

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO
ACADÉMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Actividad bacteriostática y bactericida de antibióticos
betalactámicos y glucopéptidos frente a cepas de
Staphylococcus aureus de importancia clínica.
Caracterización genotípica de aislamientos tolerantes**

DOCTORANDO: EMILCE DE LOS ANGELES MÉNDEZ

DIRECTOR DE TESIS: DRA. EMMA G. SUTICH

CO-DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARÍA CRISTINA LURÁ

LUGAR DE REALIZACIÓN: BACTERIOLOGÍA CLÍNICA FBCB (UNL)

-2012-

A Nico

*por una vieja promesa, y porque me ha hecho
revivir los inocentes años de la niñez*

*A mis familiares, amigos, integrantes de la Sección
Microbiología - Hospital J.M.Cullen y docentes de la
Cátedra de Bacteriología - FBCB (UNL), porque todos y
cada uno de ellos, aportaron para la concreción de esta
tesis.*

- *A mi Directora, Dra. Emma Sutich*, por haberme brindado empuje y aliento constantes que mantuvieron mis fuerzas para seguir adelante
- *A mi Co-Directora, Dra. María Cristina Lurá*, porque estuvo siempre presente con sus sugerencias, acertados consejos y valiosos aportes
- *A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral*; a sus autoridades, por el soporte institucional y permitirme disponer de su infraestructura
- *A Adriana Ortolani, Secretaria de Ciencia y Técnica, a la Comisión de Doctorado y al equipo de Posgrado* quienes me brindaron en todo momento el apoyo administrativo para el logro de esta tesis
- *A los Dres. Marcelo Galas, Alejandra Corso* y a los integrantes del Servicio Antimicrobianos del INEI-ANLIS Dr. Carlos Malbrán, especialmente a **Paola Cerana** por las enseñanzas prácticas brindadas en las curvas de cinética de muerte
- *Al Dr. Gabriel Gutkind y a su equipo* de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Buenos Aires quienes me abrieron desinteresadamente sus puertas y especialmente a **Noella Gardella** y a **Arabela Cuirolo** quienes me tuvieron paciencia para enseñarme las tediosas técnicas de biología molecular
- *A la Dra. Adriana Limansky* del Instituto de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Rosario por permitirme concurrir a ese centro, por cederme desinteresadamente la enzima VIM-2 y en especial, a la **Dra. Patricia Marchiaro** quien estuvo a mi lado en el estudio genotípico de los aislamientos tolerantes a vancomicina

- *A la Esp. Alicia Nagel* por su constante compañía en el campo de la microbiología y por su ayuda en la redacción de comunicaciones y publicaciones
- *A la Esp. Analía Mollerach* por su colaboración en el intercambio de opiniones sobre antimicrobianos, en el diseño de posters y presentaciones en revistas
- *A la Esp. María Alejandra Mendosa* por recolectarme diariamente los aislamientos de *S. aureus* y por su cooperación en la técnica de goteo de discos
- *A la Esp. María Rosa Baroni* por su apoyo en la corrección de manuscritos para el logro de publicaciones
- *Al Bioq. Carlos Ahumada*, por su invaluable e incalculable asistencia en el análisis estadístico de los datos
- *Al Bioq. Oscar Prendes* del Laboratorio Productor de Fármacos Medicinales de Santa Fe por facilitarme desinteresadamente la solución de betalactamasa comercial
- *A las Bioq. Josefina Bande, Romina Bodrone y a la técnica Luciana Pérez* por la dedicación y el empeño con que me ayudaron en el trabajo de campo
- *A Belén Vago*, la diseñadora, por su inagotable paciencia y comprensible actitud para seguir el ritmo de los vaivenes de la escritura del trabajo de tesis
- *A la Prof. Anita Schwender y a Sabrina Cristobal* por su colaboración en la traducción del resumen
- *todos mis alumnos y pacientes* quienes hicieron de mí una apasionada de la microbiología clínica *Debemos reclamar, en nombre de la tolerancia, el derecho a no tolerar a los intolerantes.*

Karl Popper - Filósofo – 1902-1994

ÍNDICE

Índice de Abreviaturas.....	21
Índice de Figuras.....	33
Índice de Tablas.....	41
Resumen.....	45
Summary.....	55

CAPÍTULO I: Introducción

I.1. Parte I: *Staphylococcus aureus*

I.1.1. Introducción.....	65
I.1.2. Epidemiología.....	66
I.1.3. Diagnóstico de laboratorio.....	66
I.1.3.1. Micromorfología.....	66
I.1.3.2. Cultivo.....	66
I.1.3.3. Identificación.....	67
I.1.3.4. Diagnóstico molecular.....	69
I.1.4. Etiopatogenia.....	69
I.1.4.1. Regulación.....	70
I.1.4.1.1. El sistema <i>agr</i>	70
I.1.4.1.2. Otros sistemas reguladores.....	70
I.1.4.2. Determinantes de la superficie celular involucrados en la etiopatogenia.....	70
I.1.4.2.1. Biopelícula.....	70
I.1.4.2.2. Polisacáridos capsulares.....	71
I.1.4.2.3. Adhesinas de superficie.....	71
I.1.4.2.4. Ácidos teicoicos y lipoteicoicos.....	72
I.1.4.3. Enzimas y hemolisinas secretadas.....	72
I.1.4.3.1. Hemolisinas.....	73
I.1.4.3.2. Toxina de Panton-Valentine.....	73
I.1.4.3.3. Superantígenos.....	73
I.1.4.3.4. Otras enzimas.....	74
I.1.4.4. Islas de patogenicidad (genómicas) y elementos móviles.....	75
I.1.5. Cuadros clínicos.....	76
I.1.6. Resistencia de <i>S. aureus</i> a los antibióticos: breve reseña.....	77

I.2. Parte II: Actividad bacteriostática y bactericida

I.2.1. Introducción.....	81
I.2.1.1. Términos históricamente asociados con los ensayos que estudian la actividad de los AM.....	81
I.2.1.1.1. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).....	82
I.2.1.1.2. Concentración Bactericida Mínima (CBM).....	82

I.2.1.1.3. Título Inhibitorio del suero.....82

I.2.1.1.4. Título Bactericida del suero.....82

I.2.1.1.5. Efecto Paradojal (Fenómeno de Eagle).....82

I.2.1.1.6. Persistencia.....83

I.2.1.1.7. Tolerancia.....83

I.2.1.1.8. Curva de cinética de muerte (estudios de tiempo de muerte).....83

I.2.1.1.9. Ensayo de Tablero de Damas.....84

I.2.2. Definición de la actividad bacteriostática y bactericida.....84

I.2.2.1. Agentes bacteriostáticos y bactericidas.....84

I.2.2.2. Tolerancia.....84

I.2.2.3. Modo de acción de la actividad bactericida.....88

I.2.3. Investigación de la actividad bactericida.....88

I.2.3.1. Métodos *in-vitro*.....88

I.2.3.2. CBM.....89

I.2.3.3. Estudios de cinética de muerte.....89

I.2.4. Resistencia y tolerancia de *S. aureus* a vancomicina.....90

I.2.4.1. Resistencia de *S. aureus* a vancomicina.....90

I.2.4.1.1. *S. aureus* resistentes a VAN.....90

I.2.4.1.2. *S. aureus* con resistencia intermedia a vancomicina.....91

I.2.4.2. Tolerancia de *S. aureus* a vancomicina.....92

I.2.4.2.1. Significado clínico de tolerancia a la VAN en *S. aureus* y su relación
con la resistencia intermedia.....92

I.2.5. Importancia clínica de la actividad bactericida.....94

I.2.5.1. Bacteriemia y endocarditis.....95

I.2.5.2. Meningitis.....97

I.2.5.3. Osteomielitis.....97

I.2.5.4. Actividad reducida por el desarrollo de resistencia.....98

I.2.6. Definiciones de puntos de corte para sensibilidad y resistencia.....99

I.2.6.1. Definiciones de categorías de sensibilidad.....100

I.2.6.2. Organizaciones que establecen puntos de corte.....102

I.2.6.3. Criterio farmacológico.....102

CAPÍTULO II: Objetivos generales y particulares

II.1. Objetivos

II.1.1. Objetivos generales.....107

II.1.2. Objetivos particulares.....109

CAPÍTULO III: *Staphylococcus aureus* meticilino sensibles**III.1. Sección A**

III.1.1. Concentración inhibitoria y bactericida mínimas y curvas de cinética de muerte.....	113
III.1.1.1. <u>Introducción</u>	113
III.1.1.2. <u>Objetivos</u>	117
III.1.1.3. <u>Materiales y métodos</u>	119
III.1.1.3.1. Aislamientos bacterianos.....	119
III.1.1.3.2. Pruebas de sensibilidad.....	119
III.1.1.3.2.1. Difusión con discos.....	119
III.1.1.3.2.2. Concentración inhibitoria mínima (CIM).....	120
III.1.1.3.2.2.1. Solución de antibiótico.....	120
III.1.1.3.2.2.2. Inóculo.....	121
III.1.1.3.2.2.3. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC)/mL del inóculo inicial.....	121
III.1.1.3.2.2.4. CIM.....	122
III.1.1.3.2.2.5. Cepa control.....	124
III.1.1.3.2.2.6. Lectura e interpretación de la CIM.....	125
III.1.1.3.2.3. Concentración bactericida mínima (CBM).....	125
III.1.1.3.2.3.1. Inóculos.....	125
III.1.1.3.2.3.2. CBM.....	126
III.1.1.3.2.3.3. Cálculo de la CBM.....	127
III.1.1.3.2.3.4. Bactericidia y tolerancia.....	128
III.1.1.3.2.4. Curva de cinética de muerte o de letalidad.....	128
III.1.1.3.2.4.1. Aislamientos bacterianos.....	128
III.1.1.3.2.4.2. Inóculo.....	128
III.1.1.3.2.4.3. Recuento de UFC/mL del inóculo inicial.....	128
III.1.1.3.2.4.4. Preparación de la solución de antibiótico.....	128
III.1.1.3.2.4.5. Curva de cinética de muerte.....	129
III.1.1.3.2.4.6. Bactericidia y tolerancia.....	133
III.1.1.4. <u>Resultados</u>	135
III.1.1.4.1. CIM, CBM, relación CBM/CIM y muestras clínicas.....	135
III.1.1.4.2. Curvas de cinética de muerte o de letalidad.....	139
III.1.1.5. <u>Discusión</u>	145
III.1.1.6. <u>Conclusiones</u>	149

III.2. Sección B

III.2.1. Historia clínica de pacientes infectados con <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino sensibles tolerantes a cefalotina detectados por curvas de cinética de muerte.....	151
III.2.1.1. Presentación.....	151

III.2.1.1.1. Paciente infectado con SAMS 3.....	151
III.2.1.1.2. Paciente infectado con SAMS 4.....	151
III.2.1.1.3. Paciente infectado con SAMS 11.....	152
III.2.1.1.4. Paciente infectado con SAMS 15.....	152

III.3. Sección C

III.3.1. Propuesta de técnica sencilla para detectar la concentración bactericida mínima.....	155
III.3.1.1. <u>Introducción</u>	155
III.3.1.2. <u>Objetivos</u>	157
III.3.1.3. <u>Materiales y métodos</u>	159
III.3.1.3.1. Aislamientos bacterianos y AM utilizados.....	159
III.3.1.3.2. Preparación de la solución de betalactamasa (SBL).....	159
III.3.1.3.3. Control de calidad de la SBL.....	160
III.3.1.3.4. Cuantificación de la SBL.....	160
III.3.1.3.4.1. Construcción de la curva patrón para definir la dilución óptima de la SBL a utilizar.....	160
III.3.1.3.4.2. Cálculo de la concentración de la SBL preparada en el laboratorio.....	161
III.3.1.3.5. Ensayo para discos de CEF y OXA.....	162
III.3.1.3.6. Ensayo con discos de FOX.....	163
III.3.1.3.7. SBL VIM-2.....	163
III.3.1.3.8. Método estadístico.....	163
III.3.1.4. <u>Resultados</u>	165
III.3.1.4.1. Ensayos con discos de CEF y OXA.....	165
III.3.1.4.2. Ensayo con disco de FOX.....	172
III.3.1.5. <u>Discusión</u>	177
III.3.1.6. <u>Conclusiones</u>	179

CAPÍTULO IV: *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes

IV.1. Sección A

IV.1.1. Concentración inhibitoria y bactericida mínimas y curvas de cinética de muerte.....	183
IV.1.1.1. <u>Introducción</u>	183
IV.1.1.1.1. Aumento de la frecuencia y complejidad de las infecciones por SAMR.....	183
IV.1.1.1.2. Infección hospitalaria por SAMR.....	185
IV.1.1.1.3. SAMR en Argentina.....	186
IV.1.1.1.4. Resistencia intrínseca a meticilina.....	187
IV.1.1.1.5. Detección de la meticilino resistencia.....	187
IV.1.1.1.6. SAMR adquiridos en la comunidad.....	188
IV.1.1.1.7. Vancomicina: historia de un AM exitoso.....	190

IV.1.1.1.8. Vancomicina: uso clínico.....	192
IV.1.1.2. <u>Objetivos</u>	195
IV.1.1.3. <u>Materiales y métodos</u>	197
IV.1.1.3.1. Aislamientos bacterianos.....	197
IV.1.1.3.2. Pruebas de sensibilidad.....	197
IV.1.1.3.2.1. Difusión con discos de OXA y FOX.....	197
IV.1.1.3.2.2. Concentración inhibitoria mínima (CIM) de VAN.....	197
IV.1.1.3.2.2.1. Solución de antibiótico y sus diluciones.....	198
IV.1.1.3.2.2.2. Inóculo.....	198
IV.1.1.3.2.2.3. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC)/mL del inóculo inicial.....	198
IV.1.1.3.2.2.4. CIM.....	199
IV.1.1.3.2.2.5. Cepa control.....	199
IV.1.1.3.2.2.6. Lectura e interpretación de la CIM.....	199
IV.1.1.3.2.3. Concentración bactericida mínima (CBM) de VAN.....	200
IV.1.1.3.2.3.1. Inóculos.....	200
IV.1.1.3.2.3.2. CBM.....	200
IV.1.1.3.2.3.3. Cálculo de la CBM.....	201
IV.1.1.3.2.3.4. Bactericidia y tolerancia.....	201
IV.1.1.3.2.4. Curva de cinética de muerte o de letalidad.....	201
IV.1.1.3.2.4.1. Aislamientos bacterianos.....	201
IV.1.1.3.2.4.2. Inóculo.....	202
IV.1.1.3.2.4.3. Recuento de UFC/mL del inóculo inicial.....	202
IV.1.1.3.2.4.4. Preparación de la solución de antibiótico.....	202
IV.1.1.3.2.4.5. Curva de cinética de muerte o de letalidad.....	202
IV.1.1.3.2.4.6. Curva de cinética de muerte o de letalidad: interpretación.....	203
IV.1.1.4. <u>Resultados</u>	205
IV.1.1.4.1. CIM, CBM, relación CBM/CIM y muestras clínicas.....	205
IV.1.1.4.2. Curvas de cinética de muerte o de letalidad.....	209
IV.1.1.5. <u>Discusión</u>	217
IV.1.1.6. <u>Conclusiones</u>	221

IV.2. Sección B

IV.2.1. Historia clínica de pacientes infectados con <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistentes tolerantes a vancomicina detectados por curvas de cinética de muerte.....	223
IV.2.1.1. Presentación.....	223
IV.2.1.1.1. Paciente infectado con SAMR 6.....	223
IV.2.1.1.2. Paciente infectado con SAMR 10.....	223
IV.2.1.1.3. Paciente infectado con SAMR 11.....	223

IV.2.1.1.4. Paciente infectado con SAMR 12.....	224
CAPÍTULO V: Estudio genotípico de <i>Staphylococcus aureus</i> tolerantes a betalactámicos y gluco péptidos	
V.1. Sección A	
V.1.1. Aislamientos tolerantes a antimicrobianos betalactámicos.....	227
V.1.1.1. <u>Introducción</u>	227
V.1.1.1.1. Técnicas moleculares usadas para detección de la resistencia a AM.....	227
V.1.1.1.1.1. Historia.....	227
V.1.1.1.1.2. Avances.....	228
V.1.1.1.2. Resistencia a meticilina/oxacilina y detección fenotípica.....	229
V.1.1.1.3. Factor de virulencia leucocidina de Pantón-Valentine.....	230
V.1.1.1.4. <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino sensibles tolerantes a cefalotina.....	232
V.1.1.2. <u>Objetivos</u>	233
V.1.1.3. <u>Materiales y métodos</u>	235
V.1.1.3.1. Aislamientos estudiados.....	235
V.1.1.3.2. Extracción del ADN genómico.....	235
V.1.1.3.3. Amplificación genes <i>mecA</i> , <i>hlg</i> y <i>luk-PV</i>	236
V.1.1.3.4. Mezcla de reacción.....	237
V.1.1.3.5. Protocolo de ciclado.....	238
V.1.1.3.6. Análisis del tamaño de los productos de PCR.....	238
V.1.1.4. <u>Resultados</u>	239
V.1.1.5. <u>Discusión</u>	243
V.1.1.6. <u>Conclusiones</u>	245
V.2. Sección B	
V.2.1. Aislamientos tolerantes a antimicrobianos gluco péptidos: vancomicina.	
Detección de polimorfismo genómico en SAMR.....	247
V.2.1.1. <u>Introducción</u>	247
V.2.1.1.1. Generalidades.....	247
V.2.1.1.1.1. Técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos.....	249
V.2.1.2. <u>Objetivos</u>	255
V.2.1.3. <u>Materiales y métodos</u>	257
V.2.1.3.1. Aislamientos bacterianos.....	257
V.2.1.3.2. Purificación de ADN.....	257
V.2.1.3.3. Protocolo de PCR empleando oligonucleótidos degenerados.....	257
V.2.1.3.3.1. Secuencia de cebadores usados.....	257
V.2.1.3.3.2. Mezcla de reacción para volumen final: 50µL.....	258
V.2.1.3.3.3. Programa empleado.....	258

