C, y uno de los 12 compartidos entre los otros 2. Los compartidos entre todas las muestras no se tienen en cuenta, ya que no son útiles para diferenciarlos. **(B)** Tiempo total de diferencias de SNP (t en días). Observe que el número final es la suma de alelos exclusivos entre muestras. **(C)** Árbol filogenético sin raíz de contexto. Las muestras y las diferencias de recuento de SNP se describen en la tabla 8.

Además, estos aislamientos difieren en más de 150 SNP (Tabla 8) de otro aislamiento sin relación epidemiológica (NE1300) con el mismo genotipo de acuerdo a la caracterización molecular por PFGE, tipo spa, MLST y SCCmec y de otros aislamientos pertenecientes al mismo

CC5 de MRSA/MSSA que circulan en Argentina (DAR3144, DAR3162, DAR3156 y DAR3170, Figura 11C).

Tabla 8| Distancia entre los aislamientos de acuerdo a las diferencias en el número de SNPs

GENOTIPO Y SCCmec	NOMBRE	ADM-C	W-INF	DIS-C	NE1300	DAR3162	DAR3170	DAR3144	DAR3156
<i>ST5-IVa</i>	<i>ADM-C</i>	0	21	19	233	350	1695	2183	1659
<i>ST5-IVa</i>	<i>W-INF</i>	-	0	16	236	355	1708	2192	1672
<i>ST5-IVa</i>	<i>DIS-C</i>	-	-	0	236	355	1708	2192	1672
<i>ST5-IVa</i>	<i>NE1300</i>	-	-	-	0	297	1660	2176	1618
<i>ST5-IVa</i>	<i>DAR3162</i>	-	-	-	-	0	1689	2175	1663
<i>MSSA-ST5</i>	<i>DAR3170</i>	-	-	-	-	-	0	1100	1102
<i>ST5-I</i>	<i>DAR3144</i>	-	-	-	-	-	-	0	1684
<i>ST100-IV</i>	<i>DAR3156</i>	-	-	-	-	-	-	-	0

Estos hallazgos revelan que los aislamientos del sitio nasal (ADM-C y DIS-C) y el de la herida difieren sólo en unas pocas mutaciones puntuales. Los aislamientos ADM-C y DIS-C diferían entre sí en 19 SNP, los aislamientos ADM-C y W-INF diferían en 21 SNP, y DIS-C y W-INF diferían en 16 SNP. Además, el W-INF difería en 9 SNP de ambos aislamientos colonizadores, por lo que tenían 9 SNP exclusivos. No está claro si alguna de las mutaciones enumeradas es importante para la colonización del sitio nasal o la infección de la herida, pero curiosamente, una de las mutaciones, que causó una inserción conservativa dentro del marco de lectura, estuvo presente sólo en el aislamiento de la herida, en el gen, *SAR1022*, *sspA*, con homología a la proteasa de serina, que junto con otras proteasas extracelulares está involucrada en la colonización e infección de tejidos humanos.

No obstante, para corroborar estos hallazgos, se procedió a sintetizar *primers* específicos para amplificar el gen *sspA* de los tres aislamientos en cuestión (ADM-C, W-INF, DIS-C). Los productos de amplificación fueron secuenciados para poder analizar si efectivamente se encontraba una inserción conservativa en el aislamiento W-INF. En los resultados obtenidos a través del alineamiento de secuencias no se encontraron diferencias respecto al gen *sspA* manteniéndose invariable en los 3 aislamientos.

Resistencia antimicrobiana a los agentes no β -Lactámicos

De todos los aislamientos CA-MRSA_G (n: 46) recuperados, el 30% (14/46) fue resistente al menos a un antibiótico no β -lactámico y el 4,3% (2/46) al menos a dos de estos agentes. Se detectó un 24% resistencia a la eritromicina (ERY), un 24% a clindamicina (CLI, 90% de resistencia inducible), un 6.5% a gentamicina (GEN) y un 4.3% a ciprofloxacina (CIP).

De todos los aislamientos HA-MRSA_G, se detectó un 50% a ERY, 50% a CLI (100% de resistencia constitutiva), 57% a GEN, 57% a CIP y 21%, a rifampicina (RIF).

De todos los aislamientos de HA-MRSA_G, el 86% fue resistente a dos o más antibióticos no β -lactámicos. Todos los aislados de MRSA fueron sensibles (CIM90 y rango en $\mu\text{g} / \text{mL}$): a mupirocina (0,38; 0,094-0,5) y vancomicina (1; 0,5-2). Los perfiles de resistencia antimicrobiana de estos clones de MRSA (Tabla 6) fueron comparables a los descritos en nuestros estudios anteriores.

Entre los 3 aislamientos secuenciados (ADM-C, DIS-C y W-INF), no se encontraron diferencias de SNPs en genes involucrados en resistencia a antibióticos. El análisis completo se detallan en los resultados relacionados al objetivo específico *III a3*, página 117 [identificados como 3867NI (ADM-C), 3867NE (DIS-C) y 3867INF (W-INF)].

8.1.5 CONCLUSIONES GENERALES DE LOS RESULTADOS DE LA ETAPA I

Para el análisis de las implicancias de la colonización por CA-MRSA_G, comparativamente con la colonización por HA-MRSA_G y MSSA, en los pacientes que se hospitalizaron en instituciones asistenciales de Córdoba (República Argentina) se diseñó un estudio prospectivo y longitudinal en 8 Instituciones hospitalarias de Córdoba, entre octubre y diciembre del año 2014. Pudimos obtener resumidamente las siguientes conclusiones:

✓ Se analizaron 1419 pacientes que fueron hospitalizados. Se obtuvo una prevalencia de colonización por MRSA de 4,2% (n: 60) en la admisión, con mayor proporción en pediatría que en adultos (6,1% vs 2,5%). Esta mayor proporción en pediatría estuvo dada principalmente por una mayor proporción de CA-MRSA_G (4,8%) comparada con la de adultos (1,9%) $p= 0,002$.

✓ Los clones MRSA más frecuentes en la admisión (n: 60) fueron, CA-MRSA_G: I-ST5-IV (n: 17, 28,3%), N-ST30-IV (n: 12, 20%), y HA-MRSA_G: C-ST100-IV (n: 9, 15%).

✓ Se identificaron factores de riesgo para colonización por MRSA, discriminando FR para colonización por genotipos CA-MRSA_G de FR para colonización por genotipos HA-MRSA_G. Los portadores de genotipos CA-MRSA_G, se asociaron de forma independiente con la edad <19 años (OR 2,92), presencia de al menos una Necesidad Básica Insatisfecha (OR 2,00), historia de infección/colonización por MRSA (OR 6,57), residencia en geriátrico/centro de rehabilitación (OR 10,69) y uso previo de antibióticos (OR, 1,94). Mientras que los FR para estar colonizado por genotipos HA-MRSA fueron: enfermedades respiratorias crónicas como el asma (OR 7,9), historial de infección/colonización por MRSA (OR 7,8) y la presencia de dispositivos médicos (OR 18,43). Esta diferencia en los FR dependiendo de los genotipos, implica diferentes orígenes y nichos de transmisión de ambos genotipos. Por otro lado, avala la importancia de conocer los genotipos prevalentes en una población a la hora de llevar a cabo el “screening” de MRSA en la admisión de acuerdo a la presencia de FR para implementar de manera temprana medidas de control de infección que reduzcan la transmisión y consecuentemente las infecciones asociadas a la atención sanitaria de inicio en el hospital o adquiridas en el hospital.

✓ Se detectaron 10 casos de adquisiciones hospitalarias, todas ellas dadas por genotipos CA-MRSA_G demostrando la circulación y adquisición de estas cepas dentro del hospital. Este dato es de fundamental importancia a la hora de la utilidad de las medidas de control de infecciones hospitalarias para el control de la transmisión de MRSA en los hospitales.

✓ Los clones CA-MRSA más frecuentes en las adquisiciones fueron: I-ST5-IV (n: 4, 40%), N-ST30-IV (n: 2, 20%), R-ST72-IV (n: 2, 20%), QQ-ST1649-IV (n: 1, 10%).

8.2 RESULTADOS DE LA ETAPA II

Determinar la evolución clínica y molecular de las infecciones por MRSA en nuestro país (2009-2015).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS RELACIONADOS A LA ETAPA II

Ila. Establecer la PREVALENCIA nacional, además del perfil de resistencia antimicrobiana de *S. aureus* meticilino resistente (MRSA) en infecciones asociadas al ámbito hospitalario (HA-MRSA) y a la comunidad (CA-MRSA).

Ilb. Analizar y comparar las características moleculares de los MRSA adquiridos en la comunidad y en el hospital según las regiones (Norte, Centro y Sur) y según grupo etario (pediatría y adultos)

Ilc. Analizar el PATRON CLINICO- EVOLUTIVO DOMINANTE actual en nuestro medio, de las infecciones causadas por MRSA en sus diferentes localizaciones y sitio de comienzo (comunidad u hospital) en pacientes pediátricos y adultos.

Ild. Determinar la evolución de la epidemiología clínica y molecular de las infecciones por MRSA en el país, tanto a nivel hospitalario como de la comunidad comparativamente con el estudio previo (2009).

8.2.1 RESULTADOS relacionados al objetivo específico *Ila*

Establecer la PREVALENCIA nacional además del perfil de resistencia antimicrobiana de *S. aureus* meticilino resistente (MRSA) en infecciones asociadas al ámbito hospitalario (HA-MRSA) y a la comunidad (CA-MRSA) en Argentina.

Ila-1 Diseño del estudio y características de los hospitales

Tal como se describe en detalle en materiales y métodos, con el fin de estudiar la epidemiología de las infecciones por *S. aureus* en nuestro país, así como la evolución en el tiempo desde los primeros estudios de vigilancia realizados por nuestro grupo de investigación, se llevó a cabo un estudio de carácter prospectivo multicéntrico transversal a nivel nacional durante el mes de abril de 2015, con la participación de 61 hospitales de 20 provincias sumada la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Se utilizó una definición genotípica para los aislamientos de MRSA, caracterizándolos como genotipos CA-MRSA_G y HA-MRSA_G, independientemente del tipo de infección que hayan causado. Por otro lado, se utilizaron definiciones epidemiológicas de las infecciones causadas por MRSA, de acuerdo al origen de la infección (descriptas en Materiales y Métodos, página: 157).

Durante el periodo de estudio de 1 mes de vigilancia (abril de 2015), se obtuvo un total de 668 aislamientos de *S.aureus* (un aislamiento por paciente), donde 417 (62,4%) fueron pacientes adultos, 251 (37,6%) fueron pediátricos y 394 (59%) fueron de sexo Masculino. En la tabla 9 se detallan las características generales de cada institución participante.

Tabla 9 | Listado de los 61 hospitales participantes

HOSPITAL	REGIÓN	PROVINCIA	N°CAMAS	N° AISLAMIENTOS
1	NORTE	CATAMARCA	100	2
2	NORTE	CORRIENTES	120	4
3	NORTE	CHACO	520	18
4	NORTE	CHACO	245	26
5	NORTE	CHACO	77	9
6	NORTE	FORMOSA	121	18
7	NORTE	FORMOSA	181	3
8	NORTE	JUJUY	110	5
9	NORTE	LA RIOJA	200	5
10	NORTE	LA RIOJA	260	4
11	NORTE	MISIONES	167	8
12	NORTE	SALTA	220	7
13	NORTE	SALTA	250	10
14	NORTE	TUCUMAN	60	11
15	NORTE	TUCUMAN	65	6
<hr/>				
TOTAL		9 PROVINCIAS	2696	144
16	CENTRO	BUENOS AIRES	140	26

17	CENTRO	BUENOS AIRES	254	3
18	CENTRO	BUENOS AIRES	78	1
19	CENTRO	BUENOS AIRES	198	10
20	CENTRO	BUENOS AIRES	400	21
21	CENTRO	BUENOS AIRES	187	29
22	CENTRO	BUENOS AIRES	305	15
23	CENTRO	BUENOS AIRES	307	15
24	CENTRO	BUENOS AIRES	360	8
25	CENTRO	BUENOS AIRES	350	32
26	CENTRO	BUENOS AIRES	114	21
27	CENTRO	BUENOS AIRES	120	3
28	CENTRO	BUENOS AIRES	150	2
29	CENTRO	BUENOS AIRES	227	9
30	CENTRO	BUENOS AIRES	380	18
31	CENTRO	BUENOS AIRES	172	8
32	CENTRO	BUENOS AIRES	534	21
33	CENTRO	BUENOS AIRES	120	7
34	CENTRO	BUENOS AIRES	244	9
35	CENTRO	CÓRDOBA	107	13
36	CENTRO	CÓRDOBA	108	1
37	CENTRO	CÓRDOBA	81	8
38	CENTRO	CÓRDOBA	216	9
39	CENTRO	CÓRDOBA	60	11
40	CENTRO	CÓRDOBA	70	9
41	CENTRO	CÓRDOBA	36	5
42	CENTRO	CÓRDOBA	228	5
43	CENTRO	CÓRDOBA	60	4
44	CENTRO	CÓRDOBA	80	10
45	CENTRO	CÓRDOBA	81	7
46	CENTRO	CÓRDOBA	186	14
47	CENTRO	CÓRDOBA	84	4
48	CENTRO	ENTRE RIOS	180	1
49	CENTRO	MENDOZA	268	8
50	CENTRO	SAN LUIS	50	12
51	CENTRO	SANTA FE	170	17
52	CENTRO	SANTA FE	180	13
53	CENTRO	SANTA FE	104	8
54	CENTRO	SANTA FE	100	8
55	CENTRO	SANTA FE	108	13
56	CENTRO	LA PAMPA	188	7
TOTAL			7797	446
7 PROVINCIAS + CABA				
57	PATAGONIA	NEUQUEN	277	23
58	PATAGONIA	RIO NEGRO	80	10
59	PATAGONIA	SANTA CRUZ	100	13
60	PATAGONIA	SANTA CRUZ TIERRA DEL	223	18
61	PATAGONIA	FUEGO	95	14
TOTAL			775	78
4 PROVINCIAS				

Tabla 9. Lista de los hospitales participantes, regiones y provincias a las que pertenecen, número de aislamientos por institución y número de camas que alberga cada hospital.

Ila-2 Prevalencia de las infecciones por MRSA en la comunidad y en el ámbito hospitalario

Considerando el total de 668 casos de infecciones por *S. aureus*, 341 (51%) fueron producidas por MRSA. La mayoría de los casos (471/668, 70,5%) fueron de inicio en la comunidad (CO), tanto en pediatría (67,6%) como en adultos (72,2%) y tanto las producidas por MRSA como aquellas por MSSA (Figura 12a y 12b).

Figura 12a| Distribución de las infecciones según definición epidemiológica CO/HO por grupo etario

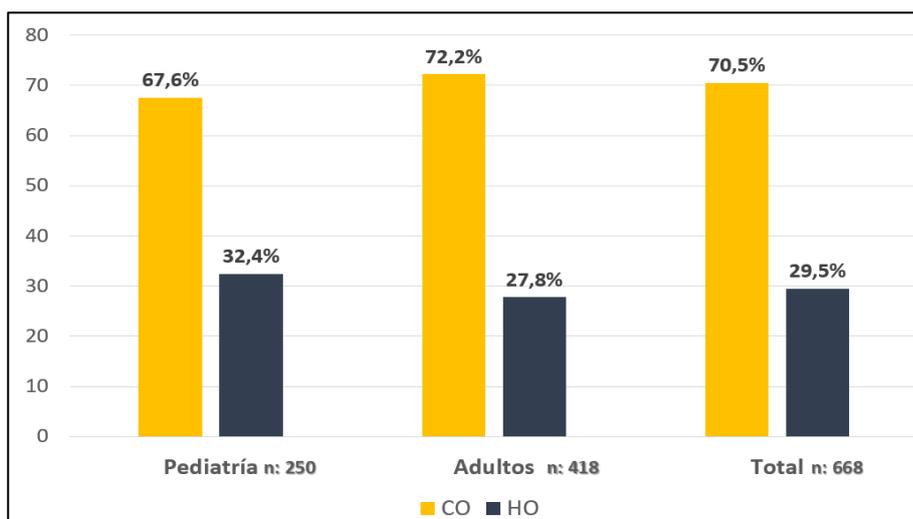


Fig.12a. Ilustra la distribución de aislamientos obtenidos de infecciones de inicio hospitalario (HO), así como las de inicio en la comunidad (CO), en la población total, adultos y pediatría.

Figura 12b| Distribución de las infecciones según definición epidemiológica CO/HO por MRSA/MSSA

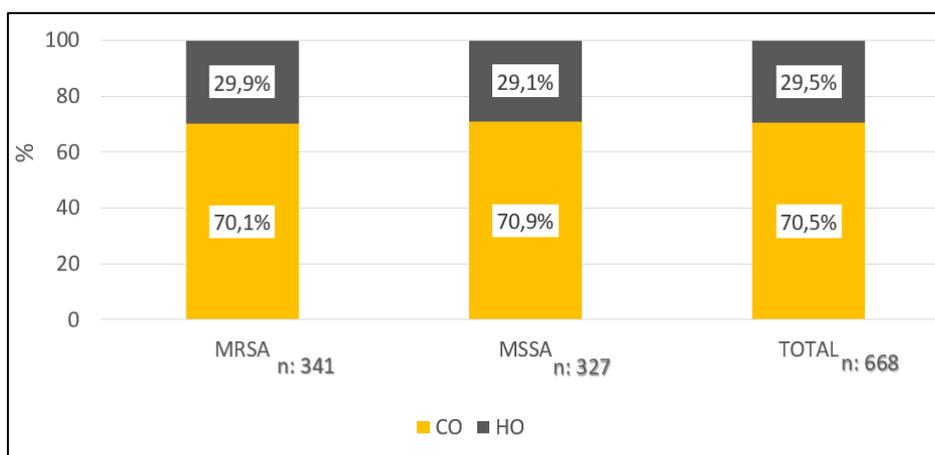


Fig.12b. ilustra la distribución de aislamientos obtenidos de infecciones de inicio hospitalario (HO), así como las de inicio en la comunidad (CO), en el total, y discriminado por MRSA y MSSA.

Un total de 325 pacientes presentaron infecciones de piel y tejidos blandos (IPPB; 48,7%) y entre estos, la proporción de MRSA fue del 63% (205/325).

El análisis molecular identificó que de los 341 aislamientos de MRSA, 302 (88,6%) fueron genotipificados como CA-MRSA (CA-MRSA_G) mientras que los restantes 39 aislamientos (11,4%) fueron genotipificados como HA-MRSA (HA-MRSA_G). Los detalles moleculares de los clones incluidos como genotipos CA-MRSA_G y HA-MRSA_G son descriptos en los resultados del objetivo específico *IIb* (página. 81).

La prevalencia nacional de MRSA obtenida fue de 51%, donde el 45.2% (302/668), corresponde a CA-MRSA_G, mientras que 5.8% (39/668) a cepas HA-MRSA_G Figura 13.

Figura 13 | Prevalencia global de MRSA en infecciones por *S. aureus*

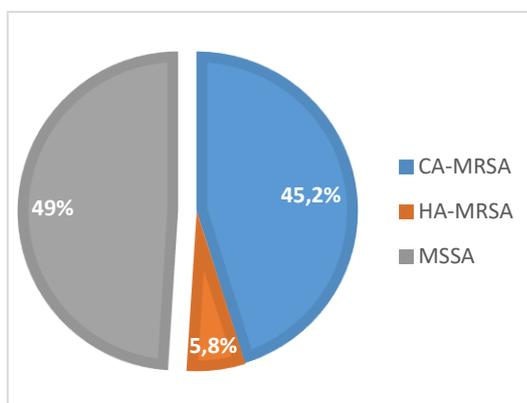


Fig.13. Prevalencia de MRSA en el total de la población analizada, discriminado por MSSA y genotipos CA-MRSA, HA-MRSA.

IIa-3. Resistencia a los antimicrobianos no-β-lactámicos de los genotipos CA-MRSA_G vs HA-MRSA_G

Las cepas CA-MRSA_G estuvieron asociadas con una menor tasa de resistencia a los ATBs ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, rifampicina, trimetoprima/sulfametoxazol (TMS) y minociclina comparada con las cepas HA-MRSA_G (Figura 14). La multiresistencia a los ATBs (≥ 3 resistencias a ATB no-β-lactámicos) sólo fue asociada a los genotipos HA-MRSA_G (Figura 14), y las proporciones de resistencia individual analizando cada antibiótico fue significativamente mayor ($p < 0,05$) para los aislamientos HA-MRSA_G, que para los CA-MRSA_G, excepto para TMS (2,6% vs 0,7% respectivamente, $p = 0,7203$) y para minociclina (2,6% vs 0% respectivamente) (tabla 10). Además, los aislamientos CA-MRSA_G presentaron mayor proporción del fenotipo inducible de la resistencia a los macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B que aquellos HA-MRSA_G y MSSA (Figura 15). Al analizar el perfil de resistencia de los aislamientos CA-MRSA_G, se observó que presentaron porcentajes de resistencias similares

tanto en las infecciones de la comunidad (CO) como en los hospitales (HO), observándose lo mismo al analizar los aislamientos HA-MRSA_G (tabla 10).

Todos los aislamientos estudiados presentaron sensibilidad a vancomicina (determinada por CIM), doxiciclina, linezolid, tigeciclina, teicoplanina y ácido fusídico.

Un aislamiento presentó resistencia a mupirocina, detectado por difusión en disco, con un halo de inhibición = 6 mm y un valor de CIM > 1024 µg/ml. Con el fin de investigar el mecanismo de resistencia involucrado, se diseñaron *primers* para la búsqueda por PCR de los genes *mupA*, *mupB*, los cuales confieren resistencia de alto nivel a mupirocina, detectando los genes *mupA*.

Figura 14 | Perfil de resistencia a los ATBs no β-lactámicos

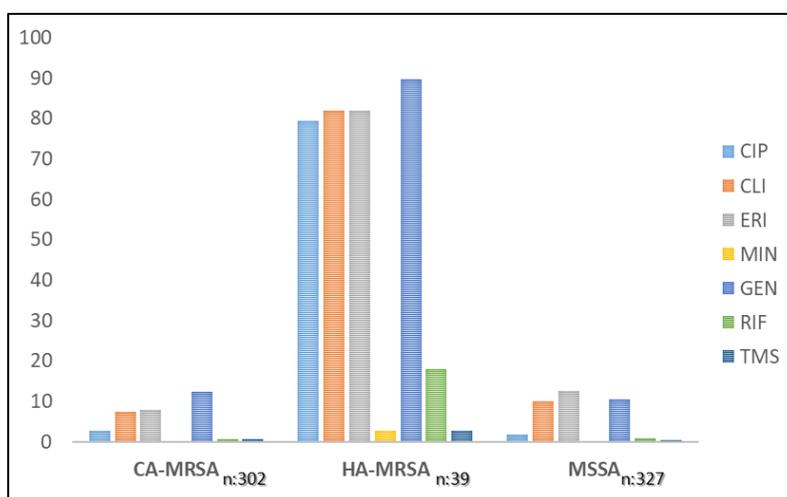


Fig.14. Distribución de la resistencia fenotípica a los antimicrobianos probados, discriminado en genotipos CA-MRSA, HA-MRSA y MSSA.

-CIP: ciprofloxacina, CLI: clindamicina, ERI: eritromicina, MIN, minociclina, GEN: gentamicina, RIF: rifampicina, TMS: trimetoprima/sulfametoxazol.

Tabla 10 | Comparación del perfil de resistencia entre CA-MRSA_G y HA-MRSA_G en el total y según categoría epidemiológica CO/HO

ATB	CA-MRSA n:302				HA-MRSA n:39				p-valor
	CO (n:226, 74,8%) n(%)	HO (n:76, 25,2%) n(%)	CO vs HO p-valor	Total n(%)	CO (n:13, 33,3%) n(%)	HO (n:26, 66,7%) n(%)	CO vs HO p-valor	Total n(%)	
CIP	5 (2,2)	3(3,9)	0,6988	8(2,6)	9(69,2)	22(84,6)	0,4828	31(79,5)	<0,0001
CLI	17(7,5)	5(6,6)	0,9952	22(7,3)	10(76,9)	22(84,6)	0,8823	32(82,1)	<0,0001
ERI	18(8)	6(7,9)	0,8283	24(7,9)	10(76,9)	22(84,6)	0,8823	32(82,1)	<0,0001
MIN	0(0)	0	NA	0	0	1(3,8)	NA	1(2,6)	NA
GEN	28(12,4)	9(11,8)	0,9488	37(12,3)	11(84,6)	24(92,3)	0,8515	35(89,7)	<0,0001
RIF	1(0,4)	1(1,3)	0,9841	2(0,7)	3(23,1)	4(15,4)	0,8823	7(18)	<0,0001
TMS	2(0,9)	0	NA	2(0,7)	0	1(3,8)	NA	1(2,6)	0,7203

Tabla.10. Comparación de la resistencia a los antibióticos probados entre los grupos CA-MRSA_G vs HA-MRSA_G, tanto en la comunidad (CO) como en el hospital (HO).

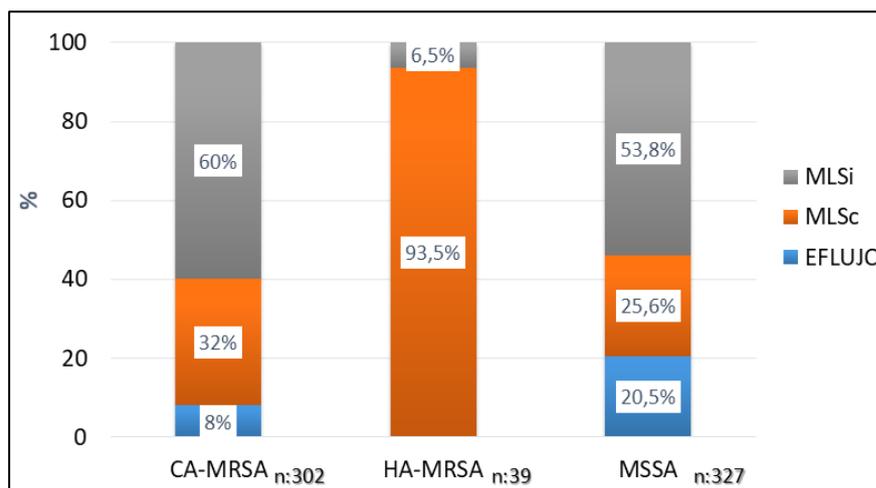
-CIP: ciprofloxacina, CLI: clindamicina, ERI: eritromicina, MIN, minociclina, GEN: gentamicina, RIF: rifampicina, TMS: trimetoprima/sulfametoxazol.

-En negrita se muestran las comparaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

NA- no aplica

Figura 15| Fenotipo de resistencia a macrólidos y lincosamidas en CA-MRSA, HA-MRSA

Y MSSA



MLSi: metilasa inducible, MLSc: metilasa constitutiva, Eflujo: mecanismo mediado por bombas de eflujo

Ila-4 Sensibilidad a ceftobiprol (BPR)

La sensibilidad a BPR fue del 98,8% (661/669) en el total de *S. aureus* y presentó un 97,7% (333/341) de sensibilidad en los aislamientos de MRSA con valores de CIM50 /CIM 90/rango: 0,5/0,5/0,12-4 ug/ml. En aislamientos CA-MRSA_G la sensibilidad a BPR fue del 100%, mientras que para aislamientos de HA-MRSA se obtuvo una sensibilidad de 79%, con valores de CIM50 /CIM 90/rango: 0,5/0,5/0,12-1 ug/ml para CA-MRSA_G y CIM50/CIM90/rango: 1/4/0,25-4 ug/ml para HA-MRSA_G. El 100% de los aislamientos MSSA fue sensible a BPR CIM50/CIM90/rango: 0,5/0,5/0,06-1 ug/ml. (Figuras 16 y 17)

Figura 16 | Perfil de sensibilidad a ceftobiprol-S.aureus vs MRSA vs MSSA vs CA-MRSA_G vs HA-MRSA_G

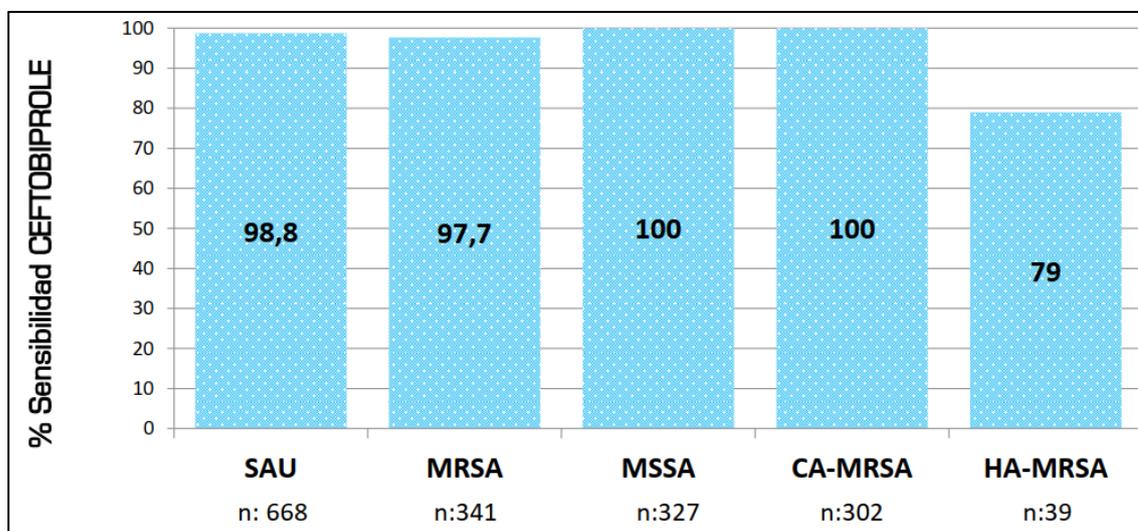
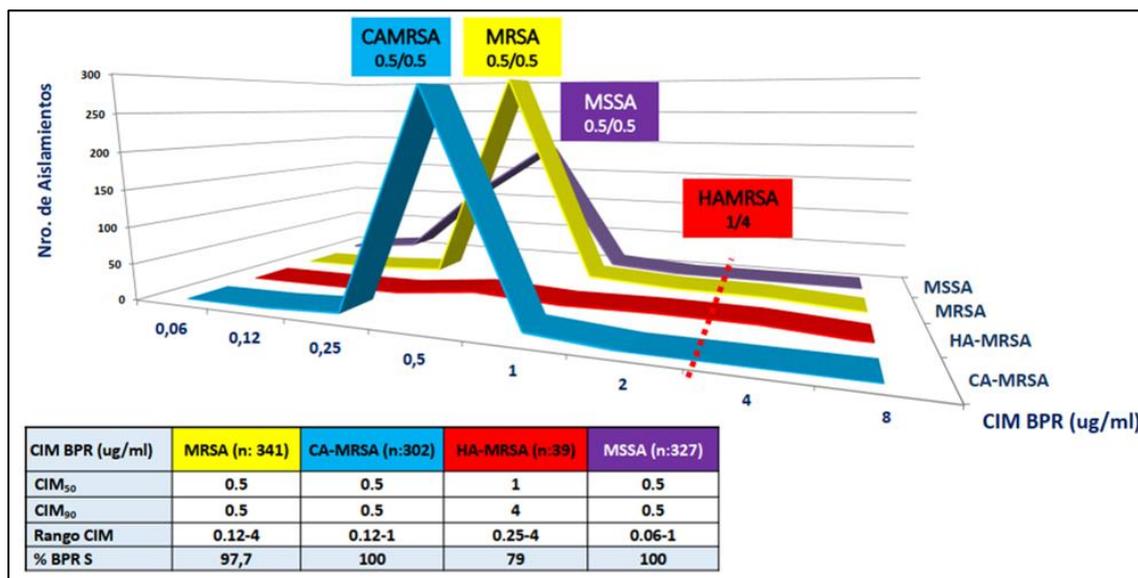


Figura 17 | Perfil de sensibilidad a ceftobiprol por CIM en MRSA vs CA-MRSA_G vs HA-MRSA_G vs MSSA



Punto de corte según EUCAST aislamientos sensibles con CIM < 2 ug/ml

Ila.5 Validación de la definición fenotípica de CA-MRSA_G

En la primera etapa de análisis de este trabajo se utilizó un criterio microbiológico para diferenciar CA-MRSA_G [MRSA con resistencia (R) a no más de un antibiótico (ATB)] de HA-MRSA_G, con el objetivo de obtener e informar a los centros hospitalarios los primeros datos de prevalencia nacional. Este criterio se implementó de acuerdo a los datos de sensibilidad antibiótica de los clones CA-MRSA caracterizados molecularmente en nuestro laboratorio y

detectados en el centro, norte y este del país, los cuales están descriptos en publicaciones previas del grupo de trabajo [148-150].

Con el análisis molecular de los aislamientos de MRSA llevado a cabo en este estudio, se pudo validar dicho criterio microbiológico. De esta manera, de todas las cepas caracterizadas molecularmente como CA-MRSA_G (n: 302), el 24,2 % fueron resistentes al menos a un ATB no-β-lactámico, el 3,6 % fueron resistentes a dos ATB y 1% resistente a tres. Entre todos los aislamientos HA-MRSA_G, el 97,4 % fue resistente a dos o más ATB no-β-lactámicos. Por lo tanto, la definición fenotípica utilizada se asoció con la definición genotípica ($p < 0,0001$), que correctamente identificó el 96,2 % de todos los aislamientos de MRSA con 96% de sensibilidad, 97 % de especificidad, 99,7% de valor predictivo positivo y 74,5% de valor predictivo negativo. Este dato representa un aporte importante, ya que permite brindar una herramienta al Laboratorio de Microbiología clínico de nuestro país y posiblemente de países limítrofes, para evaluar la transmisión de estas cepas, especialmente a nivel hospitalario, contribuyendo al control de las infecciones de inicio en el hospital.

8.2.2 RESULTADOS relacionados al objetivo específico IIb

Analizar y comparar las características moleculares de los MRSA adquiridos en la comunidad y en el hospital según las regiones (Norte, Centro y Sur) y según grupo etario (pediatría y adultos).

IIb-1 Características de la población estudiada y distribución geográfica

Con el propósito de evaluar la prevalencia de MRSA total y genotipos (CA-MRSA_G y HA-MRSA_G) según las diferentes regiones a lo largo de Argentina; el país fue separado en tres grandes áreas geográficas (Figura 21, página 84): Norte (9 provincias, 15 hospitales, 144 aislamientos), Centro (7 provincias y la ciudad de Buenos Aires, 41 hospitales, 446 aislamientos) y Sur (4 provincias, 5 hospitales, 78 aislamientos). Al analizar la distribución de los aislamientos, 144 (21,6%) provenían del norte, 446 (66,8%) del centro y 78 (11,6%) del sur del país. De acuerdo al último censo nacional del año 2010, el número de muestras obtenidas en este estudio, es representativa de la población de cada región. Según los datos de este censo, la cantidad de habitantes totales era de 40.117.096 personas distribuidos de la siguiente manera: 21,4% en el norte, 73,3% en el centro y 5,3% en el sur del país [182]. (Figura 18)

Figura 18| Censo nacional del año 2010 comparado con la distribución por región de las muestras de infección 2015.

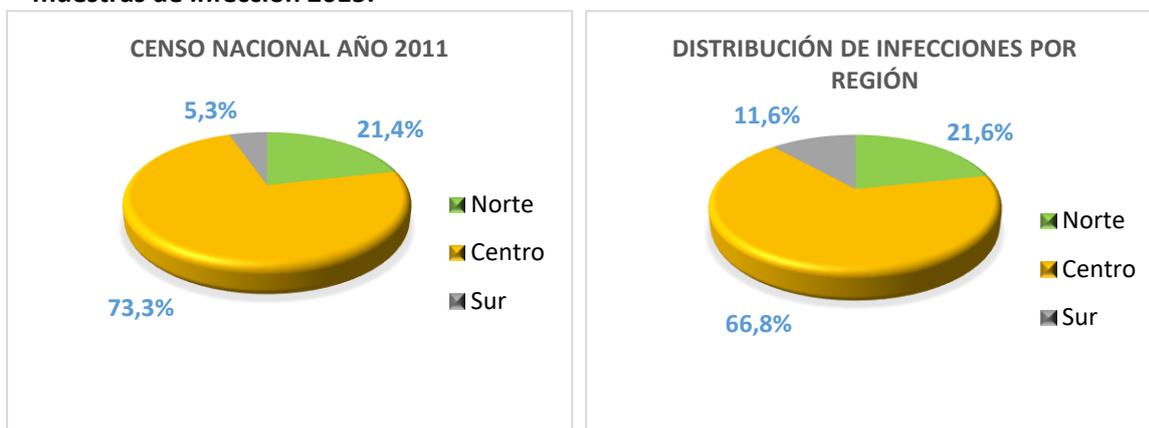


Fig.18. Detalle de la distribución de la población de acuerdo al último censo nacional de 2010 con resultados publicados en septiembre de 2011, comparada con la distribución de muestras correspondientes al proyecto nacional llevado a cabo por nuestro grupo de investigación en 2015. Las proporciones obtenidas de la distribución de las muestras del proyecto 2015 son comparables con la distribución de habitantes en las diferentes regiones del país.

Distribución de la población total en grupos etarios

La población analizada estuvo compuesta por 251 (37,6%) pacientes pediátricos (mayor proporción entre 1 y 18 años, 28,1%) y 417 (62,4%) pacientes adultos (mayor proporción entre 31 y 65 años, 34,0%), la distribución en grupos etarios se observa en la figura 19.

Figura 19 | Distribución de edades en la población total

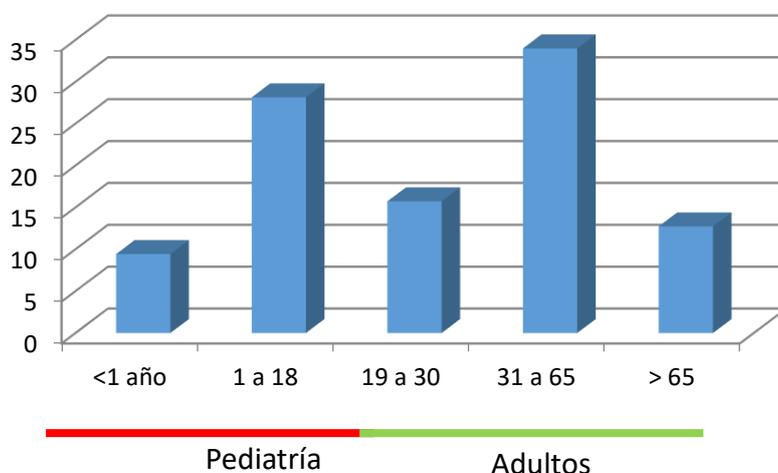


Fig.19. Distribución de las edades de los pacientes, se considera pediatría a los pacientes con < de 19 años.

IIb-2 Distribución de los genotipos CA-MRSA_G y HA-MRSA_G de acuerdo al grupo etario.

Al analizar por grupo etario (Figura 20 A y B), se encontró una proporción significativamente mayor de MRSA en pediatría (148/251, 59%) que en adultos (193/417, 46,2%) $p=0,0015$, OR: 1,67(1,22-2,29). Esta diferencia está relacionada con la mayor proporción de CA-MRSA_G en pediatría (55,8%) que en adultos (38,8%) ($p<0,0001$, OR: 1,99(1,45-2,73) mientras que los genotipos HA-MRSA_G causan significativamente menor proporción de infecciones en pediatría (3,2%) que en adultos (5,8%) $p=0,02$, OR 0,41(0,19-0,89).

Figura 20A | Distribución de MRSA (CA-MRSA_G y HA-MRSA_G) según grupo etario

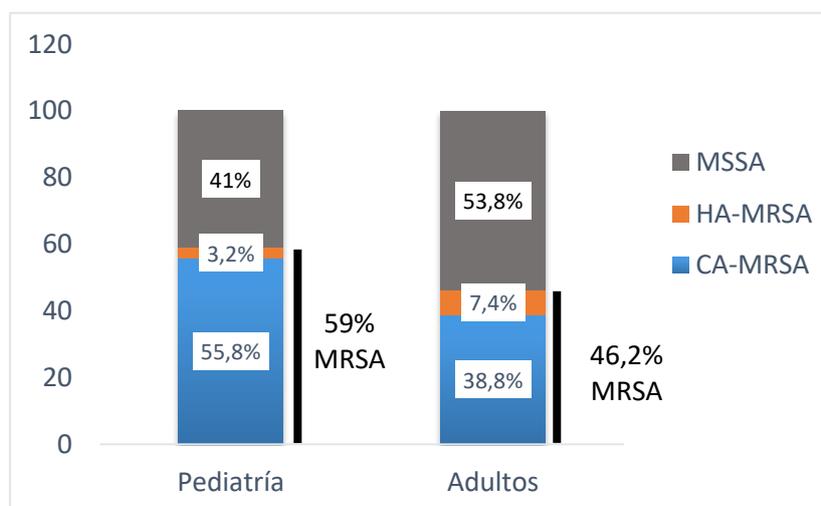


Fig.20 A. En la figura se observan las proporciones de MRSA tanto CA-MRSA_G como HA-MRSA_G así como MSSA según el grupo etario (adultos y pediatría).

Figura 20B | Distribución de MRSA (CA-MRSA_G y HA-MRSA_G) según grupo etario estratificado

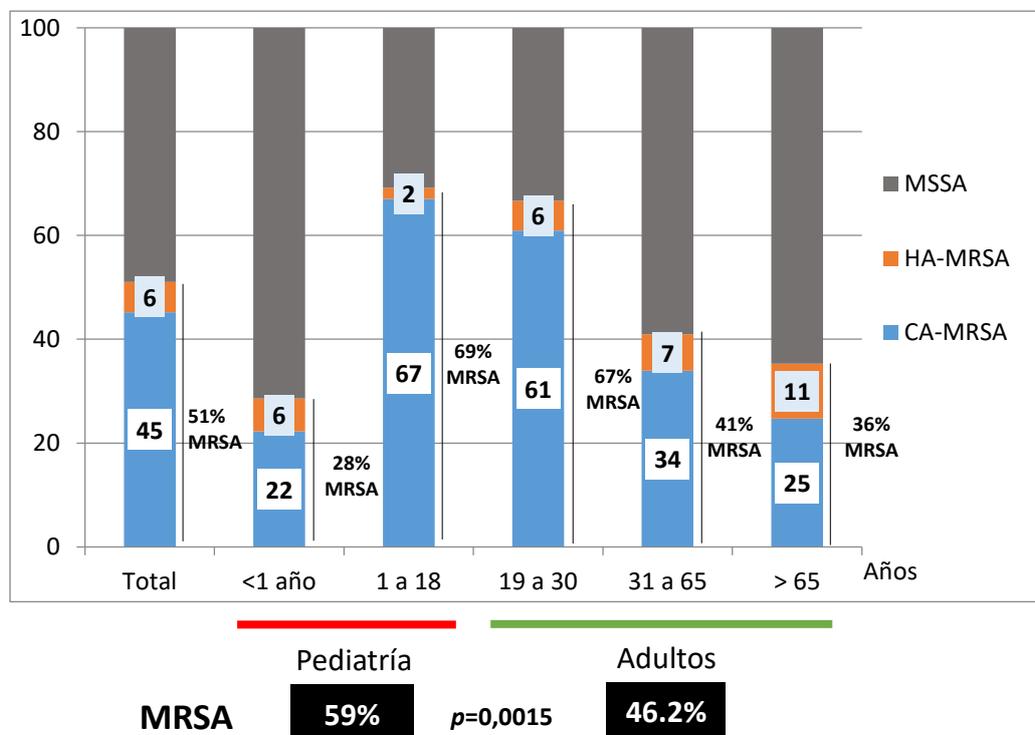


Fig.20B. Distribución de MRSA tanto CA-MRSA_G como HA-MRSA_G así como MSSA según edades de los pacientes, se considera pediatría a los pacientes < de 19 años.

//b-3 Distribución de los genotipos CA-MRSA_G y HA-MRSA_G de acuerdo a las regiones del país

Si bien la proporción global de MRSA, fue del 51%, se encontraron marcadas diferencias regionales, en el norte del país se obtuvo una prevalencia del 72,9% (n: 144), en el centro 48.4% (n: 446), y en el sur 25,6% (n: 78). Estos resultados denotan una proporción significativamente mayor en el norte que en el centro ($p<0,0001$) y en el centro que en el sur ($p=0,0002$). Esta diferencia regional de MRSA estuvo asociada a una mayor proporción de cepas CA-MRSA_G en el norte del país, 66% (n: 95/144) que en el centro, 43% (192/446) $p<0,0001$ y en el sur, de 19,2% (15/78) $p<0,0001$ (Figura 21).

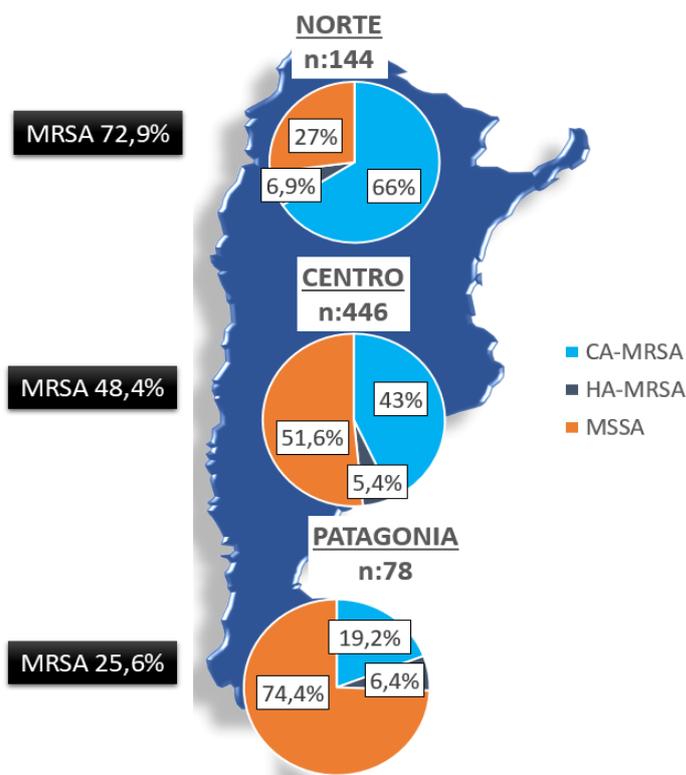
Figura 21 | Distribución de MRSA (CA-MRSA_G y HA-MRSA_G) por región

Fig.21. Distribución de MRSA (CA-MRSA y HA-MRSA) y MSSA en las diferentes regiones del país.

IIb-4 Características Moleculares y perfil de resistencia a los antibióticos de los clones de MRSA

En la Tabla 11 (página 87) se muestran las características moleculares de las cepas de MRSA: complejo clonal (CC) y el tipo secuencial (ST) definidos por MLST, el pulsotipo (PFGE) y subtipo, los tipos *spa* y *SCCmec*, la presencia de genes *pvl*, alotipo *agr*, perfil de genes de virulencia y patrón de resistencia a los antimicrobianos de todos los aislamientos CA-MRSA_G y HA-MRSA_G.

Como se detalla en la figura 22, del total de los aislamientos de MRSA (n: 341), el clon CA-MRSA N-ST30-*SCCmec*-IVc-t019 representó el 62,5% (212/341) de las infecciones por MRSA, seguido por el clon CA-MRSA I-ST5-*SCCmec*-IVa-t311 (13,7%, 47/341) y en tercer lugar el clon HA-MRSA A-ST5-*SCCmec*-I-t149 (7%, 24/341).

Al analizar por separado, el grupo de clones CA-MRSA, se identificó al clon N-ST30-*SCCmec*-IV-t019 como el más prevalente, causante del 70,5% (212/302) de las infecciones por genotipos CA-MRSA_G, seguido por el clon pulsotipo I-ST5-*SCCmec*-IV-t311 (15,6%, 47/302) y en tercer lugar el clon USA300-Variante Latino Americana ST8-*SCCmec*-IVc-t008 (6%, 18/302). Dentro de los clones menores se identificaron: DD-ST97-*SCCmec*-IV-t359 (4%, 12/302), R-ST72-

SCCmec-IVNV-t148 (3,3%, 10/302), Y-ST207-SCCmec-IV-t525 (0,7%, 2/302) y QQ-ST1649-SCCmec-IV-t701 (0,3%, 1/302). (Figura 23A)

De la misma manera, al analizar el grupo de los genotipos HA-MRSA_G, se identificó en primer lugar al clon Córdoba-Chileno, pulsotipo A-ST5-SCCmec-I-t149 (61,5%) y en segundo lugar, a la variante Argentina del clon pediátrico: pulsotipo C-ST100-SCCmec-IVNV-t002 (38,5%). (Figura 23B)

Al analizar los factores de virulencia entre los clones CA-MRSA, así como los HA-MRSA, se pudo observar, que al igual que en otros estudios [148-150], el perfil de los genes de virulencia (Tabla 11) estuvo fuertemente vinculado al background genético de cada cepa.

El perfil de resistencia de los clones de MRSA, que se muestran en la tabla 10, coincide con el descrito en el trabajo llevado a cabo previamente por nuestro grupo de investigación [150].

En el ámbito hospitalario, con este escenario detectado, mayores opciones de tratamiento antibiótico son posibles, en especial para infecciones invasivas. Esta consecuencia es el resultado de dos fenómenos, por un lado el desplazamiento de los clones HA-MRSA tradicionales que son los que mantienen la multiresistencia a otros antibióticos no β -Lactámicos, (como fue descrito previamente en resultados relacionados al objetivo Específico *Ila*) y por el otro, a la diseminación de los clones CA-MRSA que todavía no adquirieron la multiresistencia a los antibióticos.

Al analizar la sensibilidad de BPR en relación a los diferentes clones, se pudo observar que los únicos 8 aislamientos resistentes (CIM 4 μ g/ml) dentro del total, correspondían al clon Córdoba/chileno ST5-I (Figura 24).

Figura 22| Distribución de clones de MRSA (HA-MRSA_G y CA-MRSA_G), abril 2015.

