

**Epidemiología Molecular y Factores de
Virulencia de *Staphylococcus aureus*
Resistente a Meticilina: emergencia en la
comunidad e impacto a nivel
intra-hospitalario.**

2017



**Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología
(CIBICI) CONICET**

**Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias
Químicas**

Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

Tesista: Bioquímica Ana Lía Egea.

Director: Dra. Claudia Sola.

2017

Director de tesis: Dra. Claudia Sola

Miembros de la comisión de tesis:

Dr. José Luis Bocco.

Dr. Carlos Argaraña

Dra. Andrea Smania

Evaluador externo:

Dra. Sonia Gomez

Este trabajo contó con el apoyo del Consejo Nacional de Investigación y Tecnología de Argentina (CONICET), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y la Secretaría de Ciencia Técnica- Universidad Nacional de Córdoba (SECyT UNC)

A mi Familia....

La frase más excitante que se puede oír en ciencia, la que anuncia nuevos descubrimientos, no es ¡Eureka! (¡Lo encontré!) sino “Es extraño...”

Isaac Asimov.

...Detrás de cada línea de llegada, hay una de partida.

Detrás de cada logro, hay otro desafío.

Mientras estés viva, siéntete viva.

Si extrañas lo que hacías, vuelve a hacerlo.

No vivas de fotos amarillas...

Sigue aunque todos esperen que abandones.

No dejes que se oxide el acero que hay en ti.

Haz que, en vez de lástima, te tengan respeto.

Cuando por los años no puedas correr, trota.

Cuando no puedas trotar, camina.

Cuando no puedas caminar, usa el bastón.

¡Pero nunca te detengas!

Madre Teresa de Calcuta.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer, en primer lugar, a mi directora de tesis, Dra. Claudia Sola, por abrirme las puertas de este laboratorio, por haber depositado su confianza en mí y por haberme guiado y transmitido sus conocimientos, en esta etapa de formación profesional. Le agradezco la paciencia y tolerancia en esta última etapa. ¡Muchas gracias Claudia!

También agradezco a los miembros de la comisión evaluadora de esta tesis, Dr. Carlos Argaraña, Dra Inés Albesa, reemplazada en esta última etapa por la Dra. Andrea Smania y Dr. José Luis Bocco, por la buena predisposición en el seguimiento de este trabajo, por sus aportes, año tras año, en cada reunión y por haberse tomado el trabajo de leer este manuscrito.

A la Dra Sonia Gomez por haber aceptado ser el evaluador externo y dedicar parte de su tiempo a la corrección de este trabajo.

Al Dr. Mario Vilaró, del Hospital Privado de Córdoba, por haber fomentado y fortalecido mis ganas de emprender un trabajo de investigación.

Quiero agradecer a todos los integrantes del laboratorio 119-120, por su buen compañerismo y solidaridad, Dra Cecilia Alvarez, Dr. Alex Saka, Dr. Gastón Soria, Dr. José Echenique y especialmente a la Dra. Susana Genti, la Dra. Graciela Panzetta y al Dr. José Luis Bocco por inspirarnos con sus buenos ejemplos de tesón, dedicación y pasión en el trabajo, porque como dice el refrán... "la palabra convence pero el ejemplo arrastra".

A todos mis compañeros ¡muchas gracias! por compartir el día a día de manera tan amena a Danilo, ¡no podría tener un mejor compañero de mesada!, a Nubia, mi Nubis, gracias por las charlas, por el curso de photo shop jaja!, por estar, por tu mirada objetiva de la vida! A Meli , mi Meli , gracias por haber compartido tu mesada conmigo y a partir de allí, los mates y las charlas cada día!

A los más viejitos... Paulo, Luci Reina, Magui, Jesi (mis compañeritas de Inglés ja!) , Anita, Ale G., Mini Lu, Flor Pansa, Sofi, Flor Villafañe, Lucas, Ale Moyano, Hernán, algunos de Uds, ahora, en otros laboratorios, pero fueron parte de estos años ¡Gracias muchas gracias! por la picardía de todos los días, por los chistes, por las risas, por los mates, por el buen humor!

A los más nuevitos... Euge, Vani, Pablo, Marianito, Lauri, Nico, Emi, Clarisa, Daniela, Nadia, Lucille y Andrea. Gracias por sus buenos gestos de compañerismo.

Agradezco a todas las personas que trabajan en el Departamento de Bioquímica Clínica y que de una manera u otra han hecho y hacen posible el funcionamiento de las tareas cotidianas, personal técnico de apoyo, secretarías del CIBICI y CONICET, Adriana y Laura, a las secretarías de postgrado y personal del área centralizada de actividades prácticas (pañol preparativos).

A los profesionales participantes del Instituto Nacional de enfermedades Infecciosas Dr. Carlos G. Malbrán. Por su colaboración para llevar a cabo el proyecto multicéntrico: Alejandra Corso, Paula Gaguetti, Diego Faccone y Celeste Lucero

A todos los profesionales de los hospitales que formaron parte del grupo de estudio de *S. aureus* Argentina, muchas gracias, ya que sin su participación, este trabajo de tesis no hubiese sido posible.

Al Dr Juan Pablo Nicola por sus aportes en la última etapa de este trabajo

A todo el grupo de laboratorio de la Dirección de Especialidades Médicas, Silvia, Tony, Raulo, Dani, Marce M, Gabi, Andrea, Maga, Marce T., Nico, Walter, Flor, Romi y Gloria por hacer tan gratas y las mañanas de trabajo.

A mis amigos de siempre Lauri, Cora, Toe, Gri, Tuse; a los que hice en la Universidad, Marilina, César y Mauge y a los que conocí en esta hermosa ciudad, Anita, Agus, Luisa y Lilian ¡Gracias a cada uno! simplemente por haber estado y estar en cada momento.

A mis padres Hugo y Cristina gracias por sus enseñanzas, por la confianza, por el respeto y el apoyo constante. A mis hermanos Guille, Mariano (mi hermano preferido) y Cristi por el cariño de hermanos que me brindan.

A mis sobrinos Sofi, Juana, Manu, Catu y Delfi gracias por alegrarme el alma.

A mi tío Héctor por su apoyo e interés en cada etapa de mi vida.

A mi tía Susana por ser casi una mamá para mí y un ejemplo de buena persona.

A Sebastián por el amor y la paciencia.

A Dios... por la el regalo de la vida.

ÍNDICE

1	ABREVIATURAS	XIII
2	RESUMEN.....	XVIV
3	ABSTRACT	VXXI
4	INTRODUCCIÓN	1
4.1	<i>Staphylococcus aureus</i> : CARACTERÍSTICAS GENERALES	2
4.2	BASES GENÉTICAS.	3
4.2.1	TRANSPOSONES (<i>Tn</i>).....	4
4.2.2	SECUENCIAS DE INSERCIÓN (IS)	5
4.2.3	PLÁSMIDOS (PL)	6
4.2.4	BACTERIÓFAGOS (virus bacterianos)	7
4.2.5	ISLAS DE PATOGENICIDAD DE <i>S. aureus</i> (SaPI)	8
4.2.6	ISLAS GENÓMICAS (GI).....	9
4.2.7	CASSETTE CROMOSOMAL (SCC).....	10
4.3	COLONIZACIÓN y TRANSMISIÓN.....	14
4.4	FACTORES DE VIRULENCIA Y PATOGENICIDAD	15
4.4.1	COMPONENTES DE SUPERFICIE CELULAR	18
4.4.2	ENZIMAS EXTRACELULARES	23
4.5	OTROS FACTORES DE VIRULENCIA.....	27
4.5.1	ACME (Arginine Catabolic Mobile Element)	27
4.5.2	PSM (Phenol-Soluble Modulin)	28
4.6	REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA: SISTEMA Agr	30
4.7	EPIDEMIOLOGÍA: GENERAL Y MOLECULAR.....	33
4.7.1	MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN PARA MRSA.....	34
4.7.1.1	Tipificación del SCCmec	34
4.7.1.2	Tipificación del gen de la proteína A (<i>spa typing</i>).....	34
4.7.1.3	Multi Locus Sequense Typing (MLST)	35
4.7.1.4	Electroforesis en campo pulsado (PFGE)	35

4.7.1.5	Tipificación por PCR convencional	36
4.7.1.6	Secuenciación del genoma completo:	36
4.8	MRSA: Epidemiología	37
4.8.1	Healthcare-Associated Methicillin-Resistant <i>S. aureus</i> (HA-MRSA).....	38
4.8.2	Community-Associated Methicillin-Resistant <i>S. aureus</i> (CA-MRSA).....	40
4.9	RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS	42
4.9.1	BETALACTÁMICOS TRADICIONALES Y NUEVOS ANTI-MRSA	42
4.9.2	VANCOMICINA	44
4.9.3	LINEZOLID.....	46
4.9.4	TIGECICLINA	46
4.9.5	DAPTOMICINA.....	47
5	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	49
6	HIPÓTESIS	50
7	OBJETIVOS GENERALES.....	50
7.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
7.1.1	PRIMERA PARTE (Objetivo General I)	51
7.1.2	SEGUNDA PARTE (Objetivo General I)	51
7.1.3	TERCERA PARTE (Objetivo General I).....	51
7.1.4	CUARTA PARTE (Objetivo General II):	51
8	RESULTADOS.....	53
9	RESULTADOS PRIMERA PARTE	54
9.1	OBJETIVO GENERAL.....	54
9.1.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	54
9.2	Ia Resultados	55
9.2.1	Diseño del estudio, características de los Hospitales y datos de incidencia.....	55
9.2.2	Prevalencia de las Infecciones por MRSA, en la comunidad y en el ámbito hospitalario....	59
9.2.3	Genotipos de MRSA: CA-MRSA _G y HA-MRSA _G por criterio epidemiológico, grupo de edad y región geográfica.....	60
9.3	Ib Resultados	64

9.3.1	Caracterización molecular de las cepas	64
9.3.2	Clones de MRSA por criterios epidemiológicos* y grupos etarios.....	69
9.3.3	Clones de MRSA y distribución geográfica.....	70
9.3.4	Resistencia a los antimicrobianos no-β-lactámicos: CA-MRSA _G vs. HA-MRSA _G vs MSSA	72
9.3.5	Susceptibilidad a Ceftarolina (CPT)	76
9.3.6	Validación de la definición fenotípica de CA-MRSA.....	78
9.4	CONCLUSIONES	83
10	RESULTADOS SEGUNDA PARTE	85
10.1	OBJETIVO GENERAL.....	85
10.1.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	85
10.2	Ic y Id Resultados.....	86
10.2.1	Comparaciones (univariadas) de las características socio-demográficas y clínicas de las infecciones por MRSA: CA-MRSA _G vs. HA-MRSA _G	86
10.2.2	a. Infecciones por MRSA totales	86
10.2.3	b. infecciones por MRSA de inicio en el hospital (HO):.....	87
10.2.4	Comparaciones univariadas de características de los pacientes hospitalizados con infecciones por CA-MRSA _G ; infecciones de inicio en la comunidad (CO) vs. infecciones de inicio en el hospital (HO).....	94
10.2.5	Análisis Multivariados o de Regresión Múltiple.....	97
10.2.6	Comparaciones (univariadas y multivariadas) de las características socio-demográficas y clínicas de las infecciones por CA-MRSA _G vs MSSA y HA-MRSA _G vs MSSA.....	98
10.3	CONCLUSIONES	100
10.3.1	INFECCIONES DE INICIO EN LA COMUNIDAD.....	100
10.3.2	INFECCIONES DE INICIO EN EL HOSPITAL	101
11	RESULTADOS TERCERA PARTE	102
11.1	OBJETIVO GENERAL.....	102
11.1.1	OBJETIVO ESPECÍFICO	102
11.2	Ie Resultados	102
11.2.1	Características microbiológicas de las cepas de <i>S. aureus</i> sensibles a meticilina (MSSA).	102

11.2.2	Caracterización molecular y distribución regional de MSSA	103
11.2.3	Caminos evolutivos de los principales clones CA-MRSA.....	108
11.3	CONCLUSIONES	110
12	RESULTADOS CUARTA PARTE	111
12.1	OBJETIVO GENERAL.....	111
12.1.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	111
12.2	Ila Resultados-	112
12.2.1	Evaluación de la proporción de supervivencia en una superficie inerte (melamina) entre diferentes clones MRSA epidémicos.	112
12.3	Ilb Resultados	120
12.3.1	Evaluación de la expresión diferencial de genes relacionados a la adhesión, biofilm y expresión de reguladores globales de <i>S. aureus</i> durante la persistencia, de clones MRSA epidémicos, en una superficie inerte	120
12.4	Ilc Resultados	124
12.4.1	Evaluación de la expresión diferencial de genes relacionados a la adhesión, biofilm y expresión de reguladores globales de <i>S. aureus</i> , en clones MRSA epidémicos, en el estado de biofilm. 124	
12.5	CONCLUSIONES GENERALES CUARTA PARTE.....	133
13	DISCUSIÓN	134
14	MATERIALES Y MÉTODOS.....	150
14.1	Objetivo genera I:.....	151
14.1.1	Diseño del estudio y definición de caso.....	151
14.1.2	Características de los Hospitales.....	153
14.1.3	Algoritmo de trabajo.....	154
14.1.5	Definiciones	157
14.1.6	Aislamientos bacterianos y pruebas de susceptibilidad antimicrobianas	158
14.1.7	Tipificación Molecular.....	160
14.1.8	Detección del gen <i>mecA</i> por PCR multiplex:.....	160
14.1.9	Electroforesis en campo pulsado o pulsed-field gel electrophoresis (PFGE):.....	161
14.1.10	Tipificación por MLST:.....	165

14.1.11	Tipificación utilizando de la región polimórfica “X” del gen <i>spa</i> :	167
14.1.12	Determinación del tipo de SCC <i>mec</i> (Staphylococcal Cassette Chromosomal <i>mec</i>)	169
14.1.13	Subtipado del Staphylococcal Cassette Chromosome <i>mec</i> IV	171
14.1.14	Detección por PCR de la presencia de genes de virulencia	173
14.1.15	Análisis estadístico	174
14.2	Objetivo general II:	175
14.2.1	Ensayo de supervivencia en superficie inerte y recuento de colonias)	175
14.2.2	Ensayo de supervivencia en superficie inerte y expresión diferencial de genes	178
14.2.3	Ensayo de biofilm	182
14.2.4	Fase Exponencial y Fase Estacionaria en caldo:	188
15	BIBLIOGRAFÍA	189

1 ABREVIATURAS

ABC: del inglés "ATP-Binding-Cassette".

ACME: del inglés "arginine catabolic mobile element".

Agr: del inglés "accessory gene regulator".

AIP: del inglés "autoinducing peptide".

arc: del inglés "Carbamate kinase gene".

aro: del inglés "Shikimate dehydrogenase gene".

bp: del inglés "base pair".

CA-MRSA: del inglés "Community-Associated Methicillin-resistant *S. aureus*".

CC: del inglés "Clonal Complex".

CCR: del inglés "cassette chromosome recombinase".

CDC: Center for Disease Control and Prevention.

CG: del inglés "Core Genome".

CHIP: del inglés "chemotaxis inhibitory protein of *S. aureus*".

CO: del inglés "community-OnSet".

CV: Core Variable.

DR: del inglés "Direct Repeats".

egc: del inglés "enterotoxin gene clusters".

ETA: del inglés "exfoliative toxins A".

ETB: del inglés "exfoliative toxins B".

ETs: del inglés "Exfoliative Toxins".

GI: del inglés "Genomic Island".

glp: del inglés "Glycerol kinase gene".

gmk: del inglés "Guanylate kinase gene".

HA-MRSA: del inglés "healthcare-associated methicillin-resistant *S. aureus*".

HO: del inglés "healthcare-onset".

HRF: del inglés "healthcare-associated risk-factors". Factores de riesgo relacionados a la atención sanitaria.

h-VISA: *S. aureus* con resistencia Intermedia heterogénea a Vancomicina.

HVR: del inglés "Hypervariable regions".

INVI: Infecciones Invasivas.

IR: del inglés "Inverted Repeat".

IS: del inglés "Insertion Sequences".

Isd: del inglés "Iron-regulated surface determinant".

ISS: del inglés "Integration Site Sequence".

Kb: Kilo bases.

LV: del inglés "Latin American Variant".

mecA: Gen que codifica para la proteína PBP2a de baja afinidad por antibióticos β -Lactámicos..

MGEs: del inglés "Mobile Genetic Elements".

MLSB : Resistencia a macrólidos-lincosaminas-streptograminas B.

MLST: del inglés "Multilocus Sequence Typing".

MRSA: del inglés "Methicillin-resistant Staphylococcus aureus".

MRSA: del inglés "Methicillin-Resistant *S. aureus*".

MSCRAMMs: del inglés "Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules".

MSSA: del inglés "Methicillin-Sensitive *S. aureus*".

NY/J: Clon New York/Japón.

ORF: del inglés "Open Reading Frame".

PFGE: del inglés "Pulsed Field Gel Electrophoresis".

PI: del inglés del inglés "Pathogenicity Island".

S. aureus: *Staphylococcus aureus*.

SAK: del inglés " S. aureus staphylokinase "

SCC: del inglés "Staphylococcal Cassette Chromosomal".

SE: del inglés "Staphylococcal Enterotoxins".

SLV: del inglés "Single Locus Variant".

spa: del inglés "Staphylococcal protein A gene".

SSTI: del inglés "Skin and soft-tissue infections" (Infecciones de piel y tejidos blandos).

SSSS: del inglés "Staphylococcal Scalded Skin Syndrome".

ST: de inglés "Sequence type".

Tn: Transposón.

tpi: del inglés "Triosephosphate isomerase gene."

TSST: del inglés "toxina-1 del síndrome del shock tóxico."

VISA: del inglés "Vancomycin resistance Intermediate *S. aureus*" / *Staphylococcus aureus* con resistencia Intermedia homogénea a Vancomicina (CIM: 8 ug/mL).

VRE: Vancomycin Resistant *Enterococcus*.

VRSA: Vancomycin-Resistant *S. aureus* (CIM > 32 ug/mL).

yqi: del inglés "Acetyl coenzyme A acetyltransferase gene".

2 RESUMEN

Staphylococcus aureus Resistente a Metilina (MRSA) es un exitoso patógeno que se presenta asociado tanto al ambiente hospitalario (HA-MRSA) como a la comunidad (CA-MRSA), ha demostrado tener alta virulencia, capacidad para adquirir resistencia a diferentes antimicrobianos y adaptabilidad para transmitirse y diseminarse a través de la colonización de seres humanos y de la supervivencia en superficies inertes comportándose, estas, como reservorios ambientales para el microorganismo. A partir de 1990 CA-MRSA emergió y se diseminó en diferentes países del mundo y en aquellos de mayores prevalencia (> 50%) se ha descrito que estas cepas CA-MRSA comenzaron a introducirse en el ambiente hospitalario. Sin embargo, el conocimiento de su impacto en los hospitales es limitado, particularmente en América Latina. En este trabajo de tesis se realizó un estudio prospectivo de corte transversal y multicéntrico (nov-2009) de las infecciones por *S. aureus* mediante el análisis de 591 aislamientos clínicos de 66 hospitales de Argentina. Los casos se clasificaron considerando el tipo de inicio de la infección y la presencia o ausencia de factores de riesgo relacionados a la atención sanitaria (HRF) Se consideró que una infección es de inicio hospitalario (HO) si el cultivo positivo para *S. aureus* se obtuvo 48 horas después de la admisión en el hospital y el paciente no tenía evidencia de infección en el momento de la admisión Todos los demás casos se definieron como infección de inicio en la comunidad (CO). Las **infecciones asociadas a la comunidad** (CA) fueron definidas como casos de inicio en la comunidad de pacientes sin HRF durante el año anterior (CACO), según los criterios del CDC. Las **infecciones asociadas al hospital o a la atención sanitaria** (HA) incluyen: (i) infecciones de inicio hospitalario independientemente de la presencia de otros HRF (HAHO) e (ii) infecciones de inicio en la comunidad que ocurren en pacientes con al menos un HRF (HACO). Las cepas de MRSA fueron genéticamente tipificadas como genotipos CAMRSA y HA-MRSA (CA MRSA_G y HA-MRSA_G) por tipificación de SCC_{mec} y *spa*, PFGE, MLST y perfil de genes de virulencia por PCR. Teniendo en cuenta todos los aislamientos, el 63% fueron de infecciones de inicio en la comunidad (CO) y de ellas el 55% fueron MRSA [39% CA-MRSA_G y 16% HA-MRSA_G]. Detectó la proporción significativamente mayor de MRSA entre las infecciones de inicio en la comunidad CO vs las de inicio en el hospital HAHO (58% vs 49% respectivamente); Esta diferencia se notó principalmente en pediatría (<19 años) en (62% vs 43%). Los genotipos CA-MRSA_G

representaron el 16% de las infecciones de inicio en el hospital, el 39% de las infecciones relacionadas al hospital (por presentar al menos un HRF) pero de inicio en la comunidad (HACO) y el 60,5% de las de inicio en la comunidad sin relación con el ambiente hospitalario (CACO). Por el otro lado los genotipos HA-MRSA_G sólo causaron el 33% de las infecciones de inicio en el hospital y el 13% de las infecciones relacionadas al hospital pero inicio en la comunidad (HACO).

Con el objetivo de evaluar la evolución en el tiempo de estas cepas CA-MRSA y HA-MRSA en todo el país durante el período 2001-2011 se utilizó la base de datos nacional WHONET-ARGENTINA (49.909 aislamientos de *S aureus*) y una definición fenotípica basada en la falta de resistencia acompañante (a no más de un ATB no β -lactámicos) para diferenciar CA-MRSA de HA-MRSA. La misma fue validada con la definición genotípica a través del análisis molecular (identificó correctamente el 94% de todos los MRSA, con 94.7% de S, 92.4% de E, 96.9% de VPP y 87.8% de VPN). La proporción de CA-MRSA_P incrementó significativamente del 6.4% (147/2303) en el 2001 al 38.9% en el 2011 mientras que la de HA-MRSA_P disminuyó desde el 33.3% en el 2001 al 12.4% en el 2011 (χ^2 trend $P < 0.0001$). Todos estos resultados sugieren que los genotipos CA-MRSA_G están reemplazando a los HA-MRSA_G dentro del ámbito hospitalario con un reservorio que aumenta en la comunidad.

En cuanto a las asociaciones epidemiológicas identificadas en modelos univariados y multivariados para pacientes con infecciones por CA-MRSA_G de inicio en el hospital, CA-MRSA_G parece comportarse como HA-MRSA_G dentro de los hospitales, pero sobresalen los niños como el grupo de mayor riesgo para las infecciones por CA-MRSA_G.

La mayoría de CA-MRSA_G pertenecieron a dos clones principales: [I-ST5-IVa-t311-PVL⁺] y [N ST30-IVc-t019-PVL⁺] (45% cada uno). El primero fue responsable del 31% de todas las infecciones, del 20% de las infecciones HAHO, del 43% de las infecciones HACO y del 35% de las infecciones CACO. Por el otro lado, el segundo causó el 33% de todas las infecciones, el 4% de aquellas HAHO, el 23% de las HACO y el 60% de las CACO. Si bien estas proporciones fueron generales, se detectaron significativas diferencias por grupos etario (niños/adultos) y regiones geográficas de Argentina (Norte/Sur). Presentando valores de prevalencia en el norte: del 75% para el clon [N ST30-IVc-t019-PVL⁺] y del 20% el clon [I-ST5-IVa-t311-PVL⁺] ($P = 0,0006$) mientras que en el sur los porcentajes fueron 18% y 55% respectivamente ($P = 0,02$). Es importante destacar que un aislamiento perteneciente al clon USA300-0114- (ST8-SCC_{meclIVa}-*spat008*-PVL⁺-ACME +) fue detectado por primera vez en Argentina.

Considerando los tradicionales clones HA-MRSA_G, el principal (66%), fue el clon Cordobés/Chileno (A-ST5-I-t149) que causó el 18% de todas las infecciones, 47% de las HAHO y 13% de las HACO. Referido a la sensibilidad a los antimicrobianos de los diferentes clones de MRSA y a la posibilidad de uso del nuevo antibiótico β-lactámico anti-MRSA en el país, ceftarolina (CPT), se pudo demostrar que los aislamientos CA-MRSA_G fueron sensibles a CPT independientemente del clon implicado. Por el contrario, en HA-MRSA_G, la sensibilidad a CPT estaba fuertemente asociada al tipo clonal, siendo ST5-I (clon Cordobés/chileno) el principal clon asociado a Resistencia Intermedia. Este resultado implica su vigilancia molecular en el tiempo.

Para determinar genéticamente la relación evolutiva de los genotipos CA-MRSA_G, con clones de *S. aureus* meticilino sensibles (MSSA) detectados en nuestro país se compararon las características moleculares de los aislamientos con genotipos de CA-MRSA_G y los aislamientos de *S. aureus* sensibles a Meticilina (MSSA) detectados en nuestro país en el estudio multicéntrico. El análisis de una muestra de 132 aislamientos *S. aureus* Meticilino Sensible (MSSA) representativa del norte, centro y sur del país evidenció. Se detectó el predominio del CC5 (20%) seguido por el CC30 (16%) con una distribución inversa a la detectada para MRSA, con un predominio del clon MSSA [Is ST5-*ϕ*311-PVL⁺] en el norte mientras que en el sur prevalece el MSSA [Ns-ST30-t012-PVL-]. En el CC5, se determinó el predominio del tipo *spa* *ϕ*311 (46%) compartido con el clon CA-MRSA-I-ST5-IVa y en el CC30, existió un predominio del *ϕ*012. No se detectaron cepas MSSA Ns-ST30-t019 correspondiente a su par CA-MRSA N-ST30-IVc-t019. Sugiriendo la emergencia local del clon CA-MRSA [I-ST5-IVa-t311-PVL+] a partir de un linaje ST5 MSSA exitoso establecido en nuestra geografía y la diseminación del clon CA-MRSA [N-ST30-IVc-t019-PVL+] desde países limítrofes como Uruguay, Brasil, Bolivia y Paraguay. Además se identificaron clones CA-MRSA internacionales (ST72-IV, ST97-IV, ST8-IV) y linajes genéticos MSSA estrechamente relacionados, lo que avala la hipótesis sobre la aparición local y continua de nuevos clones CA-MRSA a partir de linajes exitosos de MSSA.

Con el objetivo investigar la relación entre el éxito epidemiológico de los clones epidémicos de MRSA y su capacidad para persistir en una superficie inerte medioambiental, se analizó la supervivencia y expresión de genes implicados en adhesión, metabolismo, y biofilm durante la persistencia en una superficie de melamina y también en el estado de biofilm. Se depositaron 100 µl de suspensiones bacterianas (10¹¹-10¹² UFC /ml de SF) de los principales representante de clones epidémicos (CA-MRSA y

HA-MRSA) sobre una superficie de melamina. Se realizó recuentos de colonias para evaluar supervivencia (24h; 10; 25 y 40 días) y además a las 24h y 10d se realizó extracción de RNA. Se analizó la expresión de los genes (*spa*, *fnbpA*, *fnbpB*, *hla*, *psmA1A2*, *IsdD*, *agrA*, *hld*) mediante qRT-PCR. Todos los clones MRSA mostraron una tendencia de supervivencia similar, disminuyendo progresivamente hacia los 40 días, sin embargo [A-ST5-I-t149] y [C-ST100-IVnv-t002] mostraron porcentajes de supervivencia mayores que el resto de los clones ($p < 0,05$). Los niveles de expresión de los genes por cada clon a los 10 días, fueron superiores a los de su condición inicial de 24h ($p < 0,001$). El nivel de transcripción de *IsdD* se incrementó alrededor de 40 y 35 veces en [A-ST5-I-t149] y [C-ST100-IVnv-t002], respectivamente. Además *hla* (determinante implicado en la formación de biofilm) también presentó niveles mayores de activación en [A-ST5-I-t149] (43 veces de cambio) comparado con el resto de los clones. Estos resultados sugieren que *IsdD* y *hla* podrían estar implicados en la persistencia en superficies inertes en el ámbito hospitalario de ambos clones epidémicos. Por último se evaluó la formación de biofilm en placa multiwell y el nivel de expresión de los genes *fnbpA*, *isdD*, *hla*, *spa*, *agrA* evidenciándose que i) el clon CA-MRSA [I1-ST5-IVa-t311] presentó una capacidad fuerte a moderada de formar biofilm con alto contenido proteico, posiblemente relacionada al tipo *spa t311* ii) el gen *hla* estaría involucrado en la capacidad diferente de formación de biofilm en cepas clínicas, iii) El regulador *agrA* podría estar involucrado con la capacidad de formar biofilm, a través de diferentes vías en los diferentes clones, entre ellas *hla* y/o *fnbpA* (clon USA300), iv) Se detectaron diferentes patrones de expresión de un mismo gen entre los diversos clones en el fenotipo de biofilm, lo que implica una gran variabilidad entre los diferentes complejos clonales en las estrategias utilizadas para sobrevivir en biofilm.

En conclusión los resultados de este trabajo de tesis contribuyen al control y la vigilancia de la infecciones causadas por *S. aureus* al reconocer: i) la elevada prevalencia de infecciones por MRSA, ii) el establecimiento de dos clones CA-MRSA en nuestra geografía [ST5-IVa-t311] y [ST30-IVc-t019] con significativas diferencia regionales entre norte y el sur del país, iii) el desplazamiento en Argentina de los clones HA-MRSA a nivel hospitalario por la diseminación del clon CA-MRSA [I-ST5-IVa-t311], iv) el comportamiento similar de estos a los clones HA-MRSA_G, en cuanto a consecuencias clínicas de transmisión en el hospital y v) la probable relación evolutiva de los clones MRSA circulantes en Argentina a partir sus concomitantes (MSSA). Por lo tanto, este estudio aporta a la literatura existente, información acerca de los factores asociados con la

diseminación de clones CA-MRSA en la comunidad además de la entrada y la transmisibilidad en los hospitales. Estas contribuciones serán útiles especialmente en los niños, para evaluar las estrategias de control y prevención de las infecciones por MRSA, tanto en la comunidad como en los hospitales. En una segunda instancia, este trabajo, aporta datos sobre las posibles características (relacionadas a la capacidad supervivencia en materiales inertes) que podrían tener los clones descritos para diseminarse y establecerse en el país tanto en el hospital como en la comunidad que ayudarán a abordar medidas para el control de la transmisión considerando las capacidades diferenciales de estos clones de MRSA.

3 ABSTRACT

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) burden is increasing worldwide in hospitals [healthcare-associated (HA)-MRSA] and in communities [community-associated (CA)-MRSA]. However, the impact of CA-MRSA within hospitals remains limited, particularly in Latin America. A countrywide representative survey of *S. aureus* infections was performed in Argentina by analyzing 591 clinical isolates from 66 hospitals in a prospective cross-sectional, multicenter study (Nov-2009). This work involved healthcare-onset infections-(HAHO, >48 hospitalization hours) and community-onset (CO) infections [including both, infections (HACO) in patients with healthcare-associated risk-factors (HRFs) and infections (CACO) in those without HRFs]. MRSA strains were genetically typed as CA-MRSA and HA-MRSA genotypes (CA-MRSA_G and HA-MRSA_G) by SCCmec- and *spa*-typing, PFGE, MLST and virulence genes profile by PCR. Considering all isolates, 63% were from CO-infections and 55% were MRSA [39% CAMRSA_G and 16% HA-MRSA_G]. A significantly higher MRSA proportion among CO- than HAHO-*S. aureus* infections was detected (58% vs 49%); mainly in children (62% vs 43%). The CA-MRSA_G/HA-MRSA_G have accounted for 16%/33% of HAHO-, 39%/13% of HACO- and 60.5%/0% of CACO-infections. In addition trends over time in MRSA were studied based on the national annual antimicrobial-susceptibility reports [WHONET-database, 2001-2011, 49.909 *S. aureus* infections] using Phenotypic-definitions. These ones were validated by genotyping of isolates from the prospective cross-sectional multicenter study. Hence, the phenotypic definitions were significantly associated with genotypic definitions ($p < 0.0001$) and it has correctly identified 94% of all MRSA isolates, with 94.7%, 92.4%, 96.9% and 87.8% of sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV), respectively. The CA-MRSA_P proportion, increased from 6.4% to 38.9% whereas HA-MRSA_P decreased from 33.3% to 12.4% ($P < 0.0001$). All these results, demonstrate that in Argentina, CA-MRSA_G appears to be replacing HA-MRSA_G strains in healthcare setting, along with an increasing reservoir in the community.

Regarding the epidemiological associations identified in multivariate models for patients with healthcare-onset CA-MRSAG infections, CA-MRSA_G behave like HA-MRSA_G within hospitals but children were the highest risk group for healthcare-onset CA-MRSA_G infections. Most CA-MRSA_G belonged to two major clones: PFGE-type N-ST30-IVc-t019-PVL+ and PFGE-type I-ST5-IVa-t311 PVL+ (45% each). The ST5-IV-PVL⁺/ST30-IV-PVL⁺

clones have caused 31%/33% of all infections, 20%/4% of HAHO-, 43%/23% of HACO- and 35%/60% of CACO- infections, with significant differences by age groups (children/adults) and geographical regions. Importantly, an isolate belonging to USA300- (ST8-SCC*meclVa-spat008*- PVL+-ACME+) was detected for the first time in Argentina. Most of HA-MRSA_G (66%) were related to the Cordobes/Chilean clone-(PFGE-type A-ST5-SCC*mecl-t149*) causing 18% of all infections (47% of HAHO and 13% of HACO-infections).

Regarding to the antimicrobial susceptibility of the different MRSA clones and the possibility of using the new anti-MRSA β -lactam antibiotic for the treatment of MRSA infections in the country, the sensitivity of these strains to ceftaroline (CPT) was investigated. The prevalence of intermediate resistance (MIC = 2ug/mL) to CPT was 6.4% for all tested *S. aureus* isolates, with MIC_{50/90} of 0.25/1 ug/ml. All MSSA and CA-MRSA clones were 100% susceptible to CPT with MIC_{50/90} of 0.25/0.25 ug/ml for MSSA and 0.5/0.5 ug/ml for CA-MRSA. CPT susceptibility was strongly associated with clonal type in HA-MRSA isolates, being ST5-I (Cordobes/Chilean) and ST239-III A (Brazilian) the main clones with intermediate susceptibility. This result implies its molecular surveillance over time

In addition, for the purpose of to describe the population structure of MSSA and to shed light on the origin of these CA-MRSA clones a total of 132 MSSA clinical isolates were analyzed by the same methodology as MRSA. Showing a reverse distribution to that detected for MRSA, with a north predominance of the MSSA [Is ST5-t311-PVL +] clone whereas MSSA [Ns-ST30-t012-PVL-] prevails in the south. *spa* types analysis showed that MRSA and MSSA isolates belonging to CC5 shared related t (t311 and t002), suggesting that these were closely related. Contrary, for MRSA (t019) and MSSA (mainly t012) isolates from ST30 no common t was found. These results suggest that: 1) CA-MRSA CC5-ST5-IV-t311-PVL(+) clone have emerged from MSSA CC5-t311-PVL(+) ancestor, already established in this country and 2) CA-MRSA CC30-ST30-IV-t019-PVL(+) clone was probably imported from neighboring countries. In addition, international CA-MRSA clones (ST72-IV, ST97-IV, ST8-IV) and closely related MSSA genetic lines were identified, supporting the hypothesis of local and continuous emergence of new CA-MRSA clones from successful MSSA lineages.

In order to investigate the relationship between the epidemiological success of epidemic MRSA clones and their capacity to persist on an environmental inert surface, the

survival and genes expression level (*spa*, *fnbpA*, *fnbpB*, *hla*, *psmA1A2*, *IsdD*, *agrA*, *hld*) during the persistence on melamine surface and biofilm form were analyzed by qRT-PCR. All MRSA clones showed a similar survival tendency, decreasing progressively towards 40 day, being higher ($P < 0,05$) in [A-ST5-I-t149] and [C-ST100-IVnv-t002] clones than the others. The genes expression levels by each clone at 10 day, were higher than those in its initial condition 24h ($p < 0,001$). *IsdD* transcription was increased about 40 and 35 fold of change in [A-ST5-I-t149] and [C-ST100-IVnv-t002] clones, respectively. These results suggest that the *isdD* could be involved in the persistence onto inert surfaces in the hospital setting of both epidemic MRSA clones.

Regarding biofilm, the multiwell plate formation and the genes level of expression of the *fnbpA*, *isdD*, *hla*, *spa*, *agrA* were evaluated and showed that: i) the clone CA-MRSA [I1-ST5-IVa-t311] had a strong-moderate ability to form biofilm with high protein content, likely related to *spa* type t311 (ii) *hla* gene would be involved in the different capacity of biofilm formation in clinical strains (iii) the *agr* regulator could be involved with the different ability to form the biofilm, a through different pathways in several clones, including *hla* and/or *fnbpA* (clone USA300), iv) Different patterns of expression of the same genes were detected among the various clones in the biofilm phenotype, which implies a great variability between the different clonal complexes and the strategies used to survive in biofilm.

Therefore, this study contributes to the existing literature, information about the factors associated with the dissemination of CA-MRSA clones in the community in addition to entry and transferability in hospitals. These contributions will be especially useful in children to evaluate strategies for the control and prevention of MRSA infections, both in the community and in hospitals. In a second instance, this work provides data on the possible characteristics (related to the survival capacity in inert materials) that the described clones could have for dissemination and establishment in the country both in the hospital and in the community that will help to address measures for control of transmission considering the differential capacities of these MRSA clones.

4 INTRODUCCIÓN

4.1 *Staphylococcus aureus*: CARACTERÍSTICAS GENERALES

En 1880, Louis Pasteur y Sir Alexander Ogston proporcionaron la primera descripción de "micrococos" aislado de forúnculos y abscesos. Mientras Pasteur suponía que eran patógenos, fue Sir Alexander Ogston quien observó que la introducción de pus en los sujetos experimentales producía abscesos similares [1, 2] y en 1883 se dio a estos microorganismos el nombre que llevan todavía hoy, en función de su apariencia bajo el microscopio: se asemejaban a racimos de uvas, así se los nombró *Staphylococcus*, del griego "*staphyle*", que significa uvas y "*Kokkos*", haciendo referencia al fruto conocido como baya [3].

Dos años más tarde, el médico alemán, Friedrich J. Rosenbach, describe 2 colonias pigmentadas de *Stafilococcus* y propuso la nomenclatura *Staphylococcus albus* (en latín significa "blanco") y *Staphylococcus aureus* (del latín aurum "oro") [4].

Staphylococcus aureus pertenece al género *Staphylococcus* de la Familia *Staphylococcaceae*, orden *Bacillales* de la clase *Bacilli* [5]. Son organismos Gram-positivos, esféricos con diámetro de 0,7-1,2 μm que se dividen secuencialmente en tres planos ortogonales sobre tres ciclos de división consecutivos lo que genera disposiciones en tétradas o agrupaciones en racimos [1, 2]. Son inmóviles, no esporulados, algunas cepas son capaces de desarrollar capsula de naturaleza polisacáridica, son anaerobios facultativos, mesófilos con un desarrollo óptimo en 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 puede 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 producción de osmoprotectores [6, 7]. Las infecciones causadas por *S. aureus* presentan diferentes severidades. Las mismas implican desde aquellas relativamente leves, tales como infecciones de piel y tejidos blandos, a infecciones más severas e invasivas como neumonías necrotizantes, infecciones de sitio quirúrgico o infecciones del torrente sanguíneo, pudiendo complicarse con endocarditis o shock séptico, llegando a comprometer la vida del individuo [8-14]

La plasticidad de *S. aureus* para generar esta variedad de escenarios clínicos es debido a una serie de características de este patógeno: i) la presencia de un arsenal de factores de virulencia, pluralidad y alta frecuencia de transmisión horizontal de los mismos, ii) la capacidad de persistir tanto en individuos sanos sin producir infección

(colonización) como en materiales inertes (particularmente en estado de Biofilm), iii) la capacidad de transmitirse de un individuo a otro o al medioambiente causando su diseminación hospitalares, en la comunidad, en región geográficas e incluso entre continentes y la capacidad de adquirir resistencia a los diferentes antimicrobianos a medida que los mismos fueron introducidos en la práctica clínica. Todas estas características están sustentadas en la dinámica del genoma de *S. aureus* [15-22].

4.2 BASES GENÉTICAS.

Staphylococcus aureus posee un único cromosoma circular de aproximadamente 2.8 millones de pb. Cerca del 75 % de los genes son compartidos por más del 95% de las cepas de *S.aureus* y se considera que conforman el genoma central (core genoma) donde están codificados genes altamente conservados de la especie. El 10%, aproximadamente, corresponden al denominado core variable (basal-variable, CV) [15, 23, 24]. Los mismos están altamente conservados dentro de cada complejo clonal (CC) o linajes de *S.aureus*, son codificados en el cromosoma bacteriano y por lo tanto son estables y transferibles verticalmente a las células hijas. Incluyen a la mayoría de los genes de determinantes de superficie como las proteínas de adhesión MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules), proteínas de evasión inmune y genes implicados en regulación. Los aislamientos de diferentes linajes poseen cientos de genes que varían entre ellos y estas diferencias en el CV implican pequeñas regiones variantes dentro de un gen o la presencia o ausencia de genes incluyendo pequeñas Islas Genómicas (GI). La mayoría de las variantes de los genes del CV no son restringidas a un solo linaje. Ejemplo de ello es el tipo de cápsula 5 que está presente en los linajes (CCs): 5, 8, 22 y 25, mientras que el tipo 8 está presente en CC1, 12, 15, 30, 45 y 51. Otro ejemplo son los tipos *agr*, así el *agr* tipo I es encontrado en CC 8, 22, 25, 45 *agr* tipo II en CC 5, 12, 15 y *agr* tipo III en CC1 y 30 [25, 26]. Esta distribución se ajusta a un modelo de ancestro común con un core genoma conservado que desarrolló múltiples CV con variantes de genes que se recombinaron repetidamente logrando los linajes progenitores y aquellos con la combinación de genes exitosos fueron seleccionados, replicados y diseminados [22, 25, 27].

La secuenciación y comparación de algunos genes del core variable, se está utilizando para la tipificación bacteriana. Uno de estos métodos es el *Multilocus Sequence Typing* (MLST), que clasifica las cepas en complejos clonales y de esta manera, se puede conocer su evolución y la epidemiología a nivel mundial

El 15% restante del genoma corresponde a una colección de elementos genéticos móviles (MGE), que se transfieren horizontalmente entre cepas, lo que implica mayor plasticidad para el genoma con capacidad de adaptación a diversos ambientes [22, 28, 29]. Los MGE son un grupo heterogéneo que incluyen plásmidos (PI), bacteriófagos (ϕ), transposones (Tn), islas de patogenicidad (PI), genómicas (GI) y de resistencia (*Staphylococcal* Csette Cromosomal: SCC) [15, 26, 28]. Estos elementos se insertan en lugares específicos de sitio a lo largo del genoma y son portadores de los genes codificantes para la mayoría de los factores de virulencia (Ej: toxinas como la Pantone-Valentine Leukocidin, enterotoxinas A, B y C, toxina del Síndrome del Shock tóxico) y genes de resistencia a metales pesados y antimicrobianos de *S. aureus*. La portación o no de diferentes MGEs está asociada a la variabilidad entre cepas del mismo linaje y de este modo en la virulencia de las mismas. Por lo tanto los MGEs son claves para la evolución de clones que se adaptan a nuevos nichos y causan serios problemas clínicos y económicos [15, 25, 28]

Los principales elementos móviles del genoma son:

4.2.1 TRANSPOSONES (Tn)

Los *Tn* son segmentos de DNA que pueden moverse autónomamente a diferentes partes del genoma. Esto se debe a que los mismos portan genes que codifican para transposasas que permiten la escisión y/o replicación e integración del elemento en el cromosoma bacteriano o en otros MEG como plásmidos o SCC para ser subsecuentemente transferido [28, 30].

En *S aureus*, los *Tn* generalmente codifican resistencia a los antibióticos. Los más pequeños están generalmente presentes en múltiples copias en el genoma (insertados en el cromosoma o en un MEG (SCC y PI). Entre ellos puede citarse el *Tn554* que lleva genes de resistencia a MLS_B (macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B) y a espectinomina a menudo asociados con los tipos de SCC_{mec} II y III; y el *Tn552*

portando el gen *bla* que le confiere resistencia a penicilina a través de una penicilinasas codificada por este gen [31].

Los *Tn* más grandes (> 18 kpb) están presentes en una sola copia y codifican resistencia a antibióticos como tetraciclina, trimetoprima, aminoglucósidos y vancomicina [32]. Son ejemplos de estos, el *Tn6009* que codifica resistencia a tetraciclinas [33], el *Tn4003* que otorga resistencia a trimetoprima [34] y el *Tn4001* que otorga resistencia a gentamicina, kanamicina y tobramicina [35].

Si bien es poco común, la resistencia a vancomicina es un potencial e importante problema de salud pública y médica, ya que sigue siendo un poderoso antibiótico en el tratamiento de las infecciones por MRSA. Los genes *vanA*, *vanH*, *vanX*, y *VanY* que confieren alto nivel de resistencia a vancomicina, son codificados por el *Tn1546* proveniente de *Enterococcus faecalis* [36]. Estudios moleculares sugieren que esto es posible gracias a la transferencia horizontal del *Tn1546*, vehiculizado por un plásmido, desde *Enterococcus faecalis* [28, 36, 37]. Además esta situación se puede dar, probablemente, en una infección mixta y simultánea por ambos microorganismos [38].

4.2.2 SECUENCIAS DE INSERCIÓN (IS)

Las secuencias de inserción son segmentos de DNA, generalmente de 700 a 2500 pb, que pueden moverse dentro del mismo cromosoma o a otro cromosoma diferente, aunque en general son encontradas formando parte de *Tn* compuestos [35]. Las mismas codifican para una transposasa flanqueada por repeticiones invertidas (IR). Las IS juegan un papel importante en la evolución del genoma por estar implicadas en deleciones, inversiones o reorganizaciones del genoma bacteriano, provocando cambios en la expresión de genes adyacentes pudiendo inactivar o activar a los mismos [39]. La inactivación de los genes puede ser efecto de la inserción directa o por tener un efecto polar sobre la transcripción de los genes cercanos. La activación dentro de la vecindad de una IS es, por lo general, mediada por promotores llevados por elementos de la IS o mediante la formación de un promotor híbrido con el promotor nativo de genes particulares [28]. 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*).

Las IS son abundantes y afectan a la plasticidad genómica y el potencial patogénico de *S. aureus* [40, 41].

4.2.3 PLÁSMIDOS (PL)

Los plásmidos son moléculas de DNA circular autorreplicativas. En *S. aureus* es común encontrar uno o más de estos elementos en aislamientos clínicos [28].

Estas moléculas presentan diferentes tamaños (desde pocas Kb hasta cientos de ellas) y también diferentes contenidos genético albergando genes de resistencia o virulencia que pueden favorecer a la bacteria selectiva y evolutivamente.

En general los plásmidos pueden ser clasificados en tres clases principales de acuerdo al tamaño y al mecanismo de replicación: **Plásmidos tipo I:** son plásmidos multicopia, tienen un tamaño menor de 5 kb, no es común encontrar en ellos elementos transponibles, en general son crípticos (no se ha podido demostrar que determinen ningún rasgo fenotípico) o portan un único gen de resistencia. **Plásmidos tipo II:** con un tamaño de 15 a 30 kb, se encuentran en bajo número de copias (4-5/cel) pueden codificar varios genes de resistencia y frecuentemente se asocian con elementos transponibles. **Plásmidos tipo III:** presentan un tamaño mayor de 30 kb y bajo número de copias por célula [25]. Son los principales plásmidos multiresistentes descritos en *S. aureus*, y son capaces de codificar proteínas para su propia transferencia conjugativa (portando genes *tra*). En ellos son transportados diferentes determinantes de resistencia, como por Ej. R a aminogucósidos en el *Tn4001*, o resistencia a trimetroprima en el *Tn4003*. También pueden llevar determinantes de resistencia a amino cuaternario y en algunos casos resistencia a β - lactámicos [42, 43].

Además, los Plásmidos Staphylococcicos son divididos en 15 grupos de histocompatibilidad de acuerdo a la clasificación histórica de plásmidos que considera la incompatibilidad mutua, es decir dos Plásmidos con las mismas proteínas de replicación (Rep) no pueden mantenerse en forma estable dentro de la misma célula [44]. Recientemente este sistema de clasificación se desarrolló de acuerdo a las secuencias de los genes *rep*, por lo cual se describieron 24 familias *rep* [45]. La variedad de plásmidos descritos hasta el momento en *S aureus* avalan su importante papel en la evolución y en la adaptación a diferentes condiciones ambientales y de desarrollo.

4.2.4 **BACTERIÓFAGOS (virus bacterianos)**

En las cepas de *S. aureus* los bacteriófagos están ampliamente diseminados (todas las cepas presentan al menos uno y 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 [25].

La mayoría de los bacteriófagos codifican importantes factores de virulencia entre los que destacan proteínas inhibidoras del sistema inmune de huésped como la estafiloquinasa “SAK”, o la proteína “CHIP” inhibidora de quimiotaxis [25, 46]. Otros factores codificados son también las enterotoxinas A (SEA), Q (SEQ), K (SEK) y la Leucocidina de Pantón-Valentine (PVL) [47, 48].

Los bacteriófagos también pueden verse implicados en la expresión de los FV por conversión lisogénica positiva o negativa. Después de la conversión lisogénica positiva (insertados en el genoma bacteriano), la bacteria expresa FV codificados en el profago, otorgándole FV que no disponía con anterioridad. Y contrariamente, la conversión lisogénica negativa ocurre cuando hay una inactivación insercional de genes por la integración del DNA del fago dentro del cromosoma bacteriano. Un ejemplo es el caso del gen *hly* que codifica para la β hemolisina, que después de la integración del fago la cepa se convierte en *hly* (-) de manera que la misma es ahora incapaz de producir la hemólisis β [46].

Estos elementos genéticos móviles también están implicados con alta frecuencia en la movilización de islas cromosómicas que transportan factores de virulencia entre cepas. Un ejemplo de ello es el fago 80 α que es capaz de escindir y transferir la islas de patogenicidad estafilocócica 1 (SaPI1) a otros staphylococcus [49-51].

4.2.5 ISLAS DE PATOGENICIDAD DE *S. aureus* (SaPI)

Las Islas de Patogenicidad (PI) y las Islas genómicas (GI) son estructuras continuas cuyo tamaño oscila entre aproximadamente 15 y 70 kb y que pueden ser portadoras de muchos genes de virulencia o resistencia a antimicrobianos. Las islas de patogenicidad estafilocócicas (SaPIs) son los miembros prototípicos de una familia generalizada de elementos genéticos móviles de origen cromosómico que contribuyen sustancialmente a la transferencia génica intra e interespecífica, la adaptación al hospedador y la virulencia [22, 49].

Son regiones del genoma bacteriano transferidas horizontalmente con la ayuda de bacteriófagos. Una característica común de estos elementos es que están rodeados de repeticiones directas o invertidas que actúan como anclaje para la integración en regiones homólogas del cromosoma bacteriano además de portar genes de recombinasas que cataliza la integración en el cromosoma en uno de 6 sitios específicos diferentes (*att_s*). Contienen principalmente DNA heterólogo, lo que indica su origen exógeno [49, 50]. Curiosamente, las cepas tienden a llevar no más de una copia de cada tipo SaPI.

Estas islas se transfieren de unas bacterias a otras, utilizando bacteriófagos, es decir explotan el ciclo de vida de sus fagos auxiliares para su propio beneficio. Uno de los factores clave que desencadena su movilidad es la inducción por ciertos bacteriófagos de su escisión, replicación y encapsidación. Es decir las SaPI están íntimamente relacionadas con ciertos fagos auxiliares cuyos ciclos de vida parasitan para permitir su propagación. Los SaPIs existen de forma quiescente en sitios cromosómicos específicos bajo el control de un represor maestro. Una conexión entre el fago auxiliar y el ciclo de vida de la SaPI es inducida por proteínas antirrepresoras codificadas en el fago auxiliar. Estas proteínas inhiben la represión, poniendo en marcha el ciclo de vida de SaPI: escisión, replicación y encapsidación de DNA de SaPI en partículas de fago infecciosas. El ciclo de vida de SaPI se inicia sólo cuando el ciclo de vida de un fago auxiliar está en curso; sin embargo la producción de partículas SaPI, no es capaz de mantenerse al nivel de la tasa de maduración del fago auxiliar y, tal vez para obtener una ventaja, las SaPI interfieren con diferentes estrategias en la reproducción de sus fagos auxiliares. Estos mecanismos difieren de la resistencia habitual a los fagos y se elaboran cuidadosamente para garantizar la producción de partículas de fago maduras, la mayoría de las cuales

contienen SaPI en lugar de DNA del fago, garantizando la propagación de las SaPIs [52-54].

Las SaIP son la única fuente que codifican para la toxina *tst-1* del síndrome del shock tóxico y otros genes de superantígenos como *sec* y *seb*, implicados en el mismo síndrome o también pueden llevar genes codificantes de otras enterotoxinas. Además han sido reportados en estas islas genes de resistencia como por ejemplo a ácido fusídico. La mayoría de las cepas de *S. aureus* portan al menos una SaIP [52].

4.2.6 SLAS GENÓMICAS (GI)

Todos los genomas de *S. aureus* secuenciados contienen grupos de tres islas genómicas (GI) que, en contraste con la SaPIs, no parecen ser móvil y se integran de manera estable en la misma posición en todos los genomas de *S. aureus*. Cada tipo de isla genómica es polimórfica en el contenido de genes pero conservada dentro de los linajes de cepa [29, 51]. Estas tres islas, vSa α , vSa β , y vSa γ , presentan una gran diversidad entre las cepas, llevando cada una, familias variables de lipoproteínas, exotoxinas, proteasas y grupos de genes de enterotoxinas (enterotoxin gene cluster: *egc*), compuesto por genes para las Enterotoxinas de Staphylococcus (SE) SEG, SEI, SEM, SEN, y SEO [55]. Este cluster *egc* es albergado por la isla vSa β . El mismo está relacionado a determinados linajes, así se encuentra presente en todas las cepas del CC5, CC22 y CC45 y CC25 y por otro lado, ausentes en los CC1, CC8, CC15 y CC395 [26].

Otros elementos importantes hospedados en la GI, vSa γ , son las modulinas solubles en fenol de tipo β (PSM β 1 y PSM β 2), que junto con las PSMs de tipo α (PSM α 1, PSM α 2, PSM α 3, PSM α 4) forman una familia de péptidos secretados que funcionan para disminuir la respuesta de neutrófilos, eliminando de este modo la defensa celular primaria frente a *S. aureus*. Además contribuyen a la formación de Biofilm y a la diseminación del mismo [56].

Las islas genómicas no son tan competentes como otros MGE, debido a la falta de elementos genéticos típicos necesarios para la movilización como las integrasas, las excisionasas, las terminasas y las secuencias repetidas asociadas.

Desde hace mucho tiempo se ha reconocido que los bacteriófagos contribuyen a la transferencia horizontal de los MGE por transducción generalizada y especializada, pero recientemente se pudo demostrar la transferencia de islas genómicas por un fago templado. Así el papel principal del fago templado en la transferencia de *vSa* y *vSa*y es empaquetar el DNA y transferirlo a través de la transducción de las partículas de fago. Además se demostró que el “background” genético (linaje) de las cepas huésped y la receptora afectan la capacidad y la eficiencia de la transferencia de MGEs mediada por bacteriófagos, lo que sugiere la presencia de mecanismos específicos de escisión de MGE (en la cepa donante) y de integración (en la cepa receptor) en combinación con funciones de los bacteriófagos.[29]

4.2.7 CASSETTE CROMOSOMAL (SCC)

El cassette cromosomal de *Staphylococcus aureus* (SCC) es un elemento genético móvil multifuncional caracterizado por un set de genes de recombinasas sitio específicos llamadas *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*. Estas recombinasas median la movilización de todo el elemento [16]. Aunque el mecanismo específico por el cual estos SCC son intercambiados entre diferentes cepas todavía no está aclarado, hay indicios de que podría ser por transducción, específicamente los tipos más pequeños (IV o V) [57]

Al igual que otros MGEs en *S. aureus*, SCC ha evolucionado para transportar múltiples genes implicados en la virulencia y la resistencia a los antimicrobianos.

El principal cassette cromosómico descrito es el que se encuentra asociado al gen *mec*, constituyendo el SCC_{*mec*} que codifica para la resistencia a β -lactámicos. El SCC_{*mec*} está compuesto por i) el complejo de genes *mec* y sus genes reguladores, ii) el complejo de genes de recombinasas y iii) las regiones llamadas “J” (junkyard), que se disponen a cada uno de los costados de los complejos anteriores. Estas regiones 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 [16].

El complejo de genes *ccr* está compuesto de los genes *ccr* y marcos de lectura abierta (ORFs: open reading frame), varios de los cuales presentan función desconocida. Se han descrito tres genes de recombinasas filogenéticamente diferentes: *ccrA*, *ccrB* y *ccrC* [58].

En general el complejo de genes *mec* está compuesto por el gen *mecA*, sus genes reguladores y (IS) asociadas. Este complejo puede ser dividido en las siguientes clases: 1) complejo de genes *mec* Clase A, contiene el *mecA* y los genes reguladores *mecR1* y *mecI* completos, dispuesto río arriba del *mecA*, regiones hipervariables (HVR) y la IS431 río abajo del *mecA*. 2) complejo de genes *mec* Clase B también contiene el *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) complejo de genes *mec* Clase C1 contiene al *mecA*, el regulador *mecR1* se encuentra truncado pero aquí es por la inserción de una IS431 río arriba del *mecA* 4) complejo de genes *mec* Clase C2 de igual modo que la clase anterior las HVR y la IS431 dispuestas río abajo del *mecA* y 5) Complejo *mec* Clase E, presenta la estructura: *blaZ-mecALGA251- mecR1-mecI* [58, 59].

Pueden existir variantes dentro de las clases de complejo de genes *mec* por ejemplo la inserción del *Tn4001* río arriba del *mecA* en el complejo de genes *mec* Clase B.

Actualmente se encuentran descritos 11 tipos de SCC*mec* diferentes, el último de ellos es el SCC*mec XI* el mismo presenta un gen de resistencia a meticilina divergente del *mecA*, designado como *mecC* (69% de identidad con *mecA* a nivel de DNA) que codifica para una pBP2a con 63% de identidad a nivel de aminoácidos. Este fenómeno representó un problema en los laboratorios que basan el diagnóstico de resistencia a meticilina sólo con la detección del gen *mecA* (por PCR) o de la PBP2a (por aglutinación en latex). El problema se suscitó en los casos de pacientes con una infección por MRSA con el *mecC* que se podría identificar como MSSA, lo que podría generar consecuencias graves en el tratamiento de los pacientes individuales y también consecuencias en la vigilancia de MRSA [59, 60].

La complejidad en la descripción de las variantes de SCC*mec* ha dado lugar a la conformación de un grupo llamado *International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC) Elements (IWG-SCC)*, encargado de

regular la nomenclatura de estas variantes. Su página web es: http://www.sccmec.org/Pages/SCC_HomeEN.html

Asociados a este elemento genético se pueden insertar otros fragmentos de DNA, corriente abajo del marco de lectura abierto (*orfX*), dando lugar al sector denominado *oriC* [16]. Esta región es extremadamente variable, en cuanto a longitud, genes que contiene (ya sean completos o pseudo genes). Pueden incluir genes que intervienen en rutas metabólicas como los que codifican para ACME (Arginine Catabolic Mobile Element), genes de resistencia a otros grupos de antibióticos, a desinfectantes, etc [61].

A través de una PCR multiplex se amplifican el gen *mecA* y regiones específicas de dos locus por cada tipo (seis en total), uno localizado “upstream” y el otro “downstream” del gen *mecA*, uno de estos locus es específico del tipo de *SCCmec*, de esta manera se puede diferenciar con muy buena resolución los distintos tipos *SCCmec* a excepción de los tipos IV y V [62]. Para diferenciar estos tipos y los restantes se realiza PCR convencional amplificando regiones específicas para identificar tipo de complejo *mec* y *ccr* para confirmar los diferentes tipos de *SCCmec* y luego se caracteriza el locus de las regiones J para determinar los subtipos [63, 64].