V.2.1.3.3.4. Interpretación de resultados.....	259
V.2.1.4. <u>Resultados</u>	261
V.2.1.5. <u>Discusión</u>	263
V.2.1.6. <u>Conclusiones</u>	265
V.3. Sección C	
V.3.1. <u>Introducción</u>	267
V.3.2. <u>Objetivos</u>	271
V.3.3. <u>Materiales y métodos</u>	273
V.3.3.1. Pacientes y aislamientos bacterianos.....	273
V.3.3.2. Pruebas de sensibilidad.....	273
V.3.3.3. Detección de LPV.....	273
V.3.3.3.1. Extracción del ADN.....	274
V.3.3.3.2. PCR.....	274
V.3.3.3.3. Análisis estadístico.....	274
V.3.4. <u>Resultados</u>	275
V.3.5. <u>Discusión</u>	279
V.3.6. <u>Conclusiones</u>	281
CAPÍTULO VI: Estudio de sinergia de antimicrobianos frente a SAMR tolerantes a vancomicina detectados por cinética de muerte	
VI.1. Combinaciones de antimicrobianos.....	285
VI.1.1. <u>Introducción</u>	285
VI.1.1.1. Consideraciones sobre combinaciones de AM.....	285
VI.1.1.1.1. Disminución de emergencia de cepas resistentes.....	285
VI.1.1.1.2. Disminución de la toxicidad relacionada a la droga como resultado del uso de dosis reducida.....	286
VI.1.1.1.3. Infecciones polimicrobianas.....	286
VI.1.1.1.4. Sinergismo antimicrobiano.....	287
VI.1.1.1.5. Definiciones de interacciones de AM in vitro.....	287
VI.1.1.2. Actividad de combinaciones de antimicrobianos: métodos de laboratorio.....	288
VI.1.1.2.1. Métodos de difusión.....	288
VI.1.1.2.1.1. Técnica de discos.....	288
VI.1.1.2.1.1.1. Interpretación de los resultados.....	289
VI.1.1.2.1.2. Técnica con tiras.....	291
VI.1.1.2.1.2.1. Tiras de papel.....	291
VI.1.1.2.1.2.2. Tiras comerciales.....	292
VI.1.1.2.1.3. Series en “tablero de damas”.....	292
VI.1.1.2.1.4. Estudios de cinética de muerte.....	293
VI.1.1.2.1.4.1. Interpretación de los resultados.....	294

VI.1.2. <u>Objetivos</u>	295
VI.1.3. <u>Materiales y métodos</u>	297
VI.1.3.1. Aislamientos bacterianos.....	297
VI.1.3.2. Pruebas de sensibilidad.....	297
VI.1.3.2.1. Concentración inhibitoria mínima.....	297
VI.1.3.2.1.1. Solución de antibiótico.....	297
VI.1.3.2.1.2. Inóculo.....	297
VI.1.3.2.1.3. CIM.....	298
VI.1.3.2.1.4. Cepa control.....	298
VI.1.3.2.1.5. Lectura e interpretación de la CIM.....	298
VI.1.3.2.2. Determinación de la combinación de los AM por curva de cinética de muerte o de letalidad.....	299
VI.1.3.2.2.1. Aislamientos bacterianos.....	299
VI.1.3.2.2.2. Inóculo.....	299
VI.1.3.2.2.3. Recuento de UFC/mL del inóculo inicial.....	299
VI.1.3.2.2.4. Preparación de las soluciones de antibiótico.....	299
VI.1.3.2.2.5. Curvas para determinar actividad de combinación de antibióticos mediante cinética de muerte o de letalidad.....	299
VI.1.3.2.2.6. Interpretación de resultados.....	304
VI.1.4. <u>Resultados</u>	305
VI.1.5. <u>Discusión</u>	319
VI.1.6. <u>Conclusiones</u>	321
 Conclusiones Generales.....	 325
Bibliografía.....	331
Presentación de Resultados.....	377

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

INDICE DE ABREVIATURAS

Abs: absorbancia

ACME: elemento móvil para el catabolismo de la arginina

ADH: arginina dehidrolasa.

ADN: ácido desoxirribonucleico

AFLP: polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados

AG: aminoglucósidos

AM: antimicrobianos

AMC: aminopenicilinaclavulánico

AP-PCR: PCR con cebadores arbitrarios

ARN: ácido ribonucleico

ARNr: ácido ribonucleico ribosómico

ATB: antibiótico

ATCC: American Type Culture Collection

AUC: área bajo la curva

BAL: lavado bronquioalveolar

BI₂: blanco de I₂

BS: blanco de sustrato

CA: California

CBM: concentración bactericida mínima

CBM₅₀: concentración mínima de antibiótico que mata el 50% de los aislamientos estudiados

CBM₉₀: concentración mínima de antibiótico que mata el 90% de los microorganismos estudiados

CDC: Center for Disease Control

CEF: cefalotina

CEF 1G: cefalosporinas de primera generación

CIM: concentración inhibitoria mínima

CIM₅₀: concentración mínima de antibiótico que inhibe el 50% de los aislamientos estudiados

CIM₉₀: concentración mínima de antibiótico que inhibe el 90% de los aislamientos estudiados.

CIMs: concentraciones inhibitorias mínimas

CIP: ciprofloxacina

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute

CM: curva de cinética de muerte o de letalidad

C_{max}: concentración máxima

C_{min}: concentración mínima

CPM: concentración de prevención de mutantes

CV: curva de vida

Dil It: dilución inóculo trabajo

DIU: dispositivo intrauterino

dL: decilitro

dNTPs: deoxinucleótidos trifosfatos

Dr.: doctor

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EMRSA: clon epidémico de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente

ERIC: secuencias consenso repetitivas intragénicas de Enterobacterias

ERV: *Enterococcus* resistente a vancomicina

EEUU: Estados Unidos de Norteamérica

EUCAST: European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing

FDA: Food and Drug Administration

FOX: cefoxitina

FR: factor de riesgo

°C: grados centígrados

g: gramo

GEN: gentamicina

GISA: *Staphylococcus aureus* con sensibilidad intermedia a glucopeptidos

GRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a glucopeptidos

H₂O: agua

h: horas

hVISA: *Staphylococcus aureus* con resistencia heterogénea a vancomicina

I₂: yodo

IK: yoduro de potasio

IMI: imipenem

Inoc. Inicial: inóculo inicial

It: inóculo de trabajo

L: litro

LB: Caldo Luria Bertani

LCR: líquido céfalo-raquídeo

LPV: leucocidina de Panton-Valentine

LU: Levit unit

M: molar

MgCl₂: cloruro de magnesio

MER: meropenem

MH: Müeller-Hinton

μ: micro

μg: microgramos

μL: microlitros

μmol: micromol

μM: micromolar

mg: miligramos

mL: mililitros

MilliQ: agua purificada y demonizada

MLST: multilocus sequence typing scheme

mm: milímetros

mm³: milímetros cúbico

mM: milimolar

MSCRAMM: microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules

NaCl: cloruro de sodio

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

ODC: ornitina decarboxilasa

OD-PCR: PCR utilizando oligonucleótidos degenerados

OXA: oxacilina

%T: porcentaje de tiempo

PBP: penicillin-binding protein

PC: puntos de corte

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PD: farmacodinamia

PFGE: electroforesis en gel de campo pulsado

PK: farmacocinética

PLP: proteína ligando penicilina

PPB: piel y partes blandas

PYR: pirrolidonil-beta-naftilamida

R: resistente

RAPD: ADN polimórfico amplificado al azar

REP: repetitivas palindrómicas extragénicas

rep-PCR: PCR donde se usan cebadores que hibridan secuencias de ADN repetitivas

RFA: rifampicina

RFLP: polimorfismo de los fragmentos de restricción

Rpm: revoluciones por minuto

S: sensible

SAMR: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente

SAMR-AC: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad

SAMR-AH: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente asociado a cuidados de la salud

SAMR-CO: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente de inicio en la comunidad

SAMS: *Staphylococcus aureus* meticilino sensible

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

SBL: solución de betalactamasa

SCC*mec*: staphylococcal chromosomal cassette *mec*

SDS: sulfato dodecil de sodio

sp: especie

S. pneumoniae: *Streptococcus pneumoniae*

ss: subespecie

TAE: tris-acetato EDTA

Taq: *Thermus aquaticus*

TE: 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA

TES: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 50% sacarosa

TMS: trimetoprimasulfametoxazol

U: unidades

UFC: unidades formadoras de colonias

UI: unidades internacionales

UNL: Universidad Nacional del Litoral

USA: Estados Unidos de Norteamérica

UTI: unidades de cuidados intensivos o unidad de terapia intensiva

VISA: *Staphylococcus aureus* con sensibilidad intermedia a vancomicina

VAN: vancomicina

VRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina

wt: wild type

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1: Representación gráfica de la curva de concentración de un AM en función del tiempo.....	103
Figura I.2: Representación gráfica de %T > CIM.....	104
Figura I.3: Representación del área bajo la curva sobre la CIM (AUC/CIM).....	104
Figura III.1: Inducción de la síntesis de betalactamasa en presencia de penicilina.....	114
Figura III.2: Preparación de solución de trabajo de cefalotina.....	120
Figura III.3: Preparación del inóculo de trabajo.....	121
Figura III.4: Recuento del inóculo de trabajo.....	122
Figura III.5: CIM de cefalotina.....	123
Figura III.6: CIM para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.....	124
Figura III.7: CBM de cefalotina.....	126
Figura III.8: Cálculo de la CBM.....	127
Figura III.9: Curva de cinética de muerte o de letalidad. Metodología aplicada y recuentos de UFC/mL a t ₀ : 0h; t ₃ : 3h; t ₆ : 6h; t ₂₄ : 24h de incubación.....	130
Figura III.10: Curvas de muerte o de letalidad de seis aislamientos SAMS tolerantes a CEF considerando la relación CBM/CIM ≥ 32 o CBM/CIM ≥ 16 y CBM ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$	141
Figura III.11: Curvas de muerte o de letalidad de SAMS con relación CBM/CIM de CEF = 16 (no tolerantes).....	142
Figura III.12: Curvas de muerte o de letalidad de 11 aislamientos SAMS cuya CBM/CIM de CEF resultó = 8.....	143
Figura III.13: Prueba de sensibilidad de cefalotina frente a <i>S. aureus</i> según normas CLSI.....	162

<u>Figura III.14:</u> Agar Müeller-Hinton con una cepa incógnita de <i>S. aureus</i> luego de 24 horas de incubación donde 3 discos de cefalotina fueron reemplazados por discos goteados con SBL pura, diluída al medio y al décimo.....	162
<u>Figura III.15:</u> Aislamiento de <i>S. aureus</i> con CBM/CIM de cefalotina ≥ 8 después de 24 horas de incubación a 35°C con los tres discos reemplazados y goteados con SBL.....	171
<u>Figura III.16:</u> Aislamiento de <i>S. aureus</i> con CBM/CIM de cefalotina ≤ 2 después de 24 horas de incubación a 35°C con los tres discos reemplazados y goteados con SBL.....	171
<u>Figura III.17:</u> Ampliación de la figura III.15. Aislamiento de <i>S. aureus</i> con CBM/CIM de cefalotina ≥ 8 y el disco reemplazado de CEF y goteado con SBL diluída al medio.....	172
<u>Figura III.18:</u> Ampliación de la figura III.16. Aislamiento de <i>S. aureus</i> con CBM/CIM de cefalotina ≤ 2 con el disco reemplazado y goteado con SBL diluída al medio.....	172
<u>Figura IV.1:</u> Cantidad de artículos en inglés en cuyo título se menciona VAN. Años 1950-2003.....	191
<u>Figura IV.2:</u> Uso de VAN en los EEUU, Francia, Italia, Alemania e Inglaterra desde 1975 a 1995.....	192
<u>Figura IV.3:</u> Preparación de la solución de trabajo de vancomicina (64µg/mL) para determinar concentración inhibitoria mínima.....	198
<u>Figura IV.4:</u> Determinación de CIM de vancomicina.....	199
<u>Figura IV.5:</u> Determinación de CBM de vancomicina.....	200
<u>Figura IV.6:</u> Cálculo de la CBM.....	201
<u>Figura IV.7:</u> Curvas de cinética de muerte o de letalidad de SAMR tolerantes a VAN según relación CBM/CIM (CBM/CIM ≥ 32).....	211
<u>Figura IV.8:</u> Curvas de cinética de muerte o de letalidad de SAMR tolerantes a VAN según relación CBM/CIM (CBM/CIM ≥ 16 y CBM ≥ 16 µg/mL).....	212

Figura IV.9: Curvas de cinética de muerte o de letalidad a VAN de los aislamientos SAMR cuya relación CBM/CIM de VAN resultó igual a 16.....	213
Figura IV.10: Curvas de cinética de muerte o de letalidad a VAN de los aislamientos SAMR cuya relación CBM/CIM de VAN resultó igual a 8.....	215
Figura V.1: Detección del gen <i>mecA</i> en los aislamientos de <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino sensibles tolerantes a cefalotina.....	239
Figura V.2: Investigación del gen <i>hlg</i> en los aislamientos de <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino sensibles tolerantes a cefalotina.....	240
Figura V.3: Investigación de los genes <i>pvl</i> en los aislamientos de <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino sensibles tolerantes a cefalotina.....	241
Figura V.4: Perfiles OD-PCR de aislamientos de <i>Staphylococcus aureus</i>	261
Figura V.5: Curvas de vida y de cinética de muerte de los 5 aislamientos de <i>S. aureus</i> con CBM/CIM de vancomicina ≥ 32	277
Figura V.6: Curvas de vida y de cinética de muerte de los 4 aislamientos de <i>S. aureus</i> con CBM/CIM de vancomicina igual a 16.....	277
Figura V.7: Curva de vida y de cinética de muerte de los 6 aislamientos de <i>S. aureus</i> con una relación de CBM/CIM de vancomicina igual a 8 y no productores de LPV.....	278
Figura V.8: Curvas de vida y de cinética de muerte de los 4 aislamientos de <i>S. aureus</i> con una relación CBM/CIM de vancomicina igual a 8 y productores de LPV.....	278
Figura VI.1: Efecto aditivo o indiferente entre dos discos de AM.....	289
Figura VI.2: Sinergia entre meropenem, imipenem y ácido etilendiaminotetraacético.....	290
Figura VI.3: Ensayo de combinaciones de AM usando tiras de papel embebidas en soluciones de AM preparadas en el laboratorio.....	291
Figura VI.4: Efecto sinérgico entre un betalactámico y un aminoglucósido con una cepa control. Método epsilométrico.	292

Figura VI.5: Técnica para determinar actividad combinada de AM.....	301
Figura VI.6: Técnica de detección de combinación antimicrobiana y recuento de UFC/mL a las 3, 6 y 24 horas de incubación a 35°C.....	302
Figura VI.7: Curvas de cinética de muerte de VAN, CIP y la combinación de ambos AM frente a SAMR 6.....	306
Figura VI.8: Curvas de cinética de muerte de VAN, RFA y la combinación de ambos AM frente a SAMR 6.....	306
Figura VI.9: Curvas de cinética de muerte de VAN, GEN y la combinación de ambos AM frente a SAMR 6.....	307
Figura VI.10: Curvas de cinética de muerte de VAN, IMI y la combinación de ambos AM frente a SAMR 6.	307
Figura VI.11: Curvas de cinética de muerte de VAN, CIP y la combinación de los dos AM frente a SAMR 10.....	309
Figura VI.12: Curvas de cinética de muerte de VAN, RFA y la combinación de ambos AM frente a SAMR 10.....	309
Figura VI.13: Curvas de cinética de muerte de VAN, GEN y la combinación de ambos AM frente a SAMR 10.....	310
Figura VI.14: Curvas de cinética de muerte de VAN, IMI y la combinación de ambos AM frente a SAMR 10.....	310
Figura VI.15: Curvas de cinética de muerte de VAN, CIP y la combinación de ambos AM frente a SAMR 11.....	312
Figura VI.16: Curvas de cinética de muerte de VAN, RFA y la combinación de ambos AM frente a SAMR 11.....	312
Figura VI.17: Curvas de cinética de muerte de VAN, GEN y la combinación de ambos AM frente a SAMR 11.....	313
Figura VI.18: Curvas de cinética de muerte de VAN, IMI y la combinación de ambos AM frente a SAMR 11.....	313

<u>Figura VI.19:</u> Curvas de cinética de muerte de VAN, CIP y la combinación de ambos AM frente a SAMR 12.....	315
<u>Figura VI.20:</u> Curvas de cinética de muerte de VAN, RFA y ambos AM combinados frente a SAMR 12.....	315
<u>Figura VI.21:</u> Curvas de cinética de muerte de VAN, GEN y la combinación de ambos AM frente a SAMR 12.....	316
<u>Figura VI.22:</u> Curvas de cinética de muerte de VAN, IMI y la combinación de ambos AM frente a SAMR 12.....	316

ÍNDICE DE TABLAS

Índice de Tablas

Tabla I.1: Pruebas diferenciales para identificar especies de *Staphylococcus*
 coagulasa positiva.....67

Tabla I.2: Pruebas diferenciales para identificar especies de *Staphylococcus*
 coagulasa negativa.....68

Tabla III.1: Concentración Inhibitoria Mínima y Concentración Bactericida
 Mínima para cefalotina. Relación CBM/CIM y origen de 109 aislamientos
 de *Staphylococcus aureus* meticilino sensibles.....136

Tabla III.2: Recuento de células viables (UFC/mL) a las 0, 3, 6 y 24 horas.
 Curvas de vida y de muerte de 25 aislamientos de *Staphylococcus aureus*
 meticilino sensibles que mostraron CBM/CIM de cefalotina ≥ 8139

Tabla III.3: Estudio de 24 aislamientos de *S. aureus* con CBM/CIM de cefalotina ≥ 8 .
 Recuento de las UFC que desarrollaron alrededor de los discos de CEF goteados
 con SBL pura, diluída al medio y al décimo.....166

Tabla III.4: Estudio de 20 aislamientos de *S. aureus* con CBM/CIM de cefalotina ≤ 2 .
 Recuento de las UFC que desarrollaron alrededor de los discos de CEF goteados
 con SBL pura, diluída al medio y al décimo.....167

Tabla III.5: Estudio de 22 aislamientos de *S. aureus* con CBM/CIM de cefalotina ≥ 8 .
 Recuento de las UFC que desarrollaron alrededor de los discos de OXA goteados
 con SBL pura, diluída al medio y al décimo.....168

Tabla III.6: Estudio de 20 aislamientos de *S. aureus* con CBM/CIM de cefalotina ≤ 2 .
 Recuento de las UFC que desarrollaron alrededor de los discos de OXA goteados
 con SBL pura, diluída al medio y al décimo.....169

Tabla III.7: Test de Mann-Whitney para los discos de CEF y OXA goteados
 con SBL pura, diluída al medio y al décimo.....170

Tabla III.8: Estudio de 22 aislamientos de *S. aureus* con CBM/CIM de cefalotina ≥ 8 .
 Recuento de las UFC que desarrollaron alrededor de los discos de FOX goteados
 con VIM-2 diluída 1/80, 1/100 y 1/150.....173

<u>Tabla III.9:</u> Estudio de 20 aislamientos de <i>S. aureus</i> con CBM/CIM de cefalotina ≤ 2 . Recuento de las UFC que desarrollaron alrededor de los discos de FOX goteados con VIM-2 diluída 1/80, 1/100 y 1/150.....	174
<u>Tabla III.10:</u> Test de Mann-Whitney para el disco de FOX goteado con SBL-VIM2 diluída 1/80, 1/100 y 1/150.....	175
<u>Tabla III.11:</u> Frecuencias de UFC acumuladas para los discos de cefalotina, oxacilina y cefoxitina goteados con la dilución de SBL que logró mejor diferenciación.....	176
<u>Tabla IV.1:</u> Número de muertes estimado según enfermedades infecciosas en EEUU.....	184
<u>Tabla IV.2:</u> Resultados de CIM y CBM de vancomicina (expresados en $\mu\text{g/mL}$), relación de CBM/CIM y origen de los SAMR estudiados.....	206
<u>Tabla IV.3:</u> Recuento de células viables (UFC/mL) a las 0, 3, 6 y 24 horas. Curvas de vida y de muerte de 39 aislamientos de <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistentes que mostraron CBM/CIM de vancomicina ≥ 8	209
<u>Tabla V.1:</u> Aislamiento, origen, relación CBM/CIM de vancomicina y producción de LPV de las cepas SAMR que mostraron CBM/CIM ≥ 8	275
<u>Tabla V.2:</u> Aislamiento, origen, relación CBM/CIM de vancomicina y producción de LPV de las cepas SAMR con CBM/CIM < 8	276
<u>Tabla VI.1:</u> CIMs (expresadas en $\mu\text{g/mL}$) para cada uno de los aislamientos frente a los diferentes AM ensayados.....	305

RESUMEN

El género *Staphylococcus* pertenece a la familia *Staphylococcaceae*, phylum *Firmicutes*, dominio *Bacteria*. Comprende 36 especies y 21 subespecies que están presentes en la mucosa y en la piel de los humanos y de otros mamíferos y aves. Son cocos gram positivos que se presentan aislados, en tetradas, cadenas cortas o grupos a modo de racimos irregulares.