Argentina

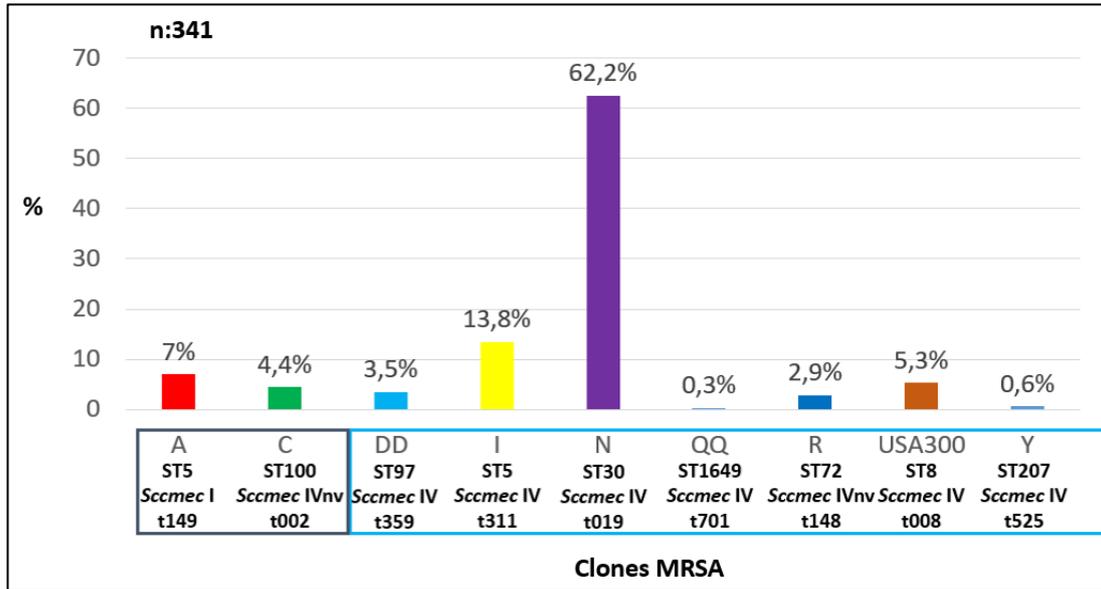


Fig.22. Se detalla los diferentes clones de MRSA, tanto HA-MRSA (recuadro azul oscuro) y CA-MRSA (recuadro turquesa) de acuerdo a las metodologías moleculares utilizadas. Las letras A, C, DD, I, N, QQ, R, USA300 e Y indican los diferentes pulsotipos obtenidos por PFGE. Los ST de acuerdo a la metodología de MLST, los diferentes SCCmec, obtenidos por la caracterización de cada cassette cromosomal y los diferentes t, obtenidos por la caracterización del gen de la proteína A (SpaA).

Figura 23| Distribución de los clones CA-MRSA y HA-MRSA

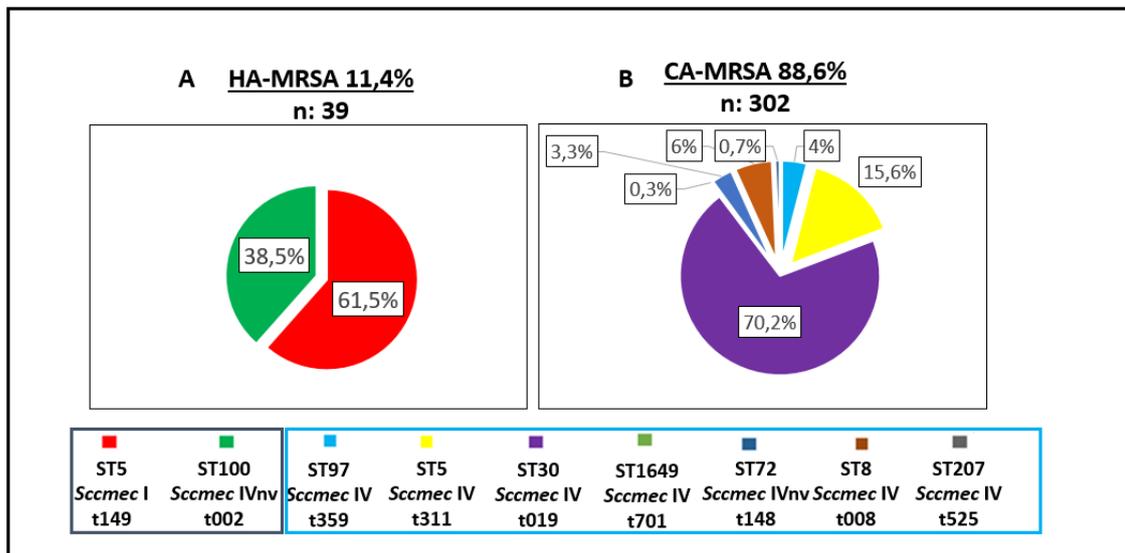


Fig.23. Se muestran los diferentes clones MRSA (n: 341) agrupados en HA-MRSA n:39 (recuadro azul oscuro) y CA-MRSA n:302 (recuadro turquesa)

RESULTADOS

Tabla 11 | CARACTERÍSTICAS DE AISLAMIENTOS DE MRSA QUE PERTENECEN A GENOTIPOS HA-MRSA_G Y CA-MRSA_G, ARGENTINA 2015

Background Genético	ST	PFGE tIpo/no. (%)	PFGE Subtipo/no. (%) ^a	RIDOM <i>spa</i> tipo/ no. (%) ^a	SCC <i>mec</i> n°. (%) ^a	<i>pvl</i> n°. (%) ^a	<i>agr</i> tipo	Perfil de genes de virulencia ^b n°. (%)	Resistencia a ATB no-β-Lactámicos n. (%) ^c
CA-MRSA n: 302									
CC30	30	N/ 212(70.2)	N4/101 (47.6), N6/23(10.8), N30/22(10.4) N13/20 (9.4), y 26 subtipos menores.	r019: 208 (98), t021: 1 (0.5), r3037: 1(0.5) r433: 1(0.5), r2529: 1(0.5)	IVc: 209 (98.5), IVh: 2(1), IVNT: 1(0.5)	203(96)	3	<i>egc-lukDE-bbp-cna</i>	GEN 24 (11.4), ERY 6 (3) ^d , CLi 3 (1.5) ^d , CLiC 3 (1.5), RIF 1 (0.5), Cip 7(3.3)
CC5	5	I/47(15.6)	I1/28 (59.6), I29/4 (8.5), I26/2 (4.3), I47/2 (4.3), I68/2 (4.3), y 9 subtipos menores.	r311: 29 (61.7), r002: 15 (31.9), r1265: 1(2.1), r1215: 1(2.1), r062: 1(2.1)	IVa: 43 (91.5), IVc: 3 (6.4), IVB: 1(2.1)	32 (68.1)	2	<i>sea-egc-lukDE</i> 26 (55), <i>egc-lukDE</i> 21 (45) <i>lukDE-sek-seq-bsa</i> : 5 (25), <i>lukDE-sea- bsa</i> : 3 (17), <i>lukDE- bsa</i> : 2 (17), <i>lukDE-sek-seq-seD</i> : 1 (8), <i>lukDE-seD-seK-seC-bsa</i> : 1(8), <i>lukDE-sea- bsa-seK-seQ</i> : 1(8), <i>lukDE-seC- bsa</i> : 1(8), <i>lukDE-seD-bsa</i> : 1(8)	GEN 5 (10.6), ERY 12 (25.5) ^d , CLi 8 (17) ^d , CLiC 3(6.4)
CC8	8	USA300/ 18(6)	USA300-5/4 (22), USA300-17/ 2(11), USA300-19/ 2(11) y 10 subtipos menores	r008: 14 (77), r024: 2(11), r723: 1(6), r068: 1(6)	IVc: 9 (50), IVb: 1(6) V#: 3(16.5) IVNT:3(16.5) IVa: 2(11)	9 (50)	1		GEN 5(28), ERY 4(22.2), CLi 2(11), CLiC 1(5.6), CIP 6(33.3)
CC97	97	DD/ 12(4)	DD1/5 (42), DD21/2 (17) y 4 subtipos menores	r267: 3(25), r359: 2(17), t1190: 2(17), r521: 1(8), r8870: 1(8), r1247: 1(8), r2445: 1(8), r2383: 1(8)	IVa: 10 (83), IVc: 2(17)	0(0)	1	<i>lukDE</i> 7(58), <i>sec-bsa-lukDE</i> 4(34), <i>seG-lukDE</i> 1(8)	GEN 3(25), ERY 1(8.3), CLi 1(8.3)
CC8	72	R/ 10(3.3)	R1/6 (60) y 4 subtipos menores	t148: 10 (100)	IVc: 9 (90), IVa: 1 (10)	0 (0)	1	<i>egc-lukDE</i> 9(90) <i>seO-seN-lukDE</i> 1 (10)	GEN 4(40), ERY 1(10), CLi 1 (10), CIP 2(20), RIF 2 (20) TMS 1(10)
CC509	207	Y/ 2(0.7)	Y1/ 1(50), Y4 1(50)	r525	IVa: 2(100)	0 (0)	3	<i>sei-seo-sem-etaa-etab</i> 1(50), <i>sei-seo-cna</i> 1(50)	
CC6	1649	QQ/ 1(0.3)	QQ2	t701	IVNT	0 (0)	1	<i>lukDE-sei-sea-bsa-cna</i>	TMS
HA-MRSA n: 39									
CC5	5	A/ 24(61.5)	A102/3 (12.5), A10/2 (8.3), A40/2 (8.3), y 15 subtipos menores	r149 22(92), r15913: 1(4), r17035: 1(4)	I: 24 (100)	0 (0)	2	<i>egc-lukDE</i>	GEN 21 (88), ERY 24 (100), CLiC 24 (100), CIP 23 (96), TMS 1(4) RIF 1(4)
CC5	100	C/ 15(38.5)	C30/6 (40), y 9 subtipos menores	r002: 9 (60), r045: 2(13) r1084, t1791, t548	NT 11 (73) IVNv: 4 (27)	0 (0)	2	<i>egc-lukDE</i>	GEN 14 (93), ERY 8 (53), CLiC 6 (40), CLi 2 (13), CIP 9 (60), RIF 13 (87) MIN 1

RESULTADOS

CC, Complejo Clonal; ST, Tipo Secuencial, PFGE tipo/subtipo, tipos y subtipos determinados por Pulsed Field Gel Electrophoresis; RIDOM spa tipo: tipo de proteína A staphylococcal (*spa*) asignado a través de la base de datos RIDOM spa server (<http://spaserver.ridom.de>); SCCmec: Tipo of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) NT: no fue posible determinar la clase de complejo de genes *mec* o el tipo de *ccr*; *pvl*, genes Pantón Valentine leukocidin (*lukS-PV-lukF-PV*); tipo *agr*, tipo de allotipo de los genes reguladores accesorios.

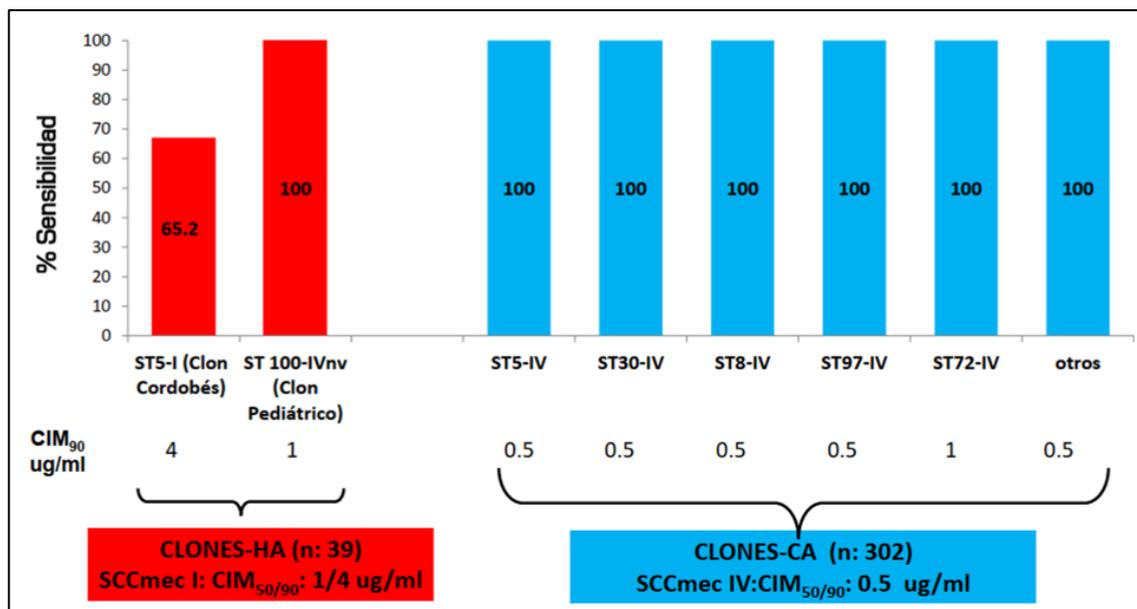
^a no. (%), Número y % de las cepas con esta característica molecular [subtipo PFGE (sólo los más frecuentes están indicados) o tipo *spa* o tipo de SCC*mec* o genes *pvl*], pertenecientes a cada background genético: genotipos CA-MRSAG (n: 302) o HA -MRSAG (n: 39).

^b Perfil de genes de virulencia: Se analizaron los siguientes genes. enterotoxinas: *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seh*, *sej*, *seo*, *seq* y *sek*; *egc* (*seg-sei-sem-sen-seo*), la toxina del síndrome de shock tóxico 1 (*TSST-1*): *tst*; toxinas exfoliativa: *eta* y *etb*; leukocidinas: *lukE-lukD* y la leukocidina de clase F: *lukM*; bacteriocine (*bsa*), adhesinas: para el colágeno (*cna*) y la proteína de unión ósea sialoproteína- (*bbp*), proteína de superficie *sasX* (*sasX*) y el gen *arcA* (indicador del elemento móvil catabólico de Arginina, ACME). Los genes detectados están indicados (número y % de los aislamientos positivos se expresa cuando no todos los aislamientos albergan este factor de virulencia).

^c Resistencia a los antimicrobianos que no son β -lactámicos (%), se indica de la siguiente manera: gentamicina (GEN), eritromicina (ERY), clindamicina (CLIC y CLII: resistencia constitutiva e inducible a los macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B, respectivamente), ciprofloxacina (CIP), rifampicina (RIF), trimetoprim/sulfametoxazol (TMS), minociclina (MIN) y cloranfenicol (CHL)

^d $p < 0.0001$ por la prueba de χ^2 para la comparación entre aislamientos de MRSA caracterizado como pulsotipo N y aquellos con pulsotipo I referido a la resistencia a la clindamicina y a eritromicina.

Figura 24 | Perfil de sensibilidad a Ceftobiprol de los diferentes clones (HA-MRSA y CA-MRSA)



IIb-5 Distribuciones de los clones de MRSA según grupo etario

Cuando se analizó la distribución de los clones de MRSA por grupo etario (pediatría y adultos), el clon CA-MRSA N-ST30-SCCmec-IV-t019 presentó la mayor proporción tanto en pediatría como en adultos con un 70,9% (105/148) y un 55,4% (107/193) respectivamente. De la misma manera, tanto en pediatría como en adultos, el clon CA-MRSA I-ST5-SCCmec-IV-t311, se identificó en segundo lugar con un 15,5% (23/148) y 12,4% (24/193) respectivamente, no obstante, en pediatría, el clon que ocupó el tercer lugar en proporción fue el USA300-VL ST8-SCCmec-IVc-t008 con un 4,1% (6/148), mientras que en adultos fue el clon HA-MRSA A-ST5-SCCmec-I-t149, 10,4% (20/193) (Figura 25).

Figura 25| Distribución de clones según grupo etario

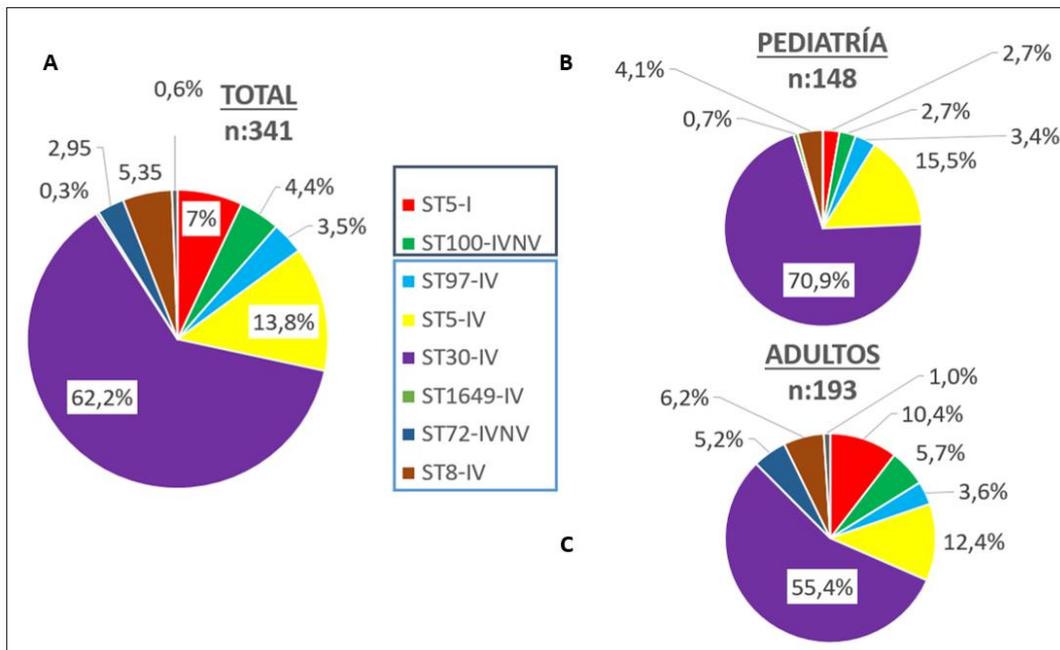


Fig.25. Distribución de clones MRSA agrupados en HA-MRSA (dentro de cuadro azul oscuro) y CA-MRSA (dentro de cuadro turquesa), Fig.25 A: en el total de MRSA. Fig.25 B: clones de MRSA en pediatría fig.25 C: Clones MRSA en Adultos.

IIb-6 Distribución de los clones de MRSA de acuerdo a las regiones del país

La distribución de clones por las diferentes regiones, presentó una notable prevalencia del clon CA-MRSA N-ST30-SCCmec-IV-t019 t en el norte, centro y sur del país, con proporciones de 61% (64/105), 64,8% (140/216) y 40% (8/20) respectivamente. Tanto en el norte como en el centro del país, el clon CA-MRSA I-ST5-SCCmec-IV-t311, representó el segundo lugar en prevalencia, con porcentajes de 13,3% (14/105) y 13,9% (30/216) respectivamente, mientras que en el sur, el clon HA-MRSA A-ST5-SCCmec-I-t149, presentó una proporción de 25% (5/20) ocupando el segundo lugar, seguido en tercer lugar por los clones CA-MRSA USA300-VL ST8-SCCmec-IVc-t008 y I-ST5-SCCmec-IV-t311 con una frecuencia del 15% (3/20) cada uno. En el centro, los clones HA-MRSA A-ST5-SCCmec-I-t149 y C-ST100-SCCmec-IVNV-t002 presentaron iguales proporciones (5,6%, 12/216) ocupando el tercer lugar en prevalencia, mientras que en el norte, la tercer mayor proporción la dio el clon USA300-VL ST8-SCCmec-IVc-t008 con un 7,6% (8/105). (Figura 26)

Figura 26 | Distribución de clones MRSA según región

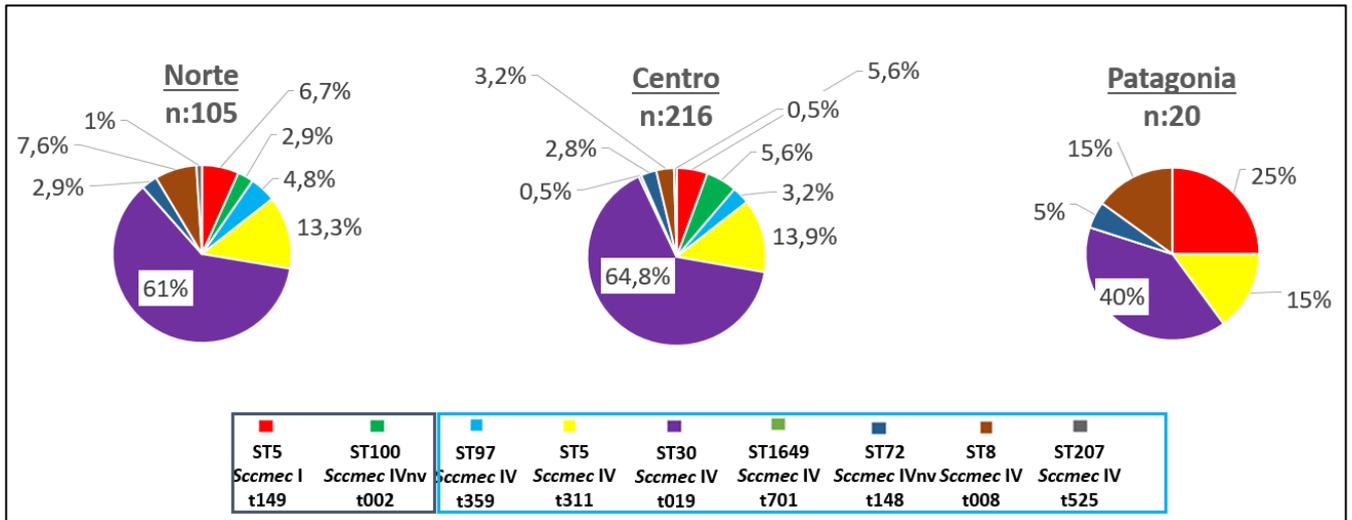


Fig.26. Distribución de clones MRSA agrupados en HA-MRSA (recuadro azul oscuro) y CA-MRSA (recuadro turquesa) de acuerdo a las diferentes regiones de Argentina (Norte, Centro y Patagonia)

8.2.3 RESULTADOS del objetivo específico //c

Analizar el PATRON CLINICO- EVOLUTIVO DOMINANTE actual en nuestro medio, de las infecciones causadas por MRSA en sus diferentes localizaciones y sitio de comienzo (comunidad u hospital) en pacientes pediátricos y adultos.

//c. 1 Tipos de Infecciones causadas por MRSA

Entre las infecciones por MRSA, 159 (47%) fueron invasivas, y 176 (52%) infecciones no complicadas de piel y partes blandas. Por otro lado, entre las infecciones causadas por MSSA, 204 (62,3%) fueron invasivas y 123 (37,7%) infecciones no complicadas de piel y partes blandas (Figura 27).

Al analizar dentro del grupo de MRSA (n: 341), la principal causa de infección fueron las infecciones de piel y partes blandas (IPPB, 60,7%), con una proporción significativamente mayor ($p<0,0001$) en CA-MRSA_G que en HA-MRSA_G (66,2% vs 17,9% respectivamente), relacionado a una proporción significativamente mayor ($p<0,0001$) de IPPB no complicadas (IPPB-NC) en CA-MRSA_G que en HA-MRSA_G (56,6% vs 12,8% respectivamente). Los clones HA-MRSA causaron proporciones significativamente mayores respecto a los CA-MRSA tanto de infecciones del tracto respiratorio bajo (IRB), $p=0,0243$ (20,5% vs 7,9% respectivamente), como de infecciones bacteriémicas $p=0,0062$ (17,9% vs 5% respectivamente) e infecciones asociadas a catéter $p=0,0007$ (15,4% vs 2,6% respectivamente). Consecuentemente, los clones HA-MRSA produjeron mayor proporción ($p<0,0001$) con respecto a los CA-MRSA_G (82,1% vs 42,1%,) de infecciones invasivas (Figura 27 y tabla 12)

Figura 27| Distribución de las infecciones en CA-MRSA_G, HA-MRSA_G Y MSSA

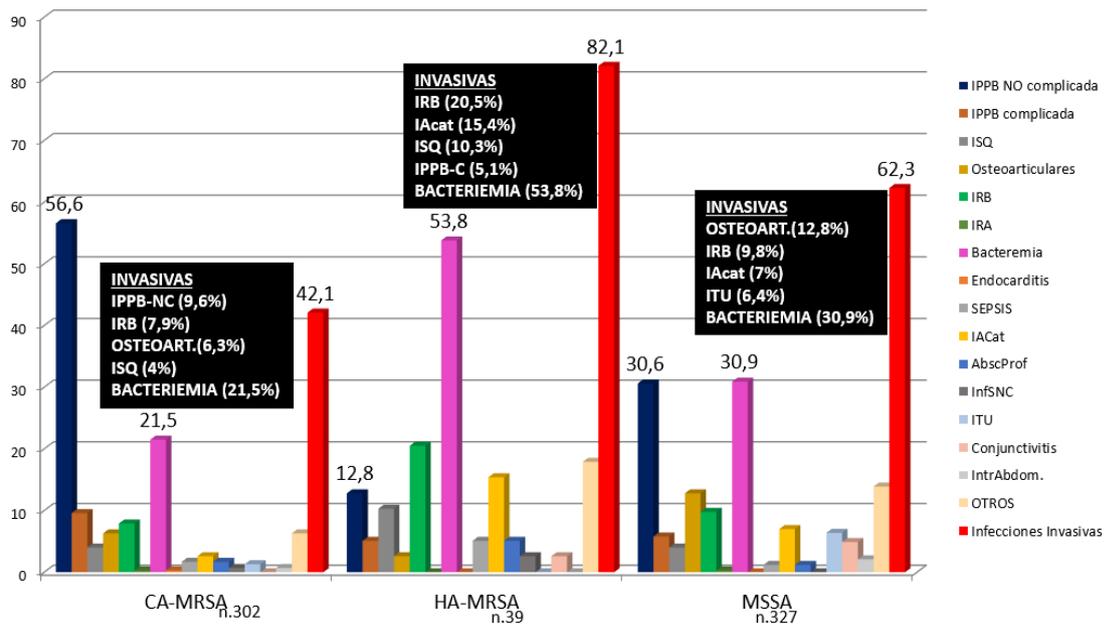


Fig 27. En la figura se detallan las infecciones causadas por CA-MRSA (recuadro turquesa), HA-MRSA (recuadro azul oscuro) y MSSA (recuadro gris). **IPPB-NC**, Infecciones de piel y partes blandas no complicadas (Círculo y recuadro celeste), **IPPB complicada**, infecciones de piel y partes blandas complicadas, **ISQ**, infecciones de sitio quirúrgico, **IRB**, infecciones respiratorias bajas (Pulmonar), **IRA**, infecciones respiratorias altas, **Bacteriemia**, infección de la sangre (círculo y recuadro violeta), **Endocarditis**, enfermedad cardíaca, **Sepsis**, síndrome de respuesta inflamatorio sistémico, **IACat**, infección asociada a catéter, **AbscProf**, absceso profundo, **infSNC**, infección del sistema nervioso central, **ITU**, infección del tracto urinario, **conjuntivitis**, infección de la conjuntiva ocular, **intrAbdom**, infección intra-abdominal, **otros**, infecciones varias no definidas como las anteriores, **Infecciones invasivas** (círculo y recuadro rojo), se definieron por una o más de las siguientes afecciones: bacteriemia, endocarditis, neumonía, absceso pleural, linfadenitis, artritis séptica, osteomielitis, fascitis necrotizante, piomiositis u otra enfermedad en la que se aisló *S. aureus* de fluidos corporales normalmente estériles.

Tabla 12| Características clínicas de 341 pacientes infectados con CA-MRSA_G vs HA-MRSA_G, Argentina, 2015.

Infecciones totales por MRSA				
	Pacientes totales n: 341	CA-MRSA _G n: 302	HA-MRSA _G n: 39	<i>p</i> -value
Tipo de Infecciones				
Piel y Tejidos Blandos (IPPB) ^a	207 (60.7)	200 (66.2)	7 (17.9)	<0.0001
IPPB no complicadas	176 (51.6)	171 (56.6)	5 (12.8)	<0.0001
IPPB complicadas	31 (9.1)	29 (9.6)	2 (5.1)	0.5325
Infecciones sitio de herida Quirúrgica (ISQ)	16 (4.7)	12 (4)	4 (10.3)	0.1787
Infecciones osteo-articulares	20 (5.9)	19 (6.3)	1 (2.6)	0.5735
Infecciones del Tracto Respiratorio Bajo (IRB)	32 (9.4)	24 (7.9)	8 (20.5)	0.0243
Infecciones del Tracto Respiratorio Alto	1 (0.3)	1 (0.3)	0(0)	NA
Bacteriemia ^b	22 (6.5)	15 (5)	7 (17.9)	0.0062
Endocarditis	1 (0.3)	1 (0.3)	0 (0)	NA
Infección asociada a catéter	14 (4.1)	8 (2.6)	6 (15.4)	0.0007
Absceso Profundo	7 (2.1)	5 (1.7)	2 (5.1)	0.4224
Infección del Sistema Nervioso Central	3 (0.9)	2 (0.7)	1 (2.6)	0.7803
Infección del Tracto Urinario	4 (1.2)	4 (1.3)	0 (0)	NA
Conjuntivitis	1 (0.3)	0 (0)	1 (2.6)	NA
Infección Intra-abdominal	2 (0.6)	2 (0.7)	0 (0)	NA
Infecciones genitales	1 (0.3)	1 (0.3)	0 (0)	NA
Sepsis	7 (2.1)	5 (1.7)	2 (5.1)	0.4224
Infección en trasplantados	1 (0.3)	1 (0.3)	0 (0)	NA
Otras	2 (0.6)	2 (0.7)	0 (0)	NA
Infecciones Invasivas ^c	159 (46.6)	127 (42.1)	32 (82.1)	<0.0001

CA-MRSA_G y HA-MRSA_G: Genotipos de *S. aureus* resistentes a la meticilina asociados a la comunidad (CA) y asociados al cuidado de la salud (HA). Valores de *p* para las comparaciones de CA-MRSA_G vs HA-MRSA_G ≤ 0,05 se muestran en letra negra.

^a IPPB: infecciones de piel y partes blandos: los casos de infección primaria de la piel fueron clasificados como sin complicaciones, mientras que las IPPB complicadas incluyeron casos con bacteriemia secundaria o su propagación a los tejidos contiguos.

^b Bacteriemias incluyen las clasificadas como primarias, secundarias o las no especificadas

^c las infecciones invasivas se definieron por una o más de las siguientes afecciones: bacteriemia, endocarditis, neumonía, absceso pleural, linfadenitis, artritis séptica, osteomielitis, fascitis necrotizante, piomiositis u otra enfermedad en la que se aisló *S. aureus* de fluidos corporales normalmente estériles.

Fig. 28 Distribución de los genotipos CA-MRSA_G y HA-MRSA_G según el lugar de inicio de las infecciones: comunidad (CO) u Hospital (HO)

Como se mencionó anteriormente, la mayoría (471/668, 70,5%) de las infecciones fueron de inicio en la comunidad (CO), tanto en pediatría como en adultos y tanto las producidas por MRSA que por MSSA.

Al analizar las proporciones de MRSA en el hospital (51,8%) y la comunidad (50,8%), no se detectaron diferencias significativas ($p=0,86$). Cuando se indagó qué genotipos fueron causantes de las infecciones de inicio en el hospital y en la comunidad, coincidente con su origen, se siguió evidenciando una proporción significativamente mayor de CA-MRSA_G en la comunidad (48,0%) que en el hospital (38,6%), $p = 0,0323$ y una proporción significativamente mayor de HA-MRSA_G en el hospital (13,2%) que en la comunidad (2,8%) $p < 0,0001$. Asimismo, de manera notable, se pudo identificar una significativa mayor proporción de genotipos CA-MRSA_G que HA-MRSA_G tanto en las infecciones CO (48,0% vs. 2,8%, $p < 0,0001$) como en las HO (38,6% vs. 13,2%, $p=0,0009$). Por lo tanto se confirma que los genotipos CA-MRSA_G fueron los principales causantes de infecciones por MRSA, tanto en el hospital como en la comunidad, lo que implica el desplazamiento de los clones HA-MRSA del ambiente hospitalario debido a la diseminación de los clones CA-MRSA (Figura 28).

Figura 28| Distribución de infecciones según sitio de inicio CO/HO

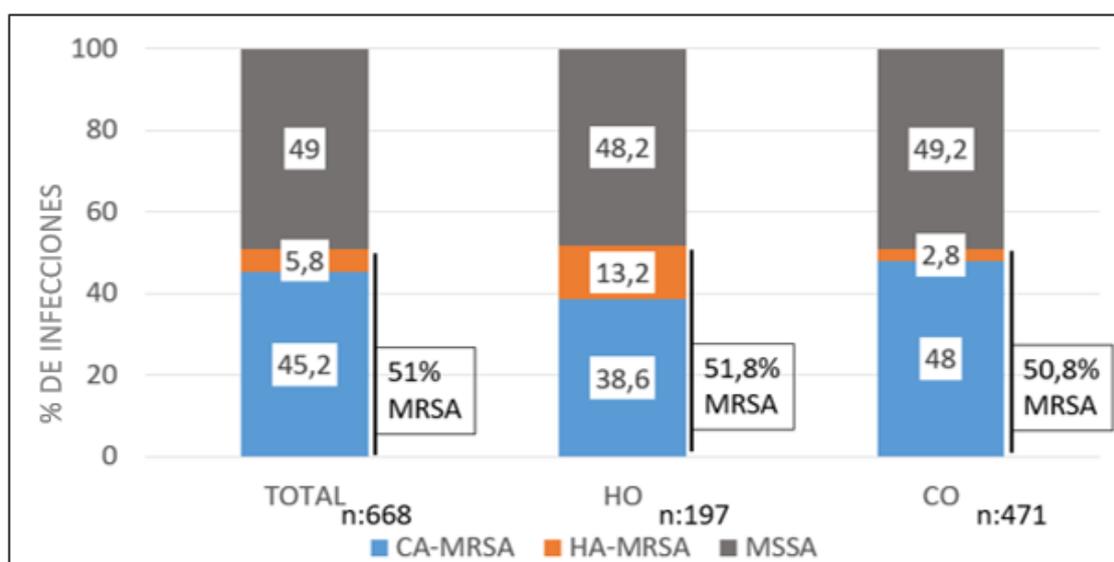


Fig. 28. Distribución de MRSA (CA-MRSA y HA-MRSA) así como MSSA según el sitio de inicio de la infección, ya sea de inicio en el hospital (HO) o de inicio en la comunidad (CO). Las líneas negras verticales indican el % de MRSA total para cada barra (Total, HO y CO).

Ilc-3 Distribución de los clones de MRSA según el lugar de inicio de las infecciones: comunidad (CO) u Hospital (HO)

Al analizar los 341 aislamientos de MRSA, 239 (70,1%) fueron CO, donde el 72% (172/239) estuvieron dados por el clon CA-MRSA N-ST30-SCCmec-IV-t019, en segundo lugar por I-ST5-SCCmec-IV-t311 (12,6%, 30/239) y USA300-VL ST8-SCCmec-IVc-t008 (4,6%, 11/239). Dentro de las infecciones por MRSA de inicio en el hospital (29,9%, 102/341), el 39,2% (40/102) fueron causadas por el clon CA-MRSA N-ST30-SCCmec-IV-t019, seguido por el clon HA-MRSA A-ST5-SCCmec-I-t149 con un 17,6% (18/105) y el clon CA-MRSA I-ST5-SCCmec-IV-t311 (16,7%, 17/102) (Figura 29). Estos resultados implican la entrada del clon CA-MRSA ST30-IV al ámbito hospitalario, desplazando al clon HA-MRSA Cordobés-Chileno ST5-I y también al CA-MRSA ST5-IV.

Figura 29| Distribución de clones según sitio de inicio de las infecciones CO/HO

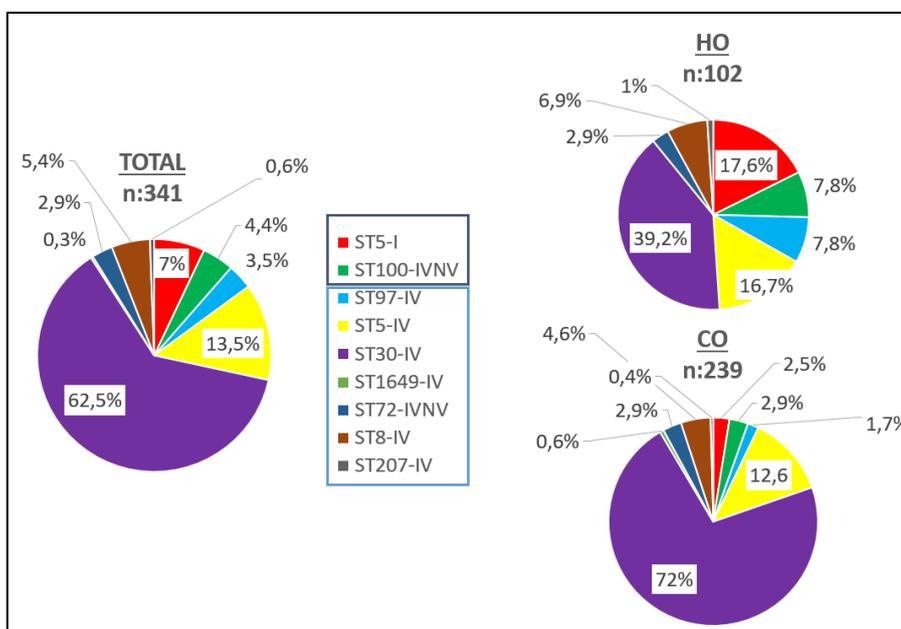


Fig.29. Distribución de clones MRSA agrupados en HA-MRSA (dentro de cuadro azul oscuro) y CA-MRSA (dentro de cuadro turquesa), de acuerdo al sitio de inicio de las infecciones en el total, HO y CO.

Ilc-4 Distribución de los clones de MRSA según el lugar de inicio de las infecciones: comunidad (CO) u Hospital (HO) y grupo etario

En la figura 30 se puede observar que al analizar la distribución de los clones según el grupo etario y la categoría epidemiológica de las infecciones (CO, HO), se determinó que entre la infecciones en general, el clon N-ST30-SCCmec-IV-t019 está desplazando al clon ST5-SCCmec IV-t311 (62,2% vs 13,8% respectivamente, $p<0,0001$) tanto entre las infecciones en la comunidad (72,0% vs 12,6% respectivamente, $p<0,0001$), como en las del ámbito hospitalario (39,2% vs 16,7% respectivamente, $p=0,0006$), particularmente en pediatría. En el ámbito hospitalario, se detecta claramente el desplazamiento del clon tradicional HA-MRSA A-ST5-SCCmec-I-t149 por ambos clones CA-MRSA, siempre con predominio del clon N-ST30-SCCmec-IV-t019 y particularmente en pediatría. Por lo tanto, se evidencia el desplazamiento del ST5-IV por el ST30-IV en el hospital y en pediatría. Por otro lado, el clon HA-MRSA A-ST5-SCCmec-I-t149, presentó una proporción significativamente mayor en adultos que en pediatría (10,4% vs. 2,7% respectivamente, $p=0,0111$), principalmente en el ámbito hospitalario (24,1% vs. 9,1% respectivamente, $p=0,0005$). En la tabla 13 se presenta en detalle todas las comparaciones.

Figura 30| Distribución de clones de MRSA según categoría epidemiológica de las infecciones y grupo etario

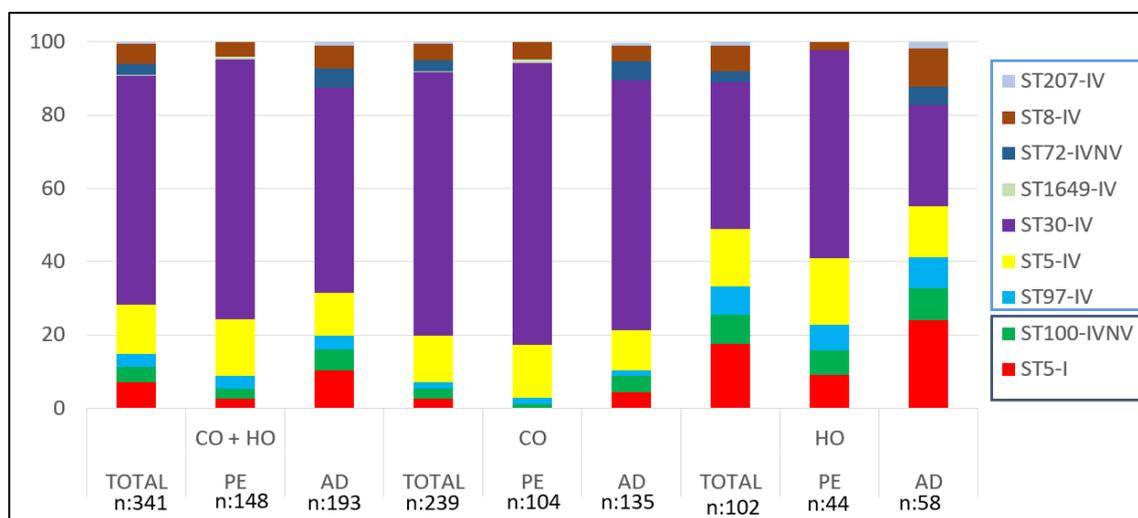


Fig.30. Distribución de clones MRSA agrupados en HA-MRSA (dentro de cuadro azul oscuro) y CA-MRSA (dentro del cuadro turquesa) en el total de MRSA, pediatría (PE) y adultos (AD) tanto en infecciones de inicio en la comunidad (CO), de inicio en el hospital (HO) y en el total de los casos (HO + CO).

Tabla 13 | Comparaciones de los clones CA-MRSA más prevalentes (ST30-IV y ST5-IV) y el clon HA-MRSA ST5-I por grupo etario y categoría epidemiológica de las infecciones (CO/HO)

	Total MRSA n: 341 % y p	Comunidad MRSA n: 239 % y p	Hospital MRSA n: 102 % y p
ST30-IV: Pediatria (n: 148) vs. Adultos (n: 193)	70,9% vs. 55,4% p=0.0049	76,9% vs. 68,1% p=0,0948	56,8% vs. 25,9% p<0.0001
ST5-IV: Pediatria (n: 148) vs. Adultos (n: 193)	15,5% vs. 12,4% p=0,5058	14,4% vs. 11,1% p=0,4549	18,2% vs. 15,5% p=0,6056
ST5-I: Pediatria (n: 148) vs. Adultos (n: 193)	2,7% vs. 10,4% p=0,0111	0% vs 4,4% NA	9,1% vs. 24,1% p=0,0005
Población total:	n: 341	n: 239	n: 102
ST30-IV, vs. ST5-IV	62,2% vs 13,8% p<0.0001	72,0% vs 12,6% p<0.0001	39,2% vs 16,7% p=0.0006
ST30-IV, vs. ST5-I	62,2% vs 7% p<0.0001	72,0% vs 2,5% p<0.0001	39,2% vs 17,6% p=0.0011
ST5-I, vs. ST5-IV	7% vs 13,8% p=0,0054	2,5% vs 12,6% p=0.0001	17,6% vs 16,7% p=0,9878
Pediatria:	n: 148	n: 104	n: 44
ST30-IV, vs. ST5-IV	70,9% vs 15,5% p<0.0001	76,9% vs 14,4% p<0.0001	56,8% vs 18,2% p=0,0004
ST30-IV, vs. ST5-I	70,9% vs 2,7% p<0.0001	76,9% vs 0% NA	56,8% vs 9,1% p<0,0001
ST5-I, vs. ST5-IV	2,7% vs 15,5% p=0.0003	0% vs 14,4% NA	9,1% vs 18,2% p=0,3510
Adultos:	n: 193	n: 135	n: 58
ST30-IV, vs. ST5-IV	55,4% vs 12,4% p<0.0001	68,1% vs 11,1% p<0.0001	25,9% vs 15,5% p=0.2488
ST30-IV, vs. ST5-I	55,4% vs 10,4% p<0.0001	68,1% vs 4,4% p<0.0001	25,9% vs 24,1% p=0,9925
ST5-I, vs. ST5-IV	10,4% vs 12,4% p=0,6469	4,4% vs 11,1% p=0.0671	24,1% vs 15,5% p=0,3528

Tabla 13. Se muestran todas las comparaciones hechas entre los clones CA-MRSA ST30-IV y ST5-IV y el clon HA-MRSA ST5-I por grupo de edad (pediatria y adultos) así como según categoría epidemiológica de las infecciones, ya sea comunidad (CO) u hospital (HO).

- Nivel de significancia $p < 0.05$ se denota en letra negrita.

-NA, No aplica (presenta proporciones = 0)

8.2.4 RESULTADOS relacionados al objetivo IId

Determinar la evolución de la epidemiología clínica y molecular de las infecciones por MRSA en el país, tanto a nivel hospitalario como de la comunidad, comparativamente con el estudio previo (2009).

IId-1 Comparaciones de las proporciones de MRSA, CA-MRSA_G, HA-MRSA_G y principales clones de MRSA entre 2009 y 2015, considerando el total de infecciones por *S. aureus*, regiones geográficas, grupos etarios y lugar de inicio de dichas infecciones.

Se llevó a cabo un análisis comparativo entre los resultados obtenidos en el proyecto de 2009 [150], con los obtenidos en 2015, con el fin de evaluar la evolución de la epidemiología molecular de las infecciones por *S. aureus* en el tiempo. En la tabla 14 se comparan las proporciones de MRSA y genotipos CA-MRSA_G y HA-MRSA_G, en el total de infecciones por *S. aureus*, además de las proporciones de clones principales que abarcan estos genotipos en el total de MRSA, de acuerdo a las regiones geográficas, grupos etarios y lugar de inicio de las infecciones, entre el estudio llevado a cabo en el año 2009 vs. el llevado a cabo en el año 2015. Además, se compararon las proporciones de infecciones invasivas (Iinv) causadas por MRSA, o por genotipos CA-MRSA_G y por HA-MRSA_G, entre ambos estudios, para evaluar posibles cambios evolutivos en los cuadros clínicos posiblemente relacionados a los cambios clonales.

La Figura 31 esquematiza las proporciones de MRSA, CA-MRSA y HA-MRSA en las diferentes regiones del país tanto en el proyecto del 2009 como en el del 2015.

Tabla 14 | Análisis comparativo de las infecciones obtenidas en el proyecto de 2009 vs 2015, Argentina

	2009	2015	2009 vs 2015, <i>p</i> -valor
INFECCIONES TOTALES	n: 591, n _{MRSA} : 322 % (n)	n: 668, n _{MRSA} : 341 % (n)	
MRSA	55 322	51 341	<i>p</i> = 0,2361
CA-MRSA _G	38,7 229	45,2 302	<i>p</i> = 0,0304
HA-MRSA _G	15,7 93	5,8 39	<i>p</i> < 0,0001
ST30-IV-total	33 104/322	62,2 212/341	<i>p</i> < 0,0001
ST5-IV-total	31 102/322	13,7 47/341	<i>p</i> < 0,0001
ST5-I-total	18 61/322	7 24/341	<i>p</i> < 0,0001
Infecciones Invasivas (Iinv) MRSA	47,5 153/322	46,6 159/341	<i>p</i> =0,87
Iinv CA-MRSA	34,1 78/229	42,1 127/302	<i>p</i> =0,074
Iinv HA-MRSA	80,6 75/93	82,1 32/39	<i>p</i> =0,96
REGION			
NORTE	n: 86, n _{MRSA} : 70 % (n)	n: 144, n _{MRSA} : 105 % (n)	

RESULTADOS

MRSA-norte	81,0 70	72,9 105	$p = 0,21$
CA-MRSA _G -norte	72,1 62	66,0 144	$p = 0,42$
HA-MRSA _G -norte	9,0 8	6,9 144	$p = 0,744$
ST30-IV-norte	67,0 47/70	61,0 64/105	$p=0,51$
ST5-IV-norte	20,0 14/70	13,0 14/105	$p=0,30$
ST5-I-norte	10,0 7/70	6,7 7/105	$p=0,61$
CENTRO	n: 433, n_{MRSA}: 231 % (n)	n: 446, n_{MRSA}: 216 % (n)	
MRSA-centro	53,0 231	48,4 216	$p = 0,19$
CA-MRSA _G -centro	36,0 156	43,0 192	$p = 0,04$
HA-MRSA _G -centro	17,0 75	5,4 24	$p < 0,0001$
ST30-IV-centro	23,0 54/231	65,3 140/216	$p < 0,0001$
ST5-IV-centro	36,0 82/231	13,4 30/216	$p < 0,0001$
ST5-I-centro	20,0 47/231	5,6 12/216	$p < 0,0001$
SUR	n: 72, n_{MRSA}: 21 % (n)	n: 78, n_{MRSA}: 20 % (n)	
MRSA _G -sur	29,0 21	25,6 20	$p = 0,78$
CA-MRSA _G -sur	15,0 11	19,2 15	$p = 0,67$
HA-MRSA _G -sur	14,0 10	6,4 5	$p = 0,20$
ST30-IV-sur	10,0 2/21	40,0 8/20	$p=0,06$
ST5-IV-sur	38,0 8/21	15,0 3/20	$p=0,19$
ST5-I-sur	33,0 7/21	25,0 5/20	$p=0,82$
GRUPO ETARIO			
PEDIATRÍA	n: 225, n_{MRSA}: 127 % (n)	n: 251, n_{MRSA}: 148 % (n)	
MRSA-Ped	56,0 127	59,0 148	$p=0,56$
CA-MRSA-Ped	51,1 115	55,8 140	$p=0,33$
HA-MRSA-Ped	5,3 12	3,2 8	$p=0,44$
ST30-IV-Ped	31,0 40/127	70,9 105/148	$p < 0,0001$
ST5-IV-Ped	50,0 63/127	15,5 23/148	$p < 0,0001$
ST5-I-Ped	2,0 3/127	2,7 4/148	$p=0,96$
ADULTO	n: 366, n_{MRSA}: 195 % (n)	n: 417, n_{MRSA}: 193 % (n)	
MRSA-Ad	53,3 195	46,3 193	$p=0,07$
CA-MRSA-Ad	31,1 114	38,8 162	$p=0,02$
HA-MRSA-Ad	22,1 81	7,4 31	$p < 0,0001$
ST30-IV-Ad	32,8 64/195	55,4 107/193	$p < 0,0001$
ST5-IV-Ad	20,0 39/195	12,4 24/193	$p = 0,058$
ST5-I-Ad	29,7 58/195	10,4 20/193	$p < 0,0001$
origen de la infección			
COMUNIDAD	n: 375, n_{MRSA}: 216 % (n)	n: 471, n_{MRSA}: 239 % (n)	
MRSA-CO	57,6 216	50,7 239	$p=0,041$
CA-MRSA _G -CO	52,0 195	48,0 226	$p=0,27$
HA-MRSA _G -CO	5,6 21/375	2,8 13/471	$p=0,03$

RESULTADOS

ST30-IV-CO	46,3 100/216	72,0 172/239	p < 0,0001
ST5-IV-CO	37,5 81/216	12,6 30/239	p < 0,0001
ST5-I-CO	4,6 10/216	2,5 6/239	p=0,24
comunidad y grupos etarios			
CO-PEDIATRÍA	n: 160, n _{MRSA} : 99 % (n)	n: 170, n _{MRSA} : 104 % (n)	
MRSA-CO-Ped	62 99/160	61,2 104	p=0,97
CA-MRSA _G -CO-Ped	60,0 94	60,6 103	p=0,79
HA-MRSA _G -CO-Ped	3,1 5	0,6 1	p=0,21
ST30-IV-CO-Ped	40,4 40/99	76,9 80/104	p < 0,0001
ST5-IV-CO-Ped	50,5 50/99	14,4 15/104	p < 0,0001
ST5-I-CO-Ped	0	0	NA
CO-ADULTOS	n: 215, n _{MRSA} : 117 % (n)	n: 301, n _{MRSA} : 135 % (n)	
MRSA-CO-Ad	54,4 117	44,9 135	p=0,05
CA-MRSA _G -CO-Ad	46,9 101	40,9 123	p=0,19
HA-MRSA _G -CO-Ad	7,4 16	4,0 12	p=0,19
ST30-IV-CO-Ad	51,3 60/117	68,1 92/135	p=0,0088
ST5-IV-CO-Ad	26,5 31/117	11,1 15/135	p=0,0021
ST5-I-CO-Ad	8,5 10/117	4,4 6/135	p=0,22
HOSPITAL	n: 216, n _{MRSA} : 106 % (n)	n: 197, n _{MRSA} : 102 % (n)	
MRSA-HO	49,1 106	51,8 102	p=0,63
CA-MRSA _G -HO	15,7 34	38,6 76	p < 0,0001
HA-MRSA _G -HO	33,3 72	13,2 26	p < 0,0001
ST30-IV-HO	3,8 4/106	39,2 40/102	p < 0,0001
ST5-IV-HO	19,8 21/106	16,7 17/102	p=0,66
ST5-I-HO	48,1 51/106	17,6 18/102	p < 0,0001
HOSPITAL Y GRUPO ETARIO			
HO-PEDIATRÍA	n: 65, n _{MRSA} : 28 % (n)	n: 81, n _{MRSA} : 44 % (n)	
MRSA-HO-Ped	43,1 28	54,9 44	p=0,20
CA-MRSA _G -HO-Ped	32,3 21	45,7 37	p=0,13
HA-MRSA _G -HO-Ped	10,8 7	8,6 7	p=0,84
ST30-IV-HO-Ped	0	56,8 25/44	NA
ST5-IV-HO-Ped	46,4 13/28	18,2 8/44	p=0,023
ST5-I-HO-Ped	10,7 3/28	9,1 4/44	p=0,88
HO-ADULTOS	n: 151, n _{MRSA} : 78 % (n)	n: 100, n _{MRSA} : 58 % (n)	
MRSA-HO-Ad	51,7 78	50,0 50	p=0,86
CA-MRSA _G -HO-Ad	8,6 13	33,6 39	p < 0,0001
HA-MRSA _G -HO-Ad	43,0 65	16,4 19	p < 0,0001
ST30-IV-HO-Ad	5,1 4/78	25,9 15/58	p=0,0012
ST5-IV-HO-Ad	10,3 8/78	15,5 9/58	p=0,48
ST5-I-HO-Ad	61,5 48/78	24,1 14/58	p < 0,0001

Las proporciones de MRSA totales se mantuvieron sin diferencias significativas, entre los años 2009 y los del 2015. Se detectó una leve tendencia a disminuir a nivel nacional, que no alcanzó a ser significativa, desde 55% a 51%, así como también en las diferentes regiones del país, en el norte (MRSAN) de 81% a 72,3%, en el centro (MRSAC) de 53% a 48,3% y en la Patagonia (MRSAS) de 29% a 25,6%, respectivamente. Contrariamente, la proporción de CA-MRSA_G total, aumentó significativamente del 39% en el año 2009 a 45,2% en el 2015 desplazando a los clones HA-MRSA, cuya frecuencia como causa de infecciones por *S. aureus* disminuyó significativamente de un 16% en 2009 a un 5,8% en el 2015, $p < 0,0001$.