4.2.7.1

Tipos de SCCmec

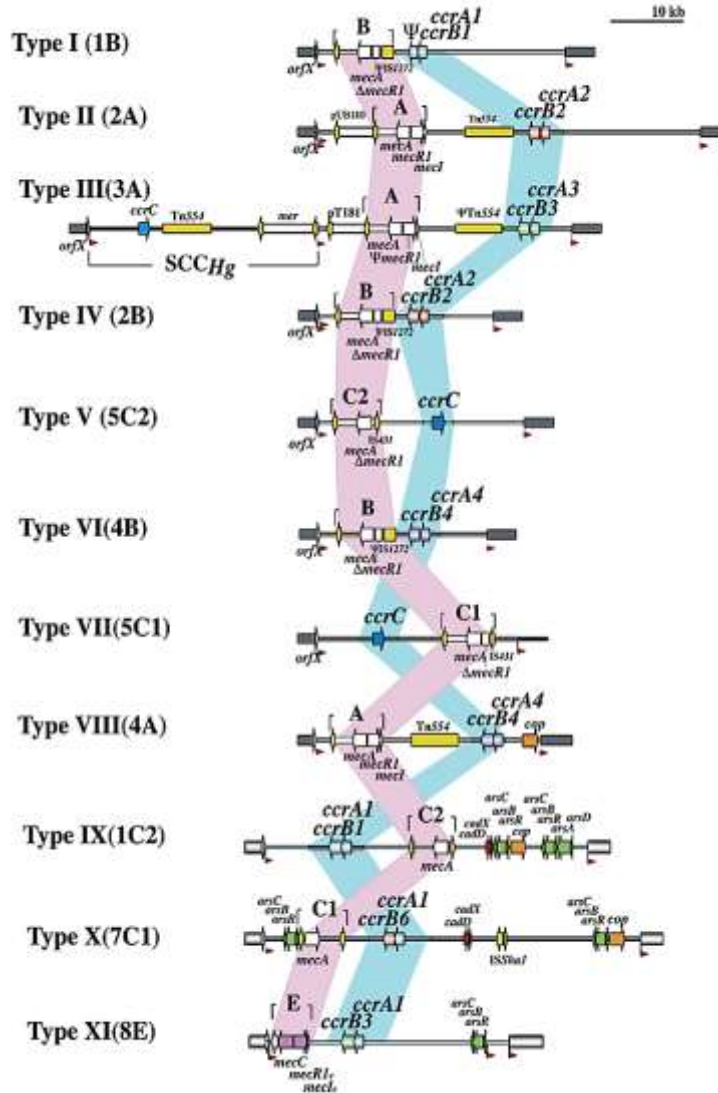


Figura1: Se ilustran las estructuras de 11 tipos diferentes de SCCmec fundamentados en secuencias nucleotídicas las cepas: NCTC10442 (SCCmec I); N315 (II), 85/2082 (III); CA05 (IV); WIS (V), HDE288 (VI); JCSC6082 (VII); C10682 (VIII); JCSC6943 (IX); JCSC6945 (X) y LGA251 (XI) consignadas en las bases de datos DDBJ, EMBL yGenBank. El SCCmec está limitado por Repeticiones Directas (RD) que flanquean secuencias sitio de integración (ISS) las cuales son reconocidas por Recombinasas del Cassete Cromosomal (CCR). La localización de cinco clases (A - E) de complejos genes *mec* se indica mediante una franja rosa. Las ubicaciones de los complejos de genes *ccr* están indicadas por una franja celeste. Las secuencias de inserción y los transposones se indican en amarillo. También se indican los genes representativos relacionados con la resistencia a los metales pesados y los plásmidos integrados situados en las regiones J. *Figura tomada de Hiramatsu, K. et al Genomic Basis for Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus, Infect Chemother 2013 (40).*

4.3 COLONIZACIÓN y TRANSMISIÓN

La mucosa nasal es el principal sitio de colonización por *S.aureus* en los seres humanos. Sin embargo también existen en sitios de extranasales como piel, perineo, ingle, axilas, tracto gastrointestinal y garganta [65].

La colonización puede ser categorizada como portador persistente, portador intermitente o no portador. Aproximadamente el 30%-40% de la población se encuentra colonizada en forma permanente, un 60% son portadores intermitentes, mientras que el 20% restante no está colonizado [66, 67]. Los portadores persistentes tienen más posibilidad de ser colonizados en múltiples lugares, de transmitir la bacteria a otros y, eventualmente, de infectarse [68-70]. La colonización aumenta significativamente el riesgo de infecciones, se ha descrito que la posibilidad de desarrollar infecciones estafilocócicas 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 [68, 71].

El sitio nasal es a menudo la fuente de inoculación de otros sitios a través de transferencia manual, y cuanto mayor es la carga bacteriana en las fosas nasales, mayor es la probabilidad de que otros sitios del cuerpo estén colonizados y que la colonización sea persistente [69].

La transmisión del microorganismo ha sido descrita, principalmente, a través de la contaminación y/o colonización de las manos del personal de salud como resultado del contacto directo de piel a piel, o el contacto con fómites recientemente contaminados y posterior traspaso a pacientes y entre pacientes [72-74].

Además se ha reportado el aislamiento de MRSA en diferentes superficies de instrumentales del ámbito hospitalario como es el caso de teclados de computadoras usadas solamente por médicos [73] o la contaminación de guantes utilizados por enfermeras sin contacto directo con el paciente, pero que habían estado en contacto con las superficies de la habitación de un paciente infectado por MRSA [73]. También se ha reportado en la literatura la contaminación de la ropa del personal de la salud, y de los instrumentos tales como termómetros, esfigomanómetros, fonendoscopios y otoscopios que actúan como fómites para la transmisión del patógeno, mediante el contacto directo del paciente con el instrumento o indirectamente a través de las manos del personal de la

salud. Por otra parte, aparatos electrónicos como teléfonos móviles, pueden contaminarse fácilmente con MRSA y también podrían tener un impacto en la transmisión cruzada [74, 75].

Es importante acentuar que MRSA puede permanecer en diversas superficies durante semanas e incluso meses, lo cual aumentaría el riesgo de transmisión [75, 76] actuando el instrumental y el espacio físico utilizado por pacientes infectados por MRSA como reservorio.

Además, del ambiente hospitalario, también han sido estudiados sitios de contacto habitual en el hogar, donde la contaminación de juguetes, controles remotos de televisión u objetos similares como teléfonos, perillas de puertas, almohadas y ropa de cama, toallas de mano y grifos podrían tener un papel importante en la transmisión en los hogares [77].

4.4 FACTORES DE VIRULENCIA Y PATOGENICIDAD

El éxito de *S. aureus* como patógeno y su capacidad de causar una amplia gama de infecciones se debe en gran medida a sus factores de virulencia y a la plasticidad de estos (un factor de virulencia puede tener varias funciones en la patogénesis y múltiples factores de virulencia puede realizar la misma función). Entre ellos se encuentran proteínas de superficie que median la adherencia bacteriana a los tejidos del huésped, la secreción de una serie de toxinas extracelulares, y enzimas que destruyen las células huésped y tejidos, para evitar o incapacitar, la respuesta inmune de éste, y permitiendo el crecimiento y la propagación del microorganismo en el mismo [78, 79].

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

Los factores de virulencia, no sólo están implicados en la patogénesis de *S aureus*, sino también aportan a la caracterización molecular de un clon (epidemiología molecular). 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 elementos genéticos móviles (donde se encuentran contenidos la mayoría de los FV). Esta

diferenciación entre aislamientos, el estudio de la diversidad genética lograda y su relación con el linajes ayudan a identificar clones dominantes y su comportamiento evolutivo, en un área determinada. Además es posible asociarlos con características patogénicas de hábitat y de diseminación. El conocimiento de estas características permite llevar a cabo estrategias de vigilancia para limitar la diseminación del mismo.

También es destacable la utilidad de estos FV como marcadores diagnósticos y blancos terapéuticos [25].

Algunos autores dividen estos factores según su actividad biológica, en tres categorías funcionales [80]: a) factores que median la adhesión de la bacteria a la célula hospedadora b) factores que promueven el daño y la diseminación tisular y c) factores que protegen a la bacteria del sistema inmune del hospedador.

Sin embargo clásicamente han sido divididos en dos grandes grupos: i) componentes superficiales y ii) toxinas y enzimas extracelulares. En esta tesis se utiliza esta última división

:

COMPONENTES SUPERFICIALES

- Polisacárido capsular
- Polisacárido extracelular
- Proteínas superficiales
 - Proteínas de unión a colágeno (Cna)
 - Proteínas de unión a fibronectina (FnBPA y FnBPB)
 - Proteínas de unión a fibrinógeno (ClfA y ClfB)
 - Proteína A (*spa*)
 - Determinantes de superficie que regulan hierro

TOXINAS Y ENZIMAS EXTRACELULARES

Toxinas con actividad sobre membrana

Toxinas o hemolisinas α , β , γ , δ

Leucocidina PVL

Toxinas con actividad de superantígenos

Enterotoxinas (A-E y G-J)

Toxina del síndrome del choque tóxico 1 (TSST-1)

Toxinas epidermolíticas o exfoliativas (A y B)

Enzimas extracelulares

Estafiloquinasa

Coagulasa

Hialuronidasa

Lipasas

Proteasas

ADNasa

OTROS FACTORES DE VIRULENCIA

ACME

PSM

4.4.1 COMPONENTES DE SUPERFICIE CELULAR

4.4.1.1 POLISACÁRIDO CAPSULAR (PC)

La cápsula o glicocalix está constituida por exopolisacáridos secretados en la superficie bacteriana y que se disponen alrededor de la célula [81, 82]. Once serotipos de polisacárido capsular (PC) (tipos 1 al 11) han sido descritos, de los cuales el PC5 y el PC8 son los más frecuentemente asociados a infecciones en seres humanos [8, 83, 84].

Diferentes autores describen la contribución del PC a la virulencia de *S. aureus* en cuadros clínicos de bacteriemia, absceso renal, absceso subcutáneo y artritis séptica, estudiado en diversos modelos animales [85, 86]. El PC interfiere en la opsonización y la fagocitosis; provoca el enmascaramiento de C3b depositado sobre la superficie bacteriana y por lo tanto limita el reconocimiento por los receptores de C3b en la célula fagocítica inhibiendo la acción fagocítica de los neutrófilos [87, 88].

4.4.1.2 POLISACÁRIDO EXTRACELULAR (BIOFILM)

Algunas cepas de *S. aureus* producen una matriz de polisacáridos extracelular conocidas como biofilm o biopelícula. El mismo es definido como una comunidad sétil 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, DNA extracelular (DNAe) y un exopolímero autoproducido, cuya maquinaria de síntesis es codificada por un operón llamado *ica*. El cual, si bien está presente en la mayoría de los aislamientos, su expresión varía entre cepas y según las condiciones de crecimiento [89]. Sin embargo se ha observado que deleciones en este operón no impiden que la bacteria desarrolle biofilm, lo que resalta la existencia de una vía independiente de *ica* [90-92]. En este mecanismo alternativo intervienen las proteínas de adhesión llamadas MSCRAMMs ("*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*") [89, 91, 93]. Cabe destacar, que la característica de formar biofilm dependiente de proteínas parece ser frecuente entre aislamientos de MRSA, lo que enfatiza la importancia de este tipo de estructura de biofilm [90-94].

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 [95]. También podría estar implicado en la colonización y diseminación de MRSA [96].

4.4.1.3 PROTEÍNAS DE LA SUPERFICIE CELULAR

La adherencia es un paso esencial requerido para la colonización de tejidos del huésped. *Staphylococcus aureus* puede expresar una variedad de proteína de superficie en su mayoría unidas covalentemente al peptidoglicano conocidas como MSCRAMMs (del inglés: componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de matriz) que intercatúan con ligandos extracelulares de la célula huésped [97]. Entre las MSCRAMMs más relevantes en la patogenia se destacan las siguientes:

- PROTEÍNA DE UNIÓN A LA FIBRONECTINA (FnBP, “fibronecting binding protein”)

Esta proteína muestra al menos tres especificidades de fijación: a fibronectina, a fibrinógeno y a elastina. Las FnBPs permiten tanto el enlace entre *S. aureus* como también la unión a la integrinas del huésped [92]. Las mismas han sido descritas en la adhesión e invasión al endotelio en endocarditis, en mastitis y en la adhesión e infección de materiales protésicos promoviendo la formación de biofilm [14].

- -PROTEÍNA DE UNIÓN AL COLÁGENO (Cna, “collagen binding protein”)

Proteína responsable de la adhesión de la bacteria al colágeno de la matriz extracelular. Fue descrita en osteomielitis y artritis experimental [98]. También es capaz

de unirse a la proteína C1q de la vía clásica del complemento previniendo su activación, lo cual sería una estrategia potencial de evasión inmune [99].

- FACTOR DE AGLUTINACIÓN (Clf, “clumping factor”)

Los factores de aglutinación A y B se unen al fibrinógeno del hospedador y promueven la agregación de plaquetas [82]. Los genes *clfA* y *clfB* no son contiguos en el cromosoma de *S. aureus* y parecen ser altamente conservadas entre las diferentes cepas. Aunque ambos factores difieren con respecto a la naturaleza de su interacción con fibrinógeno presentan efectos biológicos similares [100]. Por ejemplo, tanto ClfA y ClfB promueven la agregación de plaquetas, lo cual contribuye al desarrollo de endocarditis infecciosa. Además ClfA y en menor medida ClfB demostraron que promueven la virulencia en un modelo de endocarditis experimental [101]. ClfA también desempeña un papel en la patogénesis de la sepsis y la artritis séptica [102]. Se sugirió que este efecto es una función de su capacidad para unirse al fibrinógeno soluble y por lo tanto limitar la deposición de opsoninas. ClfB ayuda a la colonización de las narinas anteriores debido a su capacidad para unirse a citoqueratina 10 [82]. Además parece dar una ayuda adicional a la adhesión bacterias-anfitrión por unión a citoqueratina 8 [103].

4.4.1.4 DETERMINANTES DE SUPERFCIE QUE REGULAN HIERRO (*Isd*)

Las proteínas del sistema transportador de hemo *Isd* (Iron-regulated surface determinant): *IsdA*, *IsdB*, *IsdC*, *IsdH* se encuentran covalentemente unidas a la pared mientras que *Isd EFD* (*IsdE*, *IsdF*, *IsdD*) son parte de un transportador ABC (**A**TP-**B**inding-**C**assette) dispuesto en la membrana de la célula bacteriana. El rol de *IsdD* no ha sido determinado concluyentemente y sin embargo es destacable que la misma está ausente en el genoma de otros patógenos Gram positivos [104]. El sistema se encarga de unir hemoglobina, extraer y transportar grupos hemo desde el plasma del huésped para ser incorporado (atravesando la pared y la membrana bacteriana) hacia el citoplasma de *Staphylococcus aureus* donde el hierro es liberado gracias a la acción de dos enzimas citoplasmáticas *IsdG* e *IsdI* [105].

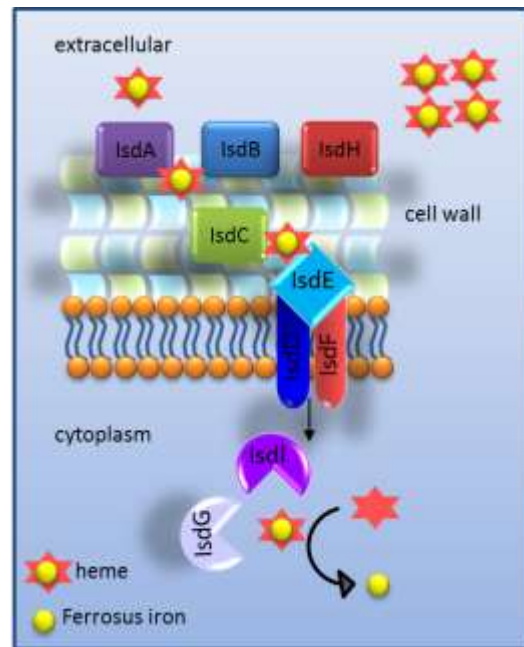


Figura 2. Representación esquemática de los componentes del sistema de transporte de hemo: *Isd*. El transporte de hemo y la liberación de hierro se logran mediante la coordinación de nueve proteínas *Isd*. *IsdA*, *IsdB*, *IsdC* e *IsdH* están anclados covalentemente a la pared celular. *IsdE* e *IsdF* son la proteína de unión y los componentes de permeasa de un transportador ABC, respectivamente. *IsdD* es una proteína de membrana de función desconocida. *IsdG* e *IsdI* son enzimas que degradan el hemo citoplásmico.

Figura tomada de Caza M, y Kronstad J. W *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2013

4.4.1.5 PROTEÍNA A (*spa* “Staphylococcus protein A”)

La proteína A es una proteína de 42 kDa, presente en la superficie de todas las cepas de *S. aureus*, está unida covalentemente a la pared celular por medio de su extremo carboxi-terminal (Figura 3). En su extremo amino-terminal, presenta cinco dominios conservados (E, D, A, B, C) que son los responsables de la unión a las inmunoglobulinas G y M. A continuación e inmediatamente antes del sitio de anclaje a la pared celular, la proteína A, posee una región llamada “X” que consiste en un número variable de secuencias repetidas cortas de 24 pb (short sequence repeat, SSR). Dicha región es altamente polimórfica y se la utiliza como marcador epidemiológico en la tipificación molecular, con un alto poder discriminativo: “*spa*-typing”. Esta metodología se basa en la secuenciación de ésta región (Xr) polimórfica, el análisis del número de repeticiones y su variabilidad permite asignar distintos tipos *spa* (t) a cada cepa en estudio [106].

La función más importante de esta proteína es la de llevar a cabo el reconocimiento y la unión a la fracción Fc de las inmunoglobulinas G impidiendo la opsonofagocitosis. También ha sido descrita como un factor de virulencia relevante en la neumonía estafilocócica. Capaz de unirse al Receptor 1 del Factor de Necrosis Tumoral (TNFR1) en las células epiteliales del pulmón, lo que conduce a la activación de señales intracelulares que llevan a la producción de citoquinas quimioatrayentes tales como la interleuquina-8 (IL-8) para el reclutamiento de neutrófilos. Este proceso aumenta la inflamación del epitelio respiratorio y por lo tanto contribuye al daño tisular [106]. Además se ha demostrado que estimula la proliferación de linfocitos B, provocando su expansión clonal. Esta inmunodominancia podría limitar la respuesta del hospedador a otros factores de virulencia de *S.aureus*. También puede interactuar con el factor von Willebrand (vWF) mediando la adhesión de plaquetas después de una lesión endovascular [107, 108].

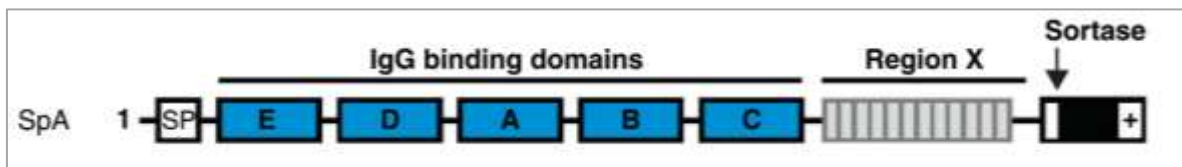


Figura 3: Descripción esquemática de la Proteína compuesta por cinco dominios homólogos de unión a inmunoglobulina seguidos por la región X, altamente polimórfica, y por el motivo LPXTG en el extremo C-terminal.

Tomado de Hwan Keun Kimv et al. *Current Opinion in Microbioloav.* 2012.

4.4.2 ENZIMAS EXTRACELULARES

Las exoenzimas son proteasas y lipasas necesarias para la adquisición de nutrientes. Las mismas, si bien no son toxigénicas o citolíticas, contribuyen a la patogénesis, ya que ocasionan la destrucción del tejido del huésped promoviendo la invasión. La mayoría de las enzimas funcionan degradando moléculas del anfitrión o interfiriendo en las cascadas de señalamientos y vías metabólicas en el hospedador.

Entre ellas se distinguen las siguientes: a) **estafiloquinasa**, enzima activadora del plasminógeno, que lleva a la descomposición de las mallas de fibrina aumentando la invasividad de la bacteria b) **coagulasa**, puede encontrarse tanto asociada a la pared bacteriana como secretada al medio. La misma estimula la coagulación del plasma convirtiendo al fibrinógeno en fibrina, favorece la sepsis y la formación de abscesos; c) **hialuronidasa**, destruye el ácido hialurónico (polisacárido que proporciona sostén a las células eucariotas) facilitando la diseminación del microorganismo por la matriz extracelular d) **lipasas** y **nucleasas** cuya función es pobremente entendida aún. Se considera que, posiblemente, las nucleasas podrían disminuir la actividad antibacteriana de las trampas extracelulares de neutrófilos (neutrophil extracellular traps “NETs”) las cuales contienen DNA del lisado de neutrófilos [109]. Las proteasas son relativamente no específicas, produciendo la degradación de proteínas de una manera amplia, lo que conduce a la destrucción del tejido. También pueden tener un impacto más específico, como por ejemplo la serinproteasa de la toxina exfoliativa de estafilococos (ETS) que corta específicamente cadherinas desmosómicas de las capas superficiales de la piel, dando lugar al síndrome de la piel escaldada (SSSS) [110].

4.4.2.1 **Toxinas con actividad sobre membrana**

Las toxinas son proteínas secretadas por *S. aureus* en la matriz extracelular durante las fases: post-exponencial y la fase estacionaria temprana. Estas proteínas están a menudo involucradas en la penetración en el tejido y permiten a las bacterias invadir al huésped. También son citolíticas y ayudan el crecimiento bacteriano mediante la adquisición de nutrientes esenciales tales como el hierro a partir de células lisadas [78]

S. aureus secreta diversas toxinas citolíticas, entre las que se encuentran la α -hemolisina, β -hemolisina, γ -hemolisina, δ -hemolisina, y leucocidina PVL (Panton-Valentine)

- **α -hemolisina (Hla)**

Es considerada como el prototipo de las toxinas formadoras de poros, provoca la lisis celular de un gran rango de células del hospedador: eritrocitos, células epiteliales, células endoteliales, linfocitos T, monocitos y macrófagos. El gen que codifica a la Hla está ubicado en el core genoma y se expresa como un monómero soluble en agua, que luego se ensambla para formar un poro heptamérico (β -barril) en la membrana citoplasmática. Vía unión con su receptor ADAM10 (una desintegrina y metaloproteinasa), conduce a la formación del poro en la membrana celular con el subsecuente influjo de calcio y eflujo de potasio con posterior muerte celular [111].

La expresión Hla está controlada principalmente por el regulador global *agr* (“accessory gene regulator”) a través de la molécula regulatoria efectora RNAIII. Si bien *agr* es el principal mecanismo que incrementa la expresión de Hla, también puede ser modulada por otros reguladores como: *SaeR*, *SarZ*, *ArS* (up-reguladores) y *Rot*, *SarT* como (down-reguladores) [112, 113]

- **β -hemolisina (Hlb):**

Es caracterizada como una esfingomielinasa, no es una toxina formadora de poros; sólo lisa eritrocitos a bajas temperaturas y no es citolítica para linfocitos y granulocitos. Se postula que la β -hemolisina actúa sobre la esfingomielina de la bicapa lipídica de la membrana plasmática llevando a una irregularidad en el fluido de la misma [78, 88]

- **γ -hemolisina (Hlg):**

Es una toxina formadora de poros β -barril, que afecta a eritrocitos de conejo y también presenta actividad sobre leucocitos provocando daño en la membrana de neutrófilos, monocitos y macrófago. Esta toxina también 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 en una proporción estequiométrica 1:1, lo que conduce a la formación de un poro. La presencia de este poro tiene como consecuencia la liberación de iones y finalmente la muerte de la célula [78, 109].

- **δ -hemolisina (Hld):**

Forma una hélice α anfipática, que actuaría como surfactante, provocando la lisis celular. Es miembros de la familia de péptidos secretados llamados Modulinas Solubles en fenol (Phenol-Soluble Modulins, “PSMs”) los cuales tiene múltiples funciones en la patogénesis de *S.aureus*. Produce la lisis de eritrocitos y leucocitos, estimula la respuesta inflamatoria y contribuye al desarrollo y diseminación de las infecciones asociadas a bofilm [56]. La δ -hemolisina es codificada dentro de la secuencia codificante para RNAIII, el cual es molécula efectora del regulador global “Agr”, (accessory gene regulator) y presenta actividad citolítica moderada en comparación con PSM α que presenta pronunciada capacidad lítica y PSM β sin actividad lítica.[56, 78].

- **Leucocidina de Panton-Valentine (PVL)**

PVL es una toxina de dos componentes formadora de poros que induce a necrosis y apoptosis en leucocitos. PVL es codificada por los genes *lukS-PV* and *lukF-PV* localizados en el profago ϕ SA2 *pvl* [95].

Existe una fuerte asociación entre las infecciones causadas por cepas de *S. aureus* meticilina resistentes (MRSA) asociadas a la comunidad (CA-MRSA) y la presencia de PVL. Además 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. Este hecho sugirió que PVL podría ser un contribuyente para la virulencia de clones CA-MRSA, sin embargo otros estudios demostraron que clones CA-MRSA con pérdida de PVL pueden aún ser infectivos, [95]. Por lo tanto el rol de PVL en la patogénesis continúa siendo controversial. La diversidad de modelos animales utilizados en estos estudios podría explicar la discordancia en los resultados.

Por otro lado, la alta asociación existente entre PVL y CA-MRSA ha hecho que ésta sea considerada un muy útil marcador epidemiológico más que un determinante en la virulencia de CA-MRSA.

4.4.2.2 Toxinas con actividad de superantígenos

- ENTEROTOXINAS (Staphylococcal Enterotoxins, SE):

Representantes de una gran familia de exotoxinas pirógenas llamadas superantígenos.

Las enterotoxinas de *S aureus* (SEs) son causante de vómitos y diarrea siendo la causa más común de enfermedades transmitidas por alimentos. La intoxicación alimentaria por cepas de *S. aureus* enterotoxigénicas tiene lugar tras la ingestión de toxinas que han sido liberadas en los alimentos sólidos o las bebidas contaminados. Las mismas son termoestables y, por lo tanto, no se desnaturalizan con la cocción de los alimentos. Hay más de 20 SEs identificadas hasta la fecha, ellas se diferencian por su heterogeneidad antigénica (SEA-SE / V) [114]. Las SEs son superantígenos capaces de inducir la activación y proliferación de las células T de una manera independiente del antígeno, lo que resulta en una producción y liberación masiva de citosinas (también llamadas citoquinas) que favorecen el daño epitelial [115]. Se considera que la función primaria de los superantígenos se enfoca en debilitar el sistema inmune del huésped lo suficiente para que el patógeno pueda propagarse y conducir a la progresión de la enfermedad [26, 114, 116].

- TOXINA-1 DEL SÍNDROME DEL SHOCK TÓXICO (TSST-).

El superantígeno más conocido es la toxina-1 del síndrome del shock tóxico (TSST-). El gen que codifica esta toxina es llevado por un limitado número de cepas. Ha sido descrito que TSST-1 podría estimular un aumento de citoquinas (IL-8 y MIP-3 α , IL-2, y TNF α). La secreción y activación masiva de citoquinas pueden conducir a un síndrome similar a la sepsis conocido como Síndrome de Shock Tóxico, cuadro severo y potencialmente fatal, principalmente conocido por brotes asociados al uso de tampones vaginales en mujeres jóvenes en la década de 1980 [109, 110].

- TOXINAS EXFOLIATIVAS (ETs)

Algunas cepas de *S. aureus* son capaces de causar el Síndrome de la piel escaldada (staphylococcal scalded skin syndrome “SSSS”) una enfermedad que afecta principalmente a recién nacidos y lactantes. Los individuos infectados experimentarán ampollas en la piel y la pérdida de las capas superficiales de la piel, deshidratación e infecciones secundarias [110].

La patología generalmente es el resultado de la colonización de las mucosas o la piel (p. ej. el cordón umbilical) por una cepa toxigénica de *S. aureus* que produce la toxina exfoliativa A (ETA) o B (ETB), [78] codificada por los genes *eta* y *etb*. Los mismos están localizados en un fago (*eta*) o en un plásmido (*etb*).

Las ETs también son consideradas superantígenos pero menores comparados con los anteriormente citados.

4.5 OTROS FACTORES DE VIRULENCIA

4.5.1 ACME (Arginine Catabolic Mobile Element)

Es un elemento genético móvil (MEG) que podría tener implicancias en el crecimiento, la transmisión y la patogénesis de CA-MRSA (Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*). Fue identificado a partir de la secuenciación del genoma de la cepa MRSA USA300 [117]. Físicamente está unido al SCCmecIV en el clon USA300. Existe una alta prevalencia de este elemento en *Staphylococcus epidermidis* lo que sugiere que esta especie es desde donde fue adquirido [16, 95].

Este elemento porta el “cluster” de genes de arginina desaminase (*arc*), el operón de oligopéptido permeasa (*opp*) y los genes *speG*. 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 [21, 118]. 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 provocaría una deficiente formación de Óxido Nítrico, molécula implicada en la respuesta inmune innata y

adaptativa del huésped [117, 119, 120]. El operón *opp* codifica un oligopeptido 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*[121]. De acuerdo a estas características se hipotetizó que ACME dota a los clones USA300 de una mayor capacidad para colonizar la piel de personas sanas y así, difundir más fácilmente en la comunidad [117, 121]. Se demostró que la delección de ACME redujo la aptitud competitiva de USA300 en un modelo de bacteriemia de conejo, Sin embargo otros autores no mostraron ningún defecto en la virulencia en modelos de neumonía o abscesos cutáneos en roedores [120, 121].

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 [122].

4.5.2 **PSM (Phenol-Soluble Modulin)**

Las Modulinas Solubles en Fenol (PSMs) son una familia de péptidos anfipáticos, helicoidales que comprenden la conocida δ -toxina estafilocócica (39). Son codificadas en tres localizaciones diferentes del genoma: i) en el operón *psmA* son codificados los péptidos PSM α : PSM α 1-PSM α 4, ii) en el operón *psm* β están codificadas las PSM β 1 y PSM β 2 y iii) la δ -toxina está codificada dentro de la secuencia codificante para RNAIII (molécula efectora del regulador *agr*). Las PSMs están presentes en prácticamente todos los estafilococos, particularmente aquellos que son patógenos. Se las consideran determinantes clave en el desarrollo de infecciones asociadas con piel, flujo sanguíneo y

biofilm. Las PSM de tipo α son fuertemente citolíticos hacia neutrófilos y eritrocitos, particularmente destruyen neutrófilos después de la fagocitosis dentro del fagosoma [56].

Los péptidos PSM β parecen tener el impacto más pronunciado en la estructuración de biofilm [123]. Además estudios llevados a cabo por Otto y cols han demostrado que las PSM intervienen en la estructuración y dispersión del biofilm estafilocócico. Basados en la estructura anfipática de las PSM y bajo estricta regulación del sistema *agr*, es considerado que interrumpen las fuerzas no covalentes en la matriz del biofilm. Así, se forman canales que son necesarios para el suministro de nutrientes a niveles más profundos del mismo y proporcionan las fuerzas disruptivas necesarias para el desprendimiento de grupos de biofilm a sitios distales [124].

4.6 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA: SISTEMA Agr

En *S. aureus* la expresión de los genes implicados en la virulencia está influenciada por reguladores globales. Los FV (Virulence Factor) expresados actúan de manera sincronizada, lo que aumenta la capacidad de habitar y causar diversas enfermedades en el huésped facilitando la formación de biofilm, la invasión y colonización [112].

Estos reguladores perciben las condiciones ambientales y responden a ellas mediante un fino ajuste de la expresión de determinantes metabólicos y de virulencia. El paradigma de la regulación génica de la virulencia es el regulador “agr” (accessory gene regulator). El mismo actúa como un mecanismo de detección de quórum 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) [125]. El regulador global “agr” consiste en dos unidades transcripcionales adyacentes: RNAII y RNAIII, las cuales son transcritas en direcciones opuestas en dos operones divergentes P2 y P3, que codifican un sistema de transducción de señales de dos componentes (histidin-Kinasa). El operón P2 codifica al RNAm policistrónico RNAII, que contiene cuatro marcos de lectura abiertos (ORFs) a partir de los cuales se traducen cuatro proteínas Agr involucradas en el circuito de autoinducción: 1) una proteína transmembrana (AgrB); 2) un precursor peptídico de autoinducción (AgrD) que a su vez es procesado y exportado por AgrB (insertado en la membrana); 3) un sensor transmembrana (AgrC) que es el receptor del péptido autoinducido (AIP) derivado del AgrD y 4) un regulador de la transcripción (AgrA) que puede ser activado por AgrC. El AIP es la señal de activación que es detectada por un sistema de dos componentes clásico (TCS), en el cual el receptor histidin Kinasa (RHK) es AgrC y el regulador de respuesta (RR) es AgrA. El AIP interactúa con AgrC para activar una cascada de fosforilación que conduce a la fosforilación de AgrA. Tras la fosforilación, AgrA se une al promotor P2 y regula positivamente la transcripción de RNAII y por lo tanto, la producción de las cuatro proteínas Agr, que confieren retroalimentación positiva a la síntesis de AIP [125].

La regulación de la producción del factor de virulencia se lleva a cabo a través del operón P3 dependiente de AgrA, que codifica el RNAIII, que es el RNAm para la δ -toxina y un factor regulador pleiotrópico. RNAIII principalmente actúa como una molécula efectora del sistema *agr* por un mecanismo de apareamiento de bases antisentido. El mismo produce la supresión de la síntesis de proteínas necesarias para la fase de adhesión del ciclo de vida bacteriano, mientras que reprime aquellas involucrados en la fase de invasión. El RNAIII representa un ejemplo paradigmático del control de la expresión de factores de virulencia a través de un pequeño RNA regulador (RNAs) y el papel central de sRNAs en el “quorum sensing” [125, 126]. No obstante, cabe señalar que en los últimos años se han identificado también los efectores de AgrA independientes del RNAIII, siendo los más destacados las modulinas solubles en fenol, que facilitan la evasión inmune de la bacteria [125].

A modo de resumen a medida que tiene lugar el crecimiento bacteriano y se incrementa la densidad de las mismas, aumentan las posibilidades del encuentro del AIP con su receptor AgrC. Tras este contacto, AgrC experimenta una modificación conformacional y da lugar a la fosforilación (o desfosforilación) del regulador AgrA activándolo, así se unirá a la región promotora P2 para RNAII y a la región promotora P3 para RNAIII, así como a los promotores que controlan la expresión de péptidos PSM α y PSM β [127] (Figura 4).

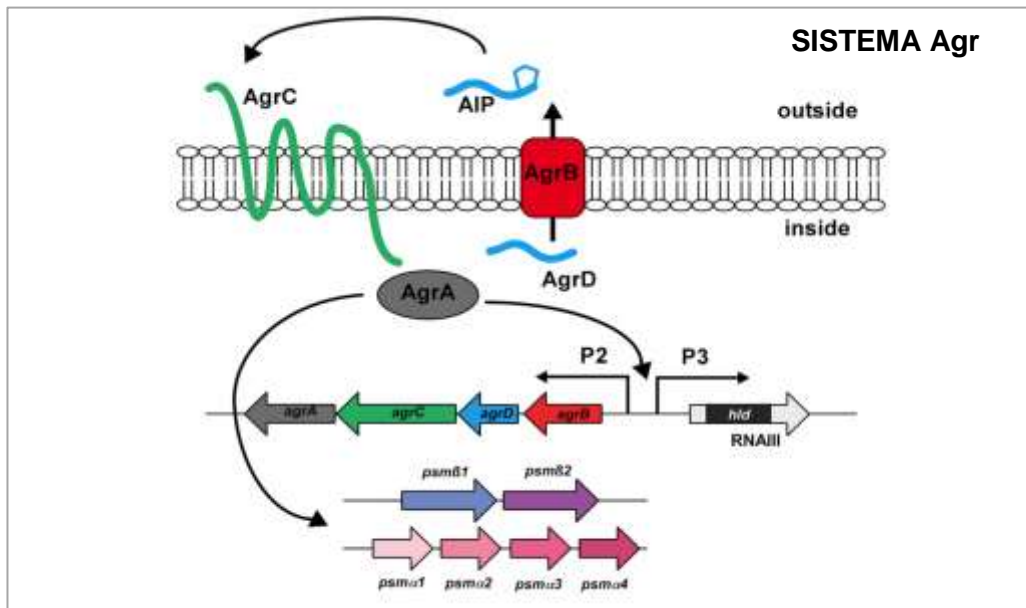


Figura 4.: Sistema de regulación Global: Agr. A un cierto umbral de concentración, AIP activa el AgrC-AgrA y AgrA fosforilado activa la transcripción del promotor P2, lo que resulta en una regulación de retroalimentación. La mayoría de las dianas de Agr se regulan a través de RNAIII, cuya transcripción se incrementa mediante AgrA, a través del promotor P3. El RNAIII también contiene el gen de la toxina delta (*hld*). AgrA también aumenta la transcripción de los operones *psmA* y *psmB*, que codifican péptidos PSM, en un modo independiente de RNAIII.
Tomado de Katherine Y. Le and Michael Otto, *Frontiers in Microbiology*, 2015 (208).

Una de las características más intrigantes del locus *agr* es su polimorfismo dentro de una sola especie. Aunque *agr* se conserva generalmente dentro de los *Staphylococcus spp*, las variaciones (polimorfismos) en las secuencias de *agrB*, *agrC*, *agrD* conducen a la producción de AIP con especificidades de señalización variados, lo que permite la activación de sí mismo y la inhibición cruzada de los grupos de Agr no idénticos, un fenómeno que podría ser el reflejo de las presiones selectivas en la evolución [125]. En los 5 años siguientes a la clonación del primer locus *agr* en *S. aureus*, se describieron cuatro variantes alélicas [128] y las cepas que albergan cada alelo *agr* se clasifican como un subtipo de especificidad [128]. Además como el locus *agr* pertenece al genoma variable central se ha informado una fuerte asociación a linajes clonales [129] y cada CC pertenece exclusivamente a un grupo *agr* [127, 129]. Esta característica transforma al locus *agr* como un marcador muy útil en la genotipificación.

Se ha demostrado relación entre un tipo *agr* particular y un síndrome estafilocócico específico, por ejemplo la mayor parte de los *S. aureus* que producen la TSST-1 o la toxina de Panton Valentine pertenecen al grupo *agr* III, las cepas productoras de la toxina exfoliativa A (ETA) pertenecen al grupo IV (105). Sin embargo, otros estudios no indicaron asociación estadística entre los grupos *agr* y los tipos de toxina (106,211).

4.7 EPIDEMIOLOGÍA: GENERAL Y MOLECULAR

La epidemiología se dedica al estudio de las enfermedades y los factores de riesgo que afectan a una población humana, su distribución y control. El conocimiento derivado de los estudios epidemiológicos permite determinar la historia natural de las enfermedades, es decir, su etiología, frecuencia de aparición, distribución, vías y patrón de diseminación, reservorios o factores que incrementen el riesgo de contraerla. Adicionalmente, ofrece una alternativa para establecer mecanismos que permitan prevenir o controlar la enfermedad, así como evaluar la eficacia de dichas medidas y la magnitud del beneficio al aplicarlas sobre la población [130].

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 [130]. La caracterización de los aislamientos es importante para desarrollar estrategias locales adecuadas de tratamiento.

Los clones bacterianos son células genéticamente idénticas o muy similares que descienden de un antepasado común (concepto de “clon relativo”). Con el paso del tiempo, los miembros de un clon individual pueden diferenciarse a través de mutaciones puntuales, de recombinación y de adquisición o eliminación de elementos genéticos móviles. Esta diferenciación ofrece los medios adicionales para la adquisición de características patogénicas como la resistencia antimicrobiana. De este modo, la variación genética da origen a una amplia diversidad genética y fenotípica[130]. Las técnicas moleculares, o las técnicas de secuenciación e hibridación de DNA, brindan el potencial de reunir un nuevo grado de detalles en la vigilancia de MRSA. Por ejemplo, la vigilancia molecular proporciona un medio para diferenciar HA-MRSA (Healthcare-Associated Methicillin-Resistant *S. aureus*) de CA-MRSA (Community-Associated Methicillin-Resistant *S. aureus*) y permite describir variantes genéticas respecto de los síndromes clínicos.

Además, conocer la razón por la que clones específicos predominan en diferentes regiones geográficas, posibilitaría el desarrollo de estrategias más eficaces para controlar la transmisión de MRSA en la región.

La Epidemiología Molecular permite aportar resultados que conducirán a una mejor comprensión de los fenómenos implicados en la transmisibilidad de esta bacteria, además de mejorar el entendimiento en la patogénesis de las infecciones causadas por

Staphylococcus aureus y el conocimiento de futuros blancos implicados en la diseminación de estas cepas.

4.7.1 MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN PARA MRSA

Los clones bacterianos son células genéticamente idénticas o muy similares que descienden de un antepasado común, es decir forman parte de una cadena de replicación y transmisión. Con el paso del tiempo, los miembros de un clon individual pueden diferenciarse a través de mutaciones puntuales, de recombinación y de adquisición o eliminación de elementos genéticos móviles que pueden contener secuencias relevantes epidemiológicamente, como por ejemplo, genes de resistencia antibiótica o de virulencia. De este modo se genera una amplia diversidad genética y fenotípica que sólo es posible estudiar a través de diferentes técnicas de tipificación molecular.

Las técnicas utilizadas en este trabajo se exponen, brevemente, a continuación:

4.7.1.1 Tipificación del SCCmec

A través de la PCR multiplex de acuerdo a lo descrito, en sección materiales y métodos (página 168), se amplificaron diferentes regiones específicas de los distintos tipos de SCCmec de las regiones J, de los complejos *ccr* y de los complejos *mec*. [62, 64].

4.7.1.2 Tipificación del gen de la proteína A (*spa* typing)

Basada en la amplificación y posterior secuenciación de la región polimórfica “X” del gen que codifica la proteína A (*spa*) de *Staphylococcus aureus* Esta región consta de un número variable de secuencias repetidas cortas (24pb) que sufren mutaciones puntuales, deleciones y duplicaciones. El análisis del número de repeticiones y su variabilidad permite asignar un tipo *spa* “t” a cada cepa estudiada. Esta técnica es de utilidad en epidemiología global y local [131, 132]

4.7.1.3 Multi Locus Sequense Typing (MLST)

Se basa en la amplificación y posterior secuenciación de fragmentos internos de 7 genes (450pb) altamente conservados, presentes en el core variable. Los mismos codifican enzimas de siete vías metabólicas centrales, por lo cual estos genes evolucionan lentamente. En la secuenciación nucleotídica de estos genes Housekeeping; cada aislamiento es definido por el conjunto de alelos en cada uno de los 7 genes, lo que se define por convención como perfil alélico o tipo secuencial ST. Los aislamientos de *S.aureus* que tienen identidad en cinco o más de los siete genes determinado por MLST se conoce como complejo clonal (CC) son considerados como parte de un mismo linaje. Este método resulta adecuado para estudios epidemiológicos globales y es muy útil para medir largos periodos de evolución entre los linajes de *S. aureus* [32].

4.7.1.4 Electroforesis en campo pulsado (PFGE)

Se basa en la generación de fragmentos de gran tamaño de (más de 40 Kb) a partir de DNA tratado con enzimas de restricción de cortes poco frecuentes (en el caso de *S. aureus* es la enzima *SmaI* cuyo sitio de restricción se encuentra poco representado en el genoma debido al bajo contenido de GC del mismo) esto genera la división del DNA 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 DNA se reorientan avanzando en dirección del polo positivo. La aplicación de un segundo campo eléctrico, con una orientación diferente al primero, obliga al DNA 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 DNA será en línea recta y el patrón final será la suma de todos los avances en zig-zag que ha realizado la molécula. Se obtienen así patrones de restricción que representan el DNA cromosómico bacteriano distribuido en pocas bandas con movibilidades electroforéticas distintas. Para la interpretación de esta

existen una serie de criterios establecidos desde el año 1995 por Tenover y col. [133] Que son utilizados para entender si aislamientos clínicos relacionados epidemiológicamente lo son, también, genéticamente.

4.7.1.5 Tipificación por PCR convencional

En este trabajo de tesis la PCR convencional se realizó para 23 genes de virulencia de utilidad en epidemiología de *S.aureus* como marcadores moleculares:

-Enterotoxinas: *sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei, sej, sen, seo, sem, seq* y *sek*.

-Toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1): *tst*.

-Toxinas exfoliativas: *eta* y *etb*.

-Leucocidinas: *lukE-lukD* y los genes de la Leucocidina de Pantón Valentine (PVL): *lukS-PV-lukF-PV*

También fueron testeados el gen *arcA* del elemento móvil del catabolismo de arginina (ACME) y la presencia del gen *sasX*

Este gen codifica para una proteína de superficie implicada en la colonización nasal, en la formación del absceso de pulmón y en la promoción de los mecanismos de evasión inmune en modelos animales [134]. Se encuentra localizada en un MGE que posibilita su transferencia y ha sido relacionada a la rápida diseminación de algunos clones epidémicos ST239 en Asia [20].

4.7.1.6 Secuenciación del genoma completo:

La epidemiología de *S. aureus* y la diversidad fenotípica presente en diferentes cepas se refleja en sus genotipos. Es por ello que es posible analizar múltiples genomas de *S. aureus* para descubrir factores que podrían ser predictores de fenotipos de enfermedad y capacidades de virulencia [23, 24].

Actualmente existe una revolución en las tecnologías de secuenciación del ADN, cientos de secuencias completas del genoma de *S. aureus* ya están disponibles y pueden

analizarse utilizando nuevos métodos. Un método de este tipo es el análisis de genes compartidos y únicos, dentro de una especie, denominado "pangenoma" (112).

Las tecnologías de secuenciación de DNA de alto rendimiento y las técnicas de análisis pretenden mejorar nuestra capacidad de rastrear y distinguir patógenos. El análisis computacional de MGE construido para múltiples cepas en una especie proporciona una poderosa herramienta que puede otorgar una visión de los determinantes metabólicos de virulencia, identificar nuevos biomarcadores capaces de distinguir ciertas cepas entre sí y descubrir nuevos objetivos farmacológicos (111).

Si bien el secuenciamiento del genoma completo no se utilizó en esta tesis, el mismo se ha comenzado a desarrollar como perspectivas posteriores a este trabajo..

4.8 MRSA: Epidemiología

Desde la introducción de la penicilina en la práctica clínica, a inicios de 1940, la resistencia bacteriana ha sido continua comenzando con la resistencia a penicilina por *S. aureus*. La misma, en un principio, tuvo una baja incidencia pero en pocos años su prevalencia aumentó rápidamente principalmente debida al clon (fago tipo 80/81) productor de la penicilinasas capaz de hidrolizar el anillo β -lactámico inactivando la molécula del antibiótico. Rápidamente se diseminó en diferentes países del mundo como Australia, Canadá, Gran Bretaña y Estados Unidos causando infecciones adquiridas a nivel hospitalario y fuera del él [135]. Contribuyó a esta diseminación, el hecho, que las penicilinasas estuvieran codificadas en elementos genéticos móviles, como plásmidos, por lo cual casi por dos décadas *S.aureus* resistentes a penicilina se convirtieron en un problema global.

Posteriormente se introduce la metilina en la industria farmacéutica (primer betalactámico semisintético resistente a las penicilinasas) a finales de los años 1950. Si bien el clon (fago tipo 80/81) prácticamente desapareció, la prevalencia de cepas productoras de penicilinasas se ha mantenido muy elevada desde entonces. Actualmente se reporta una resistencia a la penicilina mayor a 90% [136] o más, en las cepas de *S. aureus*.

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 [137]. Es de destacar que los β -lactámicos son la principal herramienta para hacer frente a las infecciones por *S aureus*. Al principio, *estas cepas de MRSA* se diseminaron por el Reino Unido, luego en Europa y finalmente en el resto del mundo convirtiéndose en endémicas. Se establecieron en hospitales, es decir las infecciones se adquirían en los mismos o fuera de ellos pero eran pacientes que habían estado en contacto con el hospital. Los cuales presentaban alguno de los siguientes factores de riesgo para infección adquirida en el hospital o relacionadas a la atención sanitaria (HRFs)[138]: i) historia de hospitalización en el año previo, ii) residencia en instituciones de cuidado crónico, iii) intervenciones quirúrgicas, iv) hemodiálisis, v) utilización de dispositivos invasivos por ej. catéter endovascular) historia de colonización o infección por MRSA . Consecuentemente, estas cepas adquirieron resistencia a otros antibióticos usados comúnmente en los hospitales además de la resistencia a los antibióticos β -lactámicos.

4.8.1 Healthcare-Associated Methicillin-Resistant *S. aureus* (HA-MRSA)

HA-MRSA en principio se los definió como MRSA aislados de pacientes hospitalizados que no portaban MRSA al inicio de la hospitalización o MRSA aislados de pacientes hospitalizados con 48 o más horas de hospitalización [139]

Las cepas de MRSA emergieron a partir de *S. aureus* sensible a la meticilina (MSSA) mediante la adquisición del *SCCmec*. Este hecho ocurrió un número limitado de veces conduciendo a un número reducido de clones MRSA que fueron capaces de diseminarse en todo el mundo, produciendo epidemias en el ambiente hospitalario [140, 141].

Entre los clones HA-MRSA destacados se encuentran:

- clon arcaico (con un background genético ST250-*SCCmecI*-PVL- reportado en el Reino Unido desde los años 60),
- clon Ibérico (ST247-*SCCmecIA*/PVL-; reportado en España desde 1989),
- clon New York/Japón (ST5-*SCCmecII*-PVL-, reportado en Estados Unidos desde 1998),
- clon EMRSA-16 (ST36-*SCCmecII*-PVL-, reportados en el Reino Unido desde 1993),

- clon Brasileiro (ST239-SCC*mecl*IIA-PVL- reportado en Brasil desde 1992),
- clon Húngaro (ST239-SCC*mecl*III-PVL- reportado en Hungría desde 1993),
- clon EMRSA-15 (ST22-SCC*mecl*IV-PVL- reportado en el Reino Unido),
- clon Pediátrico (ST5-SCC*mecl*IV-PVL-, reportado en Portugal desde 1992) y
- clon Berlín (ST45-SCC*mecl*IVa-PVL-, reportado en Alemania desde 1998)

De todos ellos solo seis (Ibérico, Brasileiro, Húngaro, EMRSA-15, New York/Japón, y el Pediátrico) han sido diseminados internacionalmente y son referidos como clones pandémicos

A lo largo del tiempo, se ha observado el reemplazo de un clon de MRSA por otro clon MRSA o cambios en los patrones de distribución en cada país o área. Por ejemplo durante un período de nueve años en España, el clon común MRSA New York/Japón (NY/J) fue desplazado por el clon MRSA Brasileiro, que luego fue desplazado por el clon EMRSA-16 [142]. En América del Sur el clon más diseminado fue el Brasileiro que se aisló en todo Brasil y se extendió a varios países más, como Argentina, Chile, Colombia, Ecuador, Paraguay, Perú y Uruguay [134, 141, 143]. Sin embargo, en el año 1999, en Argentina, a partir de un estudio de vigilancia, llevado a cabo por nuestro grupo [144, 145], se observó que la mayoría de las infecciones hospitalarias por MRSA (HA-MRSA), en Córdoba, eran provocadas por un clon epidémico multirresistente a antibióticos (aunque sensible a TMS), denominado clon Cordobés/Chileno (del linaje ST5). El mismo comenzó a desplazar al clon brasileiro (ST239-IIIa). Actualmente, el clon Cordobés /Chileno, predomina como HA-MRSA en distintos países de América Latina, como Argentina, Chile, Paraguay y Colombia [143, 144, 146, 147].

4.8.2 Community-Associated Methicillin-Resistant *S. aureus* (CA-MRSA)

En los 90 comenzó a reportarse un número incrementado de infecciones por MRSA pero en pacientes de la comunidad los cuales no habían tenido relación con el ambiente hospitalario (es decir no presentaba los tradicionales factores de riesgos). Las infecciones fueron limitadas a brotes en diferentes partes del mundo como en la comunidad indígena del Oeste de Australia y en diferentes regiones de EE.UU (127). Así en los estados de Dakota y Minnesota, la muerte de 4 niños (no relacionados al ambiente hospitalario) marcó el reconocimiento formal de este nuevo *S. aureus* causante de infecciones sin relación nosocomial [148]. Esta nueva entidad fue llamada CA-MRSA (Community-acquired/associated MRSA) para poder distinguirlas de las relacionadas al ambiente hospitalario que fueron denominados HA-MRSA (Healthcare-Associated Methicillin-Resistant *S. aureus*)

El estudio de estos aislamientos CA-MRSA reveló que presentaban un perfil de resistencia sólo a los a los antibióticos β -lactámicos. Esto marcó una primera diferencia con respecto a los clones de MRSA circulantes que se presentaban como multirresistentes. La evaluación 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 un fago portador de los genes que codifican para la toxina PVL, que es considerada un marcador molecular de CA-MRSA. [21].

Otra característica destacada de las cepas CA-MRSA fue la capacidad de causar enfermedad en individuos sanos, sin factores de riesgo conocidos para la infección. Si bien la mayoría fueron infecciones de piel y tejidos blandos también se reportaron infecciones severas e invasivas como neumonías necrotizantes y sepsis fatal sobre todo en el grupo etario de individuos jóvenes y niños [21, 119, 148]. Estas características asociaron a las cepas CA-MRSA con una mayor virulencia que las HA-MRSA.

La distribución geográfica de CA-MRSA es variable y específica de continente. Los análisis moleculares indican que sólo un pequeño número de clones predominantes se han establecido, como ST93 en Australia, ST80 en Europa, ST8 en los Estados Unidos. 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. Las

primeras infecciones por CA-MRSA reportadas en América Latina fueron en Brasil en el año 2003 [149-151].

En Argentina en, estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, [152] se observó que la proporción de infecciones por CA-MRSA en niños ha 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 [153]. Este aumento significativo en el tiempo, se asoció con la aparición y propagación de un clon CA-MRSA, caracterizado como ST5-SCC $_{medVa}$ -PVL⁺ [152, 153] del mismo linaje (ST5) que el clon epidémico hospitalario, sugiriendo la emergencia de ambos, a partir de un clon ancestral de *S. aureus* Meticilino Sensible (MSSA) ST5 exitoso.

Además es importante destacar que estas cepas CA-MRSA que en un principio se asociaron con infecciones de aparición o inicio en la comunidad (CO), han comenzado a detectarse en los hospitales pudiendo reemplazar a las cepas HA-MRSA convencionales, con importantes implicancias clínicas y para la salud pública [154].

Algunos autores han sugerido que esto podría indicar un cambio epidemiológico potencial en las infecciones estafilocócicas [155].

Sin embargo, la entrada de estas cepas CA-MRSA no ha sido explorada a fondo entre un gran número de hospitales y el conocimiento de los factores de riesgo implicados en la transmisión nosocomial de CA-MRSA en comparación con HA-MRSA siguen sin estar definidos [156, 157].

4.9 RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

S. aureus ha demostrado ser notablemente adaptable a los desafíos expuestos por las diferentes clases de antibióticos adquiriendo resistencia, prácticamente, frente a la totalidad de aquellos utilizados en la práctica clínica, incluso los de última generación.

Desde la primera aparición de cepas de *S. aureus* Resistentes a Meticilina, este patógeno se ha extendido por todo el mundo considerándolo actualmente como causa de preocupación mundial en salud pública. En Europa las infecciones de inicio en el hospital por MRSA continúan dominando. Los casos de infecciones por CA-MRSA son producidos por una alta diversidad de clones [153]. En cambio, en los EEUU las infecciones por MRSA relacionadas a la comunidad (CA-MRSA) son las que se registran con mayor frecuencia, asociadas a la diseminación de un clon (USA300) [158]. En América Latina, MRSA es altamente prevalente, con una proporción de CA-MRSA en aumento [151]. La terapia antimicrobiana debe ser orientada en base a factores locales y apoyarse en el conocimiento de la epidemiología actualizada referida a la incidencia local de MRSA.

4.9.1 BETALACTÁMICOS TRADICIONALES Y NUEVOS ANTI-MRSA

Los betalactámicos 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 peptidoglicano en la pared. El anillo de los betalactámicos mimetiza el sustrato de las PBP (D-ala D-ala) lo que genera que la unión del betalactámico a la PBP impida el paso de la transpeptidación, como consecuencia se interrumpa el ensamblaje de la pared celular.

En 1940, luego de la introducción de la penicilina, se observó el aumento progresivo y sostenido de la resistencia a este betalactámico y a las aminopenicilinas, por acción de una penicilinasas codificada por el gen *blaZ*. Esta betalactamasa de *S. aureus* suele ser de origen plasmídico. Pertenecen a la clase molecular A de Ambler y

permanecen unidas a la superficie de la bacteria [159]. Actualmente más del 90% de aislados de *S. aureus* producen betalactamasas que inactivan a la penicilina.

El surgimiento de esta resistencia condujo al desarrollo de betalactámicos con actividad intrínseca frente a las cepas productoras de betalactamasas como son: las penicilinas resistentes a penicilinasas (metecilina, nafcilina y penicilinas isoxazólicas), las asociaciones de una penicilina con un inhibidor de betalactamasas, las cefalosporinas (especialmente las de primera generación) y los carbapenems [159].

Con la introducción de la metecilina, emergieron las cepas resistentes a este antibiótico conocidas como MRSA. La causa de esta resistencia es mediada por la adquisición del gen *mecA*, inserto en el elemento de transferencia horizontal “*SCCmec*”. El *mecA* codifica una PBP2 adicional denominada PBP2a con baja afinidad por todos los antibióticos betalactámicos.

Sin embargo investigaciones recientes, por cristalografía de PBP2a unida a **ceftarolina**, (nueva cefalosporina anti-MRSA) indican la unión del β -lactámico a un sitio alostérico que facilitaría la exposición del sitio activo [160]. Los nuevos β -lactámicos como ceftarolina, son más eficientes para unirse de forma no covalente a este sitio alostérico y así inhibir la transpeptidación. La actividad de estos nuevos betalactámicos frente a la resistencia por PBP2a tendrían un doble sitio de acción, por un lado en el sitio alostérico que produciría un cambio conformacional sobre el sitio activo, y por otro en el propio sitio activo, que con la nueva conformación es capaz de interactuar con el betalactámico. 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 [160].

Cabe destacar que existe otra resistencia a metecilina no mediada por el *mecA*. En el año 2007 se describen los primeros aislamientos de MRSA *mecA* negativos, obtenidos de ganado, (con *mecA* LGA251) que posteriormente serían conocidos como *mecC*. Este tipo diferente de gen *mec* se encuentra dentro de un *cassette cromosómico* al que se lo designó como tipo XI. El gen *mecC* codifica una transpeptidasa con una homología aminoacídica cercana al 68% con la PBP2a codificada por *mecA*. Sin embargo presenta diferencias importantes con respecto a ésta. Desde el punto de vista funcional, es capaz de mantener la viabilidad del microorganismo que la porta aún en ausencia de la PBP2 nativa [161]. Con respecto al perfil de resistencia que confiere, es mayor el nivel de

resistencia a cefalosporinas que a ampicilinas y penicilinas, esto puede manifestarse como resultados discordantes (en las determinaciones microbiológicas de laboratorio) entre la determinación de sensibilidad a oxacilina y cefoxitina, ya que puede dar resistencia a cefoxitin y sensibilidad a oxacilina [161].

4.9.2 VANCOMICINA

La **vancomicina** es un glicopéptido, que actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular por unión a las subunidades D-Ala-D-Ala en los monómeros del péptidoglicano de microorganismos Gram (+). Este antimicrobiano ha sido el pilar (desde su introducción en 1958) del tratamiento de las infecciones graves por MRSA [136]

El aumento en la prevalencia de MRSA en las infecciones tanto hospitalarias como adquiridas en la comunidad condujo al incremento en el uso de vancomicina y, como resultado, las cepas de MRSA comenzaron a desarrollar mecanismos de resistencia. El Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) define 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 $\mu\text{g/ml}$. Los aislamientos con una CIM entre 4 y 8 $\mu\text{g/ml}$ se consideran como de sensibilidad intermedia (VISA) a la vancomicina y aquellos con una CIM ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$, como resistentes (VRSA) (CLSI 2016).

Por otra parte, entre las cepas sensibles (CIM ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$) existe un grupo que exhibe la denominada heterorresistencia a la vancomicina y que es difícil de identificar, ya que la resistencia se observa en subpoblaciones cuya CIM alcanza valores de entre 4 y 8 $\mu\text{g/ml}$. El primero de estos aislamientos (Mu3) fue recuperado de una muestra de esputo en un paciente de 64 años con neumonía que no respondió al tratamiento con vancomicina y que presentaba una subpoblación celular (frecuencia 10^5 - 10^6) con una CIM intermedia a vancomicina.

En 1997, se reportó en Japón la primera cepa con resistencia intermedia a vancomicina (VISA) con una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 8 $\mu\text{g/ml}$ (145) y en el año 2002 se reporta, en EE.UU el primer aislamiento resistente con una CIM >32 $\mu\text{g/ml}$ [162].

Los fenotipos de resistencia o sensibilidad reducida a vancomicina pueden deberse a:

- la presencia del gen *vanA* transferido a *Staphylococcus aureus* a través de plásmidos conjugativo que transportan el *Tn 1546* desde el *Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE). Las cepas con este mecanismo son consideradas resistentes a vancomicina (VRSA).

El gen *vanA*, procedente de *Enterococcus spp*, codifica una enzima que sustituye la alanina por lactato en el dipéptido terminal d-ala-d-ala. La afinidad de los glucopéptidos por este producto resultante es mucho menor que por el compuesto original, lo que resulta en un aumento de la CIM (≥ 16 mg/L) (VRSA). 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 [159]. Sin embargo, a la fecha, se han publicado 15 casos de VRSA la mayoría en los Estados Unidos con once casos, dos en India, uno en Irán, y otro, recientemente, en Brasil [163]. Este último caso atañe a un aislamiento recuperado de sangre, perteneciente al clon ST8-USA-300 variante Latinoamericana (USA300-LV) ampliamente diseminado principalmente en las regiones del norte y noroeste de Sudamérica. Lo inquietante de este caso, por su impacto, es que del mismo paciente se ha recuperado el primer aislamiento portando el gen *van A* en un *S.aureus* meticilino-sensible (MSSA-VRSA) [164]. Además es importante destacar que este MSSA-VRSA pertenece al linaje ST5, distinto del aislamiento MRSA-VRSA del linaje ST8 (indicado en el párrafo anterior) aunque ambos son portadores del mismo plásmido de estafilococo altamente transferible y estable, lo que indicaría una preocupante adaptación al medio [164].

- ii) la existencia de un engrosamiento de la pared bacteriana.

Este mecanismo es detectado en las cepas de *S. aureus* VISA y h-VISA, en el mismo se produce un aumento del grosor de la pared bacteriana por disminución de la velocidad de recambio del peptidoglicano debido a una reducción de la actividad autolítica y/o una disfunción del locus *agr* [159, 165]. Además, el número de enlaces cruzados entre las cadenas de peptidoglicano disminuye, originando un aumento de residuos d-alanil-d-alanina libres y un engrosamiento de la pared. Los residuos libres atraparían a las moléculas de vancomicina impidiendo, así, que, alcancen su sitio de acción [159].