Producen catalasa y, algunas especies, poseen una proteína llamada “coagulasa” que permite dividir a los integrantes de este género en dos grandes grupos según la produzcan o no. Entre las especies coagulasa positiva la de mayor importancia clínica es *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, denominado comúnmente *Staphylococcus aureus*. Las especies de *Staphylococcus* coagulasa negativa a menudo, aparecen como contaminantes en las muestras clínicas pero pueden ser verdaderos patógenos causando infecciones en pacientes inmunocomprometidos o asociados al uso de catéteres o a la presencia de cuerpos extraños.

S. aureus contiene factores de superficie y secreta proteínas que intervienen en la colonización del hospedero y en la producción de la enfermedad. Produce también numerosas exoenzimas, proteínas de membrana (hemolisinas y leucocidinas) y toxinas involucradas en los mecanismos patogénicos. Entre las γ hemolisinas, existe una leucocidina, llamada Pantón-Valentine que lisa los neutrófilos humanos y es dermonecrótica, explicando así la patobiología de las lesiones características de piel y partes blandas y su participación en la neumonía necrotizante.

En su genoma, se destaca la presencia de un gran número de elementos móviles que, a menudo, portan determinantes patógenos o de resistencia a fármacos. Comprenden secuencias de inserción, transposones, virus e islas de patogenicidad (o genómicas). A menudo, los transposones son portadores de determinantes de resistencia a antibióticos o a metales pesados

S. aureus puede causar una amplia variedad de enfermedades; desde infecciones cutáneas localizadas que pueden comprometer folículos pilosos (foliculitis) o avanzar hacia la dermis produciendo forúnculos. Otros cuadros clínicos pueden ser el impétigo

que afecta la epidermis y puede invadir tejidos más profundos provocando celulitis, abscesos, osteomielitis, neumonías, sepsis y endocarditis.

También es capaz de originar enfermedades a distancia, mediadas por toxinas e intoxicaciones a partir de alimentos y bebidas contaminadas. Esto constituye un importante problema de salud pública.

La historia de este patógeno incluye la evolución de la bacteria y el cambio en su impacto clínico debido a los factores de virulencia, a sus mecanismos de defensa y a su capacidad de generar resistencia a los antimicrobianos útiles para su tratamiento. A principios de los años '40, cuando fue introducida la bencilpenicilina, éste era el antimicrobiano ideal. Sin embargo, durante 1948 surgieron aislamientos resistentes a este antibiótico (por producción de penicilinasa), que se convirtieron en un grave problema hospitalario. Por tal motivo, se sintetizaron derivados de penicilinas capaces de resistir la actividad de esta enzima, conocidos como penicilinas resistentes a penicilinasa (metecilina, oxacilina y sus derivados).

A principios de la década del 60, aparecieron en Europa *S. aureus* resistentes a metecilina y, desde entonces, se han diseminado por todo el mundo constituyendo un grave problema epidemiológico ya que mostraron resistencia a todos los betalactámicos, separando a este patógeno en dos grandes grupos: *Staphylococcus aureus* metecilino sensible (SAMS) y *Staphylococcus aureus* metecilino resistente (SAMR), lo que tiene un fuerte impacto desde el punto de vista clínico. Anteriormente SAMR estaba restringido al ámbito hospitalario, pero desde los años '90, emergieron como patógenos de la comunidad, conociéndoselos como SAMR-AC. Si bien SAMR se ha erigido como el principal patógeno, resulta curioso el hecho de que no ha reemplazado a las infecciones por SAMS.

La detección de la sensibilidad antimicrobiana constituye un importante desafío para el laboratorio y el mayor problema que enfrenta el microbiólogo clínico es determinar cuál es la mejor técnica *in-vitro*.

En la actualidad, los métodos más usados son: la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), la Concentración Bactericida Mínima (CBM) y los estudios de cinética de muerte o curvas de muerte o de letalidad (CM).

La determinación de la actividad bactericida se complica por el fenómeno de tolerancia, mediante el cual, microorganismos que son normalmente muertos por un agente bactericida resultan sólo inhibidos. Actualmente la tolerancia se define teniendo en cuenta dos criterios: 1) relación CBM/CIM y 2) CM.

Este trabajo de tesis se dividió en dos partes: por un lado se estudiaron aislamientos de SAMS y, por el otro, se trabajó con aislamientos de SAMR. Los aislamientos se obtuvieron de pacientes que concurren para su atención al Hospital Dr. José María Cullen de la ciudad de Santa Fe, Argentina. Es importante destacar que, durante el período 2009-2010 las infecciones por SAMR constituyeron el 44% mientras que las producidas por SAMS representaron el 56%.

Los objetivos propuestos para SAMS fueron a) detectar las actividades bacteriostática y bactericida de cefalotina (CEF); b) diferenciar cepas tolerantes según diferentes criterios; c) analizar las historias clínicas de los pacientes infectados por SAMS tolerantes; d) estudiar genótipicamente los SAMS tolerantes y e) proponer una metodología sencilla para determinar la CBM de CEF.

Para cumplir con los mismos, se recolectaron 109 aislamientos de SAMS, consecutivos y únicos, durante el período comprendido entre el 1 de Junio de 2006 al 31 de Diciembre de 2007. Las muestras clínicas de las cuales se recuperaron fueron: piel y partes blandas (PPB) (53,21%), sangre (23,85%), muestras óseas (9,17%), materiales respiratorias (8,26%) y materiales clínicos varios (5,51%).

Para determinar la CIM y la CBM de CEF, se llevó a cabo, para cada uno de los aislamientos, el método de macrodilución en caldo según las pautas de CLSI (CLSI, 2008c). Posteriormente, a los aislamientos cuya relación CBM/CIM de CEF ≥ 8 se les efectuaron CM, realizando recuentos de colonias a las 0, 3, 6 y 24 horas de incubación a 35°C (NCCLS, 1999b).

Los estudios genotípicos, a fin de determinar la presencia de los genes *mecA*, *hlg* y *pvl*, se efectuaron sobre los 4 aislamientos que resultaron tolerantes por CM.

La CIM₅₀ y CIM₉₀ de CEF de los 109 SAMS estudiados resultaron ser 0,5 y 1 µg/mL, respectivamente. La CBM₅₀ fue 1 µg/mL y la CBM₉₀ igual a 8 µg/mL. Teniendo en cuenta la relación CBM/CIM, 6 SAMS (5,5%) fueron tolerantes y CEF resultó bactericida para 84 SAMS (77,1%).

Se detectaron 25 aislamientos con CBM/CIM de CEF ≥ 8 . De las 25 CM realizadas, 4 aislamientos resultaron tolerantes por CM pero uno de ellos no lo fue al tener en cuenta la relación CBM/CIM. La bactericidia de CEF según los estudios de cinética de muerte llevados a cabo, fue del 99,1%.

Ninguna de las 4 cepas tolerantes por CM, resultó portadora de *mecA*, lo que permitió corroborar que se trataba de *S. aureus* meticilino sensibles.

La detección de la actividad bactericida de CEF frente a SAMS, mediante la puesta a punto y desarrollo de una técnica sencilla, se llevó a cabo con 42 SAMS de los estudiados; seleccionados de la siguiente manera: 22 con CBM/CIM ≥ 8 y 20 con CBM/CIM ≤ 2 . Se utilizaron discos de CEF, oxacilina (OXA) y cefoxitina (FOX) inactivados con solución de betalactamasa (SBL) obtenida en el laboratorio.

El disco de OXA resultó mejor que los de CEF y FOX ya que logró discriminar mayor cantidad de aislamientos con CBM/CIM de CEF ≥ 8 , minimizando la superposición de cepas CBM/CIM ≤ 2 a solo un 10%, lo que hace que esta técnica resulte útil para ser aplicada en los laboratorios de microbiología clínica, insumiendo menor tiempo que los estudios de cinética de muerte.

Finalmente, para completar los objetivos propuestos, se efectuó el seguimiento de las historias clínicas de tres de los pacientes infectados por cepas SAMS tolerantes. En uno se debió recurrir al aumento de las dosis de CEF y a un curetaje ya que el paciente no respondió con la dosis habitual. En otro, los múltiples tratamientos previos con CEF, pudieron seleccionar el aislamiento tolerante y el tratamiento vancomicina

(VAN) más gentamicina (GEN) administrado pudo no haber sido el adecuado. El tercero de los pacientes poseía numerosos factores de riesgo, hecho que lo predispuso a una infección más severa, lo que se evidenció en un fracaso tanto con la administración de ceftriaxona como con la combinación de CEF más gentamicina lo que sugiere que la tolerancia a CEF, pudo contribuir a la ineficacia del mismo.

El paciente infectado por SAMS tolerante, LPV(+), era un hombre de 45 años que ingresó en mal estado general con un absceso perianal que, además del tratamiento antibiótico, debió ser intervenido quirúrgicamente y se dio el alta a las 24 horas del ingreso.

Para la segunda etapa de esta tesis, que fue el estudio de SAMR, se propusieron los siguientes objetivos: a) detectar las actividades bacteriostática y bactericida de VAN; b) diferenciar cepas tolerantes según diferentes criterios, c) analizar las historias clínicas de los pacientes infectados por SAMR tolerantes, d) investigar el polimorfismo genómico de los aislamientos SAMR tolerantes a VAN, e) comparar, en aislamientos SAMR-AC, la actividad bactericida de VAN con la portación de la leucocidina de Pantón-Valentine (LPV) y f) estudiar la actividad sinérgica de VAN con ciprofloxacina, gentamicina, rifampicina e imipenem por CM frente a los aislamientos SAMR tolerantes a VAN.

Se trabajó con 112 aislamientos de SAMR, obtenidos durante el período 25 de Febrero de 2006 al 16 de Agosto de 2008.

La CIM y CBM de VAN se realizaron por macrodilución en caldo (CLSI, 2009a). Las CM se llevaron a cabo tanto para determinar la tolerancia o bactericidia como para estudiar la sinergia de VAN con los otros AM (NCCLS, 1999b).

Las CIM_{50/90} de VAN resultaron 0,5 y 1 µg/mL, respectivamente, mientras que las CBM_{50/90} fueron 1 y 8 µg/mL, respectivamente. Los aislamientos estudiados provenían: el 58,1 % de PPB, 19,6% de sangre, 16,1% de muestras óseas y el 6,2% restante, a otros materiales clínicos.

Teniendo en cuenta la relación CBM/CIM la bactericidia fue del 65,2% y se detectaron 12 (10,7%) cepas tolerantes.

Los estudios de cinética de muerte se efectuaron con 39 SAMR (CBM/CIM de VAN \geq 8). Para el 96,4%, VAN resultó bactericida, mientras que 4 aislamientos resultaron tolerantes (3,6%); destacándose que uno de ellos no lo fue al considerarse la relación CBM/CIM.

En cuanto a las historias clínicas de los pacientes infectados con las cepas tolerantes, se analizaron retrospectivamente, investigándose, además, el polimorfismo genómico de los mismos mediante la técnica de OD-PCR. La detección de los genes *pvl* se efectuó mediante la técnica de PCR.

De la revisión efectuada, se pudo determinar que un aislamiento produjo la muerte de un paciente y, que en los otros tres, fue necesario recurrir a otros AM.

El estudio del polimorfismo en los 4 aislamientos tolerantes, permitió diferenciarlos en 2 clones: 3 de los aislamientos pertenecieron al clon A y el restante al clon B.

Vale la pena aclarar que, además de las 3 cepas estudiadas, se incluyeron otras, SAMS y SAMR, aisladas en diferentes momentos, independientemente del período en que se llevó a cabo este trabajo de tesis. Así, en el clon A se ubicaron dos cepas (1 SAMS y 1 SAMR) cuyos aislamientos no estaban relacionados en el tiempo, determinándose la existencia de un tercer clon C que resultó conformado por SAMR 8, tolerante por el criterio CBM/CIM y relacionado en el tiempo con los tolerantes por CM.

Se demostró que la actividad bactericida de VAN en SAMR-AC fue efectiva en el 96% de los aislamientos, independientemente de la presencia del factor de virulencia estudiado y que las cepas LPV (+) redujeron más lentamente el número de UFC/mL a las 6 horas cuando se realizaron estudios de cinética de muerte.

Las CIMs de los otros AM ensayados para los SAMR tolerantes a VAN fueron categorizadas como sensibles, incluyendo imipenem. Aplicando estudios de cinética de muerte, también todos estos AM fueron bactericidas a las 24 horas. Todas las asociaciones fueron sinérgicas, pero VAN más GEN, más RFA y/o IMI lograron sinergia a las 6 horas, mientras que VAN+CIPRO se obtuvo, en 3 SAMR, a las 24 horas. No hubo efecto antagonista en ninguna de las combinaciones ensayadas.

Se concluye que:

- a pesar del paso del tiempo, en la actualidad cefalotina y vancomicina pueden continuar siendo utilizadas en el Hospital Dr. J. M. Cullen de la ciudad de Santa Fe, tanto como profilaxis como para el tratamiento de las infecciones por SAMS y SAMR, respectivamente.
- para determinar la actividad bactericida de un AM, es recomendable utilizar los estudios de cinética de muerte ya que existieron discrepancias en la detección de las cepas tolerantes según el criterio usado.
- la actividad bactericida de VAN de los aislamientos SAMR-AC estudiados fue independiente de la presencia de LPV.
- las combinaciones de antimicrobianos para tratar infecciones por SAMR tolerantes a VAN, son altamente eficaces por su marcada respuesta sinérgica.
- la técnica para determinar la actividad bactericida de cefalotina usando discos goteados con betalactamasa, preparada en el laboratorio y puesta a punto en esta tesis, resultó fácil y accesible para un laboratorio de microbiología clínica. Dicho método podría reemplazar a los estudios de cinética de muerte para detectar la actividad bactericida de un antimicrobiano, hecho de gran relevancia clínica al seleccionar el tratamiento para las infecciones graves por *Staphylococcus aureus*.

SUMMARY

BACTERIOSTATIC AND BACTERICIDAL ACTIVITIES OF BETALACTAMS AND GLYCOPEPTIDES AGAINST *S. AUREUS* STRAINS OF CLINICAL SIGNIFICANCE. GENOTYPICAL CHARACTERIZATION OF TOLERANT ISOLATES.

The genus *Staphylococcus* belongs to the family *Staphylococcaceae*, phylum *Firmicutes*, domain *Bacteria*. It comprises 36 species y 21 subspecies which are to be found in human mucosa and skin and in others mammalian or birds. They are gram-positive cocci occurring as single cocci, tetrads, short chains or clusters like a bunch of grapes.

They are catalase positive and some species produce the coagulase enzyme. According to the presence or absense of this enzyme the members of this genus may be divided into two large groups. Among the coagulase-positive species, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, commonly known as *Staphylococcus aureus*, is clinically the most important specie. The coagulase-negative *Staphylococcus* species, frequently contaminate clinical specimens but they can also be true pathogens causing infections in immunocompromised patients or associated to the use of prosthetic and indwelling devices.

S. aureus has surface factors and produces proteins responsible for host colonization and disease. It also produces many exoenzymes, membrane proteins (hemolysins y leukocidins) and toxins which are involved in its pathogenic mechanisms. Among the γ hemolysins, the Panton-Valentine leukocidin (PVL) destroys human neutrophils and is associated to tissue necrosis, thus explaining the typical skin and soft tissue (SST) lesions and severe necrotizing pneumonia.

In its genome there are a large number of mobile elements which often carry pathogenic or antimicrobial resistance determinants. They comprise insertion sequences, transposons, virus and pathogenicity (or genomic) islands. The transposons carry both antimicrobial and heavy metal resistance determinants.

S. aureus may cause a wide variety of diseases ranging from superficial skin infections (folliculitis, impetigo, among others) to deep entities (cellulites, abscesses, osteomyelitis, pneumonia, sepsis, endocarditis, etc.).

It may also produce remote diseases originated by toxins or intoxications from contaminated food and drinks which constitute an important public health problem.

The history of this agent includes the evolution of the bacterium itself and the change in their clinical impact due to the virulence factors, their defence mechanisms and its ability to generate resistance to antimicrobials used in clinical practice. In the early '40s, when penicillin was first used, it was the ideal antibiotic. However, during 1948 penicillin-resistant staphylococci (penicillinase production) emerged as a serious hospital problem. Therefore, penicillin derivatives were synthesized to resist the activity of this enzyme known as penicillinase-resistant penicillin (methicillin, oxacillin and its derivatives).

In the early '60s, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) appeared in Europe and spread around the world as a serious epidemiological issue since it was resistant to all beta-lactams. Through this fact, this microorganism was categorized in two groups: methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) and MRSA, with a high clinical impact. Traditionally MRSA was just a nosocomial agent but since the '90s, it emerged as a community pathogen referred to as CA-MRSA. Although MRSA has become the main pathogen, it is surprising that it has not replaced the MSSA infections.

Antimicrobial susceptibility testing is an important challenge for the laboratory. The most pressing problem facing the clinical microbiologist is to find out the best in-vitro technique.