El incremento de la proporción de infecciones causadas por CA-MRSA_G, estuvo relacionado directamente a la diseminación del clon ST30-IV (33% en 2009 a un 62% en el 2015, $p < 0,0001$), desplazando al clon CA-MRSA ST5-IV (31% al 13,7%, $p < 0,0001$) y al clon HA-MRSA ST5-I (18% al 7%, $p < 0,0001$). A pesar de estos cambios clonales, la proporción de infecciones invasivas causadas por ambos genotipos, tanto CA-MRSA_G como HA-MRSA_G en ambos estudios fueron comparables.

Estos cambios se evidenciaron significativamente en el centro del país (CA-MRSA_G: 36% en el 2009 al 43% en el 2015, $p=0,04$), y en la población adulta. En pediatría, si bien la proporción de CA-MRSA se mantuvo más alta que en la población adulta (55,8% vs 38,8%, $p < 0,0001$), no se evidencian cambios significativos entre 2009 y 2015 (51% vs 55,8%, $p= 0,33$). Este fenómeno está relacionado a que el incremento significativo de la proporción del clon ST30-IV en pediatría (31% en el 2009 a un 70,9% en el 2015, $p < 0,0001$) se compensa con la significativa disminución del clon CA-MRSA ST5-IV (50% en el 2009 a un 15,5% en el 2015, $p < 0,0001$), en especial en las infecciones detectadas en la comunidad (Figura 32).

En cambio en el ámbito hospitalario (Figura 32), se evidencia un incremento significativo de las infecciones por CA-MRSA_G (16% en el 2009 al 38,6% en el 2015, $p<0,001$), relacionado a la diseminación e incremento de las infecciones causadas por el clon ST30-IV (4% en el 2009 al 39,2% en el 2015, $p<0,001$), tanto en pediatría (0% en el 2009 al 56,8% en el 2015, $p<0,001$) como en adultos (5% en el 2009 al 25,9% en el 2015, $p<0,001$). Además, en este ámbito se evidencia el desplazamiento del clon HA-MRSA ST5-I, al disminuir su frecuencia de 47% en el 2009 al 17,6% en el 2015, $p<0,001$. Esta disminución se evidencia significativamente en la población adulta (61% en el 2009 al 24,1% en el 2015, $p<0,0001$). En cambio en pediatría, a nivel hospitalario se detecta una disminución significativa de la frecuencia de infecciones causadas por el clon ST5-IV (46% en el 2009 al 18,2% en el 2015, $p=0,023$).

Figura 31 | Comparación de proporciones de MRSA 2009 vs 2015

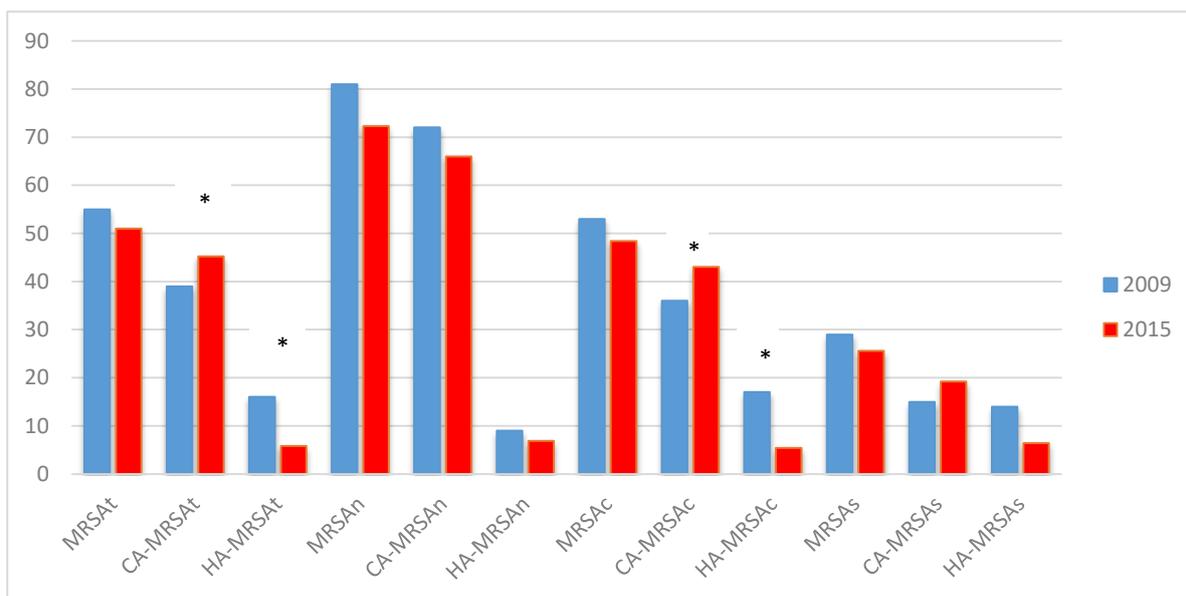


Fig.31. Comparación de proporciones en 2009 vs 2015 de MRSA, CA-MRSA y HA-MRSA tanto en el total (MRSAt, CA-MRSAt y HA-MRSAt), así como en la región del norte (MRSAn, CA-MRSAn y HA-MRSAn), centro (MRSAC, CA-MRSAC y HA-MRSAC) y región sur (MRSAs, CA-MRSAs y HA-MRSAs). Los asteriscos en negrita representan diferencia significativa ($p < 0,05$).

Figura 32 | Evolución de las infecciones CO y HO en 2009 vs. 2015

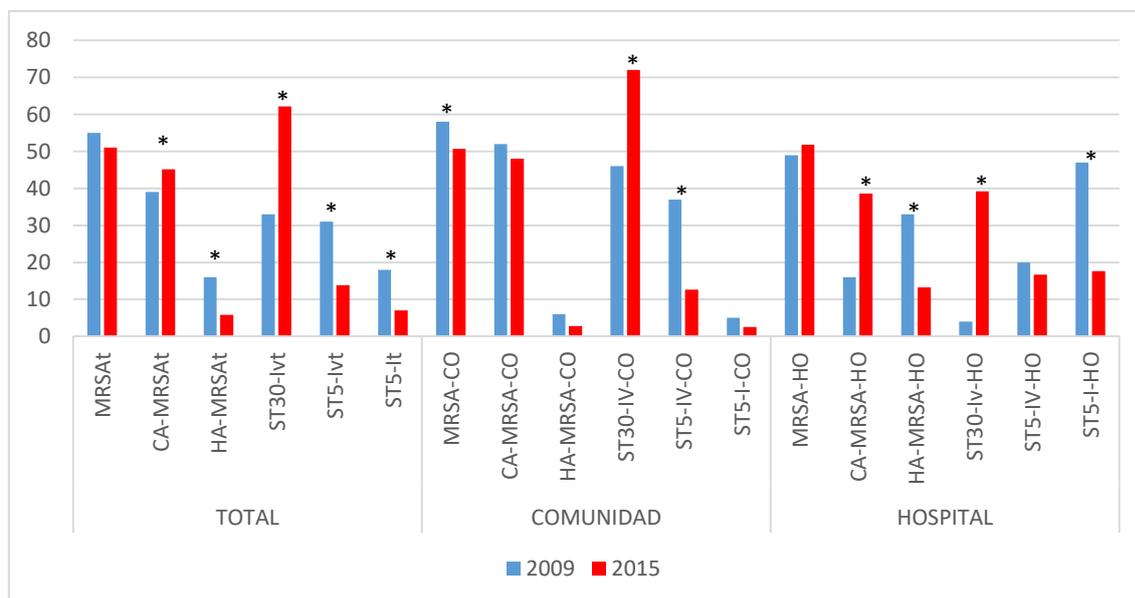


Fig 32. Se presentan las proporciones de MRSA, CA-MRSA, HA-MRSA, ST30-IV, ST5-IV y ST5-I totales (MRSAt, CA-MRSAt, HA-MRSAt, ST30-Ivt, ST5-Ivt y ST5-It) así como en la comunidad (MRSA-CO, CA-MRSA-CO, HA-MRSA-CO, ST30-IV-CO, ST5-IV-CO y ST5-I-CO) y en los hospitales (MRSA-HO, CA-MRSA-HO, HA-MRSA-HO, ST30-IV-HO, ST5-IV-HO y ST5-I-HO), en forma comparativa en 2009 y 2015. El * indica diferencia significativa ($p < 0,05$).

IId-2 Comparaciones de las proporciones de clones de MRSA que colonizan pacientes al ingreso a una institución hospitalaria en Córdoba (proyecto Oct-Dic 2014) con aquellos que producen infecciones de inicio en la comunidad en Córdoba (proyecto abril 2015).

Otra de las comparaciones que se realizaron fueron en relación a los dos proyectos que se desarrollaron en esta tesis, por un lado, el proyecto de colonización (Córdoba, 2014), el cual forma parte de los resultados relacionados a la etapa I y por otro lado, el proyecto de infecciones que forma parte de los resultados relacionados a la etapa II. En este último, se seleccionaron aquellos pacientes de la provincia de Córdoba (2015), con infecciones de inicio en la comunidad, con el fin de analizar los clones que colonizan vs los que infectan a los pacientes atendidos en los hospitales de Córdoba (figura 33).

Como se muestra en la Figura 33, no existen diferencias significativas entre las proporciones de un clon como causa de infecciones y aquellas como colonizante, avalando la fuente endógena de la infección, excepto para el clon CA-MRSA N-ST30-SCC*mec*-IV-*t019*, que presenta una proporción significativamente mayor ($p=0,0034$) en muestras de infección que en muestras de colonización. Este clon, incluso está en menor proporción (20%) que el clon CA-MRSA I-ST5-SCC*mec*IV-*t311* (28,3%) en las muestras de colonización. Esta situación también avala la hipótesis que el clon ST30-IVc utilizaría otras vías de transmisión, además de la colonización e infección endógena.

Figura 33| Comparación de muestras de colonización 2014 (n: 60) vs infección 2015 (n: 21) en Córdoba, Argentina.

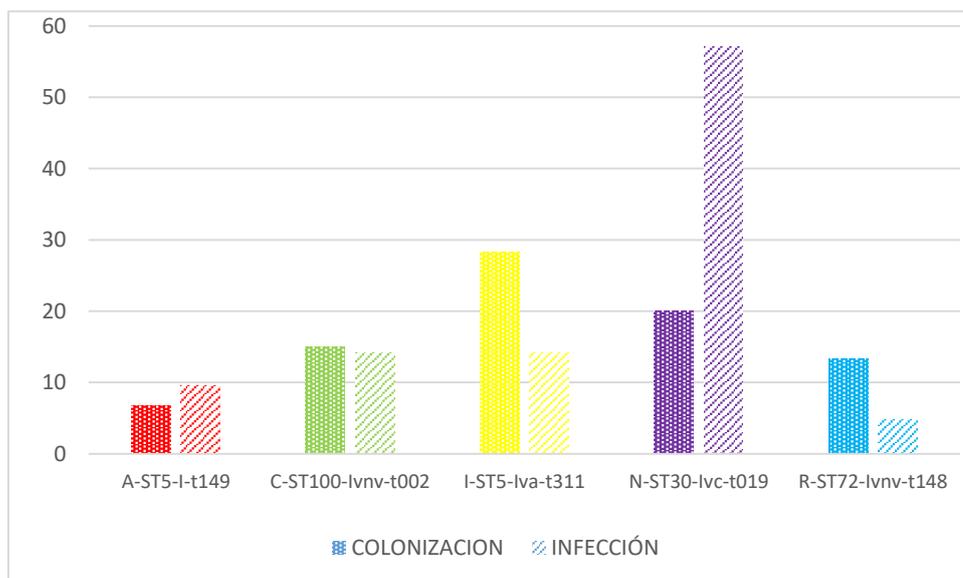


Fig.33. Representa los clones de MRSA más prevalentes tanto en el proyecto de colonización 2014 (trama a cuadros pequeños) como el de infecciones 2015 (trama a rayas), en rojo se representa el clon HA-MRSA A-ST5-I-t149, en verde el clon HA-MRSA C-ST10-IVnv-t002, en amarillo el clon CA-MRSA I-ST5-IVa-t-311, en violeta el clon CA-MRSA N-ST30-IV-t019 y en turquesa el clon CA-MRSA R-ST72-IVnv-t148.

IId-3 Evolución de la resistencia a los antibióticos de MRSA, CA-MRSA_G, HA-MRSA_G y principales clones de MRSA entre 2009 y 2015, considerando el total de infecciones y lugar de inicio de dichas infecciones.

Tabla 15: Comparación de los perfiles de resistencia a los Antibióticos entre 2009 vs 2015

PERFIL DE RESISTENCIA A ATB	2009	2015	
MRSA/TOTAL			
MRSA TOTAL	N _{MRSA} : 322 % (n)	N _{MRSA} : 341 % (n)	Valor de p
CIPROFLOXACINA	24% (78)	14% (48)	0,0014
ERITROMICINA	39,7% (128)	16,4% (56)	<0,0001
CLINDAMICINA	36,3% (117)	16% (5% i y 11%c) (54, 17i Y 37c)	<0,0001
GENTAMICINA	36,9%(119)	22,3%(76)	0,0001
RIFAMPICINA	8,1% (26)	5,0% (17)	0,14
TRIMETOPRIMA/SULFAMETOXAZOL	2,5% (8)	1% (3)	0,23
MINOCICLINA	0,3% (1)	0,3% (1)	0,9
MRSA/COMUNIDAD			
MRSA CO	N _{MRSA} : 216 % (n)	N _{MRSA} : 239 % (n)	
CIPROFLOXACINA	8,3% (18)	7,9% (19)	0,98
ERITROMICINA	23,1% (50)	11,7% (28)	0,0019
CLINDAMICINA	19,9% (43)	11% (5% i y 6%c) (27, 12i Y 15c)	0,012
GENTAMICINA	16,2% (35)	17,6%(42)	0,78
RIFAMPICINA	2,3% (5)	3,8% (9)	0,51
TRIMETOPRIMA/SULFAMETOXAZOL	0,5 (1)	0,8% (2)	0,85
MINOCICLINA	0,5 (1)	0,0% (0)	
MRSA/HOSPITAL			
MRSA HO	N _{MRSA} : 106 % (n)	N _{MRSA} : 102 % (n)	
CIPROFLOXACINA	56,7% (60)	28,4% (29)	0,0001
ERITROMICINA	73,5% (78)	27,5% (28)	<0,0001
CLINDAMICINA	69,8% (74)	27% (5% i y 22%c) (27, 5i Y 22c)	<0,0001
GENTAMICINA	79,2% (84)	33,4%(34)	<0,0001
RIFAMPICINA	21,7% (23)	7,8% (8)	0,0088
TRIMETOPRIMA/SULFAMETOXAZOL	6,6% (7)	1,0% (1)	0,08
MINOCICLINA	0	1,0% (1)	
CA-MRSA/TOTAL			
CA-MRSA	N _{CA-MRSA} : 229 % (n)	N _{CA-MRSA} : 302 % (n)	
CIPROFLOXACINA	1,3% (3)	5,2% (16)	0,029
ERITROMICINA	21,4% (49)	7,9% (24)	<0,0001
CLINDAMICINA	16,6% (38)	7,3% (5% i y 2,3%c) (22, 15i Y 7c)	0,0013
GENTAMICINA	12,7%(29)	13,6%(41)	0,83
RIFAMPICINA	1,3% (3)	1,0% (3)	0,95
TRIMETOPRIMA/SULFAMETOXAZOL	0% (0)	0,7% (2)	
MINOCICLINA	0% (0)	0% (0)	
CA-MRSA/COMUNIDAD			
CA-MRSA CO	N _{CA-MRSA} : 195 % (n)	N _{CA-MRSA} : 226 % (n)	
CIPROFLOXACINA	1,0% (2)	4,4% (10)	0,07
ERITROMICINA	17,4% (34)	8,0% (18)	0,0055
CLINDAMICINA	13,8% (27)	7,5% (4,4% i y 3,1%c)	0,051

		(17, 10i Y 7c)	
GENTAMICINA	8,2% (16)	13,7%(31)	0,10
RIFAMPICINA	0,5% (1)	0,9% (2)	0,92
TRIMETOPRIMA/SULFAMETOXAZOL	0,0 (0)	0,9% (2)	
MINOCICLINA	0,0 (0)	0,0% (0)	
CA-MRSA/HOSPITAL			
CA-MRSA HO	N CA-MRSA: 34 % (n)	HO N CA-MRSA: 76 % (n)	
CIPROFLOXACINA	2,9% (1)	7,8% (6)	0,57
ERITROMICINA	44,1% (15)	8,0% (6)	<0,0001
CLINDAMICINA	32,4% (11)	6,6% (6.6% i) (5, 5i)	0,0011
GENTAMICINA	38,2% (13)	13,1%(10)	0,0061
RIFAMPICINA	5,9% (2)	1,3% (1)	0,46
TRIMETOPRIMA/SULFAMETOXAZOL	0,0 (0)	0,0% (0)	
MINOCICLINA	0,0 (0)	0,0% (0)	
HA-MRSA/TOTAL			
HA-MRSA	N HA-MRSA: 93 % (n)	N HA-MRSA: 39 % (n)	
CIPROFLOXACINA	80,6% (75)	82,1% (32)	0,96
ERITROMICINA	84,9% (79)	82,1% (32)	0,96
CLINDAMICINA	84,9% (79)	82% (5.1% i y 76.9%c) (32, 2i y 30c)	0,96
GENTAMICINA	96,8% (90)	89,7%(35)	0,21
RIFAMPICINA	24,7% (23)	35,9% (14)	0,27
TRIMETOPRIMA/SULFAMETOXAZOL	8,6% (8)	2,6% (1)	0,38
MINOCICLINA	1,1% (1)	2,6% (1)	0,89
HA-MRSA/COMUNIDAD			
HA-MRSA -CO	CO-N HA-MRSA: 21 % (n)	CO-N HA-MRSA: 13 % (n)	
CIPROFLOXACINA	76,2% (16)	69,2% (9)	0,96
ERITROMICINA	76,2% (16)	76,9% (10)	0,99
CLINDAMICINA	76,2% (16)	76,9% (15.4% i y 61.5%c) (10, 2i y 8c)	0,99
GENTAMICINA	90,5% (19)	84,6%(11)	0,97
RIFAMPICINA	19,0% (4)	53,8% (7)	0,083
TRIMETOPRIMA/SULFAMETOXAZOL	4,8% (1)	0% (0)	
MINOCICLINA	4,8% (1)	0% (0)	
HA-MRSA/HOSPITAL			
HA-MRSA -HO	HO-N HA-MRSA: 72 % (n)	HO-N HA-MRSA: 26 % (n)	
CIPROFLOXACINA	81,9% (59)	88,4% (23)	0,98
ERITROMICINA	87,5% (63)	84,6% (22)	0,99
CLINDAMICINA	87,5% (63)	84,6% (0% i y 84.6%c)	0,95
GENTAMICINA	96,8% (71)	92,3%(24)	0,98
RIFAMPICINA	26,4% (19)	26,9% (7)	0,99
TRIMETOPRIMA/SULFAMETOXAZOL	9,7% (7)	3,8% (1)	0,59
MINOCICLINA	0% (0)	3,8% (1)	
ST5-IV-t311-PVL⁺			
ST5-IV	N 102	N: 47	
CIPROFLOXACINA	2% (2)	2,1% (1)	0,90
ERITROMICINA	28% (28)	25,5% (12)	0,90
CLINDAMICINA	24% (24% i)	23,4% (17.0% i y 3.4% c)	0,90
GENTAMICINA	7% (7)	10,6%(5)	0,67
RIFAMPICINA	1% (1)	0% (0)	
TRIMETOPRIMA/SULFAMETOXAZOL	0	0,0% (0)	
MINOCICLINA	0	0,0% (0)	
ST30-IV-t019-PVL⁺			
ST30-IV	N: 104	N: 212	
CIPROFLOXACINA	0	3,3% (7)	
ERITROMICINA	12% (12)	2,8% (6)	0,0025
CLINDAMICINA	8% (7% i y 1% c)	2,8% (6, 3i y 3c)	0,071
GENTAMICINA	12% (12)	11,4%(24)	0,97
RIFAMPICINA	2% (2)	0,5% (1)	0,50
TRIMETOPRIMA/SULFAMETOXAZOL	0	0,0% (0)	
MINOCICLINA	0	0,0% (0)	
MUPIROCINA	0	0,5% (1)	
ST100-IVNv-t002			
ST100-IV	N: 21	N: 15	
CIPROFLOXACINA	33% (7)	60,0% (9)	0,20
ERITROMICINA	52% (11)	53,3% (8)	0,98

CLINDAMICINA	52% (11) (6i (29%) y 5c (23%))	53.3% (8) (2 (13.3%) i y 6 (40.0%) c)	0,98
GENTAMICINA	91% (19)	93.3%(14)	0,95
RIFAMPICINA	24% (5)	86,7% (13)	0,0007
TRIMETOPRIMA/SULFAMETOXAZOL	0	0,0% (0)	
MINOCICLINA	0	6,7% (1)	
ST5-I-t149			
ST5-I	N: 61	N: 24	
CIPROFLOXACINA	95% (59)	96% (23)	0,98
ERITROMICINA	98% (60)	100% (24)	0,98
CLINDAMICINA	97%(59) (59(97%)) c	100% (24(100%))c	0,98
GENTAMICINA	98% (60)	87.5%(21)	0,98
RIFAMPICINA	20% (12)	4.2% (SI 1)	0,13
TRIMETOPRIMA/SULFAMETOXAZOL	0	4.2% (SI 1)	
MINOCICLINA	0	0% (0)	

Tabla 15. Se comparan los perfiles de resistencia a los antibióticos según MRSA, CA-MRSA, HA-MRSA tanto en los hospitales como en la comunidad y los principales clones MRSA, ST30-IV, ST5-IV, ST5-I y ST100, entre el año 2009 y el año 2015.

-MRSA-CO: MRSA en la comunidad, MRSA HO, MRSA en el hospital, CA- MRSA-CO: CA-MRSA en la comunidad, CA-MRSA HO, CA-MRSA en el hospital, HA-MRSA-CO: HA-MRSA en la comunidad, HA-MRSA HO, HA-MRSA en el hospital. La resistencia a clindamicina se detalla a través del mecanismo, i, inducible y c, constitutivo. En negrita se detallan las comparaciones con diferencia significativa ($p < 0,05$).

Al comparar la evolución general de la resistencia a los antibióticos no β -lactámicos (Tabla 15) en el total de MRSA entre el período 2009 (n: 322) y el período 2015 (n: 341), se detectó una disminución significativa de la proporción de aislamientos resistentes a ciprofloxacina (24% vs. 14%, $p=0,0014$), eritromicina (39,7% vs. 16,4%, $p < 0,0001$), clindamicina (36,3% vs. 16,0%, $p < 0,0001$), y gentamicina (39,7% vs. 22,3%, $p=0,0001$).

Cuando se analizaron las infecciones de inicio en la comunidad, se detectó una disminución significativa de la resistencia a eritromicina (23,1% vs. 11,7%, $p=0,0019$) y clindamicina (19,9% vs. 11,0%, $p=0,012$), asociada a la disminución de la resistencia a estos antibióticos detectada en los genotipos CA-MRSA_G (eritromicina: 17,4% vs. 8,0%, $p=0,0055$ y clindamicina (13,8% vs. 7,5%, $p=0,051$). Además, esta disminución de la resistencia también está asociada al desplazamiento del clon ST5-IVa por el clon ST30-IV, que expresa una resistencia significativamente menor a macrólidos y lincosaminas (Tabla 15).

Cuando se analizaron las infecciones de inicio en el hospital, se detectó significativas disminuciones de las tasas de resistencia a ciprofloxacina (56,7% vs. 28,4%, $p=0,0001$), eritromicina (73,5% vs. 27,5%, $p < 0,0001$), clindamicina (69,8% vs. 27,0%, $p < 0,0001$), gentamicina (79,2% vs. 33,4%, $p < 0,0001$) y rifampicina (21,7% vs. 7,8%, $p=0,0088$). Estos cambios están asociados, a dos fenómenos, por un lado, al desplazamiento de los clones HA-MRSA (con tasa de resistencia significativamente mayores a los antibióticos previamente enumerados) por los clones CA-MRSA y por el otro, a la entrada al ambiente hospitalario del clon CA-MRSA ST30-IV con tasas significativamente menores de resistencia a eritromicina y

clindamicina que el clon CA-MRSA ST5-IV, que había entrado previamente al ambiente hospitalario.

8.2.5 CONCLUSIONES GENERALES DE LOS RESULTADOS DE LA ETAPA II

Con el fin de estudiar la evolución en el tiempo de la epidemiología molecular de las infecciones por MRSA en nuestro país, desde los primeros estudios de vigilancia realizados por nuestro grupo de investigación, se llevó a cabo un estudio de carácter prospectivo multicéntrico transversal a nivel nacional durante el mes de abril de 2015, con la participación de 61 hospitales de 20 provincias sumada la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Se analizaron 668 casos de infecciones causadas por *S. aureus* y se utilizó una definición genotípica para los aislamientos de MRSA, caracterizándolos como genotipos CA-MRSA_G y HA-MRSA_G, independientemente del tipo de infección que hayan causado. Por otro lado, se utilizaron definiciones epidemiológicas de las infecciones causadas por MRSA, de acuerdo al origen de la infección, hospital (HO) o comunidad (CO). En forma resumida, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

✓ Se determinó una prevalencia nacional de infecciones por MRSA en el total de infecciones por *S. aureus* de 51% con una mayor proporción de CA-MRSA_G (88,6%) vs HA-MRSA_G (11,4%) $p < 0,0001$.

✓ Las cepas CA-MRSA_G estuvieron asociadas con menor tasa de resistencia a los ATBs que las cepas HA-MRSA_G, la multiresistencia sólo se asoció con genotipos HA-MRSA_G y los únicos aislamientos resistentes a Ceftobiprol correspondían al clon Cordobés/Chileno. Se detectó un aislamiento perteneciente al clon CA-MRSA-ST30-IVc con resistencia de alto nivel a mupirocina, asociado a la presencia del gen *mupA*.

✓ En la evaluación por regiones geográficas del país, se detectaron diferencias significativas regionales en la proporción de MRSA, con las proporciones más altas en el norte (72,9%), disminuyendo hacia el centro (48,4%) y más aún en el sur (25,6%), asociado al predominio de cepas CA-MRSA 66%, 43% y 19,2% respectivamente ($p < 0,0001$).

✓ Se identificó como principal clon al genotipo CA-MRSA ST-30-IVc tanto en la región del norte (61%) como en el centro (64,8%) y el sur (40%) desplazando al Clon ST-5-IVa, que ocupó el segundo lugar de prevalencia en el norte y centro (13%) y el tercer lugar en el sur (15%) después del clon HA-MRSA ST5-I (25%).

✓ En el análisis por grupos etarios, se identificó una mayor proporción de MRSA en pediatría (59%) que en adultos (47,2%), $p = 0,0015$, relacionada con la mayor proporción de CA-MRSA en pediatría (55,8%) que en adultos (38,8%) ($p < 0,0001$).

✓ El clon ST30-IVc fue el clon de MRSA más prevalente (62,5%), tanto en pediatría (70,9%) como en adultos (55,4%), seguido por el clon CA-MRSA ST-5-IVa (15,5% en pediatría y 12,4% en adultos). En pediatría, el tercer lugar lo ocupó el clon CA-MRSA USA300-VL ST8-SCCmec-IVc-t008 (4,1%) y en adultos el clon HA-MRSA ST-5-I (10,4%).

✓ En el análisis de la infección de acuerdo al lugar de inicio, la mayoría de las infecciones (70,5%) fueron CO y no se detectaron diferencias significativas entre las proporciones de MRSA en el hospital (51,8%) y la comunidad (50,7%), ($p=0,86$). Se determinó una proporción significativamente mayor de genotipos CA-MRSA que HA-MRSA tanto en las infecciones CO (48,0% vs. 2,8%, $p < 0,0001$) como en las HO (38,6% vs. 13,2%, $p=0,0009$). Este hecho confirma el desplazamiento de los clones HA-MRSA del ambiente hospitalario debido a la diseminación de los clones CA-MRSA.

✓ En los análisis moleculares de los clones de MRSA causantes de infecciones CO y HO, el clon ST30-IVc fue el más prevalente tanto en las CO (72%) como en las HO (39,2%). A nivel hospitalario fue seguido en frecuencia por el clon HA-MRSA I-ST5-SCC*mec*-I-t149 (17,6%) y el clon CA-MRSA I-ST5-SCC*mec*-IV-t311 (16,7%). Estos resultados demuestran la entrada del clon CA-MRSA ST30-IV al ámbito hospitalario, con una proporción significativamente mayor en pediatría que en adultos, desplazando al clon HA-MRSA Cordobés-Chileno ST5-I y también al CA-MRSA ST5-IV.

✓ El perfil de los genes de virulencia estuvo fuertemente vinculado al *background* genético de cada cepa

✓ En el análisis longitudinal, cuando se compararon los resultados de los estudios 2009 (Egea 2014) y 2015, se identificaron proporciones comparables de MRSA (55% vs 51%). Se detectó un aumento significativo de la proporción de CA-MRSA_G total, (39% en el año 2009 a 45,2% en el 2015) desplazando a los clones HA-MRSA, cuya frecuencia disminuyó significativamente (16% en 2009 vs. 5,8% en el 2015, $p < 0,0001$). Este cambio se hizo significativamente evidente a nivel hospitalario y en la población adulta. El aumento de la frecuencia de genotipos CA-MRSA_G, está relacionado a la diseminación del clon ST-30-IV, desplazando al clon CA-MRSA ST5-IV (31% en el 2009 y 13,7% en el 2015, $p < 0,0001$) y al clon HA-MRSA ST5-I (18% vs 7%, $p < 0,0001$). La diseminación e incremento de las infecciones causadas por el clon CA-MRSA ST30-IV, se produjo tanto en la comunidad como en el hospital, en pediatría y en adultos. En el ámbito hospitalario desplazó al clon HA-MRSA ST5-I (particularmente en adultos) y al clon CA-MRSA ST5-IV en pediatría. Estos cambios se evidenciaron significativamente, especialmente en el centro del país.

✓ Al analizar la evolución general de la resistencia a los demás antibióticos no β -lactámicos en el total de MRSA entre el período 2009 (n: 322) y el período 2015 (n: 341), se detectó una disminución significativa de la proporción de aislamientos resistentes a ciprofloxacina (24% vs. 14%, $p=0,0014$), eritromicina (39,7% vs. 16,4%, $p<0,0001$), clindamicina (36,3% vs. 16,0%, $p<0,0001$), y gentamicina (39,7% vs. 22,3%, $p=0,0001$). La disminución

significativa de las tasas de resistencia a eritromicina y clindamicina detectadas entre las infecciones de inicio en la comunidad estuvo asociada al desplazamiento del clon ST5-IVa por el clon ST30-IV, que expresa una resistencia significativamente menor a macrólidos y lincosaminas. A nivel hospitalario, la disminución de las tasas de resistencia a ciprofloxacina, eritromicina, clindamicina, gentamicina y rifampicina están asociados a dos fenómenos, por un lado, al desplazamiento de los clones HA-MRSA por los clones CA-MRSA (con tasa de resistencia a los antibióticos significativamente menores) y por el otro, a la entrada al ambiente hospitalario del clon CA-MRSA ST30-IV con tasas de resistencia a eritromicina y clindamicina significativamente menores que el clon CA-MRSA ST5-IV, que había ingresado previamente.

8.3 RESULTADOS DE LA ETAPA III

Analizar la evolución molecular del CC5 a través del secuenciamiento de genomas completos (WGS) y la virulencia comparativa de los diferentes clones en un modelo animal, y su posible asociación con el comportamiento epidémico

OBJETIVOS ESPECÍFICOS RELACIONADOS A LA ETAPA III

IIIa. Analizar la evolución del complejo clonal 5 (CC5) en nuestro país a través del WGS.

IIIb. Analizar en forma comparativa la virulencia de los clones MRSA (CA-MRSA y HA-MRSA) más prevalentes en nuestro país, utilizando el modelo en invertebrados de *G. mellonella*.

8.3.1 RESULTADOS relacionados al objetivo específico III *a*

Analizar la evolución del complejo clonal 5 (CC5) en nuestro país a través del WGS.

Introducción al estudio de la evolución del CC5 en Argentina y selección de aislamientos

A partir de los primeros estudios de vigilancia de las infecciones por MRSA en Córdoba llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, a finales de la década de 1990, se identificó un clon epidémico HA-MRSA A-ST5-SCC*mec*-I-t149, perteneciente al CC5 denominado clon Cordobés/Chileno, en similar prevalencia que el clon sudamericano B-ST239-SCC*mec*IIIa-t037, que era el clon HA-MRSA principal detectado hasta ese momento [142]. Con el correr de los años, en posteriores estudios de vigilancia, se identificó al clon Cordobés/Chileno como principal causa de infecciones en el ámbito hospitalario, desplazando al clon ST239-III. En tercer lugar de prevalencia en estos estudios, siempre se detectó una variante del clon pediátrico internacional, de linaje ST-100-SCC*mec*IVnv-t002, denominado Variante Argentina del clon Pediátrico, perteneciente también al CC5 [141, 142]. Estudios sucesivos permitieron detectar un posible precursor meticilino sensible (MSSA) del clon Cordobés/Chileno y de la variante Argentina del clon pediátrico del CC5 con un tipo *SpaA* relacionado (t002) [141, 148].

Como muestra la Figura 34, en base a los resultados de estos estudios de vigilancia molecular de las infecciones por MRSA (PFGE, MLST, tipificación de SCC*mecA* y análisis del gen *SpaA*), se planteó la hipótesis que en el ámbito hospitalario a partir de un precursor MSSA, como pudieron ser los aislamientos 0271 o 0298, pertenecientes al linaje ST5, con pulsotipos M2 y M1 respectivamente y un tipo *SpaA* t002, se produjo la adquisición del SCC*mec*I, dando origen a la emergencia del clon epidémico HA-MRSA (Cordobés/Chileno) del mismo linaje ST5, con un pulsotipo A por PFGE y un *SpaA* t149 (relacionado al t002 del precursor). Por otro lado, se planteó que uno de los precursores MSSA, adquirió una variante del SCC*mec* IV (identificado por nuestro grupo de investigación y nombrada como SCC*mec* IV nueva variante (SCC*mec*IVnv) [149], el cual a su vez, sufrió una variación de un sólo locus del gen “house keeping” *aroE* (*aroE* 4 cambia a *aroE* 65), para dar origen a la emergencia del clon HA-MRSA de linaje ST100, perteneciente al CC5, con un t002 [149].

Figura 34 | Hipótesis de la evolución del CC5 en Argentina

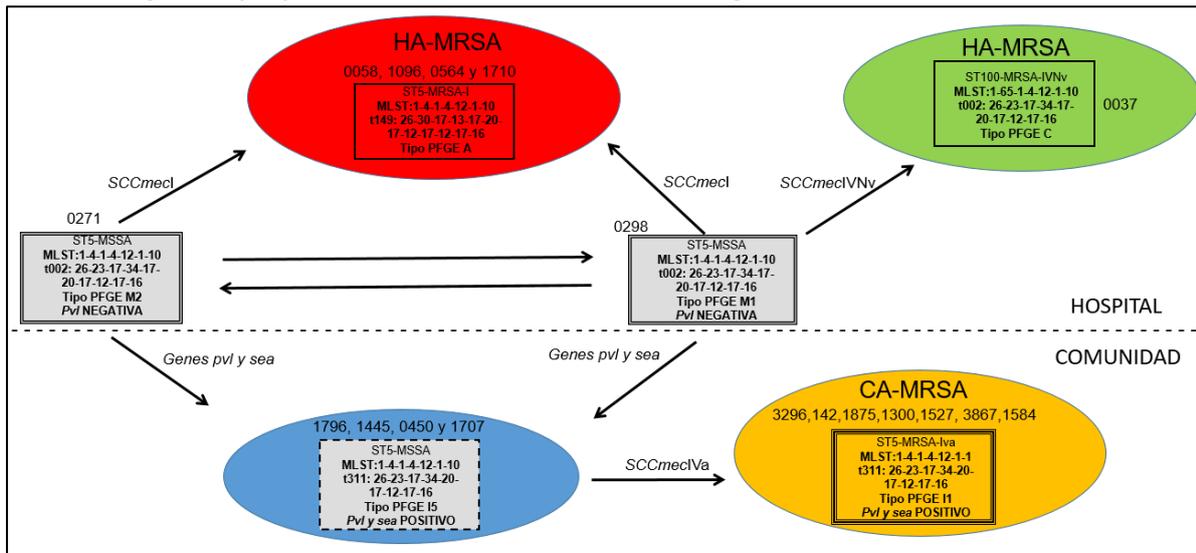


Fig.34. Hipótesis basada en la tipificación molecular tradicional para el CC5. En cada grupo se detalla la caracterización molecular dada por MLST con sus 7 alotipos numéricos, tipo *t*, con sus *repeats* numéricos y pulsotipo por PFGE. En los recuadros grises, se muestran los precursores MSSA y sus respectivos aislamientos (0271 y 0298), en óvalo rojo, se muestran los aislamientos HA-MRSA correspondientes al clon Córdoba/Chileno (0058, 1096, 0564 y 1710), en óvalo verde, el aislamiento del clon HA-MRSA ST100-IVNv (0037), en óvalo azul, los aislamientos CA-MSSA (1796, 1445, 0450 y 1707) y en óvalo amarillo los aislamientos CA-MRSA (3296, 142, 1875, 1527, 3867 y 1584). La línea discontinuada separa los eventos ocurridos en la comunidad de los ocurridos en los hospitales. Las flechas indican los genes adquiridos a través de la evolución en el tiempo.

De la misma manera y de acuerdo con esta hipótesis, en la comunidad los precursores MSSA dieron origen a un nuevo MSSA a partir de la adquisición de nuevos determinantes de virulencia como la leucocidina de Pantón-Valentine (PVL) y la enterotoxina A (*sea*), del mismo linaje ST5, pero con un pulsotipo I5 y un tipo *SpaA* t311, también relacionado al t002. A partir de este precursor MSSA, y con la adquisición del *SCCmec* IVa, emergió el clon CA-MRSA I-ST5-SCCmecIVa-t311, el cual se establece como principal causante de infecciones en la comunidad principalmente en pediatría y adultos jóvenes [148].

Con la finalidad de demostrar esta hipótesis, en este trabajo de tesis utilizamos la herramienta de Secuenciación del Genoma Completo de un número seleccionado de cepas del CC5 para realizar el análisis filogenético evolutivo y poder establecer el origen de la emergencia y la evolución de los clones epidémicos del CC5 en nuestro país. Como se explica en detalle en la sección de materiales y métodos, se llevó a cabo una selección de un total de 20 aislamientos representativos de todas las regiones del país, tanto MSSA (HA-MSSA y CA-MSSA) como MRSA (HA-MRSA y CA-MRSA) así como un aislamiento HA-MRSA de Chile. Las características de los aislamientos seleccionados se muestran en la Figura 35.

Figura 35 | Características moleculares y distribución geográfica de los aislamientos seleccionados

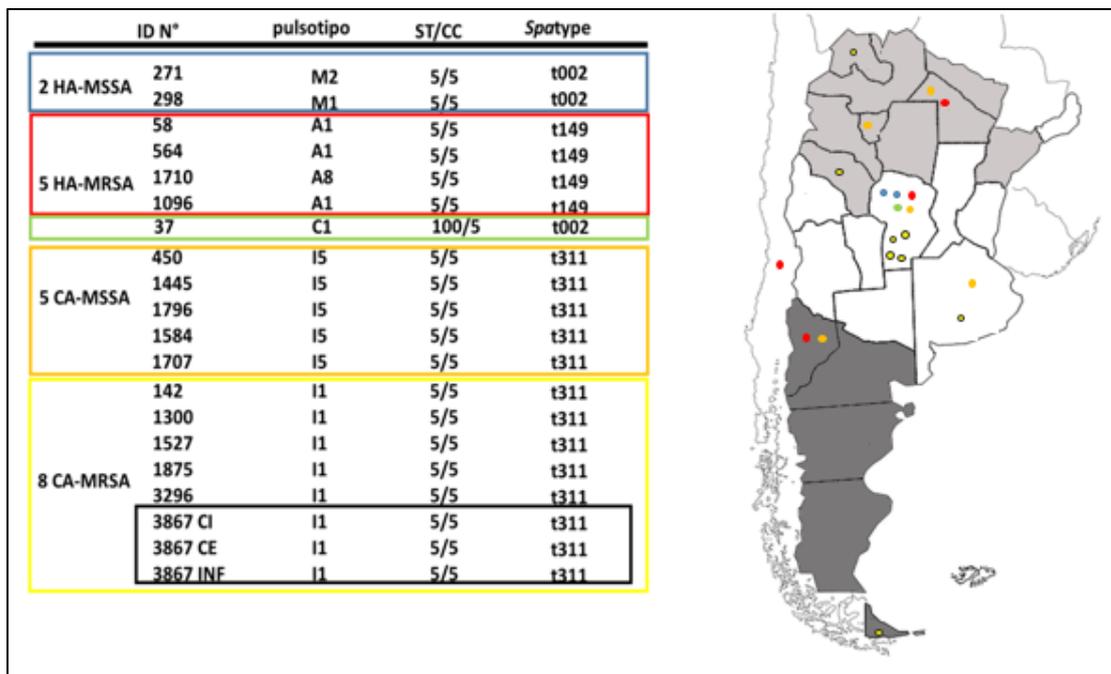


Fig.35. Detalle de los 20 aislamientos de *S. aureus*, ID N°, número de identificación, ST/CC, Tipo secuencial/complejo clonal, *Spatype*, tipo de proteína A, HA-MSSA, *S aureus* sensible a meticilina asociado al hospital (recuadro y punto azul en mapa), HA-MRSA, *S. aureus* resistente a meticilina asociado al hospital (recuadro y punto rojo en mapa), CA-MSSA, *S. aureus* sensible a meticilina asociado a la comunidad (recuadro y punto anaranjado en mapa), CA-MRSA, *S. aureus* resistente a meticilina asociado a la comunidad (recuadro y punto amarillo en mapa). En recuadro verde se distingue el clon C-ST100-IVNV y los puntos verdes en el mapa, en recuadro negro se denotan los tres aislamientos I-ST5-Iva-t311 recuperados del mismo paciente en proyecto de colonización 2014)

III a1. Análisis filogenético

Para realizar dicho análisis se compararon todas las cepas a través de las diferencias (SNPs) de los genomas core de los aislamientos representativos del CC5. Con ella se elaboraron 2 árboles, uno de máxima verosimilitud y otro consenso a partir de simulaciones bayesianas (*posterior tree*), sobre este último se realizaron todos los análisis que se detallan a continuación.

Se pudo observar que hay dos clados o grupos bien diferenciados y separados de los cuales uno corresponde a los clones asociados al hospital (HA) tanto HA-MSSA como HA-MRSA, mientras que el otro a aquellos asociados a la comunidad (CA): CA-MSSA y CA-MRSA (Figura 36). En dicha figura, se observa que el origen de la emergencia tanto de las cepas HA como las CA es diferente y coincide con los estudios realizados previamente por nuestro grupo de investigación. En los mismos, utilizando las metodologías estándares para el análisis epidemiológico, tales como PFGE, MLST, caracterización del SCCmec y tipo *SpaA* se pudo demostrar la diferencia genética entre los clones CA-MRSA y los HA-MRSA.

III a2. Identificación de los ancestros comunes más recientes (MRCA).

Como se describe en materiales y métodos (Página 167), el programa BEAST fue utilizado para elaborar el árbol consenso, éste, estima la tasa de sustitución que tiene en cuenta la variación entre las cepas y las fechas de las mismas. Se obtuvo una tasa de sustitución de 1.2×10^{-4} que está en el rango de entre 10^{-3} y 10^{-9} sustituciones / sitio / año según lo informado por otro estudio de *S. aureus* [184].

De acuerdo a los resultados obtenidos, en el ámbito hospitalario, el precursor HA-MSSA 0298 presenta menor número de diferencias de SNPs con el clon HA-MRSA C-ST100-IVnv (aislamiento 0037) compartiendo un ancestro común que data aproximadamente del año 1979, los cuales a su vez comparten un ancestro que data del año 1956. A partir de este ancestro también emergió el clon Córdoba/Chileno A-ST5-I (aislamiento 0058), el cual se diversificó aproximadamente en el año 1992. En este grupo o clado del clon ST5-I se encuentra el aislamiento 1096 procedente de Chile, lo que avala la estrecha relación genética y el origen común de los aislamientos detectados en Argentina y en Chile.