En el caso de la h-VISA la exposición a vancomicina de las mismas puede seleccionar la población con resistencia intermedia (VISA) y conducir al fracaso del tratamiento (142). Si bien su significado clínico aún se discute, hay autores que demostraron la falta de eficacia de la vancomicina en infecciones invasivas producidas por estos microorganismos (149,150).

4.9.3 LINEZOLID

Es un antimicrobiano del grupo de las oxazolidinonas, es bacteriostático, inhibe el inicio de la síntesis de proteínas bacterianas en el ribosoma 50S. 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*.

Linezolid disminuye la producción de factores de virulencia como LPV, las enterotoxinas A y B, autolisinas y hemolisinas α y β , super-antígeno; el efecto probablemente es debido a la inhibición de la síntesis proteica [166].

Los mecanismos de resistencia a linezolid parecen ser variados y pueden deberse 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*) 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]. Este tercer mecanismo es el único transferible. El gen *cfr*, generalmente, está asociado a elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones y ha sido descrito en diferentes especies bacterianas como *E. faecalis* y *Bacillus spp* recuperadas de cerdos y bovinos respectivamente [167].

4.9.4 TIGECICLINA

Tigeciclina es un derivado semisintético de minociclina (tetraciclina), capaz de ligarse 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.

Tigeciclina es activa contra la mayoría de los aislamientos de *S. aureus* que son resistentes a la tetraciclina.

El mecanismo de resistencia a Tigeciclina es poco conocido y para los organismos Gram-positivos, incluyendo MRSA, no se han identificado aislamientos de origen natural con disminución de la susceptibilidad para este antimicrobiano [168].

4.9.5 DAPTOMICINA

La Daptomicina es un lipopéptido, una molécula que requiere calcio para solubilizarse en forma de micelas de octámero en las fases líquidas. En los microorganismos Gram (+), la Daptomicina muestra difusión a través del peptidoglicano y hacia la membrana plasmática, en donde se dispersan los iones de calcio. La interacción de daptomicina-calcio con la membrana celular bacteriana, cuya carga es usualmente negativa debido a los grupos fosfato en los fosfolípidos, genera una perturbación fisiológica y estructural que lleva a la muerte celular [136].

La resistencia obedece a la existencia de varias mutaciones de un solo nucleótido en diferentes genes como *mprF* (*multiple peptide resistance factor*) e *ycyG* (gen de una histidina cinasa de múltiples funciones, que influye en la biosíntesis de los ácidos grasos de membrana) Cada mutación muestra cambios fenotípicos consistentes en engrosamiento y alteraciones de la fluidez de la pared bacteriana y aumento de la carga positiva de la superficie.

Los efectos bactericidas de daptomicina hacen a este antimicrobiano útil para el tratamiento de las infecciones causadas por MRSA, incluyendo las que afectan la piel y tejidos blandos, la bacteriemia y la endocarditis del lado derecho. Por otro lado, presenta limitaciones como son una única vía de administración (la intravenosa) y la inactivación del antimicrobiano por el surfactante pulmonar, impidiendo su empleo en la neumonía [169].

Se sugiere que el aumento en el espesor de la pared celular observado en cepas VISA Está relacionado con la resistencia cruzada a la daptomicina. Este antibiótico es una molécula muy grande y presentaría dificultad para penetrar en la célula [170].

Debido a que varias publicaciones han mostrado una relación directa entre el aumento en la CIM de vancomicina (CIM ≥ 2 ug /ml) y el aumento concomitante en la CIM a daptomicina, si se emplea daptomicina como terapia de rescate ante la falla de tratamiento con vancomicina, se recomienda realizar la CIM a daptomicina pre e intra tratamiento, para evaluar si hay cambios en el perfil de sensibilidad [159].

5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El éxito epidemiológico de los diferentes clones de *Staphylococcus aureus* se considera asociado a la combinación de un background de resistencia antibiótica con un extraordinario arsenal de factores de virulencia que le permitirían, a este microorganismo, provocar desde infecciones de diversa gravedad hasta la colonización de individuos sanos y/o la persistencia en el medio ambiente desde donde puede servir como un reservorio para la transmisión y propagación.

A través de diferentes técnicas de epidemiología a molecular se ha podido establecer que la mayoría de los clones MRSA diseminados mundialmente pertenecen a 5 linajes genético principales (CC5, CC 8, CC22, CC30, CC45). En Argentina, a partir de un estudio de vigilancia realizado en Córdoba desde el año 1999, 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 identificado en nuestro laboratorio (125). Posteriormente en el año 2005 se detecta la emergencia de un nuevo clon en la comunidad identificado por nuestro grupo como clon epidémico CA-MRSA del mismo linaje (ST5) que el clon epidémico hospitalario, pero con el *cassette cromosomal IV*, sugiriendo la emergencia de ambos, a partir de un clon ancestral de MSSA ST5 exitoso (123). En el año 2007 se encontró a este clon CA-MRSA ST5- SCCmec-IV- β 311 en pacientes pediátricos que tuvieron relación con el ambiente hospitalario en el año previo, lo que indirectamente indica que el mismo estaría siendo introducido en los hospitales. La eventual diseminación de este clon CA-MRSA en la comunidad y en los hospitales planteó un desafío para la salud pública, si se considera que la población hospitalizada es particularmente vulnerable y estas cepas CA-MRSA presentan alta virulencia, elevada tasa de ataque, transmisibilidad y el potencial genético para adquirir multirresistencia. De esta manera CA-MRSA tiene un elevado potencial para ocasionar una mayor morbi-mortalidad, y, asociado a ello, un significativo incremento de los costos asistenciales.

6 HIPÓTESIS

Con los antecedentes anteriormente expuestos, planteamos como hipótesis que la prevalencia de infecciones por CA-MRSA a nivel nacional podría ser superior a la detectada como promedio en el año 2008, en Córdoba (16%), y que el clon epidémico: CA-MRSA ST5-SCC mec IV-t311 sería el predominante, diseminado en todo el territorio argentino tanto en la comunidad como en los hospitales. Este clon presentaría características particulares diferentes del resto de los clones diseminados en el mismo ambiente (relacionada a biofilm y/o a persistencia) para poder establecerse como reservorio en un área determinada desde donde podría transmitirse y/o permanecer en el tiempo.

Consecuentemente el interrogante que surge es: ¿existe alguna característica particular (relacionada a biofilm o persistencia en el ambiente) que lo diferencie del resto de los clones de MRSA que le permita establecerse y desplazar a los demás clones en un ambiente determinado como la comunidad o el hospital?

7 OBJETIVOS GENERALES

Son objetivos generales de esta tesis:

I- Determinar el impacto epidemiológico actual de las infecciones por CA-MRSA, en la República Argentina

II- Analizar estrategias de virulencia y/o transmisibilidad de los diferentes clones y su posible asociación con epidemidad (supervivencia en superficies inertes y formación de biofilm)

7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A fin de abordar el objetivo general I se propusieron cuatro objetivos específicos (*Ia-Ie*) y para el objetivo general II se propusieron tres objetivos específicos (*Ila-IIc*).

Los mismos son desarrollados a continuación:

7.1.1 PRIMERA PARTE (Objetivo General I)

la- Establecer la PREVALENCIA GLOBAL nacional de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) en infecciones asociadas al ámbito hospitalario (HA-MRSA) y a la comunidad (CA-MRSA).

lb- Analizar las características moleculares y la susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de *S. aureus* resistente a meticilina asociados a la comunidad (CA-MRSA) y aquellos asociados a la atención sanitaria (HA-MRSA).

7.1.2 SEGUNDA PARTE (Objetivo General I)

lc- Analizar las características sociodemográficas y clínicas, en nuestro medio, de las infecciones causadas por MRSA (CA-MRSA_G vs HA-MRSA_G) y MSSA en sus diferentes localizaciones y sitio de comienzo (comunidad u hospital) en pacientes pediátricos y adultos para establecer los factores de riesgo para infecciones por CA-MRSA_G en Argentina.

ld- Identificar y comparar las características moleculares y clínicas de los genotipos CA-MRSA_G, que producen infecciones de inicio en la comunidad con aquellas responsables de infecciones de inicio en el Hospital, para evaluar el impacto de la entrada de estos genotipos a nivel hospitalario.

7.1.3 TERCERA PARTE (Objetivo General I)

le- Determinar genéticamente la relación evolutiva de los genotipos CA-MRSA_G, con clones de *S. aureus* meticilino sensibles (MSSA) detectados en nuestro país.

7.1.4 CUARTA PARTE (Objetivo General II):

Ila- Evaluar la proporción de supervivencia en una superficie inerte (melamina) entre diferentes clones MRSA epidémicos

Ilb- Evaluar en clones MRSA epidémicos la expresión diferencial de genes relacionados a la adhesión, biofilm y expresión de reguladores globales en *S. aureus* durante la persistencia en una superficie inerte.

Ilc- Evaluar en clones MRSA epidémicos la expresión diferencial de genes relacionados a la adhesión, biofilm y expresión de reguladores globales en *S. aureus* en el estado de biofilm

8 RESULTADOS

9 RESULTADOS PRIMERA PARTE

9.1 OBJETIVO GENERAL

I- Determinar el impacto epidemiológico actual de las infecciones por CA-MRSA, en la República Argentina

9.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

la-Establecer la PREVALENCIA GLOBAL nacional de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) en infecciones asociadas al ámbito hospitalario (HA-MRSA) y a la comunidad (CA-MRSA).

lb-Analizar las características moleculares y la susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de *S. aureus* resistente a meticilina asociados a la comunidad (CA-MRSA) y aquellos asociados al hospital (HA-MRSA).

9.2 la Resultados

9.2.1 Diseño del estudio, características de los Hospitales y datos de incidencia

Como se describe en detalle en Materiales y Métodos, 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 noviembre de 2009 en 66 hospitales de 20 provincias y la Ciudad de Buenos Aires (CABA), 46 Hospitales pertenecieron a la Red WHONET Argentina. En la siguiente tabla se indican, además de las características de los Hospitales, la incidencia de las infecciones causadas por CA-MRSA_G y HA-MRSA_G y la ubicación de los 66 hospitales por regiones (Norte, Centro y Sur) en el país (Tabla 1A).

RESULTADOS PRIMERA PARTE

Tabla 1A: Características, incidencia de las infecciones causadas por genotipos (CA-MRSA_G y HA-MRSA_G) y ubicación de 66 hospitales de 20 provincias y la ciudad de Buenos Aires, Argentina por regiones (Norte, Centro y Sur), noviembre de 2009.

Hospitales	Regiones	Provincias	no. de camas	no. de admisiones	no. de visitas ^a	CA-MRSA _G		HA-MRSA _G		MRSA	
						Número	Incidencia ^b	Número	Incidencia ^b	Número	Incidencia ^b
1	Norte	Corrientes	120	425	4,785	2	41.8	1	20.9	3	62.7
2	Norte	Formosa	155	402	9,628	29	301.2	2	20.8	31	321.9
3	Norte	Catamarca	249	555	3,838	4	104.2	0	0	4	104.2
4	Norte	Tucuman	200	737	8,121	4	49.2	0	0	4	49.2
5	Norte	Catamarca	100	320	9,408	3	31.9	0	0	3	31.9
6	Norte	Chaco	260	951	24,636	7	28.4	1	4.1	8	32.5
7	Norte	La Rioja	289	841	14,096	2	14.1	2	14.8	4	28.4
8	Norte	Salta	250	921	16,260	5	30.7	2	12.3	7	43.1
9	Norte	Jujuy	110	472	10,970	3	27.3	0	0	3	27.3
10	Norte	Corrientes	149	557	10,685	3	28.1	0	0	3	28.7
Norte Total			1,882	6,181	112,427	62	55.1	8	7.1	70	62.3
11	Centro	Santa Fe	170	1,250	7,230	1	13.8	0	0	1	13.8
12	Centro	Provincia de Buenos Aires	230	699	17,542	3	17.1	4	22.8	7	39.9
13	Centro	Ciudad autónoma de Buenos Aires	406	1,061	121,358	3	2.5	2	1.6	5	4.1
14	Centro	Entre Ríos	260	958	12,847	1	7.8	3	23.4	4	31.1
15	Centro	Provincia de Buenos Aires	307	803	38,675	5	12.9	4	10.3	9	23.3
16	Centro	Ciudad autónoma de Buenos Aires	198	1,097	18,782	3	15.9	0	0	3	15.9
17	Centro	Santa Fe	183	534	17,223	3	17.4	2	11.6	5	29
18	Centro	Ciudad autónoma de Buenos Aires	78	316	11,105	1	9	3	27.1	4	36.1
19	Centro	Ciudad autónoma de Buenos Aires	501	1,782	30,953	17	54.9	2	6.5	19	61.4
20	Centro	Santa Fe	180	1,520	16,667	4	23.9	0	0	4	24
21	Centro	Ciudad autónoma de Buenos Aires	350	904	41,511	8	19.3	0	0	8	19.3
22	Centro	Ciudad autónoma de Buenos Aires	323	1,158	60,102	5	8.3	5	8.3	10	16.6
23	Centro	La Pampa	212	228	12,732	3	23.6	2	15.7	5	39.3
24	Centro	La Pampa	188	678	14,361	1	6.9	3	20.9	4	27.8

RESULTADOS PRIMERA PARTE

25	Centro	San Juan	290	556	20,946	2	9.5	1	4.8	3	14.3
26	Centro	Córdoba	228	990	25,730	3	11.7	0	0	3	11.6
27	Centro	Provincia de Buenos Aires	114	769	43,519	2	4.6	0	0	2	4.6
28	Centro	Santa Fe	118	541	13,864	4	28.9	0	0	4	28.9
29	Centro	Córdoba	70	285	10,275	2	19.5	0	0	2	19.5
30 ^c	Centro	Buenos Aires	0	0	1,119	2	200	0	0	2	200
31	Centro	Buenos Aires	150	390	12,801	1	7.9	2	15.6	3	23.4
32	Centro	Ciudad autónoma de Buenos Aires	311	330	12,809	10	78.1	4	31.2	14	109.3
33	Centro	Mendoza	260	1,402	24,448	2	8.2	1	4.1	3	12.3
34	Centro	Buenos Aires	360	780	11,055	1	9.1	3	27.1	4	36.2
35	Centro	Buenos Aires	300	1216	27,938	8	28.6	2	7.2	10	35.8
36	Centro	Provincia de Buenos Aires	490	1,535	50,481	11	21.8	4	7.9	15	29.7
37	Centro	Córdoba	80	253	5,380	5	92.3	1	18.6	6	111.5
38	Centro	Córdoba	108	863	27,771	2	7.2	0	0	2	7.2
39	Centro	Provincia de Buenos Aires	148	191	9,337	7	74.9	2	21.4	9	96.4
40	Centro	Córdoba	136	774	12,553	1	7.9	2	15.9	3	23.9
41	Centro	Córdoba	81	256	5,078	1	19.7	2	39.4	3	59.1
42	Centro	Córdoba	216	719	9,119	1	10.9	2	21.9	3	32.9
43	Centro	Córdoba	90	324	4,309	3	69.6	2	46.4	5	116.1
44	Centro	Córdoba	180	990	63,990	1	1.6	1	1.6	2	3.1
45	Centro	Córdoba	181	946	24,808	2	8.1	2	8.1	4	16.1
46	Centro	Córdoba	36	218	4,731	1	21.1	2	42.3	3	63.4
47	Centro	Córdoba	81	271	5,816	1	17.2	0	0	1	17.2
48	Centro	Córdoba	144	345	10,941	1	9.1	1	9.1	2	18.3
49	Centro	Córdoba	60	173	6,863	1	14.6	0	0	1	14.6
50	Centro	Córdoba	84	723	12,493	1	8	2	16.1	3	24
51	Centro	Córdoba	106	503	20,413	1	4.9	1	4.9	2	9.8
52	Centro	Ciudad autónoma de Buenos Aires	187	1,681	46,075	3	6.5	2	4.3	5	10.9
53	Centro	Ciudad autónoma de Buenos Aires	238	1574	55,056	4	7.3	5	9.1	9	16.3
54	Centro	Ciudad autónoma de Buenos Aires	180	748	77,725	2	2.6	0	0	2	2.6
55	Centro	Provincia de Buenos Aires	259	1,111	18,819	3	15.9	0	0	3	15.9
56	Centro	Santa Fe	78	524	5,901	1	16.9	0	0	1	16.9
57	Centro	Provincia de Buenos Aires	170	355	113,948	3	2.6	1	0.9	4	3.5

RESULTADOS PRIMERA PARTE

58	Centro	Ciudad autónoma de Buenos Aires	269	1,439	7,259	3	41.3	0	0	3	41.3
59	Centro	Ciudad autónoma de Buenos Aires	120	1,145	23,499	2	8.5	0	0	2	8.5
	Centro Total		9,509	37,908	1,247,957	156	12.5	75	6.01	231	18.5
60	Sur	Rio Negro	92	339	12,653	1	7.9	1	7.9	2	15.9
61	Sur	Santa Cruz	72	307	10,520	1	9.5	1	9.5	2	19.0
62	Sur	Neuquen	277	927	22,239	2	8.9	4	17.9	6	26.9
63	Sur	Tierra Del Fuego	95	394	14,904	1	6.7	1	6.7	2	13.4
64	Sur	Tierra Del Fuego	84	319	19,029	1	5.2	1	5.2	2	10.5
65	Sur	Santa Cruz	223	633	29,945	3	10	1	3.3	4	13.3
66	Sur	Chubut	87	321	14,831	2	13.4	1	6.7	3	20.2
	Sur Total		930	3,240	124,121	11	8.9	10	8.1	21	16.9
	TOTAL		12,321	47,329	1,484,505	229	15.4	93	6.2	322	21.7
<i>P</i> value	Norte vs						<0.0001				<0.0001
OR	Centro						4.41	0.64			3.36
(95% CI)							(3.29-5.92)				(2.58-4.39)
	Norte vs						<0.0001				<0.0001
	Sur						6.23	0.79			3.68
							((3.32-11.65)				(2.27-5.97)

^a.Número de visitas: incluye atención ambulatoria, servicio de emergencia y admisiones durante noviembre de 2009.

^b Incidencia: Número de casos / 100.000 visitas mensuales (noviembre).

^c Sólo tiene centro ambulatorio

9.2.2 Prevalencia de las Infecciones por MRSA, en la comunidad y en el ámbito hospitalario

Durante el período de estudio de 1 mes de vigilancia (noviembre de 2009) la población atendida en los 66 hospitales fue de 1.484.505 visitas y 47.329 internaciones.

En ese mes se obtuvieron un total de 591 aislamientos clínicos de *S. aureus* de los cuales 225 fueron niños (<19 años) (38%) y 248 fueron mujeres (42%). La mediana de la edad de los pacientes fue de 30 años (rango: 1 mes a 96 años).

Entre los 591 casos totales, 322 fueron MRSA (55%) y 375 fueron infecciones de inicio en la comunidad (CO) (63%) (Figura 8 y Figura 10). La proporción de MRSA difirió significativamente ($P= 0,045$) entre las infecciones de inicio en la comunidad (CO, 58%, 216/375) y las de inicio en el hospital (HO, 49%, 106/216), particularmente en niños (62%, 99/160 en infecciones CO vs 43 %, 28/65 en infecciones HO, $P= 0,01$). Es decir, se observó un desplazamiento de la Resistencia a Meticilina hacia la comunidad. Este dato es destacable ya que, en Argentina, la resistencia a Meticilina siempre estuvo confinada al ambiente hospitalario.

Un total de 266 pacientes presentaron infecciones de piel y tejidos blandos (SSTI, 45%) y entre estos, la proporción de MRSA fue del 62% (164/266).

Según los criterios del CDC (116), 222 casos (38%) de las infecciones fueron clasificados como asociadas a la comunidad (CACO): 61% CACO-MRSA (n: 136) y el 39% CACO-MSSA (n: 86); 153 casos (26%) como asociadas a la atención sanitaria y de inicio en la comunidad o HACO: 52% HACO-MRSA (n: 80) y 48% HACO-MSSA (n: 73) y 216 (36%) como asociadas a la atención sanitaria y de inicio en el hospital o HAHO: 49% HAHO-MRSA (n: 106) y 51% HAHO-MSSA (n: 110) (Figura 9). Por lo tanto, la proporción de MRSA difirió significativamente ($P= 0,01$) entre las infecciones asociadas a la comunidad (CA, 61%) y aquellas asociadas a la atención sanitaria (HA, 50%) (Figura 9).

PREVALENCIA DE INFECCIONES SEGÚN EL SITIO DE INICIO



Figura 8.: proporción de las infecciones totales según el sitio de inicio: Hospital (indicado en color violeta) y Comunidad (indicada en color celeste).

PROPORCIONES RELATIVAS DE MRSA y MSSA

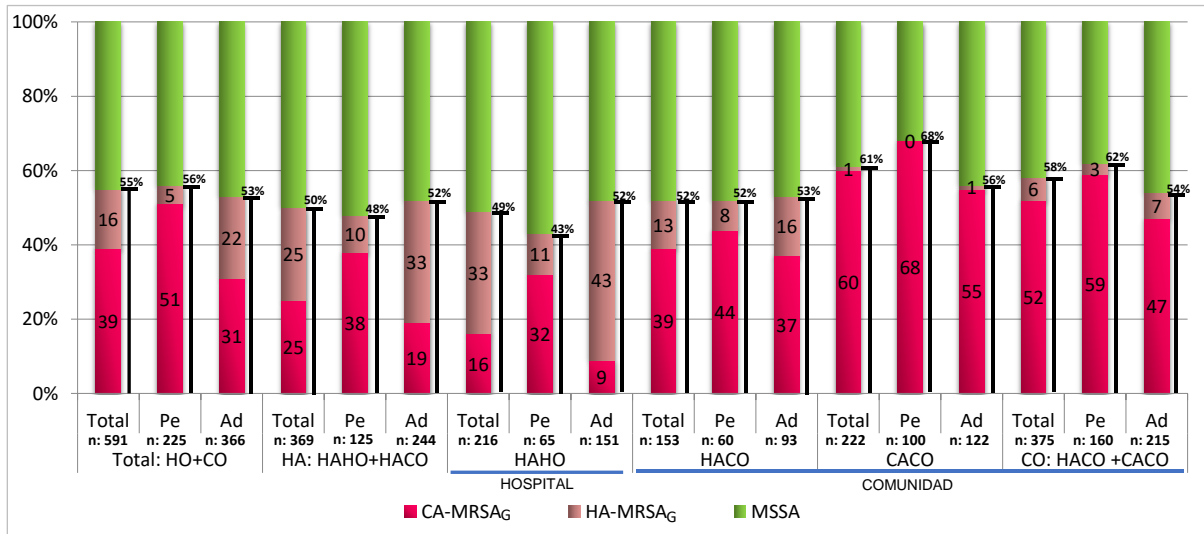


Figura 9: Proporciones relativas de MSSA y MRSA (incluyendo CA-MRSA_G y HA-MRSA_G) del total de infecciones por *S. aureus* estratificadas por criterios epidemiológicos y el lugar de inicio de las infecciones, en toda la población, en pediatría (Pe) y en adultos (Ad). **CA-MRSA_G** y **HA-MRSA_G** Genotipos de *S. aureus* resistentes a la meticilina asociados a la comunidad (CA) y asociados a la atención sanitaria (HA); **CACO**, infecciones asociadas a la comunidad y de inicio en la comunidad, **HA**, infecciones asociadas a la atención sanitaria que incluye: **HACO**, asociadas a la atención sanitaria de inicio en la comunidad y **HAHO** asociadas a la atención sanitaria de inicio en el hospital.

9.2.3 Genotipos de MRSA: CA-MRSA_G y HA-MRSA_G por criterio epidemiológico, grupo de edad y región geográfica.

La combinación de los resultados obtenidos por todos los métodos de caracterización molecular utilizados mostró que la mayoría de los MRSA (229/322 aislamientos) se clasificaron como CA-MRSA_G, (71%) mientras que 93 como HA-MRSA_G (29%) (Tabla 2).

Teniendo en cuenta todos los casos de infecciones por *S. aureus* (n: 591), 39% (n: 229) fueron causadas por CA-MRSA_G y el 16% (n: 93) por HA-MRSA_G (Figura 9). Además, la tasa global de MRSA fue de 21,7- (rango 2.6-321,9) casos / 100.000 visitas mensuales, siendo la de CA-MRSA_G de 15,4 (rango 2,5 a 301,4) y la de HA-MRSA_G 6.2 (rango 0-46,4) casos / 100.000 visitas mensuales (Tabla 1A).

En cuanto a las infecciones de inicio en la comunidad o CO por *S. aureus* (n: 375 casos): 52% (n: 195) fueron causadas por CA-MRSA_G y 6% (n: 21) por HA-MRSA_G, en cambio aquellas de inicio en el hospital o HO (n: 216 casos), 16% (n: 34) fueron

causadas por CA-MRSA_G y 33% (n: 72), por HA-MRSA_G. Por lo tanto la mayor proporción de infecciones por MRSA en la comunidad (58%, 216/375) que en el hospital (49%, 106/216) está relacionada a la mayor proporción de infecciones causadas por los genotipos CA-MRSA_G (Figura 9).

Por otra parte, al analizar los datos según el criterio del CDC (116), se detectó que, del total de infecciones CACO (n: 222), los genotipos CA-MRSA_G representaron el 60,5% (n: 135) y los HA-MRSA_G el 0.5% (n: 1). Así mismo, entre las infecciones HACO (n: 153), el 39% (n: 60) fueron causadas por CA-MRSA_G y el 13% (n: 20) por HA-MRSA_G. Notablemente, entre las infecciones hospitalarias HAHO (n: 216), el 16% (n: 34) fueron producidas por CA-MRSA_G y sólo el 33% (n: 72) por HA-MRSA_G. Entonces, entre las infecciones por *S. aureus* asociadas a la salud (HACO y HAHO, n: 369), CA-MRSA_G y HA-MRSA_G representaron aproximadamente el 25% para cada uno (n: 94 y 92, respectivamente). Además, el 31% (60/195) de los pacientes con infecciones de inicio en la comunidad causadas por cepas con genotipo CA-MRSA_G tuvieron al menos un factor de riesgo asociado al hospital o HRF (infecciones HACO).

Otro aspecto analizado fue la relación entre estas infecciones y la edad de los pacientes. La proporción relativa de infecciones causadas por CA-MRSA_G difirió significativamente entre Pediatría (<19 años) y adultos, en el total de infecciones por *S. aureus* (51% vs 31%, $P < 0,0001$), tanto en las infecciones asociadas al hospital (HACO y HAHO) (38% vs 19%, $P = 0,0001$) y en aquellas asociadas a la comunidad (68% vs 55%, $P = 0,045$) (Figura 9). La mayoría de las infecciones por CA-MRSA_G ocurrieron en pacientes pediátricos (<19 años), tanto en el entorno de la comunidad (48%) como en el ámbito hospitalario (62%) (Figura 10). Cabe destacar, que entre los pacientes con infecciones por CA-MRSA_G de inicio en el hospital (HO), el 47% fue <1 año de edad, en comparación con el 4% de pacientes < de 1 año afectados por CA-MRSA_G entre las infecciones de inicio en la comunidad (CO) (Figura 10).

PROPORCIONES RELATIVAS DE INFECCIONES CAUSADAS POR: CA-MRSA_G, HA-MRSA_G Y MSSA ESTRATIFICADOS POR GRUPOS ETARIOS

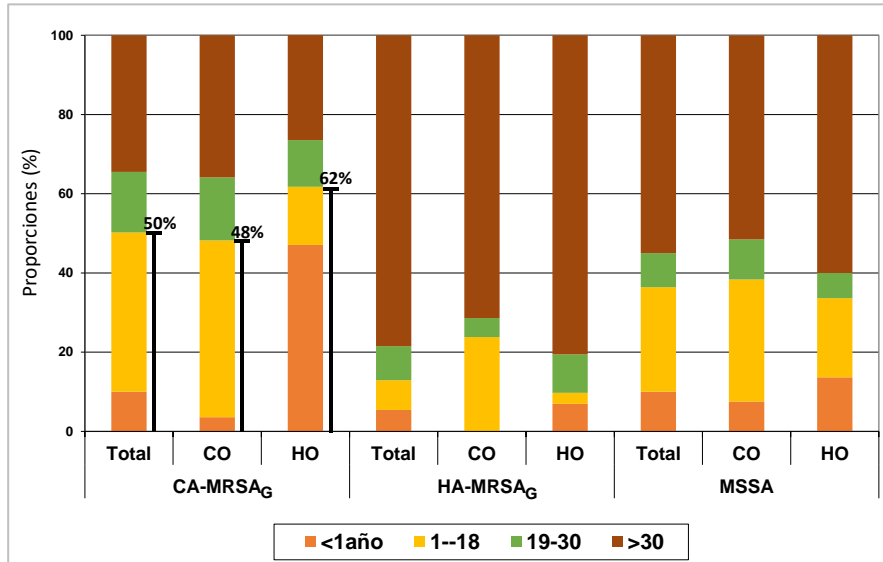


Figura 10: En la figura se muestran las proporciones relativas de las infecciones causadas por los genotipos CA-MRSA_G, HA-MRSA_G y MSSA estratificados por grupos etarios, en el total de infecciones, en aquellas de inicio en la comunidad (CO) y en las de inicio en el hospital (HO), Argentina, 2009.

Con el propósito de evaluar la prevalencia de 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 11.): Norte (8 provincias, 10 hospitales, 86 aislamientos), Centro (7 provincias y la ciudad de Buenos Aires, 49 hospitales, 433 aislamientos) y Sur (5 provincias, 7 hospitales, 72 aislamientos). Observándose que no hubo un único comportamiento de diseminación de MRSA, sino que la proporción de MRSA difirió significativamente desde el norte (81%) a las regiones centrales (53%) y al sur (29%) de Argentina ($P < 0,0001$). Este hallazgo estuvo fuertemente asociado a la propagación de los genotipos CA-MRSA_G ya que la proporción de los mismos fue estadísticamente diferente ($P < 0,0001$) entre el Norte y el Sur del país (72% vs 16%, respectivamente), mientras que la proporción de infecciones por el genotipo HA-MRSA_G fueron similares entre las dos regiones ($P = 0,08$) (Figura 11).

Del mismo modo, la tasa general de infecciones por MRSA fue 3,6 veces mayor en el Norte que en el Sur del país [62,3 casos (rango 27,3-321,9) vs 16,9 casos (rango 10,5-26,9) / 100.000 visitas mensuales, respectivamente] ($P < 0,0001$). Este hecho se asoció

con una tasa de CA-MRSA_G 6,2 veces mayor en el norte que el sur [55,1 (rango 14,1-301,2) casos vs 8.9 (rango 5,2-13,4) casos / 100.000 visitas mensuales, respectivamente] ($P < 0,0001$), mientras que las incidencias de infecciones HA-MRSA_G fueron comparables entre estas regiones (Tabla 1A).

PREVALENCIA DE TIPOS CLONALES S/ SITIO DE INICIO DE LA INFECCIÓN Y

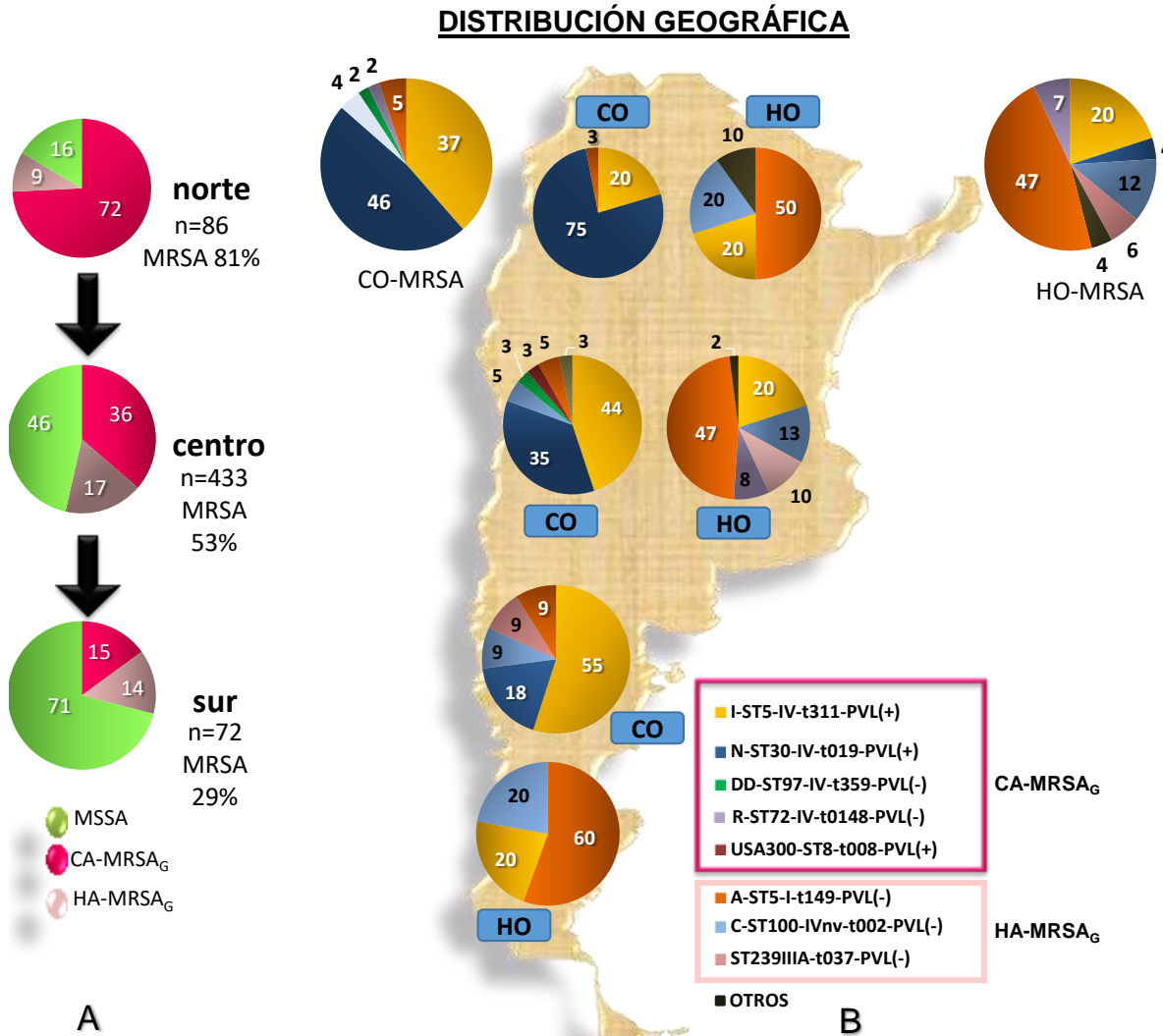


Figura 11: A-(izquierda) Prevalencia de CA-MRSA_G, HA-MRSA_G y MSSA según las regiones (norte, centro y sur) de Argentina. **B-(derecha)** Distribución de los clones de MRSA más frecuentes en la comunidad (CO) indicadas a la izquierda del mapa con rótulo celeste y en el hospital (HO) a la derecha indicadas con rótulo celeste. Abajo a la derecha se indican los clones de cada genotipo.
 CA-MRSA_G: Genotipos de *S. aureus* resistente a la meticilina asociadas a la comunidad.
 HA-MRSA_G: Genotipos de *S. aureus* resistente a la meticilina asociadas a la atención sanitaria.
 MSSA: *S. aureus* susceptible a meticilina.

9.3 Ib Resultados

9.3.1 Caracterización molecular de las cepas

En la Tabla 2 (página 66) 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. Además, en la Tabla 3 se muestra la distribución de los genotipos más predominantes de aislamientos de MRSA implicados en infecciones invasivas y no invasivas para toda la población estratificados por grupos etarios y de acuerdo con el tipo de inicio de las infecciones (comunidad u hospital).

La mayoría de los aislamientos CA-MRSA_G (n: 206, 90%) pertenecieron a dos clones principales (Figura12). Representando una prevalencia del 45 %, aproximadamente, para cada uno de ellos: PFGE tipo N-ST30-IV (n: 104) y el tipo PFGE I-ST5-IV (n: 102), que representaron el 33% y el 31% de todos los MRSA, 46% y 37% de las infecciones por CO-MRSA y el 4% y el 20% de las infecciones HO-MRSA, respectivamente (Tabla 3). Los restantes aislamientos CA-MRSA_G pertenecieron a los siguientes genotipos: R-ST72-IV (n: 10, 4%), USA300 ST8-IV (n: 5, 2%), D-ST97-IV c (n: 3, 1,5 %), G-ST88-IVG, Q-ST1649-IVc (SLV de ST6), F-ST1-VV (5C2), V-ST1210-IVE y V-ST121-VV (un aislamiento cada uno) (Tablas 2 y 3).

Los aislamientos CA-MRSA_G relacionados por PFGE a la cepa epidémica MRSA USA300 (n: 5) pertenecieron al ST8, CC8, *spa*-t008 y *agr* 1. Dos de estos aislamientos se asociaron con el *SCCmec* IVc y compartieron el perfil de genes de virulencia *pvl*- *lukDE-sek-seq-bsa*. En un aislamiento fue detectado el *SCCmec* IVb y los genes *lukDE-sea-sec-bsa*. Otro aislamiento del genotipo USA300 fue asociado al *SCCmec* V y albergó a los genes *pvl-lukDE-bsa*. Sólo una cepa con *SCCmec* IVa, llevando *lukDE-sek-seq-bsa*, también albergó el gen *arcA* que es un indicador de la presencia locus ACME 1, el cual, tal como se mencionó en la Introducción, ha sido detectado en la mayoría de los clones USA300

Clones CA-MRSA menores, es decir como causantes de infecciones en menor proporción o esporádicos también fueron detectados y sus características moleculares se incluyeron en la Tabla 2.

La mayoría (66%, n: 61) de los aislamientos HA-MRSA_G estuvieron relacionados con el Clon Cordobes/Chileno, pulsotipo A, ST5-SCC*mec* I-t149. El segundo genotipo HA-MRSA_G más comúnmente identificado fue la variante argentina del Clon Pediátrico (pulsotipo C-ST100- SCC*mec* IVNv-t002) (23%, Tabla 2). Estos dos clones representaban el 18% y el 7% de todos los MRSA, el 5% y el 4% de las infecciones CO-MRSA y el 47% y el 12% de las infecciones HO-MRSA (Tabla 3).

Otros aislamientos HA-MRSA_G solamente representaron el 3% de todo los MRSA: a) Clon Brasileiro: 7 aislamientos caracterizados como B-ST239- SCC*mec*-IIIA y 1 aislamiento como B-ST2266 (nuevo ST, SLV de ST239) SCC*mec*-IIIA y b) 3 aislamientos caracterizados como E-ST5-SCC*mec*I-t12090 (nuevo tipo *spa*).

GEL DE ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO

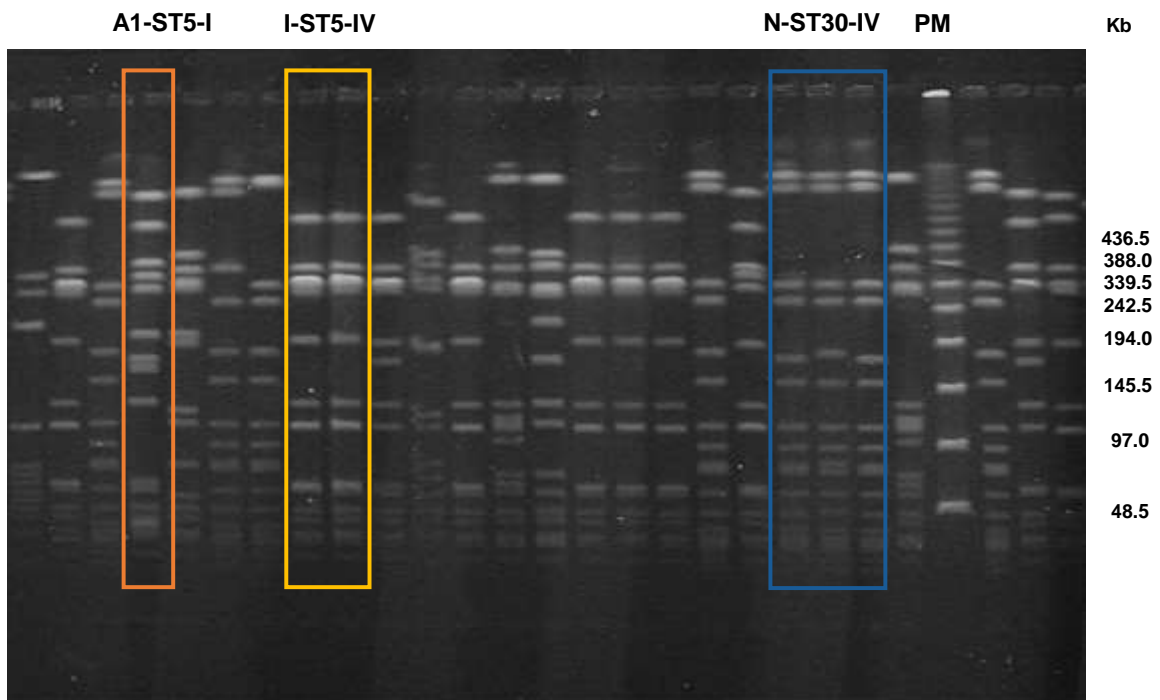


Figura 12: Gel de electroforesis en campo pulsado. Se observan patrones de bandas o pulsotipos de diferentes familias clonales. En los recuadros se señalan los principales clones detectados: HA-MRSA: A-ST5-I (recuadro anaranjado) CA-MRSA I-ST5-IV (recuadro amarillo), CA-MRSA N-ST30-IV (recuadro azul).

RESULTADOS PRIMERA PARTE

Tabla 2: CARACTERÍSTICAS DE AISLAMIENOS DE MRSA QUE PERTENECEN A GENOTIPOS HA-MRSA Y CA-MRSA, ARGENTINA

Background Genético	ST	PFGE tipo/no. (%)	PFGE Subtipo/no. (%) ^a	RIDOM spa tipo/ no. (%) ^a	SCCmec n.º (%) ^a	pvl n.º (%) ^a	agr tipo	Perfil de genes de virulencia ^b n.º (%)	Resistencia a ATB no-β-Lactámicos n.º (%) ^c
CA-MRSA n: 229									
CC30	30	N/ 104(45)	N4/73 (71), N6/10 (10), N17/7 (7), N13/6 (6) and 8 minor subtypes	t019: 102 (99), t021: 2 (1)	IVc: 103 (99) IVNT: 1	104 (100)	3	<i>egc-lukDE-bbp-cna</i>	GEN 12 (12), ERY 12 (12) ^d , CLi 7 (7) ^d , CLiC 1 (1), RIF 2 (2)
CC5	5	I/ 102(45)	I1/66 (64), I4/6 (6), I47/6 (6), I2/3 (3), I26/2 (2), I44/2 (2) and 17 minor subtypes	t311: 84 (82), t002: 17 (17), t2049: 1	IVa: 99 (96), IVc: 3 (3), Vv ¹ : 1	79 (77)		<i>sea-egc-lukDE 79 (77), egc-lukDE 23 (23)</i>	GEN 7 (7), ERY 29 (28) ^d , CLi 25 (24) ^d , CIP 2 (2), RIF1 (1), CHL1 (1)
CC8	72	R/ 10(4)	R1/5 (50), R4/2 (20) and 3 minor subtypes	t148: 5 (50), t1346: 4 (40), t3092: 1	IVNv1: 5 (50) IVc: 3 (30), IVa: 1, IVNT: 1	0 (0)	1	<i>egc-lukDE</i>	GEN 8, ERY 4, CLi 3
CC8	8	USA300/ 5(2)	USA300-5/2 (40) and 3 minor subtypes	t008: 5 (100)	IVc: 2 (40), IVb: 1, Vv ⁸ : 1 IVa: 1	4 (80)	1	<i>lukDE-sek-seq-bsa: 2 (40), lukDE-sea-sec-bsa: 1 (20), lukDE- bsa: 1 (20), lukDE-sek-seq-bsa-ACME: 1 (20)</i>	GEN 1, ERY 2, CLi 1
CC97	97	D/ 3(1.5)	DD1/2 (66) and 1 minor subtypes	t359, t267, t2734	IVc: 3 (100)	0	1	<i>lukDE</i>	GEN 1, ERY 2, CLi 1, CIP1
CC88	88	G/ 1	BB1	t186	IVg	0	3	<i>lukDE</i>	
CC6	1649 (SLV ST6)	Q/ 1	QQ1	t701	IVc	0	1	<i>lukDE-seb-bsa-cna</i>	
CC1	1	F/ 1	FF1	t127	Vv ⁸	1	3	<i>lukDE-seb-seh-bsa-cna</i>	GEN 1, CIP 1
CC121	1210	V/ 1	V1	t812	IVE	1	4	<i>egc-lukDE-seb-bbp-cna</i>	
CC121	121	V/ 1	V2	t159	Vv ⁸	0	4	<i>egc-lukDE-seb-bbp-cna-eta-etb</i>	
HA-MRSA n: 93									
CC5	5	A/ 61(66)	A4/8 (13), A15/6 (10), A5/4 (7), A3/4 (7), A10/3 (5), A8/2 (3), A42/2 (3), A71/2 (3), A85/2 (3), A86/2 (3) and 26 minor subtypes	t149 61(100)	I: 61 (100)	0 (0)	2	<i>egc-lukDE</i>	GEN 60 (98), ERY 60 (98), CLiC 59 (97), CLi 1 (1), CIP 58 (95), RIF 12 (20), CHL 4 (7)
CC5	5	E/ 3(3)	EE1/3 (100)	t12090 ^e	I: 3 (100)	0 (0)	2	<i>sea-egc-lukDE</i>	GEN 3, ERY 3, CLiC 3, CIP 3
CC5	100	C/ 21(23)	C15/2 (10), C40/2 (10) and 17 minor subtypes	t002: 17 (81), t067, t1341, t3152, t548	IVNv: 17 (81), NT 4 (19)	0 (0)	2	<i>egc-lukDE</i>	GEN 19 (91), ERY 11 (52), CLiC 5 (23), CLi 6 (29), CIP 7 (33), RIF 5 (24)
CC8	239 n: 7 2266 ^f n:1 (SLV239)	B/ 8(8)	B17/3 (29) and 5 minor subtypes	t037	IIIA: 7(86), NT: 1	0 (0)	1	<i>lukDE-bsa</i>	GEN 8, ERY 8, CLi 7, CIP 8, RIF 7, SXT 8, CHL1, MIN1

RESULTADOS PRIMERA PARTE

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>); SCC*mec*: 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 leukocidina (*lukS*-PV-*lukF*-PV); tipo *agr*, tipo de alotipo 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-MRSA_G (n: 229) o HA -MRSA_G (n: 93). (%) No se expresa cuando se detectó sólo una cepa con esta característica

^b Perfil de genes de virulencia: Se analizaron los siguientes genes. 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*; leukocidinas: *lukE*-*lukD* y la leukocidina 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). 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 (SXT), minociclina (MIN) y cloranfenicol (CHL), (%) de cepas resistentes a estos antibióticos dentro de cada background genético sólo está indicada cuando se detectaron más de 10 aislamientos con este background genético.

^d $P < 0.01$ by χ^2 prueba, para la comparación entre aislamientos de MRSA caracterizado como pulstipo N y aquellos con pulstipo I referido a la resistencia a la clindamicina y a eritromicina.

^e nuevo tipo *spa*

^f Nuevo ST

^g SCC*mec* Vv: positivo para el locus *ccrC* y la clase C2 de complejos de gen *mec* y negativa para la región J1 de SCC*mec* V y para otras regiones SCC*mec* analizados.

Tabla 3: GENOTIPOS MÁS FRECUENTES DE AISLAMIENTOS DE MRSA SEGÚN EL TIPO DE INICIO DE INFECCIONES (TOTALES E INVASIVOS), PARA TODA LA MUESTRA Y PARA AISLAMIENTOS ESTRATIFICADOS POR GRUPOS ETARIOS DE LOS PACIENTES, ARGENTINA, NOVIEMBRE DE 2009

Genotipos ^c	Infecciones por MRSA n°. (%) de casos/n°. (%) de aislamientos INVI								
	Infecciones por MRSA totales			Infecciones de inicio en la comunidad			Infecciones de inicio en el hospital		
	Total	Pacientes pediátricos	Pacientes Adultos	Total	Pacientes pediátricos	Pacientes Adultos	Total	Pacientes pediátricos	Pacientes Adultos
N-ST30-IV	104 (33)	40 (31)	64 (33)	100 (46)	40 (40)	60 (51)	4 (4)	0 (0)	4 (5) ^d
	23 (15)	13 (22)	10 (11)	21 (29)	13 (33)	8 (24.5)	2 (2.5)	0 (0)	2 (3)
I-ST5-IV	102 (31)	63 (50) ^a	39 (20) ^a	81 (37)	50 (50) ^a	31 (27) ^a	21 (20)	13 (46) ^{a, d}	8 (10) ^{a, d}
	42 (27.5)	28 (48) ^b	14 (15) ^b	27 (37)	19 (49) ^b	8 (24.5) ^b	15 (19)	9 (43) ^b	6 (10) ^b
A-ST5-I	61 (18)	3 (2) ^a	58 (30) ^a	10 (5)	0 (0)	10 (9)	51 (47)	3 (11) ^a	48 (61) ^a
	47 (31)	3 (4.5) ^b	44 (47) ^b	7 (10)	0 (0)	7 (21.5)	40 (49)	3 (14) ^b	37 (62) ^b
C-ST100-IVNv	21 (7)	8 (6)	13 (7)	8 (4)	4 (4)	4 (3.5)	13 (12)	4 (14)	9 (11.5)
	17 (11)	8 (13)	9 (10)	7 (10)	4 (10)	3 (9)	10 (12)	4 (19)	6 (10)
R-ST72-IV	10 (3)	7 (5)	3 (1)	3 (1.5)	0 (0)	3 (2.5)	7 (7)	7 (25) ^d	0 (0)
	6 (4)	5 (8)	1 (1)	1 (1)	0 (0)	1 (3)	5 (6)	5 (24)	0 (0)
ST239-IIIA	8 (2)	0 (0)	8 (4)	1 (0.5)	0 (0)	1 (1)	7 (6)	0 (0)	7 (9)
	7 (5)	0 (0)	7 (7.5)	1 (1.5)	0 (0)	1 (3)	6 (7.5)	0 (0)	6 (10)
USA300-ST8-IV	5 (2)	1 (1)	4 (2)	4 (2)	1 (1)	3 (2.5)	1 (1)	0 (0)	1 (1.5)
	3 (2)	0 (0)	3 (3)	2 (3)	0 (0)	2 (6)	1 (1.5)	0 (0)	1 (2)
Otros	11 (4)	5 (5)	6 (3)	9 (4)	4 (5)	5 (3.5)	2 (3)	1 (4)	1 (2)
	8 (4.5)	3 (4.5)	5 (5.5)	6 (8.5)	3 (8)	3 (9.5)	2 (2.5)	0 (0)	2 (3)
Infecciones Totales	n: 322	n: 127	n: 195	n: 216	n: 99	n: 117	n: 106	n: 28	n: 78
Infecciones Invasivas (INVI)	l: 153	INVI: 60	INVI: 93	INVI: 72	INVI: 39	INVI: 33	INVI: 81	INVI: 21	INVI: 60

^a $P < 0,001$ prueba del χ^2 , para la comparación entre los casos pediátricos y adultos de todas las infecciones por MRSA tanto en el ámbito hospitalario como en la comunidad, para cada genotipo.

^b $P < 0,001$ prueba del χ^2 , para la comparación entre los casos pediátricos y adultos de infecciones invasivas por MRSA, tanto en el ámbito hospitalario como en la comunidad, para cada genotipo.

^c Los genotipos se indican como: tipo (por PFGE) - Tipo Secuencial (ST por MLST) Tipo -SCCmec

^d Aislamientos CA-MRSA_G (n: 32) distribuidos en micro-brotes (≥ 2 aislamientos con el mismo genotipo) detectados en nueve hospitales.

9.3.2 Clones de MRSA por criterios epidemiológicos* y grupos etarios

[*según Center for Disease Control and Prevention (CDC) – USA]

En la figura 13, se muestra la distribución de los genotipos más predominantes de MRSA por criterios epidemiológicos (infecciones CACO, HACO y HAHO-MRSA). El clon ST5-IV representó el 35% de las infecciones CACO-MRSA y el 30% de las infecciones HA-MRSA (43% HACO; 20% HAHO). Es importante destacar que este clon CA-MRSA fue el segundo más frecuente que causó infecciones HA-MRSA después del clon HA-MRSA ST5-I. No es de extrañar, que el clon ST5-I sólo estuvo involucrado en infecciones asociadas a la atención sanitaria (HA): 33% del total fue responsable del 13% de las infecciones HACO y del 47% de las infecciones HAHO. Por otro lado, el ST30-IV representó 60% de las infecciones CACO-MRSA y 12% de las infecciones HA-MRSA (23% HACO; 4% HAHO).

PREVALENCIA DE LOS PRINCIPALES CLONES HA-MRSA Y CA-MRSA

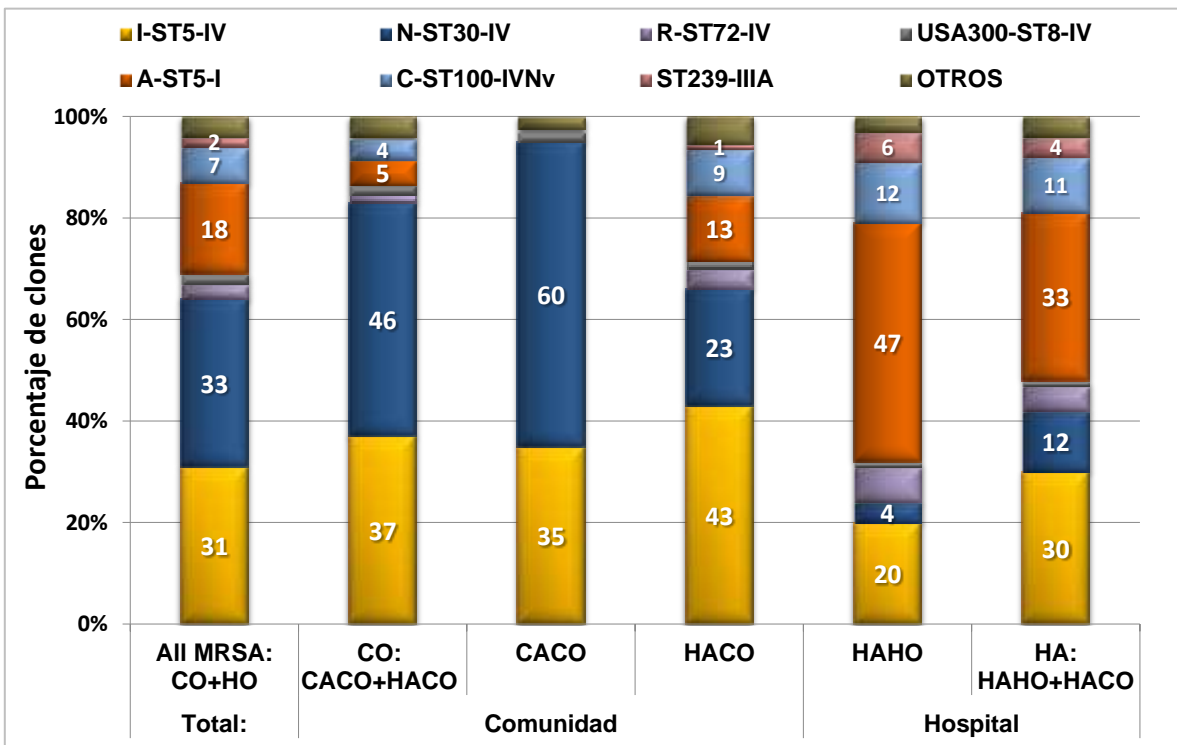


Figura 13: Prevalencia de los principales clones HA-MRSA y CA-MRSA según criterios epidemiológicos y sitio de inicio de la infección en toda la población, Argentina.
CACO: infecciones asociadas a la comunidad y de inicio en la comunidad,
HA: infecciones asociadas a la atención sanitaria, que incluyen las HACO: asociadas a la atención sanitaria de inicio en la comunidad y HAHO: infecciones asociadas a la atención sanitaria de inicio en el hospital.

Cuando se estratificó por edad (Tabla 3), la proporción de todas las infecciones por MRSA (total e invasivas) causada por el clon CA-MRSA I-ST5-IV fue mayor para niños que para adultos, 50% vs. 20% de las infecciones totales y 48% vs. 15% para las invasivas, ($P < 0,0001$). El escenario opuesto se detectó para el clon HA-MRSA A-ST5-I, que afectó en mayor proporción a los adultos que a los niños (30% frente a 2% de las infecciones totales y 47% frente a 4,5% para las invasivas, $P < 0,0001$) (Tabla 3). En contraste, el porcentaje de infecciones causadas por el clon CA-MRSA N-ST30-IV fue similar en niños y en adultos (31% vs 33%, $P = 0,80$, para las infecciones totales y 22% vs 11% $P = 0,07$, para las infecciones invasivas) (Tabla 3).

En cuanto a las infecciones CO y la presencia de HRF, la prevalencia del clon CA-MRSA I-ST5-IV fue aproximadamente la misma entre niños con HRF [n: 68 (47%)] y sin HRF [n: 31 (58%)], $P > 0,3$ y entre adultos con HRF [n: 68 (23%)] y sin HRF [n: 49 (33%)], $P > 0,27$. En cambio, el clon CA-MRSA ST30-IV, fue significativamente más frecuente entre los pacientes sin HRF que en aquellos con HRF en ambos, niños y adultos (50% frente a 19% para niños, $P = 0,0039$ y 69% frente al 24 % para los pacientes adultos, $P < 0,0001$).

9.3.3 Clones de MRSA y distribución geográfica

Mientras que los aislamientos pertenecientes al clon Cordobes/Chileno HA-MRSA ST5-I fueron recuperados en toda la Argentina en el ámbito hospitalario con frecuencias similares, las proporciones de los principales clones CA-MRSA difirieron significativamente entre el norte y el sur del país en las infecciones de inicio en la comunidad (Figura 11B): ST30-IV ($P = 0,0006$, norte: 75% y sur: 18%) y ST5-IV ($P = 0,02$, norte: 20% y sur: 55%). Consecuentemente, el clon CA-MRSA ST30-IV se ha extendido sobre todo en el norte, mientras que el clon CA-MRSA ST5-IV se ha mantenido en el sur de Argentina.

Mientras que los aislamientos pertenecientes al clon Cordobes/Chileno HA-MRSA fueron recuperados en el ámbito hospitalario de toda la Argentina con frecuencias similares, las proporciones de los principales clones CA-MRSA mostraron diferencias significativas entre el norte y el sur del país para el caso de las infecciones de inicio en la comunidad. Así, el clon ST30-IV mostró una prevalencia del 75% en la región norte mientras que el 18% en el área sur del país ($P = 0,0006$). A su vez y de manera inversa a lo observado con el clon ST30-IV, el clon ST5-IV tuvo una prevalencia del 20% en el norte y

de un 55% en la región sur ($P= 0,02$). Consecuentemente, es posible concluir que el clon CA-MRSA ST30-IV se ha extendido sobre todo en el norte del país, mientras que el clon CA-MRSA ST5-IV se ha mantenido en el sur de Argentina (Figura 11B).

9.3.4 Resistencia a los antimicrobianos no- β -lactámicos: CA-MRSA_G vs. HA-MRSA_G vs MSSA

Los aislamientos CA-MRSA_G se asociaron con menores tasas de resistencia a eritromicina, clindamicina, ciprofloxacina, gentamicina, rifampicina, trimetoprim/sulfametoxazol y cloranfenicol que aquellos HA-MRSA_G ($P < 0,0001$) para la mayoría de las comparaciones (Tabla 4).

A diferencia de las cepas HA-MRSA_G, entre los aislamientos CA-MRSA_G, los recuperados de pacientes con infecciones HO tenían tasas significativamente más altas de resistencia a la gentamicina, eritromicina y clindamicina que los obtenidos de pacientes con infecciones CO (Tabla 4).

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 14), especialmente en los aislamientos que producen infecciones de inicio en la comunidad (Tabla 4).

De todos los aislamientos CA-MRSA_G (n: 229), 25% fueron resistentes a al menos uno y 5% a al menos dos antimicrobianos no β -lactámicos. Del total de aislamientos con genotipos HA-MRSA_G, el 93% fueron resistentes a dos o más antibióticos no β -lactámicos. La multiresistencia se produjo exclusivamente en HA-MRSA_G y sus perfiles de resistencia antimicrobiana (Tabla 2) fueron similares a los descritos en estudios anteriores de nuestro grupo de trabajo [144].

Todos los aislamientos de MRSA fueron susceptibles a: vancomicina, teicoplanina, tigeciclina, fosfomicina y daptomicina, sin evidenciarse diferencias significativas entre las CIM90 de los genotipos CA-MRSA_G vs los HA-MRSA_G (Tabla 4 y Figura 15).