At present, the most frequently used methods are: the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Time-kill studies (TKS) or killing curves (KC)

The identification of bactericidal activity is further complicated by the phenomenon of tolerance, in which organisms that are normally killed by a bactericidal agent are merely inhibited. At present, the tolerance is defined taking into account two criteria: MBC/MIC ratio and TKS.

This thesis analyzed on one hand MSSA strains and on the other MRSA isolates. Strains were obtained from patients attending the Dr. José María Cullen Hospital at Santa Fe city, Argentina. It is important to point out that during 2009-2010, MRSA and MSSA infections reached 44% and 56%, respectively.

The aims for MSSA study were: a) to detect cephalotin (CEP) inhibitory and bactericidal activities, b) to distinguish tolerant strains according to different criteria; c) to analyze the medical record of tolerant MSSA infected patients; d) to analyze genotypically tolerant MSSA strains and, e) to propose a simple technique to determine CEF bactericidal activity.

One hundred and nine MSSA isolates were collected from June 1, 2006 to December 31, 2007. The isolates were unique and consecutive. They were recovered from the following clinical samples: skin and soft tissues (SST) (53,21%), blood (23,85%), bone (9,17%), respiratory samples (8,26%) and others (5,51%).

For each isolate, CEP MIC and MBC were determined by broth macrodilution according to CLSI guidelines (CLSI, 2008c). After that, isolates showing CEP MBC/MIC ratio ≥ 8 were studied by TKS counting survivors at 0, 3, 6 and 24 h of incubation at 35° C (NCCLS, 1999b).

The four tolerant MSSA strains detected by TKS were studied for the presence of *mecA*, *hlg* and *pvl* genes by PCR.

The CEP MIC₅₀ and the MIC₉₀ of the 109 studied MSSA were 0,5 and 1 µg/mL, respectively. The MBC₅₀ was 1 µg/mL and the MBC₉₀, 8 µg/mL. Considering MBC/MIC ratio, 6 MSSA (5,5%) were tolerant and CEP was bactericidal for 84 MSSA (77,1%).

Of the 25 isolates with CEP MBC/MIC ≥ 8 , 4 were tolerant by TKS but 1 of them was not tolerant considering the MBC/MIC ratio. CEP bactericidal activity according to TKS was 99,1%.

None of the 4 tolerant strains by TKS carried the *mecA* gene. Thus it was verified that they were MSSA.

The detection of CEP bactericidal activity against MSSA, was achieved by the development and improvement a simple methodology . Forty two MSSA were selected in the following way: 22 with CEP MBC/MIC ≥ 8 and 20 with MBC/MIC ≤ 2 . CEP, oxacillin (OXA) and cefoxitin (FOX) disks dropped with betalactamase solution (BLS) obtained in the laboratory were used for this assay.

The OXA disk results were better than those obtained with CEF and FOX because it allowed the discrimination of a larger quantity of isolates with CEP MBC/MIC ≥ 8 , minimizing the overlap of MBC/MIC ≤ 2 strains to a mere 10%. These results, in addition to the less time requirement respect to TKS, prove this technique to be extremely useful for clinical microbiology laboratories.

Finally, three medical records of the 4 patients infected with tolerant MSSA strains were analyzed. One of them had to receive higher doses of CEP and a curettage as the patient did not respond to the normal doses. In another patient, multiple CEP treatments could have been responsible for the tolerant strain selection and the vancomycin (VAN) and gentamicin (GEN) combination might not have been adequate. The third patient, had numerous risk factors and therefore, he was susceptible to a more severe infection. The treatment failed not only with ceftriaxone but also with CEP and gentamicin combination, which suggests that CEP tolerance might have contributed to its inefficacy. The patient infected with the PVL (+) tolerant SAMS was a 45 year old man who was admitted in bad condition with a perianal abscess. Beside the antimicrobial therapy, he had to undergo surgery and was discharged from hospital 24 hours after admittance.

The second stage of this thesis focused on MRSA strains. The aims were: a) to detect VAN bacteriostatic and bactericidal activities; b) to distinguish tolerant strains according to different criteria; c) to analyze medical records of MRSA tolerant infected patients, d) to investigate the genomic polymorphism among the VAN-tolerant MRSA isolates, e) to study vancomycin bactericidal activity against CA-MRSA isolates and

its relationship with PVL production and f) to study VAN synergical activity with ciprofloxacin(CIP), gentamicin(GEN), rifampin(RFA) and imipenem(IMI) against VAN-tolerant MRSA isolates by TKS.

One hundred and twelve MRSA were studied during the period from February 25, 2006 to August 16, 2008.

VAN MIC and MBC studies were performed by broth macrodilution (CLSI, 2009a). TKS were used to determine the VAN bactericidal activity, tolerance and synergism with other AM against tolerant MRSA isolates (NCLLS, 1999b).

The VAN MIC_{50/90} were 0,5 and 1 µg/mL, while the MBC_{50/90} were 1 y 8 µg/mL, respectively. The isolates were recovered from the following samples: SST (58,1%), blood (19,6%), bone (16,1%) and others samples (6,2%).

Considering MBC/MIC ratio VAN bactericidal activity was 65,2% and 12 strains (10,7%) were tolerant.

TKS were performed against 39 isolates that showed VAN MBC/MIC ≥ 8 . VAN showed bactericidal activity for 96,4% strains tested, while 4 isolates resulted tolerant (3,6%). Interestingly one of them was not tolerant according to MBC/MIC ratio.

The medical records of patients infected with VAN tolerant strains were retrospectively analyzed. Genomic polymorfism among tolerant isolates was detected by a degenerate-oligonucleotide-primed amplification assay. CA-MRSA isolates were tested for the presence of *pvl* genes by PCR.

From the medical record review it could be determined that one of the isolates was responsible for the patient death and in the other three ones was necessary to use others antimicrobial agents.

The study of the genomic diversity among the four VAN tolerant strains allowed characterization of 2 clones: three strains belonged to clon A and the other to clon B.

It is worth noting that besides the strains analyzed in this thesis, other three MSSA and MRSA strains were studied. Two of them (1 MSSA and 1 MRSA) belonged to clon A and they were time unrelated. A third clon C was found conformed by MRSA 8 (VAN tolerant by MBC/MIC ratio) and time related with VAN tolerant strains by TKS.

VAN bactericidal activity in CA-MRSA was found to be effective in 96% of the isolates, independently from PVL presence. However PVL-carrying strains were found to reduce more slowly the initial inoculum at 6 hours by TKS.

The MIC of the other studied antimicrobial agents against VAN tolerant MRSA were categorized as susceptible, including imipenem (IMI). When TKS were performed, all of them were bactericidal after 24 hours of incubation. All antimicrobial combinations were synergistics, but VAN with GEN, RFA and/or IMI combinations achieved synergistic activity at 6 hours of incubation while the VAN with CIP combination was synergistic at 24 hours against 3 tolerant MRSA. None of the antimicrobial combinations studied were antagonistic.

It is concluded that:

- despite the time elapsed, at present, CEP and VAN may continue to be used in Dr. José María Cullen Hospital at Santa Fe city, Argentina, as well as prophylaxis and treatment of MSSA and MRSA infections, respectively.
- to study antimicrobial bactericidal activity is recommended to use time-kill studies because there were discrepancies in the detection of tolerant strains according to different criteria.
- VAN bactericidal activity against CA-MRSA was independent from the PVL presence.
- antimicrobial combinations to treat VAN tolerant MRSA are highly effective due to its strong synergistic response.

- the technique for detection of beta-lactam bactericidal activity using disks dropped with beta-lactamase solution obtained in laboratory and tuning in this thesis, was easy and accessible for a clinical microbiology laboratory. This method could replace time-kill studies to detect antimicrobial bactericidal activity, this fact being of great clinical relevance when selecting the treatment of serious *S. aureus* infections.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

I.1. PARTE I: STAPHYLOCOCCUS AUREUS

I.1.1. INTRODUCCIÓN

El género *Staphylococcus* ha sido incluido recientemente, en el Volumen III de la segunda edición del Manual Bergey de Bacteriología Sistemática, en la sección de “Bacterias gram-positivas con bajo porcentaje de contenido en G+C”. Este género pertenece a la familia *Staphylococcaceae*, orden *Bacillales*, clase *Bacilli*, phylum *Firmicutes*. Comprende 36 especies y 21 subespecies que están presentes en la mucosa y en la piel de los humanos y de otros mamíferos y aves (Ludwig y col., 2009).

Son cocos gram-positivos (0,5 a 1,5 μm de diámetro) que se presentan aislados o formando parejas, tetradas, cadenas cortas o grupos a modo de racimos irregulares. Es una bacteria anaerobia facultativa. Su mayor velocidad de crecimiento es entre 5 - 25 °C; pero también se puede ver en activa fisión binaria entre 27 y 30 °C. Producen catalasa, lo que los diferencia de los estreptococos y, algunas especies, poseen una proteína llamada “coagulasa” que permite dividir a los integrantes de este género en dos grandes grupos según la produzcan o no (Becker y von Eiff, 2011).

Entre las especies coagulasa positiva la de mayor importancia clínica es *Staphylococcus aureus* ss. *aureus*, denominado comúnmente *Staphylococcus aureus* (Bustos-Martí y col., 2006).

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) ha sido reconocido como un importante agente patógeno durante más de cien años. Alexander Ogston lo aisló por primera vez en 1883 de un absceso quirúrgico y fue quien introdujo el nombre *Staphylococcus* (del griego *staphylé*, “racimo de uvas”) descubriendo el rol de *S. aureus* en infecciones localizadas y en septicemia, incluyendo modelos animales (Ogston, 1883; Howden y col., 2010).

Las especies de *Staphylococcus* coagulasa negativa a menudo, aparecen como contaminantes en los cultivos de muestras clínicas pero pueden comportarse como verdaderos patógenos causando infecciones en pacientes inmunocomprometidos o

cuando se asocian al uso de catéteres o a la presencia de cuerpos extraños (Archer y Climo, 2006).

I.1.2. EPIDEMIOLOGÍA

Como ya se comentó anteriormente, las especies del género *Staphylococcus* son colonizantes habituales de diferentes superficies cutáneas y mucosas. Debido a que el estado de portador es frecuente en la población humana, las infecciones se adquieren cuando el agente accede a un sitio estéril como resultado de un traumatismo o abrasión de la piel y mucosas. El episodio traumático ocasional que permite la entrada del microorganismo puede ser tan mínimo que a menudo pasa desapercibido. Pueden introducirse en forma directa en sitios normalmente estériles durante un acto quirúrgico o un procedimiento médico invasivo (Zeller y Golub, 2011).

También se transmiten de persona a persona ya que hay evidencias de portación nasal. Esta diseminación, en particular los aislamientos que han adquirido resistencia a antimicrobianos, tiene lugar con mayor frecuencia en los hospitales y originan graves problemas en el control de las infecciones (Crum y col., 2006).

I.1.3. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

I.1.3.1. Micromorfología

Mediante coloración de Gram de la muestra directa o del crecimiento de las colonias, se observan cocos gram (+) en pares, tetradas o racimos (Becker y von Eiff, 2011).

I.1.3.2. Cultivo

Desarrolla muy bien en medios disponibles en el laboratorio de microbiología clínica tales como agar nutritivo, agar con 5% de sangre ovina y agar chocolate. Se pueden utilizar además medios selectivos como el agar manitol salado que contiene una alta concentración de cloruro de sodio (10%), manitol y rojo fenol como indicador de

pH; en este medio desarrollan algunas especies, principalmente *Staphylococcus aureus* que crecen en presencia de cloruro de sodio y fermentan el manitol produciendo colonias amarillas. En todos los medios antes mencionados el desarrollo se produce generalmente a las 24 horas de incubación a 35-37°C (Becker y von Eiff, 2011).

I.1.3.3. Identificación

Se utilizan las pruebas bioquímicas que se detallan en las Tablas I.1 y I.2.

Tabla I.1: Pruebas diferenciales para identificar especies de *Staphylococcus coagulasa* positiva (Almuzara y col., 2006)

	Catalasa	Producción de ácido en anaerobiosis a partir de manitol	ADH	Producción de ácido a partir de		
				Xilosa	Trehalosa	Maltosa
<i>S. aureus</i>	+	+				
<i>S. aureus</i> ss <i>anaerobius</i>	-	+				
<i>S. schleiferi</i> ss <i>coagulans</i>	+	-	+	-	-	-
<i>S. lutrae</i>	+	-	-	+	+	+
<i>S. intermedius</i>	+	-	v	-	+	+
<i>S. delphini</i>	+	-	+	-	-	+
<i>S. hyicus</i>	+	-	+	-	-	+

ADH: Arginina dehidrolasa; ss: subespecie; v: variable (11-89% de aislamientos positivos).

Tabla I.2: Pruebas diferenciales para identificar especies de *Staphylococcus coagulasa* negativa (de Paulis y col., 2003).

	Disco de novobiocina (5 µg)	Presencia enzima ureasa	Producción de acidez a partir de D-manosa	PYR	ODC
Más frecuentes					
Grupo <i>S. epidermidis</i>	S	+	+	-	v
Grupo <i>S. haemolyticus</i>	S	-	-	+	-
Grupo <i>S. saprophyticus</i>	R	+	-	-	-
<i>S. lugdunensis</i>	S	v	+	+	+
Grupo <i>S. warneri</i>	S	+	-	-	-
<i>S. schleiferi</i> ss <i>schleiferi</i>	S	-	+	+	-
Menos frecuentes					
<i>S. simulans</i>	S	+	v	+	-
<i>S. capitis</i> ss <i>capitis</i>	S	-	+	-	-
<i>S. cohnii</i> ss <i>cohnii</i>	R	-	v	-	-
Grupo <i>S. cohnii</i> (<i>S. xylosus</i> / <i>S. cohnii</i> ss <i>urealyticum</i>)	R	+	+	v	-

PYR: pirrolidoni-beta-naftilamida; **ODC:** Ornitina decarboxilasa; **S:** sensible; **R:** Resistente; **ss:** subespecie; **µg:** microgramos; **v:** variable (11-89% de aislamientos positivos).

I.1.3.4. Diagnóstico molecular

Este diagnóstico desempeña un papel de importancia creciente tanto en la rápida detección de patógenos microbianos como en la determinación de su perfil de resistencia a los fármacos. Se pueden obtener resultados en pocas horas, en comparación con las más de 24 horas necesarias en las técnicas de fenotipia convencional (François y col., 2007).

Dichos métodos se orientan a identificar genes específicos o a la búsqueda de moléculas específicas que detectan mecanismos de resistencia por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR diagnóstica se basa fundamentalmente en la amplificación de los genes que codifican los ARN ribosómicos 16S y 23S (ARNr) (Ehrenreich, 2006).

El diagnóstico molecular juega un rol importante en el caso de infecciones con cultivos negativos lo que se da con frecuencia en pacientes previamente tratados con antimicrobianos (AM) (Naber y Erbel, 2007).

I.1.4. ETIOPATOGENIA

S. aureus contiene gran cantidad de factores de superficie y secreta numerosas proteínas que intervienen en la colonización del hospedero y en la producción de la enfermedad (Bustos-Martí y col., 2006).

Además de estas características está equipado con sistemas reguladores que detectan las condiciones ambientales y responden a ellas ajustando la expresión de determinantes de virulencia y metabólicos específicos (Traber y col., 2008).

I.1.4.1. Regulación

I.1.4.1.1. El sistema agr

El paradigma de la regulación genética de la virulencia de *S. aureus* es el gen regulador accesorio *agr*. El *agr* funciona como un control sensor de expresiones genéticas dependiente de la densidad bacteriana, permitiendo la expresión preferencial de adhesinas de superficie durante la fase de crecimiento exponencial (densidad celular baja) y pasando a la expresión de exoproteínas durante las fases de crecimiento post exponencial y estacionaria (densidad celular alta). Experimentos genéticos y funcionales han revelado la existencia de al menos cuatro grupos *agr* en *S. aureus* (I a IV) que fueron caracterizados por variaciones específicas en las tres proteínas AgrB, AgrD y AgrC: el transportador-procesador, el proceso del péptido de autoinducción y el receptor, respectivamente (Traber y col., 2008).

I.1.4.1.2. Otros sistemas reguladores

Se han descrito, posteriormente a la detección del *agr*, otros tres sistemas reguladores que afectan a la expresión génica global. Estos sistemas son *sae* (exoproteína de *S. aureus*), *arlS* (sensor del *locus* relacionado con la autólisis) y *srrAB* (respuesta respiratoria estafilocócica). Afectan a la expresión génica tanto en forma directa como indirecta al interferir con el *agr* (Pragman y col., 2007).

I.1.4.2. Determinantes de la superficie celular involucrados en la etiopatogenia

I.1.4.2.1. Biopelícula

Denominado comúnmente *biofilm*. Consiste en una red polisacáridica extracelular que congrega a comunidades bacterianas en una plataforma de cohesión mecánica. Los aislamientos de estafilococos productores de películas o *biofilms* fueron descritos principalmente en especies coagulasa-negativa, implicadas en la colonización de catéteres y biomateriales (Rohde y col., 2010).

I.1.4.2.2. Polisacáridos capsulares

Más del 90% de los aislados de *S. aureus* elaboran cápsulas polisacáridicas de las que se han comunicado 11 serotipos. Las cepas de *S. aureus* con cápsulas de tipo 1 y 2 producen grandes cantidades de polisacáridos y tienen un aspecto mucoso en las placas de cultivo. Sin embargo, es raro encontrarlas en muestras clínicas humanas. Por el contrario, los tipos capsulados 5 y 8 de *S. aureus* son responsables de hasta el 75% de las infecciones clínicas. Las cápsulas de los tipos 5 y 8 están compuestas de varios azúcares, como la manosa y la fucosa, son antifagocitarias y pueden incrementar su virulencia en modelos animales. Los anticuerpos frente a estos tipos capsulares son protectores en sepsis de modelos animales y se detectan anticuerpos naturales frente a ellos en el suero humano. Una vacuna conjugada dirigida contra las cápsulas de tipo 5 y 8 fue eficaz en pacientes de hemodiálisis. Por consiguiente, la cápsula es un constituyente antifagocitario que podría representar una diana prometedora para las vacunas (Daum y Spellberg, 2012; Proctor, 2012).

I.1.4.2.3. Adhesinas de superficie

Le confieren capacidad para unirse a diferentes proteínas del huésped. Se agrupan bajo el acrónimo MSCRAMM (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*). Incluye todas las adhesinas que median la adherencia inicial al tejido del hospedador. La mayoría se unen mediante enlaces covalentes al péptidoglicano de la pared celular. Las MSCRAMM están presentes en todos los aislamientos de *S. aureus*, implicadas en la etiopatogenia, codificadas en el cromosoma y no pertenecen a las islas de patogenicidad (Verkaik y col. 2011).