Por otro lado, los aislamientos de la comunidad, comparten con los de los hospitales un ancestro común que data del año 1937, el cual al parecer evolucionó en la comunidad adquiriendo variaciones genéticas, como genes de virulencia (ver ítem IIe3) *pvl*, *seA* (enterotoxina A) y la *seP* (enterotoxina P) hasta expandirse aproximadamente en el año 1990, para dar un precursor MSSA que a partir del año 1991 divergió adquiriendo el *SCCmec* IVa y dando origen al clon CA-MRSA-ST5-IVa, *pvl*, *sea* y *sep* positivos, causando brotes epidémicos en las diferentes regiones del país. (Figura 36)

Figura 36 | Análisis utilizando el reloj molecular para determinar el Ancestro común más reciente (MRCA)

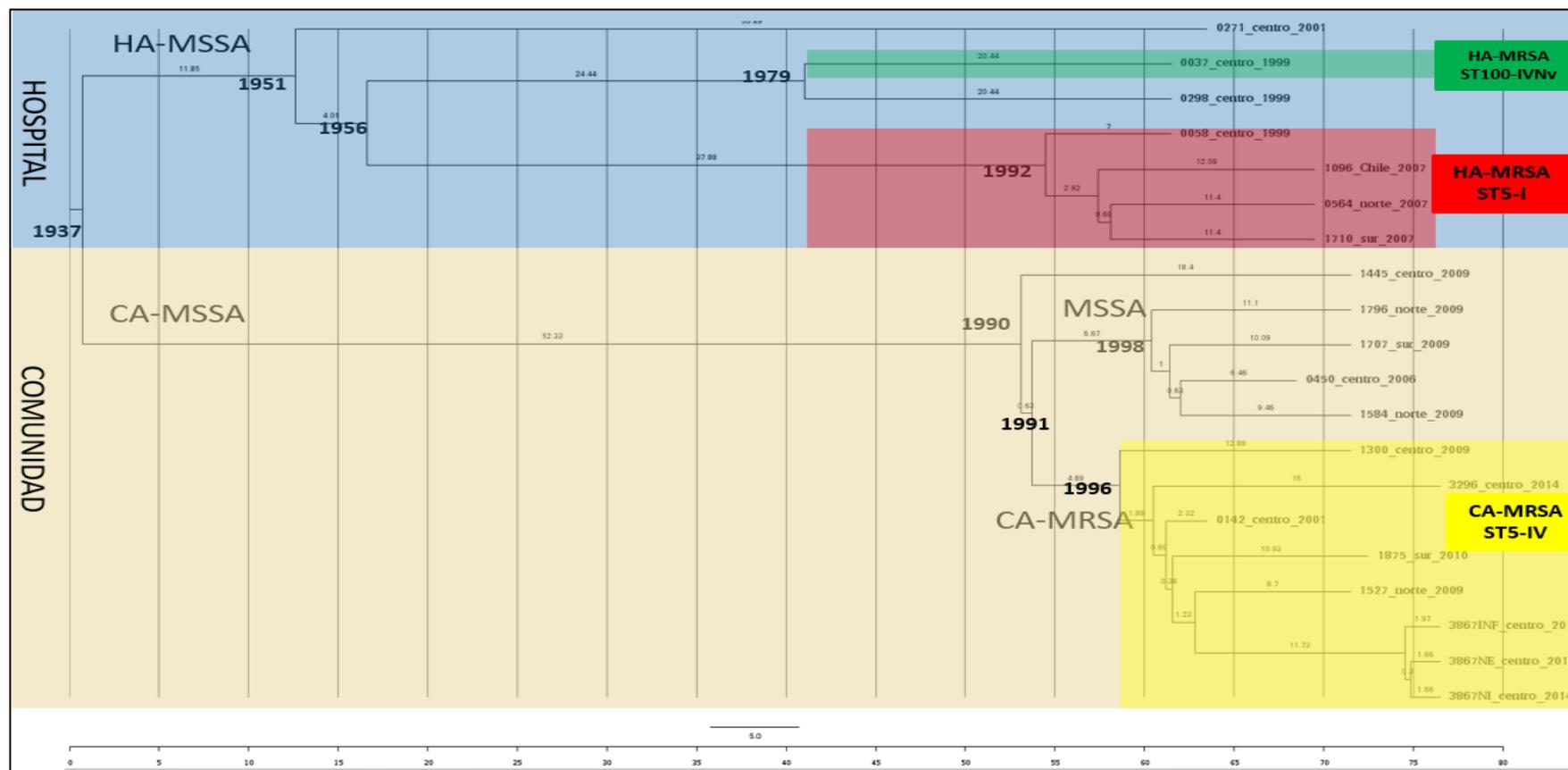


Fig.36 Árbol filogenético con análisis del MRCA. Se describen los dos cladros o grupos diferenciados: en recuadro azul, los aislamientos HA (asociados al hospital) tanto HA-MRSA como HA-MSSA, dentro de éstos, se detallan, el aislamiento del clon ST100-IVNv en recuadro verde, los aislamientos del clon Cordobés/Chileno ST5-I, y los precursores MSSA (0298 y 0271). En recuadro marrón, se detallan los aislamientos CA (asociados a la comunidad), tanto CA-MRSA (recuadro amarillo) como HA-MSSA. Se obtuvo una tasa de sustitución de 1.2×10^{-4} que está en el rango de entre 10^{-3} y 10^{-9} sustituciones / sitio / año según lo informado por otro estudio de *S. aureus* [184].

III a3. Ensamblado *de novo* para el análisis de factores de virulencia y genes de resistencia.

Análisis de factores de virulencia

El conjunto de genes que codifican para proteínas hipotéticas relacionadas a factores de virulencia alojados en el genoma core, regiones variables o elementos genéticos móviles (MGEs) fueron analizados a través de un ensamblado *de novo* (Materiales y Métodos página 163). Como se puede apreciar en la Figura 37, el perfil de factores de virulencia de las cepas CA del CC5 difiere de aquel del grupo HA. Se puede apreciar que los genes *sea* y *sep*, codificantes para las enterotoxinas A y P sólo están presentes en los aislamientos CA (MRSA y MSSA), al igual que los genes *lukF* y *lukS*, los cuales codifican para la leucotoxina PVL, como así también un fago del grupo de integrasa ϕ Sa1 (con la excepción del aislamiento CA-MRSA 3296). De acuerdo a estos hallazgos, se indagó la posibilidad que estos genes estén codificados en el mismo elemento genético móvil, posiblemente un fago del grupo de integrasa ϕ Sa1. Encontramos, a diferencia de lo esperado, que estos tres genes están codificados en un fago del grupo de la integrasa ϕ Sa2, denominado ϕ iSa119. Los “contig” donde están las secuencias de estos 3 genes en las cepas de nuestro proyecto, mapean contra la secuencia de referencia de este fago y contra el genoma de la cepa VB9352 del proyecto PRJNA520811 del NCBI https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_004153345.1. (Figura 37). Éste análisis sugiere que las cepas CA (MRSA y MSSA) contienen el fago ϕ iSa119, que porta los genes *lukFS* (*pvl*), *sea* y *sep* (Figura 38).

Este fago, no se encuentra en los clones HA, no obstante, el grupo de los HA tienen un fago del grupo ϕ Sa2 diferente al fago ϕ iSa119. La adquisición de este fago con los genes *sea*, *sep*, *lukF* y *lukS* por el ancestro MSSA podría ser un hecho evolutivo que facilitó la diseminación del grupo CA en la comunidad.

Como puede observarse también, existen genes de virulencia que son conservados en el total de los aislamientos tanto HA como CA, tal es el caso de los genes *SpaA*, que codifica para la proteína A de *Staphylococcus*, ciertas enterotoxinas como *sen*, *seo*, los genes *LukED*, codificante para la leucocidina ED, el gen *sdrE*, codificante para sideróforos, *Sek*, que codifica la quinasa de *S. aureus* y el inhibidor de complemento *scn*.

Figura 37| Principales factores de virulencia asociados a los clones HA-MRSA/MSSA y CA-MRSA/MSSA

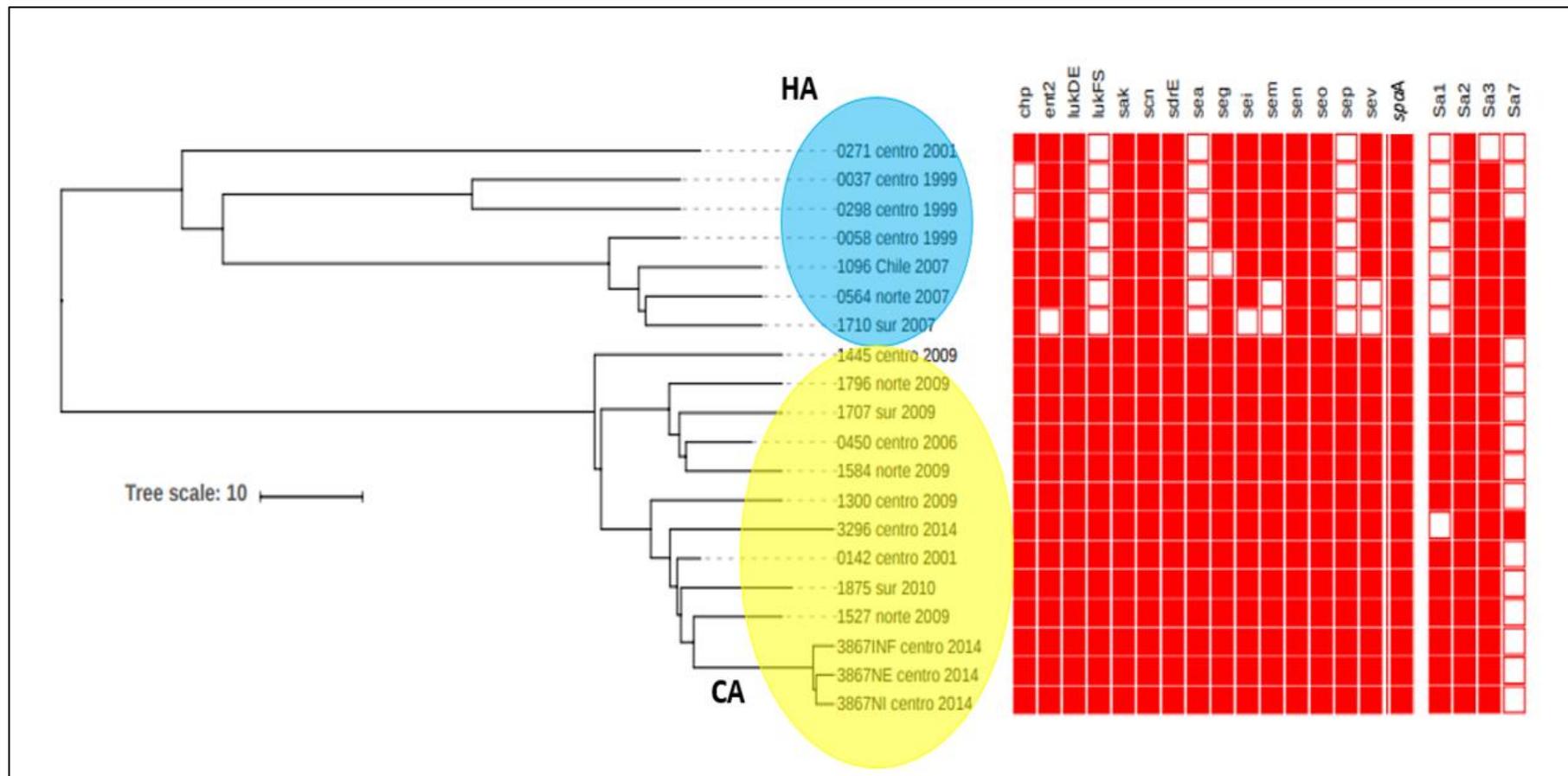


Fig. 37. Factores de virulencia asociado a los clones del CC5. Se muestra el árbol filogenético con los dos clados diferenciados, los HA (aislamientos asociados al hospital HA-MRSA y HA-MSSA) en círculo azul y los CA (aislamientos asociados a la comunidad CA-MRSA y CA-MSSA) en círculo amarillo. El perfil de genes que codifican para factores de virulencia se muestra en las columnas adyacentes, de acuerdo a la presencia (recuadro rojo) o ausencia (recuadro blanco) del gen en cuestión. 'chp', Inhibidor de quimiotaxis, 'se' a, g, i, m, n, o, p, v', 'Enterotoxinas de *Staphylococcus*', 'spaA', proteína A de *Staphylococcus*, 'lukFS', leucocidina de Pantone-Valentine, 'Sdr', Sideroforo, 'ent2', Enterotoxina yent2, 'LukDE' leutotoxina DE, 'sak', Staphyloquinasa, 'scn', Inhibidor de Complemento de *Staphylococcus*, 'Sa' 1, 2, 3 y 7, Integrasas de bacteriófagos.

De acuerdo a estos resultados, todos los aislamientos analizados por WGS portarían *scn*, por lo tanto son positivos para IEC1, todos asociados a *sak*, la mayoría también tienen *chp* (tipo IEC-B: *scn*, *sak* y *chp*) excepto los aislamientos MSSA 0298 y el cercanamente relacionado HA-MRSA 0037 (C-ST100-IVnv), que tienen un tipo diferente de IEC, el IEC-E (*scn* y *sak*), posiblemente relacionado a otro fago de la familia ϕ Sa3. Por lo cual esto podría ser una diferencia evolutiva, que ayudó a la selección y diseminación de este clon desde su divergencia del ancestro común con el otro clon HA-MRSA ST5-I.

Figura 38 | Representación esquemática del fago phiSa119

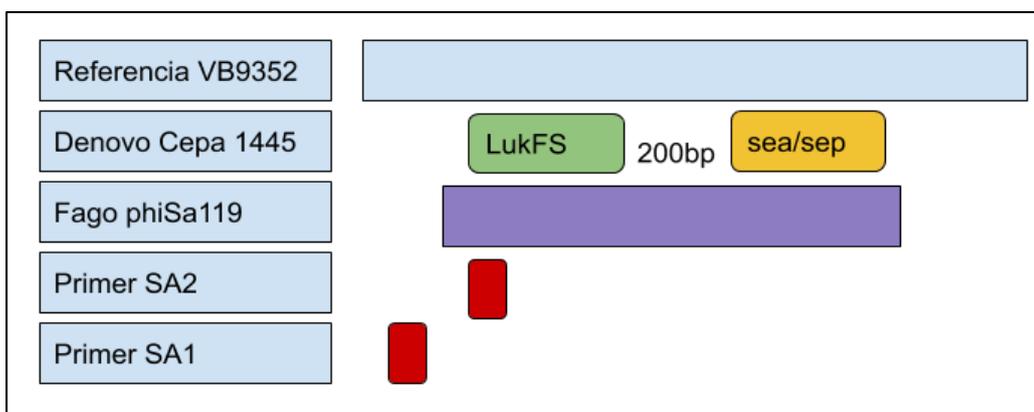


Fig. 38: En este esquema (tamaños no proporcionales para mejor visualización) vemos cómo se posicionan el fago phiSa119, los primers para la integrasa Sa2 y Sa1 y los contigs del ensamblado *de novo* que contienen a *lukFS* y a *sea/sep*. Aquí se utilizaron los contigs del ensamblado de la cepa 1445 de manera ilustrativa, pero lo mismo pasa con el resto de los CA (1796 1707 0450 1584 1300 0142 1875 1527 3867 3296). Los contigs que contienen a *LukFS* en dichos aislamientos van de ~4800 a ~5700 bps y *sea/sep* siempre están en uno de tamaño ~1370 bps.

Análisis del resistoma

El “resistoma” bacteriano puede definirse como la colección de todos aquellos genes que contribuyen, ya sea de manera directa o indirecta, a la resistencia de las bacterias, el ensamblado *de novo*, permitió confeccionar un árbol (Figura 39) con todos los genes que codifican para proteínas relacionadas a resistencia a Antibióticos tanto en el genoma core como el genoma accesorio.

El árbol generado a través del ensamblado *de novo*, representó, dos grupos diferentes, denotados con los colores azul y amarillo para HA-MRSA y CA-MRSA, respectivamente. Del total de genes que confieren resistencia a antibióticos buscados en las bases de datos, que se describen en Materiales y Métodos (página 164), se detectaron los siguientes:

1-*blaZ*, que codifica a una β -Lactamasa plasmídica, que por inactivación enzimática confiere resistencia a las penicilinas

2- *mecA*: el cual confieren resistencia a prácticamente todos los β -lactámicos

3- gen *aacA-aphD* que codifica una enzima bi-funcional de 479 aa que muestra actividad acetiltransferasa y fosfotransferasa y confiere resistencia a gentamicina, kanamicina, tobramicina y cuando se sobre-expresa, también a amikacina. Este gen se encuentra en el transposón Tn4001.

4- El gen *aphA3* [también conocido como *aph (3')-IIIa*] codifica una fosfotransferasa de 264 aa, que media la resistencia a kanamicina, neomicina y amikacina.

5- Genes *erm*: *ermA* y el *ermC*, confieren la resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (MLS_B). Estos genes codifican para metilasas que modifican el/los sitio/s objetivo/s A2058/A2059 en el ARNr. La expresión de estos genes, producen el fenotipo MLS_B, el cual se puede expresar en formas constitutivas (cMLS_B) o inducible (iMLS_B). La resistencia constitutiva está relacionada con las cepas de *S. aureus* que son resistentes tanto a eritromicina como a clindamicina. Las cepas inducibles definen aquellas bacterias que en realidad son resistentes a eritromicina y clindamicina, pero que aparecen como sensibles a la clindamicina mediante pruebas de sensibilidad de rutina. Las mismas necesitan pruebas fenotípicas para evidenciar la resistencia, como pruebas de aproximación de disco especiales que incorporan la inducción de resistencia a clindamicina con eritromicina (efecto de la zona D).

6- Se identificaron mutaciones de los sitios blancos de *gyrA*, *gyrB*, *griA*, y *griB*, los cuales confieren resistencia a quinolonas (ciprofloxacina y moxifloxacina).

7- Se identificaron mutaciones en *rpoB*, las cuales confieren resistencia a rifampicina.

Los resultados obtenidos por el secuenciamiento de genomas completos (WGS) en la detección de estos mecanismos de resistencia tuvieron una excelente correlación con los resultados obtenidos por el análisis fenotípico realizado a través del antibiograma de los aislamientos problema. Los resultados obtenidos por el secuenciamiento de genomas completos (WGS) en la detección de estos mecanismos de resistencia tuvieron una excelente correlación con los resultados obtenidos por el análisis fenotípico (Figura 39) realizado a través del antibiograma de los aislamientos problema. Sólo en dos casos se encontraron discordancias: 1) en el aislamiento CA-MRSA 3296, el cual según fenotipo presentaba el mecanismo MLS_Bi que confiere resistencia inducible a clindamicina y eritromicina, pero no se encontró por WGS ninguno de los genes *erm*, responsables de dicho mecanismo. No obstante, se realizó una búsqueda por PCR (*ermA*, *ermB*, *ermC* y *msrA*), obteniendo el producto de amplificación positivo para *ermC*, validando los resultados fenotípicos; 2) el otro caso que presentó discordancia entre los dos métodos fue la resistencia fenotípica a amikacina (Akn) del aislamiento 1710, donde no se detectó por WGS el gen *Aph-3*, posible responsable de dicha resistencia. Se debe tener en cuenta que este fenotipo de resistencia también se puede explicar por la sobre-expresión del

gen *aacA-aphD*. En la tabla 16 A y 16 B se detallan los genes que presentaron SNPs y aquellos detectados que confieren para determinantes de resistencia.

Tabla 16 A| SNPs que confieren resistencia

Cepa	Droga	Gen	SNPs AA
0058	M+C	<i>gyrA</i>	Ser84Leu
0037	RIF	<i>rpoB</i>	His481Asn
1710	M+C	<i>gyrA</i>	Ser84Leu
564	M+C	<i>gyrA</i>	Ser84Leu
1096	M+C	<i>gyrA</i>	Ser84Leu

Tabla 16 A. Se detallan los SNPs que confieren resistencia. Se muestran los genes involucrados *gyrA* y *rpoB*, así como los aminoácidos que modifican y la droga a la cuál confiere resistencia, M, moxifloxacina, C, ciprofloxacina, RIF, rifampicina.

Tabla 16 B| Genes que confieren resistencia

Droga	Gen	Cepas que portan el gen
Eritromicina	<i>ermC</i>	0271,0271,1875, ,0142, 1796
Eritromicina	<i>ermA</i>	0058,1710,0564,1096,
Amikacina	<i>aphA-3</i>	0058,0564,1096
Gentamicina	<i>aacA-AphD</i>	0058,0271, 0037, 1710,0564,1096,
Cefoxitina	<i>mecA</i>	0058,1300,0037,1875,3296,1710,0142,1527,0564,3867NE,1096,3867NI,3867INF
Penicilina	<i>blaZ</i>	0058,1300,0271,0037,1875,3296,1710,1584,1445,0142,1527,0564,3867NE,1096, 1796,3867NI,0298,1707,3867INF,0450
Penicilina	<i>blaZ-D</i>	0058,1300,0271,0037,1875,3296,1710,1584,1445,0142,1527,0564,3867NE,1096, 1796,3867NI,0298,1707,3867INF,0450
Penicilina	<i>blaZ-A</i>	0058,1300,0271,0037,1875,3296,1710,1584,1445,0142,1527,0564,3867NE,1096, 1796,3867NI,0298,1707,3867INF,0450

Tabla 16 B. Se detallan los genes detectados, los cuales codifican para determinantes de resistencia y en los aislamientos en los que se detectaron.

Figura 39| Comparación del resistoma obtenido por WGS y el fenotipo obtenido por Antibiograma de los aislamientos.

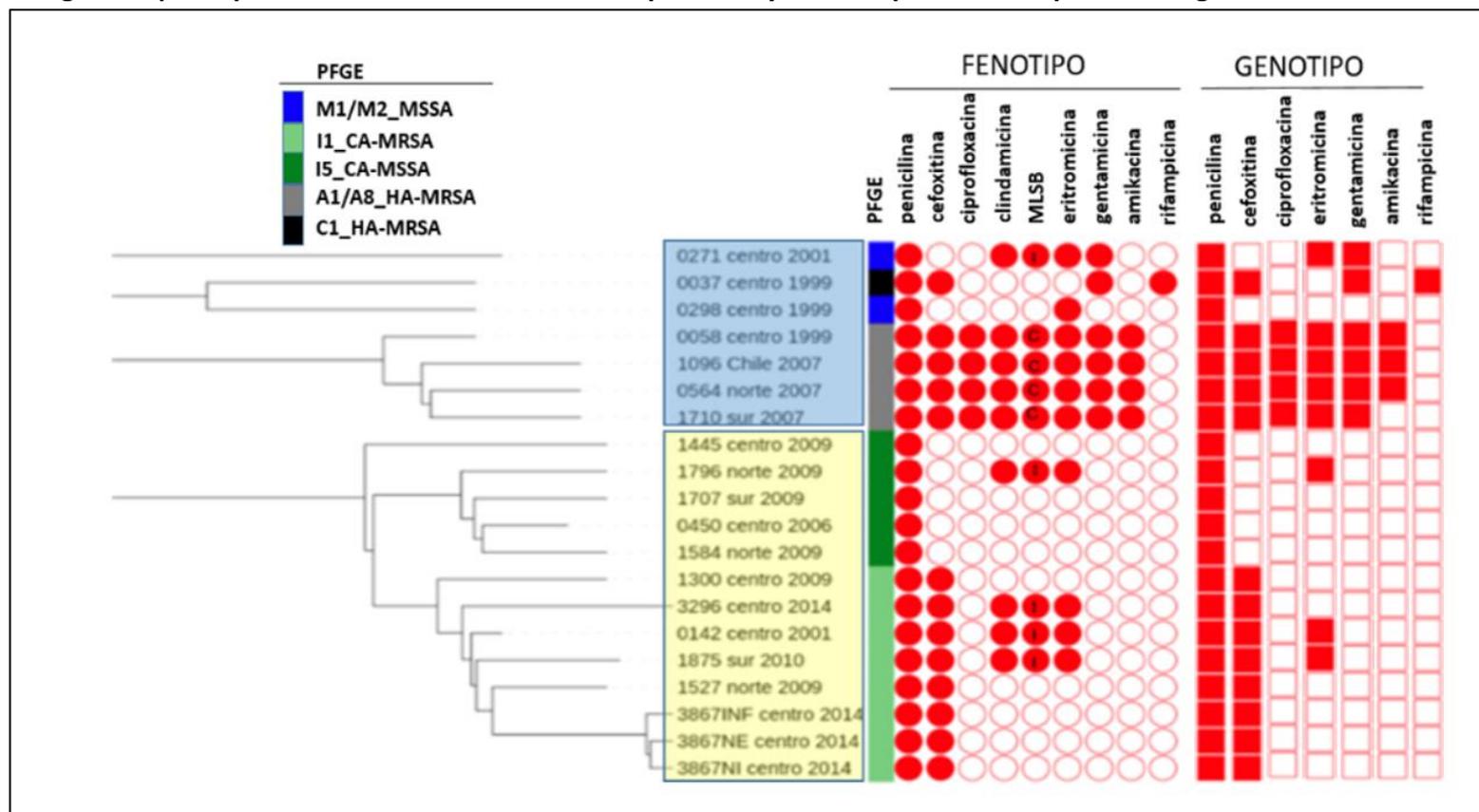


Fig.39. Se muestra el árbol filogenético y la comparación del genotipo obtenido por WGS y el fenotipo determinado por antibiograma. En recuadro celeste se muestran los aislamientos HA (asociados al hospital), en recuadro marrón, los aislamientos CA (asociados a la comunidad). En las columnas se muestra, el pulsotipo según PFGE y los antibióticos probados a través del antibiograma y los analizados por WGS en busca de mutaciones. Los círculos rojos representan resistencia (notese que en el mecanismo MLSB, se detalla si es inducible con la letra I o si es constitutivo con la letra C), los círculos blancos representan sensibilidad, los recuadros rojos, representan presencia/mutación del gen involucrado en la resistencia, los recuadros blancos representan ausencia del gen involucrado en la resistencia.

III *a*4. Caracterización de la variante del *SCCmec* IV, del clon HA-MRSA C-ST100.

Como se mencionó anteriormente, desde los primeros estudios de vigilancia en 1999 llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, el clon HA-MRSA C-ST100-t002, se ha mantenido en proporciones invariables con el paso del tiempo [141, 142, 150], y como principal causa de infecciones en la comunidad hasta la emergencia del clon CA-MRSA I-ST5IVa-t311 [148, 149].

En los estudios arriba citados, cuando se quiso tipificar mediante PCR los complejos de genes *mec* y *ccr*, se detectó un tipo de *SCCmec* no descrito previamente, el cual fue definido como nueva variante del *SCCmec* IV (*SCCmec*IVNV) [141, 149].

Un estudio epidemiológico en 2003 realizado en Zurich identificó varias cepas de MRSA que contenían múltiples locus de recombinasas (*ccr*) [185], y ya en el año 2007 se caracterizó el *SCCmec* de uno de estos aislamientos denominado MRSA_{ZH47}, de linaje ST100, perteneciente al CC5, el cual presentaba un *SCCmec* dispuesto en mosaico denominado *SCCmec*IV (2B&5) [186]. Este aislamiento además de su resistencia a los antibióticos β -lactámicos, era resistente a los aminoglucósidos, debido a la presencia de los genes *aac* (6')-*aph* (2') alojados en un transposon Tn4001 y presentaba una penicilinasa codificada por el gen *bla_z*. El tipo *SCCmec* no pudo ser determinado por multiplex-PCR [187], y la tipificación de los genes de las recombinasas (*ccr*) indicó que contenía tanto la *ccr2* como la recombinasa del tipo *ccrC* [186].

Con estos antecedentes, en un estudio previo de nuestro grupo de investigación [149], se demostró por PCR que el *SCCmec* asociado con la variante argentina del clon pediátrico (pulsotipo C-ST100) está estrechamente relacionado al *SCCmec*IV (2B&5). Se detectó el Tn4001, integrado en el complejo *mec* de clase B "upstream" del gen *mecA* (complejo de genes *mec* clase B2) mediante la tipificación por PCR de diferentes regiones de *SCCmec*IV. Por lo tanto, esta nueva variante de *SCCmec*IV, además del complejo de genes *mec* de clase B2, también tiene un complejo de genes *ccr* de tipo 2 y una región J1 con homología con *SCCmec*IVc, pero a diferencia del *SCCmec*IV (2B&5), carece de un *SCCmec* con *ccr C* y contiene el gen *dcs*.

En este trabajo de tesis a través de la WGS de la cepa 037, se logró secuenciar y anotar la región correspondiente al *SCCmec* IVNV del clon C-ST100 descrito en Argentina y compararlo con la cepa MRSA_{ZH47}, caracterizada en Suiza. Como se muestra en la Figura 40, la diferencia entre estas cepas está dada por la presencia de una proteína con dominios de nucleasa en el aislamiento 0037 en lugar de las proteínas hipotéticas ZH02-11 y la *ccrC*.

Figura 40. Secuencia del SCCmec detectado en el MRSA_{ZH47} vs la secuencia del SCCmec Nv del aislamiento 0037 C-ST100

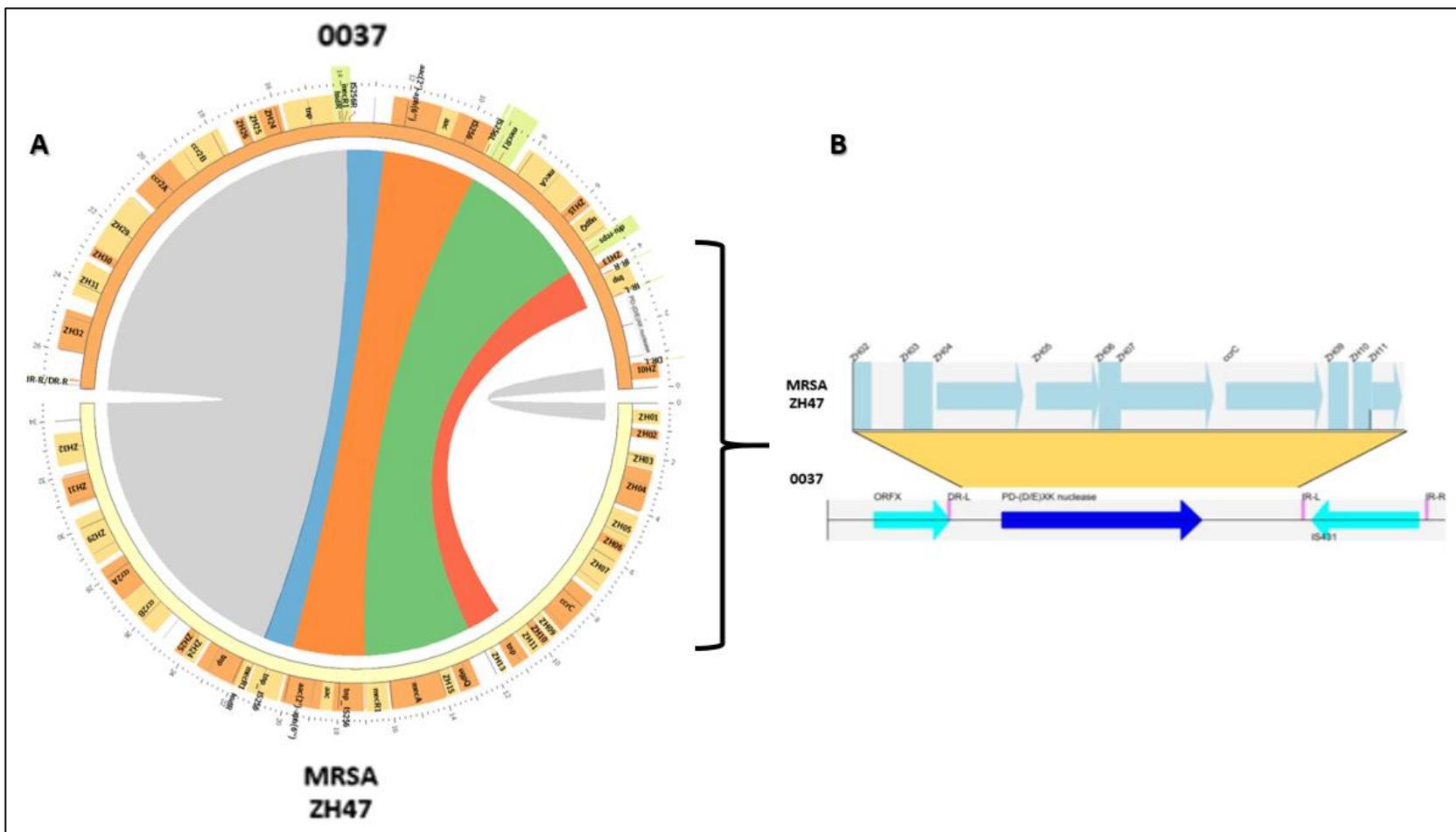


Fig. 40. (A) Esta imagen fue elaborada con el programa Circos utilizando como input los genomas, sus anotaciones y los links son la representación de los hits de Blast entra las zonas de los genomas. En la parte superior, se encuentra el aislamiento 0037 correspondiente a la secuencia del SCCmec del clon HA-MRSA ST100, mientras que en la parte inferior, se encuentra la secuencia del SCCmec detectado en la cepa MRSAZH47. La región que se encuentra en color blanco, representa la zona de discordancia entre ambos genomas. (B) la llave, amplía, utilizando GenomeDiagram de Biopython2, las diferencias entre ambos aislamientos denotado en amarillo. Los demás colores dentro del círculo, indican homología entre ambos SCCmec.

8.3.2 RESULTADOS relacionados al objetivo específico III b

Analizar en forma comparativa la virulencia de los clones MRSA (CA-MRSA y HA-MRSA) más prevalentes en nuestro país, utilizando el modelo en invertebrados de *Galleria mellonella*.

Con la finalidad de evaluar la virulencia de los clones que circulan en nuestro país, se llevó a cabo el estudio de virulencia comparativa en el modelo invertebrado *G. mellonella*, donde se inyectaron un número determinado de larvas con diferentes clones de MRSA tanto HA como CA y se analizó si existían diferencias significativas con respecto a virulencia mediante el análisis de supervivencia a través de la curva de Kaplan-Meier (K-M) [188].

Tabla 17 | Resumen de datos en el análisis de sobrevida

GRUPO	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	N° INDIVIDUOS	EVENTOS	N° de aislamientos por clon	SOBREVIDA (%)
I1	CA-MRSA I-ST5-IVa-t311	180	133	6	26
N4	CA-MRSA N-ST30-IVc-t019	95	65	3	32
USA300	CA-MRSA USA300-ST8-IVa-t008	32	27	4	16
A1	HA-MRSA A-ST5-I-t149	52	23	3	56
B1	HA-MRSA B-ST239-IIIA-t037	36	12	2	67
TOTAL		395	260		34

Como se muestra en la tabla 17 los clones seleccionados finalmente fueron 3 CA-MRSA (CA-MRSA I-ST5-IVa-t311, N-ST30-IVc-t019 y USA300-ST8-IVa-t008) y 2 HA-MRSA (HA-MRSA A-ST5-I-t149 y HA-MRSA B-ST239-IIIA-t037).

El primer análisis se llevó a cabo comparando las curvas de K-M del grupo de clones I1 vs N4 vs USA300 y los A1 vs B1 por separado para evidenciar si existían diferencias entre ellas que impidiera agruparlas como CA-MRSA y HA-MRSA, respectivamente en el análisis final. Se analizaron los aislamientos representativos de cada clon, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre ellos, por lo cual, se pudo agruparlos para aumentar el número por cada clon.

Como resultado, no se encontraron diferencias significativas entre los clones del grupo CA-MRSA $p=0.803$, no obstante, los individuos infectados con el clon N4, las primeras 24 h tiene una sobrevida de 75%, la cual fue levemente menor que la de los clones I1 con un 82% y significativamente ($p=0,028$) menor que la sobrevida de los del clon USA300 que presentó un 95%. Luego, a las 48 hs, los individuos infectados tanto por el clon N4 como el USA300 presentaron sobrevidas comparables del 43% mientras que los infectados por el clon I1 fue

levemente menor con un 38%, cuando finaliza el estudio a las 72 h, las sobrevividas fueron comparables con un 32% para los infectados por el clon N4, 26% para los infectados por el clon I1 y 16% para los infectados por el USA300 (Figura 42A).

No se encontraron tampoco diferencias significativas entre los clones del grupo HA-MRSA $p=0,380$ (figura 41B), con sobrevividas comparables en todo el estudio, donde en las primeras 24 hs, individuos infectados por el clon B1 presentaron una sobrevivida del 95% y los del A1 un 100%, luego, a las 48 hs los individuos infectados por el clon B1 tuvieron una sobrevivida del 80% mientras que los del A1 una sobrevivida de 88%, con una leve diferencia a las 72 hs, donde los individuos infectados con el clon A1 presentaron una sobrevivida del 56% mientras que los del B1 fue del 70%. En el grupo de clones HA-MRSA se extendió 24 hs más el análisis debido al bajo número de eventos, no encontrando diferencias en sobrevivida para los infectados por el clon A1 (56%) mientras que para los del clon B1 la sobrevivida cayó a un 70%.

Figura 42 | Curvas de sobrevivida de los clones CA-MRSA y HA-MRSA

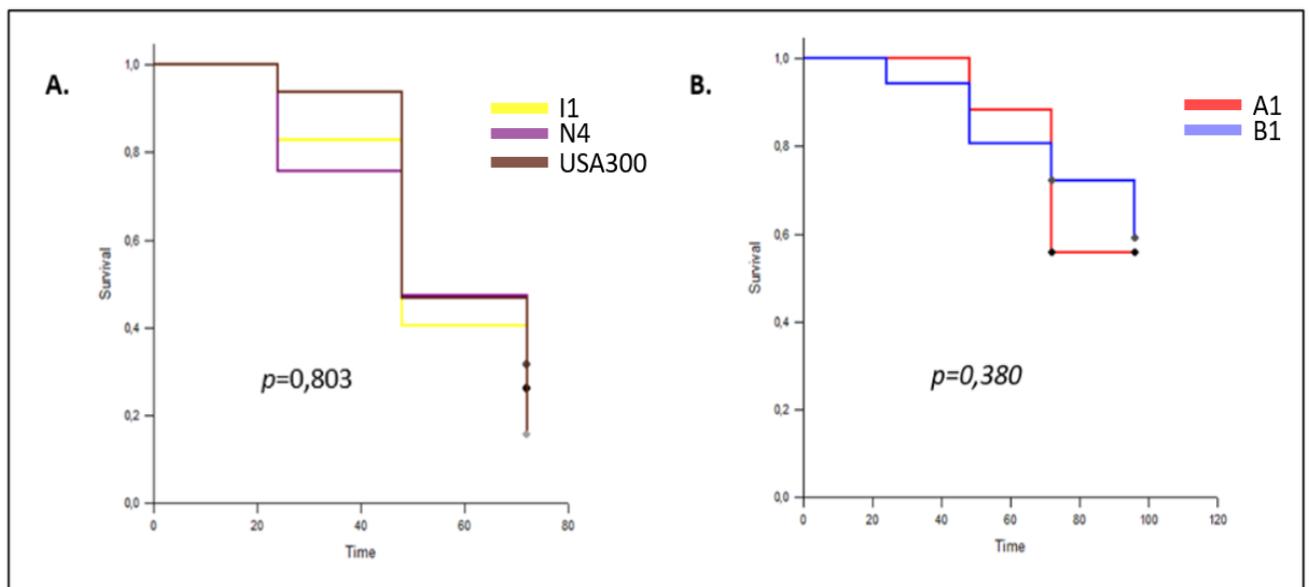


Fig.42. Curvas KM comparando las sobrevividas de los clones de MRSA, A. clones CA-MRSA (I1, N4 y USA300) y B. Clones HA-MRSA (A1 y B1)

Una vez realizada la comparación entre clones y habiendo determinado que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos, se procedió a agrupar los clones CA-MRSA y HA-MRSA y realizar un análisis de virulencia comparativa.

Figura 43 | Análisis de virulencia comparativa entre HA-MRSA y CA-MRSA

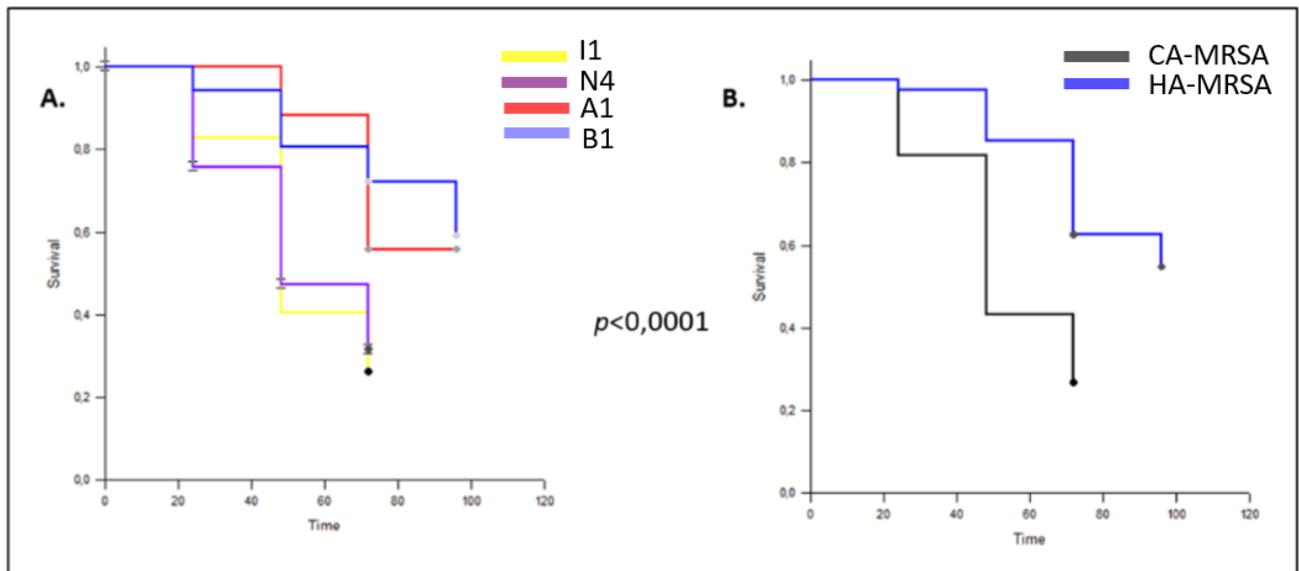


Fig.43. Muestra las curvas KM comparando los clones CA-MRSA y HA-MRSA agrupados. A. Clones HA-MRSA y CA-MRSA por separado, B. clones HA-MRSA vs CA-MRSA agrupados.

En los resultados obtenidos por el análisis de las curvas de K-M (figura 43) se encontraron diferencias estadísticamente significativas en todas las combinaciones entre los clones N4, I1 y USA300 con los clones A1 y B1 ($p < 0,001$), así como también al analizarlos agrupados en CA-MRSA vs HA-MRSA ($p < 0,001$), lo cual indica, que de acuerdo a este modelo de virulencia comparativa, los clones CA-MRSA de nuestro país, presentan mayor virulencia que los clones HA-MRSA.

8.3.3 CONCLUSIONES GENERALES DE RESULTADOS III

- ✓ El análisis por WGS de una muestra representativa del CC5 (n: 20) de diferentes regiones del país, tanto MSSA como MRSA, recuperados a partir de infecciones en la comunidad y en el hospital desde 1999 al 2015, permitió confirmar un ancestro común MSSA que data de 1937, el cual dio origen a la emergencia por un lado de los clones MRSA en el ámbito hospitalario (HA-MRSA) y por el otro a los clones MRSA en la comunidad (CA-MRSA). En el ámbito hospitalario emergieron a partir de un ancestro común en el año 1956, tanto el clon Cordobés/Chileno ST5-I expandiéndose a partir 1992, como la variante argentina del clon pediátrico ST100-IVNv a partir del año 1979. En la comunidad el ancestro MSSA evolucionó adquiriendo variaciones genéticas que posiblemente facilitaron su diseminación, como genes codificantes de factores de virulencia como *pvl*, *sea* y *sep* en un fago del grupo ϕ Sa2 llamado ϕ Sa119. Para luego expandirse aproximadamente en el año 1990, para dar un precursor MSSA que a partir del año 1991 divergió adquiriendo el SCCmec IVa y dando origen al clon CA-MRSA-ST5-IVa, *pvl*, *sea* y *sep* positivos, causando brotes epidémicos en las diferentes regiones del país. Además, se logró caracterizar la nueva variante del SCCmec-IV, identificada previamente por nuestro grupo de investigación.
- ✓ En el estudio de virulencia comparativa usando el modelo de invertebrado *G. mellonella*, se seleccionaron aislamientos pertenecientes a los clones CA-MRSA y HA-MRSA prevalentes en nuestro país. Al analizar por separado los aislamientos de cada grupo, no se encontraron diferencias significativas entre los aislamientos del mismo clon ($p > 0,05$), lo cual permitió agruparlos para hacer un análisis general de mayor potencia estadística.
- ✓ En el análisis global, los clones CA-MRSA más prevalentes en nuestro país I-ST5-IVa-t311 y N-ST30-IVc-t019, presentaron una virulencia significativamente mayor ($p < 0,001$) comparada con los clones HA-MRSA A-ST5-I-t149 y B-ST239-IIIA-t037, según en el modelo *G. mellonella*.

9. DISCUSIÓN

S. aureus resistente a la meticilina (MRSA), representa un paradigma epidemiológico, debido a su importancia en salud pública, que se caracteriza por su patogenicidad, la capacidad de adquirir multirresistencia antibiótica y por su potencial para la diseminación. Debido a estas características es que la Organización Mundial de la Salud (OMS), reconoce a MRSA como uno de los 3 microorganismos multiresistentes más importantes que causan infecciones tanto en los hospitales como en la comunidad [189]. Su epidemiología mostró una rápida evolución, después de ser un patógeno con multirresistencia a los antibióticos del hospital-(HA-MRSA), emergió en la comunidad-(CA-MRSA) con características genéticas diferentes, alta virulencia, transmisibilidad y sin la multirresistencia asociada, considerada, por la OMS dentro de la Lista de alta prioridad de bacterias resistentes a los antibióticos para guiar la investigación, el descubrimiento y el desarrollo de nuevos antibióticos [190].

En Argentina, hasta el año 2008, aproximadamente 50% de los aislamientos nosocomiales de *S. aureus* eran MRSA y el principal clon responsable de estas infecciones, fue un clon epidémico HA-MRSA, denominado clon Cordobés/Chileno (ST5-SCCmec I), identificado en nuestro laboratorio [141, 142, 148]. En el período 2001-2008, por otro lado, se produjo un incremento significativo de las infecciones por *S. aureus* detectadas en la comunidad, alcanzando prevalencias mayores al 50% en pediatría en el centro, norte y este del país. Este fenómeno obedeció a la diseminación del clon epidémico CA-MRSA, ST5-IVa-t311-PVL⁺ no detectado previamente como clon predominante, en ningún lugar del mundo [148, 149]. En el año 2009 la prevalencia de MRSA, en un estudio multicéntrico realizado por nuestro grupo (en 66 hospitales de 20 provincias argentinas y CABA) llegó al 55%, con un claro predominio de genotipos CA-MRSA_G (39%) sobre HA-MRSA_G (16%). Resultó de gran interés, que el 16 % de las infecciones nosocomiales, las ocasionaron cepas CA-MRSA_G [150].

La extensa bibliografía refiere que la colonización del sitio nasal y otros sectores del cuerpo con MRSA, constituye un factor de riesgo para el ulterior desarrollo de la infección por este agente. Se ha descrito además, que existe una correlación, entre la prevalencia de portadores en el momento de la hospitalización y la incidencia de infecciones asociadas al cuidado de la Salud (HA o IACS). Algunos estudios han descrito la Prevalencia y los Factores de Riesgo, para portación de CA-MRSA fuera del Hospital [118, 191, 192].

A pesar del aumento en la prevalencia de infecciones por CA-MRSA_G en todo el mundo [2, 150], la comprensión actual del estado del portador de CA-MRSA_G en el momento del ingreso y su papel en las infecciones adquiridas en el hospital (inicio en el hospital/asociada al hospital / HAHO) no está clara, por lo que es necesario dilucidar cuándo, cómo y dónde se adquiere la colonización para concentrar esfuerzos en la prevención de MRSA. Además, hay pocos estudios

que informen datos sobre la colonización en el ingreso hospitalario, tanto en pediatría como en adultos [193, 194], menos aún en países en desarrollo como los latinoamericanos [195, 196].

De acuerdo a lo antes expuesto, en este trabajo de tesis, se llevó a cabo un estudio longitudinal que proporciona la primera descripción completa, en Argentina (Córdoba), sobre epidemiología molecular y factores de riesgo para la portación de MRSA, considerando los genotipos CA-MRSA_G y HA-MRSA_G, en el momento del ingreso hospitalario y su relación con las infecciones HAHO.

El hallazgo más relevante de la primera parte de esta tesis, fue que se pudo demostrar que los clones de CA-MRSA, en particular ST5-IV-PVL⁺ y ST30-IV-PVL⁺, no sólo ingresaron a los hospitales, sino que también se adquieren en ellos y probablemente se transmitan causando infecciones adquiridas en el ámbito hospitalario (HO), las cuales son prevenibles con un adecuado programa de control de infecciones. Además, la comunidad sigue siendo el reservorio más probable para estos clones CA-MRSA.

Comparado con los valores de prevalencia de colonización por *S. aureus* en países europeos (12,7% -29,8%), norteamericanos (28,6%, 37,1%) y asiáticos (23,1%, 35,7%), la prevalencia de colonización por *S. aureus* en la población de Córdoba (Argentina) (30,9%, IC 95%: 28,6% a 33,4%), está dentro del rango superior [197-199]. Es importante destacar que la prevalencia de portación de MRSA entre 1419 pacientes ingresados en las ocho instituciones de Córdoba, Argentina, fue de 4,2% (IC 95%: 3,3% a 5,4%), y varió de 1,6% a 11,0% en todos los hospitales. Estas tasas de prevalencia fueron consistentes con estudios previos de Estados Unidos y Europa [118, 193, 200, 201]. Con tasas entre 4,2% y 7,3% en los Estados Unidos, particularmente relacionadas con la propagación del clon CA-MRSA USA300 [2, 202], y niveles más bajos en algunos países europeos (1,3-2,1%), en este caso relacionados a la diseminación de genotipos HA-MRSA_G, como el clon ST22-IV [194, 198]. Además, en el presente trabajo de tesis, se estudiaron 3 sitios de portación y se usó el cultivo en caldo de enriquecimiento para disminuir los falsos negativos, aumentando la sensibilidad para detectar la colonización por MRSA. Es importante destaca, que nuestros resultados, en línea con otros estudios [203, 204], evidencian que, si sólo se hubiera estudiado el cultivo del sitio nasal en nuestra población, habríamos perdido el 35% de los pacientes colonizados por MRSA. Este hallazgo es de suma trascendencia en la organización de medidas de control de infecciones que consideren utilizar la detección del estado de colonización, en nuestro país y en el mundo en general.

Además, de todos los pacientes admitidos, 3,2% fueron colonizados por CA-MRSA_G; y sólo el 1% por HA-MRSA_G, de modo que CA-MRSA_G representó el 77% de los aislamientos de MRSA. La tasa general de adquisición de MRSA fue de 2,3 (IC 95%: 1,5 a 3,4) por cada 1.000 días-pacientes y el porcentaje de pacientes en riesgo que adquirieron MRSA, 1,96% (IC 95%, 1,0% a

3,4%). Es importante destacar que el 100% de los MRSA adquiridos fueron CA-MRSA_G. Este hallazgo confirmó nuestros resultados anteriores [150], así como también respalda un reporte previo acerca de que la comunidad es el reservorio más probable para la colonización CA-MRSA_G [205], pero además, también llegamos a la conclusión de que estas cepas no sólo han ingresado sino que también se adquieren en el entorno hospitalario y causan infecciones HAHO.

Por lo tanto, es esencial conocer la población específica en riesgo de adquisición de CA-MRSA para realizar estrategias dirigidas para su control. Con respecto a esto, los resultados de este estudio demuestran que la población pediátrica, particularmente entre 1 y 18 años, sigue siendo el grupo de mayor riesgo de colonización por CA-MRSA_G al momento de la admisión, lo que provoca un mayor nivel de Presión de Colonización, llevando a su vez a mayores tasas de adquisición de CA-MRSA_G en el hospital. En consecuencia, se convierten en el grupo de mayor riesgo para las infecciones nosocomiales o HAHO, avalando nuestro trabajo anteriormente publicado [150], así como otros estudios [201, 206]. Por lo que se destaca la necesidad de encontrar mejores métodos para prevenir las infecciones por MRSA en los niños.