Tabla 4: TASAS DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS DE AISLAMIENTOS CA-MRSA_G Y HA-MRSA_G RECUPERADOS DE TODOS LOS CASOS Y SEGÚN EL TIPO DE INICIO DE LAS INFECCIONES EN ARGENTINA, NOVIEMBRE DE 2009

Animicrobiano ^a	CA-MRSA _G				HA-MRSA _G ^b	P valor
	CO, no. (%) n: 195	HO, no. (%) n: 34	P value CO vs.HO	Total, no. (%) N: 229	Total, no. (%) N: 93	CA-MRSA vs HA-MRSA
Gentamicina	16 (8.2)	13 (38.2)	<0.0001	29 (12.7)	90 (96.8)	<0.0001
Ciprofloxacina	2 (1.0)	1 (2.9)	0.37	3 (1.3)	75 (80.6)	<0.0001
Clindamicina	27 (13.8)	11 (32.4)	0.007	38 (16.6)	79 (84.9)	<0.0001
CLII	26 (13.3)	11 (32.4)	0.0054	37 (16.2)	1 (1.2)	<0.0001
CLIC	1 (0.5)	0 (0)	NA	1 (0.4)	78 (83.2)	<0.0001
Eritromicina	34 (17.4)	15 (44.1)	0.0005	49 (21.4)	79 (84.9)	<0.0001
Rifampicina	1 (0.5)	2 (5.9)	0.058	3 (1.3)	23 (24.7)	<0.0001
Trimetroprima/ sulfamethoxazol	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)	8 (8.6)	NA
Cloranfenicol	0 (0)	1 (2.9)	-	1 (0.4)	6 (6.5)	0.0028
Minociclina	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)	1 (1.1)	NA
Linezolid	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	0 (0)	NA

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); CO y HO: infecciones de inicio en la comunidad y las de inicio en el hospital.

CLIC y CLII: resistencia constitutiva e inducible a los macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B, respectivamente, NA: No aplicable

^a Todos los aislamientos de MRSA fueron susceptibles a (CIM90 y rango en µg/mL): vancomicina (1; 0,5-2), teicoplanina (1; 0,5-2), la tigeciclina (0,25; 0,03 a 0,25), la fosfomicina (4; 0,5- > 512) y la daptomicina (0,25; 0,06 a 0,5) (ver también Figura 15).

^b $P > 0,05$ prueba del χ^2 , para la comparación entre *S. aureus* recuperados de pacientes con infecciones CO vs aquellos recuperados de pacientes con infecciones HO

Las diferencias significativas ($P < 0.05$) para cada comparación entre las resistencias (%) se muestran en negrita.

FENOTIPOS DE RESISTENCIA A MACRÓLIDOS EN:
CA-MRSA_G vs HA-MRSA_G vs MSSA

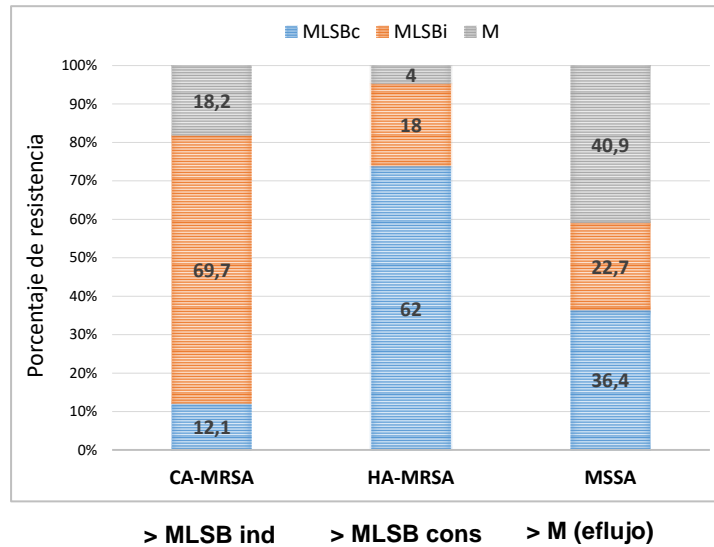


Figura 14.: Proporción de cepas resistencia a macrólidos para CA-MRSA_G, HA-MRSA_G y MSSA.

MLSBind: Fenotipo de resistencia inducible a los macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B

MLSbconst: Fenotipo de resistencia constitutivo a los macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B

M: Fenotipo de resistencia a macrólidos por eflujo.

El signo ">" refiere a la mayor proporción observada en la columna de cada genotipo.

Valores de CIM para antimicrobianos no-β-lactámicos: CA-MRSA_G vs. HA-MRSA_G

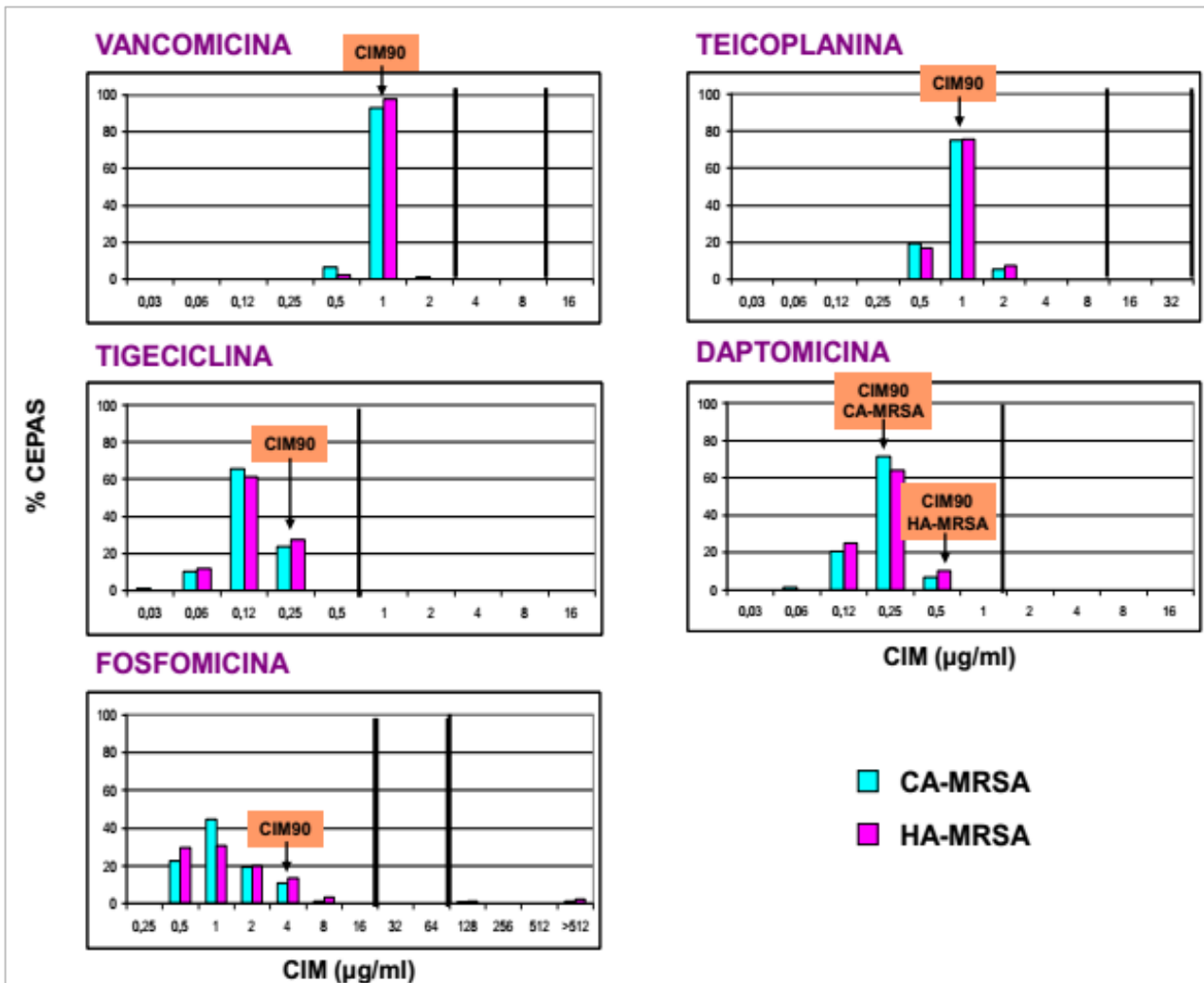


Figura 15: Se indican los valores de CIM y CIM₉₀, en genotipos CA-MRSA_G vs HA-MRSA_G para Vancomicina, Teicoplanina, Tigeciclina, Daptomicina y Fosfomicina

9.3.5 Susceptibilidad a Ceftarolina (CPT)

Los resultados de susceptibilidad de los genotipos CA-MRSA_G y HA-MRSA_G se muestran en la Tabla 5.

Los valores de CIM 50/90 promedios para CPT fueron: 0.25/1 ug/ml para todas las cepas de *S. aureus*, siendo el 93,6% de los aislamientos sensibles a CPT (CIM ≤ 1 ug/ml).

Los valores de CIM 50/90 para CPT de MRSA fueron 0.5/2 ug/ml con un 88.2% de aislamientos sensibles y 11.8% con sensibilidad intermedia (CIM 2 ug/ml).(figura 16.)

Todos los aislamiento MSSA fueron sensibles a CPT con valores de CIM 50/90 0.25/0.25 ug/ml. Ningún aislamiento exhibió resistencia (MIC_≥4 ug/ml) a CPT (Tabla 5).

PERFIL DE SENSIBILIDAD A CEFTAROLINA: *S. aureus* vs MRSA vs MSSA

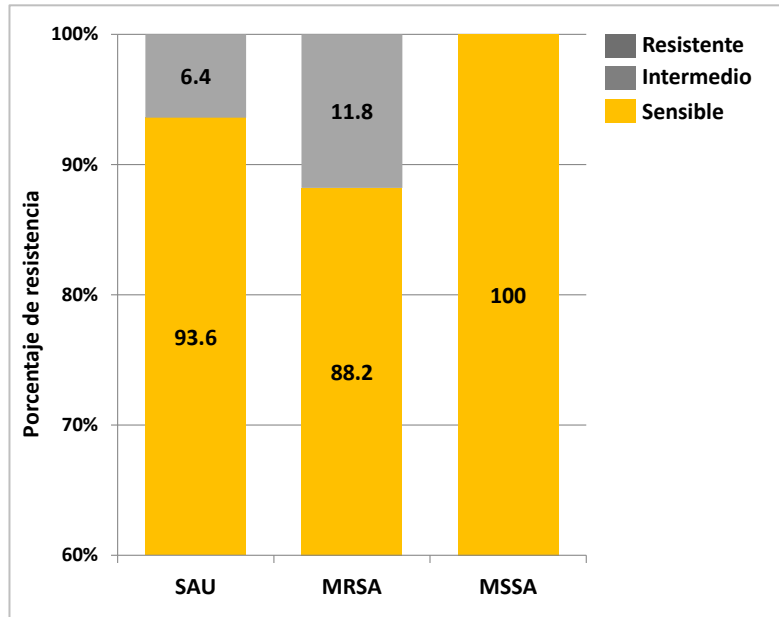


Figura 16.: Se indica el porcentaje de los aislamientos agrupados como: SAU (*Staphylococcus aureus* totales), MRSA (*S. aureus* Resistente a Meticilina) y MSSA (*S.aureus* Sensible a Meticilina) que presentaron Resistencia, Resistencia Intermedia o Sensibilidad a Ceftarolina.

CIM CPT (ug/ml): **S** ≤ 1; **I** 2; **R** ≥ 4 (CLSI)

Tabla 5: Rango de CIM a Ceftarolina

CIM CPT (ug/ml)	<i>S. aureus</i>	MSSA	MRSA	CA-MRSA	HA-MRSA
CIM ₅₀	0,25	0,25	0,5	0,5	1
CIM ₉₀	1	0,25	2	0,5	2
CIM Rango	0,06-2	0,06-0.25	0,25-2	0,25-1	0,25-2

Se indica CIM₅₀, CIM₉₀ y rango de CIM a Ceftarolina: para *S. aureus* vs MSSA vs MRSA

Todos MSSA y los clones CA-MRSA fueron 100% sensibles a CPT con CIM50/90 de 0.25/0.25 ug/ml para MSSA y 0.5/0.5 ug/ml para CA-MRSA (Figura 17).

La Resistencia Intermedia a CPT estuvo fuertemente asociada con los tipos clonales HA-MRSA, siendo ST5-I (Cordobes/Chileno) y ST239-III A (Braziliano) los principales clones con sensibilidad intermedia. (Figuras 17 y 18).

Susceptibilidad a ceftarolina de clones MRSA

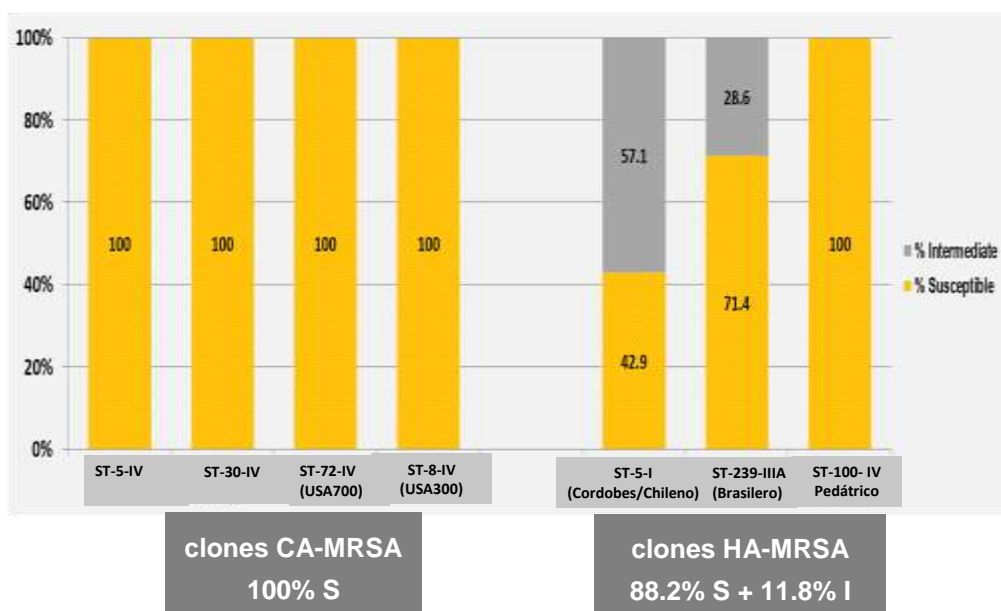


Figura 17: Perfil de sensibilidad a Ceftarolina de clones MRSA Se indica porcentaje de sensibilidad y de Resistencia Intermedia para CA-MRSA_G y HA-MRSA_G.

CIM A CEFTAROLINA Y TIPO CLONAL

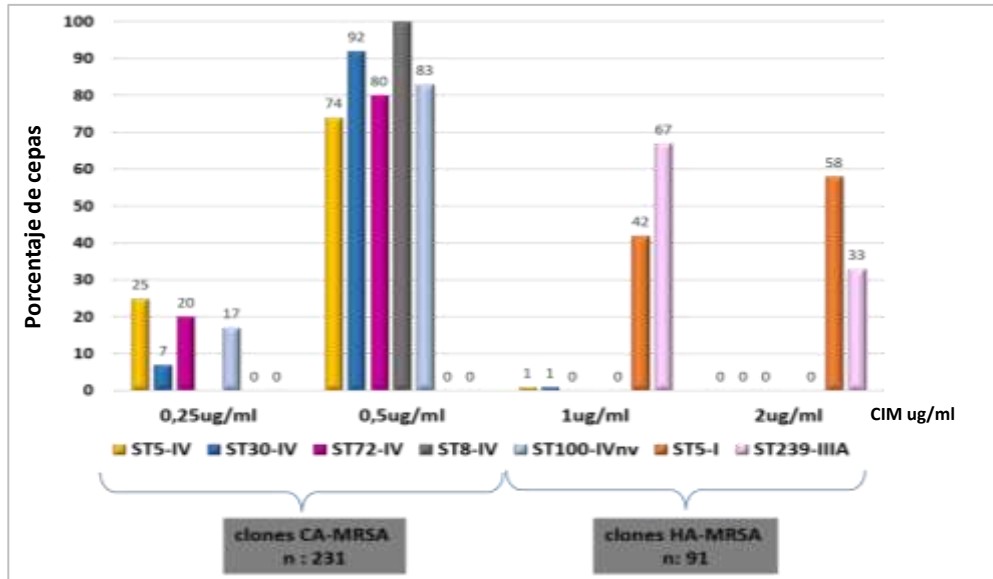


Figura 18: Asociación entre CIM (ug/ml) a Ceftarolina y tipo el clonal de genotipos o clones CA-MRSA y HA-MRSA

Es importante destacar, la existencia de Resistencia Intermedia a Ceftarolina en cepas que nunca habían estado expuestas al antimicrobiano. Es por ello que debería evaluarse el significado clínico de esta Resistencia Intermedia.

9.3.6 Validación de la definición fenotípica de CA-MRSA

En la primera etapa de análisis de este trabajo se utilizó un criterio microbiológico para diferenciar CA-MRSA [MRSA con resistencia (R) a no más de un antibiótico (ATB)] de HA-MRSA, 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 descritos en publicaciones previas del grupo de trabajo [152, 153].

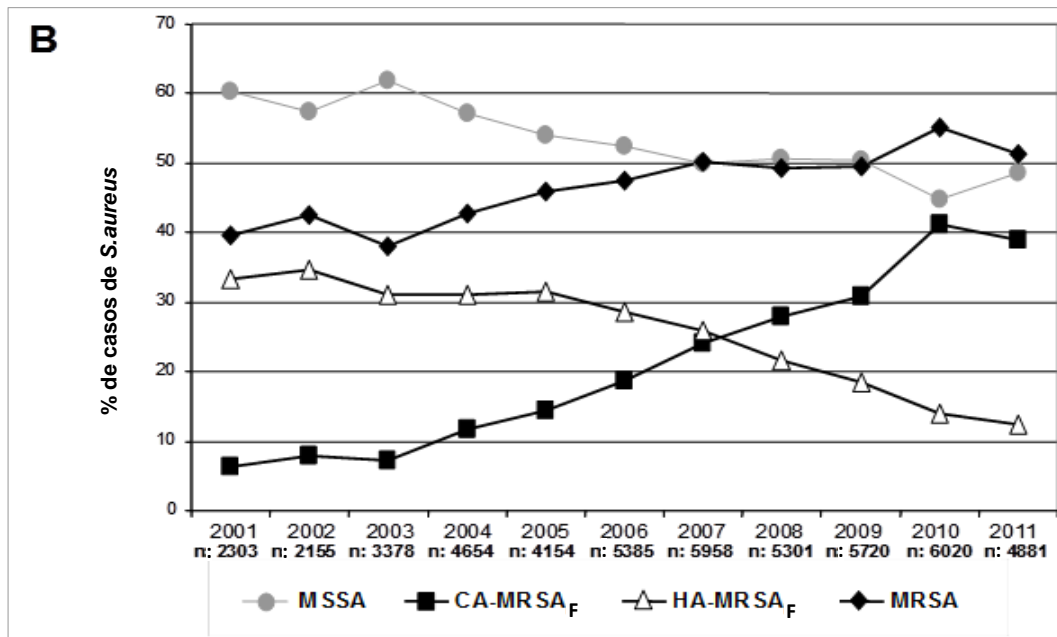
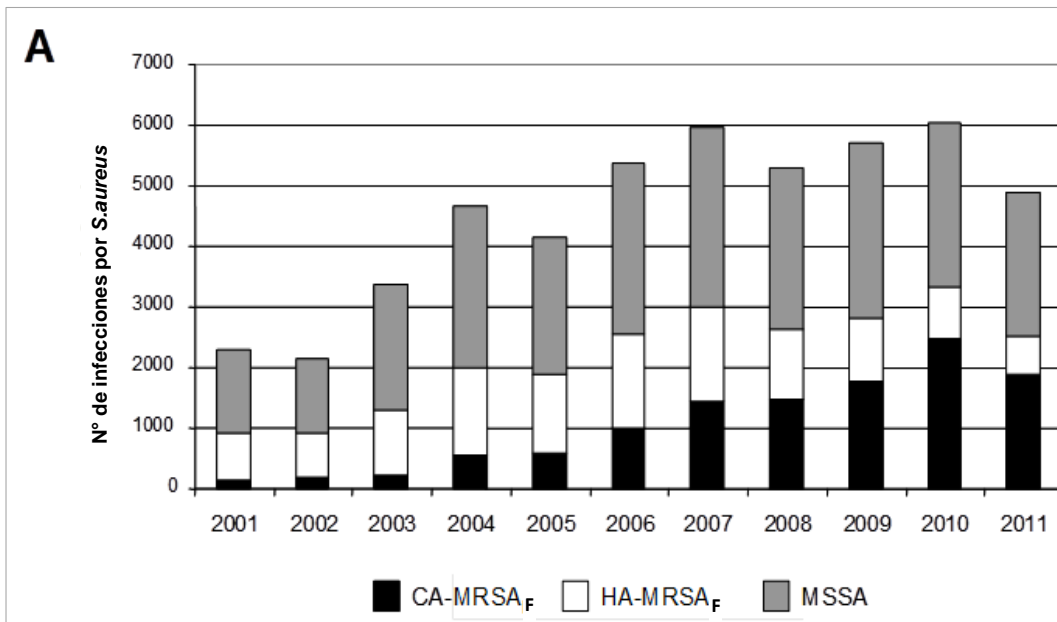
Con el análisis molecular de los aislamientos de MRSA llevado a cabo en este estudio, se pudo validar dicho criterio microbiológico. De esta manera de todas las cepas caracterizadas molecularmente como CA-MRSA_G (n: 229), el 25% fueron resistentes al

menos a un ATB no- β -lactámico y el 5% fueron resistentes al menos a dos de estos ATB. Entre todos los aislamientos HA-MRSA_G, el 93% fueron resistentes a dos o más ATB no- β -lactámicos. Por lo tanto la definición fenotípica utilizada fue significativamente asociada con la definición genotípica ($P < 0.0001$), que correctamente identificó el 94% de todos los aislamientos de MRSA con 94.7% de sensibilidad, 92.4% de especificidad, 96.9% de valor predictivo positivo y 87.8% de valor predictivo negativo. Este es otro importante aporte de este trabajo, ya que permite brindar una herramienta al Laboratorio de Microbiología clínica 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.

Esta estrategia, también nos permitió evaluar la evolución en el tiempo de estas cepas CA-MRSA y HA-MRSA en todo el país durante el período 2001-2011. Para lo cual se utilizó la base de datos nacional WHONET-ARGENTINA, creada por el INEI Instituto Dr. Carlos G Malbrán, que recibe los datos de identificación bacteriana y sensibilidad de ATB de los aislamientos bacterianos, además de datos demográficos de los pacientes (edad, sexo), origen de la infección (hospitalizados o de Consultorio externo) y tipos de focos, obtenidos de 83 laboratorios del país distribuidos en las 23 provincias argentinas, lo cual demuestra la representatividad de la muestra. De acuerdo al criterio microbiológico se clasificaron fenotípicamente a todos los aislamientos de MRSA recuperados entre los años 2001 y 2011, ya sea como CA-MRSA_F o como HA-MRSA_F. Fueron incluidos 49.909 aislamientos de *S aureus* con un promedio de 4537.18 aislamientos por año, (rango 915-6020). El número total y la proporción anual de los aislamientos de *S. aureus* que fueron MRSA incrementó del 39.7% (915/2303) en el 2001, alcanzando un pico de 55.2% (3323/6020) en 2010 (χ^2 trend $P < 0.0001$) y luego disminuyendo al 51.2% (2503/4090) en 2011, $P < 0.0001$ (Figura 19 A y B). La proporción de CA-MRSA_F incrementó significativamente del 6.4% (147/2303) en el 2001 al 38.9% (1897/4881) en el 2011 alcanzando un pico del 41.1% (2477/6020) en el 2010 (χ^2 trend $P < 0.0001$). HA-MRSA_F disminuyó desde el 33.3% (768/2303) en el 2001 al 12.4% (606/4881) en el 2011 (χ^2 for trend $P < 0.0001$). Si bien el incremento de la proporción del CA-MRSA_F fue mayor y más rápido entre pacientes no hospitalizados también se pudo demostrar entre los pacientes hospitalizados, alcanzando a causar el 37.5% de las infecciones por *S aureus* entre estos pacientes hospitalizados.

Por lo tanto con este estudio, también pudimos demostrar que los clones CA-MRSA han entrado a los hospitales en Argentina comenzando a desplazar a los clones tradicionales hospitalarios HA-MRSA. Estos resultados tienen importantes implicancias clínicas para nuestro país, por un lado para las infecciones por *S. aureus* detectadas en la comunidad ya no se podrían utilizar los ATB β -lactámicos empíricamente, especialmente en niños, y por el otro, a nivel hospitalario habría más opciones de tratamiento para las infecciones por MRSA ya que las cepas CA-MRSA son sensibles a un número mayor de ATB no- β -lactámicos que las cepas HA-MRSA, pero con capacidad de adquirirlo, lo cual, también es otra área para vigilar su evolución.

Figura 19 A, B, C: Análisis longitudinal: Infecciones causadas por MSSA, CA-MRSA_F y HA-MRSA_F (fenotipos) por año, Argentina (base de datos WHONET), 2001-2011:



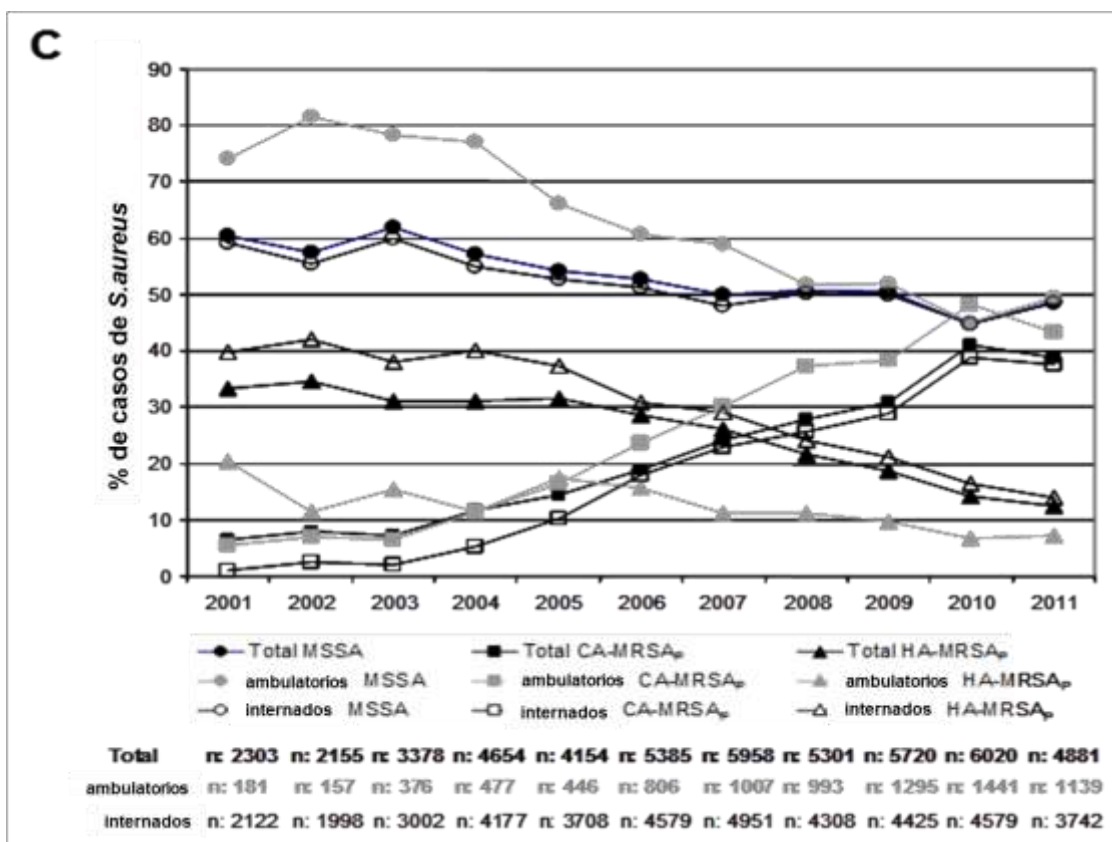


Figura 19: Análisis longitudinal: Infecciones causadas por MSSA, CA-MRSA_P y HA-MRSA_P (fenotipos) por año, Argentina (base de datos WHONET), 2001-2011:

A. número total de infecciones causadas por CA-MRSA_P, HA-MRSA_P y MSSA.

B. CA-MRSA_P y HA-MRSA_P, MRSA y MSSA como una proporción de todas las infecciones por *S. aureus*

C. Fenotipos CA- MRSA_P (cuadrado), HA-MRSA_P (triángulo) y MSSA (círculo) como proporción de todas las infecciones por *S. aureus* por año, en toda la población (negro y lleno), entre los pacientes hospitalizados (negro y vacío) y entre los pacientes ambulatorios (gris).

WHONET: Esta base de datos nacional incluye datos de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de cada cepa , junto con la edad, el origen de la muestra, tipo de infección y tipo de aparición de infecciones (ambulatorios o internados), reportados por los laboratorios clínicos obtenida a partir de 89 hospitales, en 23 provincias de la Argentina y la CABA.

CA-MRSA_F: Aislamientos resistentes a no más de 1 de los antibióticos no beta-lactámicos

HA-MRSA_F: Aislamientos resistentes a 2 o más antibióticos no-beta-lactámicos

Pruebas de concordancia entre las definiciones genotípicas y fenotípicas de 322 aislamientos de MRSA: sensibilidad: 94,7%, especificidad: 92,4% el valor predictivo positivo: 96,9% (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) del 87,8%.

9.4 CONCLUSIONES

- ✓ Las cepas CA-MRSA, con un reservorio en aumento entre las infecciones de inicio en la comunidad, han comenzado a causar infecciones a nivel intra-hospitalario y están reemplazando a las cepas HA-MRSA que tenían elevada prevalencia en ARGENTINA.
- ✓ Se han detectado diferencias regionales significativas en la prevalencia de MRSA / CA-MRSA.
- ✓ Se identificaron dos clones CA-MRSA de elevada prevalencia: que presentan diferencias según la edad de los pacientes afectados y las regiones geográficas del país:
 - Clon CA-MRSA ST5-IV detectado en HOSPITALES, en pacientes del área de PEDIATRÍA, desplazando al clon HA-MRSA Cordobés/Chileno y permanece con mayor prevalencia en el SUR del país.
 - Clon CA-MRSA ST30-IV, diseminado en la COMUNIDAD, CA-CO, afectando principalmente a pacientes ADULTOS y con mayor prevalencia en el NORTE de Argentina.

Respecto al análisis de sensibilidad a los antimicrobianos se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- ✓ Los aislamientos CA-MRSA_G se asociaron con menores tasas de resistencia a la eritromicina, clindamicina, ciprofloxacina, gentamicina, rifampicina, trimetoprim/sulfametoxazol y cloranfenicol que los HA-MRSA_G.
- ✓ El clon CA-MRSA ST30-IV-PVL⁺, tiene menor porcentaje de resistencia que el clon CA-MRSA ST5-IV-PVL⁺ a eritromicina (12% vs. 28%) y clindamicina (8% vs. 24%), teniendo importantes implicancias para el tratamiento antimicrobiano empírico, particularmente para las infecciones de piel y tejidos blandos en el entorno de la comunidad.
- ✓ Todos los aislamientos de MRSA fueron sensibles a: vancomicina, teicoplanina, tigeciclina, fosfomicina y daptomicina, sin diferencias significativas entre las CIM90 de los HA-MRSA_G vs la de los CA-MRSA_G para cada antimicrobiano.

- ✓ Los aislamientos CA-MRSA_G fueron sensibles a CPT independientemente del clon implicado. Por el contrario, para el caso de los clones HA-MRSA_G, la sensibilidad a CPT estuvo fuertemente asociada al tipo clonal, siendo el clon ST5-I (clon Cordobes / chileno) el principal clon que mostró resistencia intermedia a ese antimicrobiano.

10 RESULTADOS SEGUNDA PARTE

10.1 OBJETIVO GENERAL

I- Determinar el impacto epidemiológico actual de las infecciones por CA-MRSA, en la República Argentina

10.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Ic-Analizar las características sociodemográficas y clínicas, en nuestro medio, de las infecciones causadas por MRSA (CA-MRSA_G vs HA-MRSA_G) y MSSA en sus diferentes localizaciones y sitio de comienzo (comunidad u hospital) en pacientes pediátricos y adultos para establecer los factores de riesgo para infecciones por CA-MRSA_G en Argentina.

Id-Identificar y comparar las características moleculares y clínicas de los genotipos CA-MRSA_G, que producen infecciones de inicio en la comunidad con aquellas responsables de infecciones de inicio en el Hospital, para evaluar el impacto de la entrada de estos genotipos a nivel hospitalario.

10.2Ic y Id Resultados

10.2.1 Comparaciones (univariadas) de las características socio-demográficas y clínicas de las infecciones por MRSA: CA-MRSA_G vs. HA-MRSA_G

Se realizó el análisis de las características socio-demográficas y clínicas de estas infecciones con el propósito de evaluar si alguna de ellas estaba más asociada a los genotipos CA-MRSA_G diseminados en Argentina. Esta información será de utilidad para poder diseñar estrategias de vigilancia efectivas y prevenir la diseminación de estas cepas, además de mejorar el diagnóstico clínico de una manera rápida y certera, colaborando con todo ello a mejorar la calidad de la atención en salud y los costos de la misma.

Las características socio-demográficas y clínicas analizadas de los pacientes con infecciones por CA-MRSA_G y HA-MRSA_G se resumen en la Tabla 6. En general, 41,6% (134/322) de los MRSA fueron recuperados de pacientes de sexo femenino; sin diferencia significativa en la distribución de género entre HA-MRSA_G y CA-MRSA_G tanto en el total de infecciones como sólo en aquellas de inicio en el hospital.

10.2.2 a. Infecciones por MRSA totales

Teniendo en cuenta todas las infecciones por MRSA, en comparación con HA-MRSA_G, las infecciones por CA-MRSA_G se asociaron con inicio en la comunidad, en los pacientes más jóvenes (grupo < de 19 años) y sin co-morbilidades (Tabla 6). Además, estos pacientes con infecciones por CA-MRSA_G, fueron: 1) más propensos a convivir con ≥ 3 personas por habitación (hacinamiento) y con ≥ 5 personas por hogar, 2) presentaron una situación económica desfavorable [ingreso mensual del hogar <US \$ 800 (equivalente al salario mínimo en pesos en el país en ese momento)] y 3) desarrollaron con mayor frecuencia infecciones de piel y tejidos blandos (SSTI) (Tabla 6). Todas estas características también se asociaron con infecciones por CA-MRSA_G cuando sólo las infecciones de inicio en la comunidad (CA-MRSA_G: 195 y HA-MRSA_G: 21 casos) fueron evaluados (estos datos no fueron incluidos).

Al mismo tiempo se observó que, en comparación con CA-MRSA_G, las infecciones por HA-MRSA_G fueron asociadas a pacientes de mayor edad, con infecciones de inicio en el hospital (Tabla 6), tuvieron mayor proporción de co-morbilidades, principalmente neoplasias (tumores sólidos y neoplasias malignas hematológicas, 18,5% vs 5%, $P = 0,011$) y diabetes (17,2% frente a 4,4%, $P = 0,001$) y presentaron tasas más altas de al menos un HRF (98,9% frente a 41,0%, $P < 0,0001$) (Tabla 6). Además, fueron más propensos a desarrollar infecciones invasivas (80,6% vs 34,1% $P < 0,0001$), principalmente en los pulmones, bacteriemia e infecciones asociadas a catéter y exhibieron menos probabilidades de presentar infecciones de piel y tejidos blandos (Tabla 6 y Tabla7).

10.2.3 b. infecciones por MRSA de inicio en el hospital (HO):

En el análisis de los pacientes con infecciones HO, se detectó que aquellas causadas por los genotipos CA-MRSA_G se asociaron con pacientes más jóvenes, en particular <1 año (Figura 10 y parte inferior de la Tabla 6) que las causadas por HA-MRSA_G. Es importante destacar que, en el ámbito hospitalario, los dos grupos de pacientes infectados con CA-MRSA_G y HA-MRSA_G, fueron comparables con respecto a la mayoría de las variables y factores clínicos implicados en la transmisión nosocomial (Tabla 6 y Tabla 7, Figura 20), incluyendo la proporción de infecciones invasivas [67,6% (23/34) vs 80,6% (58/72) $P < 0,15$].

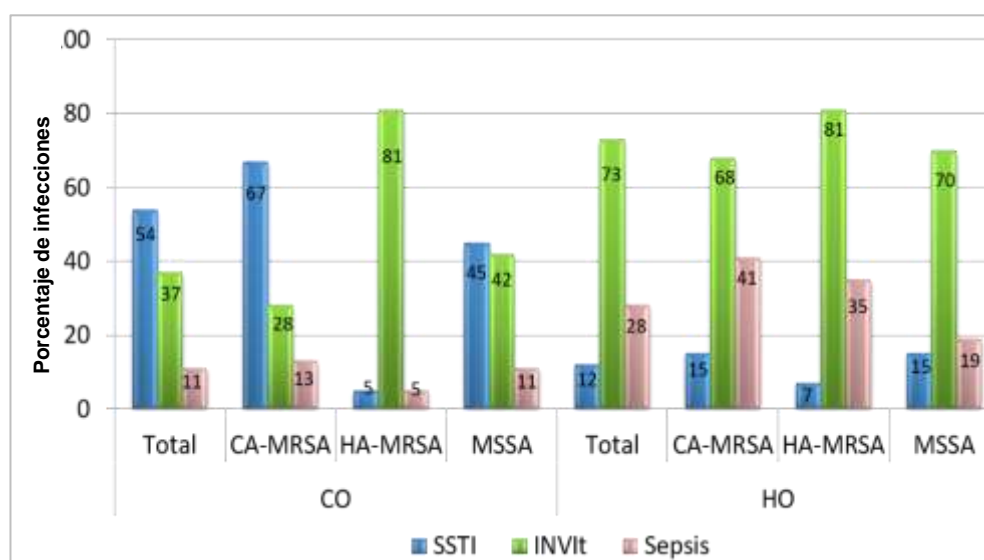


Figura 20: Tipos y Severidad de las infecciones de Genotipos: CA-MRSA, HA-MRSA, y MSSA en el ambiente hospitalario y en la comunidad (HO: Hospital On set CO: Community On set)
SSTI: Infecciones de piel y tejidos blandos, INVI: Infecciones Invasivas.

En base a las características clínicas evaluadas, para el genotipo CA-MRSA_G vs el HA-MRSA_G, en el ambiente hospitalario, a diferencia de lo detectado en la comunidad, se pudo demostrar que el comportamiento de las cepas CA-MRSA_G tiende a ser similar al de las HA-MRSA_G produciendo una elevada proporción de infecciones invasivas.

RESULTADOS SEGUNDA PARTE

Tabla 6: Comparación de las características clínico-epidemiológicas de los pacientes con infecciones causadas por genotipo CA-MRSA_G y HA-MRSA_G, (Superior: total de infecciones, inferior: infecciones de inicio en el hospital) en 66 hospitales argentinos durante un mes (noviembre), 2009

Infecciones totales	no.(%) de pacientes			P valor/ Univariado odd de CA-MRSA _G , OR (95% CI)	P valor/ Multivariado odd de CA-MRSA _G , OR (95% CI)
	Total de pacientes N: 322	CA-MRSA _G no: 229	HA-MRSA _G no: 93		
Características socio-demográficas					
<i>Edad, años, media ± SD/ median (rango)</i>	31.3 ± 24.4 28 (0-95)	24.4 ± 21.2 18 (0-83)	48.3 ± 23.3 55 (0-95)	<0.0001	<0.0001
Grupos de edades, < 19	127 (39.4)	115 (50.2)	12 (12.9)	<0.0001 6.81(3.6-13.0)	<0.0001 12.33(3.81-39.92)
<i>Proporción de mujeres</i>	134 (41.6)	96 (41.9)	38 (40.9)	0.89	
<i>Hacinamiento^a (si duermen ≥ 3 personas/habitación)</i>	73 (26.7)	63 (32.3)	10 (12.7)	0,0009 3.3(1.61-6.70)	
Salario mensual ^a < u\$ 800	210 (76.5)	160 (81.5)	50 (63.3)	0,0009 2.4(1.41-4.72)	
Número de Co-habitantes ^a , ≥ 5	117 (42.6)	102 (52.3)	15 (18.8)	<0,0001 4.7(2.53-8.72)	
Enfermedad subyacente^b	139 (43.1)	70 (30.7)	69(74.2)	<0.0001 0.15(0.09-0.29)	0.002 0.16(0.05-0.49)
Factores de riesgo asociados a la atención sanitaria (HRFs)^c					
Hospitalización en el año previo	109 (38.5)	57 (28.9)	52 (60.4)	<0.0001 0.27(0.16-0.47)	
Historia de infección/colonización por MRSA	18 (6.3)	8 (4.0)	10 (11.6)	0.010 0.32(0.13-0.83)	
Cirugía en el año previo	82 (28.9)	32 (16.2)	50 (58.1)	<0.0001 0.14(0.08-0.25)	
Hemodiálisis en el año previo	10 (3.5)	3 (1.5)	7 (8.1)	0.007 0.17(0.05-0.64)	
Concurrencia a guardería o residencia en centro de cuidados crónicos	7 (2.5)	6 (3.0)	1 (1.1)	0.34	
Tipo de inicio					
<i>Inicio en el hospital</i>	106 (32.9)	34 (14.9)	72 (77.4)	<0.0001 0.05(0.03-0.09)	<0.0001 0.14(0.05-0.39)

RESULTADOS SEGUNDA PARTE

<i>Inicio en la comunidad</i>	216 (67.1)	195 (85.1)	21 (22.6)	<0.0001 19.7(10.81-35.92)	<0.0001 6.97(2.51-19.36)
Exposición previa a antibióticos ^d					
<i>algún β-lactámico</i>	99 (35.9)	68 (34.6)	31 (38.7)	0.52	
<i>Alguna quinolona</i>	15 (5.4)	2 (1.2)	13 (16.3)	<0.0001 0.05(0.01-0.21)	
<i>vancomicina</i>	21 (7.6)	13 (6.6)	8 (9.6)	0.38	
Características de la infección					
<i>Tipo y severidad de la infección</i>					
Infección de piel y tejidos blandos(SST) no complicada	146 (45.3)	140 (61.1)	6 (6.5)	<0.0001 21.2(9.21-49.10)	0.016 6.24(1.40-27.85)
sepsis severa o shock séptico ^e	62 (21.9)	38 (19.4)	24 (27.9)	0.11	
Mortalidad a los 30 días por todas las causas ^f	16 (5.5)	4 (2.0)	12 (13.1)	0.0001 0.14(0.04-0.41)	
Infecciones de inicio en el hospital	no.(%) of pacientes			<i>P</i> valor	<i>P</i> valor
	Total de pacientes N: 106	CA-MRSA _G no: 34	HA-MRSA _G no: 72	Univariado odd de CA-MRSA _G , OR (95% CI)	Multivariado odd de CA-MRSA _G , OR (95% CI)
Características socio-demográficas					
<i>Edad, años, media ± SD/ median (rango)</i>	40.6 ± 27.8 45 (0-95)	21.4 ± 28.2 3.5 (0-83)	49.8 ± 22.6 56 (0-95)	<0.0001	
Grupos de edades, < 19	28 (26.4)	21 (61.8)	7 (9.7)	0.0001 15.0(5.43-41.47)	0.0001 13.90(3.54-54.42)
<i>Proporción de mujeres</i>	47 (44.3)	19 (55.9)	28 (38.9)	0.14	
Enfermedad subyacente ^d	76 (71.7)	25 (73.5)	51 (70.8)	0.77	
Características de la infección					
Infección no relacionada a la piel	96 (90.6)	29 (85.3)	67 (93.0)	0.35	
sepsis severa o shock séptico ^e	35 (36.8)	12 (40.0)	23 (35.4)	0.66	
<i>hospitalización en UTI durante la estadía</i>	52 (49.0)	13 (38.2)	39 (54.1)	0.12	
<i>Tiempo de internación (días)</i> Media ± SD/Mediana (rango)	17.78 ± 17.12 14 (1-90)	21.31 ± 19.5 14 (1-90)	16.33 ± 15.69 13 (2-90)	0.22	

RESULTADOS SEGUNDA PARTE

<i>Tiempo de hospitalización > 10 días</i>	61 (57.5)	22 (65.4)	39 (54.9)	0.30	
Mortalidad a los 30 días por todas las causas ^f	14 (13.5)	3 (8.8)	11 (15.7)	0.33	
Factores involucrados en la transmisión nosocomial					
Tiempo a la infección desde la admisión ^g (días) Media ± SD/ Mediana (rango)	16.04 ± 22.56 7 (3-130)	15.41 ± 24.38 4.5 (3-123)	16.33 ± 21.82 8 (3-130)	0.84	
Tiempo a la infección ≤ 5 días	43 (40.5)	19 (56.9)	24 (33.3)	0.027 2.53(1.11-5.78)	
Procedimientos invasivos previos					
<i>Catéteres endovenosos</i>	89 (93.6)	27 (93.1)	61 (93.8)	0.92	
<i>Asistencia respiratoria mecánica</i>	40 (42.1)	12 (40.4)	28 (43.0)	0.77	
<i>Catéter urinario</i>	45 (47.3)	10 (33.3)	35 (53.8)	0.06	
<i>Alimentación parenteral</i>	18 (18.9)	5 (17.2)	13 (19.7)	0.70	

CA-MRSA_G y HA-MRSA_G genotipos de *S. aureus* resistentes a meticilina asociados a la comunidad y al cuidado de la salud respectivamente; HO, inicio en el hospital después de 48 hs de hospitalización; CI, intervalo de confianza.

-Variables- asociadas con CA-MRSA_G con un valor de $p \leq 0,05$ en el análisis multivariado se muestran en letra negra.

-NA: No aplicable.

^a Los datos estaban disponibles para 274 pacientes: 95 con CA-MRSA_G y 79 con infecciones HA-MRSA_G. Hacinamiento: hogares con más de tres personas por habitación.

^b enfermedades subyacentes: diabetes, enfermedades del corazón, enfermedad del hígado o del riñón, enfermedad del sistema nervioso central crónica, cáncer o inmunodeficiencias (VIH, SIDA y artritis reumatoide).

RESULTADOS SEGUNDA PARTE

Tabla 7. Características clínicas de 322 pacientes infectados con *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina: CA-MRSA_G vs HA-MRSA_G, Argentina, 2009.

	Infecciones totales por MRSA				Infecciones por MRSA de inicio en el hospital			
	Pacientes totales N: 322	CA-MRSA _G N: 229	HA-MRSA _G N: 93	P value	Pacientes totales N: 106	CA-MRSA _G N: 34	HA-MRSA _G N: 72	P valor
Tipo de Infecciones ^a	no: 423 (%)	no: 287 (%)	no: 136 (%)		no: 157 (%)	no: 48 (%)	no: 109 (%)	
	[no]: 103	[no]: 58	[no]: 43		[no]: 51	[no]: 14	[no]: 37	
Piel y Tejidos Blandos (SSTI) ^b	166 (39.2)	158 (55.1)	8 (5.9)	<0.0001	13 (8.2)	7 (14.6)	6 (5.5)	0.06
	[2]	[2]			[1]	[1]	[0]	
SSTI no complicadas	146 (34.5)	140 (48.8)	6 (4.4)	<0.0001	11 (7.0)	6 (12.6)	5 (4.5)	0.07
<i>Abscesos y celulitis ^c</i>	146	140	6		11	6	5	
SSTI complicadas	20 (4.7)	18 (6.3)	2 (1.5)	0.029	2 (1.3)	1 (2.0)	1 (<1)	0.56
<i>Con bacteriemias e infecciones secundarias</i>	19	17	2		2	1	1	
<i>Fascitis Necrotizante</i>	1	1	0		0	0	0	
<i>Infección de Pie Diabético</i>	0	0	0		0	0	0	
Sitio Quirúrgico (SSI)	27 (6.4)	15 (5.2)	12 (8.8)	0.15	18 (11.5)	8 (16.7)	10 (9.5)	0.17
Infecciones Músculo-esqueléticas	36 (8.5)	23 (8.0)	13 (9.6)	0.58	9 (5.7)	3 (6.3)	6 (5.5)	0.85
	[11]	[9]	[2]		[2]	[1]	[1]	
<i>Osteomielitis</i>	15	7	8		4	0	4	
<i>Artritis Séptica</i>	10	9	1		3	2	1	
<i>Infección de Prótesis Articular</i>	6	3	3		1	1	0	
<i>Piomiositis</i>	3	3	0		0	0	0	
<i>Spondilodiscitis</i>	2	1	1		1	0	1	
Infecciones del Tracto Respiratorio Bajo ^d	49 (11.5)	20 (6.9)	29 (21.3)	<0.0001	29 (18.5)	6 (12.5)	23 (21.1)	0.20
	[13]	[9]	[4]		[5]	[2]	[3]	
<i>Neumonía</i>	40	16	24		25	6	19	
<i>Absceso Pleural</i>	9	4	5		4	0	4	
Infecciones del Tracto Respiratorio Alto	5 (1.2)	4 (1.4)	1 (<1)	0.9	1 (<1)	0 (0)	1 (<1)	
<i>Otitis Media Aguda</i>	3	3	0		0	0	0	
<i>Sinusitis</i>	2	1	1		1	0	1	
Bacteriemia ^e	88 (20.8)	45 (15.7)	43 (31.6)	0.0001	50 (31.8)	14 (29.3)	36 (33.0)	0.63

RESULTADOS SEGUNDA PARTE

	[66]	[33]	[33]		[37]	[7]	[30]	
Endocarditis	2 (<1)	0	2 (1.5)	NA	0	0	0	
	[1]	[0]	[1]		[0]	[0]	[0]	
Pericarditis	1 (<1)	1 (<1)	0	NA	0	0	0	
Infección asociada a catéter	26 (6.1)	7 (2.4)	19 (13.9)	<0.0001	23 (14.6)	4 (8.3)	19 (17.4)	0.13
Absceso Profundo^f	3 (6.1)	2 (<1)	1 (<1)	0.99	2 (1.3)	1 (2.0)	1 (<1)	0.56
	[1]	[1]	[0]		[1]	[1]	[0]	
Linfadenitis	1 (<1)	1 (<1)	0	NA	0	0	0	
Infección del Sistema Nervioso	7 (1.7)	6 (2.1)	1 (<1)	0.67	3 (1.9)	3 (6.3)	0 (0)	NA
Central	[3]	[2]	[1]		[1]	[1]	[0]	
<i>Meningitis</i>	4	3	1		1	1	0	
<i>Ventriculitis Cerebral</i>	3	3	0		2	2	0	
Infección del Tracto Urinario	3 (<1)	1 (<1)	2 (1.5)	0.89	2 (1.3)	0	2	NA
	[3]	[1]	[2]		[2]	[0]	[2]	
Conjuntivitis	3 (<1)	2 (<1)	1 (<1)	0.99	1 (<1)	1 (2.0)	0 (0)	NA
Infección Intra-abdominal	5 (1.2)	1 (<1)	4 (2.9)	0.04	5 (3.2)	1 (2.0)	4 (3.7)	0.68
	[1]	[1]	[0]		[0]	[0]	[0]	
Adenoflemon Dental	1 (<1)	1 (<1)	0	NA	0	0	0	
Infección Invasiva^g	153 (47.5)	78 (34.1)	75 (80.6)	<0.0001	81 (76.4)	23 (67.6)	58 (80.6)	0.14

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 (infecciones totales y de inicio en el hospital) $\leq 0,05$ se muestran en letra negrita.

^a infecciones no son mutuamente excluyentes (423 infecciones por MRSA en 322 pacientes), los valores son número de infecciones y los porcentajes se indican entre paréntesis. [no]: número de pacientes con este foco de infección secundario.

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

^c Absceso y celulitis: incluyen 1 caso de impétigo y 8 casos de foliculitis para las infecciones causadas por CA-MRSA_G y 4 casos de infecciones de herida causadas por HA-MRSA_G.

^d Entre los casos de neumonía causada por HA-MRSA_G, el 75% eran neumonías asociadas a ventilación mecánica y entre las causadas por CA-MRSA_G, 69% fueron infecciones severas agudas, con bacteriemia y admisión a la UCI, y el 50% se presentó con sepsis.

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

^f Abscesos profundos incluidos son: abscesos de psoas y de torax (1 cada uno) para las infecciones por CA-MRSA_G, y uno absceso hepático entre las infecciones por HA-MRSA_G.

^g Los valores son número de pacientes, los porcentajes se indican entre paréntesis (Total: 322 pacientes: 229 con infecciones por cepas CA-MRSA_G y 93 con infecciones por HA-MRSA_G)

10.2.4 Comparaciones univariadas de características de los pacientes hospitalizados con infecciones por CA-MRSA_G: infecciones de inicio en la comunidad (CO) vs. infecciones de inicio en el hospital (HO).

Continuando con la evaluación del impacto que presenta CA-MRSA_G en el ambiente hospitalario, se analizaron, en el total de pacientes hospitalizados, todas las infecciones por CA-MRSA_G. Se comparó la infección por CA-MRSA_G iniciada en el hospital (HO), es decir aquella producida luego de 48h de hospitalización y la infección por CA-MRSA_G de inicio en la comunidad (CO) pero con posterior hospitalización del paciente a causa de la misma. En relación a los pacientes con infecciones CO, el 53,8% (105/195) de aquellos infectados por CA-MRSA_G, el 90,5% (19/21) de aquellos afectados por HA-MRSA_G y el 64,8% (103/159) de los infectados por MSSA, fueron hospitalizados.

Considerando sólo los pacientes hospitalizados con infecciones por CA-MRSA_G (n: 139: 105 con infecciones CO como causa de hospitalización y 34 con infecciones HO), las variables que difieren significativamente ($P < 0,05$) entre los pacientes con infecciones CO- vs. HO- se muestran en la Tabla 8. Entre estas, la admisión en la Unidad de Terapia Intensiva (UTI), infecciones no relacionadas a la piel y tejidos blandos (no-SSTI) (especialmente las de sitio quirúrgico (ISQ) y las infecciones invasivas, Tabla 9, pacientes con comorbilidades, presentación con sepsis y una duración de la internación mayor a 10 días fueron más comunes en el grupo HO que en el grupo CO ($P < 0,05$). Las infecciones de piel y tejidos blandos (SSTI) fueron las más frecuentes en el grupo CO.

Tabla 8: Infecciones causadas por genotipos CA-MRSA_G: asociación de factores socio-demográficos y clínicos de los pacientes con infecciones de inicio en el hospital (HO) vs las de inicio en la comunidad (CO), pacientes hospitalizados, Argentina, 66 hospitales, Nov, 2009

Características	no.(%) de pacientes			P valor/ Univariado odd de HO OR(95% CI)	P valor/ Multivariado odds de HO OR(95% CI)
	Total N: 139	HO n: 34	CO n: 105		
Grupo de edad <19	79 (56.8)	21 (61.8)	58 (55.2)	0.50 1.31(0.60-2.86)	
Proporción de mujeres	58 (41.7)	19 (55.9)	39 (37.1)	0.06 2.14(0.95-4.65)	
Enfermedades subyacentes^a	56 (40.3)	25 (73.5)	31 (29.5)	<0.0001 6.63(2.82-15.61)	0,016 4.71(1.34-16.55)
Características de la infección					
Infecciones No-relacionadas a la piel	91 (65.5)	29 (85.3)	62 (59.0)	0.0051 4.02(1.50-10.82)	0,038 7.14(1.12-45.53)
sepsis severa o shock séptico^b	34 (25.8)	12 (40.0)	22 (21.6)	0.0424 2.42(1.03-5.71)	
Características de la hospitalización					
Ingreso a UTI durante la hospitalización	23 (16.9)	13 (38.5)	10 (9.5)	0.0001 5.88(2.31-14.94)	
Tiempo de hospitalización (días)	13.77 ± 13.7	21.31 ± 19.5	11.29 ± 10.18		
Media ± SD/ Mediana (rango)	10 (1-90)	14 (1-90)	9 (1-60)	0.017	
Tiempo de hospitalización > 10 días	64 (46.0)	22 (64.7)	42 (40.0)	0.012 2.75(1.24-6.08)	
Mortalidad a los 30 días por todas las causas	4 (2.9)	3 (8.8)	1 (1.0)	0.045 10.06(1.43-71.01)	

CA-MRSA_G: genotipos de *S. aureus* resistentes a metilina asociados a la comunidad; CI, intervalo de confianza..

^a Enfermedades Subyacentes: diabetes, enfermedades del corazón, enfermedad del hígado o del riñón, enfermedad crónica del sistema nervioso central, enfermedades malignas o inmunodeficiencias (VIH, el SIDA y la artritis reumatoide).

^b n: 132, el dato sobre sepsis grave o shock séptico no estuvo disponible para: 7 pacientes (3 CO y 4 infecciones HO)

Tabla 9. Tipos de infección para 139 pacientes hospitalizados infectados con genotipos CA-MRSA_G, infecciones de inicio en la comunidad (CO) vs infecciones de inicio en el hospital (HO) en Argentina, 2009.

Infecciones por CA-MRSA _G en pacientes hospitalizados	no (%)			
	infecciones Totales	CO	HO	<i>P</i> valor
Tipos de Infección^a	N: 197	N: 149	N: 48	
<i>Piel y Tejidos Blandos (SSTI)^b</i>	70 (35.5)	63 (42.3)	7 (14.6)	0.0005
<i>SSTI no complicada</i>	52 (26.3)	46 (30.8)	6 (12.6)	0.012
<i>Abscesos and celulitis^c</i>	52	46	6	
<i>SSTI complicada</i>	18 (9.1)	17 (11.4)	1 (2.0)	0.079
<i>Con bacteriemia e infecciones secundarias</i>	17	16	1	
<i>Fascitis Necrotizante</i>	1	1	0	
Sitio Quirúrgico (SSI)	15 (7.6)	7 (4.7)	8 (16.7)	0.006
<i>Musculo-esqueléticas</i>	23 (11.7)	20 (13.4)	3 (6.3)	0.17
<i>Osteomielitis</i>	7	7	0	
<i>Artritis séptica</i>	9	7	2	
<i>Infección de Prótesis Articular</i>	3	2	1	
<i>Piomiositis</i>	3	3	0	
<i>Spondilodiscitis</i>	1	1	0	
<i>Infecciones del Tracto Respiratorio Bajo</i>	20 (10.1)	14 (9.4)	6 (12.5)	0.53
<i>Neumonía</i>	16	10	6	
<i>Abscesos Pleurales</i>	4	4	0	
<i>Infecciones del Tracto Respiratorio Alto</i>	3 (1.5)	3 (2.0)	0 (0)	
<i>Otitis Media Aguda</i>	2	2	0	
<i>Sinusitis</i>	1	1	0	
<i>Bacteremia^d</i>	45 (22.8)	31 (20.8)	14 (29.3)	0.23
<i>Endocarditis</i>	0	0 (0)	0	
<i>Pericarditis</i>	1	1 (<1)	0	
<i>Infección Asociada a catéter</i>	7 (3.6)	3 (2.0)	4 (8.3)	0.07
<i>Abscesos Profundos^e</i>	2 (1.0)	1 (<1)	1 (2.0)	
<i>Linfadenitis</i>	1 (<1)	1 (<1)	0	
<i>Infecciones del Sistema Nervioso Central</i>	6 (3.0)	3 (2.0)	3 (6.3)	0.15
<i>Meningitis</i>	3	2	1	
<i>Ventriculitis Cerebral</i>	3	1	2	
<i>Infección del Tracto Urinario</i>	1 (<1)	1 (<1)	0	NA
<i>Conjuntivitis</i>	2 (1.0)	1 (<1)	1 (2.0)	0.42
<i>infecciones Intra-abdominal</i>	1 (<1)	0	1 (2.0)	NA
Infecciones Invasivas^f	73 (52.5)	52 (47.6)	23 (67.3)	0.042

CA-MRSA_G: Genotipos de *S. aureus* resistentes a la metilina asociados a la comunidad

^a Infecciones no son mutuamente excluyentes (197 infecciones en 139 pacientes hospitalizados) y los valores son número de infecciones y los porcentajes se indican entre paréntesis.

^b SSTI: Los casos de infecciones primarias de la piel fueron clasificados como sin complicaciones, mientras que las SSTI complicadas incluyó casos con bacteriemia secundaria o su propagación a los tejidos contiguos.

^c Absceso y celulitis: incluyen 3 casos de foliculitis en infecciones CO.

^d Bacteriemias: se incluyeron aquellas clasificadas como primarias, secundarias y no especificadas.

^e Abscesos profundos incluidos: psoas (1 de infecciones CO) y de tórax (1 de infecciones HO).

^f Valores son número de pacientes hospitalizados y los porcentajes se indican entre paréntesis (Total: 139 pacientes, 105 con infecciones de CO y 34 con infecciones HO).

10.2.5 Análisis Multivariados o de Regresión Múltiple

Hasta aquí todas las comparaciones fueron analizadas de manera univariada, además con aquellas variables que difirieron significativamente ($P < 0,05$) se realizó el análisis multivariado.

En el análisis multivariado, considerando el total de infecciones por MRSA, cuando se compararon las infecciones por CA-MRSA_G con las causadas por HA-MRSA_G, las infecciones por CA-MRSA_G se asociaron independientemente con la edad <19 años (OR 12,33) y con menor frecuencia de comorbilidades (OR 0,16) de los pacientes afectados, como así también con infecciones de inicio en la comunidad (OR 6,97), y con la presencia de infecciones de piel y tejidos blandos. (OR 6,24) (Tabla 6).

Por otro lado, considerando sólo los pacientes con infecciones HO, sólo la edad <19 años (OR 13,90) se asoció a los CA-MRSA_G. (Tabla 6).