Las principales proteínas de superficie asociadas a la pared y sus funciones se detallan a continuación (Moreillon y col., 2006; Scott y Barnett, 2006):

- Proteína A (codificada por el gen *spa*): antiinmunitaria y antifagocitaria ya que fija la región Fc de la inmunoglobulina IgG;
- Proteína F: afinidad por el fibrinógeno A y B;

- Proteínas A, B, C, E y F (codificadas por los genes *sasA*, *sasB*, *sasC*, *sasE* y *sasF*): función indeterminada;
- Proteína G (codificada por el gen *sasG*): unión a células de la mucosa nasal;
- Proteínas H, I, J y K (codificadas por los genes *sasH*, *sasI*, *sasJ*, *sasK*): función indeterminada;
- Otras proteínas: se unen al colágeno, a la fibronectina A y B y a la lactoferrina.

I.1.4.2.4. Ácidos teicoicos y lipoteicoicos

Los ácidos teicoicos representan hasta el 50% del peso seco de la pared estafilocócica purificada. Desempeñan un importante papel fisiológico en el metabolismo de la pared celular y es probable que constituyan un punto de unión de enzimas activas y de otras proteínas a la pared celular. No está claro si los ácidos teicoicos tienen un papel directo en la etiopatogenia estafilocócica. No han sido definidos como adhesinas ni desencadenan inflamación por parte del sistema inmunológico innato.

Los ácidos lipoteicoicos son los equivalentes a los teicoicos, ligados a la membrana plasmática. Están asociados a procesos inflamatorios por desencadenar la liberación de citocinas por parte de macrófagos y otros actores del sistema inmunológico innato (Deininger y col., 2007).

I.1.4.3. Enzimas y hemolisinas secretadas

S. aureus produce numerosas exoenzimas, proteínas de membrana (hemolisinas y leucocidinas) y toxinas involucradas en los mecanismos patogénicos (Stevens y col., 2007).

Entre las exoenzimas se encuentran proteasas y lipasas que son destructivas para los tejidos humanos y útiles para proveer nutrientes a la bacteria cuando invade al organismo (Fraser y Proft, 2008).

I.1.4.3.1. Hemolisinas

S. aureus posee un mínimo de cuatro hemolisinas llamadas α , β , γ y δ hemolisinas. La alfa hemolisina tiene efectos letales sobre los polimorfonucleares y eritrocitos. Es dermonecrótica cuando se inyecta subcutáneamente y letal cuando es inyectada intravenosamente. La betahemolisina es una esfingomielinasa. Las γ y δ hemolisinas se encuentran en algunas cepas de *S. aureus* y producen la lisis de distintos tipos de células. La δ hemolisina actúa primeramente como surfactante y también sobre la adenilciclase jugando un rol importante en la producción de diarrea (Stevens y col., 2007).

I.1.4.3.2. Toxina de Panton-Valentine

Se han reportado algunos homólogos de la γ hemolisina. Uno de ellos fue identificado en 1932 por Panton y Valentine. Esta toxina, también llamada leucocidina de Panton-Valentine (LPV) está codificada por dos genes: *lukS* y *lukF*, cuyos productos pueden ensamblarse entre ellos mismos o con los componentes de la γ hemolisina produciendo estructuras quiméricas. La LPV está codificada por un fago móvil que se puede transferir a otras cepas (Panton y Valentine, 1932b).

I.1.4.3.3. Superantígenos

La toxina 1 del síndrome del shock tóxico y las enterotoxinas estafilocócicas son el paradigma de una gran familia de exotoxinas pirógenas llamadas superantígenos (Zhang y col., 2011).

Los superantígenos son proteínas que no activan el sistema inmunológico a través del contacto normal entre las células presentadoras de antígenos y los linfocitos T. En condiciones normales las células presentadoras captan el antígeno, lo hidrolizan y lo presentan en forma de fragmentos peptídicos a los linfocitos T afines. Los superantígenos pueden eludir esta interacción altamente específica. Se unen a una porción externa de los dominios V_{β} de numerosos linfocitos, enclavándolos directamente en los receptores de clase II del complejo principal de histocompatibilidad

de las células presentadoras de antígeno. Este contacto inespecífico activa hasta el 20% del conjunto de linfocitos T en comparación con lo que se activa en una presentación normal de antígeno. La consecuencia es una liberación masiva de citocinas que da lugar a una intensa respuesta inflamatoria y produce un shock parecido al de la endotoxina, incluyendo filtración endotelial, shock hemodinámico, insuficiencia multiorgánica y a veces, la muerte (Fraser y Proft, 2008).

S. aureus puede producir numerosos superantígenos. Además de la toxina 1 del síndrome del shock tóxico produce quince enterotoxinas distintas (enterotoxina estafilocócicas A, B, C_n, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N, O), a las que estudios genómicos han añadido un número similar de homólogos de superantígenos llamados exotoxinas estafilocócicas cuyos nombres van desde 1 a 15 (Aguiar-Alves y col., 2006).

Se incluyen en este grupo las toxinas llamadas exfoliatina A y B, codificadas por los genes *eta* y *etb* respectivamente. Estas toxinas son producidas por *S. aureus* que colonizan la piel y mucosas y causan desde un trastorno cutáneo superficial como una flictena hasta una impresionante escaldadura generalizada, síndrome denominado de la piel escaldada, descrito por primera vez por el médico alemán Baron Gotfried Ritter von Rittershain en 1878 (Bukowski y col., 2010).

I.1.4.3.4. Otras enzimas

S. aureus produce varias enzimas que contribuyen a su virulencia. A continuación se mencionan las principales de ellas y sus funciones:

- Catalasa: inactiva el peróxido de hidrógeno tóxico y los radicales libres formados por el sistema de mieloperoxidasa dentro de los fagocitos después de la ingestión de estas bacterias;
- Coagulasa libre y ligada (esta última también llamada “*clumping factor*”): coagula el plasma y la fibrina y las hace resistente a la opsonización y a la fagocitosis;
- Hialuronidasa: hidroliza la matriz intracelular de los mucopolisacáridos de los tejidos;

- Lipasa: colabora en la diseminación de los microorganismos en los tejidos cutáneos y subcutáneos;
- Nucleasa: posee propiedades endo y exonucleolíticas y puede clivar el ADN y ARN (Tang y col., 2011);
- Fosfolipasa ha sido asociada a aislamientos recuperados de pacientes con síndrome de distress respiratorio en el adulto y coagulación intravascular diseminada (Hayashida y col., 2009);
- Estafiloquinasa es un activador del plasminógeno (Moreillon y col., 2006).

I.1.4.4. Islas de patogenicidad (genómicas) y elementos móviles

Aproximadamente el 50% del genoma de *S. aureus* comparte homología con la bacteria no patógena *Bacillus subtilis* lo que indica que los dos microorganismos son muy parecidos y han evolucionado a partir de un ancestro común. La mayoría de los genes homólogos son determinantes estructurales esenciales, necesarios para el crecimiento y división. Entre los genes divergentes se encuentran los responsables de la esporulación, presentes sólo en *B. subtilis* y los que codifican factores de patogenicidad propios únicamente de *S. aureus* (Dearborn y col., 2011).

Una característica notable del genoma de *S. aureus* es la presencia de un gran número de elementos móviles que, a menudo, portan determinantes patógenos o de resistencia a fármacos. Comprenden secuencias de inserción, transposones, virus e islas de patogenicidad (o genómicas). Las secuencias de inserción pueden desplazarse a través del cromosoma y desactivar o activar los genes diana mediante la interrupción o restitución de marcos de lectura abiertos, o por activación de la transcripción por promotores intrínsecos. A menudo, los transposones son portadores de determinantes de resistencia a antibióticos o a metales pesados (Kuroda y col., 2001).

Las islas de patogenicidad son estructuras continuas que varían en tamaño, de 15 a 70 kb y pueden albergar muchos genes de virulencia o resistencia. Suelen contener

ADN heterólogo, lo que indica su adquisición exógena. Una característica común de estos elementos es que están rodeados por repeticiones directas o inversas y llevan genes de recombinasa. Las repeticiones sirven como sitios de unión (*att*) para su integración en regiones homólogas del cromosoma bacteriano. La recombinasa, a menudo una integrasa, cataliza la integración cromosómica (Tallent y col., 2007).

Previo a disponer de los genomas estafilocócicos completos se describieron diferentes islas de patogenicidad, como por ejemplo SaPI1 y SaPI2 responsables del síndrome de shock tóxico y SaPI3 y SaPI4 que contienen genes que codifican la síntesis de enterotoxinas (Dearborn y col., 2011).

A medida que se descubren nuevas islas se revisa su nomenclatura. Dado que se ha encontrado que contienen otros determinantes diferentes a los de toxinas se propuso denominar a estas islas genómicas como “vSa” en la que “v” significaría isla. Sa sería *Staphylococcus aureus* y los números adicionales harían referencia a su sitio de inserción cromosómico (Diep y col. 2006a).

I.1.5. CUADROS CLÍNICOS

S. aureus puede causar una amplia variedad de enfermedades.

Las infecciones cutáneas localizadas pueden comprometer folículos pilosos (**foliculitis**) y si avanzan hacia la dermis profunda producen **forúnculos**. El **impétigo** afecta la epidermis, se caracteriza por vesículas que se rompen y forman costras y puede afectar a tejidos más profundos provocando **celulitis, abscesos, osteomielitis, neumonías, sepsis y endocarditis** (Diekema y col., 2001).

Además de ocasionar diversos tipos de infecciones en las que el microorganismo está presente en el lugar, *S. aureus* es capaz de originar enfermedades a distancia mediadas por toxinas. Las toxinas pueden ser sintetizadas por estafilococos que colonizan las mucosas o indirectamente por las mismas bacterias presentes en alimentos o bebidas. Un ejemplo de la vía directa lo encontramos en el **síndrome de la piel escaldada** causado por la toxina exfoliativa A o B así como en el **síndrome del**

shock tóxico relacionado con la producción de la toxina 1 o las exotoxinas B o C (Norbury y col., 2010).

Las enfermedades causadas por alimentos constituyen un problema importante de salud pública. La intoxicación alimentaria por *S. aureus* se debe a la ingesta de toxinas liberadas en alimentos o bebidas. Las toxinas son termoestables por lo que no se desnaturalizan con la cocción. La enfermedad comienza a las 2 a 6 horas de la ingesta con malestar general, náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea. Los síntomas revierten en 6 a 12 horas y el pronóstico es muy bueno (Scallan y col., 2011).

La historia de este patógeno incluye evolución de la bacteria misma y cambio en su impacto clínico. Los cambios patológicos relacionados a osteomielitis son conocidos desde las momias egipcias. Además, como ya se ha expresado anteriormente, este microorganismo está dotado de factores de virulencia y mecanismos de defensa que le han permitido adaptarse y sobrevivir en una gran diversidad de entornos manteniendo su patogenicidad y virulencia a lo largo del tiempo (Lew y Waldrogl, 1997).

I.1.6. RESISTENCIA DE *S. AUREUS* A LOS ANTIBIÓTICOS: BREVE RESEÑA

S. aureus es el principal agente de infecciones adquiridas tanto en la comunidad como en el hospital y quizás sea la causa más común de infecciones asociadas a cuidados de la salud en el mundo (Mc Donald, 2006).

A pesar que la mayoría de las infecciones por *S. aureus* son episodios menores de celulitis o abscesos cutáneos; las infecciones graves con toxicidad sistémica severa y muerte súbita no son infrecuentes y la infección estafilocócica hospitalaria ha sido una gran preocupación durante más de un siglo (Noskin y col., 2005).

A principios de los años '40, cuando fue introducida la bencilpenicilina, las infecciones estafilocócicas eran tratadas con este antimicrobiano. Sin embargo, durante 1948 aparecieron aislamientos de *S. aureus* resistentes a este antibiótico, convirtiéndose en un grave problema hospitalario (Kanafani y Fowler, 2006).

Hasta 1960, la resistencia a betalactámicos era debida exclusivamente a la producción de la enzima penicilinas. Con la intención de soslayar este problema fueron sintetizados derivados de penicilinas capaces de resistir la actividad de esta enzima. Estos compuestos se conocen como penicilinas resistentes a penicilinas, entre ellas la meticilina, oxacilina y sus derivados y estuvieron disponibles a finales de la década del '50. Resulta irónico que Jevons describiera el primer aislamiento de *S. aureus* meticilino resistente (SAMR), casi al mismo tiempo (Jevons, 1961).

Estos hallazgos, en un principio, fueron relacionados a curiosidades de laboratorio con dudoso valor clínico a tal punto que el primer fracaso terapéutico de una infección por SAMR pasó desapercibida (Dowling, 1961).

Los primeros brotes de SAMR, documentados microbiológicamente, ocurrieron en hospitales europeos a principios de la década del '60 y desde entonces se han diseminado por todo el mundo (Chabbert y Baudens, 1962).

Estos aislamientos se convirtieron en un grave problema epidemiológico ya que mostraron resistencia a todos los betalactámicos, separando a este patógeno en dos grandes grupos: *Staphylococcus aureus* meticilino sensible (SAMS) y SAMR, lo que tiene un fuerte impacto desde el punto de vista clínico. Si bien SAMR se ha erigido como el principal patógeno, resulta curioso el hecho de que no ha reemplazado a las infecciones por SAMS. Dichas cepas continúan siendo responsables de la mayoría de graves infecciones estafilocócicas, incluyendo endocarditis y pacientes en hemodiálisis (Stryjewski y col., 2007).

En el hospital Dr. José María Cullen de la ciudad de Santa Fe, Argentina, institución de donde se obtuvieron los aislamientos para este estudio, durante los años 2009-2010 las infecciones por SAMR constituyeron el 44% mientras que las producidas por SAMS representaron el 56%.

Entre los SAMS aislados, el 10% correspondieron a infecciones asociadas a respirador en Unidad de Cuidados Intensivos (una infección netamente hospitalaria), el 14% fue aislado a partir de sangre y el 76% produjo infecciones de piel y partes

blandas, muchas de ellas posteriores a cirugías traumatológicas limpias tales como reemplazo de cadera, colocación de otras prótesis y cirugías cardiovasculares.

Esto implica que las infecciones por ambos tipos de *S. aureus* continúan siendo, a pesar del transcurso del tiempo y de la introducción de nuevas drogas antimicrobianas, un problema para el equipo de salud.

I.2. PARTE II: ACTIVIDAD BACTERIOSTÁTICA Y BACTERICIDA

I.2.1. INTRODUCCIÓN

La detección de la sensibilidad antimicrobiana constituye un importante desafío para el diagnóstico del laboratorio debido a que los resultados son usados por los médicos clínicos para establecer los regímenes del tratamiento antibiótico de los pacientes infectados (DeGirolani y Eliopolus, 1987).

El enfoque del laboratorio de microbiología orientado a las pruebas de susceptibilidad así como su relación con el manejo de las enfermedades infecciosas ha sido durante muchos años, objeto de numerosos reportes científicos (Ellner, 1982).

A principios de la década de 1920 comenzó la detección de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos; desde entonces numerosos investigadores han propuesto diferentes y variados métodos (Peterson y Shanholtzer, 1992).

El mayor problema que enfrenta el microbiólogo clínico es determinar cuál es la mejor técnica *in-vitro* que resultará más útil para guiar la terapia (Brown y col., 1991).

Algunas técnicas fueron aplicadas ampliamente y, a lo largo de los años, se han publicado numerosos métodos estandarizados tanto para ensayos de rutina como para investigación (Laverdiere y Sabath 1977; NCCLS, 1987; NCCLS, 1990; CLSI, 2010).

I.2.1.1. Términos históricamente asociados con los ensayos que estudian la actividad de los AM

Diversos términos se han asociado con los ensayos de laboratorio destinados a investigar la actividad de los AM. A continuación se describen los más comúnmente utilizados.

I.2.1.1.1. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Es la mínima concentración de un agente AM que inhibe el crecimiento de las bacterias y es detectado visualmente luego de un período determinado de incubación (generalmente de 18 a 24 horas) (Pankey y Sabath, 2004).

I.2.1.1.2. Concentración Bactericida Mínima (CBM)

Es la mínima concentración de un agente antibacteriano que causa al menos la reducción de 3 log₁₀ en el número de células sobrevivientes (comparada con el inóculo inicial), luego de un período de incubación (generalmente de 18 a 24 horas) (Peterson y Shanholtzer, 1992).

I.2.1.1.3. Título Inhibitorio del suero

Es la máxima dilución (o título) de una muestra de suero tomada de un paciente que está recibiendo terapia antimicrobiana, que inhibe visiblemente el crecimiento del agente infectante, luego de un período de incubación (generalmente 18 a 24 horas). Este test fue descrito por Schlichter and Mac Lean en 1947 (Schlichter y MacLean, 1947).

I.2.1.1.4. Título Bactericida del suero

Es la máxima dilución (título) de una muestra de suero obtenida de un paciente tratado con AM que causa al menos la disminución en 3 log₁₀ del inóculo inicial del agente infectante luego de un período de incubación (usualmente 18 a 24 horas) (NCCLS, 1999a).

I.2.1.1.5. Efecto Paradojal (Fenómeno de Eagle)

Fenómeno aún no explicado donde se observa un aumento de las células sobrevivientes (indicando disminución de la actividad bactericida) a medida que la concentración del antimicrobiano aumenta por encima de la CBM (Eagle y Musselman, 1948; Chait y col., 2007).

I.2.1.1.6. Persistencia

Ocurre cuando una pequeña cantidad de células (usualmente menos del 0,1% o 0,01 % del inóculo inicial) son capaces de sobrevivir al efecto letal del AM betalactámico. Si las células “persistentes” se subcultivan y reensayan, resultan sensibles al antibiótico original desapareciendo su persistencia (Toumanem, 1986).

I.2.1.1.7. Tolerancia

Es el fenómeno mediante el cual agentes normalmente bactericidas (por ej. betalactámicos y/o vancomicina) parecen tener reducida o nula actividad bactericida contra un determinado microorganismo.

Este término fue usado por primera vez por Tomasz y col. (1970) para describir un nuevo tipo cualitativo de resistencia donde la respuesta de la bacteria a drogas que normalmente producían lisis celular era modificada de tal manera que dichos compuestos se transformaban en bacteriostáticos. Este estudio fue realizado con *Streptococcus pneumoniae* (en ese momento denominado *Diplococcus pneumoniae*) frente a penicilina y otros AM. Primitivamente se asoció este mecanismo a la discapacidad de la actividad autolítica de las enzimas bacterianas, aunque podrían existir otros mecanismos (Handwerger y Tomasz, 1985).

Operacionalmente, la tolerancia puede definirse como la habilidad de la bacteria para evadir la acción letal del agente AM sin mostrar cambios en la CIM (French, 2006).