En el análisis de los factores de riesgo (FRs), siete FRs se asociaron de forma independiente con la colonización por MRSA al ingreso: pacientes menores de 19 años (predominantemente entre 1 y 18 años), presencia de al menos una necesidad básica insatisfecha (considerada como indicadores indirectos de pobreza), residencia en geriátrico o en un centro de rehabilitación, uso previo de antibióticos, antecedentes de infección / colonización por MRSA en el último año, presencia de un dispositivo médico y presentación de enfermedades respiratorias crónicas como el asma. Además, los cuatro primeros FR y los dos últimos se asociaron con CA-MRSA_G y HA-MRSA_G respectivamente, lo que refleja diferentes orígenes y nichos de transmisión de estos genotipos. Estos hallazgos respaldan nuestros resultados anteriores en Argentina [150], y presentan similitud con un análisis reciente en Reino Unido [207], en el que algunas características sociodemográficas (hacinamiento y bajos ingresos, entre otros) fueron FR para infecciones por CA-MRSA_G.

Las cepas de MRSA de portación mostraron un perfil de resistencia a los antibióticos muy similar al de las cepas de MRSA informadas en las muestras clínicas [149, 150], la resistencia a múltiples antibióticos se produjo exclusivamente en los aislados de HA-MRSA_G, además, no se detectó resistencia a la mupirocina, siendo este último el más eficaz y el más utilizado para la descolonización nasal de MRSA.

La carga de infecciones asociadas al hospital (IAH) en los países en desarrollo, como Argentina, es mucho mayor que los reportados desde Europa y los Estados Unidos [195]. En Argentina, se informaron recientemente tasas más altas de IAH en pacientes hospitalizados pediátricos (8,6 / 1000) que en pacientes adultos (2,3 / 1000) (Ministerio de Salud y Desarrollo

Social, 2018). Después de debatir en los últimos años sobre qué método de detección de colonización por MRSA de la admisión, es el más eficaz para disminuir la transmisión nosocomial de MRSA como medida de control de la infección (CI) [208-211], hay muchos estudios que sugieren que la detección basada en factores de riesgo es clínicamente eficaz y puede ser una estrategia rentable [208, 212, 213]. Por ello, en lo que respecta a la utilidad de diversos FR para aumentar la eficacia de la detección de MRSA en el momento del ingreso, encontramos que los FR individuales, considerados sólo, carecían de sensibilidad para ser utilizados en la detección de la portación de MRSA. Aunque la detección de la presencia de cualquiera de los cuatro FR detectó el 98,9% (sensibilidad) del MRSA en la admisión, requirió cultivos de vigilancia (carga de detección) para el 73,9% de las admisiones, siendo poco práctico y costoso para implementar de forma rutinaria. Una opción más asequible podría ser excluir la edad <19 años como FR, y luego usar cualquiera de los 3 FR restantes (Tabla 5). De esta manera, la mayoría (90%) de los portadores de MRSA tenían al menos uno de ellos: i) presencia de al menos una Necesidad Básica Insatisfecha, ii) uso de antibióticos en el último año y iii) enfermedades respiratorias crónicas como el asma, con una carga de vigilancia de 57,6% de ingresos. Estos datos regionales proporcionarán información para dirigir recursos limitados relacionados con las estrategias de control de la transmisión del MRSA, particularmente en un contexto de un sistema de atención de salud de ingresos medios / bajos, y por lo tanto contribuirán al control de la resistencia a los antibióticos en todo el mundo [214]. Además, toda esta información, de acuerdo con evidencia reciente [215], ayudaría a un uso más selectivo de las precauciones de contacto o la descolonización en Argentina, donde las tasas de infección por MRSA son superiores al 50%, tanto en la comunidad como en el entorno hospitalario [150].

Por otro lado, no hay muchos datos con respecto a la transmisibilidad en entornos hospitalarios de distintos genotipos de MRSA involucrados en cada región. Hay evidencia de una menor transmisibilidad de las cepas CA-MRSA_G frente a HA-MRSA_G en los hospitales daneses [216]. En contraste, se encontró una dinámica de transmisión similar para las cepas CA-MRSA y HA-MRSA en un hospital pediátrico de EE. UU. [217]. Además, hay estudios que sugieren que la transmisión directa de persona a persona y de fómites a personas asociada con cepas de CA-MRSA_G [218], parece desempeñar un papel más importante que la colonización nasal para las infecciones y la transmisión de CA-MRSA_G [219, 220].

En este estudio, las cepas CA-MRSA_G representaron el 84,6% de las cepas de MRSA importadas y el 100% de las cepas adquiridas en el hospital. Además, el 75% (3/4) y sólo el 41% (9/22) de los pacientes que importaron HA-MRSA_G y CA-MRSA_G respectivamente, fueron descolonizados espontáneamente al momento del alta. Aunque nuestra cohorte tuvo relativamente pocos episodios de adquisición de MRSA comprometiendo el análisis estadístico

de los datos, todos ellos fueron causados por CA-MRSA_G. Estos resultados sugieren que las cepas de CA-MRSA_G tienen una capacidad de transmisión mayor o similar, pero no menor, que las cepas de HA-MRSA_G en el entorno hospitalario. Este hallazgo podría vincularse a un estado de colonización más persistente o una relación más estable entre la cepa y el hospedador en el tiempo [221]. Además, 2 de 3 infecciones por cepas CA-MRSA_G adquiridas en el hospital, fueron sólo detectadas en muestras clínicas con hisopados de portación negativos para MRSA, lo que sugiere la implicancia de diferentes reservorios ambientales en el hospital, como fue reportado previamente [222].

Las adquisiciones y las descolonizaciones espontáneas de MRSA en la población de estudio fueron procesos equilibrados, donde las pérdidas de cepas de MRSA fueron compensadas por una nueva adquisición y la permanencia en el tiempo de algunas cepas. De esta forma, el 34,6% (9/26) de los pacientes con MRSA importado permanecieron colonizados [en su mayoría (89%, 8/9) con CA-MRSA_G] hasta el alta y el 1,9% (10/534), adquirieron MRSA (todos CA-MRSA_G). En consecuencia, 3,2% (17/534) de los pacientes fueron dados de alta a la comunidad con MRSA (94% identificados como CA-MRSA_G), probablemente con mayor riesgo de infección posteriores luego del alta [193]. Es importante destacar que estas cepas, después de estar en el entorno hospitalario con una mayor presión de los antibióticos, pueden aumentar el reservorio en la comunidad para la diseminación no sólo dentro de los sitios comunitarios (hogares, escuelas, guarderías) [221], sino también entre hospitales a través de pacientes con admisiones múltiples [207]. Por lo tanto, para optimizar las estrategias de control de infecciones para MRSA, las intervenciones deben dirigirse a pacientes de alto riesgo para el transporte de cepas MRSA para interrumpir la cadena de transmisión entre el hospital y la comunidad. El desarrollo de estrategias mejoradas para apuntar a esto también dependerá de una mayor comprensión de los diferentes factores (determinantes microbiológicos-moleculares de las cepas, interacciones entre bacterias y huéspedes y factores ambientales) que contribuyen al éxito de estos clones epidémicos.

La epidemiología molecular de la colonización por MRSA al ingreso reveló que la mayoría de estas cepas de MRSA pertenecían a los principales clones de MRSA epidémicos diseminados en Argentina: los dos clones principales CA-MRSA [PFGE tipo I-ST5-IV, 28,3% (*spa-t311* y relacionados, 94,1% *SCCmec-IVa*, y la mayoría de ellos (70.6%), portaban genes *pvl* y *sea*) y N-ST30-IV / SWP, 20%, (*agr3*, *spa-t019* y relacionados, 71,4% *SCCmec-IVc*, todos ellos con los genes *egc-lukED-bbp-cna* y 71,4% con genes *pvl*)] y la variante argentina del clon pediátrico HA-MRSA_G C-ST100-IVNv (12%, *agr2*, *spa-t002* y relacionados). Al igual que en otros estudios, el perfil de los genes de virulencia estuvo fuertemente vinculado al *background* genético de cada cepa [137, 150, 198].

Estos resultados avalan nuestro estudio anterior sobre las infecciones por MRSA [150], en el cual, a diferencia de Europa, donde la mayoría de las cepas de MRSA encontradas en la comunidad son HA-MRSA, particularmente el clon ST22-IV [2, 198], en Argentina como en los países de América del Norte, los clones CA-MRSA son endémicos y predominan uno (USA300 en los EE. UU.) o dos clones (ST5-IV y ST30-IV en Argentina) [2, 150].

Cuando se estratificó por edad, del total de pacientes pediátricos y adultos, sólo se detectó una mayor proporción de colonización en pediatría que en adultos para el clon ST5-IVa de CA-MRSA (2,1% vs 0,4%). Esta preferencia por la colonización en pediatría de este clon también se detectó previamente para las infecciones HO y CO [150].

En este estudio, demostramos que el 40% de las adquisiciones de MRSA, fueron causados por el clon CA-MRSA ST5-IVa-PVL⁺, todos los casos asociados a colonización, seguidos por los clones CA-MRSA: ST30-IVc-PVL⁺ (20%, fueron dos casos y ambos asociados a infecciones adquiridas con cultivo de portación negativo y muestras clínicas positivas) y el clon CA-MRSA ST72-IVc-PVL⁻ (20%). Es importante destacar que el 44% (4/9) de los pacientes que permanecieron colonizados durante la estancia hospitalaria, fueron colonizados por el clon CA-MRSA ST5-IVa PVL⁺ (todos eran niños) y sólo uno (11%) por el clon CA-MRSA ST30-IVc-PVL⁺. Todos estos resultados son comparables con otros estudios [221, 223], sugiriendo un reservorio ambiental distinto, relacionado a una capacidad de persistencia y por consiguiente de transmisión diferentes para cada clon, particularmente en niños.

En un paciente colonizado e infectado por el clon CA-MRSA ST5-IVa-PVL⁺, también se compararon los pares de aislamientos de la herida y de portación al ingreso y al alta (aislamientos nasales) mediante la metodología de secuenciación del genoma completo (WGS). Este método confirmó que todos los aislamientos pertenecían al mismo subtipo dentro del huésped y a lo largo del tiempo, demostrando su persistencia y permanencia con capacidad de transmisión después del alta a pesar del tratamiento antibiótico sistémico con clindamicina.

Además, la proporción de clones MRSA adquiridos en el hospital, detectados en este estudio son comparables con hallazgos previos de nuestro grupo [150], donde las infecciones HO en pediatría (definidas según los criterios del CDC, > 48 h después del ingreso), se asociaron principalmente con el clon CA-MRSA-ST5-IVa-PVL⁺ (46%) seguido del clon CA-MRSA ST72-IVc (25%) y la variante argentina del clon pediátrico HA-MRSA ST100-IVNv (12%). En consecuencia, estos hallazgos indican que el otro clon principal CA-MRSA ST30-IVc-PVL⁺ también ha ingresado y es adquirido en los hospitales. Estos resultados fueron corroborados en la segunda parte de esta tesis, cuando se analizaron los clones causantes de infecciones tanto aquellas detectadas en la comunidad como las detectadas en el hospital a lo largo de todo el país.

Es importante destacar que otro hallazgo del presente estudio fue que el clon HA-MRSA, denominado variante Argentina del clon pediátrico [142, 149, 150], ST100-IVNv [con un SCCmec estrechamente relacionado con SCCmecIV (2B y 5)] [149], fue uno de los principales clones de MRSA que colonizaron pacientes en el momento del ingreso. Este resultado respalda la importancia de la colonización como reservorio para la permanencia en el tiempo de este clon HA-MRSA “escapado” del hospital a la comunidad [149]. Este clon ha causado infecciones asociadas al cuidado de la salud, tanto en el entorno hospitalario (HAHO), donde permaneció en el tercer lugar en prevalencia, desde 1998 hasta 2009 y en la comunidad (HACO), antes de la aparición del clon CA-MRSA ST5-IVa-PVL⁺. Además, también se lo detectó como el clon principal (69%) que coloniza a los trabajadores de la salud (n: 126) en un hospital infantil de Paraguay en 2009 (Carpinelli L, Guillén Fretes RM y Sola C, datos no publicados). Por lo tanto, este clon HA-MRSA, constituye una preocupación para la salud pública, no sólo en Argentina sino también para los países vecinos, teniendo en cuenta todas las características del mismo: i) es uno de los clones principales que colonizan a los pacientes al momento del ingreso, lo que se demuestra en este estudio, ii) la alta estabilidad en el tiempo en nuestro país, causando infecciones, particularmente invasivas [141, 142, 148-150] iii) su capacidad para causar brotes en pacientes infectados y colonizados [224], iv) su capacidad para expresar el fenotipo h-VISA [149, 225], junto con el hecho de que la vancomicina todavía se considera la terapia de primera línea para las infecciones invasivas por MRSA [202], v) Su capacidad para adquirir resistencia a los antibióticos y nuevos tipos de SCCmec [149, 224].

Entre los restantes clones CA-MRSA que colonizan pacientes al ingreso, el clon R-ST72-IVc, DD- ST97-IV, USA300 VL-ST8-IV e Y-ST509-IVa representaron el 13,3%, 6,7%, 5% y 1,7% respectivamente. Todos estos clones se detectaron en nuestros estudios anteriores como clones menores, causando infecciones de CO y HO en Argentina [149, 150].

Es importante destacar que el clon HA-MRSA cordobés / chileno A-ST5-I siendo el principal clon HA-MRSA en Argentina sólo representó el 6,7% de los clones de MRSA importados, lo que respalda la falta de transmisión sostenida fuera de las instalaciones sanitarias de los clones de HA-MRSA tradicionales [207].

Curiosamente, también detectamos el clon CA-MRSA ST97-IV como un clon menor colonizando pacientes en el ingreso (n: 5), entre ellos, un aislamiento permaneció colonizando durante la estancia hospitalaria y otro fue adquirido en el hospital. Estos resultados sugieren que este clon, el cual está relacionado con infecciones en el ganado (LA-MRSA) [144], también se puede transmitir en hospitales de nuestro país, con el riesgo de adquirir resistencia a los antibióticos por la exposición a ellos, y luego transmitirse al ganado, que representa una de las

principales fuentes económicas de Argentina. Este hecho destaca a la resistencia antimicrobiana como un problema mundial de múltiples huéspedes [214].

Otro hallazgo importante fue la identificación de dos aislamientos que pertenecen a dos clones epidémicos de MRSA nunca antes reportados en Argentina causando infecciones: el clon HA-MRSA USA600-AA-ST45-II-t2233 PVL⁻ y el clon CA -MRSA W-ST59-IVa-t437 PVL⁻ (un aislamiento cada uno), por lo cual, se recomendaría su vigilancia molecular en el tiempo. El ST45-II pertenece a uno de los cinco principales CC de HA-MRSA (CC5, CC8, CC22, CC30 y CC45) identificados por MLST, que circulan internacionalmente. El CC45 se detectó en EE. UU., Canadá (ST45-II) y Europa (ST45-IV / V) [2, 226]. Aunque, se han detectado bajos niveles de prevalencia en la colonización o infecciones por MRSA USA600 en los Estados Unidos [227], se asoció con altas tasas de mortalidad y fracaso terapéutico en bacteriemias y con la capacidad de expresar el fenotipo h-VISA (más del 50% de los aislamientos) [228]. El clon ST59, parece ser el linaje CA-MRSA más prevalente en el área de Asia-Pacífico (incluyendo Taiwán y Australia) en la comunidad, aunque también comenzó a propagarse dentro del hospital [2]. En este linaje se identificaron dos clones epidémicos principales, el clon de Taiwán: ST59-VT-t437 PVL⁺, con un alto potencial patógeno que causa enfermedades graves [229], y el clon comensal de Asia y el Pacífico: ST59-IV / spat437 / PVL⁻, como un colonizante frecuente de niños sanos [2, 229].

Las fortalezas de este estudio incluyen el diseño longitudinal prospectivo, la alta sensibilidad del procedimiento para detectar la colonización en 3 sitios del cuerpo, la extensa caracterización molecular de los aislamientos colonizantes, incluida la detección de descargas y el alcance de la información sociodemográfica recopilada en Córdoba, Argentina, que representa la prevalencia promedio de MRSA del país [150].

La limitación más importante de este estudio es el período relativamente corto de inclusión en cada centro y, como resultado, el bajo número de casos de colonización en el momento de la admisión y el de adquisiciones hospitalarias. Esto ha llevado a un análisis multivariado de baja potencia, lo que implica que probablemente no se hayan detectado algunos factores de riesgo para la colonización. Sin embargo, los FR detectados se pueden utilizar con una eficacia y precisión adecuadas para la detección. En segundo lugar, realizamos la caracterización molecular de un sólo morfotipo de colonia de MRSA por sitio corporal y, por lo tanto, es posible que no hayamos podido detectar subpoblaciones de minorías coexistentes [230]. Existe evidencia sobre el bajo nivel de diversidad dentro del huésped en el colonizante recién adquirido, lo que apoya que el análisis de una sola colonia probablemente identifique grupos estrechamente relacionados de manera confiable en este contexto [230]. Por último, no

hemos estudiado las redes de transmisión dentro del hospital, por lo que no pudimos saber cuáles son los principales reservorios y rutas de transmisión de CA-MRSA_G en el hospital.

Como conclusión de esta primera etapa, es importante destacar, que por medio de la vigilancia molecular local de la colonización por MRSA, este estudio amplía la literatura existente y proporciona información sobre los factores asociados con la portación de CA-MRSA_G en la comunidad como reservorio para el ingreso al hospital, transmisibilidad, nuevas adquisiciones, descolonizaciones espontáneas y permanencia de ciertas cepas, resultando un proceso dinámico de transmisión entre el hospital y la comunidad. Estas contribuciones serán útiles, especialmente en niños, para desarrollar estrategias mejoradas de control de infecciones que apunten a interrumpir esta cadena de transmisión.

En la segunda parte de este trabajo de tesis se procedió a determinar la evolución clínica y molecular de las infecciones por MRSA en nuestro país. Para ello, se llevó a cabo un estudio de carácter prospectivo multicéntrico a nivel nacional durante el mes de abril de 2015, con la participación de 61 hospitales de 20 provincias sumada la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Este estudio proporcionó una descripción a nivel nacional acerca de la epidemiología de CA-MRSA_G y HA-MRSA_G como causa de infecciones de inicio en la comunidad (CO) y de inicio en el hospital (HO) en Argentina. Donde el hallazgo de mayor relevancia se dio en las infecciones detectadas en el hospital, lo que confirmó el desplazamiento de los clones tradicionales ST5-I y el clon ST5-IV del ambiente hospitalario debido a la diseminación del clon ST30-IV.

Los MRSA representaron el 51% del total de las infecciones causadas por *S. aureus*. La combinación de los resultados obtenidos por todos los métodos de caracterización molecular utilizados mostró que la mayoría (88,6%) de los MRSA se clasificaron como CA-MRSA_G, mientras que el restante 11,4% como HA-MRSA_G. Es importante destacar, que se encontró una proporción significativamente mayor de CA-MRSA_G que HA-MRSA_G no sólo en las infecciones CO (48% vs 2,8%, respectivamente $p < 0,0001$) sino que también en las HO (38,6% vs 13,2%, respectivamente $p=0,0009$). Ésto denota el impacto en la salud pública que ha producido la entrada de los clones CA-MRSA, al ámbito hospitalario, principalmente a causa de la diseminación del clon CA-MRSA_G ST30-IV, tanto en pediatría como en adultos, desde la región del norte hacia el centro y sur del país, desplazando como principal causa de infección, dentro de los hospitales al tradicional clon HA-MRSA_G ST5-I (clon cordobés/chileno) y también al clon CA-MRSA_G ST5-IV, el cual, ya había sido detectado previamente dentro de los hospitales como segundo clon más prevalente [150].

A partir del análisis de sensibilidad a los antibióticos, es importante destacar que, la multi-resistencia a otros antibióticos además de los β -lactámicos, se produjo exclusivamente en aislamientos con genotipos HA-MRSA_G y el 96,4% de todos los aislamientos CA-MRSA_G fueron

sólo resistentes a no más de un antibiótico no- β -lactámico. Por lo tanto, la definición fenotípica o microbiológica para diferenciar CA-MRSA [MRSA con resistencia (R) a no más de un antibiótico (ATB)] de HA-MRSA, utilizada en la primera etapa de análisis de este trabajo de tesis y en los laboratorios de microbiología clínicos fue significativamente asociada con la definición genotípica ($p < 0,0001$) y correctamente identificó el 96% de todos los aislamientos de MRSA. (96% de sensibilidad, 97% de especificidad, 99,7% de valor predictivo positivo y 74,5% de valor predictivo negativo). Este aporte del trabajo de tesis representa una herramienta muy útil brindada a los laboratorios de Microbiología clínica de Argentina y posiblemente de países limítrofes, para evaluar, en primera instancia, la transmisión de estas cepas, especialmente a nivel hospitalario, contribuyendo al control de las infecciones de inicio en el hospital. Siempre es importante la validación con los métodos moleculares a lo largo del tiempo, para detectar posibles cambios en el perfil de resistencia a los antibióticos de los diferentes clones, debido a que *S. aureus* tiene una gran potencialidad para adquirir resistencia a los antibióticos después de la exposición a los mismos, lo que se produce en mayor medida en el ámbito hospitalario.

La entrada de los clones CA-MRSA a los hospitales a partir de un gran reservorio en la comunidad tiene importantes implicancias clínicas en nuestro país para el diagnóstico y tratamiento de las infecciones por *S. aureus*, ya que para las infecciones detectadas en la comunidad ya no se podrían utilizar los ATB β -lactámicos de forma empírica, especialmente en pediatría. Dentro de las otras opciones, se pudo demostrar el incremento, durante el período 2009-2015 de aislamientos sensibles a clindamicina, relacionado a la diseminación del clon ST30-IVc desplazando al otro clon CA-MRSA ST5-IV, el cual tiene mayores tasas de resistencia a estos antibióticos. Estos resultados tienen importantes consecuencias clínicas, ya que la clindamicina es una excelente opción terapéutica, con buena biodisponibilidad oral y excelente penetración en los tejidos (especialmente en los huesos y los abscesos), tiene mejor sensibilidad *in vitro* para cepas CA-MRSA que para cepas de HA-MRSA y se ha utilizado con éxito en pediatría con infecciones invasivas por CA-MRSA [231]. Por el otro lado, a nivel hospitalario habría más opciones de tratamiento para las infecciones por MRSA, relacionado a dos fenómenos, la diseminación en los hospitales de las cepas CA-MRSA que son sensibles a un número mayor de ATB no- β -lactámicos que las cepas HA-MRSA, y a la entrada de otro clon CA-MRSA ST30-IVc que presenta menores tasas de resistencia que el clon CA-MRSA ST5-IVa que había ingresado previamente. Sin embargo, no se debe dejar de tener en cuenta la incrementada capacidad natural de este patógeno de adquirir diferentes mecanismos de resistencia a antibióticos.

La sensibilidad a ceftobiprol fue del 98,8% en el total de *S. aureus* y presentó un 97,7% de sensibilidad entre las cepas de MRSA, sólo presentando resistencia en 8 aislamientos pertenecientes al clon HA-MRSA_G ST5-I (cordobés/chileno), el cual tiene el *Scm* mec I.

Similarmente, en un estudio [232], donde se analizaron aislamientos 121 aislamientos de MRSA de diferentes CC, recuperados de Europa, Asia, Africa, America del Norte y America del Sur, detectaron 96,4% de sensibilidad a ceftobiprol. Sólo 11 aislamientos tuvieron un valor de CIM de 4 µg/ml, y todos portaban un SCCmec tipo I o III. Si bien, en ese estudio, 10 aislamientos del clon cordobés/chileno ST5-I fueron analizados (7 provenían de Argentina recuperadas entre 2005 y 2007), ninguno tuvo un valor de CIM de 4 µg/ml. La aparición de cepas resistentes a ceftobiprol antes que este antibiótico se comenzara a usar en la práctica clínica en Argentina (2017), avala la vigilancia de este tipo de resistencia. Actualmente, el ceftobiprol está aprobado para el tratamiento de adultos con neumonía adquirida en el hospital (excluyendo la neumonía asociada a ventilación) y neumonía bacteriana adquirida en la comunidad en un gran número de países incluido Argentina, y está siendo evaluada en estudios en fase III, para el tratamiento de enfermedades invasivas como bacteriemias incluida endocarditis [233], lo que promete ser una opción de importancia para el tratamiento de infecciones invasivas causadas por cepas MRSA, principalmente por CA-MRSA en nuestro país.

Del total de las cepas MRSA (n:341) sólo una, presentó resistencia a mupirocina con un valor de CIM>1024 ug/ml, relacionado a la adquisición del gen *mupA*, posiblemente alojado en un plásmido que favorece su diseminación [173]. Esta resistencia de alto nivel fue detectada en una cepa CA-MRSA genotificada como N-ST30-IV-t019, en un paciente de 8 años de edad que presentaba una infección de inicio en la comunidad (CO) de piel y partes blandas caracterizada como celulitis, el paciente no había tenido contacto previo con el hospital y tampoco había recibido tratamiento antibiótico en el año previo. Este hallazgo fue de interés, debido a que si bien se detectó sólo en un paciente del total analizado (0,3%), mupirocina es el antibiótico tópico más utilizado para erradicar la portación nasal de los pacientes colonizados. Como este mecanismo de resistencia se transmite horizontalmente mediante un MGE (plásmido), el uso indiscriminado de esta droga podría favorecer la selección de cepas que hayan adquirido el plásmido y así llevar a un aumento en la resistencia [234]. De esta manera, facilitaría la diseminación en nuestro medio de estas cepas resistentes, aún en aquellos pacientes sin contacto previo con el antibiótico. Este hallazgo presenta similitud con un trabajo publicado en Brasil [235], donde se analizaron 100 aislamientos de *S. aureus* recuperado de hisopados nasales y lesiones de piel de 90 pacientes pediátricos donde el 24% fueron MRSA. Entre ellos se detectaron 8 aislamientos con resistencia de alto nivel a mupirocina (CIM>1024 µg/mL) y cuatro de ellos pertenecieron al clon ST30-IV. Similarmente, en un estudio realizado en un hospital pediátrico de Australia [236], sólo 1/100 aislamientos de MRSA presentó resistencia a mupirocina y pertenecía al linaje ST30-IV. Estos resultados podrían sugerir una posible asociación entre este linaje ST30-IV y la resistencia a mupirocina. Sin embargo, en otro estudio

realizado en hospitales de Kuwait [237], donde se analizaron 400 aislamientos de MRSA, se obtuvo un 5,2% de resistencia a mupirocina y estuvo asociada principalmente a los linajes ST-5-II (clon New York/Japón), ST8-IV (relacionado al USA300) y ST239-III (clon Brasileño), 11 aislamientos pertenecientes al ST30-IV, fueron sensibles a mupirocina. La resistencia a mupirocina detectada en nuestro estudio, junto con los trabajos antes expuestos, refuerza la necesidad de la vigilancia de la resistencia a este antibiótico tópico en nuestro medio.

La cobertura nacional de este estudio, permitió seguir evidenciando profundas diferencias regionales, en la proporción de MRSA entre el norte, centro y sur del país (72,9% vs 48,4% vs 25,6%, respectivamente). Esta diferencia regional entre las proporciones de MRSA estuvo asociada a la propagación de las cepas CA-MRSA_G desde el Norte hacia el Sur (66% vs 43% vs 19,2%, respectivamente). Entre probables factores que podrían estar involucrados en la continuación de la propagación de las cepas CA-MRSA_G en la región norte de Argentina se pueden enumerar: nivel socioeconómico más bajo (bajo condiciones de hacinamiento) [150, 207], junto con una menor cobertura de salud y condiciones climáticas favorables (clima más cálido y húmedo) que favorece una mayor densidad de estas cepas en la piel [150].

A diferencia del estudio llevado a cabo en el año 2009 [150], en este estudio (2015), las diferencias regionales en las proporciones de genotipos CA-MRSA_G están relacionadas a la diseminación del clon ST-30-IVc tanto en la región del Norte como en el Centro y Sur desplazando al Clon HA-MRSA_G ST-5-IVa. Este fenómeno, curiosamente ocurrió a la inversa en Nueva Zelanda, donde el clon ST-30-IV, el cual se mantuvo como el clon CA-MRSA más prevalente por dos décadas [238, 239], fue desplazado, por un clon de CA-MRSA de linaje ST5-IV-t002 PVL⁻ [240], como la causa más común de infección por CA-MRSA en Nueva Zelanda. Coincidentemente en otro estudio demostraron que la proporción de ST5-IV aumentó significativamente, de 0,3% en 2005 a 34,7% en 2011 ($p < 0,0001$). En este estudio los pacientes con infecciones por CA-MRSA_G eran significativamente más jóvenes, pertenecían a poblaciones aborígenes (Maoríes o pacíficos) y residían en algún vecindario de bajos recursos [241].

En forma concidente con otros estudios [2, 11, 242] se detectaron diferencias por grupo etario, con una mayor proporción de MRSA en pediatría (59%) que en adultos (46,3%), relacionada con la mayor proporción de CA-MRSA_G en pediatría (55,8%) que en adultos (38,8%). Con respecto a asociaciones de clones con grupos etarios, en el proyecto de infecciones realizado en 2009, se identificó en las infecciones de la comunidad, una asociación del clon ST30-IV con la población adulta, mientras que el clon ST5-IV estuvo mayormente asociado a pediatría en el hospital [150]. En este estudio, el clon ST30-IVc fue el más prevalente (62,5%) asociado a Pediatría, seguido por el clon CA-MRSA ST-5-IVa. En cambio el clon Clon ST-5-I, estuvo asociado

a pacientes adultos. De acuerdo a este análisis se podría concluir, que en nuestro país, el clon ST30-IV evolucionó primero en la comunidad en pacientes adultos para diseminarse luego en los hospitales tanto en pediatría como en adultos. Las asociaciones entre los genotipos de *S. aureus* y la edad del paciente fue descrita en ciertos linajes MSSA (CC5 o CC45) [243], y en algunos clones de MRSA [241, 244, 245], por ejemplo, en Nueva Zelanda, el clon ST30-IV estuvo mayormente asociado a adultos, mientras que el ST5-IV-t002 tuvo una mayor asociación con pediatría.

Por otro lado, considerando el origen de las infecciones, en este trabajo de tesis se identificó, tanto en las infecciones de la comunidad como en el ámbito hospitalario, el desplazamiento del clon CA-MRSA ST5-IVa-t311, por parte del clon ST30-IVc, en las diferentes regiones, en pediatría y adultos. En el ámbito hospitalario, el clon CA-MRSA ST30-IVc, también desplazó al clon HA-MRSA ST5-I cordobés/chileno como principal causante de infecciones hospitalarias en adultos (40,2% vs 17,6%, respectivamente). Estos resultados implican la entrada del clon CA-MRSA ST30-IV al ámbito hospitalario, con significativa mayor proporción en pediatría que en adultos, desplazando al clon HA-MRSA Cordobés-Chileno ST5-I y también al CA-MRSA ST5-IV.

Al realizar un análisis longitudinal entre el proyecto de infecciones llevado a cabo en 2009 y el que forma parte de los resultados de la segunda parte de este trabajo de tesis (resultados de la etapa II, año 2015), se evidenció que en los 6 años transcurridos, las proporciones de MRSA en Argentina permanecieron sin cambios significativos (55%, 2009 vs 51%, 2015). Con este trabajo, se ha demostrado que este fenómeno es la consecuencia de dos evoluciones significativas en sentidos contrarios, por un lado la disminución en la proporción de infecciones causadas por HA-MRSA_G (16% en 2009 vs. 5,8% en el 2015, $p < 0,0001$), y por el otro, un aumento de aquellas producidas por CA-MRSA_G (39%, 2009 a 45,2% en el 2015). Esta situación, estuvo relacionada a la diseminación del clon CA-MRSA ST-30-IVc, tanto en la comunidad como en el hospital, en pediatría y en adultos. El hallazgo de mayor relevancia, ocurrió en el ámbito hospitalario donde, el clon ST30-IVc desplazó al clon HA-MRSA ST5-I (particularmente en adultos) y también al clon CA-MRSA ST5-IV en la población pediátrica, especialmente en el centro del país.

Esta evolución tiene importantes consecuencias a nivel de la resistencia a los antibióticos y consecuentemente en el establecimiento de los tratamientos empíricos en Argentina. Durante el período 2009-2015 se demostró una disminución de la proporción de aislamientos resistentes a ciprofloxacina (24% vs. 14%, $p=0,0014$), eritromicina (39,7% vs. 16,4%, $p<0,0001$), clindamicina (36,3% vs. 16,0%, $p<0,0001$), y gentamicina (39,7% vs. 22,3%, $p=0,0001$). La disminución significativa de las tasas de resistencia a eritromicina y clindamicina detectadas entre las

infecciones de inicio en la comunidad estuvo asociada al desplazamiento del clon ST5-IVa por el clon ST30-IV, que expresa significativa menor resistencia a macrólidos y lincosaminas. A nivel hospitalario, la disminución de las tasas de resistencias a ciprofloxacina, eritromicina, clindamicina, gentamicina y rifampicina están asociados, a dos fenómenos, por un lado, al desplazamiento de los clones HA-MRSA por los clones CA-MRSA (con tasa de resistencia a la mayoría de los antibióticos significativamente menores) y por el otro a la entrada al ambiente hospitalario del clon CA-MRSA ST30-IV con tasas de resistencia a eritromicina y clindamicina significativamente menores que el clon CA-MRSA ST5-IV, que había ingresado previamente.

Con el objetivo de analizar los clones de MRSA que están colonizando a pacientes sanos y aquellos que están causando infecciones se compararon los tipos y proporciones de los clones de MRSA en pacientes colonizados (n: 60) en el ingreso a instituciones hospitalarias de Córdoba (proyecto octubre-diciembre 2014, etapa I) con aquellos infectados por MRSA (n: 21) en la provincia de Córdoba (proyecto abril 2015, etapa II). Se pudo constatar que los clones de MRSA que colonizan a los individuos, son los mismos que luego les causan infecciones, manteniéndose, en la mayoría de los casos, en proporciones comparables en ambos estados. Este resultado, estaría de acuerdo con otros estudios que sostienen que la colonización por MRSA es un conocido factor de riesgo para producir infecciones endógenas subsiguientes [193, 204, 246]. Curiosamente, el clon ST-30-IVc-t019 se encontró en una proporción significativamente mayor causando infecciones que colonizando, lo que avalaría la hipótesis que el clon ST30-IVc utilizaría otras vías de transmisión, tanto en los hospitales [247-250], como en la comunidad [112, 221], además de la colonización e infección endógena. En cambio, para el clon I-ST5-IVa-t311 ocurrió lo contrario, donde se lo detectó en mayor proporción como colonizante que infectante, lo que podría indicar que algunos clones presentan mayor capacidad para colonizar que para infectar, utilizando esta característica como una estrategia de diseminación o permanencia en el tiempo.

Por lo tanto, a través de diferentes vías, los resultados de este trabajo de tesis, sugieren que el clon ST30-IVc, utiliza otras vías de transmisión, además de la endógena, basándonos en los siguientes hallazgos: i) en los resultados del proyecto de colonización 2014 (resultados relacionados a la etapa I), donde de seis casos de infecciones, 3 fueron causadas por el clon ST30-IV (1 infección CO y 2 HO) y en los tres casos los hisopados de colonización fueron negativos, ii) los resultados obtenidos del proyecto de infecciones 2015 (resultados relacionados a la etapa II) detectamos un caso de infección por el clon ST30-IV en un paciente con resistencia de alto nivel a mupirocina sin haber tenido contacto previo con el hospital ni con el antibiótico y iii) en la comparación de los aislamientos tanto de colonización (2014) como de infección (2015) en la provincia de Córdoba, el clon ST30-IV se encontró produciendo una proporción significativamente mayor de infecciones que de colonizaciones.

En la tercera etapa del presente trabajo de tesis, nos propusimos analizar características moleculares patogénicas y evolutivas, que pudieran de alguna manera abordar las capacidades diferenciales de diseminación de estos clones de MRSA.

En primera instancia, se propuso analizar la evolución molecular del CC5 en nuestro país, ya que en los últimos 20 años, los MRSA pertenecientes al CC5, se encuentra entre los clones más prevalentes causando infecciones asociadas al hospital en el hemisferio occidental [2, 11, 144]. En América Latina [180], y particularmente en Argentina, los clones del CC5 han sido, desde los primeros reportes por parte de nuestro grupo de investigación, los principales responsables de las infecciones tanto nosocomiales, particularmente relacionado a la emergencia y diseminación de los clones HA-MRSA cordobés/chileno (A-ST5-I-t149) y la variante argentina del clon pediátrico (C-ST100-IVNv-t002) [141, 142], a partir de la emergencia y diseminación del clon CA-MRSA I-ST5-IVa-t311. Para analizar las características moleculares de este linaje en nuestro país, que podrían estar involucradas en este comportamiento evolutivo, utilizamos el secuenciamiento de genomas completos (WGS) en un grupo de 20 aislamientos representativos de todo el país pertenecientes al CC5 en un periodo comprendido desde 1999 hasta 2014.

El análisis filogenético, identificó dos clados o grupos bien diferenciados, uno correspondiente a los aislamientos asociados al hospital (HA) y otro a los aislamientos asociados a la comunidad (CA), indicando que ambos clados tuvieron un origen de emergencia diferente, uno asociado al ámbito hospitalario y el otro asociado a la comunidad, lo cual coincide y confirma los resultados de estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación [141, 148-150], utilizando los marcadores moleculares tradicionales. A través de los resultados obtenidos con el análisis evolutivo o del “reloj molecular”, se pudo inferir que ambos clones HA-MRSA (ST100-IVNv y el ST5-I) derivan de un posible ancestro común desde el año 1956, que dio origen a la emergencia, primero al HA-MRSA ST100-IVNv aproximadamente en 1979 y luego con el tiempo, al clon cordobés/chileno (A-ST5-I-t149) en el año 1992.

Por el otro lado, a partir del ancestro común de 1937, probablemente derivó un precursor MSSA en 1991 a partir del cual, en 1996 dio origen a la emergencia de los clones CA-MRSA I-ST5-IVa-t311 en nuestro país causando brotes epidémicos en las diferentes regiones [149, 150]. Es importante denotar que en 1998, hay una expansión del clado de CA-MSSA, posterior a la emergencia de los clones CA-MRSA en 1996, esto podría explicar que los CA-MSSA están en continua expansión y las cepas CA-MRSA emergen continuamente a partir de estas cepas exitosas de CA-MSSA. Si bien, estos datos explican y concuerdan con los datos reales de cómo ha sido la emergencia de los clones epidémicos de MRSA pertenecientes al CC5 en nuestro país (primero los HA-MRSA y luego los CA-MRSA), difieren con los resultados de un estudio recientemente publicado [184], realizado con aislamientos del CC5 en América Latina, donde los

clones CA-MRSA de Argentina ST5-IVa-t311 forman parte de un clado denominado basal con expansión previa a los aislamientos del clon cordobés/chileno (ST-5-I-t149) y la variante del clon pediátrico (ST100-IVNv-t002) los cuales se agrupan en un clado denominado CC5-I. No obstante, los autores del trabajo concluyen que la estructura geográfica de CC5 por país o región puede brindar una delineación más precisa en los patrones de propagación de los clones, como sucede con los resultados de este trabajo.

Por otro lado, se analizaron los perfiles de genes de virulencia de los aislamientos, a partir de un ensamblado *de novo*, en el cual se consideró el conjunto de genes que codifican para proteínas hipotéticas relacionadas a factores de virulencia alojados tanto en el genoma core, regiones variables y elementos genéticos móviles (MGEs). El perfil de factores de virulencia de las cepas CA se diferenciaron del HA principalmente por la presencia de los genes *sea* y *sep*, codificantes para las enterotoxinas A y P, al igual que los genes *lukF* y *lukS*, los cuales codifican para la leucotoxina PVL. En este trabajo, se ha determinado que estos genes están codificados en un fago del grupo de la integrasa ϕ Sa2, denominado phiSa119, el cual no se encuentra en los clones HA, los cuales presentan otro fago del mismo grupo ϕ Sa2 pero diferente al fago phiSa119. Este hallazgo sugiere que la adquisición de este fago con los genes *sea*, *sep*, *lukF* y *lukS* por el ancestro MSSA podría ser un hecho evolutivo que facilitó la diseminación del grupo CA en la comunidad. A su vez, en todos los aislamientos (tanto HA como CA), se detectó el gen *scn* codificante del inhibidor del complemento de *Staphylococcus* (SCIN), el gen *sak* codificante de la Staphyloquinasa, la leucocidina DE (*lukED*), el sideróforo *sderE*, las enterotoxinas N y O (*sen* y *seo*) y el modulador del receptor de quimioquinas bacterianas CHIPS (*chp*) (tipo IEC-B: *scn*, *sak* y *chp*) excepto en los aislamientos MSSA 0298 y el cercanamente relacionado HA-MRSA 0037 (C-ST100-IVnv), en el cual se detectó que tienen un tipo diferente de IEC, el IEC-E (*scn* y *sak*), posiblemente relacionado a otro fago de la familia ϕ Sa3. Por lo cual, esto podría ser una diferencia evolutiva, que ayudó a la selección y diseminación de este clon desde su divergencia del ancestro común con el otro clon HA-MRSA ST5-I.

El análisis del resistoma, también fue llevado a cabo a través de un ensamblado *de novo*, a través de éste, se buscó, mediante una base de datos pública, todos aquellos genes o SNP en genes involucrados en resistencia antimicrobiana (resistoma mutacional), alojados tanto en el genoma core como en el genoma accesorio. Todos los genes que fueron detectados a través del ensamblado *de novo*, coincidieron con los mecanismos de resistencia detectados a través del antibiograma, excepto en dos casos: 1) en el aislamiento CA-MRSA 3296, el cual según fenotipo presentaba el mecanismo MLSBi que confiere resistencia inducible a clindamicina y eritromicina, pero no se encontró por WGS ninguno de los genes *erm*, responsable de dicho mecanismo. No obstante, se realizó una búsqueda por PCR (*ermA*, *ermB*, *ermC* y *msrA*), obteniendo el producto

de amplificación positivo para *ermC*, validando los resultados fenotípicos; 2) el otro caso que presentó discordancia entre los dos métodos fue la resistencia fenotípica a amikacina (Akn) del aislamiento 1710, en el cual el gen *aph-3* no fue detectado por WGS, posible gen responsable de dicha resistencia. Se debe tener en cuenta que este fenotipo de resistencia también se puede explicar por una sobre-expresión del gen *aacA-aphD*, que sí está presente en ese aislamiento. Sin embargo, en un estudio realizado en Europa, se predijo falsamente para amikacina que 21 aislamientos eran resistentes en base a la presencia del gen de resistencia a la kanamicina *aphA-3* y *aadD* [251]. En otro estudio, se ha detectado que la presencia de estos dos genes de enzimas modificadoras de aminoglucósidos son indicadores deficientes de la resistencia a la amikacina [252]. Tanto nuestros resultados como los descriptos [251, 252], demuestran la importancia del análisis fenotípico, el cual, en esta instancia no se podría sustituir por el análisis dirigido a la búsqueda de genes involucrados en resistencia antibiótica (resistoma). En principio, la secuenciación del genoma completo (WGS) puede predecir la resistencia fenotípica directamente de un genotipo, reemplazando las pruebas de laboratorio. Sin embargo, la contribución de diferentes métodos de bioinformática a las discrepancias entre genotipo y fenotipo no se ha explorado sistemáticamente hasta la fecha. En un trabajo publicado recientemente en el Reino Unido [253], se compararon tres métodos bioinformáticos basados en WGS, para predecir la presencia/ausencia de 83 diferentes determinantes de resistencia y sensibilidad antimicrobiana general en 1379 aislamientos de *S. aureus* previamente caracterizados por métodos de laboratorio estándar. La predicción de sensibilidad antimicrobiana genotípica coincidió con el fenotipo de laboratorio en 98,3% (14224 / 14464) de casos [2720 (18,8%) de resistencia, 1374 (9,5%) sensibles]. En un estudio multicéntrico realizado también en Europa [251], se realizaron un total de 5288 predicciones *in silico* de resistencia/sensibilidad y se compararon con los resultados de referencia de EUCAST. De éstos, se pronosticó que 1075 eran resistentes, en comparación con 1050 fenotípicamente identificadas como resistentes por un laboratorio de referencia, con una concordancia observada para 5213 (98,6%) de las pruebas individuales.

Otro de los análisis realizados por la metodología del WGS, estuvo dirigido a la caracterización del *SCCmecIVNV* correspondiente al clon HA-MRSA C-ST100-IVNV-t002, representado por el aislamiento 0037, descrito por nuestro grupo de investigación [141, 142].

Se obtuvo la secuencia completa a partir de la base pública NCBI (del inglés “*The National Center for Biotechnology Information*”) del *SCCmec* de la cepa MRSA_{ZH47}, la cual fue descrita en Suiza en 2007 [186], con el fin de comparar los *SCCmecIVNV* de ambas cepas (0037 vs MRSA_{ZH47}). La principal diferencia entre estas cepas estuvo dada por un lado, por la presencia de una proteína de función desconocida pero que presenta dominios de nucleasa en el aislamiento

0037, mientras que en la cepa MRSA_{ZH47} se encuentran las proteínas hipotéticas ZH02-11, así como también la recombinasa *ccrC*, ausentes en el aislamiento 0037 (Figura 32). Estos resultados, permitieron finalmente describir en forma completa el SCC*mec*IVNV del clon HA-MRSA C-ST100-IVNv-t002 y sembrar las bases para la búsqueda de nuevas variantes del mismo, donde en el presente estudio de infecciones 2015 llevado a cabo por nuestro grupo de investigación, se han identificado aislamientos del clon HA-MRSA C-ST100 en los cuales, no se ha podido amplificar ninguno de los tipos conocidos de complejos *mec* y *ccr*, sólo el gen *mecA* fue detectado. Estos aislamientos, hasta el momento, son identificados como “no tipables” (SCC*mec*NT), por lo cual, sería indispensable utilizar la metodología del WGS para poder caracterizar estos nuevos cassettes.

A modo de conclusión, el análisis por WGS, permitió indagar con mayor profundidad sobre la posible emergencia de los clones pertenecientes al CC5, los cuales conforman el grupo de clones más importantes en nuestro medio, identificando un posible ancestro común a los clones HA-MRSA y CA-MRSA que data del año 1937 y sus cambios evolutivos que llevaron a la emergencia de los principales clones epidémicos de Argentina con expansiones probables para los clones HA-MRSA a partir de 1951 y a partir de 1990 para los clones CA-MRSA. De la misma manera, el WGS permitió caracterizar el SCC*mec* IVNV y diferenciarlo con el anteriormente descrito SCC*mec*IV (2B&5) identificado en la cepa MRSA_{ZH47}.

En la última etapa de este trabajo de tesis, también se planteó analizar posibles estrategias patogénicas que podrían ayudar en la diseminación diferencial en la comunidad u hospital de estos clones de MRSA. Para esto, se analizó la virulencia comparativa entre los clones HA-MRSA y CA-MRSA más frecuentes en nuestro país, en un modelo invertebrado. Se eligió a *Galleria mellonella*, debido a que presenta una serie de ventajas, respecto a los modelos animales en mamíferos, como el hecho de que por ser un invertebrado, *G. mellonella* no está sujeta a las limitaciones éticas de los modelos de mamíferos. Además, las larvas se pueden mantener fácilmente, se pueden infectar mediante inyección sin anestesia, someterse a un tratamiento previo con inhibidores químicos y mantener la incubación a 37 °C, temperatura a la cual ocurren las infecciones en el ser humano, y más aún, un sistema inmunológico que si bien carece de inmunidad adaptativa, presenta un sofisticado sistema de defensa celular y humoral que incluye la producción de péptidos antimicrobianos [93].

Se eligieron los clones CA-MRSA más prevalentes de nuestro país: ST5-IVa (Clon CA-MRSA Argentino) y ST30-IVc (Clon *Southwest Pacific*), así como también el clon USA300 (ST8-IV) con el fin de poder utilizarlo como control de clon CA-MRSA internacional y comparar su virulencia ya que es el clon más prevalente en los Estados Unidos como causante de infecciones tanto en la comunidad como en el ámbito hospitalario. De la misma manera, se eligió el clon HA-MRSA más

prevalente en Argentina: ST5-I (Clon Córdoba/Chileno), así como también el clon ST239-III A (Clon Brasileño/Sudamericano), que si bien no se encontró como clon prevalente causando infecciones, se utilizó como control de clon internacional HA-MRSA.

Al analizar las curvas de K-M del grupo de clones CA-MRSA I1 (ST5-IVa) vs N4 (ST30-IVc) vs USA300 (ST8-IV) y los clones HA-MRSA A1 (ST5-I) vs B1 (ST239-III A), no se encontraron diferencias significativas entre los clones del grupo CA-MRSA $p=0,803$, lo que evidenció que si bien el clon N4-ST30-IV mató más rápidamente en las primeras 24 hs que los restantes clones CA-MRSA, el clon USA300-ST8-IV, terminó matando más individuos al finalizar el estudio, seguido por el clon I1-ST5-IV. De la misma manera, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los clones del grupo HA-MRSA $p=0,380$ con sobrevividas comparables entre los clones A1-ST5-I y B1-ST239-III A, tanto las primeras 24, 48 y 96 hs.

Al analizar el grupo de CA-MRSA vs el de HA-MRSA más prevalentes de Argentina, se encontró que los clones CA-MRSA mataron un número significativamente ($p<0,0001$) mayor de individuos que los clones HA-MRSA. Estos resultados, estarían de acuerdo con estudios previos que sostienen que, en contraste con las cepas HA-MRSA, que fueron detectadas por primera vez en los hospitales y han afectado a los pacientes con factores de riesgo asociados a la atención de la salud, estos genotipos CA-MRSA tienen la capacidad de infectar a las personas jóvenes previamente sanas fuera del ámbito hospitalario [202], lo que sugiere una mayor virulencia y "fitness" o aptitud. Diferentes investigaciones revelaron que la mayor virulencia y fitness es multifactorial y relacionada con: i) la adquisición de nuevos genes en elementos genéticos móviles, tales como los staphylococcal cassette chromosome *mec* más pequeños (*SCCmec*) como los tipos IV o V, el fago que codifica a la Pantón-Valentine leucocidina (PVL) o, en el caso del clon USA300, el elemento móvil del catabolismo de la arginina (ACME) y ii) el aumento de la expresión de toxinas codificadas en el genoma, incluyendo las modulinas solubles en fenol y la alfa-toxina [254]. Tanto el clon CA-MRSA ST5-IVa (*sea-seP-pvl* en un fago del grupo de la integrasa $\phi Sa2$, denominado phiSa119, identificado en este trabajo de tesis) como el ST30-IVc (*egc-lukDE-bbp-cna*) adquirieron evolutivamente características patogénicas que favorecen este mayor "fitness" y avalan los resultados detectados en el modelo de *G. mellonella*. Esto podría sustentar en parte el comportamiento de estos clones CA-MRSA en nuestro medio, desplazando a los clones HA-MRSA, lo que produce un gran impacto en salud pública debido a las infecciones que producen en seres humanos desde su emergencia en la comunidad y como causa actual de las infecciones en el ámbito hospitalario.