En el estudio multivariado de los pacientes hospitalizados con infecciones por CA-MRSA_G (Tabla 8) sólo la presencia de algún tipo de enfermedad subyacente (OR 4,71) e infecciones que no eran de piel (No-SSTI, OR 7,14) se asociaron de forma independiente con infecciones de inicio en el hospital causadas por los genotipos CA-MRSA_G.

10.2.6 Comparaciones (univariadas y multivariadas) de las características socio-demográficas y clínicas de las infecciones por CA-MRSA_G vs MSSA y HA-MRSA_G vs MSSA.

Cuando se compararon las características sociodemográficas y clínicas de los pacientes infectados con MSSA vs. aquellos afectados por CA-MRSA_G y también los infectados por MSSA y aquellos infectados con HA-MRSA_G, no hubo diferencias significativas en la distribución de género entre los genotipos de HA-MRSA_G, CA-MRSA_G y MSSA ya sea en el ambiente hospitalario como en la comunidad.

En el análisis de todas las demás variables, se detecta que MSSA tiende a tomar valores de porcentajes intermedios entre ambos genotipos de MRSA, en cada característica demográfica o clínica evaluada. Estas variables se compararon primero en el análisis univariado y luego aquellas con diferencias significativas ($P < 0,05$) fueron utilizadas para el análisis multivariado (Tabla 10) y se concluyó que: **i)** cuando se compara la población de pacientes infectados con CA-MRSA_G vs los infectados por MSSA, las infecciones por CA-MRSA_G están independientemente asociadas con pacientes previamente sanos y con infecciones de inicio en la comunidad. Si se comparan sólo las infecciones de inicio en el hospital, las producidas por CA-MRSA_G están independientemente asociadas con pediatría; **ii)** cuando comparamos la población de pacientes infectados con HA-MRSA_G vs los infectados por MSSA, las infecciones por HA-MRSA_G están independientemente asociadas con pacientes adultos, con historia de infección o colonización previa por MRSA, con infecciones hospitalarias (con un tiempo transcurrido desde el ingreso hasta el cultivo positivo > 5 días) y con infecciones NO relacionadas a la piel (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis multivariado: variables asociadas con genotipos CA-MRSA_G vs. MSSA y con genotipos HA-MRSA vs MSSA en el total de pacientes infectados con *S. aureus*, en aquellos con infecciones de inicio en la comunidad (CO) y en aquellos con infecciones de inicio en el hospital (HO).

Variables ^a	CA-MRSA vs MSSA p-Valor/OR (95% CI)	HA-MRSA vs MSSA p-Valor/OR (95% CI)
Infecciones totales por <i>S. aureus</i>		
Grupo etario ≥ 19	0,075/0.62(0.37-1.05)	0,003/3.79(1.55-9.25)
Enfermedad de base ^b	<0,0001/0.37 (0.22-0.64)	0.69/1.16(0.53-2.56)
Historia de MRSA infección/colonización	NS	0,002/13.16(2.48-70.02)
Lugar de inicio de la infección		
Inicio en el hospital	0,009/0.46(0.26-0.82)	0,001/3.61(1.70-7.69)
Inicio en la comunidad	0,009/2.18(1.22-3.91)	0,001/0.28(0.13-0.56)
Tipo y Severidad de la Infección		
Piel y Tejidos Blandos (SSTI)	0.40/ 1.27(0.72-2.24)	0,012/0.12(0.02-0.63)
Infección que NO es de piel y Tejidos Blandos (NO-SSTI)	0.40/ 0.78(0.45-1.38)	0,012/8.36(1.59-43.93)
Infecciones de inicio en la comunidad	CA-MRSA vs MSSA p-Value/OR (95% CI)	HA-MRSA vs MSSA p-Value/OR (95% CI)
Grupo etario < 19	NS	NS
Grupo etario ≥ 19	NS	NS
Enfermedad de base	<0,0001/0.25 (0.13-0.46)	0.28/ 2.41(0.48-12.00)
Historia de MRSA infección/colonización	NS	0,006/31.45(2.63-375.28)
Tipo y Severidad de la Infección		
Piel y Tejidos Blandos SSTI	0.91/ 1.04(0.55-1.93)	0,054/0.07(0.005-1.05)
Infección NO SSTI	0.91/ 0.96(0.52-1.8)	0,054/14.3(0.95-214.7)
Infecciones de inicio en el hospital	CA-MRSA vs MSSA p-Value/OR (95% CI)	HA-MRSA vs MSSA p-Value/OR (95% CI)
Grupo etario < 19	0,006/ 3.82(1.46-10.00)	0,002/ 0.14(0.04-0.49)
Grupo etario ≥ 19	0,006/ 0.26(0.10-0.68)	0,002/ 7.37(2.04-26.59)
Tiempo a la infección ^c ≤ 5 días	NS	0,024/ 0.34(0.13-0.86)
Tiempo a la infección ^c > 5 días	NS	0,024/ 2.94(1.15-7.52)

CA-MRSA_G: Genotipos de MRSA asociados a la comunidad y HA-MRSA_G: Genotipos de MRSA asociados a la atención sanitaria, MSSA, *S. aureus* sensible a meticilina; OR, odd ratio; CI, intervalo de confianza.

Se muestran marcadas con fondo negro las variables asociadas con CA-MRSA_G (comparación CA-MRSA_G vs MSSA) y con HA-MRSA_G (comparación HA-MRSA_G vs MSSA) con un valor P ≤ 0,05 en el análisis multivariado.

^a Variables: Del total de variables comparadas en el análisis univariado sólo se enumeran en la tabla aquellas que tuvieron una $P < 0.05$ en el análisis univariado en por lo menos un de las comparaciones. NS: $P > 0.05$ en el análisis univariado.

^b Enfermedades subyacentes: diabetes, enfermedad cardíaca o infarto, enfermedad de pulmón o riñón, enfermedades crónicas del SNC, cáncer o inmunodeficiencias (HIV, AIDS y artritis reumatoidea)

^c Tiempo a la infección: tiempo transcurrido desde el ingreso hasta el cultivo positivo para *S aureus*.

10.3 CONCLUSIONES

10.3.1 INFECCIONES DE INICIO EN LA COMUNIDAD

En el análisis multivariado para establecer factores de riesgo se compararon las características clínicas y sociodemográficas de pacientes infectados con:

- **CA-MRSA_G vs aquellos infectados por MSSA:** La ausencia de Comorbilidades está independientemente asociada con infecciones por CA-MRSA_G [(OR: 0,25(0,13-0,46)]
- **HA-MRSA_G vs aquellos infectados por MSSA:** Infección o colonización previa por MRSA [(OR: 31,45(2,63-375,3)].

Paciente sano (sin co-morbilidades) con infección o colonización previa por MRSA tiene más probabilidad que sea una infección de la comunidad causada por MRSA que por MSSA.

Al comparar las características sociodemográficas de pacientes infectados por el genotipo HA-MRSA_G vs aquellos con infecciones por CA-MRSA_G se establecieron los siguientes factores de riesgo para infección por CA-MRSA_G: **Pediatría <19 años** [OR: 6,3 (1,10-40,03)], **Ausencia de Comorbilidades** [OR: 0,07(0,01-0,49)] e **infecciones de piel y tejidos blandos** [OR: 16,11(1,41-184,4)] por lo tanto se puede concluir que:

Paciente pediátrico (< 19 años), sano (sin co-morbilidades) y con SSTI tiene más probabilidad de tener una infección de la comunidad causada por por CA-MRSA_G que por HA-MRSA_G

10.3.2 INFECCIONES DE INICIO EN EL HOSPITAL

De la comparación de las características clínicas y sociodemográficas de pacientes infectados con:

- **CA-MRSA_G vs HA-MRSA_G:** < 19 años [(OR: 13,90- (CI 95: 3.54-54.40)]
- **CA-MRSA_G vs MSSA:** < 19 años [(OR: 3,82-(1,46-10,00)]
- **HA-MRSA_G vs MSSA** ≥19 años [(OR: 7,37-(2,04-26,6)] y tiempo desde el ingreso al cultivo positivo > 5 días [(OR: 2,94-(1,15-7,52)].

Se puede concluir que ante una infección de inicio en el hospital por *S. aureus*:

- ✓ *Un paciente pediátrico (< 19 años, especialmente < 1 año) tiene mayor probabilidad de padecer una infección por CA-MRSA que por HA-MRSA o MSSA.*
- ✓ *Si el tiempo transcurrido desde el ingreso del paciente al hospital hasta detectar el primer cultivo positivo es mayor a 5 días, tiene mayor probabilidad de padecer una Infección por HA-MRSA que por MSSA*
- ✓ *No hay diferencias significativas entre los tipos de infecciones de inicio en el hospital producida por los genotipos HA-MRSA_G vs CA-MRSA_G*

PACIENTES HOSPITALIZADOS CON INFECCIONES POR CA-MRSA_G

*Es más probable que los pacientes infectados por genotipos CA-MRSA_G de inicio en el hospital sean pacientes con **co-morbilidades** [OR 4,71(1,34-16,55)] y que desarrollen **infecciones no relacionadas a la piel** [OR 7,14(1,12-45,53)] comparados con los pacientes infectados por genotipos CA-MRSA_G pero con infección de inicio en la comunidad por la cual se hospitalizó.*

CONCLUSIÓN:

En el hospital los genotipos CA-MRSA_G tienden a comportarse de manera similar a los genotipos HA-MRSA_G

11 RESULTADOS TERCERA PARTE

11.1 OBJETIVO GENERAL

I- Determinar el impacto epidemiológico actual de las infecciones por CA-MRSA, en la República Argentina

11.1.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

Ie- Determinar genéticamente la relación evolutiva de los genotipos CA-MRSA_G, con clones de *S. aureus* meticilino sensibles (MSSA) detectados en nuestro país.

11.2 *Ie* Resultados

11.2.1 Características microbiológicas de las cepas de *S. aureus* sensibles a meticilina (MSSA).

Para determinar genéticamente la relación evolutiva de los genotipos CA-MRSA_G, con clones de *S. aureus* meticilino sensibles (MSSA) detectados en nuestro país se compararon las características moleculares de los aislamientos con genotipos de CA-MRSA_G y los aislamientos de *S. aureus* sensibles a Meticilina (MSSA) detectados en nuestro país en el estudio multicéntrico.

Considerando el total de 591 aislamientos clínicos de *S. aureus* recuperados en este estudio, el 46% (n 269) fueron infecciones por MSSA y de ellas el 44% correspondió a pacientes pediátricos y el 47% a pacientes adultos. Además, la distribución regional, en Argentina, de MSSA representó 16% (norte), 46% (centro) y 71% (sur) (Figura.11 A). Utilizando el criterio epidemiológico del CDC, también las infecciones por MSSA fueron clasificadas como asociadas a la comunidad de inicio en la comunidad (CACO) 49% (n: 86), asociadas a la atención sanitaria de inicio en la comunidad (HACO) (n: 73) 48% y las asociadas a la atención sanitaria de inicio en el hospital (HAHO) 51% (n: 110) (Figura. 9 pág. 94). Entonces, evaluando el total de infecciones de inicio en la comunidad CO (CACO + HACO) se observó que MSSA causó el 42% (n: 159) de las mismas.

Para llevar a cabo el análisis molecular de MSSA, se seleccionó una muestra de 132 aislamientos, representativa de las infecciones de inicio en la comunidad y en el

hospital, de pediatría y de adultos y de las diferentes regiones del país. Por lo tanto, del total de 132 aislamientos de MSSA, el 39% (n: 52) fueron aislados de niños y el 60% (n: 80) de adultos, el 42% (n: 55) fueron recuperados del centro del país, el 27% (n: 36) del norte y el 31% (n: 41) del sur, el 67% (n: 89) causaron infecciones CO y el 33% (n: 43) infecciones HO.

Estas cepas produjeron, los siguientes tipos de infecciones: sepsis (16%, n: 21), infecciones musculo-esqueléticas (14%, n: 18), infecciones de piel y tejidos blandos (39%, n: 51 casos, 8 complicados con bacteriemia), infecciones de sitio quirúrgico (11%, n: 14), bacteriemias (33%, n: 44), Infecciones pulmonares (11%, n: 15), abscesos profundos (3%, n: 4), infecciones cardiovasculares (1,5%, n: 2), infecciones asociadas a catéteres (11%, n: 14), infecciones del SNC (2%, n: 3), Infecciones del tracto urinario (3%, n: 4), infecciones oculares (1,5%, n: 2), e infecciones intra-abdominales (1,5%, n: 2).

11.2.2 Caracterización molecular y distribución regional de MSSA

El análisis molecular de los MSSA incluyó PFGE y *spa typing* a todos los aislamientos seleccionados. Primero se realizó *spa typing* y aquellos tipos *spa* genéticamente relacionados se los agrupó juntos en los geles en el PFGE. El tipo secuencial (ST)/Complejo Clonal (CC) se infirió de acuerdo al *spa t*, en aquellos que no tuvieron un ST relacionado se realizó Multilocus Sequence Typing (MLST)

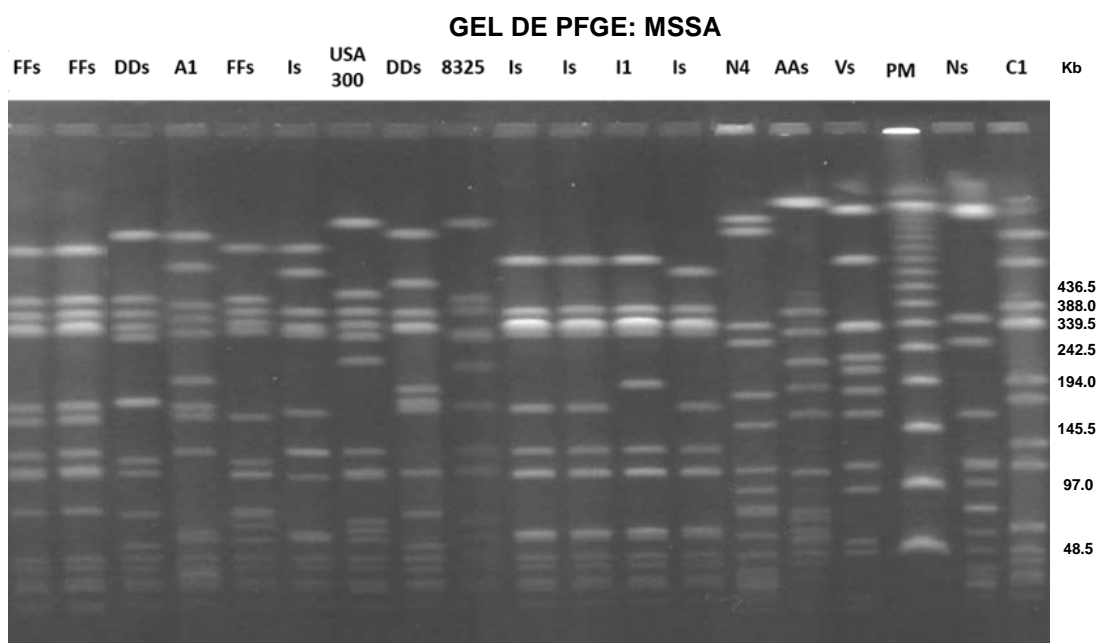


Figura 21.: Gel de PFGE, se muestran los patrones de bandas correspondientes a los aislamientos de MSSA analizados. Las letras (arriba) indican el pulstipo y/o familia clonal a la que pertenece cada aislamiento. La letra "s", como subíndice, refiere al aislamiento Meticilino Sensible analizado.

El análisis molecular por *spa typing*; reveló una elevada diversidad genética 65 diferentes tipo *spa* (*t*) a partir de los 132 aislamientos (tabla 11.). Estos tipos *spa* fueron agrupados dentro de 12 CC según MLST (%): CC5 (21), CC30 (16), CC1 (15), CC121 (10), CC8 (8), CC45 (8) CC12 (1), CC97 (8), CC25 (4) CC101 (2), CC15 (1), CC88 (1) y se presentaron distribuidos en todo el país (Figura 23). En el total se detectó el predominio del CC5 (20%) seguido por el CC30 (16%) (Figura 22). Se demostraron significativas diferencias en las proporciones de los principales CC entre el norte y el sur del país: el CC5 (principalmente *t*311 y *t*002) representó el 35% en el Norte vs 10% en el Sur ($p=0.004$) y el CC30 (principalmente *t*012, *t*021 y *t*018) representó el 5% en el Norte vs. 33% al Sur ($p=0.01$). Por PFGE, los principales pulsotipos de MSSA fueron: Is (CC5), Ns (CC30) ambos relacionados a pulsotipos de los clones mayores de CA-MRSA: I, N circulantes en Argentina. Es destacable, entonces, que los MSSA se presentaron con una distribución geográfica inversa a la descrita para el MRSA concomitante en su linaje.

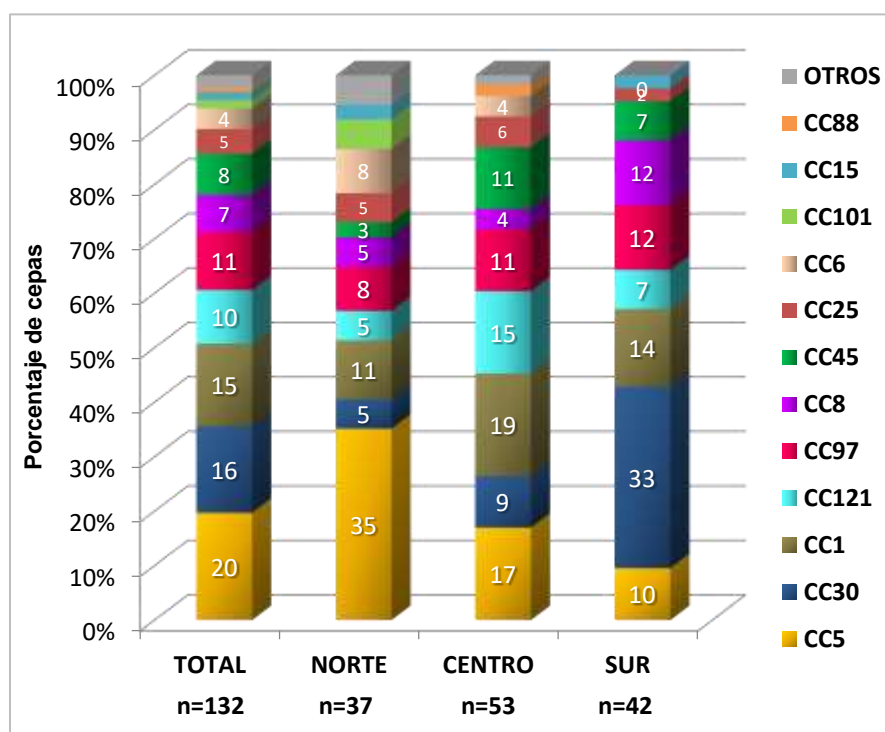


Figura 22: Distribución regional (Norte, Centro y Sur) de Complejos Clonales (CC) de MSSA analizados en Argentina, 2009

El análisis por *spa typing* de los aislamientos MSSA que conformaron los linajes: CC5 y CC30 evidenció una elevada variabilidad en los MSSA (comparados con MRSA) (Figura 23 y tabla 11). Sin embargo se observó, en el CC5, un predominio del tipo *spa*

t311 (46%), seguido del t002 (30%) y en el CC30, existió un predominio del t012 (ya descrito desde el año 2007 entre los MSSA, circulantes en Argentina. [171], seguido del t021 representando el 36% y el 14% de los aislamientos MSSA, dentro de este linaje, respectivamente (Figura 23).

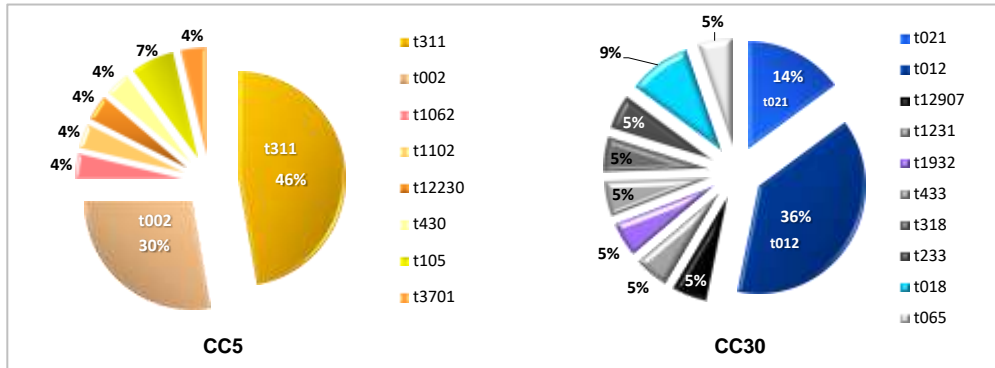


Figura 23: Distribución de los diferentes tipo *spa* en los dos más prevalentes CC (MLST) detectados en MSSA. Se indica en la gama de los amarillos-anaranjados los linajes de *spa* que compartieron CC5 y en la gama de los azules los tipo *spa* relacionados al CC30.

El Background genético de los principales CC en estudio, se expresa en la tabla 11 en la misma se comparan las características moleculares de MSSA con los MRSA del mismo linaje, para poder ilustrar o esclarecer el posible origen o vía evolutiva de los clones MRSA más relevantes que circulan en el país.

Tabla 11 Comparación de Background Genéticos de MSSA vs MRSA diseminados en Argentina. Se indica el CC y ST (por MLST), Pulsotipo (por PFGE), t (por *spa* tipyng). Sensibilidad / Resistencia a Meticilina y detección del gen *PVL*.

BACKGROUND					
GENÉTICO	PFGE type/n (%)	<i>spaA</i> type t:n(%)	MS/MR	PVL (%)	
CC5	ST5	Is/ 26(20%)	t311: 12 (46%), t002: 8, (31%), t105:2(7%), t1062:1 t11002:1 ,t443:1, t3701:1	MSSA	PVL+: (42%) / t311 (99%)
	ST5	I/ 102(45%)	t311: 84(82%), t002: 17(17%)	MRSA	PVL+ : 79%
	ST100	C/25(8%)	t002:21(84%), t3152:1, t1341:1, t548:1, t067:1	MRSA	PVL-
	ST5	A/63(66%)	t149: 61(100%)	MRSA	PVL-
CC30	ST30	Ns/ 21(16%)	t012: 8(38%), t021: 3(14%), t018: 2(9%), t433: 1, t318: 1, t189: 1, t136: 1, t233: 1, t1932: 1, t1231: 1, t12907: 1	MSSA	PVL- PVL- PVL-
		N/104 (45%)	t019: 102(99%), t021: 2(1%)	MRSA	PVL+ : 100%
CC121	ST121	Vs/ 13(9%)	t1688: 3(23%), t159: 2(15%), t645: 2(15%), t1588: 2(15%), t2155:2(15%), t 272:1, t4976:1	MSSA	PVL+: 8%
	ST121	V/3(1%)	t159:2	MRSA	PVL-
	ST1210		t812:1		PVL+
CC45	ST45	AAs/ 11(8%)	t550: 3(27%), t065: 3(27%), t105: 1, t371: 1, t671: 1, t330: 1, t722:1, t5211: 1	MSSA	PVL- PVL-
	ST45	AA/1(1%)	t5834:1	MRSA	PVL-
CC88	ST88	BBs/ 1(1%)	t186:1	MSSA	PVL-
	ST88	BB1	t186:1	MRSA	PVL-
CC97	ST97	DDs/ 12(10%)	t267: 4(31%), t359: 2(23%), t2802: 2(15%) t3380: 1, t2612: 1, t2279: 1, t1190: 1	MSSA	PVL- PVL-
		DDD/ 2(1%)	t359: 1, t224: 1		PVL-
	ST97	DD/4(1%)	t2734:1, t359:2 (50%), t267:1	MRSA	PVL-
CC1	ST1	FFs/ 6(11%)	t127: 3(21%), t128: 1, t1853: 1, t2279: 1	MSSA	PVL-
	ST1	FF/1 (1%)	t127:1	MRSA	PVL+
	ST188	TTs/ 10(8%)	t189: 10(100%)	MSSA	PVL-
	ST188	DDN/ 3(2%)	t2612: 2, t2883: 1	MSSA	PVL-
CC8	ST72	Rs/ 4(2%)	t148: 3(75%), t12229: 1	MSSA	PVL-
	ST72	R/10(3%)	t148:5 (50%), t1346:4(40%), t3092:1	MRSA	PVL-
	ST8	USAs/ 5(4%)	t008: 3(60%), t530: 1, t304: 1	MSSA	PVL-
CC15	ST8	USA/5(1,5%)	t008: 5(100%)	MRSA	PVL+ : 80%
	ST239	B/6 (4,5%)	t037:6(100%)	MRSA	PVL-
	ST15	CCs/ 2(2%)	t2055: 1, t084	MSSA	PVL-
	ST15	CCs/ 1(1%)	t084:1	MRSA	PVL+

El CC5 presentó la mayor prevalencia tanto en MSSA (pulsotipo Is) como en MRSA (pulsotipos I1, C1, A1).

Dentro de este linaje el *spa* t311 seguido del t002 fueron compartidos por ambos, MSSA y MRSA, así el *spa* t311 representó el 46% del total de MSSA y el 82% de los aislamientos pertenecientes al clon CA-MRSA-I-ST5 IV (altamente prevalente en el sur y centro del país) ambos portando la toxina Pantón Valentine Leucocidina. El *spa* t002 representó el 31% de los MSSA y el 17% del CA-MRSA-I-ST5 IV y el 84% del clon HA-MRSA-C-ST100-IVNv. Estos resultados sugieren que este clon CA-MRSA habría emergido en esta región a partir de su par MSSA, y posiblemente lo mismo habría sucedido con el clon HA-MRSA ST100-IVNv-t002 (perteneciente al CC5).

Respecto al CC30, en MSSA se observó, el pulsotipo Ns (16%) con un predominio del tipo *spa* t012 (38%) (Descrito en el año 2007 por nuestro grupo de laboratorio) (123) indicando que este MSSA es un clon establecido en la región. En segundo lugar se detectó el t021 (14%). En cambio, dentro de los MRSA del mismo linaje ST30 y pulsotipo N, la mayor proporción de los aislamientos fueron caracterizados como tipo *spa* t019 (99%) (clon CA-MRSA N- ST30-IV-t019 diseminado en el norte del país), no se detectó el tipo *spaA* t012 y sólo se detectó el tipo *spa* t021 en baja proporción (1%). Cabe destacar que el tipo *spa* t019 no fue detectado entre los MSSA. Indicando que el clon CA-MRSA N- ST30-IV-t019 no emergió en la región sino que fue diseminado desde países vecinos desde el norte y este del país, como Uruguay donde está descrito como un clon epidémico, Brasil y Paraguay.

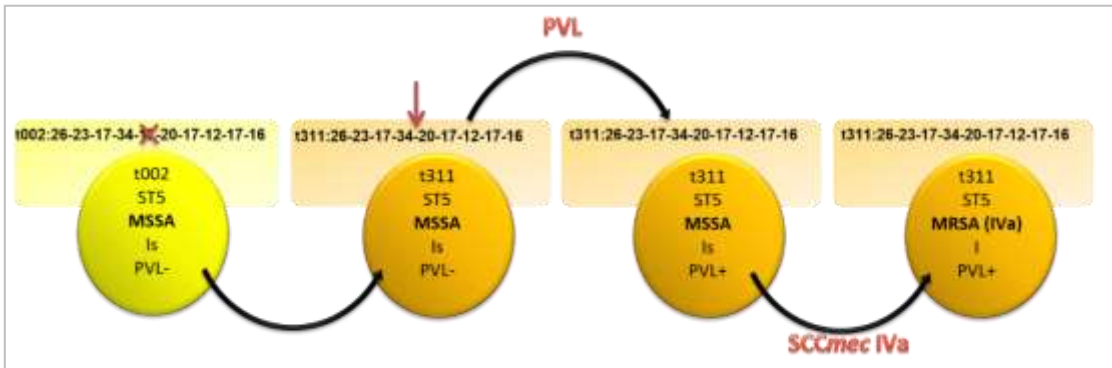
Además, clones menores o esporádicos, también fueron detectados, como es el caso de los pertenecientes al CC97. Entre los aislamientos de este linaje se encontró una alta diversidad de tipo *spa* pero sólo los t269 y t359 fueron hallados tanto en MSSA como en MRSA, sugiriendo la emergencia regional de estos clones de MRSA del linaje ST97-IV. El CC97 es de importancia epidemiológica por ser ST97 un linaje descrito como relacionado al ganado [150, 172], situación de relevancia en nuestro país por la importante actividad ganadera desarrollada.

Respecto al CC8 se detectaron dos linajes relacionados a clones CA-MRSA internacionales, por un lado el ST72, clon pandémico diseminado en Asia, principal CA-MRSA diseminado en Corea del Sur [173]. En Argentina fue detectado en bajo porcentaje produciendo infecciones en pediatría e infecciones asociadas al ambiente hospitalario (resultados ya indicados en el apartado de MRSA “caracterización molecular de las cepas”).Coincidente con este, se hallaron aislamientos ST72-t148 entre la población de MSSA estudiada, sugiriendo la emergencia regional de este clon CA-MRSA. Por otro lado dentro del mismo CC8 se detectó el linaje ST8-t008 tanto en MSSA como en MRSA (principal clon epidémico CA-MRSA de EE.UU, USA300, diseminado en varios países del mundo [143, 153, 158]. Sin embargo, como ya se indicó, dentro de los MRSA de este linaje se encontraron cinco aislamientos con cuatro diferentes *SCCmec*, indicando adquisiciones independientes de estos elementos por parte del mismo linaje MSSA ST8-t008 y no la diseminación de un solo clon en nuestra región.

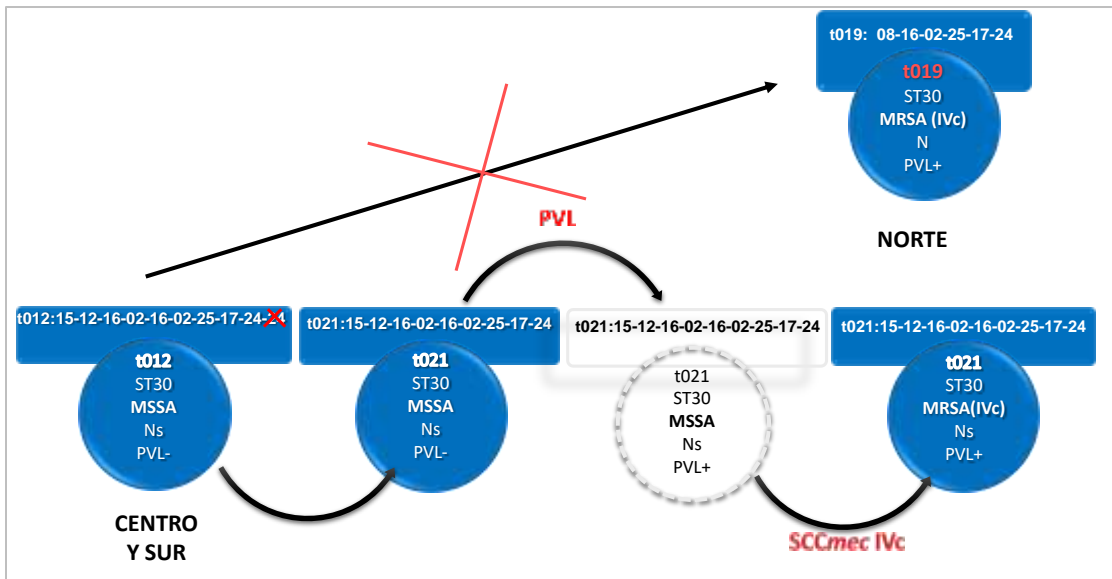
11.2.3 Caminos evolutivos de los principales clones CA-MRSA

Con los resultados anteriormente descritos y destacando los clones más importantes como del linaje ST5 y ST30, se sugirió la vía evolutiva descrita en las siguientes figuras (24 y 25).

CAMINO EVOLUTIVO PROPUESTO PARA CA-MRSA_G ST5-IV



CAMINO EVOLUTIVO PROPUESTO PARA CA-MRSA_G ST30 IV



Figuras 24 y 25: Los modelos se basaron en la combinación del análisis del tipo *spa*, pulsotipos por PFGE, adquisiciones del *SCCmec* y de los genes codificantes para la toxina Leucocidina de Panto-Valentine. Los clones del linaje ST5 están representados con círculos sombreados con tonalidades amarillas y los del linaje ST30 con azules. Las flechas indican las direcciones de cambio entre los clones. Al en el rectángulo se indica el tipo *spa* y las alteraciones en los perfiles de estos. Sobre las flechas se señalan las adquisiciones del *SCCmec* y de los genes *pvl*. Los círculos sin color de relleno indican clones hipotéticos no detectados en este estudio. La flecha tachada con X indica un camino evolutivo no detectado.

Estos caminos evolutivos implican la emergencia en el país del clon CA-MRSA I-ST5-SCC*meclVa*-t311-PVL+ establecido en el centro y sur del país y la diseminación desde países vecinos hacia el norte y este del clon CA-MRSA ST30-SCC*meclVc*-t019-PVL+.

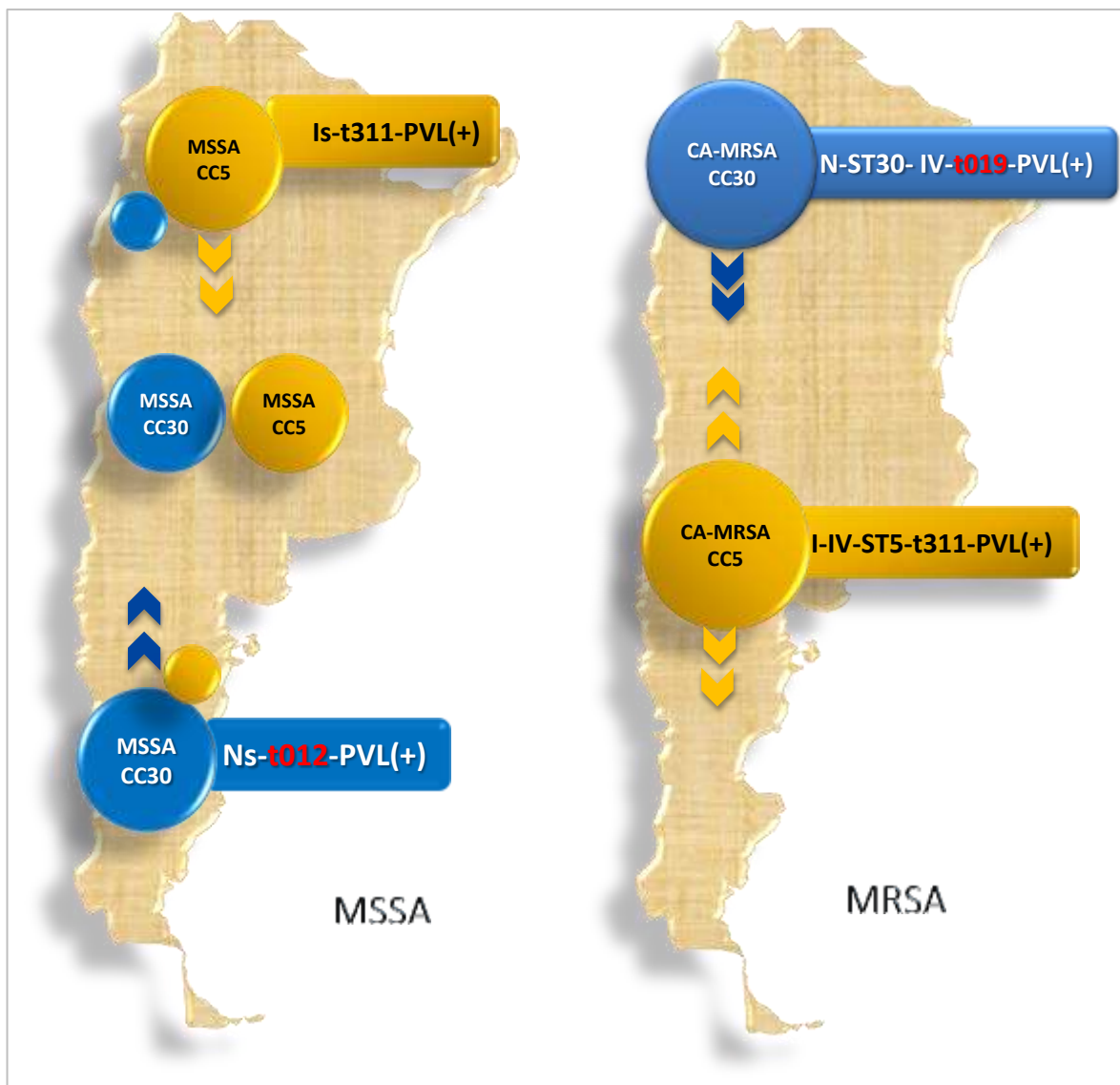


Figura 26. Distribución de los linajes predominantes en Argentina. En la figura se muestra la distribución inversa de entre los linajes de MSSA y MRSA, como también es posible dilucidar origen de los dos principales CA-MRSA detectados en Argentina. En color azul está representado el linaje ST30, en rojo se indican los tipo *spa* diferentes encontrados para este linaje. En color amarillo está representado el linaje ST5.

11.3 CONCLUSIONES

Considerando que:

- Se evidenció una elevada diversidad genética de los clones MSSA vs MRSA.
- Se identificaron clones CA-MRSA internacionales (ST72-IV, ST97-IV) y linajes genéticos MSSA estrechamente relacionados.
- Si bien en el mapa de MRSA se identificaron dos clones CA-MRSA principales, ST30-IVc-t019 más prevalente en el norte del país disminuyendo hacia el sur y ST5-IVa-t311 en el centro y sur, en la distribución de los MSSA se detecta una disposición inversa. Se observó un predominio del clon "Is" ST5-t311-PVL⁺ en el norte y centro y mientras que en el sur prevalece el Ns-ST30-t012-PVL⁻. No se evidenció una cepa MSSA N-ST30-t019.

Se puede concluir lo siguiente:

- ✓ *Aparición local y continua de nuevos clones CA-MRSA a partir de linajes exitosos de MSSA.*
- ✓ *Emergencia local del clon CA-MRSA ST5-IVa-t311-PVL⁺ a partir de un linaje ST5 MSSA exitoso establecido en nuestra geografía.*
- ✓ *El clon CA-MRSA ST30-IVc-t019-PVL⁺ podría ser el resultado de la diseminación desde países limítrofes como Uruguay, Brasil, Bolivia y Paraguay donde ese clon ha causado infecciones.*

12 RESULTADOS CUARTA PARTE

12.1 OBJETIVO GENERAL

En este punto del trabajo, después de identificar el desplazamiento de los clones tradicionales HA-MRSA a nivel hospitalario en Argentina debido a la diseminación de clones CA-MRSA epidémicos, especialmente del clon CA-MRSA I-ST5-SCC mec IV-t31. Se decidió intentar responder un interrogante fundamental del terreno de la epidemiología: ¿Existe alguna característica biológica medible en relación al desarrollo de estrategias que le permitirían a estos clones CA-MRSA adquirir una mayor capacidad de colonizar y sobrevivir en diferentes reservorios ambientales facilitando la diseminación y el establecimiento en todo el país tanto en la comunidad como a nivel hospitalario?. Por lo tanto en esta última etapa de la tesis planteamos el siguiente objetivo general II:

II- Analizar estrategias de virulencia y/o transmisibilidad de los diferentes clones y su posible asociación con epidemicidad (supervivencia en superficies inertes y formación de biofilm)

12.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

IIa- Evaluar la proporción de supervivencia en una superficie inerte (melamina) entre diferentes clones MRSA epidémicos

IIb- Evaluar en clones MRSA epidémicos la expresión diferencial de genes relacionados a la adhesión, biofilm y expresión de reguladores globales en *S. aureus* durante la persistencia en una superficie inerte.

IIc-- Evaluar en clones MRSA epidémicos la expresión diferencial de genes relacionados a la adhesión, biofilm y expresión de reguladores globales en *S. aureus* en el estado de biofilm.

12.2Ia Resultados-

12.2.1 Evaluación de la proporción de supervivencia en una superficie inerte (melamina) entre diferentes clones MRSA epidémicos.

El éxito epidemiológico de MRSA es debido, no sólo a sus determinantes de virulencia, sino también a factores que intensifican su capacidad de sobrevivir y persistir en el ambiente siendo éste un reservorio desde el cual puede diseminarse. Se eligió como material inerte una superficie de melamina porque es el material más frecuentemente utilizado para el mobiliario en los hospitales y también en los hogares.

Ensayo de supervivencia en superficie de melamina

Esquema del ensayo en superficie de melamina (Figura 5, página 177)

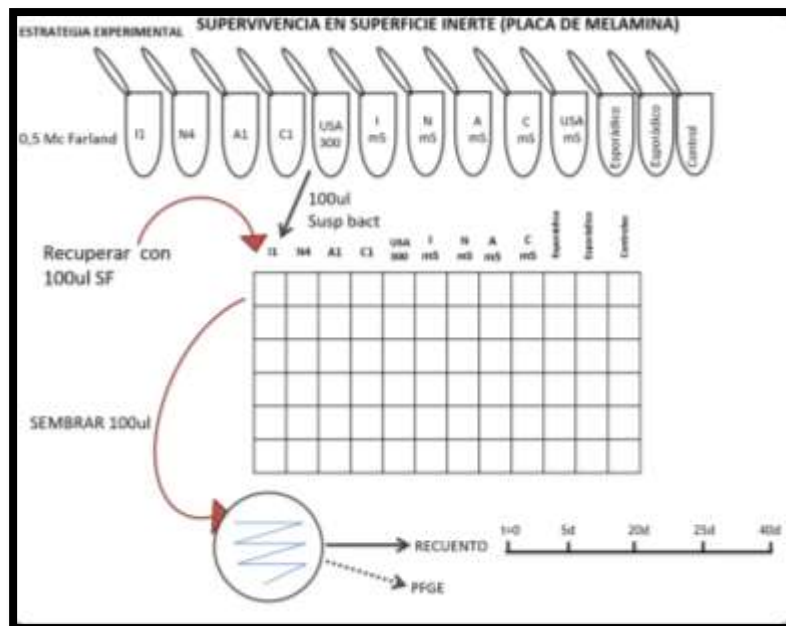


Figura 5. Esquema de la metodología utilizada para evaluar supervivencia en superficie inerte (placa de melamina)

-Cada cuadrado representa la superficie donde se depositó una gota de 100ul de suspensión bacteriana de aislamientos de cada familia clonal analizada.

-Cada fila está dividida en seis cuadrados de los cuales los tres primeros, contienen la suspensión de tres aislamientos diferentes cada uno, pero todos pertenecientes a la misma familia clonal o pulsotipo y los tres últimos cuadrados contienen la suspensión del aislamiento depositado en el cuarto lugar repetido por triplicado en el cuarto, quinto y sexto cuadrado.

-Las familias clonales analizadas están representadas con una letra mayúscula (pulsotipo) seguidas de un número que indica el subtipo.

El primer ensayo se realizó con el fin de evaluar si diferentes aislamientos clínicos con el mismo “background” genético (pulsotipo, tipo *spa* y tipo de *SCCmec*) o familia clonal tenían el mismo comportamiento referido a la supervivencia en melamina y no era una característica de cada cepa. Se evaluaron los siguientes aislamientos:

- i)-aislamientos de MRSA pertenecientes a los pulsotipos: I1, A1, N4, C1, USA300.
- ii)-aislamientos de MSSA pertenecientes a las mismos pulsotipos elegidos para MRSA; en este caso indicadas como: Ims, Ams, Nms, Cms, USA300ms.
- iii)-aislamientos esporádicos de MRSA pertenecientes a los: EE [ST5-I], HH [ST5-I], BB [ST88-IV], QQ [ST5-IV]

En este primer ensayo sobre la placa de melamina llevado a cabo durante 20 días se observó una tendencia general a la menor supervivencia a lo largo del tiempo de las cepas en estudio y no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas, entre los distintos aislamientos pertenecientes a cada familia clonal. (Figura 27).

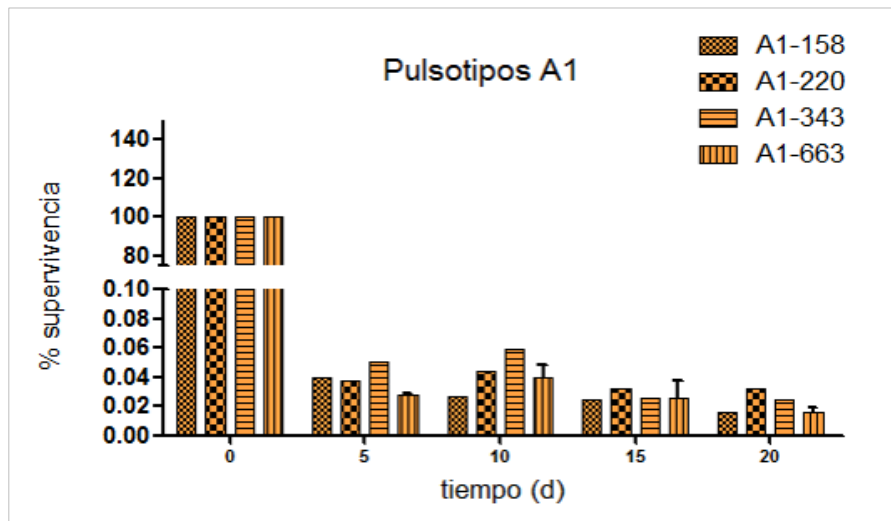


Figura 27: Supervivencia en placa de melamina, de diferentes aislamientos de una misma familia clonal. En la figura se expone como ejemplo aislamientos (158, 220, 343, 663) del clon Cordobés-chileno (pulsotipo A1, *spa* t149, *SCCmec* I). Se indica familia clonal o pulsotipo de los aislamientos (determinado por PFGE), seguido del número de la cepa.

El experimento fue repetido por un período de tiempo mayor (40 días), pero esta vez, con un representante de cada familia clonal. Se evidenció, una tendencia similar a la observada en el período de 20d con una disminución de la supervivencia a lo largo del tiempo similar en todos los clones. Sin embargo, es destacable, que los clones HA-MRSA: A1-ST5-IV-t149 y C1-ST100-IVnv-t002 presentaron un comportamiento de mayor supervivencia hacia el día 40 estadísticamente significativo con respecto a los demás clones (Figura 28)

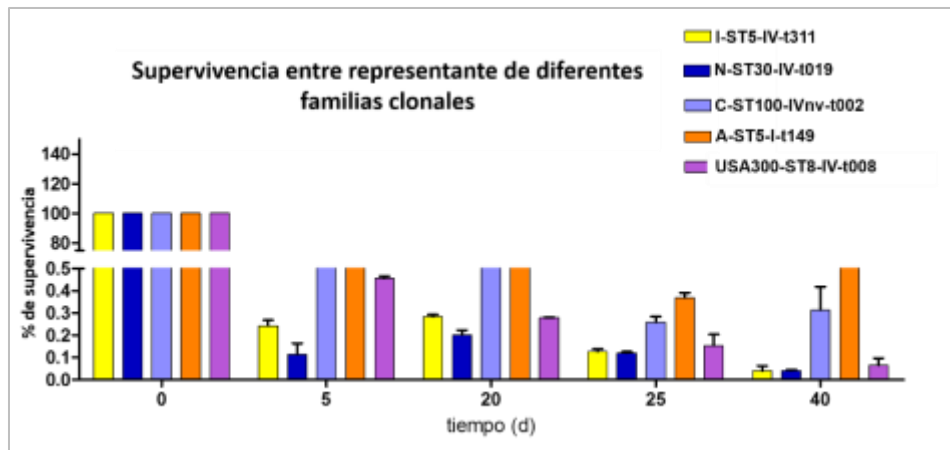


Figura 28: Comparación de supervivencia entre representantes de diferentes familias clonales.

La comparación de la supervivencia entre ambos HA-MRSA evidenció que, si bien, existe una tendencia de ambos a disminuir hacia el día 40, en este punto la supervivencia de A1-ST5-I-t149 fue significativamente mayor a la de C1-ST100-IV-t002 (Figura 29).

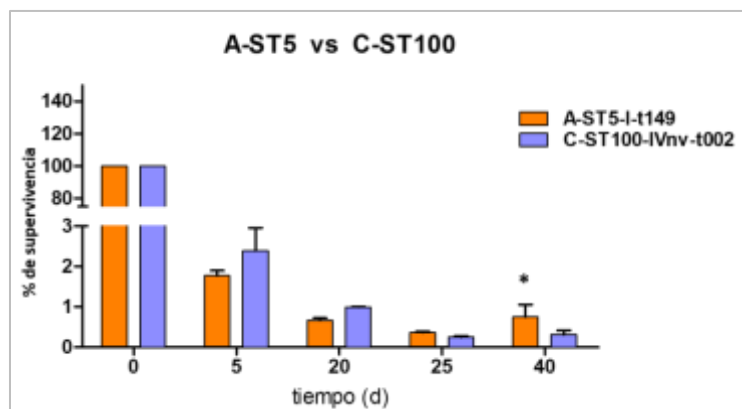


Figura 29: Supervivencia comparativa entre principales clones HA-MRSA: A-ST5 y C-ST100 diseminados en el país. Test ANOVA 2 vías post-test Bonferroni. $P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$; $P < 0,001^{***}$

El comportamiento entre los clones CA-MRSA fue similar entre ellos con una tendencia a la disminución hacia el día 40 sin diferencias significativas entre ellos (Figura 30).

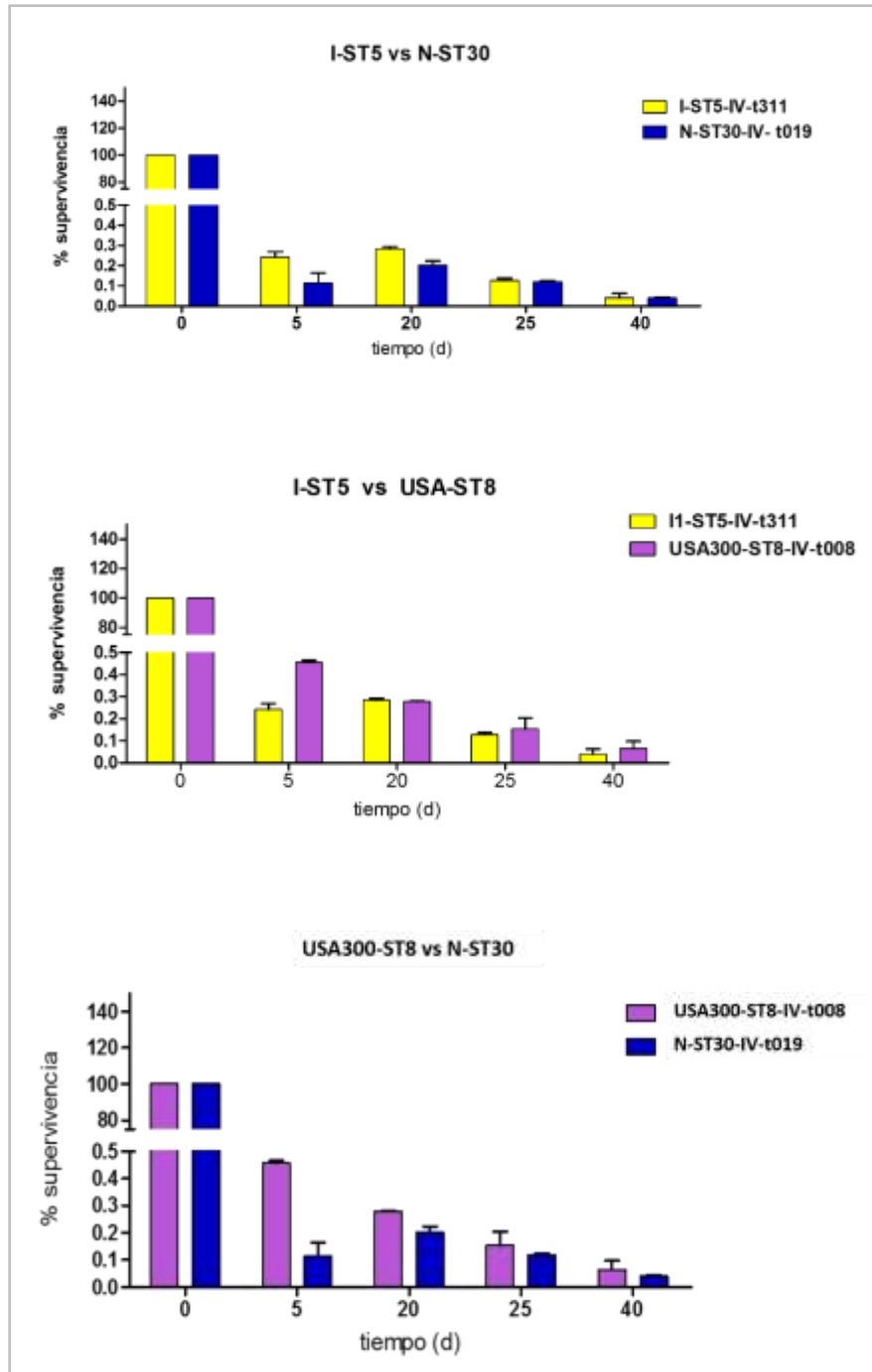


Figura 30: Comparación de supervivencia entre los dos principales clones CA-MRSA de Argentina: I-ST5-IV-t311 y N4-ST30-IV-t019 y el principal clon epidémico de EE.UU: USA300 ST8-IV-t008. No se observaron diferencias significativas entre ellos. Test ANOVA 2 vías post-test Bonferroni $P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$; $P < 0,001^{***}$

Al hacer la comparación entre el clon HA-MRSA (A-ST5-I) y los principales CA-MRSA [I-ST5-IV], [N-ST30-IV] de Argentina y también con el clon USA 300 de EE.UU. se evidenció una mayor supervivencia del A1 a lo largo del tiempo (Figura 31).

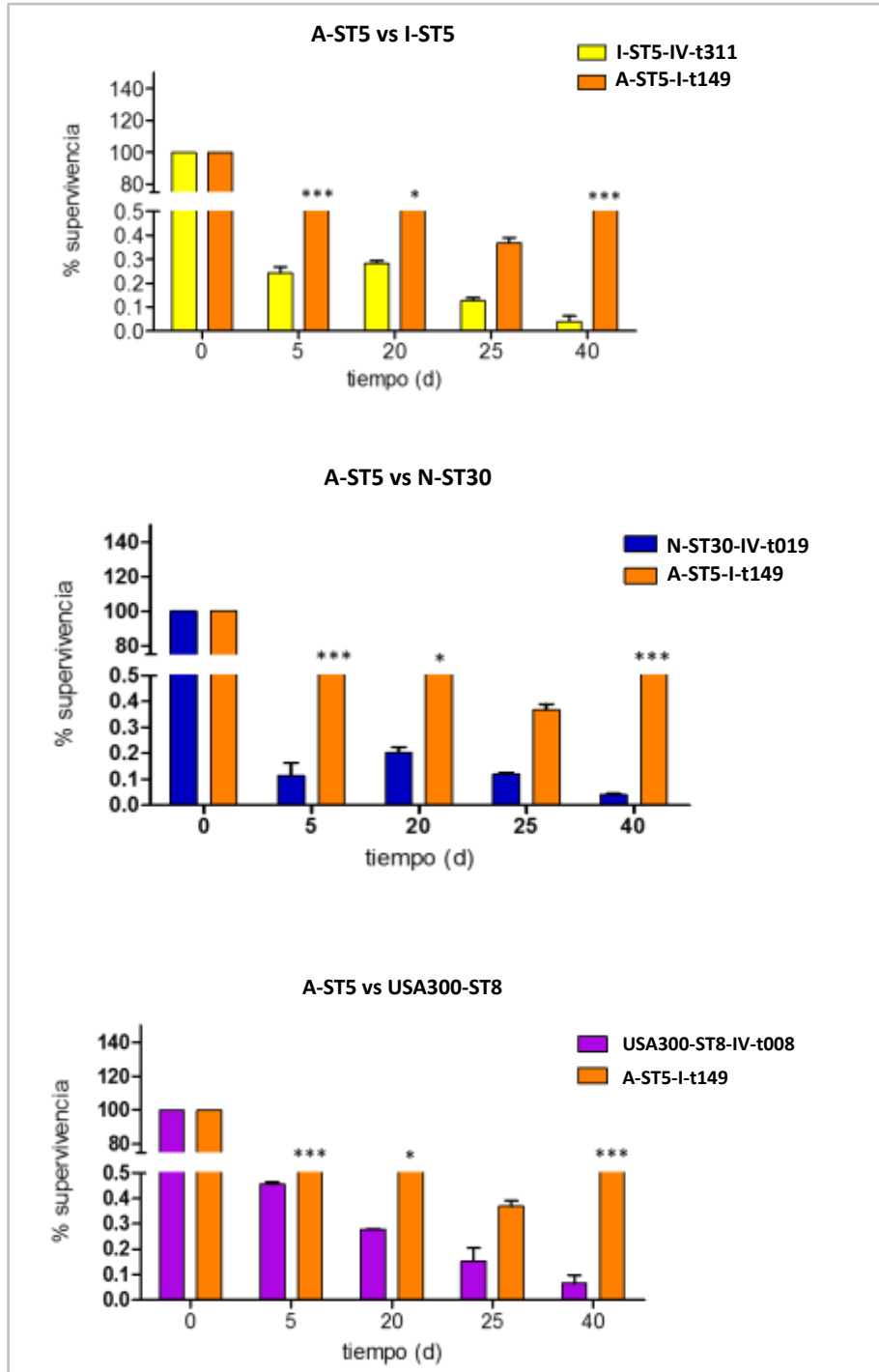


Figura 31: Supervivencia comparativa entre el representante de los HA-MRSA: clon A1-ST5-I-t149 vs los dos principales clones CA-MRSA: I-ST5-IV-t311 y N-ST30-IV-t019 de Argentina.
Test ANOVA 2 vías post-test Bonferroni. $P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$; $P < 0,001^{***}$

Del mismo modo fueron comparados aislamientos esporádicos observándose un comportamiento similar a CA-MRSA, sin embargo, existieron diferencias significativas con una mayor supervivencia para HA-MRSA, en el período estudiado (Figura 32).

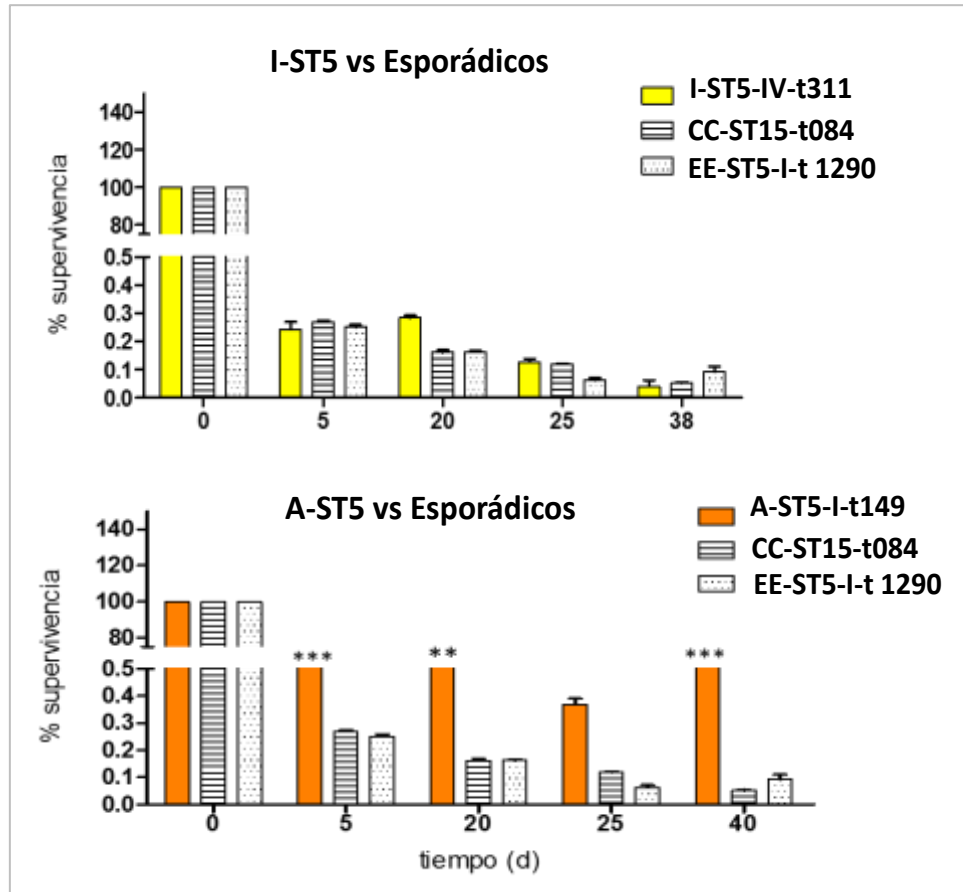


Figura 32 Comparación de supervivencia entre el clon HA-MRSA A-ST5 y clones esporádicos Test ANOVA 2 vías post-test Bonferroni. $P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$; $P < 0,001^{***}$

Cabe señalar que la supervivencia exitosa del clon HA-MRSA A1-ST5-I condujo a cuestionar si esta particularidad de A1 era una característica clonal del mismo o si era una característica de todos los HA-MRSA, es por ello que se repitió el experimento contemplando los clones epidémicos HA-MRSA: B-ST239-III y N/J-ST5-II. Además esta repetición se realizó con un mayor inóculo con el fin de poder recuperar RNA desde la superficie de melamina (Figura 33).