I.2.1.1.8. Curva de cinética de muerte (estudios de tiempo de muerte)

Es una técnica similar a la usada para la CBM excepto que se estudia una única y determinada concentración de AM (generalmente cercana a la media alcanzada en

sangre) y se realizan subcultivos en agar libre de antibióticos, a diferentes tiempos, durante una incubación de 24 horas. El ensayo permite detectar cómo disminuye el número de bacterias viables del inóculo inicial en función del tiempo y, por lo tanto, la actividad bactericida del AM (Peterson y Shanholtzer, 1992).

I.2.1.1.9. Ensayo de Tablero de Damas

Esa técnica fue usada para estudiar la acción de las combinaciones de dos agentes AM (normalmente denominada sinergia) y detectar si la actividad de ambos era mayor o menor que la de cada uno de ellos por separado. Esta técnica es muy compleja y no se utiliza rutinariamente (Bayer y Morrison, 1984).

I.2.2. DEFINICIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERIOSTÁTICA Y BACTERICIDA

I.2.2.1. Agentes bacteriostáticos y bactericidas

Los agentes bacteriostáticos inhiben el crecimiento de la bacteria pero no la matan, mientras que los bactericidas, sí. Sin embargo, estas categorías no son absolutas ya que el efecto de la droga varía con el método de ensayo y el tipo de bacteria en estudio. Existen agentes que pueden ser bactericidas frente a un grupo de microorganismos y bacteriostáticos frente a otros (French, 2006).

La vancomicina, por ejemplo, es usualmente bactericida frente a *S. aureus* pero bacteriostática frente a *Enterococcus* sp. De la misma manera, azitromicina y linezolid son bacteriostáticos para estafilococos pero pueden ser bactericidas para *Streptococcus pyogenes* (Zurenko y col., 1996; Wang y col., 2009).

I.2.2.2. Tolerancia

La determinación de la actividad bactericida se complica por el fenómeno de tolerancia, mediante el cual, microorganismos que son normalmente muertos por un agente bactericida resultan sólo inhibidos. La definición de tolerancia ha sufrido cambios (variaciones) con el transcurso del tiempo.

Sabath y col. (1977) definieron a una cepa como tolerante cuando la relación CBM/CIM es mayor o igual a 32.

Bradley y col. (1978) describieron este fenómeno de dos maneras diferentes:

- 1) cuando una bacteria mostraba una $CIM \leq 1 \mu\text{g/mL}$ y una $CBM \geq 50 \mu\text{g/mL}$ o;
- 2) cuando se obtenía reducción del inóculo inicial a un valor $\leq 99,9 \%$ de los recuentos de cepas viables, después de las 24 horas de incubación en una concentración de antibiótico varias veces mayores a la CIM (Bradley y col., 1978).

Rajashekaraiah y col. (1980) fijaron arbitrariamente la relación $CBM/CIM \geq 16$; posteriormente surgieron otros autores estableciendo valores ≥ 8 , ≥ 100 , etc.

A menudo, se define la tolerancia de una bacteria cuando la relación CBM/CIM de la misma resulta mayor o igual a 32; pero la que se considera de importancia clínica es la tolerancia obtenida por métodos de cinética de muerte (Sader y col., 2006).

Actualmente, distintos autores y diferentes trabajos, definen la tolerancia según consideren la relación CBM/CIM o los estudios de curvas de letalidad. En definitiva, un aislamiento se considera tolerante:

- Cuando la relación $CBM/CIM \geq 32$ o, cuando esta relación es $CBM/CIM \geq 16$ siendo la $CBM \geq$ al valor categorizado como resistente según Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (Traczewski y col., 2009);
- Cuando se obtiene una reducción en $< 3 \log_{10}$ del recuento del inóculo inicial después de 24 horas de incubación a una determinada concentración de AM, según CLSI (NCCLS 1999b) o;
- Cuando la reducción del inóculo inicial es $< 1 \log_{10}$ UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias /mL) después de las 6 horas; esto corresponde a una reducción menor o igual al 90% del inóculo inicial, durante el mismo tiempo (May y col., 1998).

Diversos mecanismos se han asociado con este fenómeno (Vaudaux y Lew, 2006).

Según las condiciones de crecimiento del ensayo, la tolerancia puede ser una respuesta fenotípica reversible. Cualquier situación que produzca una disminución o alteración del desarrollo puede convertir al microorganismo en tolerante a los antibióticos betalactámicos. Esta tolerancia fenotípica es fácilmente producida *in-vitro* si se limita el suministro de los nutrientes esenciales. *In vivo* ha sido demostrada en modelos animales. Es muy probable que este fenómeno ocurra comúnmente, en humanos, durante las infecciones, pero es difícil de determinar (Handwerger y Tomasz, 1985).

Esta tolerancia fenotípica puede también explicar el fenómeno de las “persistentes”, las cuales constituyen una pequeña proporción (aproximadamente 0,1%) de una población bacteriana y constan de células inactivas o que se multiplican más lentamente que la mayoría de esa población. Estas bacterias “persistentes” no son destruidas por los betalactámicos u otras drogas bactericidas ya que desarrollan en los subcultivos en agar, realizados durante las técnicas de CBM y de cinética de muerte. Las persistentes no representan una verdadera subpoblación resistente ya que resultan sensibles si se reensayan (French, 2006).

El “efecto paradójal” o fenómeno Eagle también puede considerarse otro fenómeno de tolerancia que, como se comentó anteriormente, fue descrito por primera vez por Eagle y Musselman en 1948. La muerte de la bacteria varía con la concentración de la droga (Yourassowsky, 1975). A bajas concentraciones de penicilina, ésta puede ser bacteriostática; pero, a medida que la concentración aumenta, comienza la muerte de las bacterias y se incrementa a mayor concentración. Existe, por lo general, una zona de concentración específica en la cual la letalidad es máxima. En la mayoría de los aislamientos, la muerte no aumenta por encima de esa concentración; sin embargo, en algunas especies, incluyendo *S. aureus*, la muerte de las bacterias se reduce a concentraciones mayores de ese valor. Este fenómeno es particularmente común para agentes activos sobre la pared celular. En su publicación original, Eagle y Musselman ensayaron 7 aislamientos de *S. aureus*; 3 de las cuales mostraron este fenómeno. De estos tres, el 99,9 % del inóculo inicial murió a una concentración óptima de penicilina

($\leq 0,128 \mu\text{g/mL}$) dentro de las 6 horas, pero el 13% de este inóculo sobrevivió a las 6 horas a una concentración mayor ($256 \mu\text{g/mL}$) y sólo se logró a esta concentración la muerte del 99,9%, después de 27 horas (Eagle y Musselman, 1948).

Este efecto paradójico no ha sido aún completamente explicado, aunque se han propuesto varias teorías (Blumberg y Strominger, 1974): a) puede tratarse de un efecto fenotípico como resultado de un menor crecimiento a mayor concentración del AM; b) la ausencia del entrecruzamiento de la pared celular a bajas concentraciones de penicilina podría ser necesaria para la lisis celular y esto podría no ocurrir a altas concentraciones cuando la síntesis del péptidoglicano puede ser totalmente inhibida; c) las bacterias poseen múltiples proteínas ligando penicilina (PLP) que varían en sus afinidades por las penicilinas y la inhibición de un componente podría conducir a la muerte celular, mientras que la inhibición de otro podría reducir el grado de letalidad y, finalmente, d) algunas enzimas autolíticas responsables de la muerte celular pueden ser inhibidas a altas concentraciones de penicilinas (Nishino y Nakazawa, 1976; Kohanski y col., 2010).

Voorn y col. (1994) demostraron el fenómeno de tolerancia Eagle provocando una endocarditis en un modelo animal utilizando dos cepas de *S. aureus*, uno no tolerante y su variante fenotípica, tolerante a cloxacilina. *In-vitro* la muerte de la cepa tolerante se obtuvo a una concentración cercana a la CIM pero, paradójicamente, la bactericidia disminuyó a mayores concentraciones. Esto también ocurrió *in vivo*; ya que, mayores dosis de cloxacilina resultaron menos efectivas para reducir el número de bacterias tolerantes presentes en las vegetaciones que el número de las no tolerantes.

El significado clínico de los aislamientos “persistentes” y del efecto paradójico continúa siendo poco claro. De mayor importancia es la tolerancia asociada a cambios genéticos tales como el desarrollo de sistemas autolíticos defectivos que resultan en una reducción de las tasas de muerte en estudios de letalidad (Sabath y col., 1977). Estos efectos son más accesibles que la tolerancia fenotípica para ser estudiados, tanto *in-vitro* como *in-vivo*.

Voorn y col. (1992) realizaron también otros experimentos en endocarditis de ratas producidas por *S. aureus* tolerantes y no tolerantes a cloxacilina, tanto para tratamiento como para profilaxis. Estos autores demostraron que la cloxacilina es menos efectiva para cepas tolerantes que para no tolerantes ya sea para el tratamiento o para la profilaxis. Existen también estudios clínicos en humanos que reportan que las infecciones por *S. aureus* tolerantes a betalactámicos responden menos a las terapias que los no tolerantes (Safdar y Rolston, 2006). Sin embargo, las dificultades para definir la tolerancia en estos casos hace que el real significado clínico de este fenómeno sea incierto.

I.2.2.3. Modo de acción de la actividad bactericida

La actividad bactericida de un AM frente a un organismo en particular, tiende a estar relacionada a su mecanismo de acción (Finberg y col., 2004). En general los agentes que destruyen la pared o la membrana celular o interfieren con las enzimas bacterianas esenciales son probablemente bactericidas mientras que aquellos que inhiben la función del ribosoma y la síntesis proteica tienden a ser bacteriostáticos (French, 2006).

I.2.3. INVESTIGACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA

I.2.3.1. Métodos *in-vitro*

Los métodos que actualmente se usan para determinar la actividad bactericida *in-vitro* incluyen la CBM, curvas de cinética de muerte y ensayo de la actividad bactericida del suero. Todos estos métodos tienen dificultades técnicas y son relativamente poco reproducibles (Pankey y Sabath, 2004).

El CLSI (ex National Committee Clinical Laboratory Standards) (NCCLS) ha publicado métodos estandarizados para la realización de algunos de estos ensayos (NCCLS, 1999a; NCCLS, 1999b).

I.2.3.2. CBM

Como ya se comentó, la CBM es la mínima concentración de AM que mata al microorganismo. Se determina subcultivando, todos los tubos por encima de la CIM, sobre un medio de cultivo agarizado libre de antibióticos. La CBM es la máxima dilución que produce una reducción del 99,9 % del inóculo inicial dentro de las 24 horas. Un agente es considerado bactericida cuando la CBM para ese AM es 2 a 4 veces la CIM. Sin embargo, la CBM está sujeta a variaciones surgidas de la aplicación de las técnicas y tiene algunas limitaciones teóricas.

Esto se debe a que las determinaciones de la CBM son generalmente realizadas con cultivos en fase de crecimiento logarítmico y en las infecciones clínicas, el crecimiento puede ser más lento con lo que la actividad bactericida de los agentes puede perderse o reducirse (Kim y Anthony, 1981). Aunque la CBM puede sugerir una actividad bactericida general, los estudios de cinética de muerte dan una medición significativamente más importante.

I.2.3.3. Estudios de cinética de muerte

En estos ensayos los caldos que contienen diluciones del AM en estudio se cultivan con un inóculo estandarizado del microorganismo y se determina la muerte de los mismos por recuento de los sobrevivientes en placas de medio de cultivo agarizado libres de antibiótico, a distintos intervalos de tiempo (Levison, 2004).

Este método puede ser usado durante el desarrollo de una droga determinando:

- a) si un agente es bactericida (cuando muere el 99,9 % o se reduce en $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL el recuento del inóculo inicial) o bacteriostático (cuando hay una reducción $< 3 \log_{10}$ UFC/mL) para las distintas especies en estudio;
- b) si la droga es concentración o tiempo dependiente;
- c) si algunos aislamientos que normalmente se lisan desarrollan tolerancia y
- d) el efecto de combinaciones de AM (French, 2006).

Los estudios de cinética de muerte han demostrado que los agentes activos sobre la pared celular, tales como betalactámicos y vancomicina con aminoglucósidos (AG)

son sinérgicos debido a la mejor penetración de los AG. Estudios recientes han demostrado también que gentamicina actúa sinérgicamente con vancomicina en SAMR, tema que será objeto estudio de esta tesis (Shelburne y col., 2004).

I.2.4. RESISTENCIA Y TOLERANCIA DE *S. AUREUS* A VANCOMICINA

Los glicopéptidos, principalmente vancomicina y teicoplanina tienen un rol primordial en la terapia de las infecciones por SAMR. Existe, por lo tanto, un considerable interés en la emergencia de diversas formas de resistencia y tolerancia a estos agentes. Estos fenómenos son complejos, pueden aparecer en algunos aislamientos y su significado clínico es incierto. Sin embargo, la resistencia a gluco péptidos en SAMR tiene una importancia potencial y puede comprometer su tratamiento en un futuro (Appelbaum, 2006).

I.2.4.1. Resistencia de *S. aureus* a vancomicina

S. aureus es usualmente inhibido por concentraciones de vancomicina (VAN) de 0,5-2 $\mu\text{g/mL}$. Los aislamientos con CIM de VAN de 8 a 16 $\mu\text{g/mL}$ se denominan *S. aureus* con sensibilidad intermedia a la VAN (VISA) y los que poseen $\text{CIM} \geq 32$ $\mu\text{g/mL}$, se consideran resistentes a VAN (VRSA). Tanto VISA como VRSA muestran sensibilidad reducida a teicoplanina, por lo que se puede referir a ellos como *S. aureus* con sensibilidad intermedia o resistente a gluco péptidos (GISA o GRSA) (Howden y col., 2010).

I.2.4.1.1. *S. aureus* resistentes a VAN

Estos aislamientos, hasta el momento, son raros. En Estados Unidos de Norteamérica (EEUU) sólo se han reportados nueve casos de VRSA; se informaron dos más (uno en India y otro en Irán) pero estos últimos no fueron confirmados en un centro de referencia. Todas estas cepas eran meticilino-resistentes y la resistencia a VAN estaba codificada por el transposón *vanA*, probablemente adquirido de *Enterococcus* resistente a VAN (ERV). Esto indica que aunque este mecanismo es significativo, no

evoluciona ni se expande rápidamente (CDC, 2002; Aligholi y col., 2008; Saha y col., 2008; Foucault y col., 2009).

I.2.4.1.2. *S. aureus* con resistencia intermedia a vancomicina

La resistencia intermedia a VAN se asocia con una variedad de alteraciones en la estructura de la pared y en el metabolismo. Esto resulta en paredes celulares más finas con reducido entrecruzamiento del péptidoglicano que atrapa o secuestra las moléculas del AM impidiendo su función (Cui y col., 2000; Hiramatsu, 2001; Walsh y Howe, 2002; Pillai y col., 2009).

Los primeros VISA detectados, se reportaron en Japón. Una cepa Mu50, demostró verdadera sensibilidad intermedia homogénea a VAN, con CIM=8 µg/mL por el método de microdilución en caldo (Hiramatsu y col., 1997b).

Una segunda cepa Mu3 tuvo resistencia heterogénea (hVISA): cuando crecía en un medio libre de droga, Mu3 producía subpoblaciones con distintos grados de resistencia a VAN; pero, cuando crecía en presencia de VAN (≥ 8 µg/mL) Mu3 producía subclones con CIM de VAN = 8 µg/mL, en una frecuencia mayor o igual a 10^6 UFC/mL. En 1996, un estudio de vigilancia de más de 1000 SAMR provenientes de 203 hospitales japoneses, no encontró resistencia homogénea a VAN. Sin embargo la prevalencia de SAMR heterogéneamente resistente a VAN fue del 10 al 20% en hospitales universitarios y del 1% en los no universitarios (Hiramatsu y col., 1997a).

Desde la primera aparición de VISA en Japón, estos aislamientos fueron encontrados en todo el mundo generalmente en pacientes con fracasos al tratamiento con VAN bajo presión selectiva de este AM. Estas cepas mostraron CIM más bajas cuando fueron reestudiadas (CIM = 2 µg/mL) demostrando la naturaleza inestable de este fenotipo de resistencia ya que tuvieron una tendencia a reducir la CIM cuando se removió la presión selectiva de VAN. En los últimos años se ha demostrado gran interés en los resultados de la CIM a VAN (dentro del rango sensible) para predecir la mejoría clínica en pacientes con infecciones graves por *S. aureus*. En general, estos estudios han detectado un mayor fracaso frente a cepas con CIM dentro del rango sensible, pero con

valores más elevados. Se deduce claramente que, dada la variabilidad de los resultados obtenidos con diferentes métodos, es necesario conocer la técnica usada para predecir la mejoría clínica en función de la CIM de VAN (Lodise y col., 2008).

Las infecciones que involucran a los aislamientos h-VISA causan graves problemas. Dichas cepas son sensibles *in vitro* a VAN (CIM < 2 µg/mL) y por lo tanto se clasifican como sensibles según CLSI, pero contienen subpoblaciones (generalmente 1 en 10⁶ UFC/mL) que pueden crecer en presencia de 4 µg/mL de VAN, lo que los categoriza como de sensibilidad intermedia (Satola y col., 2011).

Aunque la real prevalencia de hVISA se desconoce, los datos obtenidos de un limitado número de estudios oscilan entre 1,3% a 27% de todos los SAMR. Debido al incremento de fracasos terapéuticos reportados en pacientes infectados con h-VISA, adquiere gran importancia disponer de un método exacto y práctico para su detección.

I.2.4.2. Tolerancia de *S. aureus* a vancomicina

La tolerancia de *S. aureus* a VAN ha sido reportada en numerosos estudios (May y col.1998). Sabath y col. (1977) en su trabajo original, describieron tolerancia de *S. aureus* a betalactámicos y que la mayoría de las cepas demostraron tolerancia cruzada a VAN.

Los aislamientos tolerantes a VAN son en general, tolerantes también a teicoplanina. La tolerancia de *S. aureus* a dichos AM no se investiga rutinariamente, por lo que su incidencia se desconoce. Sin embargo, este fenómeno parece ser más común en SAMR que en SAMS y en aislamientos causantes de endocarditis y bacteriemia (Aguilar y col., 2009).

I.2.4.2.1. Significado clínico de tolerancia a la VAN en *S. aureus* y su relación con la resistencia intermedia

Existe evidencia de fracasos terapéuticos con VAN en pacientes infectados con cepas h-VISA (Hiramatsu y col., 1997b; Bae y col., 2009). Sin embargo, dichos

aislamientos no son comunes en la mayoría de los pacientes que fracasan con el tratamiento con dicho AM y se han curado exitosamente con agentes alternativos tales como linezolid o con la asociación rifampicina más ácido fusídico (Neoh y col., 2007).