Por otro lado, en un estudio [255], en el cual se compararon clones HA-MRSA [ST22-IV (EMRSA-15), ST36-II (EMRSA-16) y ST239-III] vs clones CA-MRSA [ST1-IV (PVL⁺ USA400), ST1-IV

PVL⁻), ST8-IV (USA300), ST22-IV (PVL⁺), ST30-IV, ST59-IV y ST80-IV], observaron, que las muertes de las larvas variaron significativamente según el clon ($p < 0,001$), y la muerte global fue mayor para HA-MRSA en comparación con los clones CA-MRSA ($p = 0,007$).

A su vez, otro estudio realizado, en el modelo invertebrado *C. elegans* demostró, que las cepas CA-MRSA eran más virulentas que las HA-MRSA, con mayor actividad nematocida en las cepas de CA-MRSA (0,776 vs. 0,506, $p = 0,0005$). Además, los clones CA-MRSA ST8 y ST1 fueron significativamente más virulentos que un grupo de cepas CA-MRSA de linajes ST88, ST80, ST85, ST30 y ST5 [256]. Por lo tanto, nuestros resultados sumados a los antes expuestos desde la literatura internacional, denotan las dificultades para extrapolar los fenotipos clínicos con los ensayos de virulencia realizados en el laboratorio.

Como conclusión final, en este trabajo de tesis, fue posible abordar 3 aspectos cruciales referidos a *S. aureus*, la portación, las infecciones y la evolución del complejo clonal más importantes en nuestro país.

Estos tres aspectos fueron abordados en tres partes o etapas, donde en la primera etapa, se indagó sobre la epidemiología molecular y factores de riesgo para la portación de MRSA, considerando los genotipos CA-MRSA y HA-MRSA, en el momento del ingreso hospitalario y su relación con las infecciones hospitalarias. Los resultados de esta primer parte destacan la importancia de la comunidad (en particular, los niños de 1 a 18 años) como el principal reservorio de colonización de los clones principales de CA-MRSA en Argentina: ST5-IVa PVL⁺ y ST30-IVc PVL⁺. También se demostró que estos clones, realmente se adquieren y probablemente se transmiten, causando infecciones adquiridas en los hospitales. Estas infecciones HO son prevenibles y, por lo tanto, son objetivos para un programa de control de infecciones no sólo en el hospital sino también en la comunidad.

A su vez, en una segunda etapa se analizaron las infecciones causadas por *S. aureus*, con una prevalencia de MRSA del 51%, representado principalmente por cepas CA-MRSA siendo el clon ST30-IV el que se encontró en mayor proporción, en pediatría y adultos, tanto en la comunidad como en el hospital. En el análisis longitudinal 2009-2015, el hallazgo de mayor relevancia se evidenció en las infecciones HO, donde se demostró el desplazamiento tanto del clon HA-MRSA ST5-I, como el clon CA-MRSA ST5-IV del ambiente hospitalario principalmente en la población adulta, debido a la diseminación del clon ST30-IV. Este fenómeno conduce a un mayor espectro de opciones terapéuticas debido a las tasas de resistencia a los antibióticos significativamente menores en el ambiente hospitalario.

En la tercer etapa de esta tesis, se investigó la evolución molecular del complejo clonal 5 usando WGS, donde se confirmó un ancestro común MSSA que data de 1937, el cual dio origen

a la emergencia por un lado de los clones MRSA en el ámbito hospitalario (HA-MRSA) y por el otro a los clones MRSA en la comunidad (CA-MRSA). El hallazgo de mayor relevancia, fue que se pudo detectar que, en la comunidad el ancestro MSSA evolucionó adquiriendo variaciones genéticas que posiblemente facilitaron su diseminación, como genes codificantes de factores de virulencia como *pvl*, *sea* y *sep*, todos codificados en un fago del grupo ϕ Sa2 llamado phiSa119, el cual hasta el momento no ha sido descrito en este complejo clonal. Además, se logró caracterizar la nueva variante del *SCCmec-IV*, identificada previamente por nuestro grupo de investigación.

Finalmente, se indagó sobre la virulencia comparativa entre los clones CA-MRSA y HA-MRSA de nuestro país usando el modelo de invertebrado *G. mellonella*, donde se seleccionaron aislamientos pertenecientes a los clones CA-MRSA y HA-MRSA prevalentes en nuestro país, donde los clones CA-MRSA más prevalentes en nuestro país I-ST5-IVa-t311 y N-ST30-IVc-t019, presentaron una mayor virulencia comparada con los clones HA-MRSA A-ST5-I-t149 y B-ST239-IIIa-t037.

A partir de los resultados expuestos en este trabajo de tesis, por un lado se pudo aportar información genuina de importancia para ayudar al entendimiento de la evolución de los clones epidémicos de *Staphylococcus aureus* que circulan en nuestro país causando infecciones tanto en los hospitales como en la comunidad y su relación con la resistencia a los antibióticos. Consecuentemente, se proporcionan datos que permiten el planteamiento de estrategias para el control y transmisión de este patógeno tan importante, así como para el control de la resistencia a los antibióticos a nivel mundial.

10. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se describe la metodología utilizada para los procedimientos experimentales que involucran a la etapa I

10.1 Etapa I

Analizar las implicancias de la colonización por CA-MRSA_G, comparativamente con la colonización por HA-MRSA_G y MSSA, en los pacientes que se hospitalizan en instituciones asistenciales de ciudad de Córdoba (República Argentina).

10.1.1 Diseño del estudio

Se realizó un estudio de carácter prospectivo y de tipo multicéntrico, descriptivo y comparativo desde el 22 de septiembre al 22 de diciembre de 2014 en ocho instituciones médicas de Córdoba, Argentina: 7 en la ciudad de Córdoba y 1 en la ciudad de Río Cuarto. Participaron los hospitales de niños (3), adultos (3) y generales (2) (pediatría / adultos, con salas de atención pediátrica separadas de las de atención de adultos). Se evaluó la prevalencia de colonización por *S. aureus* y MRSA en el momento del ingreso, el riesgo de adquisición de MRSA por 1000 pacientes / día en riesgo, las descolonizaciones espontáneas durante la estancia y la prevalencia en el alta hospitalaria en todos los hospitales. Se utilizaron los datos agregados de ocho hospitales para identificar los factores de riesgo y para las comparaciones entre grupos de edad. Para estimar las nuevas adquisiciones y colonización al alta, se limitó el análisis a los pacientes ingresados por ≥ 3 días. Para los pacientes con admisiones múltiples, sólo se incluyó la primera admisión en el análisis.

La implementación de un programa de control de prevención de infecciones y el cumplimiento de las precauciones de contacto para pacientes con infección o colonización por MRSA conocida o sospechada dependían del comité de control de infecciones de cada hospital. En la mayoría de estos hospitales, se realizó un uso más selectivo de las precauciones de contacto, especialmente para pacientes con heridas de drenaje o diarrea infecciosa, o para actividades de atención al paciente de alto riesgo, con énfasis en la higiene de las manos, el baño de pacientes con clorhexidina y la higiene ambiental. El aislamiento de pacientes con infección o colonización por MRSA conocida o sospechada en habitaciones individuales dependía de la disponibilidad de habitaciones individuales. La descolonización no se realizó de forma rutinaria.

El Equipo de Trabajo de cada Hospital, estuvo integrado por:

- a) Responsable/s de los procesamientos Microbiológicos
- b) Responsable Médico, el cual tuvo la libertad de incorporar a otros profesionales del centro, interesados en trabajar en el mismo como el enfermero de control de Infecciones.

Las instituciones participantes fueron las siguientes: Hospital Infantil Municipal De Córdoba, Hospital Militar De Córdoba, Hospital Guillermo Rawson Hospital, Hospital De Urgencias, Hospital Pediátrico Del Niño Jesús, Hospital De Niños De La Santísima Trinidad De Córdoba, Hospital Misericordia Y Clínica Regional Del Sud–Río Cuarto

Las instituciones participantes se detallan a continuación:

N°	ESPECIALIDAD	N° CAMAS	Admisiones en 2014	N° Aislamientos
H1	PEDIATRÍA/ADULTOS	106	6520	499
H2	PEDIATRÍA	70	2280	179
H3	ADULTOS	36	1930	56
H4	ADULTOS	80	1984	48
H5	PEDIATRÍA	228	6550	266
H6	ADULTOS	81	2668	130
H7	PEDIATRÍA	60	1896	168
H8	PEDIATRÍA/ADULTOS	131	2510	73
TOTAL		792	26638	1419

Los responsables de cada institución presentaron en tiempo y forma, el Protocolo definitivo del Estudio, para su evaluación y debida aprobación ante su Comité de Ética de Investigación en Salud (CIEIS) o en caso de no disponer del mismo, ante el ente institucional equiparable a tal efecto (Ej. Departamento de Capacitación y Docencia). Todas las Instituciones asistenciales participantes fueron representativas de la población adulta y pediátrica que se hospitaliza (c/10.000 o más internaciones anuales de c/grupo etario, en forma conjunta) e integran el Grupo Colaborador de Estudio de Infecciones por *S. aureus*, de Córdoba.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN DE LOS PACIENTES AL ESTUDIO:

a) Criterios de inclusión

-Pacientes Pediátricos (Niños: ≤ 14 años de edad y Adolescentes: 15-18 años) y Adultos (Adulto Joven: 19-30 años, Adulto: 31-65 años y Adulto Mayor: > 65 años) de ambos sexos, internados (en Sala General y en Unidad de Terapia Intensiva) dentro de las primeras 48 hs. de la hospitalización.

-Disposición para participar y firmar el Consentimiento Informado.

b) Criterios de exclusión

-Internación ≥ 48 hs

-Paciente No Hospitalizado.

-Coagulopatías: predisposición al sangrado

-Paciente en tratamiento con Mupirocina nasal

-Falta de disposición para participar y a firmar el Consentimiento Informado.

Nota: En caso de que un mismo paciente registre dos o más internaciones durante el período que dure el estudio, sólo se consideró la primera.

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS

Se recolectaron y procesaron en cada institución participante, muestras microbiológicas, para detectar Colonización por *S. aureus* (hisopado nasal, orofaríngeo e inguinal), así como muestras clínicas para el diagnóstico de infecciones en sus diferentes localizaciones:

a) Muestras microbiológicas, para detectar Colonización:

1. **Hisopado NASAL:** se utilizó sólo un hisopo previamente humedecido en solución salina estéril, para ambas fosas nasales, en la región vestibular de la nariz.

2. **Hisopado FARÍNGEO:** obtenido de ambas amígdalas y pared posterior de faringe, con un hisopo de algodón seco, con la ayuda de un baja-lenguas.

3. **Hisopado Inguinal:** obtenido de la piel en la región inguinal con un hisopo de algodón seco.

Los hisopos fueron colocados en sus respectivos envases (previamente rotulados) y llevados al Laboratorio de Bacteriología.

FRECUENCIA DE LOS HISOPADOS:

Hisopado al ingreso: se realizó dentro de las primeras 48 hs de la hospitalización, previa firma del consentimiento informado y del llenado de una ficha de datos demográficos y epidemiológicos del paciente. Los hisopos fueron colocados medio de transporte adecuado, para su transporte al laboratorio de bacteriología.

Hisopado en un paciente infectado: ante el diagnóstico de una infección por *S. aureus* de inicio en el hospital (HO, muestra clínica positiva para *S. aureus* después de 48 hs de hospitalización) detectadas en el laboratorio de bacteriología, se realizó un estudio de colonización simultánea (dentro de las 48 hs de obtenida la muestra clínica). En el caso de infecciones de inicio en la comunidad (CO), que eran aquellas que la muestra clínica positiva para *S. aureus* se obtuvo dentro de las 48 hs de hospitalización, el estudio de colonización simultánea fueron los hisopados del ingreso.

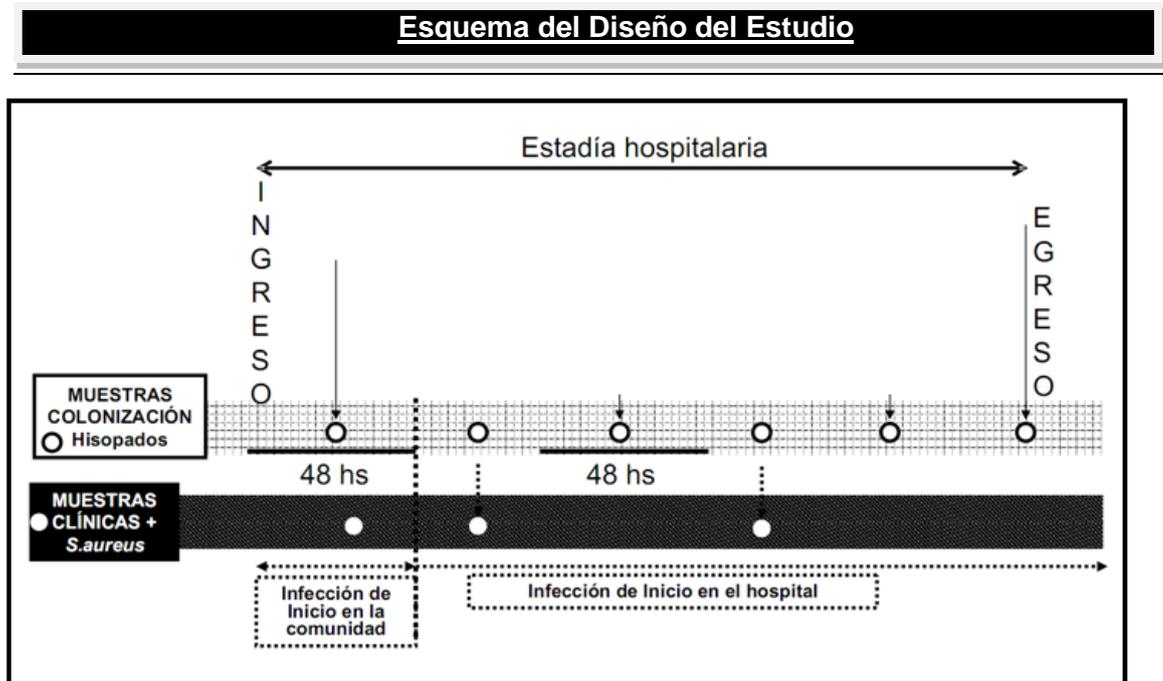
Hisopado al alta Hospitalaria: se realizó una nueva toma de muestra c/hisopo, antes del egreso hospitalario, en todos aquellos pacientes que tuvieron una internación ≥ 3 días.

b) Muestras Microbiológicas, para detectar Infecciones:

El laboratorio de microbiología que detectó en muestras clínicas *s. aureus*, se comunicó con el investigador responsable (médico clínico/infectólogo) quien verificó, si pertenecía a un paciente hospitalizado. En aquellos casos donde no se trató de un paciente hospitalizado, fue excluido del estudio. Si era un paciente hospitalizado ya ingresado al estudio, se evaluó si la

infección fue de inicio en la comunidad (< de 48 hs de hospitalización) o de inicio en el hospital (> de 48 hs de internación).

ESQUEMA DEL ESTUDIO



Como se detalla en el esquema, todo paciente admitido a cada una de las instituciones antes mencionadas, fue investigado en la búsqueda de portación de *S. aureus* a través de hisopados nasales, faríngeos e inguinales. De la misma, manera en caso de detectarse una infección por *S. aureus* a través de muestras clínicas, éstas fueron definidas como infecciones de la comunidad (CO, detectadas dentro de las 48 hs de la admisión) o infecciones hospitalarias (HO, detectadas luego de las 48 hs de la admisión).

10.1.2. Procedimientos del estudio

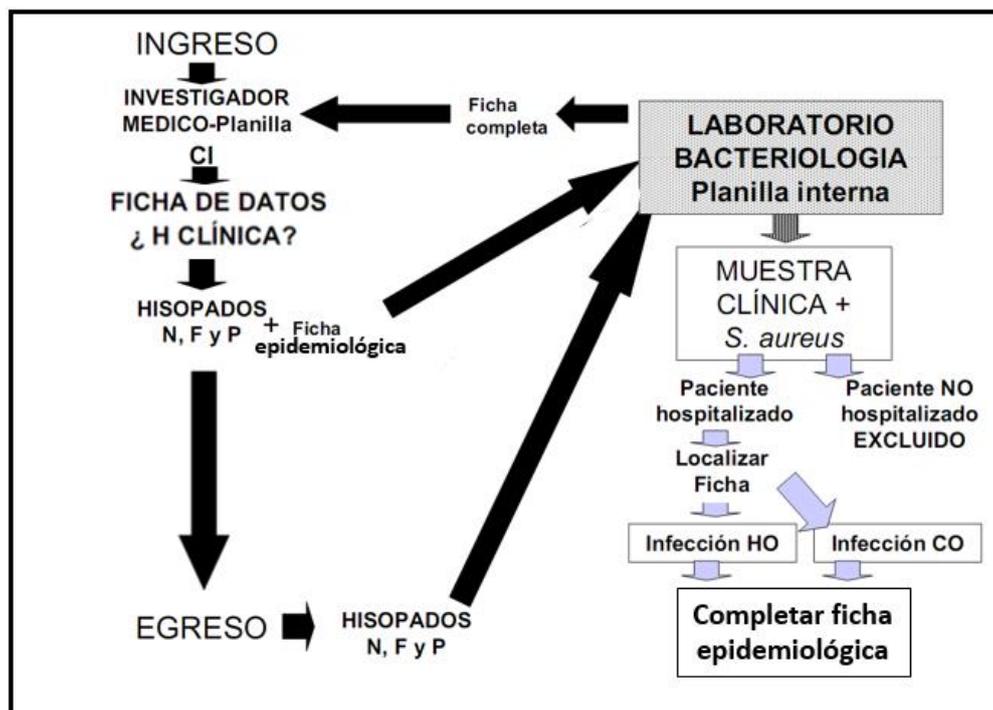
10.1.2.1 Estudios Microbiológicos en Laboratorios Locales (de c/Hospital)

a) **Muestras de Colonización:** fueron tomadas por el médico o ECI, luego de la firma del CI, al ingreso y al egreso hospitalario, o simultáneamente en caso donde se diagnosticó infección (hisopados nasales, oro faríngeos e inguinales). Las muestras fueron procesadas en los laboratorios de cada institución, los cuales recibieron suministros de cultivo estandarizados, herramientas de recopilación de datos y capacitación. Se cultivaron tres sitios del cuerpo para *S. aureus*: se colocó un hisopo en ambas fosas nasales y se rotó 3 veces en cada una; se obtuvo un segundo hisopo de un área de 10 cm² de la piel de forma bilateral y el tercero se obtuvo de la faringe posterior de la garganta. Los tres hisopados (nasal, garganta e inguinal) se cultivaron en tubos separados de caldo de tripteína de soya con 6,5% de cloruro de sodio para aumentar la sensibilidad del cultivo. Después de la incubación durante la noche a 37 °C, se subcultivó en

CHROMagar™ *Staph aureus* cromogénico para la detección de *S. aureus* (CHROMagar Microbiology, París, Francia). Después del subcultivo, se confirmó la presencia de *S. aureus* mediante la morfología de las colonias y los métodos bioquímicos estándar. Luego de este procedimiento, se realizaron las pruebas rutinarias de sensibilidad “in vitro” (antibiograma por difusión) - para *S. aureus* para evaluar sensibilidad a β-lactámicos (no anti-MRSA) (oxacilina; cefoxitina) que se interpretaron según puntos de corte de CLSI 2015. Las concentraciones inhibitorias mínimas de vancomicina (CIM) se determinaron mediante el método de dilución en agar. La sensibilidad a la mupirocina se determinó mediante el método de prueba de *e-test* (bioMerieux) con las siguientes definiciones: resistencia de alto nivel, MIC ≥512 µg / mL; resistencia de bajo nivel, CIM = 8–64 µg / mL; sensibles, MIC ≤ 4 µg / ml [257].

b) Muestras Clínicas: Se evaluaron todas las muestras clínicas positivas para *S. aureus*. El Laboratorio detectó las positivas para *S. aureus* a partir de sus registros habituales. Puesto en conocimiento, el investigador responsable evaluó, si la muestra pertenecía a un paciente hospitalizado o no, a través de la planilla interna de seguimiento. El laboratorio de microbiología Local (de cada hospital) procedió a la identificación de las cepas de *S. aureus*, por pruebas bioquímicas convencionales. Realizó luego las pruebas de sensibilidad “in vitro” rutinarias (antibiograma por difusión) - para *S. aureus* (oxacilina; cefoxitina; ceftarolina; eritromicina; clindamicina; gentamicina; ciprofloxacina; trimetoprima/ sulfametoxazol; minociclina; teicoplanina; rifampicina) que se interpretaron según puntos de corte de la CLSI 2015.

10.1.2.2 Algoritmo de estudio



10.1.2.3 Confección de la ficha de registro de datos de cada paciente

Dentro de las primeras 48 hs de hospitalización, a cada paciente hospitalizado, luego de firmar el consentimiento informado (adulto) o su tutor (pediatría), el médico o enfermera encargado realizó la toma de muestra por hisopado (nasal, oro faríngea e inguinal) y simultáneamente completó una planilla con datos demográficos y epidemiológicos del paciente.

10.1.2 DEFINICIONES UTILIZADAS EXCLUSIVAMENTE EN LOS RESULTADOS DE LA ETAPA I

10.1.2.1 Tipos de colonización de los pacientes

10.1.2.1.1 Paciente colonizado por *S. aureus* en el ingreso al hospital o Importadores (PCI: Paciente Colonizado en el Ingreso)

Pacientes con cultivos de colonización (nasal, orofaríngea y/o de la ingle) POSITIVOS para *S. aureus*, obtenidos dentro de las primeras 48 hs de hospitalización.

10.1.2.1.2 Paciente colonizado por *S. aureus* durante la hospitalización o adquiriente (PCH: Paciente Colonizado en el Hospital).

Pacientes con cultivos de colonización (nasal, orofaríngea y/o de la ingle) o de infección POSITIVOS, obtenidos luego de las primeras 48 hs de hospitalización, con cultivos de Colonización en el ingreso NEGATIVOS para *S. aureus*

Nota: se consideró como paciente colonizado en el hospital, al paciente que se ha re-hospitalizado – por cualquier motivo -dentro de las 48 hs del alta hospitalaria previa y cuyo cultivo resultó positivo, en el momento de ésta nueva internación.

10.1.2.1.3 Paciente No Colonizado por *S. aureus* durante la Hospitalización (PNC)

Pacientes con cultivos de colonización (nasal, orofaríngea y/o de la ingle), NEGATIVOS para *S. aureus* durante toda la hospitalización.

10.1.2.1.4 Presión de colonización (PC)

Se calcula a través de la siguiente tasa: Número de días de paciente con MRSA importados + MRSA adquiridos en el número total de días de internación del total de los pacientes en todo el período de estudio.

10.1.2.1.5 Tasa de adquisición hospitalaria

Es una tasa utilizada para evaluar un evento (infección o colonización adquirida en el hospital) en el número total de días para todos los pacientes que ingresaron por un episodio de atención durante un período específico. La tasa de adquisición se definió como nuevos eventos de adquisición por cada 1000 días/paciente, considerando el total de pacientes internados por más de 3 días.

A los efectos de los estudios que comprenden los resultados de las etapas I y II, se definió genotípicamente a las cepas CA-MRSA y HA-MRSA y se las nombró como CA-MRSA_G y HA-MRSA_G, respectivamente (Ver definición en el siguiente inciso). Independientemente de los tipos de cepas involucradas, los casos de infección se clasificaron teniendo en cuenta el lugar o tipo de inicio o aparición de las infecciones.

10.2 LISTA DE ABREVIATURAS Y DEFINICIONES UTILIZADAS EN LAS ETAPAS I, II y III

10.2.1 DEFINICIONES MICROBIOLÓGICAS PARA MRSA

10.2.1.1 MRSA ASOCIADO A LA COMUNIDAD (CA-MRSA)

Aislamientos de MRSA que expresen resistencia a no más de 1 (uno) de los siguientes antibióticos no-β-lactámicos: eritromicina - clindamicina, rifampicina, gentamicina, ciprofloxacina y trimetoprima-sulfametoxazol.

10.2.1.2 MRSA ASOCIADO AL HOSPITAL (HA-MRSA)

Aislamientos de MRSA que sean resistentes a dos ó más (≥ 2) de los siguientes antibióticos no-β-lactámicos: eritromicina - clindamicina, rifampicina, gentamicina, ciprofloxacina, trimetoprima-sulfametoxazol y minociclina.

10.2.2 DEFINICIONES GENOTÍPICAS PARA MRSA

10.2.2.1 GENOTIPOS CA-MRSA (CA-MRSA_G)

CA-MRSA_G se definieron como aquellos aislamientos pertenecientes a los siguientes genotipos: ST5-IV-t311 y relacionados, PVL⁺/-, ST30-IV-t019 y relacionados, PVL⁺/-, ST72-IV-t148 y relacionados, PVL⁻, ST8-IV-t008, PVL⁺/-, ST97-IV-t267 y relacionados, PVL⁻, ST59-IV-t437, PVL⁻, ST207-IV-t525, PVL⁻, ST1649 (SLV de ST6) -IV-t701, PVL⁻ [2, 150, 258].

10.2.2.2 GENOTIPOS HA-MRSA (HA-MRSA_G)

Todos los genotipos restantes se consideraron HA-MRSA_G: ST5-I-t149, ST100-IVNv-t002 y ST45-II-t2233 [2, 150].

10.2.3 DEFINICIONES EPIDEMIOLÓGICA DE LAS INFECCIONES SEGÚN SITIO DE ADQUISICIÓN DE LA CEPA (MRSA Y MSSA).

10.2.3.1 INFECCIÓN DE INICIO EN LA COMUNIDAD (CO, *Community Onset*):

Se considerarán “De Inicio en la Comunidad” a las infecciones que se diagnostiquen en el momento de la consulta inicial de pacientes ambulatorios (con confirmación microbiológica) ó las que sin manifestarse en el momento del ingreso, lo hacen dentro de las primeras 48hs de la internación.

10.2.3.2 INFECCIÓN DE INICIO EN EL HOSPITAL (HO, *Healthcare Onset*):

Serán consideradas “De inicio en el hospital” a las infecciones que no estén presentes al ingreso del paciente, y que se diagnostiquen (con confirmación microbiológica), luego de las primeras 48hs de internación.

10.3 ETAPA II

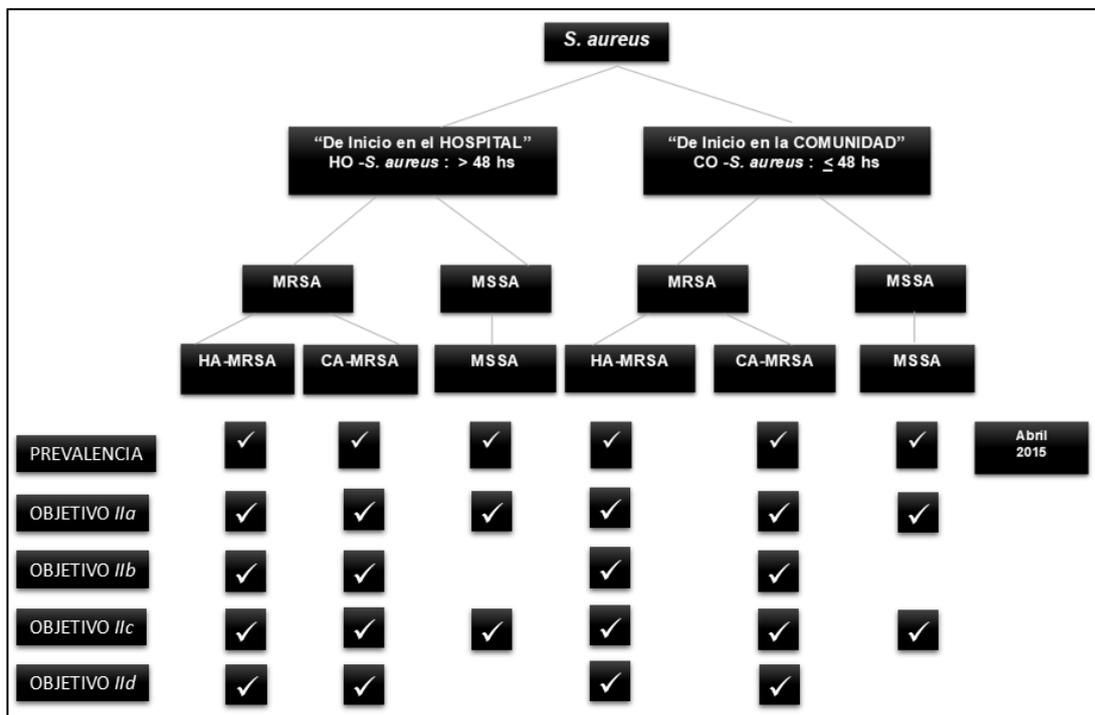
Determinar la evolución clínica y molecular de las infecciones por MRSA en nuestro país.

10.3.1 Diseño del estudio y definición de caso.

A fin de caracterizar los genotipos CA-MRSA y HA-MRSA y evaluar su prevalencia global en Argentina en el ámbito hospitalario y de la comunidad, se realizó un estudio transversal, multicéntrico, prospectivo y observacional durante el mes de abril de 2015 en 61 hospitales de 20 provincias y la Ciudad de Buenos Aires (CABA). Este estudio se llevó a cabo en colaboración con un grupo de profesionales del Instituto Malbrán dirigidos por la doctora Alejandra Corso.

A continuación se presenta un esquema de la organización de los objetivos específicos alcanzados y los genotipos analizados en cada uno de ellos (cada tilde señala el genotipo analizado).

Esquema para abordar los objetivos específicos II a-d



OBJETIVOS ESPECÍFICOS RELACIONADOS A LA ETAPA II

Ila. Establecer la PREVALENCIA nacional además del perfil de resistencia antimicrobiana de *S. aureus* meticilino resistente (MRSA) en infecciones asociadas al ámbito hospitalario (HA-MRSA) y a la comunidad (CA-MRSA).

Ilb. Analizar y Comparar las características moleculares de los MRSA adquiridos en la comunidad y en el hospital según las regiones (Norte, Centro y Sur) y según grupo etario (pediatría y adultos)

Ilc. Analizar el PATRON CLINICO- EVOLUTIVO DOMINANTE actual en nuestro medio, de las infecciones causadas por *S.aureus* (sensibles y resistentes a meticilina) en sus diferentes localizaciones y sitio de comienzo (comunidad u hospital) en pacientes pediátricos y adultos.

Ild. Determinar la evolución de la epidemiología clínica y molecular de las infecciones por MRSA en el país, tanto a nivel hospitalario como de la comunidad comparativamente con el estudio previo (2009).

10.3.2 Características de los hospitales

En la siguiente tabla (Tabla 18) se indican las características de los Hospitales, número de aislamientos clínicos de *S. aureus* recuperados durante el período en cada uno de ellos y ubicación de los 61 hospitales por regiones (Norte, Centro y Patagonia) en el país.

Tabla 18| Características de los Hospitales participantes en el proyecto multicentrico 2015, Argentina.

HOSPITAL	REGIÓN	PROVINCIA	N°CAMAS	N° AISLAMIENTOS	MSSA n(%)	MRSA n(%)	CA-MRSA n(%)	HA-MRSA n(%)	
1	NORTE	CATAMARCA	100	2	1(50)	1(50)	1(50)	0(0)	
2	NORTE	CORRIENTES	120	4	0(0)	4(100)	4(100)	0(0)	
3	NORTE	CHACO	520	18	3(17)	15(83)	11(61)	4(22)	
4	NORTE	CHACO	245	26	7(27)	19(73)	18(69)	1(4)	
5	NORTE	CHACO	77	9	0(0)	9(100)	9(100)	0(0)	
6	NORTE	FORMOSA	121	18	3(17)	15(83)	11(61)	4(22)	
7	NORTE	FORMOSA	181	3	1(33)	2(67)	1(33)	1(33)	
8	NORTE	JUJUY	110	5	1(20)	4(80)	4(80)	0(0)	
9	NORTE	LA RIOJA	200	5	1(20)	4(80)	4(80)	0(0)	
10	NORTE	LA RIOJA	260	4	2(50)	2(50)	2(50)	0(0)	
11	NORTE	MISIONES	167	8	3(37)	5(63)	5(63)	0(0)	
12	NORTE	SALTA	220	7	2(29)	5(71)	5(71)	0(0)	
13	NORTE	SALTA	250	10	1(10)	9(90)	9(90)	0(0)	
14	NORTE	TUCUMAN	60	11	3(27)	8(73)	8(73)	0(0)	
15	NORTE	TUCUMAN	65	6	1(17)	5(83)	3(50)	2(33)	
TOTAL			9 PROVINCIAS	2696	144	27%	73%	66%	7%
16	CENTRO	BUENOS AIRES	140	26	18(69)	8(31)	8(31)	0(0)	
17	CENTRO	BUENOS AIRES	254	3	1(33)	2(67)	2(67)	0(0)	
18	CENTRO	BUENOS AIRES	78	1	0(0)	1(100)	1(100)	0(0)	

MATERIALES Y MÉTODOS

19	CENTRO	BUENOS AIRES	198	10	6(60)	4(40)	4(40)	0(0)
20	CENTRO	BUENOS AIRES	400	21	12(57)	9(43)	9(43)	0(0)
21	CENTRO	BUENOS AIRES	187	29	18(62)	11(38)	10(34)	1(3)
22	CENTRO	BUENOS AIRES	305	15	3(20)	12(80)	12(80)	0(0)
23	CENTRO	BUENOS AIRES	307	15	5(33)	10(67)	9(60)	1(7)
24	CENTRO	BUENOS AIRES	360	8	8(100)	0(0)	0(0)	0(0)
25	CENTRO	BUENOS AIRES	350	32	8(25)	24(75)	22(69)	2(6)
26	CENTRO	BUENOS AIRES	114	21	6(29)	15(71)	11(52)	4(19)
27	CENTRO	BUENOS AIRES	120	3	1(33)	2(67)	2(67)	0(0)
28	CENTRO	BUENOS AIRES	150	2	1(50)	1(50)	0(0)	1(50)
29	CENTRO	BUENOS AIRES	227	9	4(44)	5(56)	4(44)	1(11)
30	CENTRO	BUENOS AIRES	380	18	13(72)	5(28)	5(28)	0(0)
31	CENTRO	BUENOS AIRES	172	8	1(12)	7(88)	7(88)	0(0)
32	CENTRO	BUENOS AIRES	534	21	9(43)	12(57)	12(57)	0(0)
33	CENTRO	BUENOS AIRES	120	7	0(0)	7(100)	7(100)	0(0)
34	CENTRO	BUENOS AIRES	244	9	1(11)	8(89)	8(89)	0(0)
35	CENTRO	CÓRDOBA	107	13	8(62)	5(38)	4(31)	1(8)
36	CENTRO	CÓRDOBA	108	1	1(100)	0(0)	0(0)	0(0)
37	CENTRO	CÓRDOBA	81	8	5(62)	3(38)	1(13)	2(25)
38	CENTRO	CÓRDOBA	216	9	6(67)	3(33)	0(0)	3(33)
39	CENTRO	CÓRDOBA	60	11	9(82)	2(18)	0(0)	2(18)
40	CENTRO	CÓRDOBA	70	9	7(78)	2(22)	2(22)	0(0)
41	CENTRO	CÓRDOBA	36	5	5(100)	0(0)	0(0)	0(0)
42	CENTRO	CÓRDOBA	228	5	4(80)	1(20)	1(20)	0(0)
43	CENTRO	CÓRDOBA	60	4	2(50)	2(50)	2(50)	0(0)
44	CENTRO	CÓRDOBA	80	10	6(60)	4(40)	4(40)	0(0)
45	CENTRO	CÓRDOBA	81	7	4(57)	3(43)	2(29)	1(14)
46	CENTRO	CÓRDOBA	186	14	10(71)	4(29)	1(7)	3(21)
47	CENTRO	CÓRDOBA	84	4	3(75)	1(25)	0(0)	1(25)
48	CENTRO	ENTRE RIOS	180	1	0(0)	1(100)	1(100)	0(0)
49	CENTRO	MENDOZA	268	8	7(87)	1(13)	1(13)	0(0)
50	CENTRO	SAN LUIS	50	12	7(58)	5(42)	5(42)	0(0)
51	CENTRO	SANTA FE	170	17	9(53)	8(47)	8(47)	0(0)
52	CENTRO	SANTA FE	180	13	5(38)	8(62)	7(54)	1(8)
53	CENTRO	SANTA FE	104	8	2(25)	6(75)	6(75)	0(0)
54	CENTRO	SANTA FE	100	8	1(12)	7(88)	7(88)	0(0)
55	CENTRO	SANTA FE	108	13	10(77)	3(23)	3(23)	0(0)
56	CENTRO	LA PAMPA	188	7	4(57)	3(43)	3(43)	0(0)
TOTAL			7797	446	52%	48%	43%	5%
57	PATAGONIA	NEUQUEN	277	23	19(83)	4(17)	4(17)	0(0)
58	PATAGONIA	RIO NEGRO	80	10	5(50)	5(50)	5(50)	0(0)
59	PATAGONIA	SANTA CRUZ	100	13	12(92)	1(8)	1(8)	0(0)
60	PATAGONIA	SANTA CRUZ	223	18	12(67)	6(33)	3(17)	3(17)
61	PATAGONIA	TIERRA DEL FUEGO	95	14	10(71)	4(29)	2(15)	2(15)
TOTAL			775	78	74%	26%	19%	7%

Este estudio se llevó a cabo en colaboración con un grupo de profesionales pertenecientes al Servicio de Antimicrobianos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. ANLIS "Dr. Carlos G Malbrán", dirigidos por la Dra. Alejandra Corso.

10.3.3 Algoritmo de trabajo



Se identificaron los pacientes en forma prospectiva y consecutiva, de acuerdo a los resultados de los cultivos clínicos de *S. aureus*, de los laboratorios de microbiología

Se evaluó solamente el primer aislamiento de cada paciente. Los miembros del Grupo de estudio de *S. aureus*, Argentina (uno o más de cada hospital participante) completaron un cuestionario estandarizado para cada paciente. Los datos recogidos incluyen las siguientes características: i) las características socio-demográficas, ii) condiciones médicas subyacentes, iii) los factores de riesgo asociadas a la salud para la colonización o infección relacionadas a la atención sanitaria (HRF) [125], iv) el inicio de la infección (hospital vs comunidad), v) la exposición a antibióticos durante el año anterior, vi) las características y gravedad de las infecciones.

Las infecciones invasivas (INVI) se definieron como una o más de las siguientes condiciones: bacteriemia, endocarditis infecciosa, neumonía, abscesos pleurales, linfadenitis, artritis séptica, osteomielitis, fascitis necrotizantes, piomiositis, meningitis u otra infección en la cual se aisló *S. aureus* a partir de fluidos corporales normalmente estériles [149]. La sepsis se definió sobre la base de los criterios del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica [149]. Las infecciones de piel y tejidos blandos (IPPB) no complicadas incluyeron los casos de infección primaria de la piel (Ej. un absceso, celulitis, foliculitis). Por otro, lado las IPPB complicadas incluyeron casos de IPPB primaria con bacteriemia secundaria o su propagación a los tejidos

contiguos [150]. Las infecciones del sitio quirúrgico (ISQ) no fueron considerados como enfermedades de la piel.

Este estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de Investigación en Salud del Ministerio de Salud, Provincia de Córdoba (aprobación N ° 2531/2015), así como por el Comité de Ética institucional de cada hospital participante.

10.3.4 Aislamientos bacterianos y pruebas de sensibilidad antimicrobianas

Los aislamientos clínicos de *S. aureus* (n: 668) fueron identificados por los procedimientos microbiológicos estándar y las pruebas de sensibilidad antimicrobiana se realizaron mediante el método de difusión en disco (CLSI, 2015). La concentración inhibitoria mínima (CIM) a vancomicina se determinó por el método de dilución en agar, (CLSI, 2015) y la CIM a Mupirocina se evaluó mediante *E-test* (bioMérieux). La sensibilidad a Ceftobiprol en las cepas de MRSA se realizó en el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas “Dr. C. G. Malbrán”, utilizando el método de dilución en agar (CLSI 2018) y se interpretó de acuerdo a los criterios del EUCAST como Sensible <2 ug/ml y Resistente >2 ug/ml. La cepa de *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* 29212 y *E. coli* 25922 se utilizaron como cepas de referencia.

10.4 ETAPA III

Analizar la evolución molecular del CC5 a través del secuenciamiento de genomas completos (WGS) y la virulencia comparativa de los diferentes clones en un modelo animal, y su posible asociación con el comportamiento epidémico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS RELACIONADO A LA ETAPA III

IIIa. Analizar la evolución del complejo clonal 5 (CC5) en nuestro país a través del (WGS).

IIIb. Analizar en forma comparativa la virulencia de los clones MRSA (CA-MRSA y HA-MRSA) más prevalentes en nuestro país, utilizando el modelo en invertebrados de *Galleria mellonella*

10.4.1 Objetivo específico IIIa

Para llevar a cabo el objetivo específico IIIa, se llevó a cabo una selección de 20 aislamientos del CC5, representativos del norte centro y sur del país tanto MSSA como MRSA, que se detallan en la figura 35.

Figura 35 | Características moleculares y distribución geográfica de los aislamientos seleccionados

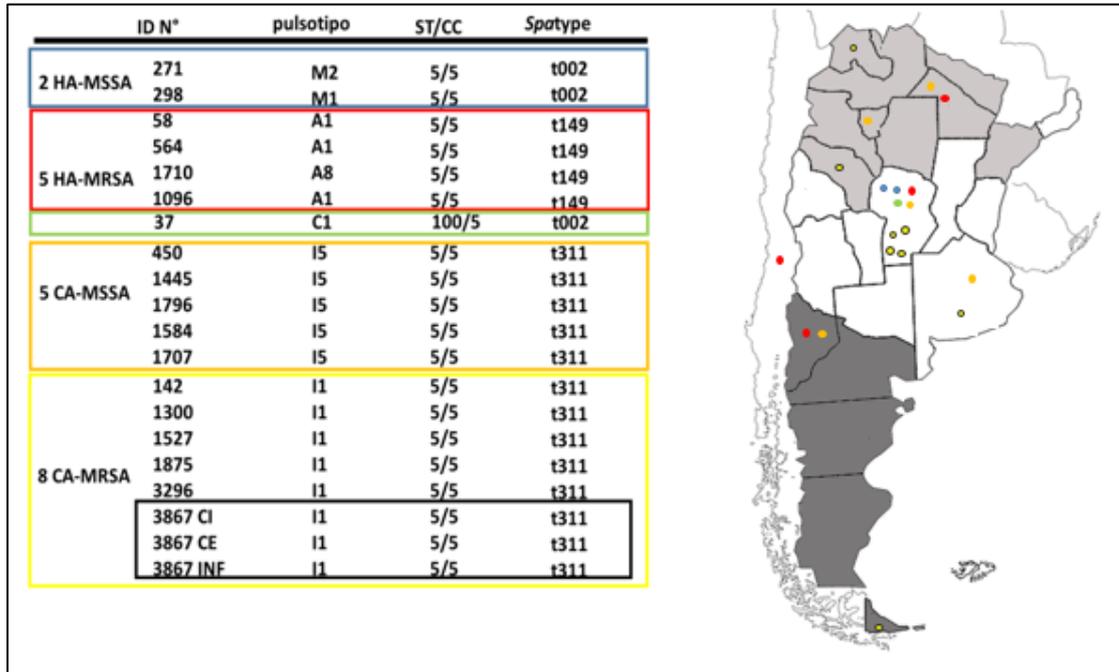


Fig.35. Detalle de los 20 aislamientos de *S. aureus*, ID N°, número de identificación, ST/CC, Tipo secuencial/complejo clonal, Spatype, tipo de proteína A, HA-MSSA, *S. aureus* sensible a meticilina asociado al hospital (recuadro y punto azul en mapa), HA-MRSA, *S. aureus* resistente a meticilina asociado al hospital (recuadro y punto rojo en mapa), CA-MSSA, *S. aureus* sensible a meticilina asociado a la comunidad (recuadro y punto anaranjado en mapa), CA-MRSA, *S. aureus* resistente a meticilina asociado a la comunidad (recuadro y punto amarillo en mapa). En recuadro verde se distingue el clon C-ST100-IVNV y los puntos verdes en el mapa, en recuadro negro se denotan los tres aislamientos I-ST5-IVA-t311 recuperados del mismo paciente en proyecto de colonización 2014).

Como se describe en la figura 35, se eligieron 2 aislamientos HA-MSSA, recuperado de la provincia de Córdoba en el año 1999, 5 aislamientos de HA-MRSA, 4 de los cuales pertenecen al clon Cordobés/chileno ST5-I (1 aislamiento recuperado en 1999 en Córdoba, 2 recuperados en 2007 en Córdoba y 1 recuperado en 2007 en Santiago de Chile) y 1 ST100-IVNV, 5 aislamientos CA-MSSA distribuidos por la región del norte, centro y sur, recuperados entre 2006 y 2009 y 8 aislamientos de CA-MRSA distribuidos por las regiones del norte, centro y sur entre 2009 y 2014.

Procedimiento de secuenciación y alineamiento utilizando Illumina HiSeq

La secuenciación se realizó utilizando la plataforma Illumina HiSeq. El ADN genómico se aisló con los kits *Qiagen DNeasy Blood and Tissue*. Las bibliotecas de secuenciación se prepararon con los kits de preparación de muestras de ADN Illumina Nextera XT (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos) y se secuenciaron (lecturas o “reads” de 100 de nucleótidos) con instrumentos HiSeq 2000 en el Laboratorio de Genómica y Bioinformática de INDEAR, Rosario, Argentina.

El análisis bioinformático de los resultados se realizó en colaboración con el Ing Ezequiel J. Sosa y el Dr. Darío A. Fernandez Do Porto, integrantes del Grupo de Bioinformática del Instituto de Cálculo, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, CONICET, Buenos Aires, Argentina, dirigido por el Dr. Adrián G. Turjanski.

Pre procesamiento

Las lecturas obtenidas de cada cepa, fueron analizadas utilizando el programa FastQC [259] y se recortaron zonas de baja calidad, adaptadores de secuenciación y las zonas del principio con sesgos de GC por posición utilizando el programa Trimmomatic [259, 260].

Ensamblado de novo

Utilizando las lecturas filtradas de las secuencias de cada cepa, se procedió a realizar un ensamblado de novo, utilizando el programa *Spades* [261] y se verificó la calidad de los ensamblados con el programa QUAST [262].

Búsqueda de genes de virulencia y resistencia

Para determinar la presencia o ausencia de determinados genes, se realizó una búsqueda de blast [262, 263] de las secuencias aminoacídicas sobre el ensamblado de novo. En particular, se buscaron todos los factores de virulencia en la base de datos VFDB [264] (Tabla 19), cuya cobertura fuera superior al 80% y posean un e-value menor a 10^{-5} .

Tabla 19 | Factores de virulencia estudiados

Gen	Códigos en VFDB	Gen	Códigos en VFDB
sak	VFG001328,VFG004787,VFG004788,VFG004789, VFG004790	sen	VFG004981
sev	VFG043787	sem	VFG004985
scn	VFG002423	sel	VFG004991,VFG004988
lukDE	VFG004861,VFG004862, VFG004864	sek	VFG001327,VFG004992
ser	VFG043785	sej	VFG043784
seq	VFG004973	sei	VFG004996,VFG004997,VFG004998
sep	VFG005013	fnbB	VFG001282,VFG004613,VFG004614,VFG004615,VFG004616,VFG017220
seg	VFG005004	lukFS	VFG001276
sed	VFG001807	chp	VFG002422
sec	VFG005009,VFG001805, VFG005006,VFG005007	sdrE	VFG001281,VFG004586,VFG004587,VFG004588,VFG004590,VFG004591,VFG004593, VFG017112,VFG017226
seb	VFG001802	ent2	VFG004966
sea	VFG001325,VFG005012	tst1	VFG004873,VFG001809
seo	VFG004977	etb	VFG001801

Para la búsqueda de genes de resistencia, se utilizó el listado de genes de la tabla 20, la cual fue previamente utilizada [251]. Las secuencias fueron descargadas de Uniprot [265].