Se observó una similar tendencia a disminuir la supervivencia, en todos los clones, lo largo del tiempo. El clon A1-ST5 continuó presentado una mayor supervivencia hacia el día 40 que el resto de los clones testeados incluso aquellos HA-MRSA como B1 y el clon New York/Japon (Figura 33).

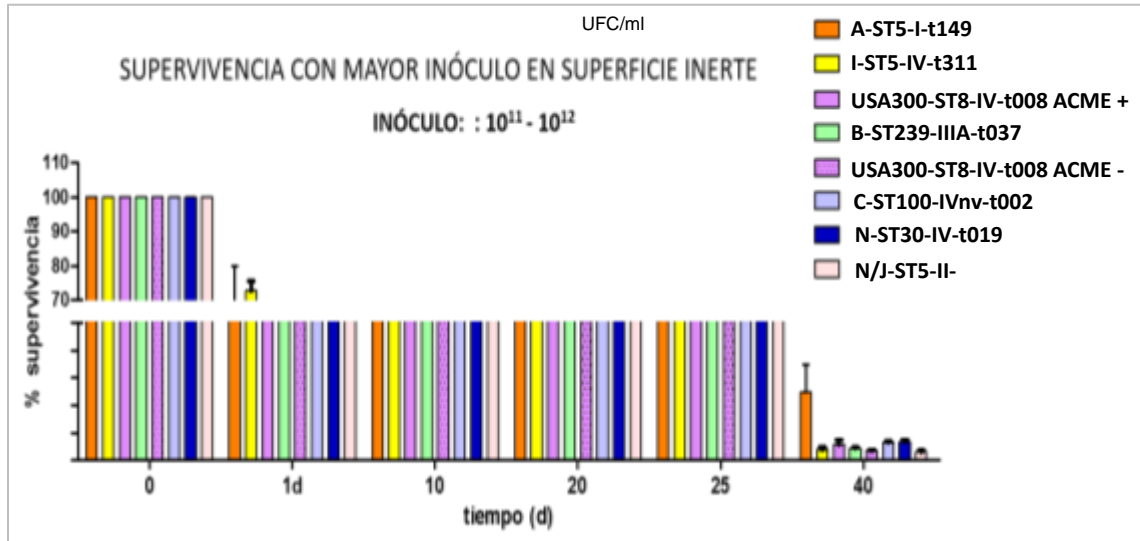


Figura 33: Repetición del ensayo de supervivencia comparativa de los aislamientos de diferentes familias clonales. Con mayor inóculo: 10^{11} - 10^{12} UFC/ml

12.2.1.1 Ila CONCLUSIONES

- ✓ La proporción de supervivencia del clon A1-ST5-I (HA-MRSA) fue mayor a la de los clones CA-MRSA analizados (I1-ST5-IV t311, N4-ST30-IV-t019, USA300-ST8-IV-t008), así como a la de otros clones HA-MRSA evaluados (B-ST239-III y N/J-ST5-II) y a la de aislamientos esporádicos.
- ✓ La proporción de supervivencia del clon C1-ST100-IVNv (HA-MRSA) fue similar a la del clon A1-ST5-I-t149 (HA-MRSA) aunque éste último presentó una mayor supervivencia a los 40d.
- ✓ No hubo diferencias significativas entre los clones CA-MRSA analizados (I1-ST5-IV, N4-ST30-IV, USA300-ST8-IV) y tampoco entre éstos con aislamientos esporádicos.
- ✓ El clon epidémico HA-MRSA A1-ST5-I-t149 presenta mayor capacidad de supervivencia sobre una superficie abiótica (melamina) comparativamente con otros clones tanto HA-MRSA como CA-MRSA.

12.3 IIb Resultados

12.3.1 Evaluación de la expresión diferencial de genes relacionados a la adhesión, biofilm y expresión de reguladores globales de *S. aureus* durante la persistencia, de clones MRSA epidémicos, en una superficie inerte

Con el fin de investigar la relación entre el éxito epidemiológico de los clones epidémicos de MRSA y su capacidad para persistir en una superficie inerte de uso corriente en hospitales y hogares, se llevó a cabo la extracción de RNA desde la placa de melamina y se evaluaron las expresiones de diferentes genes involucrados en adhesión, biofilm, metabolismo y expresión de reguladores globales de *S.aureus* durante un período de tiempo de 10 días, que fueron comparados con su condición inicial de 24h (Figura 34 a y b)

Se observó que los niveles de expresión, de los genes (*fnbpA*, *fnbpB*, *isdD*, *hla*, *spa*, *psmA1A2*, *agrA*, *hld*), en cada clon al día 10, en general, fueron más elevados respecto a su condición inicial (24h).

Cabe señalar que la transcripción de *IsdD* y *hla* fueron 40 y 35 veces mayores, respectivamente, que su condición inicial en el clon A1-ST5-SCC*mecI*-t149 y que el clon C1-ST100-SCC*mecI*Vnv-t002 presentó niveles de *IsdD* 43 veces más altos, al día 10, con respecto a las 24h. (Figura 34 a y b). Este incremento tan marcado no se observó en ninguno de los demás clones evaluados.

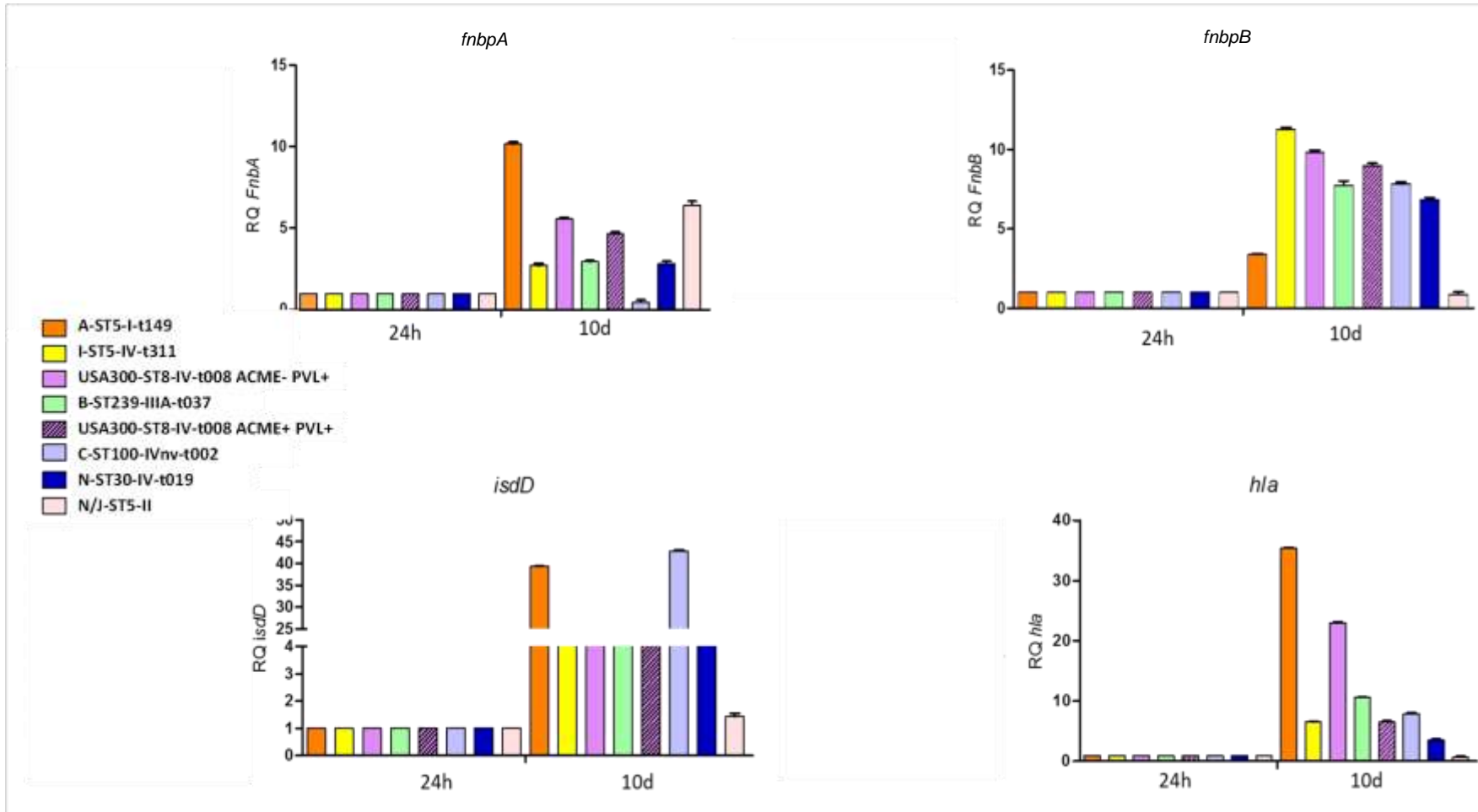


Figura 34a Evaluación de la expresión genica de *fbnpA* y *fbnpB* (*gen de proteínas de unión a fibrinógeno y fibronectina y elastina*), *isdD* (*gen de proteínas de superficies que unen hierro*), *hla* (*gen de la alfa toxina*), de clones CA-MRSA: [I-ST5-IV], [USA300-ST8-IV], [N-ST30-IV] y HA-MRSA: [A-ST5-I], C-ST100-IVnv], [B-ST239-III], [N/J-ST5-II] epidémicos en el estado de supervivencia sobre la placa de melamina. El ensayo se realizó a las 24h y a los 10 días de supervivencia sobre melamina. RQ: Cuantificación Relativa. Método comparativo $\Delta\Delta CT$.

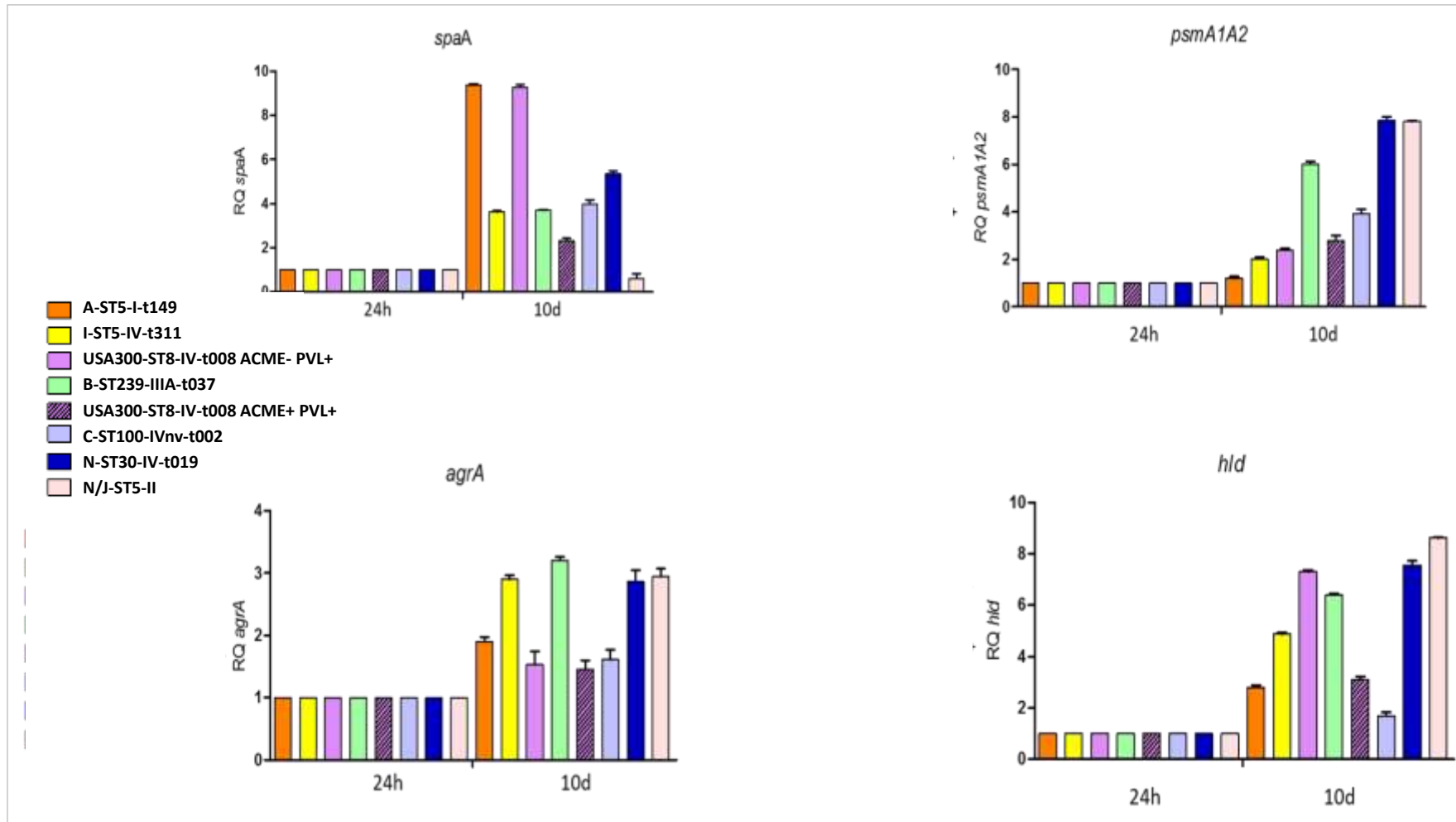


Figura 34b Evaluación de la expresión génica de *spa* (gen que codifica para la proteína A), *psm* (codifican las modulinas solubles en fenol), *agrA* (gen del regulador de respuesta del sistema Agr), *hld* (codifica la molécula efectora del regulador global Agr) en clones CA-MRSA y HA-MRSA epidémicos en el estado de supervivencia sobre la placa de melamina. El ensayo se realizó a las 24h y a los 10 días de supervivencia sobre melamina. RQ: Cuantificación Relativa.

12.3.1.1 //b CONCLUSIONES

- ✓ Los genes evaluados (*fnbpA*, *fnbpB*, *isdD*, *hla*, *spa*, *psmA1A2*, *agrA*, *hld*) en un mismo clon tienden a estar elevados respecto a su condición inicial después de 10 días de supervivencia en una superficie inerte como melamina.

- ✓ En aislamientos caracterizados como A1-ST5-I-t149, la expresión de los genes *isdD* y *hla* se encuentra incrementada 40 y 35 veces, respectivamente, a los 10 días de supervivencia respecto de su condición inicial a las 24 h.

- ✓ En el clon C1-ST100-IV-t002 *isdD* representa un nivel de su expresión 43 veces superior que su condición inicial.

Los genes isdD (codificante de un factor relacionado al transporte de hierro) y hla (descrito y relacionado con la formación de biofilms) podrían ser necesarios para una mayor supervivencia a lo largo del tiempo (persistencia) en superficies inertes (melamina).

12.4 Ilc Resultados

12.4.1 Evaluación de la expresión diferencial de genes relacionados a la adhesión, biofilm y expresión de reguladores globales de *S. aureus*, en clones MRSA epidémicos, en el estado de biofilm.

Considerando que la formación de biofilm como una estrategia adaptativa de *Staphylococcus aureus* ha sido descrita en varios estudios [92, 94, 96, 174-176]. Se decidió abordar el ensayo del mismo con el objeto de indagar la existencia de una posible relación entre el establecimiento de los clones circulantes en nuestra región y el biofilm como medio de supervivencia y persistencia en las superficies ambientales.

En primera instancia el ensayo fue realizado a grupos de aislamientos pertenecientes a los principales clones diseminados en Argentina. Si bien se observó que no hay una asociación clara entre capacidad de formar biofilm y linaje, se detectó que las cepas pertenecientes al clon CA-MRSA I1-ST5-IV presentaron una capacidad fuerte a moderada de formar biofilm (Figura. 34) es por ello que se decidió evaluar capacidad de formar biofilm a un número mayor de cepas del pulsotipo I, linaje ST5 y SCC_{med}IV (55 aislamientos). En esta oportunidad, se detectó que aquellos aislamientos I-ST5-IV que presentaron el tipo *spa* t311 desarrollaron fenotipos de fuertes formadores de biofilm y que aquellos ST5-IV con el tipo *spa* t002 fueron clasificados como débiles formadores (Figura 35).

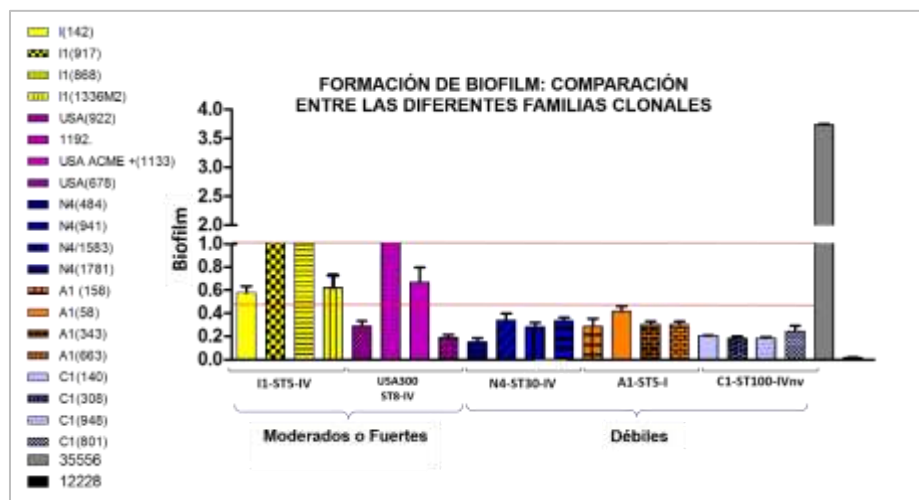


Figura 35: Formación de Biofilm: comparación entre las diferentes familias clonales. Bajo cada gama de colores se indican los aislamientos pertenecientes a la misma familia. Barra gris: control positivo de biofilm *S aureus* (ATCC 35556). Barra de color negro: control negativo de biofilm (ATCC *S epidermidis* 12228). Se mide DO del biofilm formado. A₅₉₀ de biofilm teñido con Cristal Violeta. Cada barra representa la media de tres mediciones independientes \pm la DS. Las líneas rojas marcan las categorías del fenotipo de biofilm débil, moderado y fuerte.

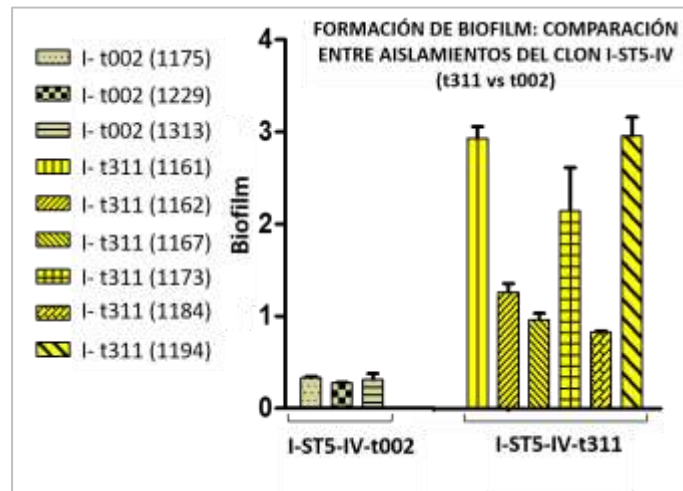


Figura 36 Formación de Biofilm: comparación entre aislamientos del clon CA-MRSA I-ST5-IV: t002 vs t311 en 55 aislamientos estudiados. Se mide DO del biofilm formado. A₅₉₀ de biofilm teñido con Cristal Violeta. Cada barra representa la media de tres mediciones independientes \pm la DS.

El mecanismo mejor descrito de desarrollo de biofilm en *S. aureus* implica la formación de un polisacárido extracelular o poli-N- acetilglucosamina (PIA / PNAG). La síntesis de PIA / PNAG está regulada por el locus de adhesión intercelular (*ica*), esta vía es llamada *ica* dependiente (70, 71, 72). Sin embargo también se ha descrito que *S. aureus* es capaz de formar biofilm por una vía alternativa llamada *ica*-Independiente. En este último mecanismo intervienen las proteínas de adhesión llamadas MSCRAMMs (“*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*”) (69, 71). La proteína A forma parte del grupo citado y ha sido implicada en la formación de biofilm [91, 92].

Teniendo en cuenta que el *spa* t o tipo *spa* (tipificación molecular por *spa* typing) está dado por el análisis de los polimorfismo que conforman la región X del gen de la proteína A y observando una relación entre el *spa* t y el fenotipo de biofilm formado (fuerte o débil) surgió el interrogante de conocer si este biofilm se encontraba relacionado a proteínas (*ica independiente*) o si presentaba un contenido polisacárido en su estructura (*ica dependiente*). Para responder esta pregunta se realizó un screening evaluando la formación de biofilm sobre una selección de aislamientos del clon I1-ST5-IV-t311, por un lado en presencia de proteinasa K a fin de digerir las proteínas que pudieran estar conformando el biofilm. Por otro lado en presencia de metaperyodato de sodio con el

objeto de inhibir la formación de polisacáridos en cuyo caso el biofilm dependería de *ica* (Figura 37).

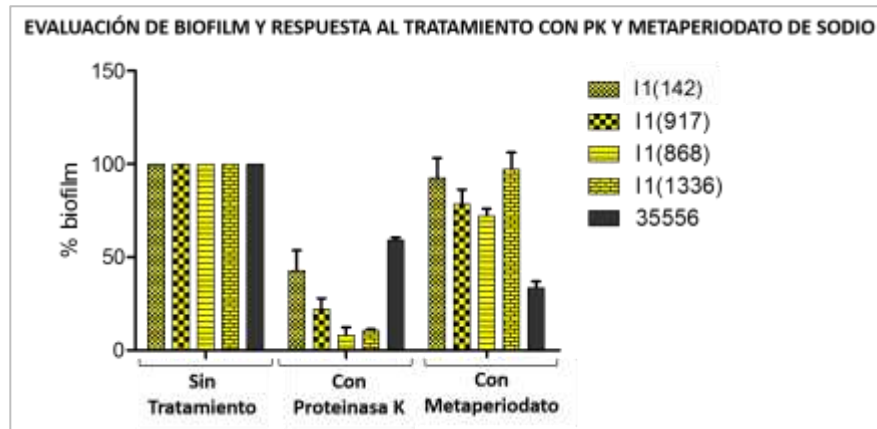


Figura 37: Evaluación de la respuesta de biofilm al tratamiento con Proteinasa K y Metaperiodato de Sodio. Se evaluó porcentaje de formación de biofilm tomando como 100% el biofilm sin tratamiento. (Ver sección Materiales y métodos).

Al tratar el biofilm con Proteinasa K se impidió en alta proporción la formación de biofilm y lo contrario ocurrió en el tratamiento con metaperiodato de sodio sugiriendo un importante contenido proteico en la estructura de biofilm de los aislamientos evaluados.

Seguidamente se estudió la expresión de diferentes genes que estarían relacionados a la formación de biofilm (entre ellos el gen de la proteína A). Para ello, el experimento de biofilm fue repetido con el fin de poder extraer RNA desde la placa multiwell. Paralelamente para poder tener un control de la expresión de genes en el biofilm, se practicó la extracción de RNA desde un cultivo del microorganismo en caldo en fase exponencial y en fase estacionaria ya que ha sido descrito, que las proteínas relacionadas a la adhesión se expresan en fase exponencial y las toxinas en fase estacionaria todo esto bajo el control del regulador global *agr* (208).

Se evaluaron aislamientos de los linajes de CA-MRSA cuyo biofilm fue categorizado como fuerte-moderado: I-ST5-IV-t311; USA300-ST8-IV-t008 y sus variantes detectadas ACME+ PVL+ / ACME+ PVL- / ACME- PVL- y también los clasificados como débiles: N-ST30-IV-t019, I-ST5-IV-t002 y el clon HA-MRSA Cordobés-chileno A-ST5-I-t149. Para calcular los cambios de expresión génica, se los comparó con el aislamiento 1579 [ST5-IV-t002], que fue categorizado como débil formador de biofilm. Con esta estrategia aquellos genes involucrados en la formación de biofilm se presentarían incrementados en aislamientos que presenten fuerte o moderada capacidad de formar biofilm.

Se observó una falta de relación entre los clones con capacidad fuerte o moderada de formar biofilm (ST5-IV-t311 y ST8-IV-t008) y la expresión del gen *spa* y lo mismo se evidenció con aquellos clones con débil capacidad para formar biofilm (ST5-IV-t002, ST5-I- t149) (Figura 38).

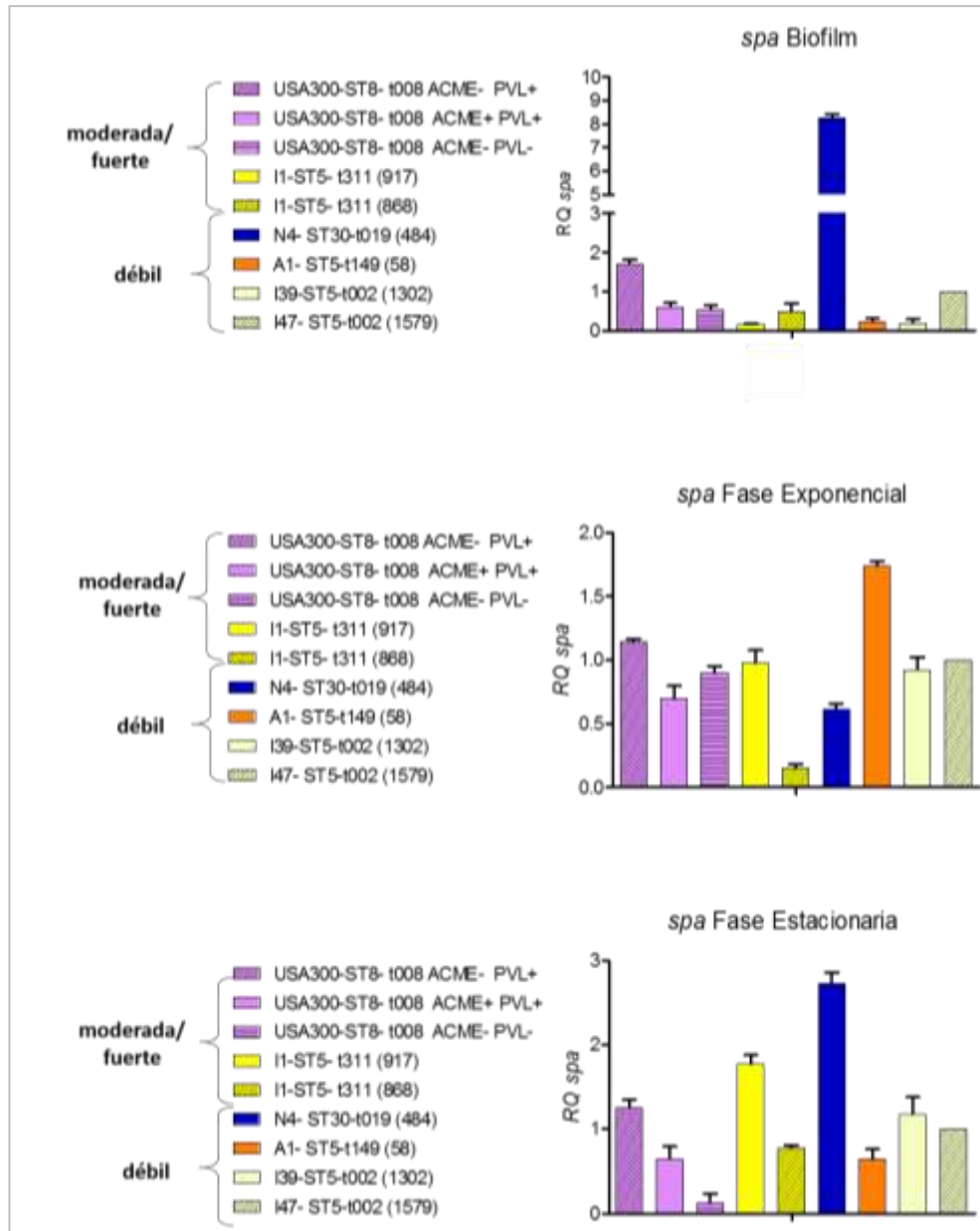


Figura 38: Evaluación de la expresión génica de *spa* en condiciones de Biofilm, Fase Exponencial y Fase Estacionaria de aislamientos CA-MRSA con fuerte/moderada capacidad de formar biofilm (linajes ST8-*spat*008 y ST5-*spat*311) y aislamientos CA-MRSA (ST5-*spat*002) y HA-MRSA (ST5-*spat*149) con débil capacidad de formación. Se grafica las veces de cambio del gen *spa* respecto al aislamiento 1579 (débil formador de Biofilm) en la condiciones de Biofilm, Fase Estacionaria y Fase Exponencial. RQ: cuantificación relativa. Los números entre paréntesis indican el número del aislamiento dentro del cepario.

En cuanto a la expresión del gen *hla* se observó un incremento del mismo para aquellos clones que presentaron una fuerte/moderado capacidad de formar biofilm (I1-ST5-IV-t311 y USA300-ST8-IV-t008) y por el contrario, en aquellos que fueron débiles formadores se observó que no hubo cambios en la expresión génica o fueron muy bajas las veces de cambio del gen evaluado (Figura 39).

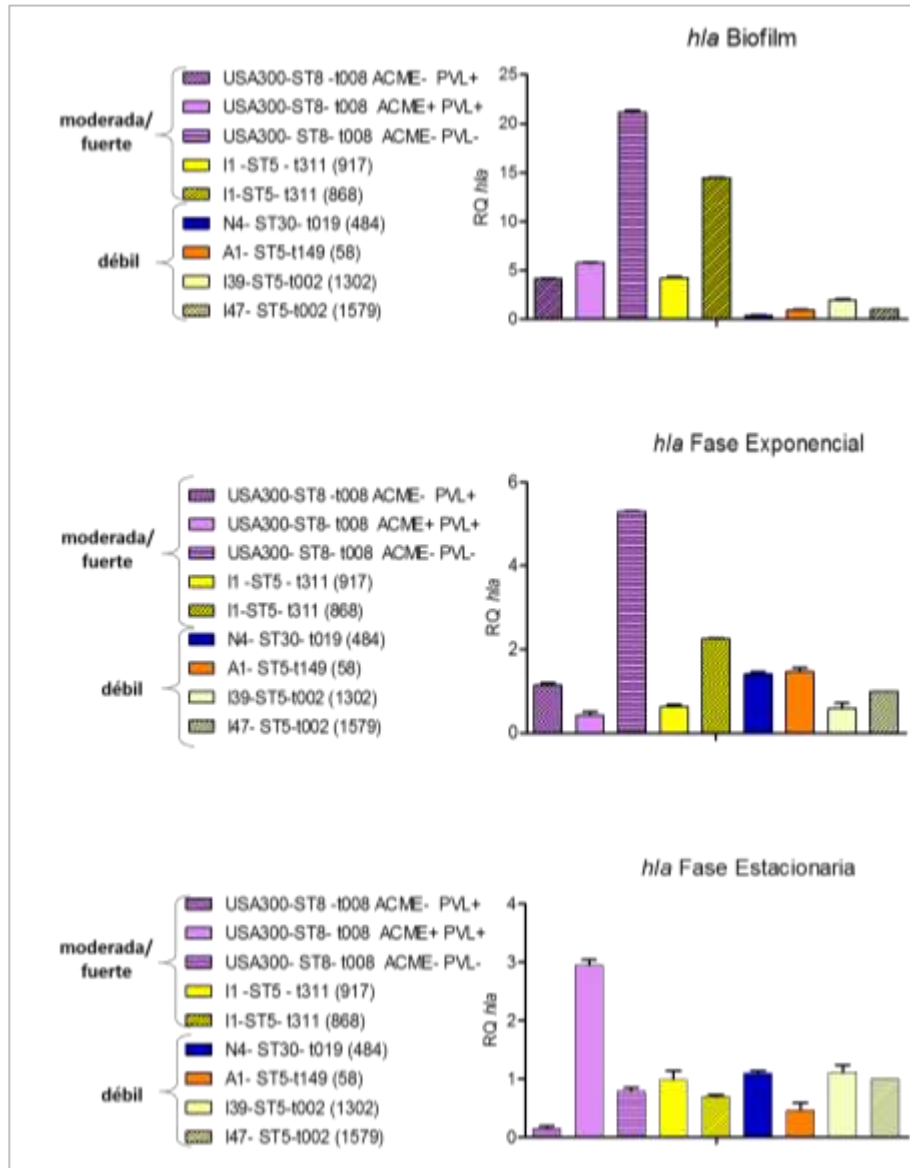


Figura 39: Evaluación de la expresión génica de *hla* en condiciones de Biofilm, Fase Exponencial y Fase Estacionaria de aislamientos CA-MRSA con fuerte/moderada capacidad de formar biofilm (linajes ST8-*spat008* y ST5-*spat311*) y aislamientos CA-MRSA (ST5-*spat002*) y HA-MRSA (ST5-*spat149*) con débil capacidad de formación. Se grafica las veces de cambio del gen *spa* respecto al aislamiento 1579 (débil formador de Biofilm) en las condiciones de Biofilm, Fase Estacionaria y Fase Exponencial en caldo. RQ: cuantificación relativa. Los números entre paréntesis indican el número del aislamiento asignado dentro del cepario de laboratorio.

La proteína de unión a fibronectina A (FnbPA) es una proteína multifuncional que promueve la adhesión a fibrinógeno, fibronectina y elastina y ha sido relacionada al proceso de biofilm dependiente de proteínas [106, 177, 178].

En este ensayo los niveles de expresión del gen *fnbpA* estuvieron incrementados en aislamientos caracterizados como CA-MRSA del linaje USA300-ST8-IV-t008 en todas las condiciones evaluadas (Biofilm, Fase Estacionaria y Exponencial) sugiriendo ser una característica propia de este linaje (Figura 40). Esta relación no se detectó en aislamientos del otro clon CA-MRSA con fuerte/moderada capacidad de formar biofilm (ST5-IV-t311).

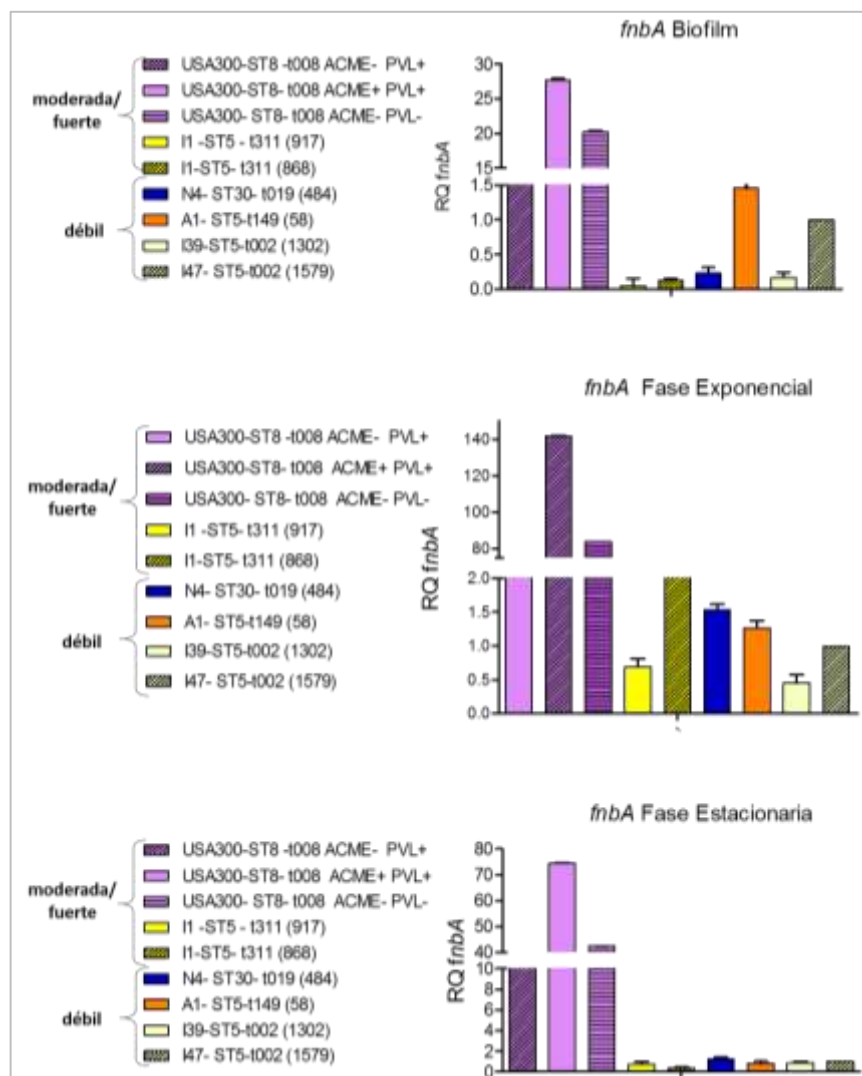


Figura 40: Evaluación de la expresión génica de *fnbpA* en condiciones de Biofilm, Fase Exponencial y Fase Estacionaria de aislamientos CA-MRSA con fuerte/moderada capacidad de formar biofilm (linajes ST8-*spat008* y ST5-*spat311*) y aislamientos CA-MRSA (ST5-*spat002*) y HA-MRSA (ST5-*spat149*) con débil capacidad de formación. Se grafica las veces de cambio del gen *spa* respecto al aislamiento 1579 (débil formador de Biofilm) en las condiciones de Biofilm, Fase Estacionaria y Fase Exponencial. RQ: cuantificación relativa. Los números entre paréntesis indican el número del aislamiento asignado dentro del cepario de laboratorio.

El operón *agr* es el regulador maestro de la expresión de genes en *S. aureus*. La expresión de *agrA* estuvo incrementada en ambos clones CA-MRSA con moderada/fuerte capacidad de formar biofilm (I-ST5-IV-t311 y USA300-ST8-IV-t008) en el estado de biofilm (Figura 41). Lo que sugiere que este regulador estaría involucrado con la capacidad de formar biofilm, a través de diferentes vías, entre ellas *hla* y/o *fnbA* (clon USA300).

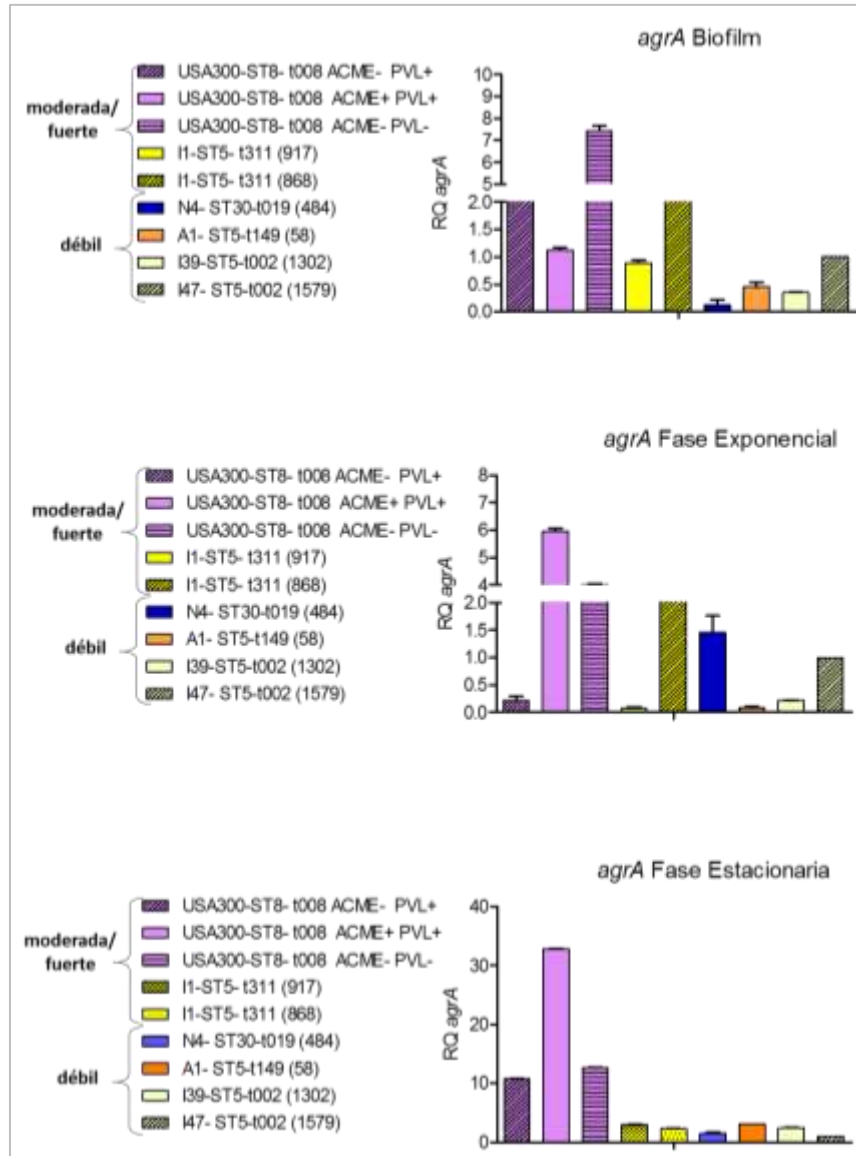


Figura 41: Evaluación de la expresión génica de *agrA* en condiciones de Biofilm, Fase Exponencial y Fase Estacionaria de aislamientos CA-MRSA con fuerte/moderada capacidad de formar biofilm (linajes ST8-*spat008* y ST5-*spat311*) y aislamientos CA-MRSA (ST5-*spat002*) y HA-MRSA (ST5-*spat149*) con débil capacidad de formación. Se grafica las veces de cambio del gen *spa* respecto al aislamiento 1579 (débil formador de Biofilm) en la condiciones de Biofilm, Fase Estacionaria y Fase Exponencial. RQ: cuantificación relativa. Los números entre paréntesis indican el número del aislamiento dentro del cepario.

12.4.1.1 //c-CONCLUSIONES

- ✓ Si bien no se evidenció una asociación clara entre capacidad de formar biofilm y linaje genético, se detectó una capacidad fuerte/moderada de formar biofilm en ciertos clones CA-MRSA (I1-ST5-IV y USA300-ST8-IV).

- ✓ En el clon CA-MRSA I1-ST5-IV-t311 se evidenció una capacidad fuerte a moderada de formar biofilm posiblemente relacionada al tipo *spa* t311. Tratamientos con proteinasa K y con metaperiodato de sodio sugieren un importante contenido proteico en la estructura del biofilm de los aislamientos pertenecientes a este clon CA-MRSA I1-ST5-IV-t311.

- ✓ El análisis de la expresión diferencial del gen *hla* en biofilm de los diferentes clones analizados, evidenció que la expresión de esta toxina estaría involucrada en la diferente capacidad de formación de biofilm en cepas clínicas.

- ✓ No se observó la relación hipotetizada entre mayor expresión del gen *spa* y el fenotipo de fuerte formador de biofilm.

- ✓ Los niveles de expresión del gen *fnbpA* estuvieron incrementados en aislamientos CA-MRSA del linaje USA300 ST8 en todas las condiciones evaluadas (biofilm, Fase Estacionaria y Exponencial). Esta relación no se detectó en aislamientos del otro clon CA-MRSA con fuerte/moderada capacidad de formar biofilm (ST5-IV-t311) lo que sugiere que puede ser una característica propia del linaje USA300.

- ✓ La expresión del gen *agrA* en el estado de biofilm, coincidentemente se relacionó con un incremento en ambos clones CA-MRSA que presentaron moderada/fuerte capacidad de formar biofilm (I1-ST5-IV-t311 y USA300-ST8-IV-t008), sugiriendo que el regulador global *agrA* estaría involucrado con la capacidad de formar biofilm, a través de diferentes vías, entre ellas *hla* y/o *fnbpA* (clon USA300).

- ✓ Se detectaron diferentes patrones de expresión de un mismo gen entre los diferentes clones en el fenotipo de biofilm, lo que implica una gran variabilidad entre los diferentes complejos clonales en las estrategias utilizadas para sobrevivir en biofilm.

✓

12.5 CONCLUSIONES GENERALES CUARTA PARTE

- ✓ Supervivencia exitosa del clon HA-MRSA A1-ST5-I-t149 sobre la superficie de melamina.

- ✓ Los genes *isdD* (factor relacionado al transporte de hierro) y *hla* (descrito y relacionado con la formación de biofilm) podrían estar implicados en la mayor sobrevivencia a lo largo del tiempo (persistencia) en el ambiente inerte (melamina) de los clones A1-ST5-I-t149. Este resultado avalaría la persistencia de este clon a lo largo de los años en los hospitales.

- ✓ No hay una clara asociación entre capacidad de formar biofilm y linaje genético.

- ✓ El clon CA-MRSA I1-ST5-IV-t311 presentó una capacidad fuerte a moderada de formar biofilm, con importante estructura proteica, posiblemente relacionada al tipo *spa* t311.

- ✓ Se observaron distintos patrones de expresión de un mismo gen entre los diferentes clones en el fenotipo de biofilm, lo que implica una gran variabilidad entre los diferentes complejos clonales.

13 DISCUSIÓN

S. aureus Resistente a la Meticilina representa un paradigma epidemiológico, debido a su importancia en salud pública, que se caracteriza por su patogenicidad, la capacidad de adquirir multiresistencia antibiótica y por su potencial para la diseminación. Su epidemiología mostró una rápida evolución, después de ser un patógeno con multiresistencia a los antibióticos del hospital-(HA-MRSA), emergió en la comunidad-(CA-MRSA) con características genéticas diferentes, alta virulencia, transmisibilidad y sin la multiresistencia asociada.

En Argentina, en los últimos años, >50% de los aislamientos hospitalarios de *S. aureus* fueron MRSA. Esta alta prevalencia fue asociada a la diseminación de un clon epidémico HA-MRSA: Córdoba/Chileno (A-ST5-I-t149), identificado por nuestro grupo de trabajo [144, 145]. Entre los años 2001-2008, se produjo la emergencia y diseminación de un clon CA-MRSA-ST5-IV que produjo >80% de las infecciones de la comunidad. El conocimiento del impacto de estas cepas CA-MRSA en los hospitales es limitado.

Sorprendentemente, no hay muchos estudios que hayan informado datos sobre todos los tipos de infecciones por *S. aureus* en la población general en la última década, cubriendo los aislamientos de niños y adultos en los ámbitos comunitarios y hospitalarios [179, 180]. Además, a diferencia de América del Norte y Europa, pocos estudios han documentado la epidemiología de la CA-MRSA_G como causa de infecciones asociadas a la atención sanitaria en América Latina [155, 181-183].

En este trabajo de tesis, para abordar el objetivo general relacionado a determinar el impacto epidemiológico actual de las infecciones por CA-MRSA, en la República Argentina, se llevó a cabo un estudio prospectivo transversal, multicéntrico, a nivel nacional. Este estudio proporcionó la primera descripción exhaustiva a nivel nacional acerca de la epidemiología de CA-MRSA_G y HA-MRSA_G como causa de ambos, infecciones de inicio en la comunidad (CO) y de inicio en el hospital (HO) en Argentina. En el mismo, los MRSA representaron el 55% 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 (71%) de los MRSA se clasificaron como CA-MRSA_G, mientras que el 29% como HA-MRSA_G. Es importante destacar que se detectó una proporción significativamente mayor de MRSA entre las infecciones CO (58%: 52% fueron causadas por CA-MRSA_G, y 6% por HA-MRSA_G) que

entre las HO (49%: 16% causadas por CA-MRSA_G, y 33% por HA-MRSA_G), particularmente en niños, en los pacientes sin HRF y en pacientes con infecciones de piel y tejidos blandos. Por otra parte, más del 50% de las infecciones asociadas a la atención sanitaria por MRSA (HA-MRSA) fueron causadas por los genotipos CA-MRSA_G, principalmente en pediatría (> 70%). Todos estos resultados demuestran el reservorio creciente de infecciones por MRSA en la comunidad asociado a los genotipos CA-MRSA_G y su entrada al ámbito hospitalario (Figura 9 y 10).

Para evaluar la evolución de este fenómeno en el tiempo en nuestro país, hemos realizado un análisis longitudinal para investigar las tendencias en infecciones por *S. aureus* entre 2001 y 2011 en Argentina (49.909 aislamientos clínicos de *S. aureus* de la base de datos nacional, WHONET, Figura. 19 A-C). En este estudio se utilizó un criterio microbiológico para diferenciar CA-MRSA [MRSA con resistencia (R) a no más de un antibiótico (ATB)] de HA-MRSA, que fue validado con el criterio genotípico en este trabajo de tesis (94.7% de sensibilidad, 92.4% de especificidad, 96.9% de valor predictivo positivo y 87.8% de valor predictivo negativo). Los resultados de este estudio longitudinal sugieren que la proporción de MRSA aumentó significativamente del 39,7 % en 2001 al 52,1% en 2011 habiendo alcanzado el 55,2% en 2010. Este aumento estuvo, en gran parte, relacionado con los tipos de cepas CA-MRSA (6,4% en 2001 a 38,9% en 2011), lo cual es consistente con nuestro estudio transversal prospectivo. Todos estos resultados sugieren fuertemente que en la Argentina, linajes típicos CA-MRSA, además de representar un reservorio creciente en la comunidad, parecen estar reemplazando a los clásicos clones HA-MRSA como causa de infecciones HO. Estos relevantes hallazgos están de acuerdo con los modelos matemáticos para predecir la sustitución de las cepas HA-MRSA en hospitales por la epidemia de genotipos CA-MRSA (163, 164), que contienen un SCC*mec* menor (tipos IV o V) y con un bajo costo en su “*fitness*” o aptitud. Sin embargo, también se sugirió la posibilidad de coexistencia de ambos, CA-MRSA_G y HA-MRSA_G [184].

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 95% 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 utilizada en este trabajo de tesis (análisis longitudinal) fue significativamente asociada con la definición genotípica ($P < 0.0001$) y correctamente identificó el 94% de todos los aislamientos de MRSA. Este es otro importante aporte de este trabajo, ya que permite brindar una

herramienta al Laboratorio de Microbiología clínico de Argentina 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. La entrada de los clones CA-MRSA_G 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*. Por un lado para las infecciones detectadas en la comunidad ya no se podrían utilizar los ATB β -lactámicos empíricamente, especialmente en niños, y por el otro, a nivel hospitalario habría más opciones de tratamiento para las infecciones por MRSA ya que las cepas CA-MRSA son sensibles a un número mayor de ATB no- β -lactámicos que las cepas HA-MRSA, sin dejar de tener en cuenta la incrementada capacidad natural de este patógeno de adquirir diferentes mecanismos de resistencia a antibióticos. Si bien no se ha detectado resistencia a vancomicina, teicoplanina, tigeciclina, fosfomicina y daptomicina (Tabla 4 y Figura 15), un importante hallazgo de este trabajo de tesis fue la detección de niveles de prevalencia de resistencia intermedia (CIM= 2 μ g/mL) a Ceftarolina: 6.4% para todos los *S. aureus*, con CIM50/90 de 0.25/1 μ g/ml. Esta no sensibilidad a Ceftarolina estuvo fuertemente asociada con los tipos clonales HA-MRSA: ST5-I (Cordobes/Chileno) y ST239-III A (Brazilian) (Figura 17 y 18). Ceftarolina fue la primera cefalosporina con actividad contra MRSA aprobado para su uso en los EE.UU en el 2010, luego en Europa en el 2012. Es activo contra hVISA, VISA y *S. aureus* no sensibles a daptomicina. Ha sido aprobado para el tratamiento de las infecciones complicadas de piel y tejidos blandos y neumonía adquirida en la comunidad debido a MRSA después de dos ensayos aleatorios doble ciego que demostraron no inferioridad a los agentes de comparación [185, 186]. Actualmente se está evaluando su uso (con resultados promisorios) para el tratamiento de bacteriemias y otras infecciones complicadas (169). El CLSI ("Clinical and Laboratory Standards Institute") definió puntos de corte clínicos para ceftarolina contra *S. aureus*, incluyendo MRSA (sensible ≤ 1 μ g / ml, intermedio 2 μ g / ml, resistente ≥ 4 μ g / ml). Los datos de estudios de vigilancia internacional sugieren que aislamientos de MRSA non-sensibles a ceftarolina son raros. Un reciente estudio en hospitales de Bélgica, sólo detectó una tasa del 5% (4 aislamientos) que pertenecieron a los linajes CC5 (n= 1), CC22 (n= 2) y CC8 (n= 1). Dos aislamientos (CC22 y CC8) llevaron mutaciones en *mecA*, así como en otros genes *pbp*. Los aislamientos restantes portaban mutaciones en genes *pbp* nativos o en *gdpP* [187]. Sin embargo, otro estudio de vigilancia, en este caso en China, encontró que la tasa de no sensibilidad a ceftarolina (CIM de 2 μ g / ml) entre los aislamientos de MRSA que causaban

infecciones de piel y tejidos blandos fue extraordinariamente alta (33,5%) y asociada a los clones HA-MRSA predominantes en China del CC8 (particularmente ST239-III) y en menor proporción (4,8%) al CC5 (ST5-II) [188]. Otro estudio ya detectó la emergencia de resistencia a Ceftarolina durante el tratamiento de un caso de osteomielitis ($CIM_{Inicial}$ 0,75 $\mu\text{g} / \text{ml}$ y $CIM_{postATB}$ 4 a 8 $\mu\text{g} / \text{ml}$) con falla clínica. La secuenciación del genoma completo del aislamiento inicial y aquellos recuperados en el seguimiento mostró que todos pertenecían al linaje ST5-II y se encontraron alteraciones en el dominio de unión a penicilina de la PBP2a (Glu447Lys y Ala601Ser) [189]. Es importante destacar, que en este trabajo de tesis se ha demostrado la existencia de resistencia intermedia a Ceftarolina en cepas detectadas en Argentina que nunca habían estado expuestas a este ATB. Una perspectiva posterior a este trabajo de tesis es analizar los mecanismos de resistencia a Ceftarolina detectado en estas cepas y la evaluación del significado clínico de esta resistencia Intermedia. Todos estos resultados avalan la vigilancia molecular en el tiempo de estas infecciones.

En este estudio, en Argentina, las características socio-demográficas específicas (hacinamiento, convivencia con ≥ 5 personas y desventaja económica) se asociaron con infecciones por cepas CA-MRSA_G, lo que estuvo en acuerdo con estudios anteriores en otros países [11]. Sin embargo, el análisis multivariado mostró que las infecciones por CA-MRSA_G, solamente se asociaron independientemente con infecciones en la comunidad, particularmente SSTI, en los pacientes más jóvenes (<19 años) sin comorbilidades. Además, los tipos de cepas CA-MRSA_G detectados en este estudio también causaron infecciones invasivas, particularmente osteomielitis y neumonías severas en personas sanas, lo que avala la naturaleza virulenta de los genotipos CA-MRSA_G que predominan en Argentina.

La entrada de los CA-MRSA_G en los hospitales en Argentina, requeriría la aplicación de nuevas estrategias de control de infecciones, según lo aconsejado en otros trabajos [154]. Además hay evidencias que las cepas CA-MRSA_G pueden causar enfermedades más graves que las cepas HA-MRSA_G [118]. En este estudio, en nuestro país, entre las infecciones HO, los genotipos CA-MRSA_G comparados con los HA-MRSA_G se asociaron sólo independientemente con infecciones en niños (especialmente menores de 1 año) y todos los demás factores clínicos y demográficos evaluados no produjeron diferencias estadísticamente significativas. Además, las infecciones HO causadas por CA-MRSA_G, como aquellas producidas por HA-MRSA_G, fueron más propensas a ser enfermedades no relacionadas con la piel y a ocurrir en pacientes con enfermedades

concomitantes, que las infecciones CO causadas por CA-MRSA_G. Estos resultados apoyan las siguientes afirmaciones: i) Las cepas CA-MRSA_G se asemejan en su comportamiento a las cepas HA-MRSA_G cuando entran en los hospitales, como ya se sugirió en otros trabajos [190], [181, 191], ii) la población pediátrica, sobre todo <1 año, se mantiene como el mayor grupo de riesgo de las infecciones HO causadas por CA-MRSA_G, lo cual acuerda con un informe reciente de USA [192].

Por otro lado, en concordancia con estudios previos [11, 154] los pacientes infectados con HA-MRSA_G tuvieron tasas significativamente más altas de la mayoría de los HRF en comparación con aquellos infectados con CA-MRSA_G. Sin embargo el 31% de los pacientes con infecciones CO por CA-MRSA_G tenía al menos un HRF. Esto no sólo pone de relieve las limitaciones de las definiciones epidemiológicas, sino también de las clasificaciones genotípicas para definir reservorios epidemiológicos y muestra que tanto los datos de caracterización molecular y los datos epidemiológicos tienen que ser considerados en conjunto cuando se realiza la vigilancia de las infecciones por *S. aureus*.

Las características moleculares y la resistencia a los ATB no β-lactámicos de los aislamientos (Tabla 2) que pertenecen a cada uno los dos principales clones CA-MRSA (ST5-IVa-PVL⁺-t311 y ST30-IVc- PVL⁺-t019), que representaron el 90% de los aislamientos CA-MRSA (45% cada uno) y a los dos grandes clones HA-MRSA (ST5-I-t149 y ST100-IVNv-t002) fueron reportados, en gran parte, en trabajos previos de nuestro grupo (134). Cabe destacar que el clon CA-MRSA ST30-IV-PVL⁺, tiene menores tasas de resistencia que su homólogo ST5-IV-PVL⁺ a eritromicina (12% vs. 28%) y clindamicina (8% vs. 24%), lo cual tiene importantes implicaciones para el tratamiento antimicrobiano empírico, particularmente para las infecciones de piel y tejidos blandos de la comunidad.

Dentro de los marcadores moleculares analizados, el gen *sasX* codificado en un elemento genético móvil, no fue identificado en ninguno de los clones MRSA analizadas en este estudio. Esto es consistente con el hallazgo de que, aunque *sasX* fue reconocido recientemente como un factor crucial en relación con el éxito epidemiológico de clones de MRSA en el ámbito hospitalario en China (particularmente ST239-III), estaba ausente de otras importantes cepas de MRSA provenientes de diferentes clones y orígenes geográficos [134]. Es probable que los aislamientos sudamericanos asociados al clon MRSA ST239-III se agrupan dentro de un “clado” o grupo filogenético uniforme muy distinto al que se agrupan los aislamientos de Asia [18]. Aunque el clon brasileiro HA-MRSA (ST239-IIIA), sólo representa el 6% de las infecciones HO en Argentina, sería recomendable la vigilancia en el tiempo para la detección de *sasX*.

El clon Cordobes/chileno HA-MRSA ST5-I se extendió desde el Sur (Argentina y Chile) al norte de América Latina a través de la región andina (Perú, Ecuador, Venezuela y Colombia), así como en Paraguay y Brasil [143, 144, 146, 152, 193]. En este estudio, representó el 66% de los genotipos HA-MRSA_G. Por lo tanto, en Argentina, las infecciones HO se asocian con este clon HA-MRSA principalmente en adultos (47% de toda la población y 61% de los adultos), pero seguido por el clon CA-MRSA-ST5-IVa-PVL⁺, en particular en niños (20% de toda la población, 46% para los niños).

Por otro lado, dos clones CA-MRSA: ST30-IVc-PVL⁺ y ST5-IVA-PVL⁺ han representado el 46% y el 37% de las infecciones CO-MRSA en toda la población, respectivamente. Sin embargo, el clon ST30-IVc-PVL⁺ fue predominante en los adultos (51%), sobre todo en aquellos que no tienen HRF (69%) en el año anterior y el clon ST5-IVa-PVL⁺ en los niños (50%), ambos con (58%) y sin (47%) HRF.

Todos estos resultados sugieren fuertemente que ST5-IV-PVL⁺ es el clon CA-MRSA dominante, que ha entrado al ámbito hospitalario, en sustitución del clon Cordobés/chileno HA-MRSA, especialmente en pediatría. Una situación semejante fue descrita en la ciudad de Medellín (Colombia), en el que el clon Cordobes/Chileno está siendo desplazado en el ámbito hospitalario, pero en este caso, por el clon USA300-LV [155]. La transmisión en el hospital del clon CA-MRSA ST5-IV-PVL⁺ constituye una preocupación para la salud pública debido a: i) su alta transmisibilidad en la comunidad [152, 153], ii) su gran capacidad de causar infecciones invasivas particularmente en niños y iii) su capacidad para expresar los fenotipos h-VISA y VISA, [153, 193], siendo la vancomicina todavía, el principal pilar del tratamiento para las infecciones invasivas por CA-MRSA [194, 195].

Este trabajo también demuestra las preferencias de edades de dos clones pertenecientes a CC5 (ST5-IV-PVL⁺ y ST5-I). Las asociaciones entre los genotipos de *S. aureus* y la edad del paciente han sido recientemente descrita en ciertos linajes MSSA (CC5 o CC45) [196] y en algunos clones de MRSA [197, 198].

La cobertura nacional de nuestro estudio permitió detectar una mayor proporción de MRSA en el norte (81%), que en Centro (53%) y en el sur de Argentina (29%). Por otra parte, la incidencia de MRSA fue 3.6 veces mayor en el Norte que en el Sur del país. Este hallazgo estuvo, en gran parte, relacionado con la propagación de las cepas de tipo CA-MRSA_G en el Norte (72%) en comparación con el sur (15%) de Argentina, con una tasa de CA-MRSA_G 6,2 veces más alta en el norte (principalmente debido al clon ST30-IV) que en regiones del sur. Esta situación podría indicar que este clon CA-MRSA se está extendiendo

no sólo desde Uruguay [153, 181], sino también desde otras regiones vecinas en el norte y noreste de la Argentina, como Brasil, donde es altamente prevalente en la comunidad [199]. De acuerdo a nuestro conocimiento, no hay datos sobre infecciones por CA-MRSA_G en Bolivia y en Paraguay. Además, mientras que el sistema de salud argentino asegura una cobertura básica, los niveles de acceso están particularmente relacionados con las diferencias económicas de cada región. De acuerdo con los indicadores generales y de salud, el noreste y el noroeste argentino son las regiones más pobres (PNUD, 2010). Entre probables importantes factores que podrían estar involucrados en 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), 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.