De igual manera, diferentes estudios y reportes de casos clínicos documentaron pobre respuesta al tratamiento con VAN en endocarditis y bacteriemia causadas por *S. aureus* tolerantes a este AM y la necesidad de usar agentes adicionales para producir actividad bactericida (Appleman y Citron, 2010).

Sakoulas y col. (2004) intentaron encontrar una relación entre las propiedades microbiológicas de SAMR aislados de pacientes bacteriémicos y la eficacia de VAN en su tratamiento. Para ello determinaron la CIM de VAN de 30 aislamientos y encontraron que variaba entre $<0,5$ a $2 \mu\text{g/mL}$ (categoría sensible); también estudiaron la actividad bactericida de este AM. Estos autores concluyeron que existe un significativo riesgo de fracaso en el tratamiento de la bacteriemia por SAMR con VAN cuando los aislamientos muestran CIMs más elevadas, aún cuando estas estén dentro del rango sensible y, además, que se puede pronosticar mejoría clínica con datos obtenidos por ensayos *in vitro* de la actividad bactericida de VAN.

De manera similar, Domenech y col. (2004) demostraron en una peritonitis de un modelo animal que la actividad bactericida de glucopéptidos disminuye significativamente *in-vivo* con pequeños aumentos de la CIM de VAN frente a *S. aureus*.

Este hecho permitiría suponer que las cepas SAMR, ante la presión de la terapia con VAN, evidencian un aumento de las CIMs de VAN si se trata de aislamientos sensibles o se tornan cepas con sensibilidad intermedia, homogéneas o heterogéneas o se detecta la aparición del fenómeno de tolerancia a dicho AM. Estos cambios se asociaron a variaciones genéticas, incluyendo el gen regulador accesorio *agr*. Este operón regula varios pasajes metabólicos aumentando la producción de factores de virulencia tales como toxinas extracelulares y disminuyendo los que están asociados a la célula tales como las adhesinas. También controla la expresión de autolisinas. Sakoulas y col. (2004) observaron una significativa asociación entre la pobre respuesta a la

terapia con VAN y el *agr* grupo II de SAMR, sugiriendo que la pérdida de la función *agr* beneficia la supervivencia de SAMR y su capacidad para resistir la acción del glucopéptido (de Sanctis y col., 2011).

Otros trabajos demostraron que en algunas cepas VISA la tolerancia a la VAN resulta, de la desregulación de la actividad del gen de la autolisina, producida por otros mecanismos. Sin embargo es importante tener presente que se necesita un mayor número de trabajos para definir el rol de las mutaciones de los genes que conducen a una gama de fenotipos adaptativos de resistencia a VAN, incluyendo héteroresistencia y tolerancia (Utaiida y col., 2006).

Jones (2006) ha ensayado la prevalencia y el significado de la tolerancia a VAN de *S. aureus* mediante el proyecto SENTRY de vigilancia global. Recolectaron más de 35.000 aislamientos entre 1998 y 2003 (5000 a 7000 por año) y no encontraron aumento de la resistencia a VAN durante el desarrollo del estudio (no hubo “corrimiento de la CIM”). La proporción de aislamientos con $CIM > 2 \mu\text{g/mL}$ osciló entre 0 a 0,1% y no hubo aislamientos con $CIM > 4 \mu\text{g/mL}$. Jones estudió, además, separadamente 17 VISA, 88 h-VISA y 3 VRSA y 105 SAMR *wild type* (wt). Definió la tolerancia cuando la relación $CBM/CIM \geq 32$ o $CBM/CIM \geq 16$ con CBM de VAN $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ y, aplicando este criterio, encontró que el 15% de SAMR-wt fueron tolerantes, mientras que el 74% de h-VISA y el 100% de VISA y VRSA resultaron tolerantes.

Estos hallazgos indican que las CIMs de VAN no están en aumento y que los aislamientos VISA aún son poco habituales. Sin embargo la tolerancia es muy frecuente entre los h-VISA. Jones sugiere que los aislamientos con $CIM > 2 \mu\text{g/mL}$ tienen alta probabilidad de ser tolerantes a VAN y pueden tener poca respuesta al tratamiento con glucopéptidos (Jones, 2006).

I.2.5. IMPORTANCIA CLÍNICA DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA

Las infecciones graves, a menudo no se curan sólo con AM; a veces requieren drenajes o remoción del material infectado y un sistema inmune competente. Sin

embargo, la terapia AM es frecuentemente esencial para la evolución rápida mediante la erradicación o reducción de la carga bacteriana (Brunton, 2006).

La mayoría de las infecciones responden tanto a agentes bacteriostáticos como bactericidas, pero teóricamente la muerte bacteriana produce una resolución más rápida de la infección y una mejor evolución clínica (Finberg y col., 2004; Pankey y Sabath, 2004). Esta rápida eliminación del patógeno podría reducir también la emergencia de resistencia y la diseminación del agente infectante (Aguilar y col., 2008).

Aunque los beneficios teóricos de la muerte bacteriana son ampliamente aceptados, existen limitados datos que demuestren la superioridad de los agentes bactericidas en la práctica clínica. En parte, esto es debido a que la mayoría de las infecciones graves son tratadas actualmente con drogas únicas o combinaciones de drogas con acción bactericida y no se han realizado comparaciones con agentes bacteriostáticos. Existen algunos estudios de infecciones por bacterias gram positivas (incluyendo SAMR) donde se demostró que linezolid (bacteriostático) ha sido tan eficaz como los glucopéptidos: VAN y teicoplanina (bactericidas) (Wilcox y col., 2004).

Los ensayos clínicos randomizados no incluyen usualmente infecciones severas que podrían beneficiarse con una muerte rápida de los agentes etiológicos, ni tampoco investigan cepas tolerantes; en cambio hay un significativo número de otros trabajos que tienden a sustentar el punto de vista de que se logra una mejor evolución con terapia bactericida en determinadas situaciones. Estos estudios incluyen: infección en modelos animales, evidencia de mejora en pacientes con neutropenia febril o endocarditis, fracasos en tratamientos de meningitis donde la actividad bactericida de un betalactámico ha sido inhibida por la adición de un agente bacteriostático, fracasos terapéuticos con VAN o evolución más lenta en infecciones por SAMR, *S. pneumoniae* u otras especies de *Streptococcus* tolerantes a VAN (French, 2006).

I.2.5.1. Bacteriemia y endocarditis

Las bacterias pueden alcanzar concentraciones elevadas ($10^8 - 10^{10}$ organismos por gramo de tejido) en las vegetaciones cardíacas. Frente a esta densidad de bacterias,

el metabolismo y la división celular se ve reducida, lo que las hace menos sensibles a los efectos bactericidas de los agentes que actúan sobre la pared celular. Las bacterias están inactivas, son cubiertas por fibrina, plaquetas y posiblemente material calcificado.

Las bacterias sensibles a diversos antibióticos en la mayoría de las situaciones clínicas, resultan resistentes en los casos de endocarditis. A menudo se logra la cura clínica, pero se requiere administrar dosis relativamente altas y por períodos prolongados de agentes bactericidas, para lograr la esterilización de la vegetación (Pankey y Sabath, 2004).

A mediados de la década de 1980, un estudio de pacientes con bacteriemia por gram-negativos, principalmente con cáncer, demostró que la respuesta clínicamente exitosa estaba asociada con un título bactericida del suero $\geq 1:16$ en pacientes neutropénicos, mientras que en los no neutropénicos se requerían títulos $\geq 1:8$ (Sculier y Klastersky, 1984).

Debido a que la sepsis en neutropénicos se trata con agentes bactericidas, es que no se han encontrado otros ensayos actualizados que comparen datos de regímenes bactericidas con bacteriostáticos.

Gonzalez y col. (1999) reportaron en un estudio de pacientes con neumonía por *S. aureus* que, cuando el agente era meticilino sensible y se trataba con VAN tenían una mortalidad mayor, estadísticamente significativa, que aquellos tratados con cloxacilina. Las razones de esta diferencia en la evolución clínica del paciente aún no han sido completamente dilucidadas pero las posibilidades incluyen actividad bactericida más lenta y pobre penetración en el tejido pulmonar del AM en estudio.

Safdar y Rolston (2006) demostraron que en pacientes con endocarditis por *S. aureus*, la terapia bactericida produjo una mejoría clínica y cura microbiológica más rápida, resultando una mortalidad significativamente menor que cuando se empleaban AM bacteriostáticos. Por su parte Small y Chambers (1999) notaron que en un grupo de drogadictos endovenosos con endocarditis por SAMS, la respuesta clínica fue peor con VAN que con nafcilina. Estudiaron además, otros 11 trabajos mostrando similares

problemas con VAN en este tipo de pacientes y sugirieron que las diferencias podrían deberse a la lenta actividad bactericida de VAN con *Staphylococcus* sp. (Lodise y col., 2007).

I.2.5.2. Meningitis

Se considera que los AM utilizados para el tratamiento de la meningitis deben ser bactericidas no sólo por la necesidad de erradicar lo más rápidamente posible la bacteria sino también por la pobre respuesta inmunológica del sistema nervioso central. Sin embargo, la penetración de los AM en el líquido cefalorraquídeo es escasa o variablemente dependiente del grado de inflamación de las meninges. Algunos antibióticos considerados bacteriostáticos tales como tetraciclinas, cloranfenicol, linezolid y trimetoprimasulfametoxazol, penetran eficientemente y han sido usados exitosamente para tratar las meningitis por bacterias gram-positivas (Zeana y col., 2001; Ponessa y col., 2006).

Rodriguez y col. (2004) observaron que, durante los 30 días posteriores al tratamiento de pacientes con meningitis causadas por *S. pneumoniae* tolerantes a VAN, tuvieron peor evolución clínica que los infectados por cepas no tolerantes.

En el reporte de un caso, la tolerancia a VAN se asoció con la recaída de la meningitis neumocócica; a pesar de la terapia adecuada que se había implementado con betalactámicos y VAN. Este fracaso de la terapia con VAN en meningitis causadas por aislamientos tolerantes a dicho AM, explica la falta de éxito al aplicar una terapia bacteriostática en infecciones meníngeas y enfatiza la importancia del uso de AM bactericidas en estas situaciones clínicas (Moscoso y col., 2010).

I.2.5.3. Osteomielitis

Debido a la pobre penetración de los AM en el hueso por la disminución de la circulación sanguínea, sería lógico pensar en un agente bactericida para el tratamiento de la osteomielitis; sin embargo, clindamicina, que es un AM bacteriostático logra altas concentraciones en hueso y se considera un buen agente para el tratamiento de estas

patologías por bacterias gram-positivas. El éxito del tratamiento está determinado, además, por una correcta desbridación quirúrgica y la elección de un AM al cual el agente es sensible más que bactericida. El fracaso del tratamiento en el humano se relaciona a la falla del AM en alcanzar el lugar de los microorganismos infectantes donde hay tejido necrótico o un cuerpo extraño (prótesis). Existe limitada evidencia que compruebe que un régimen bactericida sea ventajoso para el tratamiento de la osteomielitis cuando el AM empleado no puede penetrar al hueso (Conterno y da Silva, 2009).

La osteomielitis es producida frecuentemente por *S. aureus* y actualmente se observa un incremento en las causadas por SAMR. En estudios realizados a mediados de los '80, en las osteomielitis agudas o crónicas, los títulos del suero de los pacientes con niveles bactericidas predecían la cura clínica o el fracaso. Actualmente el tratamiento de la osteomielitis es casi siempre con altas dosis de agentes bactericidas o con combinaciones de drogas (Weinstein y col., 1987).

1.2.5.4. Actividad reducida por el desarrollo de resistencia

Si los patógenos son destruidos más que inhibidos, los mutantes que podrían emerger por la presión selectiva del AM serían eliminados. Por ejemplo, el fracaso para erradicar una bacteria del tracto respiratorio puede ocasionar la diseminación de clones resistentes entre pacientes y a toda la comunidad (Stratton, 2003).

Recientemente el concepto de la prevención de mutantes resistentes y la ventana de selección de mutante han sido usados para investigar la relación entre la exposición a la droga y el desarrollo de resistencia. Drlica y col. (2009) observaron que la selección de mutantes resistentes de *S. aureus* a las fluoroquinolonas se producía exclusivamente en un rango específico de concentraciones. La concentración inferior estaba cercana al valor de la CIM mientras que la superior se situaba en el límite para el cual dejaban de aparecer mutantes resistentes. A este rango lo denominaron “ventana de selección de mutantes” y a la concentración que impide el crecimiento de mutantes, “concentración que previene la aparición de mutantes resistentes” (CPM). El valor de la CPM quedó

también definido como la CIM de los mutantes resistentes del primer escalón en una población bacteriana sensible (Silver, 2011).

Firsov y col. (2008) demostraron en un modelo dinámico *in vitro* que, mutantes de *S. aureus* resistentes a fluorquinolonas eran selectivamente enriquecidas cuando las concentraciones de antibiótico caían dentro de la ventana de selección de mutante (período de exposición que está por encima de la CIM, pero debajo de la concentración de prevención de mutante). Estos mismos autores reportaron que la selección de mutantes resistentes a daptomicina (lipopéptido) y a VAN ocurre a concentraciones que caen dentro de la ventana de selección de mutantes, pero no a concentraciones por fuera de ella (Firsov y col., 2005).

I.2.6. DEFINICIONES DE PUNTOS DE CORTE PARA SENSIBILIDAD Y RESISTENCIA

Los “puntos de corte” (PC) constituyen una parte integral de la práctica del laboratorio de microbiología moderno y se usan para definir la sensibilidad y resistencia a los AM. Según el método de estudio aplicado, se expresan como concentración (en mg/L o µg/mL) o como diámetro de zona (mm). En general, todos los métodos de ensayo de susceptibilidad requieren PC, denominados también “criterios de interpretación” mediante los cuales los resultados de los ensayos pueden ser interpretados como “sensibles”, “intermedios” o “resistentes” e informados de esta manera.

Es reconocido que algunos especialistas pueden no sólo solicitar los PC, sino que utilizan también la CIM y el conocimiento de la farmacodinamia de un AM para optimizar la selección y la dosis del mismo.

Sin embargo, dado el volumen de muestras que procesa un laboratorio de microbiología clínica y la diversidad de médicos a los que presta servicio, la interpretación en categorías de los resultados de las pruebas de sensibilidad es una necesidad práctica, preferida por la mayoría de los clínicos tratantes (Turnidge y Paterson, 2007).

El término “punto de corte” ha sido usado de diversas formas en la literatura. (Wikler y Ambrose, 2005).

La **primera** y más obvia de ellas se refiere a la CIM para un dado AM ya que distingue una *wt* de las que han adquirido o seleccionado mecanismos de resistencia.

Estos se denominan: PC *wild type* o a menudo “**PC microbiológicos**”. Estos datos provienen de determinaciones de CIM *in-vitro* de un gran número de aislamientos, los suficientes como para describir la población salvaje. En este contexto se define al “**aislamiento salvaje**” como la bacteria que no alberga ninguna resistencia a un AM estudiado en particular o al grupo de AM con el mismo mecanismo de acción (Turnidge y Paterson, 2007).

La **segunda forma** es la denominada “**PC clínicos**” que hace referencia a aquellas concentraciones (CIMs) que separan los aislamientos entre los que tienen alta probabilidad de éxito terapéutico, de las bacterias donde el tratamiento puede fracasar. Estos PC provienen de estudios con humanos, comparando la mejoría clínica de los pacientes con las CIMs del agente patógeno (Wikler y Ambrose, 2005).

El **tercer uso** del término PC se refiere a las concentraciones calculadas a partir del conocimiento de los parámetros farmacodinámicos y de los que se predicen *in vivo*. Estos son los **PC farmacocinéticos/farmacodinámicos** (PK/PD) donde los datos se generan en un modelo animal y son extrapolados a los humanos aplicando técnicas matemáticas o estadísticas (Turnidge y Paterson, 2007).

I.2.6.1. Definiciones de categorías de sensibilidad

Los PC se usan para definir “sensibilidad” y “resistencia”. Existe una tercera categoría: “intermedia”. Esta categoría tiene múltiples propósitos: a) proveer de una categoría reguladora entre las categorías sensible y resistente a fin de prevenir errores de interpretación serios; b) implica que el microorganismo es sensible si el AM se concentra en el sitio de la infección (por ejemplo, orina) o c) sugiere que mayores dosis de AM podrían ser usados con seguridad para lograr eficacia del tratamiento.

Las definiciones *in-vitro* son: **sensible (S)**, cuando el crecimiento de la bacteria es inhibido por el agente antibacteriano a la concentración encontrada para los aislamientos salvajes; **resistente (R)**, el crecimiento de la bacteria es inhibido por una concentración mayor que la correspondiente a la del aislamiento salvaje, definiéndose como **aislamiento salvaje** a la bacteria que no lleva o no ha adquirido mecanismos de resistencia, especialmente atribuibles a mutación, adquisición de ADN extraño, bomba de eflujo, desregulación de la producción del sitio blanco o cualquier combinación de estos (Turnidge y Paterson, 2007).

Las definiciones PD y PC clínicos son: **sensible**, cuando la bacteria es inhibida a una concentración de AM asociada a alta probabilidad de éxito terapéutico, **intermedia**, cuando es inhibida por una concentración de antibacteriano cuyo efecto terapéutico es incierto y **resistente**, cuando la bacteria es inhibida a una concentración con alta probabilidad de fracaso (Dalhoff y col., 2009).

Aunque estas definiciones resultan atractivas, no incluyen todas las categorías de sensibilidad. Otro grupo mayor de definiciones está dado por el CLSI. Para este organismo “**sensible**” implica que los aislamientos son inhibidos a las concentraciones de AM que usualmente se obtienen en el sitio de la infección a la dosis recomendada. La categoría “**intermedia**” incluye aquellos aislamientos con CIMs que se aproximan a niveles alcanzables en sangre y tejidos y para las que la respuesta puede ser menor que para los microorganismos sensibles. Esta categoría implica eficacia clínica en sitios donde las drogas se concentran fisiológicamente (por ejemplo quinolonas y betalactámicos en orina) o cuando se usa una dosis mayor. Incluye también una “zona gris” donde factores técnicos no controlados pueden causar discrepancias en las interpretaciones, especialmente para AM con estrechos márgenes de farmacotoxicidad. La categoría “**resistente**” significa que los aislamientos no son inhibidos a las concentraciones que se logran con dosis normales y/o que poseen CIMs que caen en el intervalo donde existen mecanismos de resistencia probables (tales como betalactamasas) y que no se ha demostrado la eficacia clínica en estudios de tratamientos (CLSI, 2007).

I.2.6.2. Organizaciones que establecen puntos de corte

Los procesos mediante los cuales se determinan los PC varían ampliamente según los métodos de sensibilidad utilizados.