Tabla 20 | listado de genes de Resistencia

Antibióticos	Gen accesorio	Codigo de Proteina	Gen de Core	Mutación	Sustitución
Penicilina	<i>blaZ</i>	Q6GFV5_STAAR			
	<i>blaZ-D</i>	Q53699_STAAU			
	<i>blaZ-A</i>	Q60250_STAAU			
	<i>blaZLGA251</i>	G0LPN7_STAAU			
Cefoxitina	<i>mecA</i>	O54286_STAAU			
	<i>mecC</i>	G0LPN8_STAAU			
Ciprofloxacina			<i>grlA</i>		S80F
			<i>grlA & gyrA</i>		S80F, S84L
			<i>grlA & gyrA</i>		S80Y, S84L
			<i>grlA & gyrA</i>		S80F, E88K
			<i>grlA</i>		S80Y
Gentamicina	<i>aacA-aphD</i>	AACA_STAAM			
Amikacina	<i>aphA-3</i>	A8J4N5_STAAU			
	<i>aadD</i>	KANU_STAAU			
Eritromicina			23S RNA	A0258T/G	
				A2059G	
				T2089C	
				C2163T	
				C2207T	
				A2059G & A2058G	
				C2163T	
		<i>ermA</i>	ERMA_STAAN		
		<i>ermB</i>	Q799N2_STAAU		
		<i>ermC</i>	ERMC3_STAAU		
		<i>erm33</i>	Q8KLN5_STASC		
		<i>ermT</i>	D3GMR8_STAA5		
		<i>mefA</i>	Q79RU3_STAAU		
		<i>mefE</i>	Q7BKK4_STRPN		
		<i>msrA</i>	A1E139_STAEP		
	<i>ereA</i>	EREA_ECOLX			
	<i>ereB</i>	EREB_ECOLX			
Clindamicina	<i>linA</i>	Q6QHH8_STAAU			
	<i>ermA</i>	ERMA_STAAN			
	<i>ermC</i>	ERMC3_STAAU			
Linezolid			23S rRNA	C2192T	
				G2447T	
				T2500A	

		A2503G & T2504C	
		G2505A	
		G2766T	
		G2576T	
		G2534T & G2603T	
		<i>rplD</i>	K68Q
		<i>rplC</i>	G152D
			M169L
			F127-H146
	<i>cfr</i>	CFR_STASC	
Mupirocina		<i>ileS-1</i>	V588F
			G593V
			V631F
	<i>ileS-2</i>	SYI2_STAAU	
Rifampicina		<i>rpoB</i>	S464P
			Q468R
			D471Y
			A477V
			A477D
			H481Y
			R484H
			D550G
Trimethoprima/ sulfametoxazol		<i>dfrA</i>	L41F
			F99S
			F99Y
			H150R
	<i>dfrK</i>	C7C2U7_STAA5	
	<i>dfrB</i>	A8Z405_STAAT	
	<i>dfrG</i>	Q4H3Y3_STAAU	
Vancomicina		<i>rpoB</i>	A621E
		<i>graR</i>	Deletions
		<i>vraS</i>	S197N
	<i>vanA</i>	Q7BWD7_STAAU	
	<i>vanZ</i>	Q7BWD5_STAAU	

Tabla 20. Se detallan los genes buscados en este estudio, aquellos alojados en el genoma core, los del genoma accesorio, las mutaciones que llevan a las resistencia y las sustituciones.

Llamado de variantes

Para poder comparar las cepas, se realizó un llamado de variantes utilizando como referencia el genoma de *S. aureus* N315, por ser una cepa perteneciente al linaje ST5 cuyo genoma está cerrado a nivel cromosoma. Este se realizó mapeando las lecturas filtradas de cada cepa contra el genoma de referencia (NCBI NC_002745.2) utilizando BWA [266] y procesandolo

en formato binario son Samtools [267]. Luego se realiza el llamado de variantes utilizando GATK [266, 268], para finalmente anotar las variantes con SnpEff [269].

Filogenia y cálculo de ancestro común más reciente

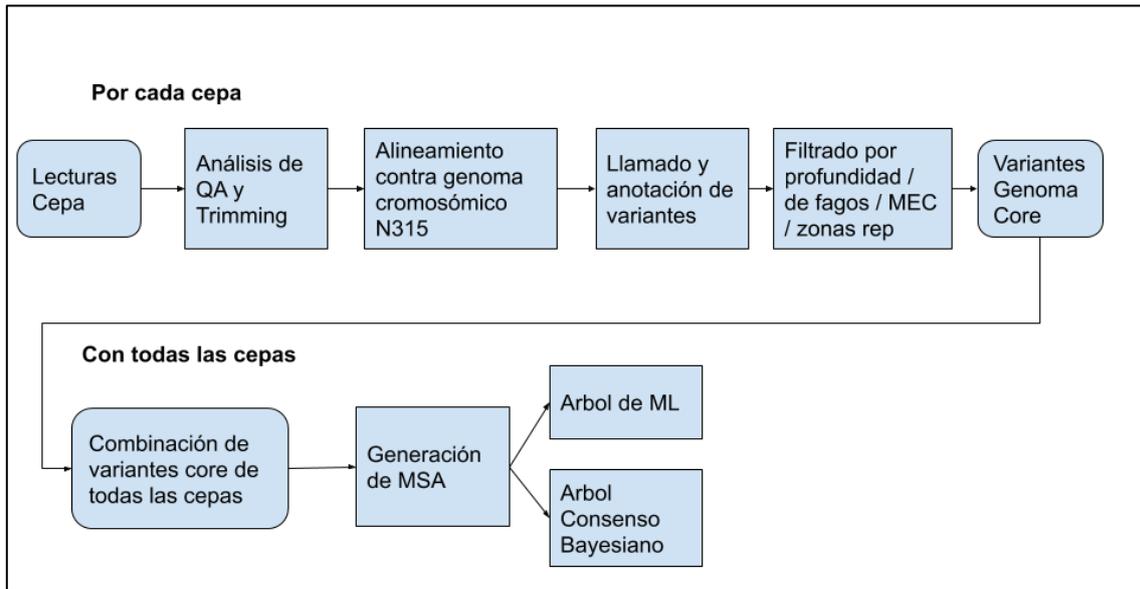
Para realizar el análisis filogenético de las cepas, se realizaron 2 análisis: un árbol de máxima verosimilitud y un árbol datado a partir de simulaciones de cadenas de Markov Monte Carlo. Como punto de partida para obtener esos resultados, se determinó el genoma core.

Para definir la región a comparar entre los aislamientos del CC5, se procedió, de acuerdo a un estudio multicentrico realizado en Europa [251], donde se utilizaron las secuencias de 26 genomas completos cargados en la base pública NCBI. A través de un mapeo contra la cepa de referencia N315 con número de acceso BA000018, se estableció todas aquellas regiones conservadas en los 26 aislamientos serían parte del genoma core en donde se realizaría el análisis filogenético, mientras que todas aquellas regiones que no se mantenían conservadas en la totalidad de los aislamientos fue asignada como genoma accesorio. El procedimiento puntual, consistió en filtrar todas las lecturas que no se mapeaban contra alguno de los 26 aislamientos.

A posteriori, todas las variantes que: tenían poca profundidad, poca calidad, estaban dentro de los SCCmec o de los fagos (resultados en http://phaster.ca/submissions/NC_002745.2 [270]) en N315, de esta manera sólo se analizaron los polimorfismos del genoma core. Luego, utilizando VCFkit (<https://vcf-kit.readthedocs.io>), se calculó un alineamiento múltiple (MSA) de las cepas a partir de dichas variantes. Con dicho MSA, se realizó un árbol de máxima verosimilitud utilizando RaXML utilizando el modelo de sustitución nucleotídica GTR (General Time Reversible).

Con el mismo MSA, se realizó un análisis bayesiano, utilizando el programa BEAST v1 [270, 271]. El mismo toma como entrada el alineamiento, los años de las muestras y los parámetros del los *priors* (probabilidades a priori) a utilizar (modelo de sustitución HKY+G con frecuencias base empíricas y un reloj molecular estricto) [251]. El mismo genera miles de simulaciones, donde cada una representa un set de parámetros de interés, en nuestro caso, nos interesan la velocidad de reloj molecular y el árbol generado. De todas esas simulaciones se genera un árbol consenso, con las fechas estimadas de cada ancestro común.

Esquema general del análisis comparativo



-QA, control de calidad de las secuencias, MSA, alineamientos múltiples, ML, maximun likelyhood (máxima verosimilitud)

Construcción del SCCmec de la cepa 0037 (C-ST100-IVNV-t002)

Para la reconstrucción del inserto, se tomó como referencia el *mec_{ZH47}* (NCBI AM292304). Primero se extrajeron los contigs del ensamblado de novo del aislamiento 0037 que contenían buena homología y al menos 500 bp que alineaban contra esa referencia. 4 contigs cumplían esas características y se alinearon contra la referencia utilizando el programa Mauve [272] y si estaban a menos de 500 se unían dichos contigs por Nucleotidos. La unión de dichos contigs también fue verificada al buscar sobre esos 4 contigs los primers que se utilizaron para amplificar: las secuencias de inserción *IS1256L-aac6*, *IS256R-IS1272*, *IS256R-IS1272* y *mecA-IS256L*, descriptos previamente por nuestro grupo de investigación [149].

10.4.2 Objetivo específico IIIb

Para llevar a cabo el estudio de virulencia comparativa, se realizó una selección de aislamientos representativos de clones HA-MRSA y CA-MRSA. En la tabla 21 se detallan las características moleculares de cada clon. Se utilizaron 395 larvas para realizar el análisis, 180 para los 6 clones I1, 95 para los N4, 32 para los USA300, 52 para los A1 y 36 para los B1.

Tabla 21 | Selección de clones MRSA

GRUPO	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	ID aislamiento
I1	CA-MRSA I-ST5-IVa-t311 PVL ⁺	1300
I1	CA-MRSA I-ST5-IVa-t311 PVL ⁺	1875
I1	CA-MRSA I-ST5-IVa-t311 PVL ⁺	142
I1	CA-MRSA I-ST5-IVa-t311 PVL ⁺	3867 ADM-C

I1	CA-MRSA I-ST5-IVa-t311 PVL ⁺	3867 DIS-C
I1	CA-MRSA I-ST5-IVa-t311 PVL ⁺	3867 W-INF
N4	CA-MRSA N-ST30-IVc-t019 PVL ⁺	1764
N4	CA-MRSA N-ST30-IVc-t019 PVL ⁺	1955
N4	CA-MRSA N-ST30-IVc-t019 PVL ⁺	484
USA300	CA-MRSA USA300-ST8-IV-t008 PVL ⁺ ACME ⁺	1133
USA300	CA-MRSA USA300-ST8-IV-t008 PVL ⁺ ACME ⁺	ATCC
USA300	CA-MRSA USA300VL-ST8-IV-t008 PVL ⁺ ACME ⁻	678
USA300	CA-MRSA USA300LV-ST8-IV-t008 PVL ⁺ ACME ⁻	1512
A1	HA-MRSA ST5-I-t149	58
A1	HA-MRSA ST5-I-t149	564
A1	HA-MRSA ST5-I-t149	1096
B1	HA-MRSA ST239-IIIa-t037	395
B1	HA-MRSA ST239-IIIa-t037	419

Tabla 21. Descripción de los clones de MRSA utilizados para inocular

El procedimiento experimental, así como el análisis de los resultados, se realizaron en el Laboratorio de Fisiología y Genética de Bacterias Lácticas, Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR), a cargo del Dr. Christian Magni y bajo la supervisión y dirección del Dr. Víctor Blancato.

Preparación de los Inóculos bacterianos

Las cepas de *S. aureus* se cultivaron durante la noche en caldo tripteína de soya (TSB) sin agitación a 37°C. Luego, los cultivos bacterianos se diluyeron en 50 ml de TSB hasta una OD final de 0,1 y se cultivaron a 37°C sin agitación, hasta que se alcanzó la fase exponencial (4,5h). Los cultivos se centrifugaron, se resuspendieron en PBS 1X + glicerol al 20% y se congelaron a -80 °C. Al día siguiente, se determinó el número de unidades formadoras de colonias por ml (UFC / ml) mediante recuento en placa en agar tripteína de soya. A partir de los recuentos obtenidos, se prepararon los inóculos ajustándolos para obtener un número de UFC/ml adecuado para el análisis.

Inoculación de larvas

Se seleccionaron todas aquellas larvas con un peso de entre 200 y 300 mg con buen aspecto y movilidad, retirándoles el alimento 24 hs previas al ensayo. Las larvas se inocularon mediante inyección directa a nivel del último espuripodio (falsa pata) utilizando una jeringa Hamilton 705 equipada con un dispensador de repetición. Cada grupo de larvas de 10 individuos ubicados en placas de Petri, se inoculó con 6×10^8 UFC/ml para inocular un volumen 5 μ l por cada larva (3×10^6 UFC/larva). Después de la inyección, las larvas se incubaron a 37°C. La supervivencia de los individuos se controló cada dos a cuatro horas, a través de observación directa y contacto suave con larvas no móviles para evidenciar una respuesta de movimiento o confirmar la

muerte. Se evaluó la supervivencia del grupo de larvas hasta 72 h después de la infección. El experimento se realizó en 3 veces por triplicado.

10.5 TIPIFICACIÓN MOLECULAR

La caracterización de los MRSA incluyó la realización de electroforesis en campo pulsante (PFGE) y tipificación por análisis de la secuencia polimórfica “x” de gen de la proteína A de *S.aureus* (*spa typing*). A los aislamientos representativos de cada pulsotipo mayor y a aquellos que el ST no se pudo deducir de la base de datos *spa-server* se los analizó por MLST (Multi Locus Sequence Typing). A todos los MRSA se les realizó la detección del gen *mecA* y *mecC* además del tipo de SCC*mec* (*Staphylococcus* Chromosomal Cassette for Methicillin resistance). Además se analizó la presencia de 23 genes de virulencia útiles como marcadores moleculares para MRSA.

10.5.1 DETECCIÓN DEL GEN *mecA* Y *mecC* POR PCR MULTIPLEX:

Esta metodología para la detección del gen *mecA* se realizó según protocolo de Geha y cols. [273]. Consiste en la utilización de dos pares de primers, uno de ellos específico para la amplificación de una secuencia del rRNA 16s del género *Staphylococcus spp* de modo que el amplicón obtenido es utilizado como control positivo de la calidad e identidad del ADN que se estudia y el otro par de primers amplifica una región altamente conservada del gen *mecA*.

Para la detección del gen *mecC*, se procedió de acuerdo al protocolo de Stegger y cols. [274], en el cual se describe una PCR multiplex, que amplifica una región conservada tanto para el gen *mecA* como para el gen *mecC*, así como primers específicos para la amplificación del gen *mecA* y *mecC* individualmente. De esta manera, la primer PCR, identifica la región que puede corresponder tanto al gen *mecA* como al *mecC*, y en la siguiente PCR se identifica cual de los dos es mediante los primers específicos.

Se procedió de la siguiente manera:

Extracción de ADN: se obtuvo, a partir de un lisado bacteriano, de la siguiente manera: se recolectaron no menos de 10 colonias bacterianas de un cultivo joven (18-24h) y fueron resuspendidas en 100µl de una solución de lisis que contenía: 25U de Lisostafina/ml, 10 mM de EGTA (ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) y 10mM Tris (pH=8) en agua desionizada. Luego, la suspensión es incubada a 37°C por 30 min y posteriormente a 95°C por 10 min. Se deja enfriar a T° ambiente y luego se añaden 900µl de agua desionizada estéril. La suspensión es centrifugada por 3 min a 13000g y del sobrenadante se utilizan 2µl como templado de ADN para la siguiente PCR:

PCR: El volumen final de la mezcla de reactivos de PCR para cada muestra fue de 50µl, la misma incluye: 200µM dNTP (deoxynucleósido trifofato, 10mM Tris; pH=8,3), 50mM KCl, 1,5 µM Mg2Cl, 1pmol/µl de cada primer, 1U de Taq ADN polimerasa y agua miliQ estéril.

Las secuencias de los primers utilizados para la región conservada del gen *mecA* y para el control interno del RNAr 16S fueron:

mecA1: 5'-GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA-3'

mecA2: 5'- CCAATCCACATTGTTTCGGTCTAA-3'

P4: 5'- GGAATTCAACTGGAATTGAATTGACGGGGGC -3'

P5: 5'- CGGGATCCCAGGCCCGGAACGTATTAC -3'

Las secuencias de los primers utilizados para la región conservada del gen *mecA* y *mecC* conjuntamente fueron:

mecALGA251FP: 5'- TCACCAGGTTCAAC[Y]CAAAA-3'

mecALGA251RP: 5'- CCTGAATC[W]GCTAATAATATTTTC-3'

Las secuencias de los primers utilizados para la región conservada del *mecC* fueron:

mecALGA251MultiFP: 5' GAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC-3'

mecALGA251MultiRP: 5'- GAAGATCTTTCCGTTTTCAGC-3'

Condiciones de reacción: el ciclado térmico consistió en: desnaturalización inicial a 94°C durante 4 min seguido de 30 ciclos de amplificación (Desnaturalización: a 94°C por 45 seg, *annealing*: 50°C 45 seg y extensión: 72°C 60 seg) y por último extensión final a 72 °C por 2 min.

Controles: Control (+): *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA); Control (-) de reacción: *S. aureus* ATCC 25923 (MSSA); Control (-) de reactivos: 2µl de agua MQ estéril con la mezcla de reacción.

10.5.2 ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO o *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE):

Esta metodología deriva, en su fundamento, de una electroforesis convencional de ácidos nucleicos en campo eléctrico constante, con la diferencia de que el estado pulsátil del campo eléctrico aplicado (campo eléctrico que varía periódicamente) permite la resolución eficiente de moléculas de ADN de gran tamaño molecular (entre 10 kb y 800 kb) que previamente se obtuvieron al tratar el cromosoma bacteriano con una enzima de restricción (ER). Para lograr la separación, se trabaja con una cuba hexagonal que tiene dispuestos 24 electrodos. Bajo la dirección de un campo eléctrico, las moléculas de ADN se reorientan y se desplazan avanzando en dirección del polo positivo. Cuando el campo eléctrico cesa, las moléculas de ADN se relajan recuperando su estado inicial. La aplicación de un 2º campo eléctrico con una orientación distinta al primero, obliga al ADN a cambiar su conformación y reorientarse de nuevo para avanzar en la dirección del 2º campo eléctrico. El tiempo requerido para la 2º reorientación es

dependiente de la longitud de la molécula (PM). Las moléculas más grande tardan más tiempo en alinearse y en poder comenzar el avance a través gel de lo que tardan las moléculas más pequeñas. Mientras los campos eléctricos que se alteran tengan la misma intensidad y voltaje la migración del ADN se recogerá en forma de línea recta aunque el patrón final de separación revelará la suma de todos los avances cortos en zig-zag que el ADN ha realizado. Se obtienen así patrones de restricción que representan el ADN cromosómico bacteriano distribuido en pocas bandas con movibilidades electroforéticas distintas. El perfil de fragmentos de ADN obtenido (pulsotipo) es considerado, por lo tanto, como parámetro de identificación, como si fuese una “huella digital” a nivel genético.

El procedimiento completo comprende:

-Extracción de ADN, para ello es necesario partir de un cultivo puro (Agar Nutritivo o Tripteína Soya Agar) de *S.aureus* de no más de 18-24h y realizar una suspensión en 1ml de buffer SE con una turbidez equivalente al estándar n°3 de Mc Farland (9×10^8 microorganismos /ml).

Posteriormente, se realiza una lectura espectrofotométrica a una DO de 420nm y el valor obtenido es referido a una curva de crecimiento vs DO y se calcula el volumen de SE necesario para lograr una concentración final de 9×10^8 - 1×10^9 microorganismos/ml a fin de estandarizar todos los inóculos.

Seguidamente, se mezclan volúmenes iguales de la suspensión bacteriana con agarosa al 1% (preparada con buffer SE) a 50-56°C (fundida) y se dispensan en moldes diseñados para lograr el “plug o taco” de agarosa y se deja solidificar. De esta manera se consigue inmovilizar las células bacterianas.

-Lisis: se remueve el taco de agarosa de su respectivo molde y se sumerge en 500µl de buffer de lisis (pH 7,5) para cocos Gram positivos que contiene 30 U/ml de lisostafina (enzima que provoca la lisis de la pared). Se incuba overnight a 37°C. Seguidamente el buffer de lisis es reemplazado por el buffer de proteólisis (pH 9,5) que contiene 1µl de Proteínasa K (50mg/ml) y es incubado durante toda la noche a 56°C.

Posteriormente los tacos son sometidos a lavados con solución TE pH 7,5 cada 30 min y a 4°C. Esta operación es repetida 6-8 veces. El objetivo es eliminar los detritos celulares de la lisis así como restos de Proteínasa K, detergentes o EDTA.

-Restricción: cada taco es cortado en 2 partes de aproximadamente 4mm x 4mm y se los sumerge en buffer de equilibrio de la enzima de restricción *SmaI* por 30 min antes de realizar la digestión. Luego se tratan con 100µ de buffer de reacción que contiene 20U/muestra de la ER *SmaI* (de cortes poco frecuentes para el cromosoma de *Staphylococcus* spp), mezclar e incubar al menos 4h a 25°C.

-Electroforesis en campo pulsado: se debe preparar un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 0,5X, dejar un remanente (10ml aproximadamente) antes de volcar la agarosa en el soporte de dará forma al gel. Dejar solidificar, luego se introducen los bloques digeridos (cepas problemas y control ATCC 8325) y el marcador de PM en cada pocillo del gel. Para finalizar la operación, estos son cubiertos (sellados) con el remanente de agarosa a fin de fijar el taco de ADN en su respectivo pocillo.

El gel es colocado en la cuba electroforética CHEF-DR II (*clamped homogeneous electric field electrophoresis*). Bio Rad con buffer TAE 1x.

Seguidamente se ajustan los parámetros para la puesta en marcha con una distribución lineal de 23h a 14°C, un voltaje de 6V/cm-1. Los tiempos de cambio para los pulsos durante 10h fueron 5 seg (tiempo inicial) y 15 seg (tiempo final) en el primer bloque y en el segundo bloque fueron durante 13h de 15 seg (inicial) a 60 seg (final).

Coloración del gel y visualización: Una vez, terminada la electroforesis, se extrae el gel, y se tiñen con una solución de 1 µg/ml de Bromuro de Etidio durante 30 min y luego es decolorado por lavado en agua destilada durante 45min para posteriormente ser visualizado en transiluminador con luz UV y a continuación se obtiene la imagen por fotografía para ser interpretada.

Interpretación: debe examinarse la colección completa de cepas a estudiar en el gel en busca del patrón de bandas más común entre los aislamientos. A continuación, todos los otros patrones son comparados con éste y a la vez entre sí. Se utilizaron los criterios de Tenover [128], los cuales indican que entre 1 y 6 bandas de diferencia se definen subtipos y 7 o más bandas de diferencias definen un tipo distinto por PFGE. A cada pulso tipo se le asigna una letra designando una familia clonal y cada subtipo es señalado, además, con un número.

Ésta es una de las técnicas de elección, que actualmente se utiliza para el estudio epidemiológico de MRSA debido a su elevado poder de discriminación (PD) y permite diferenciar cepas epidémicas de aquellas causantes de casos esporádicos de infección.

Buffers utilizados:

-Buffer SE:

75 mM NaCl; 25mM EDTA, pH=7,5

-Buffer de lisis para cocos Gram positivos:

6mM Tris; 100mM EDTA; 1M NaCl; 0,5%p/v Brij 58; 0,2%p/v Desoxicolato de Sodio; 0,5% N-Lauryl sarcosine; 1mM MgCl₂; pH=7,5

-Buffer de proteólisis:

0,5mM 1%p/v EDTA, pH= 9,5

-Buffer TE:

10mM Tris; 0,5mM EDTA pH=7,5

-Buffer TBE: (10x)

445mM Tris; 445mM Ácido Bórico; 1mM EDTA; pH=8.

Controles:

-Clon Brasileiro/sudamericano

-Clon Pediátrico

-EMRSA 16

-ATCC 8325

Reproducibilidad y Similitud

Para controlar la reproducibilidad, cada nuevo patrón de restricción detectado con mayor frecuencia fue incluido en los posteriores análisis de PFGE para comparación, además de la cepa control 8325 y del marcador de peso molecular.

10.5.3 TIPIFICACIÓN DE LA REGIÓN POLIMÓRFICA “X” DEL GEN *spa*:

Esta metodología se realizó de acuerdo al protocolo de Shopsine, B. y cols [275].

El gen de la proteína A tiene aproximadamente 2150 pb y contiene 3 regiones diferentes: la porción de unión a la fracción Fc de las inmunoglobulinas G y M, la región X y la porción terminal C.

La región polimórfica llamada “X” consiste en un número variable de secuencias repetidas cortas de 24 pb (short sequence repeat, SSR). La técnica del “*spa*-typing” se basa en la secuenciación de esta región polimórfica, el análisis del número de repeticiones y su variabilidad, la diversidad de estas regiones está dada por mutaciones tipo deleciones, mutaciones puntuales o duplicaciones de las unidades repetitivas

La existencia de regiones que limitan la secuencia codificante de la región “X” permitió el uso de primers para amplificarla por PCR. Posteriormente, se secuencian esta región y se analiza el número y orden en el que están dispuestas las SSR y cada una de ellas se les asigna un número el conjunto de números obtenido para una cepa se conoce como *Tipo spa* o “t”

Esta técnica comprende las siguientes etapas:

-Extracción de ADN: se obtuvo, a partir de un lisado bacteriano, de la siguiente manera:

Se recolectaron al menos 10 colonias bacterianas de un cultivo joven (18-24h) y fueron resuspendidas en 100µl de una solución de lisis que conteniendo: 25U de Lisostafina/ml, 10 mM de EGTA (ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) y 10mM Tris (pH=8) en agua desionizada. La suspensión es, luego incubada a 37°C por 30 min y posteriormente calentada a 95°C por 10 min. Se deja enfriar a T° ambiente y luego se añaden 900µl de agua desionizada estéril. La suspensión es centrifugada por 3 min a 13000g y del

sobrenadante se recuperan 2µl de ADN que serán utilizados en la amplificación, por PCR convencional de la región X.

PCR: la mezcla de reactivos de PCR, para cada muestra; se preparó con un volumen final de 50µl, la misma incluye: 200µM dNTP (deoxynucleósido trifofato, 10mM Tris; pH=8,3), 50mM KCl, 1,5 µM Mg₂Cl, 1pmol/µl de cada primer, 1U de *Taq* ADN polimerasa y agua miliQ estéril.

Secuencia de primers utilizados:

spaF1: 5'-GACGATCCTTCGGTGACG-3'

spaF2: 5'-CAGCAGTAGTGCCGTTTGC-3'

Condiciones de reacción de PCR

Ciclo térmico: Desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min seguido de 30 ciclos de amplificación (Desnaturalización: a 95°C por 30 seg, *annealing*: 60°C 30 seg y extensión: 72°C 45 seg) y por último, extensión final a 72 °C por 10 min.

Los productos de reacción primeramente se visualizaron en gel de agarosa 1% con electroforesis convencional y luego se purificaron en columnas de afinidad (promega) y fueron secuenciados por la empresa MACROGEN.

Para evaluar cómo estas unidades repetidas se organizaron en las regiones X de los diferentes aislamientos las secuencias y el perfil de repeticiones se analizan con el programa RIDOM (<http://spaserver.ridom.de/>) para atribuirle el tipo *spa* "t".

10.5.4 TIPIFICACIÓN POR MLST:

La técnica MLST caracteriza los aislamientos detectando polimorfismo de forma directa por secuenciación del ADN en los diferentes genes seleccionados. Esta metodología se realizó de acuerdo a lo descrito por Enright y cols [129]. El método se basa en la secuenciación nucleotídica de fragmentos internos, de aproximadamente 450 pb, de 7 genes *housekeeping* codificantes de enzimas del metabolismo de *S. aureus*, Los mismos son:

arcC (Carbamate kinase)

aroE (Shikimate dehydrogenase)

glp (Glycerol kinase)

gmk (Guanylate kinase)

pta (Phosphate acetyltransferase)

tpi (Triosephosphate isomerase)

yqi (Acetyle coenzyme A acetyltransferase)

Cada una de las variante en la secuencia de cada fragmento, es considerada un alelo distinto y a cada uno se le asigna un número. Los aislamientos son definidos por el conjunto de

alelos de los 7 genes que por convención es llamado perfil alélico o Tipo Secuencial, “*sequence type*” (ST), que queda determinado por el conjunto de 7 números. Aquellos aislamientos de *S. aureus* que presenten identidad en cinco o más de los siete genes son considerados de un mismo Complejo Clonal.

La principal ventaja de esta técnica es que utiliza secuencias y no da lugar a ambigüedades que se pueden presentar con PFGE, además, cuenta con un sitio web que contiene información de más de 1500 aislamientos provenientes de diferentes países, lo que permite comparar las secuencias con las reportadas en la base de datos.

Al comparar con otros clones pandémicos en el mundo, podemos establecer la relación genético evolutivo de utilidad epidemiología global o a largo plazo.

El protocolo empleado para esta técnica fue el siguiente:

-Extracción de ADN: se obtuvo, a partir de un lisado bacteriano, de la siguiente manera:

Se recolectaron 20 colonias bacterianas de un cultivo joven (18-24h) y fueron re-suspendidas en 100µl de una solución de lisis que conteniendo: 25U de Lisostafina/ml, 10 mM de EGTA (ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) y 10mM Tris (pH=8) en agua desionizada. La suspensión es, luego, incubada a 37°C por 30 min y posteriormente se calentó a 95°C por 10 min. Se deja enfriar a T° ambiente y luego se añaden 900µl de agua desionizada estéril. La suspensión es centrifugada por 3 min a 13000g y del sobrenadante se recuperan 2µ de ADN que serán utilizados en la amplificación, por PCR convencional, de los fragmentos internos de los 7 genes metabólicos anteriormente citados.

-PCR: la mezcla de reactivos de PCR, para cada muestra; se preparó con un volumen final de 50µl, la misma incluye: 200µM dNTP (deoxynucleósido trifofato, 10mM Tris; pH=8,3), 50mM KCl, 1,5 µM Mg₂Cl, 1pmol/µl de cada primer, 1U de Taq ADN polimerasa y agua miliQ estéril.

Las Secuencia de primers utilizados fueron:

arc up - 5' TTG ATT CAC CAG CGC GTA TTG TC -3'

arc dn - 5' AGG TAT CTG CTT CAA TCA GCG -3'

aro up - 5' ATC GGA AAT CCT ATT TCA CAT TC -3'

aro dn - 5' GGT GTT GTA TTA ATA ACG ATA TC -3'

glp up - 5' CTA GGA ACT GCA ATC TTA ATC C -3'

glp dn - 5' TGG TAA AAT CGC ATG TCC AAT TC -3'

gmk up - 5' ATC GTT TTA TCG GGA CCA TC -3'

gmk dn - 5' TCA TTA ACT ACA ACG TAA TCG TA -3'

pta up - 5' GTT AAA ATC GTA TTA CCT GAA GG -3'

pta dn - 5' GAC CCT TTT GTT GAA AAG CTT AA -3'

tpi up - 5' TCG TTC ATT CTG AAC GTC GTG AA -3'

tpi dn - 5' TTT GCA CCT TCT AAC AAT TGT AC -3'
 yqi up- 5' CAG CAT ACA GGA CAC CTA TTG GC -3'
 yqi dn- 5' CGT TGA GGA ATC GAT ACT GGA AC -3'

Condiciones de reacción de PCR

-Ciclo térmico: Desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min seguido de 30 ciclos de amplificación (Desnaturalización: a 95°C por 1min, *annealing*: 55°C 1min y extensión: 72°C 1min) y por último, extensión final a 72 °C por 5 min.

Los productos de reacción primeramente se visualizaron en gel de agarosa 1% con electroforesis convencional y luego se purificaron en columnas de afinidad (promega®) y se secuenciaron (ambas cadenas) a través del servicio internacional MACROGEN.

Las secuencias obtenidas para cada locus fueron comparadas por medio de la base de datos en www.mlst.net asignándoseles el número de alelo correspondiente para, posteriormente, poder determinar el ST.

Para la lectura y análisis de datos, las secuencias fueron comparadas utilizando el algoritmo eBURST. Éste asigna aislamientos a CC o linajes que contienen aislamientos genéticamente relacionados y anticipan el origen evolutivo de los aislamientos en cada conjunto a partir de un perfil alélico ancestral. Aquellos aislamientos que no corresponden a ningún complejo clonal se los identifica como singletones.

10.5.5 DETERMINACIÓN DEL TIPO DE SCCmec (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*)

En todos los aislamientos de MRSA se evaluaron los tipos SCCmec I-VI, incluyendo la nueva variante de SCCmec IV (IVNv) asociados a ST100 en Argentina. La metodología utilizada fue PCR múltiple y por PCR convencional a través de la identificación de los complejos de genes *mec*, *ccr*, y la región J1 como se describió previamente [44]. (Tablas 22 y 23)

La tipificación del SCCmec se llevó a cabo mediante PCR multiplex (MPCR) según describió *Oliveira y De Lancastre* [276], la cual se basa en las características estructurales y diferenciales de los distintos tipos de SCCmec, descritos hasta entonces: I (34 kb), II (52 kb), III (66 kb) y IV (20-24 kb). Dicha MPCR permite la identificación de los SCCmec tipo I, II, III, y IV, así como las variantes IA y IIIA, basándose en la amplificación de 8 locus (denominados A, B, C, D, E, F, G, y H).

El locus A se localiza corriente arriba del gen *pIs* y es específico del SCCmec tipo I.

el locus B se sitúa en el interior del operón *kdp*, el cual es específico del SCCmec tipo II.

el locus C se sitúa en el interior del gen *mecI* presente en los SCCmec tipo II y III.

el locus D se encuentra en el interior de la región *dcs*, presente en los SCCmec tipo I, II y IV. el locus E se localiza en la región entre el plásmido integrado pI258 y el transposón Tn554, específico para el SCCmec tipo III.

el locus F, que también es específico del SCCmec tipo III, se localiza en la región entre Tn554 y la unión cromosómica derecha (*orfX*).

Los loci G y H se incluyeron para distinguir las variantes estructurales IA y IIIA, respectivamente.

El locus G es la unión izquierda entre IS431 y pUB110, y

el locus H es la unión izquierda entre IS431 y pT181.

Los fragmentos van de 162 a 495pb, diferenciándose al menos en 40pb, lo que permite distinguir a cada uno de ellos. A continuación se indican los primers usados para cada locus:

Tabla 22 | Primer para tipificación de SCCmec

LOCUS	PRIMERS	SECUENCIA	TAMAÑO(amplicón)	TIPO DE SCCmec
A	CIF2 F2 CIF2 R2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG ATTTACCACAAGGACTACCAGC	495 pb	I
B	KDP F1 KDP R1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG	284 pb	II
C	<i>mecip2</i> <i>meci p3</i>	GCGGTTTCAATCACTTGTC GCGGTTTCAATCACTTGTC	209 pb	II, III
D	DCS F2 DCS R1	CATCCTATGATAGCTTGTC CTAAATCATAGCCATGACCG	342 pb	I,II,IV
E	RIF4 F3 RIF4 R9	GTGATTGTTTCGAGATATGTGG CGCTTATCTGTATCTATCGC	243 pb	III
F	RIF5 F10 RIF5 F13	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG GTCACAGTAATCCATCAATGC	414 pb	III
G	IS431P4 pUB110R1	CAGGTCTCTTCAGATCTACG GAGCCATAAACCAATAGCC	381 pb	
H	IS431 P4 pT181 R1	CAGGTCTCTTCAGATCTACG GAAGAATGGGAAAGCTTAC	303 pb	
<i>mecA</i>	<i>mecA P4</i> <i>mecA P7</i>	TCCAGATTACAATCCACCAGG CCTTTCATATCTTGTAAACG	162 pb	Control interno

Etapas de PCR multiplex para tipado de SCCmec

Extracción de ADN: Se recolectaron al menos 10 colonias bacterianas de un cultivo joven (18-24h) y fueron resuspendidas en 100µl de una solución de lisis que conteniendo: 25U de Lisostafina/ml, 10 mM de EGTA (ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) y 10mM Tris (pH=8) en agua desionizada La suspensión es, luego, incubada a 37°C por 30 min y posteriormente se calentó a 95°C por 10 min. Se deja enfriar a T° ambiente y luego se

añaden 900µ de agua desionizada estéril. La suspensión es centrifugada por 3 min a 13000g y del sobrenadante se recuperan 2µl de ADN.

PCR: la mezcla de reactivos de PCR, para cada muestra; se preparó con un volumen final de 50µ, la misma incluye: 200µM dNTP (deoxynucleósido trifofato, 10mM Tris; pH=8,3), 50mM KCl, 1,5 µM Mg₂Cl, 1pmol/µl de cada primer, 1, 25 U de *Taq* ADN polimerasa y agua miliQ estéril y 2µl ADN (obtenido tal como se indicó en el párrafo anterior). Se utilizaron los primers descritos en la tabla 12 en las siguientes concentraciones:

800nM (DCS F2, DCS R1; *mecA* P4, *mecA* P7 e IS431 P4)

400nM (CIF2 F2, CIF2 R2; *mecI* P2, *mecI* P3; RIF5 F10, RIF5 R13; pUB110 R1 y pT181 R1)

200nM (KDP F1, KDP R1; RIF4 F3, RIF4 R9)

Condiciones de reacción de PCR

Ciclo térmico: Desnaturalización inicial a 94°C durante 4 min seguido de 30 ciclos de amplificación (Desnaturalización: a 94°C por 30 seg, annealing: 50°C durante 60 seg y extensión: 72°C 120 seg) y por último extensión final a 72 °C por 4 min.

Los productos de reacción primeramente se visualizaron en gel de agarosa 1% con *sybr safe* en electroforesis convencional.

10.5.6 SUBTIPADO DEL *Staphylococcal Cassette Chromosome mec IV*

La PCR múltiplex descrita anteriormente, permite la detección *SCCmec* del tipo IV, pero no detecta sus diferentes subtipos (IVa, IVb, IVc, IVd, IVg y IVh).

La discriminación es importante para estudiar la epidemiología del CA-MRSA.

Para el subtipado del *SCCmec* IV se procedió a realizar PCR multiplex siguiendo el protocolo de Milheirico y cols [276], que detecta los subtipos IVa, IVb, IVc, IVd, IVg, IVh (por amplificación de diferentes fragmentos en las regiones J) y el tipo V caracterizado por presentar genes de recombinasas del tipo C (*ccrC*).

También se estudió la presencia, entre los aislamientos, del elemento genético móvil Tn4001 de utilidad en la tipificación del *SCCmec* IV de la variante Argentina del clon pediátrico ST100-IVnV [149], que se lo caracteriza según los datos de la tabla 24.

Las secuencias de los primers utilizados son las siguientes:

i) Tn4001-1-F (Amplificando la región IS1256L-*aac-aph* dentro del Tn4001.

ii) Tn4001-2-F y Tn4001-2-R (amplificando la región entre el IS256R (Tn4001) y el IS1272 del complejo *mecB*)

iii) Tn4001-3-F, y Tn4001-3-R (Amplificando la región entre el locus *mecA* e IS256L (Tn4001)).

Tabla 23 | Resumen de primers para la caracterización de los diferentes SCCmec

Conjunto de Primers usados para la identificación del SCCmec				Tipos de SCCmec				
región Amplificada	nombre del primer	Secuencia del Primer (5' → 3')	Amplicon tamaño, bp	IV(2B)/ ^b CA05	IV(2B&5)/ ^b ZH47 ST100 Zurich	V(5C2)/ ^b WIS	VI(4B)/ ^b HDE288	IVNv/ ^c PFGE type C ST100 Argentina
<i>ccr</i> complex								
<i>ccrA2</i>	β2	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	1000	+	+	-	-	+
	α2	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT						
<i>ccrB2</i>	<i>ccrB2F2 F2</i>	AGTTTCTCAGAATTCGAACG	311	+	+	-	-	+
	<i>ccrB2F2 R2</i>	CCGATATAGAAWGGGTTAGC						
<i>ccrAB4</i>	<i>ccrAB4 F1</i>	TCA TCA ATA AGT ATG GAA CG	1549	-	-	-	+	-
	<i>ccrAB4 R1</i>	TTT CTT GCG ACT CTC TTG G						
<i>ccrC</i>	<i>ccrC F2</i>	GTA CTGTTACAATGTTTGG	449	-	+	+	-	-
	<i>ccrC R2</i>	ATAATGGCTTCATGCTTACC						
Class B <i>mec</i> complex				+	-	-	+	-
IS1272	IS5	AACGCCACTCATAACATATGGAA	2000	+	-	-	+	-
	mA6	TATACCAAACCCGACAAC						
ψIS1272 and <i>mecR1</i>	ISF1	AATTGAAGCAAATGCCAATCG	1903	+	-	-	+	-
	MRP1	CAACTGTCGTAGTCGAAACC						
Class B2 <i>mec</i> complex ^d				-	+	-	-	+
Tn4001-1 [IS1256L-aac(2')-aph(6'')]	Tn4001-1-F	GCCAATCGCTTAATTGGAGCCG	^d 709	-	+	-	-	+
	Tn4001-1-R	ACTTCATCTTCCCAAGGCTCTGT						
Tn4001-2 (IS256R-IS1272)	Tn4001-2-F	TGGCCATCACGTGTTCTGGG	^d 968	-	+	-	-	+
	Tn4001-2-R	TCGGATGTCTGTCCGAGGACT						
Tn4001-3 (<i>mecA</i> -IS256L)	Tn4001-3-F	ACCAAACCCGACA ACTACA ACTAT	^d 1298	-	+	-	-	+
	Tn4001-3-R	GTGTCGTAAAGCTGCGCTCA						
J3 region								
<i>dcs</i>	<i>dcs-F2</i>	CATCCTATGATAGCTTGGTC	342	+	-	-	+	+
	<i>dcs-R1</i>	CTAAATCATAGCCATGACCG						
J1 region								
SCCmec V	SCCmecV-J1-F	TTCTCCATTCTGTTCATCC	377	-	-	+	-	-
	SCCmecV-J1-R	AGAGACTACTGACTTAAGTGG						
SCCmec IV ^e								
IVa	<i>JIVa F</i>	ATAAGAGATCGAACAGAAGC	278	+	-	-	-	-
	<i>JIVa R</i>	TGAAGAAATCATGCCTATCG						
IVc	<i>JIVc F</i>	CCATTGCAAATTTCTCTCC	483	-	+	-	-	+
	<i>JIVc R</i>	ATAGATTCTACTGCAAGTCC						

^a SCCmec: Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*; PFGE: Pulsed field gel electrophoresis;

^b tipo de SCCmec / nombre cepa control: Tipo de SCCmec asociado a la cepa control.

^c *SCCmec* IVNv: Nueva variante de *SCCmec* tipo IV asociado a la variante argentina del Clon Pediátrico (pulsotipo C-ST100).

^d Primers diseñados según la secuencia determinada previamente de la cepa ZH47 *accession number* AM292304

^e Los subtipos de *SCCmec* IV IVb, IVd, IVg, IVh que fueron analizados por PCR y se muestran sólo los que dan positivo.

Tabla 24 | Primers utilizados para la detección del Tn4001

Región amplificada	Nombre del primer	Secuencia nucleotídica	tamaño
Tn4001-1 [IS1256Laac(2')-aph(6'')]	Tn4001-1-F	GCCAATCGCTTAATTGGAGCCG	709 pb
	Tn4001-1-R	ACTTCATCTTCCCAAGGCTCTGT	
Tn4001-2 (IS256R-IS1272)	Tn4001-2-F	TCGGATGTCTGTCCGAGGACT	968 pb
	Tn4001-2-R	ACCAAACCCGACAACTACAACAT	
Tn4001-3 (<i>mecA</i> -IS256L)	Tn4001-3-F	ACCAAACCCGACAACTACAACAT	1298pb
	Tn4001-3-R	GTGTCGTAAGCTGCGCTCA	

Tabla 24. Caracterización molecular del *SCCmec* asociado al pulsotipo C y ST100: Variante Argentina del clon pediátrico

(Sola 2012), en relación a cepas controles.

10.5.7 DETECCIÓN POR PCR DE LA PRESENCIA DE GENES DE VIRULENCIA

En todos los aislamientos de MRSA se analizaron por PCR el tipo de gen regulador accesorio (*agr*) y **23 genes** de virulencia específicos de *Staphylococcus* detallados a continuación: enterotoxinas: *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sen*, *seo*, *sem*, *seq* y *sek*; la toxina del síndrome de shock tóxico 1 (TSST-1): *tst*; toxinas exfoliativa: *eta* y *etb*; leucocidinas: *lukE-lukD* y la leucocidina de clase F: *lukM*; bacteriocina (*bsa*), adhesinas: para el colágeno (*cna*) y la proteína de unión ósea sialoproteína- (*bbp*), proteína de superficie *sasX* (*sasX*) y el gen *arcA* (indicador del elemento móvil catabólico de Arginina, ACME), incluidos los genes Pantón-Valentine leucocidina (*Luks-PV-LukF-PV*), el gen *arcA* (indicador del elemento móvil catabólico arginina, ACME) y el gen *sasX*, de acuerdo a lo descripto [150].

Con las metodologías anteriormente descritas, un clon queda definido por: el pulsotipo (letra mayúscula), seguido del tipo secuencial (ST), el el *SCCmec* (en número romano) y el *spa* t. También puede asociarse a la descripción un marcador molecular característico de ese clon como por ejemplo PVL, ACME.

10.5.8 SECUENCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO (*Whole-genome sequencing, WGS*)

Esta metodología se utilizó para cumplimentar el Objetivo Específico *IIIa* de la etapa III, por lo tanto el procesamiento y análisis bioinformático de los resultados necesarios para cumplimentar dichos objetivos se describieron en la sección de Materiales y Métodos correspondiente al objetivo *IIIa* (Página 163).

En esta sección se describe el análisis realizado para cumplimentar la etapa II. Se analizaron a través del WGS, cuatro aislamientos pertenecientes al clon I1-ST5-IVA-t311 con el fin de investigar su filogenia, de los cuales, tres pertenecían al mismo paciente, dos de colonización nasal (al ingreso, ADM-C y al alta, DIS-C) y uno de infección activa de piel y partes blandas (IPPB) de inicio en la comunidad (W-INF) y un aislado no relacionado epidemiológicamente con estos tres últimos definido como NE/1300. El objetivo fue determinar si las cepas de MRSA aisladas de la herida en el momento del ingreso y las recuperadas del sitio nasal también al ingreso y al alta después de 8 días de hospitalización pertenecían al mismo subtipo. El aislamiento no relacionado epidemiológicamente (NE1300), presentaba el mismo tipo *spa*, tipo MLST y *SCCmec*. Con el fin de proporcionar una comparación más amplia, se incluyeron aislamientos del CC5 secuenciados previamente [184] con el mismo tipo *spa*, tipo MLST y *SCCmec* que los tres aislamientos en cuestión.

10.5.8.1 Procedimiento de secuenciación y alineamiento utilizando Illumina HiSeq

La secuenciación se realizó utilizando la plataforma Illumina HiSeq. El ADN genómico se aisló con los kits **Qiagen DNeasy Blood and Tissue**. Las bibliotecas de secuenciación se prepararon con los kits de preparación de muestras de ADN Illumina Nextera XT (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos) y se secuenciaron (100 lecturas de nucleótidos) con instrumentos HiSeq 2000 en el Laboratorio de Genómica y Bioinformática de INDEAR, Rosario, Argentina.

Se realizó el ensamblado de las lecturas cortas (*Short reads*) frente a la cepa de referencia del CC5 N315 (número de acceso de GenBank NC_002745.2) con el programa BWA (*Burrows-Wheeler Aligner*) [277], y procesado con Samtools [278]. El llamado de variantes (*variant calling*) fue realizado utilizando GATK (*Genome Analysis Toolkit*) [279], y anotado usando SnpEff [269]. Se requirió un consenso del 75% y 30 lecturas para respaldar un SNP, y las llamadas se realizaron bajo un modelo haploide.

Las secuencias de otras cuatro muestras del CC5 de Argentina: DAR3144, DAR3162, DAR3156 y DAR3170 [184], fueron obtenidas de la base de datos pública NCBI y fueron analizados utilizando el mismo flujo de trabajo o *pipeline*. Se definió que los aislamientos eran

del mismo subtipo si diferían en no más de 40 polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP), lo que equivale a aproximadamente 5 años de evolución.

10.5.8.2 Construcción del árbol filogenético

Los árboles de máxima verosimilitud (*Maximum likelihood*) de ADM-C, W-INF, DIS-C, NE1300, DAR3144, DAR3162, DAR3156 y DAR3170, se estimaron a partir de la alineación de los genomas completos asignados utilizando RAxML [280].

10.5.9 DETECCIÓN POR PCR DEL GEN *Sspa*

Para amplificar gen *Sspa* codificante para la serin proteasa *Sspa* se realizó el siguiente procedimiento:

Extracción de ADN: se obtuvo, a partir de un lisado bacteriano, de la siguiente manera: se recolectaron no menos de 10 colonias bacterianas de un cultivo joven (18-24h) y fueron resuspendidas en 100µl de una solución de lisis que contenía: 25U de Lisostafina/ml, 10 mM de EGTA (ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) y 10mM Tris (pH=8) en agua desionizada. Luego, la suspensión es incubada a 37°C por 30 min y posteriormente a 95°C por 10 min. Se deja enfriar a T° ambiente y luego se añaden 900µl de agua desionizada estéril. La suspensión es centrifugada por 3 min a 13000g y del sobrenadante se utilizan 2µl como templado de ADN para la siguiente PCR:

PCR: El volumen final de la mezcla de reactivos de PCR para cada muestra fue de 50µl, la misma incluye: 200µM dNTP (deoxynucleósido trifofato, 10mM Tris; pH=8,3), 50mM KCl, 1,5 µM Mg2Cl, 1pmol/µl de cada primer, 1U de Taq ADN polimerasa y agua miliQ estéril. Se utilizaron los siguientes pares de Primers:

Sspa-rep-F 5'-TTTATGCAGCGTCAGGGTTG- 3'

Sspa-rep-R 5'-ATTAGGTTGGTCATCGTTGG- 3'

Sspa-TOTAL-F 5'-TGCTTATAATATTGAATACTCTAG- 3'

Sspa-TOTAL-R 5'-AATGTTTTTGTAAGCTAATCT- 3'

Condiciones de reacción: el ciclado térmico consistió en: desnaturalización inicial a 94°C durante 4 min seguido de 30 ciclos de amplificación (desnaturalización: a 94°C por 45 seg, *annealing*: 50°C 45 seg y extensión: 72°C 60 seg) y por último, extensión final a 72 °C por 2 min.

10.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

A continuación se describe el análisis estadístico de los datos utilizado en cada etapa.

10.6.1 Etapa I

Los datos bacteriológicos y de pacientes se compilaron en una base de datos electrónica utilizando Access (Microsoft). Se determinó la prevalencia de colonización al ingreso y la incidencia de adquisición de MRSA. Se utilizaron análisis de regresión logística univariable (Tabla

2, página 57) y múltiple (Tabla 4, página 59) para investigar los factores de riesgo para la portación de MRSA; tanto en una sola medida de riesgo como en toda la medida de riesgo entre los pacientes ingresados en los ocho hospitales de Córdoba, Argentina. Además, también se realizaron análisis de regresión logística univariable y múltiple para investigar los factores de riesgo para CA-MRSA_G o HA-MRSA_G. Las variables continuas se compararon mediante la prueba *t* de Student o el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba U de Mann-Whitney o la prueba de Kruskal Wallis para datos no paramétricos, según correspondiera. Las variables dicotómicas o categóricas se compararon mediante análisis de χ^2 o la prueba exacta de Fisher, según correspondiera. Un $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Las variables categóricas que fueron significativas en cada análisis univariado ($p < 0,05$) realizadas entre grupos pareados de cepas, se incluyeron en el análisis de regresión logística múltiple para cada situación comparada. En todas las comparaciones, la información sobre las variables consideradas estuvo disponible para más del 80% de los casos. Una prueba de *Goodness* de ajuste de Hosmer y Lemeshow indicó un ajuste aceptable a los datos. Los datos se analizaron utilizando SPSS (versión 15,0) e InfoStat (www.infostat.com.ar).