Los resultados de este estudio están de acuerdo con resultados de otro trabajo [200], que muestra que el clon ST30-IV CA-MRSA ha sido el más frecuente causante de infecciones invasivas de inicio en la comunidad, durante 2010-2011, en la población adulta sin factores asociados al cuidado de la salud, en Argentina [200]. Sin embargo, ese estudio [200], es limitado no sólo en el ámbito geográfico (región central), sino también en la población analizada (sólo adultos sin HRF con infecciones de inicio en la comunidad).

Otro hallazgo importante de nuestro estudio fue la identificación del clon CA-MRSA ST72-IV-PVL como un clon menor (3% del total de todos los MRSA) a diferencia de Corea del Sur, donde este clon, fue descrito como el principal clon CA-MRSA [200]. Este clon también ha entrado en hospitales causando el 7% de infecciones HO, principalmente en niños (25%).

El clon USA300 (ST8-IV), que representa el más importante clon epidémico CA-MRSA internacional, es el más frecuente clon de MRSA causante de infecciones CO y HO en los EE.UU. Ahora es la cepa CA-MRSA dominante también en otros países y ha sido identificada en todos los continentes excepto en la Antártida (188). La variante, USA300-0114 (ACME⁺) es la dominante en los EE.UU y la variante Latino-Americana o USA300-LV (ACME⁻) es dominante en el norte de América Latina [143, 153, 158, 193]. En Argentina, a diferencia del norte de América del Sur, la variante USA300-LV se mantiene como un clon menor desde el año 2007 (4 casos) [153] y en este estudio sólo se identificaron 4 casos con un alto grado de diversidad genética. Por lo tanto, estos resultados sugieren que habría otros factores, sociodemográficos, socioeconómicos, ambientales y de etnia, además de los factores bacterianos, relacionados con la competencia entre clones

epidémicos por el mismo nicho ecológico que podrían influir en su propagación, aunque se necesitan más estudios para confirmar esta hipótesis. Es importante destacar que en este trabajo, también se identificó una cepa con todas las características de la variante USA300-0114-ACME⁺, lo que representa el primer caso en la Argentina de una infección por CA-MRSA causada por esta cepa altamente virulenta y transmisible. Este aislamiento se recuperó a partir de un paciente de 30 años, previamente sano con SSTI sin complicaciones, quien viajó a los EE.UU en el año anterior, lo que sugiere que este clon probablemente fue importado de ese país. Se deberá analizar en el futuro, si esta cepa se propagará en Argentina y en qué medida tendrá impacto en las tasas de enfermedad y mortalidad.

Si bien el linaje CC121 de MSSA es una causa común de SSTI en todo el mundo y uno de los linajes dominantes de *S. aureus*, los aislamientos de MRSA de este linaje son muy raros (189). Recientemente, dos aislamientos recuperados en pacientes pediátricos no relacionados de Camboya con infecciones asociadas a la comunidad fueron MRSA del CC121/ ST121-V-PVL⁺ [173]. En este trabajo pudimos identificar aislamientos CA-MRSA pertenecientes a CC121 en Argentina. Una de esas cepas se caracterizó como ST1210 (SLV de ST121), *spa*-t812, SCC*mec*IVe, PVL⁺, *eta*⁻ y *etb*⁻, y el otro como ST121, *spa*-t159, SSC*mec*V, *pvl*⁻, *eta*⁺ y *etb*⁺. Ellos fueron recuperados a partir de niños, el primero con infecciones de piel profunda (abscesos) y el segundo con una infección de piel superficial (impétigo). Por otra parte, también fueron identificados en Argentina (Córdoba), seis meses antes de este estudio, en niños con osteomielitis, dos cepas CA-MRSA pertenecientes al CC121/ST1210 *spa*-t645, SCC*mec*IVe, PVL⁺, *eta*⁻, *etb*⁻ [201]. Las características de todos estos casos avalan la naturaleza mutuamente excluyentes de los genes *eta/etb* con los genes *pvl* en el linaje CC121 y la asociación de infecciones superficiales de la piel con la presencia de las toxinas exfoliativas ETA y ETB y de infecciones profundas con la toxina PVL (190). Por otra parte, un estudio reciente (190) reportó la presencia de un “clade” o grupo filogenético dentro del CC121 (clade C) asociado geográficamente con América del Sur y Central, en el cual se detectaron varios tipos *spa* como *spa*-t159 y *spa*-t645 y aislamientos tanto *eta/etb*⁺-*pvl*⁻ y *eta/etb*⁻-*pvl*⁺. Por lo tanto, se puede hipotetizar la aparición local de los clones CA-MRSA en el linaje CC121 en Argentina a través de adquisiciones independientes de diferentes tipos SCC*mec* (IV y V) por ancestro “clade C” del CC121.

Cabe destacar, que en este estudio también se identificó al genotipo ST97-IV como un clon CA-MRSA menor o esporádico. Es importante señalar que este clon está

probablemente relacionado con clones CA-MRSA epidémicos humanos que provienen de infecciones en el ganado bovino del linaje CC97 de *S. aureus* que “saltaron” al humano [150, 172]. Por lo tanto, este hallazgo sugiere que la ganadería, uno de los grandes pilares de la economía argentina, puede ser un reservorio adicional de cepas de MRSA. Sin embargo, sería necesaria la vigilancia molecular regular, en el país, de la microbiota en el ganado para demostrar esta hipótesis.

Una vez analizadas las características moleculares de los clones de MRSA, en la tercera parte de esta tesis nos propusimos identificar los principales linajes genéticos de MSSA en Argentina y su relación genética con clones epidémicos internacionales de MRSA, para analizar el posible surgimiento local o diseminación desde otros países limítrofes de los clones CA-MRSA detectados en nuestro país. A diferencia del MRSA, sorprendentemente se conoce poco sobre la evolución clonal de *S. aureus* sensible a meticilina (MSSA), aunque estas cepas son responsables de la mayoría de las infecciones por *S. aureus*. Para determinar genéticamente la relación evolutiva de los genotipos CA-MRSA_G, con clones de *S. aureus* sensibles a meticilina (MSSA) detectados en nuestro país se analizaron las características moleculares de un grupo de *S. aureus* sensibles a Meticilina (MSSA) detectadas en el estudio multicéntrico. Esta muestra fue, representativa de las infecciones de inicio en la comunidad y en el hospital, de pediatría y de adultos y de las diferentes regiones del país. Como ya se describió en otros estudios previos [202] se evidenció una elevada diversidad genética en las cepas de MSSA (65 diferentes tipo *spa* (*t*) (tabla 11) agrupados dentro de 12 CC según MLST) aunque se detectó el predominio del CC5 con los tipos *spa* relacionados t311 y t002, (20%) seguido por el CC30 con los tipos *spaA* t012, t021 y t018 (16%). Ambos distribuidos en todo el país, el primero más prevalente en el norte y centro del país y el segundo en el Sur. Al comparar los aislamientos de MRSA y los de MSSA pertenecientes al CC5 se demuestra que comparten los mismos tipos *spa* (t311 y t002) y pulsotipos altamente relacionados, lo que sugiere que éstos están estrechamente relacionados. Al contrario, el tipo *spa* t019, que caracterizó al 99% de los aislamientos pertenecientes al clon CA-MRSA diseminado especialmente en el Norte y centro del país (clon CA-MRSA N-ST30-IV-t019) no fue detectado entre los MSSA. Estos resultados sugieren que el clon CA-MRSA ST5-IV-t311 habría emergido en esta región a partir de su par MSSA exitoso, y posiblemente lo mismo habría sucedido con el clon HA-MRSA ST100-IVnv-t002. En cambio, el clon CA-MRSA N-ST30-IV-t019 no habría surgido en la región sino que sería el resultado de la diseminación desde países vecinos

desde el norte y este del país, como Uruguay donde está descrito como un clon epidémico, Brasil y Paraguay (Figura 24 y Figura 25).

Los CC restantes también mostraron una relación genética estrecha entre el MSSA y MRSA considerando el pulsotipo, tipo *spa* y ST. Entre los CC que comparten aislamientos MSSA y MRSA con los mismos tipos *spa* y el mismo ST podemos mencionar: ST72 y t148 (CC8), ST1 y t127 (CC1), ST88 y t186 (CC88), ST97 y t359 (CC97) y ST121 y t159 (CC121). También detectamos MRSA y MSSA caracterizados como ST8 con *spa* t008 en el CC8, las cuales son las características genéticas del clon epidémico más diseminado en EEUU: USA300. Sin embargo, se detectaron cuatro diferentes subtipos de SCC*mec* IV a partir de cinco aislamientos de MRSA con el *spat*008, indicando adquisiciones independientes en el ancestro MSSA. Estos resultados apoyan la hipótesis acerca de la aparición local y continúa de nuevos clones CA-MRSA a partir de linajes exitosos de MSSA, hipótesis también sugerida en Europa para el linaje ST8 (MRSA USA300 USA300-LV), ST72 (MRSA ST72-IV) y ST59 (MRSA ST59-IV) [203, 204]. A este surgimiento continuo de nuevos clones CA-MRSA se suma la diseminación de clones epidémicos en diferentes regiones como es el caso clon ST30-IVc detectado en nuestro país (este trabajo) y en Europa [203]. Ambos mecanismos aportan a la creciente resistencia a los antibióticos beta-lactámicos a nivel mundial. Estas hipótesis están comenzando a ser aclaradas a nivel mundial, particularmente el caso del clon USA300 a través de la utilización de la secuencia del genoma completo [24].

En Argentina existe un programa nacional de epidemiología y control de infecciones nosocomiales (VIHDA, Ministerio de Salud y el Gobierno de Argentina, INE y ANLIS, <http://www.vihda.gov.ar/>), que cubre casi todas las regiones el país. Los objetivos del programa VIHDA incluyen el establecimiento de normas y directrices para el control de las infecciones nosocomiales, según datos nacional. Teniendo en cuenta los resultados de este estudio, en nuestro país se deberían desarrollar intervenciones en los hogares para controlar la diseminación de estas infecciones por CA-MRSA_G en la comunidad y también podría ser beneficioso llevar a cabo acciones coordinadas entre médicos y veterinarios.

Los puntos fuertes de este estudio incluyen el diseño prospectivo, la extensión de la información socio-demográfica y clínica recogida en todo el país y la extensa caracterización molecular de las cepas causantes de infecciones. Sin embargo, se deben considerara algunas limitaciones. La definición de las infecciones por el genotipo CA-MRSA_G de inicio en el hospital está basada en el tiempo transcurrido entre el ingreso a la institución y el cultivo de la muestra clínica. Como no se realizaron cultivos de vigilancia al

ingreso rutinariamente, no hay una manera confiable de determinar el tiempo real y el origen de la adquisición de las cepas de MRSA, lo que implica que un error en la clasificación puede ser posible. Sin embargo, 32 de los 34 casos de infecciones por CA-MRSA_G de inicio en el hospital se agruparon en micro-brotes de infecciones causadas por el mismo genotipo en sólo 9 de 66 hospitales en un mes. Además, ningún paciente tratado por una infección por CA-MRSA_G de inicio en la comunidad estuvo presente al mismo tiempo y en el mismo servicio o sala, donde se detectaron estos microbrotes. De esta manera, es poco probable que estos casos de infecciones HO causados por las cepas CA-MRSA_G fueran adquiridas fuera del hospital o por transmisión cruzada de un paciente con una infección por CA-MRSA de inicio de la comunidad y hospitalizado en el mismo lugar y al mismo tiempo.

En conclusión, los resultados de este estudio fuertemente sugieren la rápida aparición e introducción de las cepas CA-MRSA_G en hospitales de Argentina, suplantando a los tradicionales linajes HA-MRSA_G, junto con un reservorio creciente en la comunidad. Es importante destacar, la conclusión que las cepas CA-MRSA_G se comportan en forma similar a las cepas HA-MRSA_G cuando están dentro de los hospitales, lo cual era un gran interrogante y preocupación en Salud Pública.

Mientras que dos clones CA-MRSA se difundieron en el entorno de la comunidad, el clon ST30-IV-PVL⁺ y el clon ST5-IV-PVL⁺, este último parece estar extendiéndose también a los hospitales, en sustitución del clon Cordobés/Chileno HA-MRSA ST5-I, principalmente en niños.

Por medio de la vigilancia molecular y clínica local de las infecciones por MRSA, nuestro estudio aporta a la literatura existente, información acerca de los factores asociados con la diseminación de clones CA-MRSA en la comunidad además de la entrada y la transmisibilidad en los hospitales. Estas contribuciones serán útiles especialmente en los niños, para evaluar las estrategias de control y prevención de las infecciones por MRSA, tanto en la comunidad como en los hospitales.

Entre los factores que podrían contribuir a la capacidad de un microorganismo para diseminarse y mantener su prevalencia en el tiempo se encuentran aquellos involucrados con la colonización del huésped, multiplicación sobre la superficie epitelial y mucosa, invasividad y capacidad de sobrevivida intracelular, capacidad de sobrevivir en el ambiente, tanto en los hospitales como en los hogares y resistencia antibiótica. La supervivencia en el medio ambiente tiene un papel crucial en la transmisión y propagación, además de servir como un reservorio para la diseminación con implicancias públicas negativas para la salud.

En los establecimientos de salud, esta supervivencia se produce en superficies tocadas por los pacientes y los proveedores de atención médica, por este motivo, en este trabajo de tesis, se eligió la melamina, un material utilizado en la mayoría del mobiliario de los hospitales y hogares, como superficie inerte para evaluar la supervivencia de las diferentes cepas de *S. aureus*. Si bien varios investigadores han estudiado la supervivencia en diferentes materiales inertes [75, 76, 205, 206], no hay estudios en los que se analice una posible relación entre supervivencia y linajes genéticos de *S. aureus* con la intención de buscar una respuesta a la exitosa adaptación de los clones epidémicos de nuestra geografía. Es por ello que los objetivos de esta etapa del trabajo estuvieron dirigidos a evaluar la proporción de supervivencia en melamina entre diferentes clones de MRSA epidémicos. En primera instancia, se demostró que diferentes aislamientos clínicos con el mismo “background” genético (pulsotipo, tipo *spa* y tipo de *SCCmec*) o familia clonal tenían el mismo comportamiento y no era una característica de cada cepa (Figura 27). También se evidenció una disminución de la supervivencia a lo largo del tiempo similar en todos los clones. Sin embargo, los clones HA-MRSA: A1 ST5-*SCCmec* I-t149 y C1 ST100-IVnv-t002 presentaron un comportamiento de una significativa mayor supervivencia ($P < 0,05$) hacia el día 40 comparada con los demás clones tanto HA-MRSA (ST239-III-, NY/J ST5-II) como CA-MRSA (ST5-IV, ST30-IV y USA300) (Figura 28) y aislamientos esporádicos. La comparación de la supervivencia de ambos HA-MRSA evidenció que, si bien, existe una tendencia de ambos a disminuir hacia el día 40, en este punto la supervivencia de A1-ST5-I-t149 fue significativamente mayor a la de C1-ST100-IV-t002 (Figura 29). El tiempo de supervivencia de MRSA total (sin distinción de linaje) concuerda con otros trabajos en los que se observó que el microorganismo continúa sobreviviendo más allá de los 9; 11 y 12 días en fómites hospitalarios (tablas de plástico, mesa laminada y tela respectivamente) [206]. Observaciones similares fueron reportadas por otros investigadores [205] que demostraron que varias cepas de *S. aureus* sobrevivieron en pisos de vinilo durante 40 días. Si bien hay datos de supervivencia de *S. aureus*, no se ha reportado que se haya investigado posibles diferencias entre clones epidémicos y aislamientos esporádicos, genéticamente caracterizados que permita asociar una mayor supervivencia en el ambiente como reservorio de transmisión de clones epidémicos.

Para encontrar una posible explicación a la incrementada supervivencia ambiental del clon Cordobés-Chileno [A-ST5-I-t149] en comparación con los demás clones, se evaluó durante 10 días de persistencia en la placa de melamina la expresión de genes relacionados a i) biofilm-adhesión (*hla*, *spa*, *fnbpA*, *fnbpB*, *psmA1A2*) ii) a la subsistencia

referida a la metabolización de nutrientes como el hierro (*IsdD*) y *iii*) a la regulación global (locus *agr*: *agrA*). De este análisis resultó que si bien todos los genes evaluados estuvieron incrementados a los 10 días, respecto de su condición inicial 24h, *hla* e *IsdD* presentaron mayor cantidad de veces de cambio (35 y 40 veces respectivamente) en el clon A1-ST5-SCCmecl-t149 que en los demás clones analizados. También el clon C1-ST100-SCCmeclVnv-t002 presentó niveles de *IsdD*, 43 veces más altos, al día 10, con respecto a las 24h. (Figuras 34a y 34b).

La implicancia de la alfa-toxina, codificada en el gen *hla*, en la formación de biofilm en superficies abióticas fue descrita por O'Toole GA y cols. [207], avalando la expresión incrementada de *hla* en el período de persistencia a los 10 días si se supone que *S.aureus* persiste en melamina en estado de biofilm. De esta manera la mayor expresión de *hla* demostrada en el clon A1-ST5-SCCmecl-t149 podría estar relacionada a la mayor supervivencia demostrada en el ambiente inerte. Por otro lado, en un reciente estudio, [208] se ha descrito una fuerte correlación entre los polimorfismo genéticos del *hla* (agrupados en genotipos) y los diferentes complejos clonales de *S.aureus*. En base a este dato, futuros estudios, sobre el polimorfismo de *hla* de clones diseminados en nuestro país y su relación con supervivencia en el ambiente como reservorio de epidemias podría ser investigado para esclarecer el comportamiento de este microorganismo.

El hierro es esencial para los procesos fisiológicos bacterianos básicos, como el transporte de electrones y la síntesis de nucleótidos, aunque también puede ser tóxico, por lo cual las concentraciones homeostáticas deben mantenerse rigurosamente [104]. Es por ello que las bacterias expresan una multitud de maneras complejas y frecuentemente redundantes para adquirir hierro. Entre estos sistemas, el *Isd* ("iron-regulated surface-determinant" o determinante de superficie regulado por hierro) es el mejor caracterizado entre los patógenos Gram positivos para capturar hierro desde el grupo heme [104]. Por lo anteriormente expuesto e interesados en indagar sobre la subsistencia de *S.aureus* sin aditamentos nutricionales en una superficie inerte se decidió evaluar la expresión del gen *isdD* (componente del sistema *isd*), que aunque su papel no se ha determinado de manera concluyente, su homólogo se encuentra ausente en los genomas de otros patógenos Gram positivos [104]. Si bien no hay estudios que hayan evaluado el sistema *Isd* en superficies inertes, si los hay sobre modelos animales (199) y sobre diferentes medios de cultivo y suero [209]. El aumento observado en los niveles de expresión de *IsdD* (para los clones hospitalarios A-ST5-I y C-ST100-IVnv) durante la persistencia en la placa de melamina, sobre la cual se supone que hay una carencia de hierro, estaría en concordancia con otros

autores [209] , quienes describen que ante la carencia de hierro existiría un aumento de los sistemas implicados en la toma del mineral y de los factores de virulencia que ayudarían a secuestrar hierro de los tejidos o células del huésped.

De modo que la pregunta que nos ocupa, ante este escenario, es si ¿estos clones (del linaje CC5) establecido en los hospitales, tienen más capacidad de buscar hierro ante una necesidad del mismo?, ¿Este incremento en el nivel de expresión los hace más competentes respecto al resto de los clones evaluados? Son posibles hipótesis que nos proponemos seguir investigando en nuestro grupo de trabajo. Según Berit Schulte y cols., en general, la razón del éxito de los aislamientos pertenecientes al CC5, como linajes asociados con el hospital, no está claro. Especialmente porque los datos de la secuenciación del genoma completo no revelaron ninguna mutación obvia dentro del genoma central que pudiera estar asociada con este rasgo [210]. En futuros estudios será necesario evaluar si se produce el mismo comportamiento (incremento del nivel de expresión del gen *IsdD*) sobre diferentes aislamientos pertenecientes al mismo clon A-ST5-I-t149 y al clon C-ST100-IVnv-t002. Y en pasos posteriores lograr la mutante del gen *isdD* en estas cepas clínicas, para evaluar si se revierte el fenómeno de mayor supervivencia del clon A-ST5-I-t149.

La formación de biofilm como una estrategia adaptativa de *Staphylococcus aureus* ha sido descrita [89, 94, 175], por lo cual se decidió abordar el ensayo del mismo con el objeto de indagar el biofilm como medio de supervivencia y persistencia en las superficies ambientales de los clones de MRSA circulantes en nuestra región. El estado de biofilm pudo ser categorizado en fuerte, moderado y débil para los diferentes aislamientos estudiados. Los resultados de este trabajo demuestran que no hay una asociación clara entre capacidad de formar biofilm (fuerte, moderado y débil) y el tipo de linaje. Como ejemplo, se detectó que en el mismo linaje CC5, están presentes los clones categorizados como débiles formadores de biofilm, como son HA-MRSA: A-ST5-I-t149 y C-ST100-IVnv-t002, y también están presentes aquellos clones caracterizado como fuertes o moderados formadores de biofilm como el clon CA-MRSA-ST5-IV-t311 (Figura 35). También el CC8 (ST8-IV-USA300) presentó aislamientos con fenotipos de fuertes /moderados a débiles en algunos casos. Todos los aislamientos evaluados para el CC30 fueron débiles formadores de biofilm. Estos resultados son concordantes con los descritos en otro trabajo llevado a cabo con aislamientos clínicos de MRSA de Brasil [175].

Por otro lado, en el análisis de 55 aislamientos pertenecientes al mismo clon CA-MRSA: pulstipo I-ST5-IVa, se detectó que aquellos que presentaron el tipo *spa* t311

fueron categorizados como fuertes formadores de biofilm y aquellos con *spa* t002 débiles (Figura 36). La posible relación entre la mayor capacidad de formar biofilm y el tipo *spa* también ha sido reportada recientemente para el *spa*-CC 064 (205). Después de evidenciar que las diferentes capacidades de formar biofilm podrían estar relacionadas con los diferentes polimorfismos de la regiones X de la proteína A (distintos tipos *spa*), surgió el interrogante de conocer si este biofilm se encontraba relacionado a proteínas [90], (mecanismo descrito como *ica independiente* en la literatura) o si presentaba un contenido polisacárido en su estructura (*ica dependiente*). Así se evaluó la capacidad de formar biofilm de aislamientos representativos de este clon I-ST5-IVa-t311 luego del tratamiento con Proteinasa K y con metaperiodato de sodio (Figura 37). Estos resultados demostraron un alto contenido proteico en su estructura avalando la hipótesis que en el tipo de fenotipo (fuerte o débil formador) de biofilm podría estar implicada la región X del gen de la proteína A de cuyo análisis de secuencia surge el tipo *spa*.

Ante la relación sospechada se esperaría un intensificación en la expresión del gen *spa* en el estado de biofilm, sin embargo esta situación no se observó (Figura 38). Este resultado todavía no descarta la hipótesis planteada, debido a que los primers utilizados en la RT-PCR tienen como target una región de la proteína A que no es la región X. Lo cual deja otras posibilidades para seguir indagando, como por ejemplo la utilización de mutantes de la proteína A y de la fracción polimórfica de la misma para evaluar si se revierte el efecto sobre el fenotipo de biofilm.

Además otra característica identificada fue la fuerte relación entre expresión de *hla* en el estado de biofilm y los clones con fenotipos de biofilm débil y fuerte. Donde *hla* se presentó con más veces de cambio para los clones categorizados como fuerte formadores de biofilm vs los débiles formadores que presentaron menores veces de cambio. En el caso del clon HA-MRSA A-ST5-I-t149 se presentó como débil formador de biofilm y menor expresión de *hla* en el estado de biofilm [55]. Estos resultados concuerdan con los previamente reportados sobre la implicancia de alfa-toxina, en la formación de biofilm en superficies abióticas [207, 211]. También implican, que la mayor expresión de alfa-toxina de este clon en relación a la mayor supervivencia en un ambiente inerte como la melamina en relación a otros clones, podría estar relacionada a otra forma de subsistir no relacionado al biofilm, por lo menos de la manera que se evalúa el biofilm en este trabajo.

Estudios previos han demostrado que la proteína FnbPA es una de las más importantes proteínas en el desarrollo de biofilm [175]. Específicamente se ha demostrado que las proteínas de unión a fibronectina son necesarias tanto para la adherencia como

para la acumulación de biofilm en la cepa altamente epidémica del linaje USA300 (CC8) [90, 212]. En concordancia con esos resultados, en este trabajo de tesis se evidenció que los niveles de expresión del gen *fnbpA* estuvieron incrementados en los aislamientos caracterizados como CA-MRSA del linaje USA300 ST8-IV en todas las condiciones evaluadas (Biofilm, Fase Logarítmica y Fase Estacionaria). Este comportamiento no se observa en los demás clones, lo que sugiere que proteínas de unión a fibronectina en este clon sería un importante factor que favorece la colonización y adherencia de diferentes superficies bióticas y abióticas, facilitando su transmisión epidémica.

Por último el regulador global por excelencia, *Agr*, también fue evaluado observándose un incremento del nivel de expresión en aquellos clones (I-ST5-IV-t311 y USA300-ST8-IV-t008) con fenotipos de fuertes formadores de biofilm y sin cambios o una “disminución en los débiles formadores de biofilm. Lo que sugiere que este regulador estaría involucrado con la capacidad de formar biofilm, a través de diferentes vías, entre ellas *hla* y/o *fnbpA* (clon USA300). Aunque esta asociación entre expresión de *agr* y capacidad de formar biofilm no fue detectada por Farrel Cortes M. y cols., [175], nuestros resultados concuerdan con aquellos reportados por Coelho LR. y cols., [213]. En este estudio se utilizan “knockouts” *agr* con diferentes “background” genéticos, que demostraron que *Agr* puede regular la producción de biofilm por MRSA positiva o negativamente e incluso puede tener un efecto neutro.

El análisis presentado en esta última parte de este trabajo de tesis brinda datos para seguir indagando sobre características moleculares y estrategias patogénicas de los clones descritos localmente que ayudarán a abordar estrategias para el control de la transmisión considerando las capacidades diferenciales de los clones de MRSA para diseminarse y/o de establecerse en un área geográfica en particular.

14 MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se describe la metodología utilizada para los procedimientos experimentales que involucran al objetivo general I

14.1 Objetivo genera I:

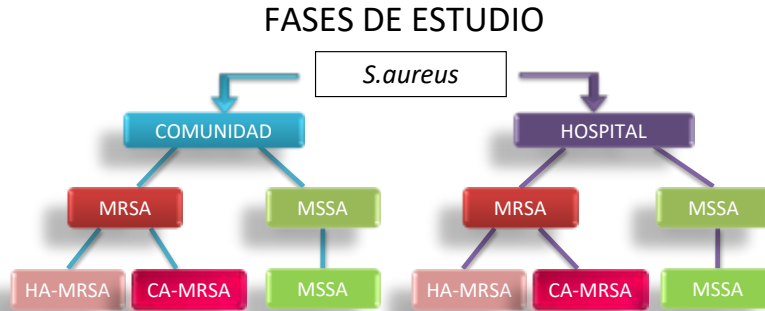
I- Determinar el impacto epidemiológico actual de las infecciones por CA-MRSA, en la República Argentina

14.1.1 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 noviembre de 2009 en 66 hospitales de 20 provincias y la Ciudad de Buenos Aires (CABA), 46 Hospitales pertenecen a la Red WHONET Argentina. 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 alcanzados y los genotipos analizados en cada uno de ellos (cada tilde señala el genotipo analizado).

14.1.1.1 Esquema de organización de objetivos etapas



prevalencia	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	(nov/2009)
OBJETIVO Ia	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
OBJETIVO Ib	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
OBJETIVO Ic	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
OBJETIVO Id		<input checked="" type="checkbox"/>			<input checked="" type="checkbox"/>		
OBJETIVO Ie		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	

Objetivo Ia: Establecer la PREVALENCIA GLOBAL nacional y susceptibilidad a los antimicrobianos de *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA) en infecciones asociadas al ámbito hospitalario (HA-MRSA) y a la comunidad (CA-MRSA).

Objetivo Ib: Analizar las características moleculares de los aislamientos de *S. aureus* resistente a metilicina asociados a la comunidad (CA-MRSA) y aquellos asociados a la atención sanitaria (HA-MRSA).

Objetivo Ic: Analizar las características sociodemográficas y clínicas, en nuestro medio, de las infecciones causadas por MRSA (CA-MRSA_G vs HA-MRSA_G) y MSSA en sus diferentes localizaciones y sitio de comienzo (comunidad u hospital) en pacientes pediátricos y adultos para establecer los factores de riesgo para infecciones por CA-MRSA_G en Argentina.

Objetivo Id: Identificar y comparar las características moleculares y clínicas de los genotipos CA-MRSA_G, que producen infecciones de inicio en la comunidad con aquellas responsables de infecciones de inicio en el Hospital, para evaluar el impacto de la entrada de estos genotipos a nivel hospitalario.

Objetivo Ie: Determinar genéticamente la relación evolutiva de los genotipos CA-MRSA_G, con clones de *S. aureus* meticilino sensibles (MSSA) detectados en nuestro país.

14.1.2 Características de los Hospitales

En la siguiente tabla (Tabla 1B) se indican las características de los Hospitales y ubicación de los 66 hospitales por regiones (Norte, Centro y Sur) en el país. (Tabla1B)

Hospitales	Regiones	Provincias	no. de camas	no. De admisiones	no. De visitas
1	Norte	Corrientes	120	425	4,785
2	Norte	Formosa	155	402	9,628
3	Norte	Catamarca	249	555	3,838
4	Norte	Tucumán	200	737	8,121
5	Norte	Catamarca	100	320	9,408
6	Norte	Chaco	260	951	24,636
7	Norte	La Rioja	289	841	14,096
8	Norte	Salta	250	921	16,260
9	Norte	Jujuy	110	472	10,970
10	Norte	Corrientes	149	557	10,685
Norte Total			1,882	6,181	112,427
11	Centro	Santa Fe	170	1,250	7,230
12	Centro	Provincia de Buenos Aires	230	699	17,542
13	Centro	CABA	406	1,061	121,358
14	Centro	Entre Ríos	260	958	12,847
15	Centro	Provincia de Buenos Aires	307	803	38,675
16	Centro	CABA	198	1,097	18,782
17	Centro	Santa Fe	183	534	17,223
18	Centro	CABA	78	316	11,105
19	Centro	CABA	501	1,782	30,953
20	Centro	Santa Fe	180	1,520	16,667
21	Centro	CABA	350	904	41,511
22	Centro	CABA	323	1,158	60,102
23	Centro	La Pampa	212	228	12,732
24	Centro	La Pampa	188	678	14,361
25	Centro	San Juan	290	556	20,946
26	Centro	Córdoba	228	990	25,730
27	Centro	Provincia de Buenos Aires	114	769	43,519
28	Centro	Santa Fe	118	541	13,864
29	Centro	Córdoba	70	285	10,275
30 ^F	Centro	Buenos Aires	0	0	1,119
31	Centro	Buenos Aires	150	390	12,801
32	Centro	CABA	311	330	12,809
33	Centro	Mendoza	260	1,402	24,448
34	Centro	Buenos Aires	360	780	11,055
35	Centro	Buenos Aires	300	1216	27,938
36	Centro	Provincia de Buenos Aires	490	1,535	50,481
37	Centro	Córdoba	80	253	5,380
38	Centro	Córdoba	108	863	27,771
39	Centro	Provincia de Buenos Aires	148	191	9,337
40	Centro	Córdoba	136	774	12,553
41	Centro	Córdoba	81	256	5,078
42	Centro	Córdoba	216	719	9,119
43	Centro	Córdoba	90	324	4,309
44	Centro	Córdoba	180	990	63,990
45	Centro	Córdoba	181	946	24,808
46	Centro	Córdoba	36	218	4,731
47	Centro	Córdoba	81	271	5,816
48	Centro	Córdoba	144	345	10,941
49	Centro	Córdoba	60	173	6,863
50	Centro	Córdoba	84	723	12,493
51	Centro	Córdoba	106	503	20,413

MATERIALES Y MÉTODOS

52	Centro	CABA	187	1,681	46,075
53	Centro	CABA	238	1574	55,056
54	Centro	CABA	180	748	77,725
55	Centro	Provincia de Buenos Aires	259	1,111	18,819
56	Centro	Santa Fe	78	524	5,901
57	Centro	Provincia de Buenos Aires	170	355	113,948
58	Centro	CABA	269	1,439	7,259
59	Centro	CABA	120	1,145	23,499
Centro Total			9,509	37,908	1,247,957
60	Sur	Rio Negro	92	339	12,653
61	Sur	Santa Cruz	72	307	10,520
62	Sur	Neuquén	277	927	22,239
63	Sur	Tierra Del Fuego	95	394	14,904
64	Sur	Tierra Del Fuego	84	319	19,029
65	Sur	Santa Cruz	223	633	29,945
66	Sur	Chubut	87	321	14,831
Sur Total			930	3,240	124,121
TOTAL			12,321	47,329	1,484,505

Tabla 1B: Características y ubicación de 66 hospitales de 20 provincias y la ciudad de Buenos Aires, Argentina por regiones (Norte, Centro y Sur), noviembre de 2009

^a.Número de visitas: incluye atención ambulatoria, servicio de emergencia y admisiones durante noviembre de 2009.

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.

A continuación se expone el algoritmo de trabajo llevado a cabo conjuntamente con los microbiólogos e infectólogos de cada hospital participante

14.1.3 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) [138], 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

Además, también se analizaron las características de hospitalización y algunos de los factores que intervienen en la transmisión nosocomial en pacientes hospitalizados (Tabla 1B y Tabla 2 en sección resultados).

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 [153]. La sepsis se definió sobre la base de los criterios del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica [153]. Las infecciones de piel y tejidos blandos (SSTI) no complicadas incluyeron los casos de infección primaria de la piel (Ej. un absceso, celulitis, foliculitis). Por otro lado las SSTI complicadas incluyeron casos de SSTI primaria con bacteriemia secundaria o su propagación a los tejidos contiguos [214]. Las infecciones del sitio quirúrgico (SSI) no fueron considerados como enfermedades de la piel.

Las indicaciones, definiciones, ficha epidemiológica que contempla información demográfica, clínica y microbiológica, y todas las descripciones de las características mencionadas en los párrafos anteriores fueron consignadas en el protocolo de trabajo (año 2009)

Este estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de Investigación en Salud del Ministerio de Salud, Provincia de Córdoba (aprobación N ° 1338), así como por el Comité de Ética institucional de cada hospital participante.

A los efectos de este estudio, se definió genóticamente a las cepas CA-MRSA y HA-MRSA (ver más abajo) y se las nombró como **CA-MRSA_G** y **HA-MRSA_G**, respectivamente. 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 y la presencia/ausencia de factores de riesgo relacionados a la atención sanitaria: HRF (definiciones epidemiológicas).

14.1.5 Definiciones

14.1.5.1 Tipo/lugar de inicio de las infecciones

-Se consideró INFECCIÓN DE INICIO EN EL HOSPITAL (HO, Healthcare Onset) a las infecciones que no estuvieron presentes en el paciente al ingreso en el hospital, y que se diagnosticaron (con confirmación microbiológica), luego de las primeras 48hs de internación

-Se consideró INFECCIÓN DE INICIO EN LA COMUNIDAD (CO, Community Onset), a las infecciones diagnosticadas en el momento de la consulta inicial de pacientes ambulatorios (con confirmación microbiológica) o dentro de las primeras 48h de internación

14.1.5.2 Definiciones epidemiológicas

Las infecciones asociadas a la comunidad (**CA**), se definieron como casos de inicio en la comunidad (**CACO**) en pacientes sin factores de HRF durante el año anterior, según los criterios de los CDC [138]. Las infecciones asociadas a la atención sanitaria (**HA**), incluyen: I) Infecciones de inicio en el hospital independientemente de la presencia de otros HRF (**HAHO**) y ii) las infecciones de aparición en la comunidad que se producen en pacientes con al menos un HRF (**HACO**) [138].

14.1.5.3 Factores de riesgo hospitalarios o relacionados a la atención sanitaria: HRF (CDC):

- -Hospitalización en los últimos 12 meses
- -Historial de infección / colonización de MRSA en los últimos 12 meses
- -Cirugía en los últimos 12 meses
- -Hemodiálisis en los últimos 12 meses
- -Residencia en una guardería o centro de rehabilitación

14.1.5.4 Definiciones Microbiológicas para MRSA

MRSA ASOCIADO A LA COMUNIDAD (CA-MRSA):

Aislamientos clínicamente significativos 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.

MRSA ASOCIADO A LA ATENCIÓN SANITARIA (HA-MRSA):

Aislamientos clínicamente significativos 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.

14.1.5.5 Definiciones genotípicas para MRSA

Para los objetivos de este estudio, se definió a los genotipos CA-MRSA_G como aquellos que pertenecían a clones CA-MRSA previamente identificados: ST5-IV/V-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⁻; ST88-IV-t186, PVL⁻; ST1649 (SLV of ST6)-IV-t701, PVL⁻; ST1-V-t127, PVL⁺; ST121/ST1210 (SLV of ST121)-IV/V t159 y relacionados, PVL^{+/-} [150, 153, 172, 173, 215, 216]

Todos los genotipos restantes se consideraron HA-MRSA_G [153, 217]

14.1.6 Aislamientos bacterianos y pruebas de susceptibilidad antimicrobianas

Los aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* (n: 591) fueron identificados por los procedimientos microbiológicos estándar y las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se realizaron mediante el método de difusión en disco (CLSI, 2009). La vancomicina, teicoplanina, tigeciclina y las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de fosfomicina se determinaron por el método de dilución en agar, (CLSI, 2009) y la CIM a daptomicina se evaluó mediante E-test (bioMérieux). La susceptibilidad a Ceftarolina 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 y se interpretó de acuerdo a la CLSI M100-S25: Sensible ≤ 1 ug/ml; Intermedia 2 ug/ml; Resistente ≥ 4 ug/ml. La cepa de *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* 29212 y *E. coli* 25922 se utilizaron como cepas de referencia.

14.1.7 Tipificación Molecular

La tipificación molecular se realizó en todos los aislamientos MRSA (n: 322) y una muestra de 132 aislamientos clínicos de MSSA representativa de todo el país (norte, centro y sur) y de la población pediátrica y adulta.

La caracterización de los MRSA incluyó la realización de electroforesis en campo pulsante (PFGE) y en aquellos aislamientos representativos de los subtipos más prevalente (definidos por PFGE) se realizó tipificación por secuencias multilocus (MLST) y tipificación por análisis de la secuencias polimórfica “x” de gen de la proteína A de *S.aureus* (*spa typing*).

Además se estudió la presencia del gen *mecA* y de 23 genes de virulencia útiles como marcadores moleculares para MRSA

Para la caracterización molecular de los MSSA se realizó PFGE y *spa typing* a todos los aislamientos seleccionados. El tipo secuencial (ST)/Complejo Clonal (CC) se infirió de acuerdo al *spa t*, en aquellos que no tuvieron un ST relacionado se realizó Multilocus Sequence Typing (MLST).

14.1.8 Detección del gen *mecA* por PCR multiplex:

Esta metodología se realizó según protocolo de Geha y cols.[218] Consiste en la utilización de dos pares de primers, uno de ellos específico para la amplificación de una secuencia del RNAr 16s del genero *Staphylococcus* spp de modo que el amplicon obtenido es utilizado como control positivo de la calidad e identidad del DNA que se estudia y el otro par de primers amplifica una región altamente conservada del gen *mecA*.

Extracción de DNA: 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 100 μ de una solución de lisis que contenía: 25U de Lisofaphin/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 900 μ de agua desionizada estéril. La suspensión es

centrifugada por 3 min a 13000g y del sobrenadante se utilizan 2 μ como templado de DNA para la siguiente PCR:

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

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

mecA1: 5'-GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA-3'

mecA2: 5'- CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA-3'

P4: 5'- GGAATTCAACTGGAATTGAATTGACGGGGGC -3'

P5: 5'- CGGGATCCCAGGCCCGGGAACGTATTCAC -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: 2 μ de agua MQ estéril con la mezcla de reacción

14.1.9 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 DNA 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 exagonal que tiene

dispuestos 24 electrodos. Bajo la dirección de un campo eléctrico, las moléculas de DNA se reorientan y se desplazan avanzando en dirección del polo positivo. Cuando el campo eléctrico cesa, las moléculas de DNA se relajan recuperando su estado inicial. La aplicación de un 2º campo eléctrico con una orientación distinta al primero, obliga al DNA a cambiar su conformación y reorientarse de nuevo para avanzar en la dirección del 2º campo eléctrico. El tiempo requerido para esta 2º reorientación es dependiente de la longitud de la molécula (PM). Las molécula 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 DNA 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 DNA ha realizado. Se obtienen así patrones de restricción que representan el DNA cromosómico bacteriano distribuido en pocas bandas con movilidades electroforéticas distintas. El perfil de fragmentos de DNA obtenido (**pulsotipo**) es considerado, por lo tanto, como parámetro de identificación, como si fuese una “huella digital” a nivel genético. Ver en página 163 la interpretación.

El procedimiento completo comprende:

-Extracción de DNA 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 “plugs 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 1µ de

Proteínasa K (50mg/ml) y es incubado durante toda la noche a 56°C.

Posteriormente los tacos son sometidos 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 aprox 4mm x 4mm y se los sumerge en buffer de equilibrio de Smal por 30 min antes de realizar la digestión. Luego se tratan con 100 μ de buffer de reacción que contiene 20U/muestra de la ER Smal (de cortes poco frecuentes para el cromosoma de *Staphylococcus spp*), mezclar e incubar al menos 4h.

-Electroforesis en campo pulsado: se debe preparar un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 0,5X, dejar un remanente (10ml aprox) antes de volcar la agarosa en el soporte de dará forma al gel. Dejar solidificar, luego se introducen los bloque digeridos (cepas problemas y control ATCC 8325) y el marcador de PM en cada well del gel. Para finalizar la operación estos son cubiertos (sellados) con el remanente de agarosa a fin de fijar el taco de DNA en su respectivo well.

El gel es colocado en la cuba electroforética CHEF-DR II (*clamped homogeneous electric field electrophoresis*). Bio Rad con buffer TAE1x

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 Swich 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 μ g/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 [109] 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 pulsotipo se le asigna una letra designando una familia clonal y cada subtipo es señalado, además, con un número.

Esta 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:

-Buffer SE:

75 mM NaCl; 25mM EDTA, pH=7,5

-Buffer de lisis para coco 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

-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 PM lamdda.

14.1.10 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 Enright y cols. 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*)

aro (*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 considera un alelo distinto y a cada uno se le asigna un número. Los aislamiento 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 evolutiva de utilidad epidemiología global o a largo plazo.

El protocolo empleado para esta técnica fue el siguiente:

-Extracción de DNA: 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 resuspendidas en 100 μ de una solución de lisis que conteniendo: 25U de Lisofaphin/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 calentar a 95°C por 10 min. Se deja enfriar a T° ambiente y luego se añaden 900 μ de agua desionizada estéril. La suspensión es centrifugada por 3 min a 13000g y del sobrenadante se recuperan 2 μ de DNA 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 50 μ , la misma incluye: 200 μ M dNTP (deoxynucleósido trifofato, 10mM Tris; pH=8,3), 50mM KCl, 1,5 μ M Mg₂Cl, 1pmol/ μ l de cada primer, 1U de *Taq* DNA 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, aneling: 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. Este 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

14.1.11 Tipificación utilizando de la región polimórfica “X” del gen *spa*:

Esta metodología se realizó de acuerdo al protocolo de [219]

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 ésta 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 DNA: 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 100 μ de una solución de lisis que conteniendo: 25U de Lisofaphin/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 calentar a 95°C por 10 min. Se deja enfriar a T° ambiente y luego se añaden 900 μ de agua desionizada estéril. La suspensión es centrifugada por 3 min a 13000g y del sobrenadante se recuperan 2 μ de DNA 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 50 μ , la misma incluye: 200 μ M dNTP (deoxynucleósido trifofato, 10mM Tris; pH=8,3), 50mM KCl, 1,5 μ M Mg₂Cl, 1pmol/ μ l de cada primer, 1U de *Taq* DNA 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".

14.1.12 Determinación del tipo de SCCmec (Staphylococcal Cassette Chromosomal 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 múltiplex y por PCR convencional a través de la identificación de los complejos de genes *mec*, *ccr*, y la región J1 como se describió previamente (134).

La tipificación del SCCmec se llevó a cabo mediante PCR multiplex (MPCR) según describió Oliveira y De Lancastre [62], 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 pl258 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 Ver tabla 12 a continuación con primer usados para cada locus.

Tabla 12 Primer para tipificación de *SCCmec*

LOCUS	PRIMERS	SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS	TAMANO(amplicón)	TIPO DE <i>SCCmec</i>
A	CIF2 F2 CIF2 R2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG ATTTACCACAAGGACTACCAGC	495 pb	I
B	KDP F1 KDP R1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC CGAATGAAGTGAAGAAAAGTGG	284 pb	II
C	MECIP2 MECI P3	GCGGTTTCAATTCACCTTGTC GCGGTTTCAATTCACCTTGTC	209 pb	II, III
D	DCS F2 DCS R1	CATCCTATGATAGCTTGGTC CTAAATCATAGCCATGACCG	342 pb	I,II,IV
E	RIF4 F3 RIF4 R9	GTGATTGTTCCGAGATATGTGG CGCTTTATCTGTATCTATCGC	243 pb	III
F	RIF5 F10 RIF5 F13	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG GTCACAGTAATCCATCAATGC	414 pb	III
G	IS431P4 pUB110R1	CAGGTCTCTTCAGATCTACG GAGCCATAAACACCAATAGCC	381 pb	
H	IS431 P4 pT181 R1	CAGGTCTCTTCAGATCTACG GAAGAATGGGGAAAGCTTCAC	303 pb	
<i>mecA</i>	MECA P4 MECA P7	TCCAGATTACAACCTCACCAGG CCACTTCATATCTTGTAAACG	162 pb	Control interno

Etapas de PCR multiplex para tipado de *SCCmec*

Extracción de DNA: Se recolectaron al menos 10 colonias bacterianas de un cultivo joven (18-24h) y fueron resuspendidas en 100 μ de una solución de lisis que conteniendo: 25U de Lisofaphin/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 calentar a 95°C por 10 min. Se deja enfriar a T° ambiente y luego se añaden 900 μ de agua desionizada estéril. La suspensión es centrifugada por 3 min a 13000g y del sobrenadante se recuperan 2 μ de DNA.

PCR: la mezcla de reactivos de PCR, para cada muestra; se preparó con un volumen final de 50 μ , la misma incluye: 200 μ M dNTP (deoxynucleósido trifofato, 10mM Tris; pH=8,3), 50mM KCl, 1,5 μ M Mg₂Cl, 1pmol/ μ l de cada primer, 1, 25 U de *Taq* DNA polimerasa y agua miliQ estéril y 2 μ l DNA (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 electroforesis convencional y posterior tinción con Bromuro de Etidio.

14.1.13 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 Milheirço y cols. [62] 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 [153], que se lo caracteriza según los datos de la tabla 13.

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 *mec* B)
- iii) *Tn4001*-3-F, y *Tn4001*-3-R (Amplificando la región entre el locus *mecA* y IS256L (*Tn4001*)).

Región amplificada	Nombre del primer	Secuencia nucleotídica	tamaño
<i>Tn4001</i> -1 [IS1256Laac(2')-aph(6'')]	<i>Tn4001</i> -1-F	GCCAATCGCTTAATTGGAGCCG	709 pb
	<i>Tn4001</i> -1-R	ACTTCATCTTCCCAAGGCTCTGT	
<i>Tn4001</i> -2 (IS256R-IS1272)	<i>Tn4001</i> -2-F	TCGGATGTCTGTCCGAGGACT	968 pb
	<i>Tn4001</i> -2-R	ACCAAACCCGACAACACTACAACACTAT	
<i>Tn4001</i> -3 (<i>mecA</i> -IS256L)	<i>Tn4001</i> -3-F	ACCAAACCCGACAACACTACAACACTAT	1298pb
	<i>Tn4001</i> -3-R	GTGTCGTAAAGCTGCGCTCA	

Tabla 13 Caracterización molecular del SCC_{mec} asociado al pulsotipo C y ST100: Variante Argentina del clon pediátrico (Sola 2012), en relación a cepas controles.

Conjunto de Primers usados para la identificación del SCC _{mec}				Tipos de SCC _{mec}				
región Amplificada	nombre del primer	Secuencia del Primer (5' → 3')	Amplicon tamaño, bp	IV(2B) ^a / _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	TAAAGGCATCAATGCACAAACT						
<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>	GTACTCGTTACAATGTTTTGG	449	-	+	+	-	-
	<i>ccrC R2</i>	ATAATGGCTTCATGCTTACC						
Class B <i>mec</i> complex				+	-	-	+	-
IS 1272	IS5	AACGCCACTCATAACATATGGAA	2000	+	-	-	+	-
	mA6	TATACCAAACCCGACAAC						
ψIS 1272 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	-	+	-	-	+
	Tn4001-1-R	ACTTCATCTTCCCAAGGCTCTGT	709					
Tn4001-2 (IS256R-IS 1272)	Tn4001-2-F	TGGCCATCACGTGTTCTGGG	^d	-	+	-	-	+
	Tn4001-2-R	TCGGATGTCTGTCCGAGGACT	968					

	R							
Tn4001-3 (<i>mecA</i> -IS256L)	Tn4001-3- F	ACCAAACCCGACAACACTACAATAT	^d 1298	-	+	-	-	+
	Tn4001-3- R	GTGTCGTAAAGCTGCGCTCA						
J3 region								
<i>dcs</i>	<i>dcs</i> -F2	CATCCTATGATAGCTTGGTC	342	+	-	-	+	+
	<i>dcs</i> -R1	CTAAATCATAGCCATGACCG						
J1 region								
SCC <i>mec</i> V	SCC <i>mec</i> V- J1-F	TTCTCCATTCTTGTTCATCC	377	-	-	+	-	-
	SCC <i>mec</i> V- J1-R	AGAGACTACTGACTTAAGTGG						
SCC <i>mec</i> IV ^e								
IVa	<i>J IVa F</i>	ATAAGAGATCGAACAGAAGC	278	+	-	-	-	-
	<i>J IVa R</i>	TGAAGAAATCATGCCTATCG						
IVc	<i>J IVc F</i>	CCATTGCAAATTTCTCTTCC	483	-	+	-	-	+
	<i>J IVc R</i>	ATAGATTCTACTGCAAGTCC						

^a SCC*mec*: Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*; PFGE: Pulsed field gel electrophoresis;

^b tipo de SCC*mec* /nombre cepa control: Tipo de SCC*mec* asociado a la cepa control.

^c SCC*mec* IVNv: Nueva variante de SCC*mec* 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 SCC*mec* IV IVb, IVd, IVg, IVh que fueron analizados por PCR y se muestran sólo los que dan positivo.

14.1.14 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 estafilococos 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*; leukocidinas: *lukE-lukD* y la leukocidina 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 descrito [214].

En los aislamientos de MSSA analizados molecularmente (n: 132) se determinó la presencia los genes Pantón-Valentine leucocidina (*Luks-PV-LukF-PV*) por PCR.

Con las metodologías anteriormente descritas, un clon queda definido por: el pulstipo (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.

14.1.15 Análisis estadístico

Los datos bacteriológicos y de los pacientes fueron compilados en una base de datos mediante ACCES (Microsoft). Para investigar las características asociadas de forma independiente con las infecciones causadas por los genotipos CA-MRSA_G tanto en el total de infecciones como en aquellas de inicio en el hospital se utilizó el análisis de regresión logística Uni y Múlti variado. Se realizaron comparaciones entre grupos de cepas definidas genotípicamente como CA-MRSA_G y HA-MRSA_G, en todas las infecciones de MRSA y se repitieron para las infecciones de inicio en el hospital (HO), para explorar la transmisión de CA-MRSA_G y describir los factores asociados con la transmisión.

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 corresponda. Las variables dicotómicas o categóricas se compararon mediante la prueba del χ^2 o la prueba exacta de Fisher, según corresponda. $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Las variables

categorías que fueron significativas en cada análisis univariado ($p < 0,05$) realizado entre grupos de cepas apareadas, se incluyeron en el análisis de regresión logística múltiple para cada situación comparada. En todas las comparaciones, la información sobre las variables consideradas estaba disponible para más del 80% de los casos. Los datos fueron analizados con el programa SPSS (versión 15.0) y InfoStat (www.infostat.com.ar).

14.2 Objetivo general II:

- ***III Analizar estrategias de virulencia y/o transmisibilidad de los diferentes clones y su posible asociación con epidemividad (supervivencia en superficies inertes y formación de biofilm).***

14.2.1 Ensayo de supervivencia en superficie inerte y recuento de colonias).

Para este ensayo se prepararon suspensiones bacterianas en Solución Fisiológica estéril con una concentración del microorganismo de 0,5 Mc Farland, equivalente a una concentración bacteriana entre 1×10^8 y 1×10^9 UFC/ml, para ello se utilizaron:

i)-aislamientos de MRSA pertenecientes a los pulsotipos: **I1** [I-ST5-IVa-t311], **A1** [A-ST5-I-t149], **N4** [N-ST30-IVc-t019], **C1** [C-ST100-IVnv-t002], **USA300** [USA300-ST8-IVa-t008].

ii)-aislamientos MSSA pertenecientes a los mismos pulsotipos elegidos para MRSA; en este caso indicadas como: **Ims**, **Ams**, **Nms**, **Cms**, **USA300ms**.

iii)-aislamientos esporádicos de MRSA pertenecientes a los pulsotipos: **EE** [ST5-I], **HH** [ST5-I], **BB** [ST88-IV], **QQ** [ST5-IV]

En todos los caso para un mismo pulsotipo se estudiaron 3 aislamientos de *S. aureus* distintos, es decir de diferentes pacientes, con el fin de evaluar si el comportamiento observado era correspondiente a la familia clonal en estudio o al aislamiento particular.

Además en cada familia clonal se eligió uno de los 3 aislamientos para ser procesado por triplicado y de este modo evaluar la variabilidad intra ensayo.

-Se depositaron 100 μ (en forma de gota o spot de cada una de las suspensiones citadas) en una placa de melamina y se dejaron secar por 24h. Esta placa se mantuvo expuesta a temperatura, aireación y desecación ambiente por un total de 40 días.

Cada uno de estos spot secos fue recuperado con 100 μ l de SF estéril y a continuación rastrillados (con espátula de Drigalsky) en una placa de Petri conteniendo Tripteína Soya Agar (TSA) como medio de cultivo.

Para lograr un correcto recuento se sembraron diferentes diluciones seriadas de las suspensiones recuperadas.

Los recuentos se realizaron a los días: (5d); 20d; 25d y 40d. El recuento de la suspensión inicial fue considerado como t=0.

Al momento del recuento de UFC se tomó una única colonia para posterior repique y verificación de coincidencia del pulsotipo con el originalmente depositado en la placa de melamina.

Se grafica como porcentaje (%) de sobrevivida o supervivencia en función del tiempo, tomando el recuento de la suspensión inicial como 100 %.

**Esquema del ensayo de supervivencia en superficie inerte
(PLACA DE MELAMINA)**

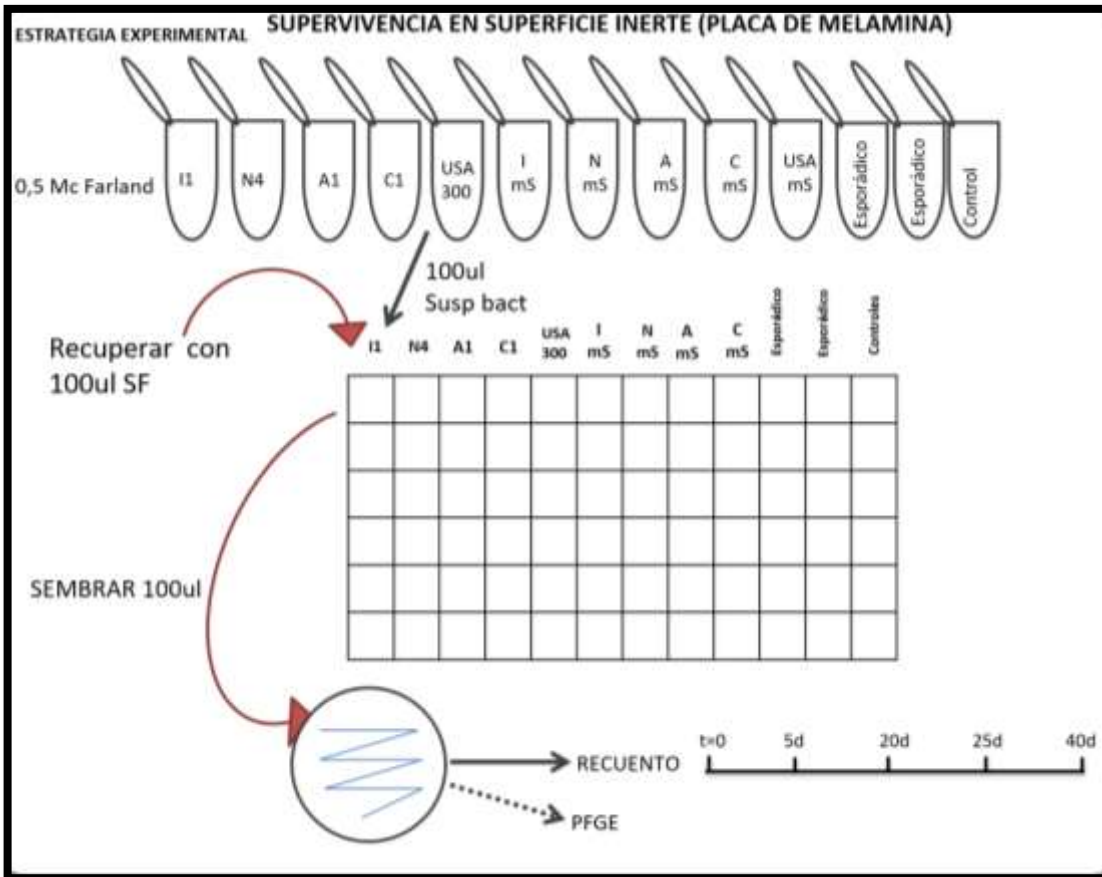


Figura 5. Esquema de la metodología utilizada para evaluar supervivencia en superficie inerte (placa de melamina)

-Cada cuadrado representa la superficie donde se depositó una gota de 100ul de suspensión bacteriana de aislamientos de cada familia clonal analizada.

-Cada fila esta dividida en seis cuadrados de los cuales los tres primeros, contienen la suspensión de tres aislamientos diferentes cada uno, pero todos pertenecientes a la misma familia clonal o pulsotipo y los tres últimos cuadrados contienen la suspensión del aislamiento depositado en el cuarto lugar repetido por triplicado en el cuarto, quinto y sexto cuadrado.

-Las familias clonales analizadas están representadas con una letra mayúscula (pulsotipo) seguidas de un número que indica el subtipo.

14.2.2 Ensayo de supervivencia en superficie inerte y expresión diferencial de genes

Se desarrolló la misma estrategia experimental descrita en el punto anterior pero en esta oportunidad se aumentó el inóculo bacteriano a 1×10^{11} - 1×10^{12} UFC/ ml y la cantidad de spot sembrados en la placa de melamina, con el objeto de poder recuperar material suficiente para el recuento bacteriano y extracción de RNA desde el spot seco en la placa. A continuación se muestra en el esquema la estrategia utilizada (Figura 6) .

Primeramente se realizó ensayo de supervivencia con la nueva concentración 1×10^{11} - 1×10^{12} UFC/ ml, a fin de evaluar si se mantenía la tendencia de supervivencia observada en la placa de melamina como se indicó en el esquema anterior.

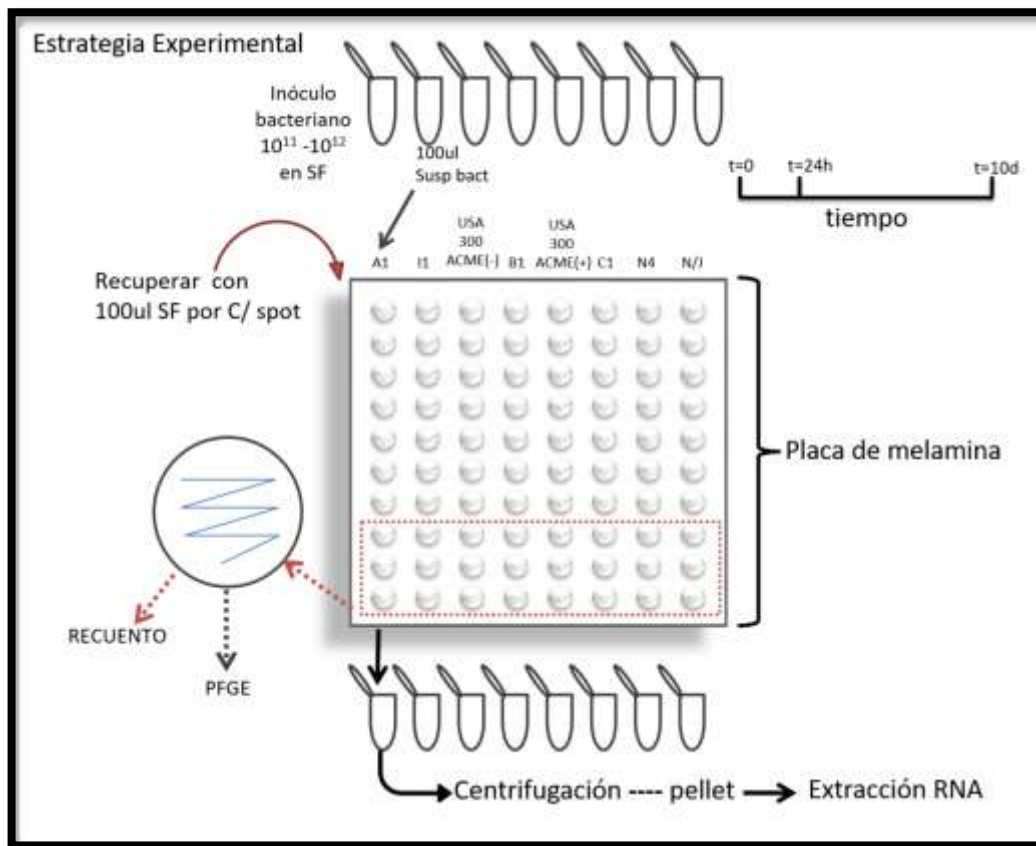


Figura 6. Esquema de la metodología utilizada para evaluar supervivencia y para extracción de RNA en placa de melamina

Cada círculo representa la superficie donde se depositó una gota de 100ul de suspensión bacteriana de aislamientos de cada clon analizad (Indicados arriba de cada fila.).

Los primeros 7 spots se depositaron para ser luego recuperados para purificación de RNA. Los tres últimos spots se usaron para realizar recuento de colonias y PFGE. Con el objeto de corroborar la supervivencia y la identidad del clon.

Para realizar las suspensiones, se trabajó con clones epidémicos MRSA: [Clon cordobés-chileno ST5-I-t149]; [USA300 ACME(-) ST8-IVc-t008], [USA300 ACME(+)-ST8-IVa-t008], [clon Brasil ST239-III-t037], [clon N/J ST5-II-t002]; [variante Argentina del clon pediátrico ST100-IVnv-t002]; y los principales clones CA-MRSA circulantes en Argentina: [I1-ST5-IVa-t311]; [N4-ST30-IVc-t019].

Se sembró una fila de 10 spots de 100 μ cada uno (de cada una de las suspensiones citadas) en la placa de melamina y se dejaron secar por 24h, la misma se mantuvo expuesta a temperatura, aireación y desecación ambiente por un total de 40 días.

En esta oportunidad los recuentos se realizaron a las 24h, y a los días (5d); 10d; 25d y 40d. El recuento de la suspensión inicial fue considerado como t=0.

Los 7 primeros spots fueron recuperados en 100 μ l de SF estéril con el objeto de lograr la mayor concentración posible para posterior extracción de RNA a las 24h y 10d.

Los 3 últimos spots fueron recuperados con 100 μ de SF cada uno y utilizados para Recuento Bacteriano por triplicado.

Al momento del conteo de UFC/ml se tomó una única colonia para posterior repique y verificación por PFGE de coincidencia del clon recuperado con el originalmente depositado en la placa de melamina.

14.2.2.1 Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó a las 24h y 10 d desde el depósito de los spot en la placa de melamina.

Los primeros 7 spot sembrados fueron recuperados en 100 μ l de SF y posteriormente centrifugados a altas rpm con el objeto de concentrar la mayor cantidad de pellet, posteriormente se procedió según protocolo de purificación de RNA del Kit comercial GeneJET RNA Thermo Scientific Fermentas.

Luego se realizó la cuantificación en un espectrofotómetro de volumen múltiple. Los datos se procesaron con el software Gen5TM. Se aplicaron 2 μ L de muestra en la

plataforma Take3 (BioTek Instruments Inc). Se realizó lectura de densidad óptica (DO) a 260 y 280 nm, para medir ácidos nucleicos y proteínas, respectivamente.

Luego de medir la concentración del mismo y de corroborar su integridad se eliminó la contaminación con DNA utilizando la enzima DNAsa I (Promega 200U) [3U de DNAsa/1 µg de RNA a 37°C durante 60 min]. Las muestras de RNA fueron conservadas a -70°C hasta su posterior utilización

14.2.2.2 Obtención de cDNA

Para obtener cDNA a partir de RNA se llevó a cabo la reacción de transcripción reversa (RT) mediante el uso de la enzima transcriptasa reversa M-MLV™ Invitrogen. Esta reacción se logró a partir de 500ng de RNA total por metodología de PCR convencional (según protocolo descrito por Frozatti y cols). Brevemente se describe a continuación:

Agua (RNA free)	4µl
RNA 500ng	5µl
Random Primers 50µM	1µl
Calentar durante 5min a 70°C y enfriamiento rápido en hielo	
Agua (RNA free)	7µl
MMLV buffer 5X	5µl
dNTP 10mM	2µl
MMLV enz 200U	1µl
Calentar durante 60min a 37°C	

14.2.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RTqPCR)

Se analizó y comparó el nivel de expresión de los genes: *spa*, *fnbpA*, *fnbpB*, *hla*, *psmA1A2*, *IsdD*, *agrA*, *RNAIII* en dos puntos de tiempo (24h y 10d) entre los distintos clones epidémicos

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

El perfil térmico fue: 94°C 4 min; 94°C 30 seg, T° de annealing 35 seg, 72°C 30 seg. La medición de la señal emitida por SYBR Green y en cada ciclo fue realizada en la etapa de annealing. La cuantificación de cambios relativos en la expresión génica del gen en estudio respecto a genes de expresión constitutiva como *Gyr B* usados como control internos fue realizada mediante el método de $2^{-\Delta(\Delta C_t)}$.

Para cada par de primers bajo las condiciones ensayadas se observó la presencia de un solo pico en curva de disociación, indicando que un solo producto de PCR se generó en la amplificación. A continuación se describen las secuencias los oligonucleótidos de los genes evaluados.

Secuencias de oligonucleótidos utilizados.

<i>spa F</i>	ACCAGCAAACCATGCAGATG
<i>spa R</i>	CGCTGCACCTAACGCTAATG
<i>fnbpA F</i>	AGCATGGTCAAGCACAAGGA
<i>fnbpA R</i>	CGTCATAATTCCTGGACCA
<i>fnbpB F</i>	GCAGCATCGGAACAAAACAA
<i>fnbpB R</i>	TGTCGCGCTGTATGATTGTG
<i>hla F</i>	GGTGCAAATGTTTCGATTGG
<i>hla R</i>	TCCCAATTTTGATTCACCA
<i>psmA1A2 F</i>	TCGCTGGCATCATTAAAGTTATC
<i>psmA1A2 R</i>	TTCCTGCAATGATACCCATGT
<i>IsdD F</i>	GCATGTTAAAACGTTGGCTGA
<i>IsdD R</i>	GGCACTTCTTTTGCATCATCA
<i>agrA F</i>	CATTCGCGTTGCATTTATTGA
<i>agrA R</i>	GACCTAAACCACGACCTTCACC
<i>RNAIII F</i>	TGGCACAAGATATCATTTCACAA
<i>RNAIII R</i>	TTGTTCACTGTGTCGATAATCCAT
<i>gyr B F</i>	ACGCAGGCGATTTTACCATT
<i>gyr B R</i>	ATCAAAGTCGCCACCGATTC

14.2.3 Ensayo de biofilm

Las mediciones semicuantitativas de la formación de biofilm se determinaron con placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano, basándose en el método de Christensen y col. y posterior modificación de Srdjan Stepanovic (226, 227). A continuación se muestra un esquema con el ensayo de biofilm realizado.

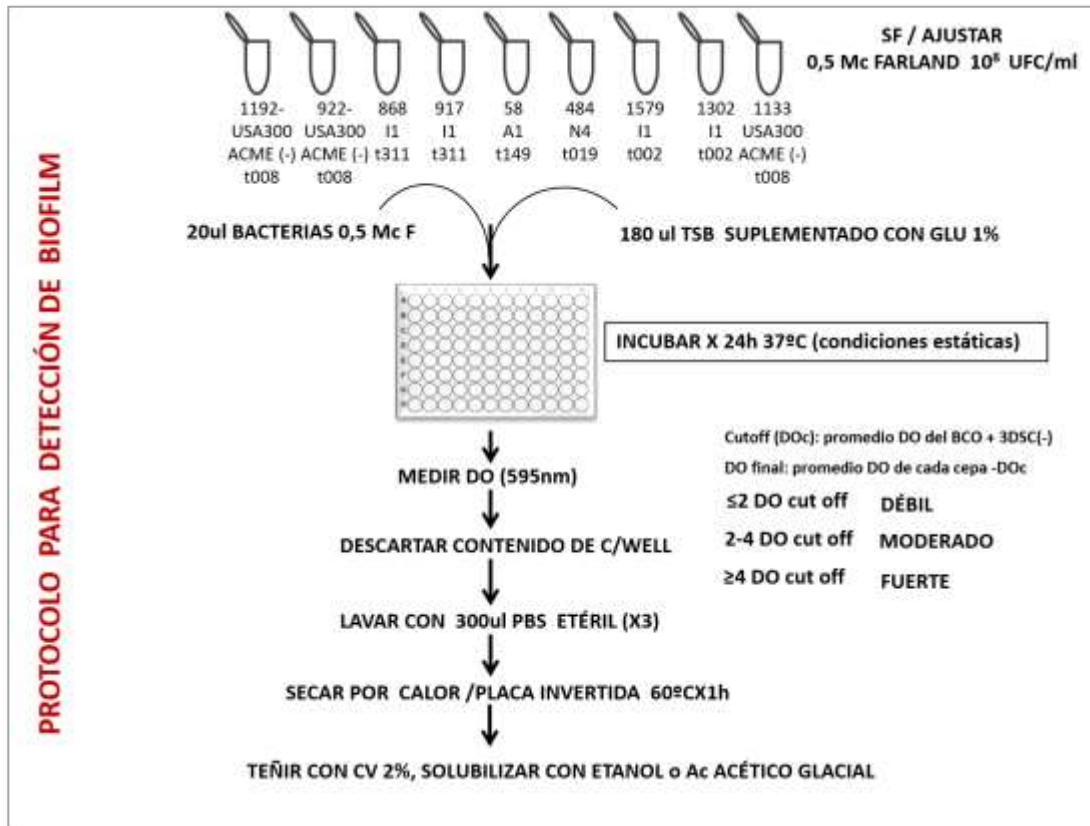


Figura 7.: Esquema de metodología utilizada para evaluar biofilm en placa multiwell

Resumidamente se siguieron los pasos descritos a continuación:

1- A partir de un cultivo bacteriano, desarrollado en medio sólido, de no más de 24h se realizó una suspensión en SF estéril equivalente al 0,5 de la escala de Mc Farland (1×10^8 - 1×10^9 UFC/ml)

2- En cada pocillo de la placa de microtitulación o multiwell se adicionaron 180µl de Caldo Trypticase Soya (suplementado con Glucosa al 1%) [90, 94].y seguidamente se inoculó con 20 µl de la suspensión bacteriana en estudio alcanzándose una dilución final 1:10.

3- La placa se incubó por 24h a 37°C en condiciones estáticas.

4- Luego de 24h de crecimiento se midió la DO en lector de placa a 595nm (este paso es un control de crecimiento bacteriano para evitar falsos negativos).

5- Posteriormente el contenido de cada pocillo fue descartado, agitando previamente.

6- Se lavó vigorosamente cada pocillo con 300µl de 1X PBS estéril. Este paso se repitió 3 veces (para eliminación de las bacterias planctónicas y restos de medio de cultivo).

7-La placa se secó y fijó por calor a 60°C durante 60 minutos como recomienda Gelosia y cols.[220]

8- La tinción se llevó a cabo agregando, en cada uno de los pocillos inoculados, 150µl de Cristal Violeta 2% (CV), que luego fueron incubados por 15 minutos a temperatura ambiente.

9- Se eliminó el CV excedente y se realizaron lavados con agua destilada hasta que los lavados fueron claros y posteriormente se secó a 37°C durante 15 minutos.

10- El biofilm formado y teñido con CV se eluyó con 150µl de ácido acético glacial al 33% y se realizó la lectura a una DO de 540nm en lector de placa de Elisa

14.2.3.1 Aislamientos

El ensayo de Biofilm se realizó con diferentes aislamientos MRSA representantes de las principales familias clonales tanto **CA-MRSA**: [I1-ST5-IV]; [N4-ST30-IV]; [USA300-ST8-IV] como **HA-MRSA**: [A1-ST5-I]; [C1-ST100-IVnv] Y también a **clones esporádicos**: EE-ST5-I, HH-ST5-I, BB-ST88-IV, QQ-ST5-IV. (Los aislamientos estudiados en el ensayo de biofilm fueron los mismos que los analizados en el ensayo de supervivencia).

En cada uno de los aislamientos la formación de biofilm se evaluó por triplicado (tres pocillos para cada aislamiento) y se promedió la lectura de DO obtenida. El método de biofilm fue repetido en tres ensayos independientes.

Se utilizó como control (+) la cepa ATCC: *Staphylococcus aureus* 35556. Como Blanco y Control (-) se tomó la lectura de la DO de 3 pocillos con caldo TSB sin inoculación bacteriana y que, por lo tanto, presentaron ausencia total de biofilm.

14.2.3.2 Cuantificación

Para semicuantificar el biofilm formado se estableció un Cut off (DOc) y una DO final (DOf).

-La DOc resulta del promedio de 3 lecturas de DO del blanco (ausencia total de biofilm) más tres veces la desviación estándar (SD) del mismo.

$$DOc = \text{promedio de DO (del blanco)} + (3 \text{ SD blanco})$$

-La DOf resulta del promedio de las 3 DO, de cada aislamiento, menos la DOc

$$DOf = \text{promedio de DO (cepa cepa en estudio)} - DOc$$

Se consideró la adhesión como:

≤ 2 DOc.....DÉBIL

2-4 DOc.....MODERADO

≥ 4 DOc.....FUERTE

14.2.3.3 Tratamiento del biofilm

El mecanismo mejor descrito de desarrollo de biofilm en *S. aureus* implica la formación de un polisacárido extracelular o poli-N- acetilglucosamina (PIA / PNAG). La síntesis de PIA / PNAG está regulada por el locus de adhesión intercelular (*ica*), esta vía es llamada *ica* dependiente (70, 71, 72). Sin embargo también se ha descrito que *S. aureus* es capaz de formar biofilm por una vía alternativa llamada *ica*-Independiente En este último mecanismo intervienen las proteínas de adhesión llamadas MSCRAMMs ("*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*") (69, 71).

- **Biofilm: tratamiento con Proteinasa K (PK)**

Se utilizó PK con el objeto de digerir las proteínas que pudieran estar conformando el biofilm y así observar que tipo de contenido es el que lo conforma (polisacárido o proteico)

Se llevó a cabo la metodología de Biofilm en placa de microtitulación, como se describió anteriormente, hasta el punto número 7 (fijación por calor) a partir de aquí se trató, el biofilm formado, con 100 μ l de Proteinasa K (100 μ g/ml) (156) y se incubó durante

120min a 37°C. Seguidamente se eliminó el contenido de cada pocillo y los mismos fueron lavados con agua destilada. A continuación se prosiguió con la metodología descrita, en el apartado anterior, desde el punto número 8 en adelante.

- **Biofilm: tratamiento con Metaperiodato de Sodio (IO₄Na)**

El metaperiodato sódico es un agente que oxida los polisacáridos inactivándolos, se utilizó aquí con la intención de evaluar el tipo del contenido del biofilm.

Se llevó a cabo la metodología de Biofilm en placa de microtitulación, como se describió anteriormente, hasta el punto número 7 (secado por calor) a partir de aquí se trató, el biofilm formado, con 100 µl de 10mM metaperiodato de sodio [178] y se incubó durante 120min a 37°C. Seguidamente se eliminó el contenido de cada pocillo y los mismos fueron lavados con agua destilada. A continuación se prosiguió con la metodología descrita, en el apartado anterior, desde el punto número 8 en adelante.

14.2.3.4 Extracción de RNA en Biofilm

Para la purificación del RNA bacteriano a partir del biofilm, se realizaron dos ensayos de biofilm (como se describió anteriormente) en paralelo partiendo de un mismo inóculo inicial:

-Un ensayo de biofilm como se describió en la metodología de biofilm con placa multiwell de 96 pocillos con el objeto de poder leer el biofilm en el lector de placa de ELISA.

-Un ensayo de biofilm con placa multiwell de 24 pocillos (con el objeto tener mayor superficie de adherencia para mejor y mayor extracción de RNA). Para este experimento se procedió a efectuar los pasos 1 a 7 descritos anteriormente para ensayo de biofilm; a partir de aquí el biofilm adherido a la placa fue tratado con 100µl de buffer TE que contenía lisostafina a 30U/ml, se mezcló 10 veces (suavemente con el tip), posteriormente se incubó durante 5 min a T° ambiente, seguidamente se añadieron 300µl de Buffer de Lisis (Kit comercial GeneJET RNA Thermo Scientific Fermentas) suplementados con 6µ de 2 mercaptoetanol y fueron mezclados suavemente en el pocillo hasta observar una solución homogénea. Se agregó 180µl de Etanol (absoluto). Este lisado fue transferido a

la columna de purificación del kit comercial GeneJET RNA Thermo Scientific Fermentas y se continuó según protocolo del mismo para obtención de RNA

Luego se realizó la cuantificación en un espectrofotómetro de volumen múltiple. Los datos se procesaron con el software Gen5™. Se aplicaron 2 µL de muestra RNA en la plataforma Take3 (BioTek Instruments Inc). Se realizó la lectura de densidad óptica (DO) a 260 y 280 nm, para relación medir ácidos nucleicos y proteínas, respectivamente.

Luego de medir la concentración y de corroborar la integridad, del RNA, se eliminó la contaminación con DNA utilizando la enzima DNAsa I (Promega 200U) [3U de DNAsa/1 µg de RNA a 37°C durante 60 min]. Las muestras de RNA fueron conservadas a -70°C hasta su posterior utilización.

14.2.3.5 Obtención de cDNA

Para lograr cDNA a partir de RNA se llevó a cabo la reacción de transcripción reversa (RT) mediante el uso de la enzima transcriptasa reversa M-MLV™ Invitrogen. Esta reacción se logró a partir de 500ng de RNA total por metodología de PCR convencional (según protocolo descrito por Frozatti y cols).Brevemente se describe a continuación:

Agua (RNA free)	4µl
RNA 500ng	5µl
Random Primers 50µM	1µl
Calentar durante 5min a 70°C y enfriamiento rápido en hielo	
Agua (RNA free)	7µl
MMLV buffer 5X	5µl
dNTP 10mM	2µl
MMLV enz 200U	1µl
Calentar durante 60min a 37°C	

14.2.3.6 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RTqPCR)

Se analizó y comparó el nivel de expresión de los genes: *spa*, *fnbpA*, *fnbpB*, *hla*, *psmA1A2*, *IsdD*, *agrA*, *RNAIII* entre los distintos clones en estudio.

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

El perfil térmico fue: 94°C 4 min; 94°C 30 seg, T° de annealing 35 seg, 72°C 30 seg. La medición de la señal emitida por SYBR Green y Rox en cada ciclo fue realizada en la etapa de annealing. La cuantificación de cambios relativos en la expresión génica del gen en estudio respecto a genes de expresión constitutiva como *Gyr B* usados como control internos fue realizada mediante el método de $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$.

Para cada par de primers bajo las condiciones ensayadas se observó la presencia de un solo pico en curva de disociación, indicando que un solo producto de PCR se generó en la amplificación.

14.2.4 Fase Exponencial y Fase Estacionaria en caldo:

Con el objeto de tener un control de la expresión de genes en el biofilm, se practicó la extracción de RNA desde el microorganismo en desarrollo (Fase exponencial y Fase estacionaria) ya que ha sido descrito, que las proteínas relacionados a la adhesión se expresan en fase exponencial y las toxinas en fase estacionaria todo esto bajo el control del regulador global *agr* (208).

14.2.4.1 Extracción de RNA en caldo

En primera instancia, se llevaron a cabo curvas de crecimiento durante 24h de los principales clones en estudio. En base a las mismas se determinó el tiempo y la DO alcanzada durante cada fase (exponencial / estacionaria), apoyados en este dato se pudo corroborar que los cultivos de 5h y 8h se encontraban en las Fases a ser evaluadas*.

Se realizaron suspensiones Bacterianas (de cada uno los clones en estudio) equivalentes al 0,5 Mc Farland este punto se tomó como tiempo inicial =0), luego los cultivos se incubaron a 37°C se procesaron para purificación de RNA, a las 5h y 8h de incubación, según protocolo de kit comercial GeneJET RNA Thermo Scientific Fermentas.

Completada la etapa de purificación, se realizó retrotranscripción y Real Time PCR tal como fue desarrollado en el apartado de Biofilm.

Los genes evaluados fueron: *spa*, *fnbpA*, *fnbpB*, *lsdD*, *hla*, *psmA1A2*, *lsdD*, *agrA*, *RNAIII*. Las secuencias de los mismos fueron detalladas en apartado descripto para extracción de RNA desde superficie inerte.

*Previamente al procesamiento para RNA se realizaron lecturas de DO en 3 puntos de tiempo

Lectura de DO en **T=0 tiempo inicial** en el momento de la suspensión DO (625nm)= 0,1 equivalente a 0,5 Mc Farland.

Lectura de DO en **T=5h** desde que se realiza la suspensión bacteriana (tiempo en el que se alcanza la **fase exponencial**)

Lectura de DO en **T=8h** desde que se realiza la suspensión bacteriana (tiempo en el que se alcanza la **fase estacionaria**).

1. Newsom, *Ogston's coccus*. Journal of Hospital Infection, Cambridge, UK., 2008. **70**(4): p. 369-72.
2. Missiakas and Schneewind, *Growth and laboratory maintenance of Staphylococcus aureus*. Current Protocols in Microbiology, wiley online library, 2013. **Unit 9C.1**: p. Unit 9C.1.
3. Ogston, A., *Micrococcus Poisoning*. Journal of anatomy and physiology, 1882. **17**: p. 24-58.
4. Cowan, Shaw, and Williams, *Type strain for Staphylococcus aureus Rosenbach*. Journal of general microbiology, 1954. **10**(1): p. 174-6.
5. Murray, R., Pfarrel, *Microbiología Médica*. Capítulos 20 y 21, ed. ^m edición. 2015.
6. Graham and Wilkinson, *Staphylococcus aureus osmoregulation: roles for choline, glycine betaine, proline, and taurine*. Journal of bacteriology, 1992. **174**(8): p. 2711-6.
7. Schwan and Wetzel, *Osmolyte transport in Staphylococcus aureus and the role in pathogenesis*. World J Clin Infect Dis, 2016. **6**: p. 22-27.
8. Lowy, F.D., *Staphylococcus aureus infections*. N Engl J Med, 1998. **339**(8): p. 520-32.
9. Dhanoa, A., et al., *Acute haematogenous community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus osteomyelitis in an adult: case report and review of literature*. BMC Infect Dis, 2012. **12**: p. 270.
10. Cresti, A., et al., *Epidemiological and mortality trends in infective endocarditis, a 17-year population-based prospective study*. Cardiovascular Diagnosis and Therapy, 2016. **7**(1): p. 27-35.
11. 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. 616-687.
12. Hanses, F., et al., *Staphylococcus aureus gene expression in a rat model of infective endocarditis*. Genome Med, 2014. **6**(10).
13. Chi, C.-Y., et al., *Panton-Valentine Leukocidin Facilitates the Escape of Staphylococcus aureus From Human Keratinocyte Endosomes and Induces Apoptosis*. The Journal of Infectious Diseases, 2014. **209**(2): p. 224-235.
14. Xiong, Y.Q., et al., *Endovascular infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus are linked to clonal complex-specific alterations in binding and invasion domains of fibronectin-binding protein A as well as the occurrence of fnbB*. Infect Immun, 2015. **83**(12): p. 4772-80.
15. Fitzgerald, J.a.H., MT, *Genomics of Natural Populations of Staphylococcus aureus*. Annual Review of Microbiology, 2016. **70**: p. 459-78.
16. Hiramatsu K, I.T., Tsubakishita S, Sasaki T, Takeuchi F, Morimoto Y, Katayama Y, Matsuo M, Kuwahara-Arai K, Hishinuma T, Baba T., *Genomic Basis for Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus*. Infect Chemother. , 2013. **45**(2): p. 117-36.
17. Balasubramanian, D., et al., *Staphylococcus aureus pathogenesis in diverse host environments*. Pathogens and Disease, 2017. **75**(1): p. ftx005-ftx005.
18. Harris, S.R., et al., *Evolution of MRSA During Hospital Transmission and Intercontinental Spread*. Science (New York, N.Y.), 2010. **327**(5964): p. 469-474.
19. Lin, J., et al., *Non-hospital environment contamination with Staphylococcus aureus and methicillin-resistant Staphylococcus aureus: proportion meta-analysis and features of antibiotic resistance and molecular genetics*. Environmental Research, 2016. **150**: p. 528-540.
20. Otto, M., *MRSA virulence and spread*. Cell Microbiol, 2012. **14**(10): p. 1513-21.
21. Uhlemann, A.-C., et al., *Evolution of community- and healthcare-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus()*. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, 2014. **21**: p. 563-574.
22. JA, L., *Staphylococcus aureus genomics and the impact of horizontal gene transfer*. Int J Med Microbiol., 2014. **304**(2): p. 103-9.

23. Bosi, E., et al., *Comparative genome-scale modelling of Staphylococcus aureus strains identifies strain-specific metabolic capabilities linked to pathogenicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(26): p. E3801-9.
24. Jamrozny, D.M., et al., *Pan-genomic perspective on the evolution of the Staphylococcus aureus USA300 epidemic*. Microb Genom, 2016. **2**(5): p. e000058.
25. Lindsay, J.A., *Genomic variation and evolution of Staphylococcus aureus*. International journal of medical microbiology, 2010. **300**: (2-3): p. 98-103.
26. Grumann D, N.U., Bröker BM., *Staphylococcus aureus toxins their functions and genetics*. Infect Genet Evol., 2014. **21**: p. 583-92.
27. Lindsay, J.A., et al., *Microarrays reveal that each of the ten dominant lineages of Staphylococcus aureus has a unique combination of surface-associated and regulatory genes*. J Bacteriol, 2006. **188**(2): p. 669-76.
28. F, M.N.a.D., *Mobile genetic elements of Staphylococcus aureus*. Cellular and molecular life sciences 2010. **67**(18): p. 3057-71.
29. Moon BY, P.J., Robinson DA, Thomas JC, Park YH, Thornton JA, Seo KS, *Mobilization of Genomic Islands of Staphylococcus aureus by Temperate Bacteriophage*. PLoS One, 2016. **11**(3).
30. Lindsay JA, H.M., *Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of Staphylococcus aureus*. Funct Integr Genomics. , 2006. **6**(3): p. 186-201.
31. Rowland SJ, D.K., *Characterization of the staphylococcal beta-lactamase transposon Tn552*. EMBO J., 1989. **8**(9): p. 2761-73.
32. Chambers HF, D.F., *Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era*. Nat Rev Microbiol., 2009. **7**(9): p. 629-41.
33. Soge OO, B.N., White TM, No DB, Roberts MC., *A novel transposon, Tn6009, composed of a Tn916 element linked with a Staphylococcus aureus mer operon*. J Antimicrob Chemother., 2008. **62**(4): p. 674-80.
34. Rouch D, M.L., Loo L, Jackson C, Skurray R., *Trimethoprim resistance transposon Tn4003 from Staphylococcus aureus encodes genes for a dihydrofolate reductase and thymidylate synthetase flanked by three copies of IS257*. Mol Microbiol., 1989. **3**(2): p. 161-75.
35. Byrne ME, R.D., Skurray RA., *Nucleotide sequence analysis of IS256 from the Staphylococcus aureus gentamicin-tobramycin-kanamycin-resistance transposon Tn4001*. Gene. , 1989. **81**(2): p. 361-7.
36. Weigel LM, C.D., Gill SR, Clark NC, McDougal LK, Flannagan SE, Kolonay JF, Shetty J, Killgore GE, Tenover FC., *Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of Staphylococcus aureus*. Science. , 2003. **302**(5650).
37. Kobayashi, S.D., J.M. Musser, and F.R. DeLeo, *Genomic Analysis of the Emergence of Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus*. mBio, 2012. **3**(4): p. e00170-12.
38. Weigel, L.M., et al., *High-Level Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus Isolates Associated with a Polymicrobial Biofilm*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007. **51**(1): p. 231-238.
39. Wang L, X.H., Li L, Zhao X., *Characterization of Insertion Sequence ISSau2 in the Human and Livestock-Associated Staphylococcus aureus*. PLoS One., 2015. **10**(5).
40. Hiramatsu, K., et al., *The emergence and evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol, 2001. **9**(10): p. 486-93.
41. Siguier, P., E. Gournayre, and M. Chandler, *Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity*. FEMS Microbiology Reviews, 2014. **38**(5): p. 865-891.
42. Archer GL, C.J., Johnston JL., *Plasmid-encoded trimethoprim resistance in staphylococci*. Antimicrob Agents Chemother. , 1986. **29**(5): p. 733-40.
43. Thomas WD Jr, A.G., *Mobility of gentamicin resistance genes from staphylococci isolated in the United States: identification of Tn4031, a gentamicin resistance transposon from Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob Agents Chemother., 1989. **33**(8): p. 1335-41.
44. Kuntová L, P.R., Rájová J, Růžicková V, Petráš P, Mašlaňová I, Doškař J., *Characteristics and distribution of plasmids in a clonally diverse set of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains*. Arch Microbiol. , 2012. **194**(7): p.607-14.

45. Lozano C, G.-M.L., Aspiroz C, Zarazaga M, Torres C, Aarestrup FM., *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.
46. van Wamel WJ, R.S., Ruyken M, van Kessel KP, van Strijp JA., *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.
47. Karasartova, D., et al., *Identification of virulence genes carried by bacteriophages obtained from clinically isolated methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 2016. **63(4)**: p. 433-447.
48. McCarthy, A.J., A.A. Witney, and J.A. Lindsay, *Staphylococcus aureus Temperate Bacteriophage: Carriage and Horizontal Gene Transfer is Lineage Associated*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2012. **2**: p. 6.
49. Christie GE, M.A., King DG, Lane KD, Olivarez NP, Tallent SM, Gill SR, Novick RP., *The complete genomes of Staphylococcus aureus bacteriophages 80 and 80α--implications for the specificity of SaPI mobilization*. Virology., 2010. **407(2)**: p. 381-90.
50. Chen J, R.G., Penadés JR, Brown S, Novick RP., *Pathogenicity island-directed transfer of unlinked chromosomal virulence genes*. Mol Cell. , 2014. **57(1)**: p. 138-49.
51. Moon, B.Y., et al., *Phage-mediated horizontal transfer of a Staphylococcus aureus virulence-associated genomic island*. Scientific Reports, 2015. **5**: p. 9784.
52. Ram G, C.J., Ross HF, Novick RP., *Precisely modulated pathogenicity island interference with late phage gene transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A., 2014. **111(40)**: p. 14536-41.
53. Quiles-Puchalt N, C.N., Alonso JC, Novick RP, Marina A, Penadés JR., *Staphylococcal pathogenicity island DNA packaging system involving cos-site packaging and phage-encoded HNH endonucleases*. Proc Natl Acad Sci U S A. , 2013. **111(16)**: p. 6016-21.
54. Carpena N, M.K., Dokland T, Marina A, Penadés JR., *Convergent evolution of pathogenicity islands in helper cos phage interference*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci., 2016. **371(1707)**.
55. 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.
56. Peschel A, O.M., *Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection*. Nat Rev Microbiol. , 2013. **11(10)**: p. 667-73.
57. Chlebowicz, M.A., et al., *The Staphylococcal Cassette Chromosome mec type V from Staphylococcus aureus ST398 is packaged into bacteriophage capsids*. International Journal of Medical Microbiology, 2014. **304(5-6)**: p. 764-774.
58. *Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53(12)**: p. 4961-7.
59. Shore, A.C. and D.C. Coleman, *Staphylococcal cassette chromosome mec: recent advances and new insights*. Int J Med Microbiol, 2013. **303(6-7)**: p. 350-9.
60. Paterson, G.K., E.M. Harrison, and M.A. Holmes, *The emergence of mecC methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Trends in Microbiology, 2014. **22(1)**: p. 42-47.
61. Monecke S, J.L., Müller E, Nitschke H, Pfohl K, Slickers P, Reissig A, Ruppelt-Lorz A, Ehricht R, *Diversity of SCCmec Elements in Staphylococcus aureus as Observed in South-Eastern Germany*. PLoS One., 2016. **11(9)**.
62. 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.
63. Okuma, K., et al., *Dissemination of New Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Clones in the Community*. Journal of Clinical Microbiology, 2002. **40(11)**: p. 4289-4294.
64. Milheirico, C., D.C. Oliveira, and H. de Lencastre, *Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome mec type IV in methicillin-resistant Staphylococcus aureus: 'SCCmec IV multiplex'*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007. **60(1)**: p. 42-48.
65. Septimus EJ, S.M., *Decolonization in Prevention of Health Care-Associated Infections*. Clin Microbiol Rev. , 2016. **29(2)**: p. 201-22.

66. Vandenberg MF, V.H., *Carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology and clinical relevance*. J Lab Clin Med., 1999. **133(6)**: p. 525-34.
67. Lucet, J.-C. and B. Regnier, *Screening and Decolonization: Does Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus Hold Lessons for Methicillin-Resistant S. aureus?* Clinical Infectious Diseases, 2010. **51(5)**: p. 585-590.
68. Tong SY, C.L., Fowler VG Jr., *Colonization, pathogenicity, host susceptibility, and therapeutics for Staphylococcus aureus: what is the clinical relevance?* Semin Immunopathol., 2012. **34(2)**: p. 185-200.
69. van Belkum, A., et al., *Reclassification of Staphylococcus aureus Nasal Carriage Types*. The Journal of Infectious Diseases, 2009. **199(12)**: p. 1820-1826.
70. Mody , M.S., Galecki A, Kauffman CA, Bradley SF., *Indwelling device use and antibiotic resistance in nursing homes: identifying a high-risk group*. J Am Geriatr Soc., 2007. **55(12)**: p. 1921-6.
71. Brown AF, L.J., Rogers TR, McLoughlin RM., *Staphylococcus aureus Colonization: Modulation of Host Immune Response and Impact on Human Vaccine Design*. Front Immunol., 2014. **4:507**.
72. Boyce J M, I.C.H.E., *Environmental contamination due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus: possible infection control implications*. Infect Control Hosp Epidemiol., 1997. **18(9)**: p. 622-7.
73. Devine J, C.R., Wright EP., *Is methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) contamination of ward-based computer terminals a surrogate marker for nosocomial MRSA transmission and handwashing compliance?* J Hosp Infect., 2001. **48(1)**: p. 72-5.
74. Ulger F, E.S., Dilek A, Yanik K, Gunaydin M, Leblebicioglu H., *Are we aware how contaminated our mobile phones with nosocomial pathogens?* Ann Clin Microbiol Antimicrob. , 2009. **8:7**.
75. Neely AN, M.M., *Survival of enterococci and staphylococci on hospital fabrics and plastic*. J Clin Microbiol., 2000. **38(2)**: p. 724-6.
76. Dietze B, R.A., Wendt C, Martiny H., *Survival of MRSA on sterile goods packaging*. J Hosp Infect. , 2001. **49(4)**: p. 255-61.
77. Davis MF, I.S., Baron P, Vasse A, Silbergeld EK, Lautenbach E, Morris DO., *Household transmission of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and other staphylococci*. Lancet Infect Dis. , 2012. **12(9)**: p. 703-16.
78. Kong C, N.H., Nathan S., *Targeting Staphylococcus aureus Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy*. Toxins (Basel). 2016. **8(3)**.
79. Jusko M, P.J., Kantyka T, Bielecka E, Miller HK, Kalinska M, Dubin G, Garred P, Shaw LN, Blom AM., *Staphylococcal proteases aid in evasion of the human complement system*. J Innate Immun., 2014. **6(1)**: p. 31-46.
80. Kerro Deogo O, v.D.J., Nederbragt H., *Factors involved in the early pathogenesis of bovine Staphylococcus aureus mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review*. The Veterinary quarterly, 2002. **4**: p. 181-98.
81. Salimena AP, L.C., Camussone C, Signorini M, Calvino LF, Brito MA, Borges CA, Guimarães AS, Ribeiro JB, Mendonça LC, Piccoli RH, *Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharide and biofilm formation in Staphylococcus aureus isolated from bovine milk collected from Brazilian dairy farms*. Vet Res Commun. , 2016. **40(3-4)**: p. 97-106.
82. Zecconi A, S.F., *Staphylococcus aureus virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases*. Immunology letters, 2013. **150(1-2)**: p. 12-22.
83. Luong TT, L.C., *The arl locus positively regulates Staphylococcus aureus type 5 capsule via an mgrA-dependent pathway*. Microbiology. , 2006. **152(Pt 10)**: p. 3123-31.
84. O'Riordan K, L.J., *Staphylococcus aureus capsular polysaccharides*. Clinical microbiology reviews, 2004. **17**: p. 218-34.
85. Nilsson IM, L.J., Bremell T, Rydén C, Tarkowski A., *The role of staphylococcal polysaccharide microcapsule expression in septicemia and septic arthritis*. Infect Immun. , 1997. **65(10)**: p. 4216-21.
86. Hanses F, R.C., Dunman PM, Salzberger B, Lee JC., *Staphylococcus aureus gene expression in a rat model of infective endocarditis*. Genome Med. , 2014. **6(10)**.

87. Cunnion KM, L.J., Frank MM., *Capsule production and growth phase influence binding of complement to Staphylococcus aureus*. Infect Immun., 2001. **69(11)**: p. 6796-803.
88. Camussone CM, C.L., *Virulence factors of Staphylococcus aureus associated with intramammary infections in cows: relevance and role as immunogens*. Rev Argent Microbiol., 2013. **45(2)**: p. 119-30.
89. Hobbey L, H.C., MacPhee CE, Stanley-Wall NR., *Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes*. FEMS Microbiol Rev. , 2015. **39(5)**: p. 649-69.
90. O'Neill E, P.C., Houston P, Smyth D, Humphreys H, Robinson DA, O'Gara JP., *Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in Staphylococcus aureus isolates from device-related infections*. J Clin Microbiol. , 2007. **45(5)**: p. 1379-88.
91. Merino, N., et al., *Protein A-mediated multicellular behavior in Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 2009. **191(3)**: p. 832-43.
92. Speziale P, P.G., Foster TJ, Geoghegan JA, *Protein-based biofilm matrices in Staphylococci*. Front Cell Infect Microbiol, 2014 **4**: p. 171.
93. O'Neill, E., et al., *A Novel Staphylococcus aureus Biofilm Phenotype Mediated by the Fibronectin-Binding Proteins, FnBPA and FnBPB*. Journal of Bacteriology, 2008. **190(11)**: p. 3835-3850.
94. McCarthy, H., et al., *Methicillin resistance and the biofilm phenotype in Staphylococcus aureus*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2015. **5**: p. 1.
95. Watkins RR, D.M., Salata RA., *Current concepts on the virulence mechanisms of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Journal of medical microbiology, 2012. **61**: p. 1179-93.
96. Otto, M., *Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity*. Annu Rev Med, 2012. **64**: p. 175-88.
97. Jemima Beulin, D.S. and K. Ponnuraj, *Steered molecular dynamics study reveals insights into the function of the repetitive B region of collagen- and fibrinogen-binding MSCRAMMs*. J Biomol Struct Dyn. **35(3)**: p. 535-550.
98. Valotteau, C., et al., *Single-Cell and Single-Molecule Analysis Unravels the Multifunctionality of the Staphylococcus aureus Collagen-Binding Protein Cna*. ACS Nano, 2017. **11(2)**: p. 2160-2170.
99. 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.
100. Miajlovic, H., et al., *Both complement- and fibrinogen-dependent mechanisms contribute to platelet aggregation mediated by Staphylococcus aureus clumping factor B*. Infect Immun, 2007. **75(7)**: p. 3335-43.
101. Vernachio, J., et al., *Anti-clumping factor A immunoglobulin reduces the duration of methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteremia in an experimental model of infective endocarditis*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47(11)**: p. 3400-6.
102. Josefsson, E., et al., *Protection against experimental Staphylococcus aureus arthritis by vaccination with clumping factor A, a novel virulence determinant*. J Infect Dis, 2001. **184(12)**: p. 1572-80.
103. Haim, M., et al., *Cytokeratin 8 interacts with clumping factor B: a new possible virulence factor target*. Microbiology. **156(Pt 12)**: p. 3710-21.
104. Sheldon, J.R. and D.E. Heinrichs, *Recent developments in understanding the iron acquisition strategies of gram positive pathogens*. FEMS Microbiol Rev, 2015. **39(4)**: p. 592-630.
105. Grigg, J.C., et al., *Structural biology of heme binding in the Staphylococcus aureus Isd system*. J Inorg Biochem, 2010. **104(3)**: p. 341-8.
106. Foster TJ, G.J., Ganesh VK, Höök M., *Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus*. Nat Rev Microbiol., 2014. **12(1)**: p. 49-62.
107. Kim, H.K., et al., *Recurrent infections and immune evasion strategies of Staphylococcus aureus*. Curr Opin Microbiol, 2010. **15(1)**: p. 92-9.
108. Pauli, N.T., et al., *Staphylococcus aureus infection induces protein A-mediated immune evasion in humans*. The Journal of Experimental Medicine, 2014. **211(12)**: p. 2331-2339.

109. Otto, M., *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr Opin Microbiol*, 2014. **17**: p. 32-7.
110. Bukowski, M., B. Wladyka, and G. Dubin, *Exfoliative toxins of Staphylococcus aureus*. *Toxins (Basel)*. **2**(5): p. 1148-65.
111. Powers, M.E., et al., *Synergistic Action of Staphylococcus aureus alpha-Toxin on Platelets and Myeloid Lineage Cells Contributes to Lethal Sepsis*. *Cell Host Microbe*, 2015. **17**(6): p. 775-87.
112. Arya, R. and S.A. Princy, *Exploration of Modulated Genetic Circuits Governing Virulence Determinants in Staphylococcus aureus*. *Indian J Microbiol*, 2015. **56**(1): p. 19-27.
113. Tamber, S., et al., *The Staphylococcus-Specific Gene rsr Represses agr and Virulence in Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, 2010. **78**(10): p. 4384-4391.
114. Ono, H.K., et al., *The emetic activity of staphylococcal enterotoxins, SEK, SEL, SEM, SEN and SEO in a small emetic animal model, the house musk shrew*. *Microbiol Immunol*, 2017. **61**(1): p. 12-16.
115. Lin, C.F., et al., *Different types of cell death induced by enterotoxins*. *Toxins (Basel)*, 2010. **2**(8): p. 2158-76.
116. Sorensen, M., et al., *Staphylococcus aureus enterotoxin-sensitization is associated with allergic poly-sensitization and allergic multimorbidity in adolescents*. *Allergy*, 2017.
117. Diep, B.A., et al., *The arginine catabolic mobile element and staphylococcal chromosomal cassette mec linkage: convergence of virulence and resistance in the USA300 clone of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*, 2008. **197**(11): p. 1523-30.
118. Otto, M., *Community-associated MRSA: what makes them special?* *International journal of medical microbiology : IJMM*, 2013. **303**(0): p. 324-330.
119. Planet, P.J., *Life After USA300: The Rise and Fall of a Superbug*. *The Journal of Infectious Diseases*, 2017. **215**(suppl_1): p. S71-S77.
120. Montgomery, C.P., S. Boyle-Vavra, and R.S. Daum, *The arginine catabolic mobile element is not associated with enhanced virulence in experimental invasive disease caused by the community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus USA300 genetic background*. *Infect Immun*, 2009. **77**(7): p. 2650-6.
121. Planet, P.J., et al., *Emergence of the epidemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain USA300 coincides with horizontal transfer of the arginine catabolic mobile element and speG-mediated adaptations for survival on skin*. *MBio*, 2013. **4**(6): p. e00889-13.
122. 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.
123. Le, K.Y., et al., *Molecular determinants of staphylococcal biofilm dispersal and structuring*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2014. **4**: p. 167.
124. Periasamy, S., et al., *Phenol-soluble modulins in staphylococci: What are they originally for?* *Commun Integr Biol*, 2012. **5**(3): p. 275-7.
125. Wang, B. and T.W. Muir, *Regulation of Virulence in Staphylococcus aureus: Molecular Mechanisms and Remaining Puzzles*. *Cell Chem Biol*, 2016. **23**(2): p. 214-24.
126. Le, K.Y. and M. Otto, *Quorum-sensing regulation in staphylococci—an overview*. *Frontiers in Microbiology*, 2015. **6**: p. 1174.
127. Robinson, D.A., et al., *Evolutionary genetics of the accessory gene regulator (agr) locus in Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 2005. **187**(24): p. 8312-21.
128. Jarraud, S., et al., *Relationships between Staphylococcus aureus genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease*. *Infect Immun*, 2002. **70**(2): p. 631-41.
129. Xie, Y., et al., *Genotypes and toxin gene profiles of Staphylococcus aureus clinical isolates from China*. *PLoS One*, 2011. **6**(12): p. e28276.
130. Infectología, S.C.d., *Epidemiología y vigilancia de Staphylococcus aureus resistente a meticilina en América Latina*. *Revista chilena de Infectología* 2009. **27**.
131. 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*. *Microbial Drug Resistance*, 2016. **22**(1): p. 88-96.
132. Votintseva, A.A., et al., *Prevalence of Staphylococcus aureus protein A (spa) mutants in the community and hospitals in Oxfordshire*. *BMC Microbiology*, 2014. **14**: p. 63-63.

133. 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.
134. Li, M., et al., *MRSA epidemic linked to a quickly spreading colonization and virulence determinant*. Nat Med, 2012. **18**(5): p. 816-9.
135. DeLeo, F.R., et al., *Molecular differentiation of historic phage-type 80/81 and contemporary epidemic Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(44): p. 18091-6.
136. Rincon, S., et al., *[Resistance to "last resort" antibiotics in Gram-positive cocci: The post-vancomycin era]*. Biomedica, 2014. **34 Suppl 1**: p. 191-208.
137. Jevons, M.P., A.W. Coe, and M.T. Parker, *Methicillin resistance in staphylococci*. Lancet, 1963. **1**(7287): p. 904-7.
138. Klevens, R., et al., *Invasive methicillin-resistant staphylococcus aureus infections in the united states*. JAMA, 2007. **298**(15): p. 1763-1771.
139. Stijn Blot, R.N., M.A., et al., *Staphylococcus aureus Infections*. New England Journal of Medicine, 1998. **339**(27): p. 2025-2027.
140. de Sousa, M.A., et al., *Comparison of Genetic Backgrounds of Methicillin-Resistant and -Susceptible Staphylococcus aureus Isolates from Portuguese Hospitals and the Community*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(10): p. 5150-7.
141. Molton, J.S., et al., *The Global Spread of Healthcare-Associated Multidrug-Resistant Bacteria: A Perspective From Asia*. Clinical Infectious Diseases, 2013. **56**(9): p. 1310-1318.
142. Rodríguez-Noriega, E. and C. Seas, *The changing pattern of methicillin-resistant staphylococcus aureus clones in Latin America: implications for clinical practice in the region*. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2010. **14**: p. 87-96.
143. Medina, G., Egea, A.L., Otth, C. et al. , *Molecular epidemiology of hospital-onset methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in Southern Chile*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2013. **32**(12): p. 1533–1540.
144. 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.
145. Sola, C., et al., *Identification of a Novel Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Epidemic Clone in Córdoba, Argentina, Involved in Nosocomial Infections*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(4): p. 1427-35.
146. Becker, A.P., et al., *First report of methicillin-resistant Staphylococcus aureus Cordobes/Chilean clone involved in nosocomial infections in Brazil*. Epidemiology and Infection, 2011. **140**(8): p. 1372-1375.
147. Ocampo, A.M., et al., *Cambios a lo largo del tiempo en la distribución de los complejos de clones dominantes de Staphylococcus aureus resistente a la meticilina en Medellín, Colombia*. Biomédica, 2014. **34**: p. 34-40.
148. Otto, M., *Basis of Virulence in Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. Annual Review of Microbiology, 2010. **64**(1): p. 143-162.
149. Ribeiro, A., et al., *First Report of Infection with Community-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in South America*. Journal of Clinical Microbiology, 2005. **43**(4): p. 1985-1988.
150. 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.
151. Rodríguez-Noriega, E., et al., *Evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones in Latin America*. International Journal of Infectious Diseases. **14**(7): p. e560-e566.
152. Sola, C., et al., *Emergence and dissemination of a community-associated methicillin-resistant Panton-Valentine leucocidin-positive Staphylococcus aureus clone sharing the sequence type 5 lineage with the most prevalent nosocomial clone in the same region of Argentina*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(5): p. 1826-31.
153. 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.

154. Otter, J.A. and G.L. French, *Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains as a cause of healthcare-associated infection*. Journal of Hospital Infection. **79**(3): p. 189-193.
155. Jiménez, J.N., et al., *CC8 MRSA Strains Harboring SCCmec Type IVc are Predominant in Colombian Hospitals*. PLoS ONE, 2012. **7**(6): p. e38576.
156. Lee, B.Y., et al., *The Importance of Nursing Homes in the Spread of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Among Hospitals*. Medical care, 2013. **51**(3): p. 205-215.
157. Hetem, D.J., et al., *Nosocomial transmission of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Danish Hospitals*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012. **67**(7): p. 1775-1780.
158. Nimmo, G.R., *USA300 abroad: global spread of a virulent strain of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology and Infection, 2012. **18**(8): p. 725-734.
159. Mensa J, S.A., Llinares , Barberán J, Montejo M, Salavert M, Alvarez-Rocha L, Maseda E, Moreno A, Pasquau J, Gómez J, Parra J, Candel J, Azanza JR, García JE, Marco F, Soy D, Grau S, Arias J, Fortún J, de Alarcón CA, Picazo J; Sociedad Española de Quimioterapia (SEQ); Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI); GTIPO-Sociedad Española de Anestesiología y Reanimación., *Guidelines for antimicrobial treatment of the infection by Staphylococcus aureus*. Rev Esp Quimioter, 2013. **Suppl 1**: p. 1-84.
160. Acebrón, I., et al., *The Allosteric Site for the Nascent Cell Wall in Penicillin-Binding Protein 2a: an Achilles' Heel of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. Current medicinal chemistry, 2015. **22**(14): p. 1678-1686.
161. Paterson GK, H.E., Holmes MA., *The emergence of mecC methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol., 2014 **22**(1): p. 42-7.
162. (CDC), C.f.D.C.a.P., *Vancomycin-resistant staphylococcus aureus—pennsylvania, 2002*. JAMA, 2002. **288**(17): p. 2116-2116.
163. Rossi , F., et al., *Transferable Vancomycin Resistance in a Community-Associated MRSA Lineage*. New England Journal of Medicine, 2014. **370**(16): p. 1524-1531.
164. Panesso, D., et al., *Methicillin-Susceptible, Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus, Brazil*. Emerging Infectious Diseases, 2015. **21**(10): p. 1844-1848.
165. Moise-Broder, P.A., et al., *Accessory Gene Regulator Group II Polymorphism in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Is Predictive of Failure of Vancomycin Therapy*. Clinical Infectious Diseases, 2004. **38**(12): p. 1700-1705.
166. Stevens, D.L., et al., *Impact of Antibiotics on Expression of Virulence-Associated Exotoxin Genes in Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. The Journal of Infectious Diseases, 2007. **195**(2): p. 202-211.
167. Arias, C.A., et al., *Clinical and Microbiological Aspects of Linezolid Resistance Mediated by the *cfr* Gene Encoding a 23S rRNA Methyltransferase*. Journal of Clinical Microbiology, 2008. **46**(3): p. 892-896.
168. Stein, G.E. and T. Babinchak, *Tigecycline: an update*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. **75**(4): p. 331-336.
169. Cui, L., et al., *Correlation between Reduced Daptomycin Susceptibility and Vancomycin Resistance in Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006. **50**(3): p. 1079-1082.
170. Vergara-Irigaray, M., et al., *Relevant Role of Fibronectin-Binding Proteins in Staphylococcus aureus Biofilm-Associated Foreign-Body Infections*. Infection and Immunity, 2009. **77**(9): p. 3978-3991.
171. Sola, C., et al., *High frequency of Panton-Valentine leukocidin genes in invasive methicillin-susceptible Staphylococcus aureus strains and the relationship with methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Cordoba, Argentina*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2007. **26**(4): p. 281-6.
172. Spoor, L.E., et al., *Livestock Origin for a Human Pandemic Clone of Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. mBio, 2013. **4**(4): p. e00356-13.
173. Chuang, Y.-Y. and Y.-C. Huang, *Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Asia*. The Lancet Infectious Diseases. **13**(8): p. 698-708.

174. Hopley, L., et al., *Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes*. FEMS Microbiology Reviews, 2015. **39**(5): p. 649-669.
175. Côrtes, M.F., et al., *The influence of different factors including fnbA and mecA expression on biofilm formed by MRSA clinical isolates with different genetic backgrounds*. International Journal of Medical Microbiology, 2015. **305**(1): p. 140-147.
176. Naicker, P.R., et al., *Biofilm formation in invasive Staphylococcus aureus isolates is associated with the clonal lineage*. Microbial Pathogenesis, 2016. **90**: p. 41-49.
177. Foster, T.J., *The remarkably multifunctional fibronectin binding proteins of Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016. **35**(12): p. 1923-1931.
178. Vergara-Irigaray, M., et al., *Relevant role of fibronectin-binding proteins in Staphylococcus aureus biofilm-associated foreign-body infections*. Infect Immun, 2009. **77**(9): p. 3978-91.
179. Ray, G.T., J.A. Suaya, and R. Baxter, *Trends and Characteristics of Culture-Confirmed Staphylococcus aureus Infections in a Large U.S. Integrated Health Care Organization*. Journal of Clinical Microbiology, 2012. **50**(6): p. 1950-1957.
180. Klein, E.Y., et al., *The Changing Epidemiology of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in the United States: A National Observational Study*. American Journal of Epidemiology, 2013. **177**(7): p. 666-674.
181. Benoit, S.R., et al., *Community Strains of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus as Potential Cause of Healthcare-associated Infections, Uruguay, 2002–2004*. Emerging Infectious Diseases, 2008. **14**(8): p. 1216-1223.
182. Alvarez, C.A., et al., *Nosocomial infections caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombia*. American Journal of Infection Control. **38**(4): p. 315-318.
183. Caboclo, R.M.F., et al., *Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Rio de Janeiro hospitals: Dissemination of the USA400/ST1 and USA800/ST5 SCC_{mec} type IV and USA100/ST5 SCC_{mec} type II lineages in a public institution and polyclonal presence in a private one*. American Journal of Infection Control. **41**(3): p. e21-e26.
184. Kouyos, R., E. Klein, and B. Grenfell, *Hospital-Community Interactions Foster Coexistence between Methicillin-Resistant Strains of Staphylococcus aureus*. PLOS Pathogens, 2013. **9**(2): p. e1003134.
185. Karve, S., et al., *Ceftaroline fosamil treatment outcomes compared with standard of care among hospitalized patients with complicated skin and soft tissue infections*. Journal of Comparative Effectiveness Research, 2016. **5**(4): p. 393-405.
186. Friedland, H.D., et al., *CANVAS 1 and 2: Analysis of Clinical Response at Day 3 in Two Phase 3 Trials of Ceftaroline Fosamil versus Vancomycin plus Aztreonam in Treatment of Acute Bacterial Skin and Skin Structure Infections*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012. **56**(5): p. 2231-2236.
187. Argudin, M.A., et al., *In vitro activity of ceftaroline against clinical Staphylococcus aureus isolates collected during a national survey conducted in Belgian hospitals*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2017. **72**(1): p. 56-59.
188. Zhang, H., et al., *A multicentre study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in acute bacterial skin and skin-structure infections in China: Susceptibility to ceftaroline and molecular epidemiology*. International Journal of Antimicrobial Agents. **45**(4): p. 347-350.
189. Sanchez, E.H., et al., *In vivo emergence of ceftaroline resistance during therapy for MRSA vertebral osteomyelitis*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2016. **71**(6): p. 1736-1738.
190. 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 Medicine, 2016. **13**(1): p. e1001944.
191. Popoola, V.O., et al., *Impact of Colonization Pressure and Strain Type on Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Transmission in Children*. Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America, 2013. **57**(10): p. 1458-1460.

192. Iwamoto, M., et al., *Trends in Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections*. *Pediatrics*, 2013. **132**(4): p. e817-e824.
193. Errecalde, L., Ceriana, Paola, Galletti, Paula, Erbin, Mariana, Duarte, Andrea, Rolón, María J, Cuatz, Daniel, Corso, Alejandra, & Kaufman, Sara., *Primer aislamiento en Argentina de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina adquirido en la comunidad con sensibilidad intermedia a la vancomicina y no sensibilidad a la daptomicina*. *Revista argentina de microbiología*, 2013. **45**(2): p. 99-103
194. Liu, C., et al., *Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Adults and Children*. *Clinical Infectious Diseases*, 2011. **52**(3): p. e18-e55.
195. Purrello, S.M., et al., *Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of the currently available treatment options*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2016. **7**: p. 178-186.
196. Blomfeldt, A., et al., *Correction for Blomfeldt et al., Molecular Characterization of Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Isolates from Bacteremic Patients in a Norwegian University Hospital*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2016. **54**(9): p. 2404-2404.
197. Nichol KA, A.H., Roscoe DL, Golding GR, Lagace-Wiens PRS, Hoban DJ, Zhanel GG, *Changing Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* in Canada*. *J. Antimicrob. Chemother*, 2013. **1** (68): p. 47-55.
198. 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.
199. Scribel, L.V., et al., *Clinical and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmecIV in a university hospital in Porto Alegre, Brazil*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 2009. **65**(4): p. 457-461.
200. Fernandez, S., et al., *Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST30-SCCmec IVc clone as the major cause of community-acquired invasive infections in Argentina*. *Infection, Genetics and Evolution*, 2013. **14**: p. 401-405.
201. Egea AL , G.L., Moyano A , Bocco JL , Sola C, *Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* belonging to cc121 responsible for invasive infections* *B I O C E L L*, 2011. **35**: p. 111.
202. Hamed Ghasemzadeh-Moghaddama, E.G.-R., Zamberi Sekawia, Liew Yun-Khoona, Mohammad Nazri Azizc, Rukman Awang Hamata, Damian C. Mellestd, Alex van Belkumd, Mariana Nor Shamsudina, b, Vasanthakumari Neela *Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from clinical and community sources are genetically diverse*. *International Journal of Medical Microbiology*, 2010. **301** (p. 347–353).
203. Rolo, J., et al., *High Genetic Diversity among Community-Associated *Staphylococcus aureus* in Europe: Results from a Multicenter Study*. *PLOS ONE*, 2012. **7**(4): p. e34768.
204. Von Dach, E., et al., *Comparative Genomics of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Shows the Emergence of Clone ST8-USA300 in Geneva, Switzerland*. *J Infect Dis*, 2017. **213**(9): p. 1370-9.
205. Zarpellon, M.N., et al., *Survival of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* on hospital surfaces*. *Journal of Hospital Infection*, 2015. **90**(4): p. 347-350.
206. Huang, R., et al., *Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Survival on Hospital Fomites*. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 2016. **27**(11): p. 1267-1269.
207. Caiazza, N.C. and G.A. O'Toole, *Alpha-toxin is required for biofilm formation by *Staphylococcus aureus**. *J Bacteriol*, 2003. **185**(10): p. 3214-7.
208. Xiao, M., et al., *Genotypic Diversity of *Staphylococcus aureus* α -Hemolysin Gene (*hla*) and Its Association with Clonal Background: Implications for Vaccine Development*. *PLOS ONE*, 2016. **11**(2): p. e0149112.
209. Oogai, Y., et al., *Expression of Virulence Factors by *Staphylococcus aureus* Grown in Serum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011. **77**(22): p. 8097-8105.

210. Schulte, B., et al., *Diversification of Clonal Complex 5 Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strains (Rhine-Hesse Clone) within Germany*. Journal of Clinical Microbiology, 2013. **51**(1): p. 212-216.
211. Anderson, M.J., et al., *Alpha-toxin promotes Staphylococcus aureus mucosal biofilm formation*. Front Cell Infect Microbiol. **2**: p. 64.
212. McCourt, J., et al., *Fibronectin-binding proteins are required for biofilm formation by community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain LAC*. FEMS microbiology letters, 2014. **353**(2): p. 157-164.
213. Coelho, L.R., et al., *agr RNAlII divergently regulates glucose-induced biofilm formation in clinical isolates of Staphylococcus aureus*. Microbiology, 2008. **154**(11): p. 3480-3490.
214. 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*. International Journal of Medical Microbiology, 2014. **304**(8): p. 1086-1099.
215. 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.
216. Kurt, K., et al., *Subpopulations of Staphylococcus aureus Clonal Complex 121 Are Associated with Distinct Clinical Entities*. PLoS ONE, 2013. **8**(3): p. e58155.
217. 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.
218. Geha, D.J., et al., *Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory*. Journal of Clinical Microbiology, 1994. **32**(7): p. 1768-1772.
219. Shopsin, B., et al., *Evaluation of Protein A Gene Polymorphic Region DNA Sequencing for Typing of Staphylococcus aureus Strains*. Journal of Clinical Microbiology, 1999. **37**(11): p. 3556-3563.
220. Gelosia, A., et al., *Phenotypic and genotypic markers of Staphylococcus epidermidis virulence*. Clinical Microbiology and Infection. **7**(4): p. 193-199.