10.6.2 Etapa II

Los datos bacteriológicos y de los pacientes fueron compilados en una base de datos mediante ACCES (Microsoft). Se realizaron comparaciones entre grupos de cepas definidas genotípicamente como CA-MRSA_G y HA-MRSA_G, en todas las infecciones de MRSA.

Entre las infecciones causadas por los genotipos CA-MRSA_G, también se comparó aquellas de inicio en el hospital vs las de inicio en la comunidad entre los pacientes que se hospitalizaron, para determinar las características asociadas de forma independiente con infecciones CA-MRSA_G de inicio en el hospital.

Las variables continuas se compararon mediante la prueba *t* de Student o el análisis de la varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de Mann-Whitney o la prueba de Kruskal Wallis para datos no paramétricos, según correspondiera. Las variables dicotómicas o categóricas se compararon mediante la prueba del χ^2 o la prueba exacta de Fisher, según correspondiera. $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Los datos fueron analizados con el programa SPSS (versión 15,0) y InfoStat (www.infostat.com.ar).

10.6.3 Etapa III

Las curvas de supervivencia se construyeron según el método de Kaplan-Meier, usando el test LogRank y la prueba de Holm-Sidak para comparaciones múltiples [281], utilizando un $p < 0,05$ considerado estadísticamente significativo.

11 BIBLIOGRAFÍA

1. Ogston, A., *Report upon Micro-Organisms in Surgical Diseases*. British medical journal, 1881. **1**(1054): p. 369.b2-369.b375.
2. Lakhundi, S. and K. Zhang, *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology*. Clin Microbiol Rev, 2018. **31**(4).
3. Kent B Crossley, K.K.J., Gordon L. Archer, Vance G. Fowler, *Staphylococci in Human Disease*. 2nd ed. 2009: John Wiley and Sons.
4. D. Jones, N.R.K., W. Ludwig, F. A. Rainey, K. H. Schleifer, and W. B. Whitman (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 3. The Firmicutes. Class I. Bacilli class nov., p. 19-20. In P. De Vos, G. M. Garrity. Springer, New York, NY. . 2009.*
5. James Versalovic, K.C.C., Guido Funke, James H. Jorgensen, Marie Louise Landry, David W. Warnock, *Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition*. 2015. p. 308-330.
6. Graham, J.E. and B.J. Wilkinson, *Staphylococcus aureus osmoregulation: roles for choline, glycine betaine, proline, and taurine*. Journal of bacteriology, 1992. **174**(8): p. 2711-2716.
7. Asadollahi, P., et al., *Distribution of the Most Prevalent Spa Types among Clinical Isolates of Methicillin-Resistant and -Susceptible Staphylococcus aureus around the World: A Review*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 163.
8. Dolin, G.M.J.B.R., *Principles and Practice of Infectious Diseases 8th edition*, ed. Elsevier. 2015.
9. Fitzgerald, J.R. and M.T. Holden, *Genomics of Natural Populations of Staphylococcus aureus*. Annu Rev Microbiol, 2016. **70**: p. 459-78.
10. Hiramatsu, K., et al., *Genomic Basis for Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus*. Infection & chemotherapy, 2013. **45**(2): p. 117-136.
11. Stefani, S., et al., *Meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods*. Int J Antimicrob Agents, 2012. **39**(4): p. 273-82.
12. Manara, S., et al., *Whole-genome epidemiology, characterisation, and phylogenetic reconstruction of Staphylococcus aureus strains in a paediatric hospital*. Genome Med, 2018. **10**(1): p. 82.
13. Lindsay, J.A., *Genomic variation and evolution of Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol, 2010. **300**(2-3): p. 98-103.
14. Grumann, D., U. Nubel, and B.M. Broker, *Staphylococcus aureus toxins--their functions and genetics*. Infect Genet Evol, 2014. **21**: p. 583-92.
15. Bagnoli, F., R. Rappuoli, and G. Grandi, *Staphylococcus aureus: Microbiology, Pathology, Immunology, Therapy and Prophylaxis*. Vol. 409. 2018: Springer.
16. Moon, B.Y., et al., *Mobilization of Genomic Islands of Staphylococcus aureus by Temperate Bacteriophage*. PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0151409.
17. Jarraud, S., et al., *egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in Staphylococcus aureus*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 669-77.
18. Wu, X., et al., *Expression and regulation of phenol-soluble modulins and enterotoxins in foodborne Staphylococcus aureus*. AMB Express, 2018. **8**(1): p. 187.
19. Arciola, C.R., D. Campoccia, and L. Montanaro, *Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion*. Nat Rev Microbiol, 2018. **16**(7): p. 397-409.
20. Sansevere, E.A. and D.A. Robinson, *Staphylococci on ICE: Overlooked agents of horizontal gene transfer*. Mob Genet Elements, 2017. **7**(4): p. 1-10.
21. McCarthy, A.J. and J.A. Lindsay, *Staphylococcus aureus innate immune evasion is lineage-specific: a bioinformatics study*. Infect Genet Evol, 2013. **19**: p. 7-14.
22. Bagnoli, F., R. Rappuoli, and G. Grandi, *Staphylococcus aureus: Microbiology, Pathology, Immunology, Therapy and Prophylaxis*. 2018: Springer. pag 468.

23. Novick, R.P. and A. Subedi, *The SaPIs: mobile pathogenicity islands of Staphylococcus*. Chem Immunol Allergy, 2007. **93**: p. 42-57.
24. Fitzgerald, J.R., et al., *Characterization of a putative pathogenicity island from bovine Staphylococcus aureus encoding multiple superantigens*. J Bacteriol, 2001. **183**(1): p. 63-70.
25. Guinane, C.M., et al., *Evolutionary genomics of Staphylococcus aureus reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation*. Genome Biol Evol, 2010. **2**: p. 454-66.
26. Viana, D., et al., *Adaptation of Staphylococcus aureus to ruminant and equine hosts involves SaPI-carried variants of von Willebrand factor-binding protein*. Mol Microbiol, 2010. **77**(6): p. 1583-94.
27. Fitzgerald, J.R., et al., *Genome diversification in Staphylococcus aureus: Molecular evolution of a highly variable chromosomal region encoding the Staphylococcal exotoxin-like family of proteins*. Infect Immun, 2003. **71**(5): p. 2827-38.
28. Kuroda, M., et al., *Whole genome sequencing of meticillin-resistant Staphylococcus aureus*. Lancet, 2001. **357**(9264): p. 1225-40.
29. Lindsay, J.A., *Staphylococcus aureus genomics and the impact of horizontal gene transfer*. Int J Med Microbiol, 2014. **304**(2): p. 103-9.
30. Chlebowicz, M.A., et al., *The Staphylococcal Cassette Chromosome mec type V from Staphylococcus aureus ST398 is packaged into bacteriophage capsids*. Int J Med Microbiol, 2014. **304**(5-6): p. 764-74.
31. Christie, G.E., et al., *The complete genomes of Staphylococcus aureus bacteriophages 80 and 80alpha--implications for the specificity of SaPI mobilization*. Virology, 2010. **407**(2): p. 381-90.
32. Cervera-Alamar, M., et al., *Mobilisation Mechanism of Pathogenicity Islands by Endogenous Phages in Staphylococcus aureus clinical strains*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 16742.
33. Xia, G. and C. Wolz, *Phages of Staphylococcus aureus and their impact on host evolution*. Infect Genet Evol, 2014. **21**: p. 593-601.
34. McCarthy, A.J., et al., *Staphylococcus aureus CC398 clade associated with human-to-human transmission*. Applied and environmental microbiology, 2012. **78**(24): p. 8845-8848.
35. van Wamel, W.J., et al., *The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages*. J Bacteriol, 2006. **188**(4): p. 1310-5.
36. Verkaik, N.J., et al., *Immune evasion cluster-positive bacteriophages are highly prevalent among human Staphylococcus aureus strains, but they are not essential in the first stages of nasal colonization*. Clin Microbiol Infect, 2011. **17**(3): p. 343-8.
37. Firth, N., et al., *Staphylococcal Plasmids, Transposable and Integrative Elements*. Microbiol Spectr, 2018. **6**(6).
38. Lozano, C., et al., *Expansion of a plasmid classification system for Gram-positive bacteria and determination of the diversity of plasmids in Staphylococcus aureus strains of human, animal, and food origins*. Appl Environ Microbiol, 2012. **78**(16): p. 5948-55.
39. Partridge, S.R., et al., *Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance*. Clin Microbiol Rev, 2018. **31**(4).
40. Rammelkamp, C.H. and T. Maxon, *Resistance of Staphylococcus aureus to the Action of Penicillin*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1942. **51**(3): p. 386-389.
41. Chambers, H.F. and F.R. Deleo, *Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era*. Nature reviews. Microbiology, 2009. **7**(9): p. 629-641.

42. (IWG-SCC), I.W.G.o.t.C.o.S.C.C.E., *Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009. **53**(12): p. 4961.
43. Wu, Z., et al., *Novel Type XII Staphylococcal Cassette Chromosome mec Harboring a New Cassette Chromosome Recombinase, CcrC2*. Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(12): p. 7597-601.
44. Kondo, Y., et al., *Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(1): p. 264-74.
45. Kong, C., H.M. Neoh, and S. Nathan, *Targeting Staphylococcus aureus Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy*. Toxins (Basel), 2016. **8**(3).
46. Laabei, M., et al., *Evolutionary Trade-Offs Underlie the Multi-faceted Virulence of Staphylococcus aureus*. PLoS Biol, 2015. **13**(9): p. e1002229.
47. Pérez-Montarelo, D., et al., *Pathogenic Characteristics of Staphylococcus aureus endovascular infection isolates from different clonal complexes*. Frontiers in Microbiology, 2017. **8**(917).
48. Horn, J., et al., *Inside job: Staphylococcus aureus host-pathogen interactions*. Int J Med Microbiol, 2018. **308**(6): p. 607-624.
49. Foster, T.J., et al., *Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus*. Nat Rev Microbiol, 2014. **12**(1): p. 49-62.
50. Speziale, P., et al., *Protein-based biofilm matrices in Staphylococci*. Front Cell Infect Microbiol, 2014. **4**: p. 171.
51. Kang, M., et al., *Collagen-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule (MSCRAMM) of Gram-positive bacteria inhibit complement activation via the classical pathway*. J Biol Chem, 2013. **288**(28): p. 20520-31.
52. Foster, T.J., *The remarkably multifunctional fibronectin binding proteins of Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016. **35**(12): p. 1923-1931.
53. Herman-Bausier, P., et al., *Staphylococcus aureus clumping factor A is a force-sensitive molecular switch that activates bacterial adhesion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(21): p. 5564-5569.
54. Xiang, H., et al., *Crystal structures reveal the multi-ligand binding mechanism of Staphylococcus aureus ClfB*. PLoS Pathog, 2012. **8**(6): p. e1002751.
55. Cassat, J.E. and E.P. Skaar, *Metal ion acquisition in Staphylococcus aureus: overcoming nutritional immunity*. Semin Immunopathol, 2012. **34**(2): p. 215-35.
56. Otto, M., *Staphylococcus aureus toxins*. Curr Opin Microbiol, 2014. **17**: p. 32-7.
57. Jusko, M., et al., *Staphylococcal proteases aid in evasion of the human complement system*. J Innate Immun, 2014. **6**(1): p. 31-46.
58. Brinkmann, V. and A. Zychlinsky, *Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin?* J Cell Biol, 2012. **198**(5): p. 773-83.
59. Alonzo, F., 3rd and V.J. Torres, *The bicomponent pore-forming leucocidins of Staphylococcus aureus*. Microbiol Mol Biol Rev, 2014. **78**(2): p. 199-230.
60. DuMont, A.L. and V.J. Torres, *Cell targeting by the Staphylococcus aureus pore-forming toxins: it's not just about lipids*. Trends Microbiol, 2014. **22**(1): p. 21-7.
61. Nygaard, T.K., et al., *Alpha-toxin induces programmed cell death of human T cells, B cells, and monocytes during USA300 infection*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e36532.
62. Oliveira, D., A. Borges, and M. Simoes, *Staphylococcus aureus Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases*. Toxins (Basel), 2018. **10**(6).
63. Moyano, A.J., et al., *c-Jun Proto-Oncoprotein Plays a Protective Role in Lung Epithelial Cells Exposed to Staphylococcal alpha-Toxin*. Front Cell Infect Microbiol, 2018. **8**: p. 170.
64. Le, K.Y. and M. Otto, *Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview*. Front Microbiol, 2015. **6**: p. 1174.

65. Hodille, E., et al., *Delta Hemolysin and Phenol-Soluble Modulins, but Not Alpha Hemolysin or Panton-Valentine Leukocidin, Induce Mast Cell Activation*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2016. **6**: p. 180.
66. Otto, M., *Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol*, 2010. **64**: p. 143-62.
67. Voyich, J.M., et al., *Is Panton-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus disease?* *J Infect Dis*, 2006. **194**(12): p. 1761-70.
68. Labandeira-Rey, M., et al., *Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia*. *Science*, 2007. **315**(5815): p. 1130-3.
69. Gabrilovich, M.I., et al., *Severe Necrotizing Tracheobronchitis From Panton-Valentine Leukocidin-positive MRSA Pneumonia Complicating Influenza A-H1N1-09*. *J Bronchology Interv Pulmonol*, 2017. **24**(1): p. 63-66.
70. Watkins, R.R., M.Z. David, and R.A. Salata, *Current concepts on the virulence mechanisms of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*, 2012. **61**(Pt 9): p. 1179-93.
71. Dumont, A.L., et al., *Characterization of a new cytotoxin that contributes to Staphylococcus aureus pathogenesis*. *Mol Microbiol*, 2011. **79**(3): p. 814-25.
72. Ventura, C.L., et al., *Identification of a novel Staphylococcus aureus two-component leukotoxin using cell surface proteomics*. *PLoS One*, 2010. **5**(7): p. e11634.
73. Mehlin, C., C.M. Headley, and S.J. Klebanoff, *An inflammatory polypeptide complex from Staphylococcus epidermidis: isolation and characterization*. *J Exp Med*, 1999. **189**(6): p. 907-18.
74. Wang, R., et al., *Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA*. *Nat Med*, 2007. **13**(12): p. 1510-4.
75. Spaulding, A.R., et al., *Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins*. *Clin Microbiol Rev*, 2013. **26**(3): p. 422-47.
76. Elahi, S., et al., *Characteristics of Staphylococcal Enterotoxin A Production and Growth of Staphylococcus aureus in Shaking and Stationary Cultures*. *Biocontrol Sci*, 2018. **23**(4): p. 207-214.
77. Diep, B.A., et al., *Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 2006. **367**(9512): p. 731-9.
78. Shore, A.C., et al., *Characterization of a novel arginine catabolic mobile element (ACME) and staphylococcal chromosomal cassette mec composite island with significant homology to Staphylococcus epidermidis ACME type II in methicillin-resistant Staphylococcus aureus genotype ST22-MRSA-IV*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011. **55**(5): p. 1896-905.
79. Thurlow, L.R., et al., *Functional modularity of the arginine catabolic mobile element contributes to the success of USA300 methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe*, 2013. **13**(1): p. 100-7.
80. Arias, C.A., et al., *MRSA USA300 clone and VREF--a U.S.-Colombian connection?* *N Engl J Med*, 2008. **359**(20): p. 2177-9.
81. Reyes, J., et al., *Dissemination of methicillin-resistant Staphylococcus aureus USA300 sequence type 8 lineage in Latin America*. *Clin Infect Dis*, 2009. **49**(12): p. 1861-7.
82. Planet, P.J., et al., *Parallel Epidemics of Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus USA300 Infection in North and South America*. *J Infect Dis*, 2015. **212**(12): p. 1874-82.
83. Sabat, A.J., et al., *Genome-wide analysis reveals two novel mosaic regions containing an ACME with an identical DNA sequence in the MRSA ST398-t011 and MSSA ST8-t008 isolates*. *J Antimicrob Chemother*, 2015. **70**(5): p. 1298-302.

84. Novick, R.P. and E. Geisinger, *Quorum sensing in staphylococci*. Annu Rev Genet, 2008. **42**: p. 541-64.
85. Casino, P., V. Rubio, and A. Marina, *The mechanism of signal transduction by two-component systems*. Curr Opin Struct Biol, 2010. **20**(6): p. 763-71.
86. Robinson, D.A., et al., *Evolutionary genetics of the accessory gene regulator (agr) locus in Staphylococcus aureus*. Journal of bacteriology, 2005. **187**(24): p. 8312-8321.
87. Geisinger, E., J. Chen, and R.P. Novick, *Allele-dependent differences in quorum-sensing dynamics result in variant expression of virulence genes in Staphylococcus aureus*. Journal of bacteriology, 2012. **194**(11): p. 2854-2864.
88. Reizner, W., et al., *A systematic review of animal models for Staphylococcus aureus osteomyelitis*. Eur Cell Mater, 2014. **27**: p. 196-212.
89. Parker, D., *Humanized Mouse Models of Staphylococcus aureus Infection*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 512.
90. Jander, G., L.G. Rahme, and F.M. Ausubel, *Positive correlation between virulence of Pseudomonas aeruginosa mutants in mice and insects*. J Bacteriol, 2000. **182**(13): p. 3843-5.
91. Mowlds, P., A. Barron, and K. Kavanagh, *Physical stress primes the immune response of Galleria mellonella larvae to infection by Candida albicans*. Microbes Infect, 2008. **10**(6): p. 628-34.
92. Olsen, R.J., et al., *Virulence of serotype M3 Group A Streptococcus strains in wax worms (Galleria mellonella larvae)*. Virulence, 2011. **2**(2): p. 111-9.
93. Harding, C.R., et al., *Use of Galleria mellonella as a model organism to study Legionella pneumophila infection*. J Vis Exp, 2013(81): p. e50964.
94. Mulcahy, M.E. and R.M. McLoughlin, *Host-Bacterial Crosstalk Determines Staphylococcus aureus Nasal Colonization*. Trends Microbiol, 2016. **24**(11): p. 872-886.
95. Wertheim, H.F., et al., *The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections*. Lancet Infect Dis, 2005. **5**(12): p. 751-62.
96. Hamdan-Partida, A., T. Sainz-Espunes, and J. Bustos-Martinez, *Characterization and persistence of Staphylococcus aureus strains isolated from the anterior nares and throats of healthy carriers in a Mexican community*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(5): p. 1701-5.
97. Lebon, A., et al., *Dynamics and determinants of Staphylococcus aureus carriage in infancy: the Generation R Study*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(10): p. 3517-21.
98. Brown, A.F., et al., *Staphylococcus aureus Colonization: Modulation of Host Immune Response and Impact on Human Vaccine Design*. Frontiers in immunology, 2014. **4**: p. 507-507.
99. Horowitz, I.N., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization in a pediatric intensive care unit: risk factors*. Am J Infect Control, 2012. **40**(2): p. 118-22.
100. Miller, R.R., et al., *Dynamics of acquisition and loss of carriage of Staphylococcus aureus strains in the community: the effect of clonal complex*. J Infect, 2014. **68**(5): p. 426-39.
101. Tong, S.Y., L.F. Chen, and V.G. Fowler, Jr., *Colonization, pathogenicity, host susceptibility, and therapeutics for Staphylococcus aureus: what is the clinical relevance?* Semin Immunopathol, 2012. **34**(2): p. 185-200.
102. Safdar, N. and E.A. Bradley, *The risk of infection after nasal colonization with Staphylococcus aureus*. Am J Med, 2008. **121**(4): p. 310-5.
103. Honda, H., et al., *Staphylococcus aureus nasal colonization and subsequent infection in intensive care unit patients: does methicillin resistance matter?* Infect Control Hosp Epidemiol, 2010. **31**(6): p. 584-91.
104. Merrer, J., et al., *"Colonization pressure" and risk of acquisition of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a medical intensive care unit*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2000. **21**(11): p. 718-23.

105. Ajao, A.O., et al., *Systematic review of measurement and adjustment for colonization pressure in studies of methicillin-resistant Staphylococcus aureus, vancomycin-resistant enterococci, and clostridium difficile acquisition*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2011. **32**(5): p. 481-9.
106. Stenehjem, E. and D. Rimland, *MRSA nasal colonization burden and risk of MRSA infection*. Am J Infect Control, 2013. **41**(5): p. 405-10.
107. Sakr, A., et al., *Staphylococcus aureus Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections*. Frontiers in microbiology, 2018. **9**: p. 2419-2419.
108. Chang, C.-H., et al., *Nasal colonization and bacterial contamination of mobile phones carried by medical staff in the operating room*. PloS one, 2017. **12**(5): p. e0175811-e0175811.
109. Lamanna, O., et al., *Rapid containment of nosocomial transmission of a rare community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus (CA-MRSA) clone, responsible for the Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS)*. Ital J Pediatr, 2017. **43**(1): p. 5.
110. Milstone, A.M., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization and risk of subsequent infection in critically ill children: importance of preventing nosocomial methicillin-resistant Staphylococcus aureus transmission*. Clin Infect Dis, 2011. **53**(9): p. 853-9.
111. Aires-de-Sousa, M., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus among animals: current overview*. Clin Microbiol Infect, 2017. **23**(6): p. 373-380.
112. Davis, M.F., et al., *Household transmission of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and other staphylococci*. Lancet Infect Dis, 2012. **12**(9): p. 703-16.
113. Miller, L.G., et al., *Staphylococcus aureus colonization among household contacts of patients with skin infections: risk factors, strain discordance, and complex ecology*. Clin Infect Dis, 2012. **54**(11): p. 1523-35.
114. Kwok, K.O., et al., *A systematic review of transmission dynamic studies of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in non-hospital residential facilities*. BMC Infect Dis, 2018. **18**(1): p. 188.
115. Reynolds, C., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) carriage in 10 nursing homes in Orange County, California*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2011. **32**(1): p. 91-3.
116. Olofsson, M., et al., *Differences in molecular epidemiology of Staphylococcus aureus and Escherichia coli in nursing home residents and people in unassisted living situations*. J Hosp Infect, 2019. **101**(1): p. 76-83.
117. Mody, L., et al., *Epidemiology of Staphylococcus aureus colonization in nursing home residents*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(9): p. 1368-73.
118. Torres, K. and P. Sampathkumar, *Predictors of methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization at hospital admission*. Am J Infect Control, 2013. **41**(11): p. 1043-7.
119. Septimus, E.J. and M.L. Schweizer, *Decolonization in Prevention of Health Care-Associated Infections*. Clin Microbiol Rev, 2016. **29**(2): p. 201-22.
120. Mahmoodzadeh Hosseini, H., et al., *Distribution of high-level mupirocin resistance among clinical MRSA*. J Chemother, 2017. **29**(4): p. 215-219.
121. Tong, S.Y.C., et al., *Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management*. Clinical microbiology reviews, 2015. **28**(3): p. 603-661.
122. Balasubramanian, D., et al., *Staphylococcus aureus pathogenesis in diverse host environments*. Pathogens and disease, 2017. **75**(1): p. ftx005.
123. Suaya, J.A., et al., *Incidence and cost of hospitalizations associated with Staphylococcus aureus skin and soft tissue infections in the United States from 2001 through 2009*. BMC Infect Dis, 2014. **14**: p. 296.

124. Andreatos, N., et al., *The impact of antibiotic prescription rates on the incidence of MRSA bloodstream infections: A county-level, US-wide analysis*. Int J Antimicrob Agents, 2018. **52**(2): p. 195-200.
125. Klevens, R.M., et al., *Invasive methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in the United States*. JAMA, 2007. **298**(15): p. 1763-71.
126. Organization, O.E.-W.H. Available from: <https://www.who.int/topics/epidemiology/es/>.
127. Colimon, K.-M., *"Fundamentos de Epidemiología"*. 3a Edición. Corporación para Investigaciones Biológicas, CIB. Medellín, Colombia, 2010.
128. Tenover, F.C., et al., *Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(9): p. 2233-9.
129. Enright, M.C., et al., *The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(11): p. 7687-92.
130. O'Hara, F.P., et al., *spa Typing and Multilocus Sequence Typing Show Comparable Performance in a Macroepidemiologic Study of Staphylococcus aureus in the United States*. Microb Drug Resist, 2016. **22**(1): p. 88-96.
131. Nubel, U., et al., *From types to trees: reconstructing the spatial spread of Staphylococcus aureus based on DNA variation*. Int J Med Microbiol, 2011. **301**(8): p. 614-8.
132. Sabat, A.J., et al., *Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance*. Euro Surveill, 2013. **18**(4): p. 20380.
133. Salipante, S.J., et al., *Application of whole-genome sequencing for bacterial strain typing in molecular epidemiology*. J Clin Microbiol, 2015. **53**(4): p. 1072-9.
134. Jevons, M.P., A.W. Coe, and M.T. Parker, *Methicillin resistance in Staphylococci*. Lancet, 1963. **1**(7287): p. 904-7.
135. Ochotorena, E., et al., *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus and Other Multidrug-Resistant Colonizations/Infections in an Intensive Care Unit: Predictive Factors*. Biol Res Nurs, 2018: p. 1099800418818387.
136. Foster, T.J., *Antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. Current status and future prospects*. FEMS Microbiol Rev, 2017. **41**(3): p. 430-449.
137. Monecke, S., et al., *A Field Guide to Pandemic, Epidemic and Sporadic Clones of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. PLOS ONE, 2011. **6**(4): p. e17936.
138. Rodriguez-Noriega, E. and C. Seas, *The changing pattern of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones in Latin America: implications for clinical practice in the region*. Braz J Infect Dis, 2010. **14 Suppl 2**: p. S87-96.
139. Cruz, C., et al., *Tracking methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones in Colombian hospitals over 7 years (1996-2003): emergence of a new dominant clone*. Int J Antimicrob Agents, 2005. **26**(6): p. 457-62.
140. Mayor, L., et al., *Molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates collected in Asuncion, Paraguay*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(7): p. 2298-300.
141. Sola, C., et al., *Evolution and molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus epidemic and sporadic clones in Cordoba, Argentina*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(1): p. 192-200.
142. Sola, C., et al., *Identification of a novel methicillin-resistant Staphylococcus aureus epidemic clone in Cordoba, Argentina, involved in nosocomial infections*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(4): p. 1427-35.
143. Figueiredo, A.M. and F.A. Ferreira, *The multifaceted resources and microevolution of the successful human and animal pathogen methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2014. **109**(3): p. 265-78.

144. Mediavilla, J.R., et al., *Global epidemiology of community-associated methicillin resistant Staphylococcus aureus (CA-MRSA)*. *Curr Opin Microbiol*, 2012. **15**(5): p. 588-95.
145. Junie, L.M., et al., *Molecular epidemiology of the community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones: a synthetic review*. *Clujul Med*, 2018. **91**(1): p. 7-11.
146. Morrison, M.A., J.C. Hageman, and R.M. Klevens, *Case definition for community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect*, 2006. **62**(2): p. 241.
147. Uhlemann, A.C., et al., *Evolution of community- and healthcare-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol*, 2014. **21**: p. 563-74.
148. Sola, C., et al., *Emergence and dissemination of a community-associated methicillin-resistant Panton-Valentine leukocidin-positive Staphylococcus aureus clone sharing the sequence type 5 lineage with the most prevalent nosocomial clone in the same region of Argentina*. *J Clin Microbiol*, 2008. **46**(5): p. 1826-31.
149. Sola, C., et al., *Spread of epidemic MRSA-ST5-IV clone encoding PVL as a major cause of community onset staphylococcal infections in Argentinean children*. *PLoS One*, 2012. **7**(1): p. e30487.
150. Egea, A.L., et al., *New patterns of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) clones, community-associated MRSA genotypes behave like healthcare-associated MRSA genotypes within hospitals, Argentina*. *Int J Med Microbiol*, 2014. **304**(8): p. 1086-99.
151. Pantosti, A., *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Associated with Animals and Its Relevance to Human Health*. *Front Microbiol*, 2012. **3**: p. 127.
152. Bardiau, M., et al., *Genotypic and phenotypic characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolated from milk of bovine mastitis*. *Lett Appl Microbiol*, 2013. **57**(3): p. 181-6.
153. Garcia-Alvarez, L., et al., *Meticillin-resistant Staphylococcus aureus with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study*. *Lancet Infect Dis*, 2011. **11**(8): p. 595-603.
154. Peacock, S.J. and G.K. Paterson, *Mechanisms of Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Biochem*, 2015. **84**: p. 577-601.
155. Otero, L.H., et al., *How allosteric control of Staphylococcus aureus penicillin binding protein 2a enables methicillin resistance and physiological function*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(42): p. 16808-13.
156. Lee, H., et al., *Ceftaroline Resistance by Clone-Specific Polymorphism in Penicillin-Binding Protein 2a of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018. **62**(9).
157. Acebron, I., et al., *The Allosteric Site for the Nascent Cell Wall in Penicillin-Binding Protein 2a: An Achilles' Heel of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. *Curr Med Chem*, 2015. **22**(14): p. 1678-86.
158. Srinivasan, A., J.D. Dick, and T.M. Perl, *Vancomycin resistance in Staphylococci*. *Clin Microbiol Rev*, 2002. **15**(3): p. 430-8.
159. Hiramatsu, K., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin susceptibility*. *J Antimicrob Chemother*, 1997. **40**(1): p. 135-6.
160. CLSI, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI supplement M100*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2019.
161. Howden, B.P., et al., *Reduced vancomycin susceptibility in Staphylococcus aureus, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications*. *Clin Microbiol Rev*, 2010. **23**(1): p. 99-139.

162. (CDC)., C.f.D.C.a.P., *Staphylococcus aureus resistant to vancomycin--United States, 2002*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2002. **51**(26): p. 565-7.
163. McGuinness, W.A., N. Malachowa, and F.R. DeLeo, *Vancomycin Resistance in Staphylococcus aureus*. Yale J Biol Med, 2017. **90**(2): p. 269-281.
164. Bugg, T.D., et al., *Molecular basis for vancomycin resistance in Enterococcus faecium BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA*. Biochemistry, 1991. **30**(43): p. 10408-15.
165. Rossi, F., et al., *Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage*. N Engl J Med, 2014. **370**(16): p. 1524-31.
166. Leach, K.L., et al., *The site of action of oxazolidinone antibiotics in living bacteria and in human mitochondria*. Mol Cell, 2007. **26**(3): p. 393-402.
167. Tsiodras, S., et al., *Linezolid resistance in a clinical isolate of Staphylococcus aureus*. Lancet, 2001. **358**(9277): p. 207-8.
168. Sakoulas, G., *Clinical outcomes with daptomycin: a post-marketing, real-world evaluation*. Clin Microbiol Infect, 2009. **15 Suppl 6**: p. 11-6.
169. Humphries, R.M., S. Pollett, and G. Sakoulas, *A current perspective on daptomycin for the clinical microbiologist*. Clin Microbiol Rev, 2013. **26**(4): p. 759-80.
170. Jones, T., et al., *Failures in clinical treatment of Staphylococcus aureus Infection with daptomycin are associated with alterations in surface charge, membrane phospholipid asymmetry, and drug binding*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(1): p. 269-78.
171. Jensen, S.O. and B.R. Lyon, *Genetics of antimicrobial resistance in Staphylococcus aureus*. Future Microbiol, 2009. **4**(5): p. 565-82.
172. Khoshnood, S., et al., *A review on mechanism of action, resistance, synergism, and clinical implications of mupirocin against Staphylococcus aureus*. Biomed Pharmacother, 2019. **109**: p. 1809-1818.
173. Poovelikunnel, T., H. Humphreys, and G. Gethin, *Mupirocin resistance: clinical implications and potential alternatives for the eradication of MRSA*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2015. **70**(10): p. 2681-2692.
174. Hughes, J., et al., *Clonal variation in high- and low-level phenotypic and genotypic mupirocin resistance of MRSA isolates in south-east London*. J Antimicrob Chemother, 2015. **70**(12): p. 3191-9.
175. Ramirez, M.S. and M.E. Tolmasky, *Aminoglycoside modifying enzymes*. Drug Resist Updat, 2010. **13**(6): p. 151-71.
176. Rouch, D.A., et al., *The aacA-aphD gentamicin and kanamycin resistance determinant of Tn4001 from Staphylococcus aureus: expression and nucleotide sequence analysis*. J Gen Microbiol, 1987. **133**(11): p. 3039-52.
177. Allington, D.R. and M.P. Rivey, *Quinupristin/dalfopristin: a therapeutic review*. Clin Ther, 2001. **23**(1): p. 24-44.
178. Roberts, M.C., et al., *Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(12): p. 2823-30.
179. Khodabandeh, M., et al., *Analysis of Resistance to Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Among mecA-Positive Staphylococcus aureus Isolates*. Osong public health and research perspectives, 2019. **10**(1): p. 25-31.
180. Rodriguez-Noriega, E., et al., *Evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones in Latin America*. Int J Infect Dis, 2010. **14**(7): p. e560-6.
181. A., A., *Cuatro décadas de Necesidades Básicas Insatisfechas en Argentina. Sociología del trabajo- Estudios culturales- Narrativas sociológicas y literarias*
NB - Núcleo Básico de Revistas Científicas Argentinas (Caicyt-Conicet), 2016.
182. INDEC. *CENSO NACIONAL DEL AÑO 2010*. 2011; Available from: https://www.indec.gov.ar/nivel4_default.asp?id_tema_1=2&id_tema_2=41&id_tema_3=135.

183. Kreuter, M.W., et al., *Unmet basic needs and health intervention effectiveness in low-income populations*. *Prev Med*, 2016. **91**: p. 70-75.
184. Challagundla, L., et al., *Phylogenomic Classification and the Evolution of Clonal Complex 5 Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in the Western Hemisphere*. *Frontiers in Microbiology*, 2018. **9**(1901).
185. Qi, W., et al., *Molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Zurich, Switzerland (2003): prevalence of type IV SCCmec and a new SCCmec element associated with isolates from intravenous drug users*. *J Clin Microbiol*, 2005. **43**(10): p. 5164-70.
186. Heusser, R., et al., *Mosaic staphylococcal cassette chromosome mec containing two recombinase loci and a new mec complex, B2*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007. **51**(1): p. 390-3.
187. Oliveira, D.C. and H. de Lencastre, *Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002. **46**(7): p. 2155-61.
188. Goel, M.K., P. Khanna, and J. Kishore, *Understanding survival analysis: Kaplan-Meier estimate*. *International journal of Ayurveda research*, 2010. **1**(4): p. 274-278.
189. (WHO), W.H.O., *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*, 2014. p. 257.
190. (WHO), W.H.O., *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*, 2017. p. 7.
191. Neidhart, S., et al., *Predictors of colonization with Staphylococcus species among patients scheduled for cardiac and orthopedic interventions at tertiary care hospitals in north-eastern Germany-a prevalence screening study*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2018. **37**(4): p. 633-641.
192. McKinnell, J.A., et al., *A systematic literature review and meta-analysis of factors associated with methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization at time of hospital or intensive care unit admission*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2013. **34**(10): p. 1077-86.
193. Nelson, R.E., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Colonization and Pre- and Post-hospital Discharge Infection Risk*. *Clin Infect Dis*, 2019. **68**(4): p. 545-553.
194. Otter, J.A., et al., *Low prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus carriage at hospital admission: implications for risk-factor-based vs universal screening*. *Journal of Hospital Infection*, 2013. **83**(2): p. 114-121.
195. Allegranzi, B., et al., *Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis*. *Lancet*, 2011. **377**(9761): p. 228-41.
196. Tong, S.Y., et al., *Genome sequencing defines phylogeny and spread of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a high transmission setting*. *Genome Res*, 2015. **25**(1): p. 111-8.
197. den Heijer, C.D., et al., *Prevalence and resistance of commensal Staphylococcus aureus, including methicillin-resistant S aureus, in nine European countries: a cross-sectional study*. *Lancet Infect Dis*, 2013. **13**(5): p. 409-15.
198. Holtfreter, S., et al., *Molecular Epidemiology of Staphylococcus aureus in the General Population in Northeast Germany: Results of the Study of Health in Pomerania (SHIP-TREND-0)*. *J Clin Microbiol*, 2016. **54**(11): p. 2774-2785.
199. Sollid, J.U., et al., *Staphylococcus aureus: determinants of human carriage*. *Infect Genet Evol*, 2014. **21**: p. 531-41.
200. Das, S., et al., *Active Surveillance and Decolonization Without Isolation Is Effective in Preventing Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Transmission in the Psychiatry Units*. *Open forum infectious diseases*, 2014. **1**(2): p. ofu067-ofu067.
201. Freitas, E.A., et al., *Prevalence of USA300 strain type of methicillin-resistant Staphylococcus aureus among patients with nasal colonization identified with active surveillance*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2010. **31**(5): p. 469-75.

202. David, M.Z. and R.S. Daum, *Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic*. Clin Microbiol Rev, 2010. **23**(3): p. 616-87.
203. Mody, L., et al., *Longitudinal Assessment of Multidrug-Resistant Organisms in Newly Admitted Nursing Facility Patients: Implications for an Evolving Population*. Clin Infect Dis, 2018. **67**(6): p. 837-844.
204. Price, J.R., et al., *Transmission of Staphylococcus aureus between health-care workers, the environment, and patients in an intensive care unit: a longitudinal cohort study based on whole-genome sequencing*. Lancet Infect Dis, 2017. **17**(2): p. 207-214.
205. Popovich, K.J., et al., *Genomic and Epidemiological Evidence for Community Origins of Hospital-Onset Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Bloodstream Infections*. J Infect Dis, 2017. **215**(11): p. 1640-1647.
206. Iwamoto, M., et al., *Trends in invasive methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections*. Pediatrics, 2013. **132**(4): p. e817-24.
207. Tosas Auguet, O., et al., *Evidence for Community Transmission of Community-Associated but Not Health-Care-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strains Linked to Social and Material Deprivation: Spatial Analysis of Cross-sectional Data*. PLoS Med, 2016. **13**(1): p. e1001944.
208. Cairns, S., et al., *Targeted MRSA screening can be as effective as universal screening*. BMJ : British Medical Journal, 2014. **349**: p. g5075.
209. Lin, M.Y., et al., *Regional Epidemiology of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Among Adult Intensive Care Unit Patients Following State-Mandated Active Surveillance*. Clin Infect Dis, 2018. **66**(10): p. 1535-1539.
210. Otter, J.A., et al., *Implications of targeted versus universal admission screening for methicillin-resistant Staphylococcus aureus carriage in a London hospital*. J Hosp Infect, 2014. **87**(3): p. 171-4.
211. Ziakas, P.D., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus prevention strategies in the ICU: a clinical decision analysis**. Crit Care Med, 2015. **43**(2): p. 382-93.
212. Leonhardt, K.K., et al., *Clinical effectiveness and cost benefit of universal versus targeted methicillin-resistant Staphylococcus aureus screening upon admission in hospitals*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2011. **32**(8): p. 797-803.
213. Roth, V.R., et al., *Cost Analysis of Universal Screening vs. Risk Factor-Based Screening for Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. PLOS ONE, 2016. **11**(7): p. e0159667.
214. O'NEILL, J., *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: final report and recommendations*. THE REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE, 2016. p. 80.
215. Marra, A.R., et al., *Discontinuing contact precautions for multidrug-resistant organisms: A systematic literature review and meta-analysis*. Am J Infect Control, 2018. **46**(3): p. 333-340.
216. Hetem, D.J., et al., *Transmissibility of livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Emerging infectious diseases, 2013. **19**(11): p. 1797-1802.
217. Popoola, V.O., et al., *Impact of colonization pressure and strain type on methicillin-resistant Staphylococcus aureus transmission in children*. Clin Infect Dis, 2013. **57**(10): p. 1458-60.
218. Desai, R., et al., *Survival and transmission of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus from fomites*. Am J Infect Control, 2011. **39**(3): p. 219-25.
219. Miller, L.G. and B.A. Diep, *Clinical practice: colonization, fomites, and virulence: rethinking the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(5): p. 752-60.

220. Popovich, K.J., et al., *Anatomic sites of colonization with community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2014. **35**(9): p. 1192-4.
221. Knox, J., A.C. Uhlemann, and F.D. Lowy, *Staphylococcus aureus infections: transmission within households and the community*. *Trends Microbiol*, 2015. **23**(7): p. 437-44.
222. Cassone, M., et al., *Environmental Panels as a Proxy for Nursing Facility Patients With Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus and Vancomycin-Resistant Enterococcus Colonization*. *Clin Infect Dis*, 2018. **67**(6): p. 861-868.
223. Senn, L., et al., *The Stealthy Superbug: the Role of Asymptomatic Enteric Carriage in Maintaining a Long-Term Hospital Outbreak of ST228 Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. *MBio*, 2016. **7**(1): p. e02039-15.
224. Faccone, D., et al., *MRSA Pediatric clone expressing ermC plus InuA genes causing nosocomial transmission and healthcare workers colonization in a neonatal intensive care unit*. *Infect Genet Evol*, 2014. **25**: p. 78-80.
225. Di Gregorio, S., et al., *Clinical, microbiological, and genetic characteristics of heteroresistant vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus bacteremia in a teaching hospital*. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 2015. **21**(1): p. 25-34.
226. Golding, G.R., et al., *A preliminary guideline for the assignment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus to a Canadian pulsed-field gel electrophoresis epidemic type using spa typing*. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2008. **19**(4): p. 273-81.
227. Tenover, F.C., et al., *Characterization of Staphylococcus aureus isolates from nasal cultures collected from individuals in the United States in 2001 to 2004*. *J Clin Microbiol*, 2008. **46**(9): p. 2837-41.
228. Moore, C.L., et al., *USA600 (ST45) methicillin-resistant Staphylococcus aureus bloodstream infections in urban Detroit*. *J Clin Microbiol*, 2010. **48**(6): p. 2307-10.
229. Chen, C.-J., et al., *Characterization and Comparison of 2 Distinct Epidemic Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Clones of ST59 Lineage*. *PLOS ONE*, 2013. **8**(9): p. e63210.
230. Gordon, N.C., et al., *Whole-Genome Sequencing Reveals the Contribution of Long-Term Carriers in Staphylococcus aureus Outbreak Investigation*. *J Clin Microbiol*, 2017. **55**(7): p. 2188-2197.
231. Khan, A., B. Wilson, and I.M. Gould, *Current and future treatment options for community-associated MRSA infection*. *Expert Opin Pharmacother*, 2018. **19**(5): p. 457-470.
232. Mendes, R.E., et al., *Genotypic Characterization of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Recovered at Baseline from Phase 3 Pneumonia Clinical Trials for Ceftobiprole*. *Microb Drug Resist*, 2016. **22**(1): p. 53-8.
233. Pfaller, M.A., et al., *Ceftobiprole activity when tested against contemporary bacteria causing bloodstream infections in the United States (2016-2017)*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2019.
234. Bathoorn, E., et al., *Emergence of high-level mupirocin resistance in coagulase-negative staphylococci associated with increased short-term mupirocin use*. *Journal of clinical microbiology*, 2012. **50**(9): p. 2947-2950.
235. Cavalcante, F.S., et al., *High prevalence of methicillin resistance and PVL genes among Staphylococcus aureus isolates from the nares and skin lesions of pediatric patients with atopic dermatitis*. *Braz J Med Biol Res*, 2015. **48**(7): p. 588-94.
236. Gubbay, J.B., et al., *Clinical features, epidemiology, antimicrobial resistance, and exotoxin genes (including that of Panton-Valentine leukocidin) of gentamicin-susceptible methicillin-resistant Staphylococcus aureus (GS-MRSA) isolated at a paediatric teaching hospital in New South Wales, Australia*. *Pathology*, 2008. **40**(1): p. 64-71.

237. Boswih, S.S., E.E. Udo, and N. Al-Sweih, *Shifts in the Clonal Distribution of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Kuwait Hospitals: 1992-2010*. PLoS One, 2016. **11**(9): p. e0162744.
238. Adhikari, R.P., et al., *Phenotypic and molecular characterization of community occurring, Western Samoan phage pattern methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother, 2002. **50**(6): p. 825-31.
239. Smith, J.M. and G.M. Cook, *A decade of community MRSA in New Zealand*. Epidemiol Infect, 2005. **133**(5): p. 899-904.
240. Heffernan H, B.S., *Annual survey of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. Institute of Environmental Science and Research, Wellington, New Zealand. Available: http://www.surv.esr.cri.nz/PDF_surveillance/Antimicrobial/MRSA/aMRSA_2011.pdf. Accessed 2012 Sep 13, 2011.
241. Williamson, D.A., et al., *Clinical and molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in New Zealand: rapid emergence of sequence type 5 (ST5)-SCCmec-IV as the dominant community-associated MRSA clone*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e62020.
242. David, M.Z. and R.S. Daum, *Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic*. Clinical Microbiology Reviews, 2010. **23**(3): p. 616.
243. Blomfeldt, A., et al., *Molecular characterization of methicillin-sensitive Staphylococcus aureus isolates from bacteremic patients in a Norwegian University Hospital*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(1): p. 345-7.
244. Nichol, K.A., et al., *Changing epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Canada*. J Antimicrob Chemother, 2013. **68 Suppl 1**: p. i47-55.
245. Williamson, D.A., G.W. Coombs, and G.R. Nimmo, *Staphylococcus aureus 'Down Under': contemporary epidemiology of S. aureus in Australia, New Zealand, and the South West Pacific*. Clin Microbiol Infect, 2014. **20**(7): p. 597-604.
246. Ray, S.M., *Preventing Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Disease in Urban US Hospitals-Now for the Hard Part: More Evidence Pointing to the Community as the Source of MRSA Acquisition*. J Infect Dis, 2017. **215**(11): p. 1631-1633.
247. Bernard, L., et al., *Bacterial contamination of hospital physicians' stethoscopes*. Infect Control Hosp Epidemiol, 1999. **20**(9): p. 626-8.
248. Bhalla, A., et al., *Acquisition of nosocomial pathogens on hands after contact with environmental surfaces near hospitalized patients*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2004. **25**(2): p. 164-7.
249. Otter, J.A., S. Yezli, and G.L. French, *The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2011. **32**(7): p. 687-99.
250. Sexton, T., et al., *Environmental reservoirs of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in isolation rooms: correlation with patient isolates and implications for hospital hygiene*. J Hosp Infect, 2006. **62**(2): p. 187-94.
251. Aanensen, D.M., et al., *Whole-Genome Sequencing for Routine Pathogen Surveillance in Public Health: a Population Snapshot of Invasive Staphylococcus aureus in Europe*. MBio, 2016. **7**(3).
252. Davies, J. and P. Courvalin, *Mechanisms of resistance to aminoglycosides*. The American Journal of Medicine, 1977. **62**(6): p. 868-872.
253. Mason, A., et al., *Accuracy of Different Bioinformatics Methods in Detecting Antibiotic Resistance and Virulence Factors from Staphylococcus aureus Whole-Genome Sequences*. J Clin Microbiol, 2018. **56**(9).
254. Otto, M., *Community-associated MRSA: what makes them special?* Int J Med Microbiol, 2013. **303**(6-7): p. 324-30.

255. Boakes, E., et al., *Comparative analysis of phenol-soluble modulins production and *Galleria mellonella* killing by community-associated and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains*. *J Med Microbiol*, 2016. **65**(12): p. 1429-1433.
256. Wu, K., et al., *A correlative analysis of epidemiologic and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones from diverse geographic locations with virulence measured by a *Caenorhabditis elegans* host model*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2013. **32**(1): p. 33-42.
257. Patel, J.B., R.J. Gorwitz, and J.A. Jernigan, *Mupirocin resistance*. *Clin Infect Dis*, 2009. **49**(6): p. 935-41.
258. Spoor, L.E., et al., *Livestock origin for a human pandemic clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus**. *MBio*, 2013. **4**(4).
259. Babraham Bioinformatics, B., *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data*. Cambridge, UK: Babraham Institute. 2011.
260. Bolger, A.M., Lohse, M. & Usadel, B., *Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data*. *Bioinformatics* **30**, 2114–2120 2014.
261. Bankevich, A.e.a., *SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing*. *J. Comput. Biol.* **19**, 455–477 2012.
262. Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N. & Tesler, G. , *QUAST: quality assessment tool for genome assemblies*. *Bioinformatics* **29**, 1072–1075 2013.
263. Pevsner, J., *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*. *Bioinformatics and Functional Genomics* **100–138**. 2009.
264. Chen, L., *VFDB: a reference database for bacterial virulence factors*. *Nucleic Acids Research* **33**, D325–D328 2004.
265. Consortium, T., *The Universal Protein Resource (UniProt)*. *Nucleic Acids Research* **35**, D193–D197 2007.
266. Li, X., *Probability forecasting of burst transmission for IEEE 802.16 BWA systems*. in *2010 5th International Conference on Computer Science & Education* 2010.
267. Li, H.e.a., *The Sequence Alignment/Map format and SAMtools*. *Bioinformatics* **25**, 2078–2079 2009.
268. McKenna, A.e.a., *The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data*. *Genome Res.* **20**, 1297–1303 2010.
269. Cingolani, P., et al., *A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3*. *Fly (Austin)*, 2012. **6**(2): p. 80-92.
270. Arndt, D., *PHAST, PHASTER and PHASTEST: Tools for finding prophage in bacterial genomes*. *Brief. Bioinform.* . 2017.
271. Drummond, A.J.B., R. , *Bayesian Evolutionary Analysis with BEAST*. 2015.
272. Darling, A., *Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements*. *Genome Research* **14**, 1394–1403 2004.
273. Geha, D.J., et al., *Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant *Staphylococci* in the clinical laboratory*. *J Clin Microbiol*, 1994. **32**(7): p. 1768-72.
274. Stegger, M., et al., *Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA(LGA251)**. *Clin Microbiol Infect*, 2012. **18**(4): p. 395-400.
275. Shopsin, B., et al., *Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains*. *J Clin Microbiol*, 1999. **37**(11): p. 3556-63.
276. Milheirico, C., D.C. Oliveira, and H. de Lencastre, *Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus**. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007. **51**(9): p. 3374-7.
277. Li, H. and R. Durbin, *Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform*. *Bioinformatics*, 2009. **25**(14): p. 1754-60.

278. Li, H., et al., *The Sequence Alignment/Map format and SAMtools*. Bioinformatics, 2009. **25**(16): p. 2078-9.
279. McKenna, A., et al., *The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data*. Genome Res, 2010. **20**(9): p. 1297-303.
280. Stamatakis, A., *RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies*. Bioinformatics, 2014. **30**(9): p. 1312-3.
281. Rich, J.T., et al., *A practical guide to understanding Kaplan-Meier curves*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2010. **143**(3): p. 331-6.