Sólo dos grupos internacionales, European Comité for Antimicrobial Susceptibility (EUCAST) y CLSI, han publicado guías acerca de qué datos son requeridos y cómo se aplican los PC. La Administración de Alimentos y Drogas de Estado Unidos (EEUU), conocida como FDA, establece PC para antibacterianos en el momento de su aprobación para ser usados (EUCAST, 2000; CLSI, 2001).

Desafortunadamente los PC determinados por las diversas organizaciones pueden diferir, creando confusión para los microbiólogos clínicos, para los fabricantes de equipos e insumos usados para determinar sensibilidad y para los médicos.

I.2.6.3. Criterio farmacológico

Es el más utilizado, tiene en cuenta la concentración de ATB necesaria para inhibir al microorganismo (CIM), con relación a las concentraciones séricas alcanzadas en un tratamiento con dosificación habitual. Por lo tanto, si la CIM es mayor que los niveles que pueden alcanzarse en suero, ese microorganismo será resistente.

En la última década, este concepto se ha enriquecido con la utilización de parámetros que combinan datos farmacocinéticos y farmacodinámicos que proveen mayor información para el uso más racional de los AM (Nicola, 2008).

Los parámetros más conocidos son:

- **C_{máx}/CIM**: representa el número de veces que la concentración sérica máxima alcanzada por el AM, supera la CIM del mismo, para esa bacteria. Este parámetro es el mejor predictor para los AM concentración-dependiente, por ejemplo quinolonas y aminoglucósidos (Figura I.1).

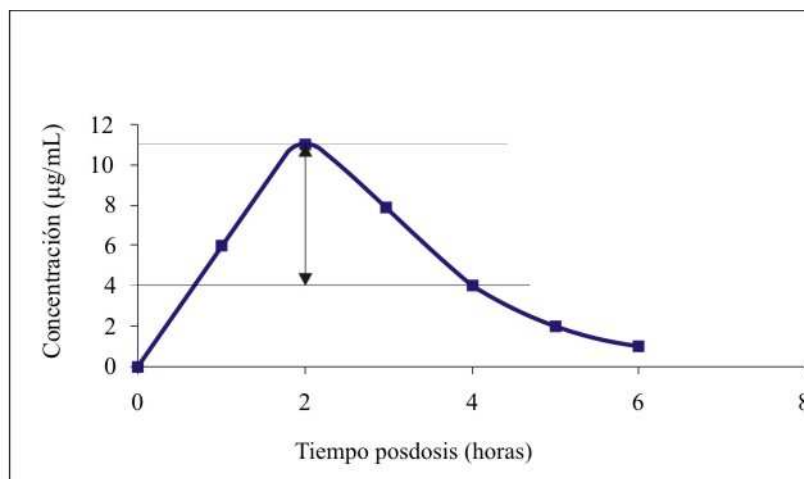


Figura I.1: Representación gráfica de la curva de concentración de un AM en función del tiempo. Se observa que la concentración máxima (C_{max}) alcanzada es 11 µg/mL a las 2 horas de administrado el AM y la CIM de la bacteria es igual a 4 µg/mL. La flecha indica la C_{max}/CIM.

- **%T > CIM:** porcentaje del tiempo que la concentración del AM permanece con valores más elevados que la CIM de la bacteria infectante. Éste es el mejor predictor para AM tiempo-dependientes. Se usa para los betalactámicos donde se considera que un %T > CIM de al menos 40% se correlaciona con éxito terapéutico (Figura I.2).

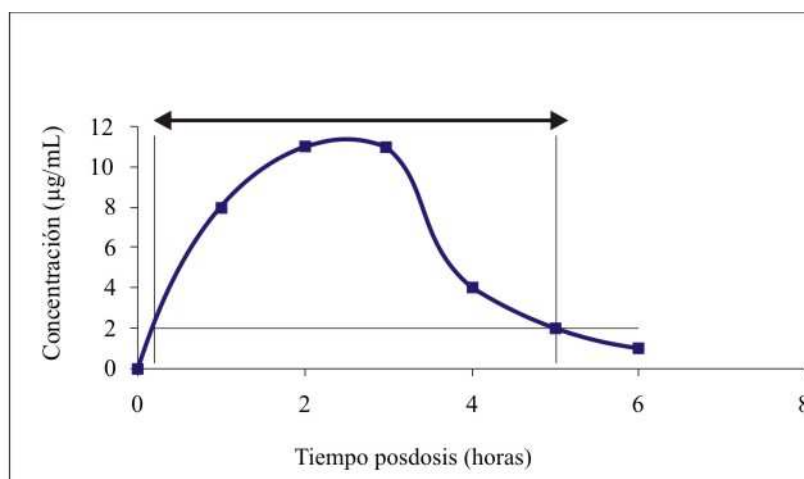


Figura I.2: Representación gráfica de %T > CIM. La bacteria aquí representada tiene una CIM = $2 \mu\text{g/mL}$ y el tiempo que la concentración del AM está sobre la CIM es 5 horas. La dosis de este AM se administra cada 8 horas. La flecha indica el %T > CIM, siendo éste > 50%.

- **AUC/CIM:** es el área bajo la curva y la recta que representa el valor de la CIM del AM utilizado. Este parámetro se obtiene aplicando una fórmula matemática que realiza la integral de todas las concentraciones séricas (de $C_{\text{máx}}$ a $C_{\text{mín}}$) y la relaciona con la CIM del microorganismo. Resulta un mejor predictor para AM que presentan propiedades intermedias o compartidas entre concentración-dependiente y concentración-independiente (ej. azitromicina) (Figura I.3).

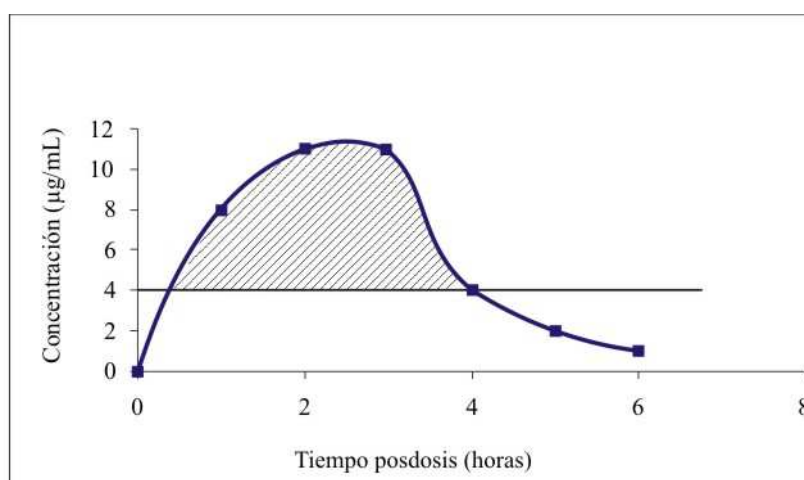


Figura I.3: Representación del área bajo la curva sobre la CIM (AUC/CIM). La zona con rayas representa la relación numérica entre el área bajo la curva concentración-tiempo y la CIM.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES

II.1 OBJETIVOS

II.1.1. OBJETIVOS GENERALES

- Investigar la actividad bacteriostática y bactericida de antibióticos betalactámicos y glucopéptidos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* de importancia clínica.
- Caracterizar genótipicamente los aislamientos tolerantes detectados por métodos de cinética de muerte.

II.1.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Detectar las actividades bacteriostática y bactericida de cefalotina frente a aislamientos infectantes de *Staphylococcus aureus* meticilino sensibles.
- Diferenciar los aislamientos tolerantes a CEF según la relación CBM/CIM con los obtenidos mediante curvas de cinética de muerte.
- Evaluar una técnica simple y sencilla para determinar la actividad bactericida de cefalotina frente a SAMS utilizando discos de cefalotina (CEF), oxacilina (OXA) y cefoxitina (FOX) inactivados con solución de betalactamasa obtenida en el laboratorio.
- Investigar la actividad bacteriostática y bactericida de vancomicina frente a aislamientos infectantes de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes.
- Diferenciar los aislamientos tolerantes a VAN según la relación CBM/CIM con los obtenidos mediante curvas de cinética de muerte.
- Investigar la presencia de los genes *mecA*, *hlg* y *pvl* en los aislamientos SAMS tolerantes a cefalotina.
- Investigar el polimorfismo genómico de los aislamientos SAMR tolerantes a vancomicina mediante la técnica de OD-PCR
- Estudiar la actividad bactericida de vancomicina frente a SAMR-AC aislados de adultos sin factores de riesgo.
- Evaluar la relación de dicha actividad bactericida con la producción de LPV.
- Determinar la concentración inhibitoria mínima de diferentes AM de uso clínico: ciprofloxacina, rifampicina, gentamicina e imipenem, frente a los aislamientos SAMR tolerantes a vancomicina.

- Investigar el efecto sinérgico de la combinación de vancomicina con las drogas antes ensayadas

CAPÍTULO III

STAPHILOCOCCUS AUREUS

METICILINO SENCIBLES

III.1. SECCIÓN A

III.1.1. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA Y BACTERICIDA MÍNIMAS Y CURVAS DE CINÉTICA DE MUERTE

III.1.1.1. Introducción

S. aureus es el patógeno que ocasiona mayor preocupación debido a su virulencia intrínseca, a su habilidad para causar infecciones severas y a su capacidad para adaptarse a las condiciones del medio ambiente. La mortalidad por bacteriemia estafilocócica permanece en aproximadamente 20-40% a pesar de la disponibilidad de AM efectivos. Este patógeno sigue siendo el principal agente etiológico de las infecciones nosocomiales pero como la mayoría de los pacientes continúa tratándose en forma ambulatoria constituye una creciente preocupación de la comunidad (Lowy, 2003).

La mortalidad de pacientes con bacteriemia por *S. aureus* en la era pre-antibiótica, excedía el 80% y más del 70 % desarrollaba infecciones metastásicas.

Fleming descubrió la penicilina en 1928, y recién a partir de 1940 se la comenzó a administrar como indicación terapéutica para una serie de infecciones, entre ellas neumonía, sífilis e infección de partes blandas; pero lamentablemente, en el año 1942 se reportaron las infecciones estafilocócicas resistentes a penicilina, primero en hospitales y posteriormente en la comunidad. Sólo 2 años transcurrieron para que este antibiótico perdiera vigencia en el tratamiento de infecciones por *S. aureus* ya que este microorganismo, como ya se comentó desarrolló la enzima denominada betalactamasa, porque degrada el núcleo betalactámico que es la principal estructura química de la penicilina. Por esta razón a esta betalactamasa se la denominó penicilinasas (Rammelkamp y Maxon, 1942).

Kirby fue el primero que demostró que la penicilina era inactivada por cepas de *S. aureus* resistentes a penicilinas (Kirby, 1944). Bondi y Dietz (1944) posteriormente, identificaron el rol específico de la penicilinasas. En ese momento más del 90% de los aislamientos producían la penicilinasas, sin tener en cuenta el sitio de infección.

El gen que codifica la penicilinasa es parte de un transposón ubicado en un gran plásmido, que lleva a menudo genes de resistencia a otros AM, tales como gentamicina y eritromicina. Esta resistencia está mediada por el gen *blaZ*, que codifica la betalactamasa. Esta enzima predominantemente extracelular, que es sintetizada cuando *S. aureus* está expuesto a la acción de los betalactámicos, hidroliza el anillo betalactámico, inactivando el antibiótico. *blaZ* está bajo el control de dos genes reguladores adyacentes, el derrepresor *blaR1* y el represor *blaI* (Kernodle, 2000), (Figura III.1).

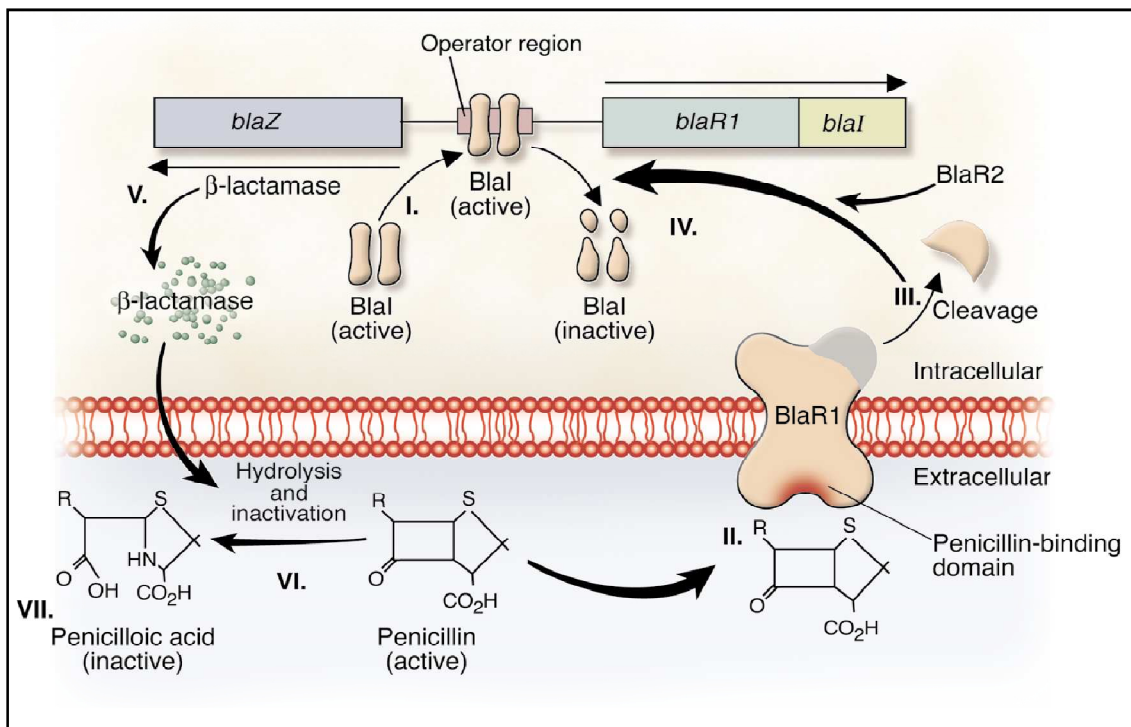


Figura III.1: Inducción de la síntesis de betalactamasa en presencia de penicilina. (Extraído de Lowy, 2003).

La proteína BlaI asociada al ADN se une a la región del operador y por lo tanto reprime la transcripción de *blaZ* y *blaR1-blaI*. En ausencia de penicilina la betalactamasa se expresa a bajos niveles. II. Al unirse la penicilina al receptor transmembrana (sensor-transductor) BlaR1 estimula la autoactivación catalítica de BlaR1. III. y IV. BlaR1 activa, ya sea directa o indirectamente (por vía de una segunda proteína, BlaR2) cliva BlaI produciendo fragmentos inactivos permitiendo la transcripción de ambos *blaZ* y *blaR1-blaI*. V. a VII. La betalactamasa extracelular codificada por *blaZ* (V.) hidroliza el anillo betalactámico (VI.) y en consecuencia la inactiva (VII.).

Hacia fines de la década del '60, la mayoría de los aislamientos de *S. aureus* era resistente a penicilina, independientemente de que fueran hospitalarios como de la comunidad (Crum y col., 2006).

La frecuencia y nivel de resistencia de la bacteria a un antibiótico varía con relación a una serie de factores, por ejemplo, puede variar en el tiempo, en las diferentes áreas geográficas, según que la bacteria provenga de la comunidad o de un centro de atención de salud y, aún dentro del mismo, el nivel de resistencia varía según el grado de complejidad de la Unidad Hospitalaria. Se ha determinado que existe una serie de factores de la práctica médica diaria que favorecen la resistencia de las bacterias, tales como: uso irracional de los antibióticos, variación genética espontánea e inducida por la presión selectiva de los antibióticos y constante aumento de técnicas invasivas para diagnóstico y tratamiento (Chambers y Deleo, 2009).

También se debe tener presente que *S. aureus* integra la microbiota normal de algunas zonas de nuestro organismo: piel, periné, faringe y en menor proporción, el tracto gastrointestinal, la vagina y las axilas. Las fosas nasales son el primer reservorio y muchas infecciones ocurren en personas portadoras (Muñoz y col., 2008). La colonización nasal es un factor de riesgo fundamental para adquirir una infección tanto ambulatoria como nosocomial. El 80% de episodios de bacteriemias intrahospitalarias fueron atribuidos a un origen endógeno (von Eiff y col., 2001).

Por otra parte, *S. aureus* puede sobrevivir meses sobre todo tipo de superficies y polvo ambiental. La transmisión aérea es importante, sobretodo en la persistencia de los reservorios del medio ambiente; pero, las manos son los principales vectores para transportarlo desde el medio ambiente a la nariz y desde el nicho nasal a las distintas zonas del cuerpo.

Numerosos estudios de diferentes regiones del mundo se han llevado a cabo para determinar portadores nasales de este microorganismo especialmente en personas sanas, incluyendo poblaciones cerradas tales como instituciones escolares, militares, etc. (Choi y col., 2006; Tenover y col., 2008).

Actualmente, debido a la vigilancia epidemiológica de la sensibilidad de *S. aureus* que se lleva a cabo tanto a nivel local, nacional como internacional la frecuencia de la meticilino resistencia ha disminuido, siendo SAMS el agente prevalente de las infecciones estafilocócicas.

En un estudio recientemente realizado en China, entre militares voluntarios, sobre 1044 hisopados nasales se recuperaron 209 *S. aureus* y todos fueron meticilino sensibles (Fen Qu y col., 2010).

Los antibióticos betalactámicos, incluyendo cefalosporinas de primera generación tales como cefalotina, son los preferidos para tratar las infecciones causadas por SAMS (Stryjewski y col., 2007). Surge así la necesidad de conocer las actividades tanto bacteriostática como bactericida de este AM frente a los aislamientos del Hospital Dr. José María Cullen, Santa Fe, Argentina, lugar donde se llevó a cabo parte de esta tesis doctoral.

III.1.1.2. Objetivos

- Detectar las actividades bacteriostática y bactericida de cefalotina frente a aislamientos infectantes de *Staphylococcus aureus* meticilino sensibles.
- Diferenciar los aislamientos tolerantes a CEF según la relación CBM/CIM con los obtenidos mediante curvas de cinética de muerte.

III.1.1.3. Materiales y Métodos

III.1.1.3.1. Aislamientos bacterianos

Se recolectaron 109 aislamientos de SAMS, consecutivos y únicos, provenientes de diferentes tipos de muestras de pacientes asistidos en el Hospital Dr. José María Cullen de la ciudad de Santa Fe, Argentina. Dicho hospital depende del Ministerio de Salud de la Provincia de Santa Fe, perteneciendo actualmente al Nodo Santa Fe. Es un hospital de Autogestión, de Complejidad IX, Base Referencial, de Emergentología y Programado. Posee una gran zona de influencia que incluye el centro y norte de la provincia de Santa Fe y parte de las provincias de Córdoba, Chaco y Santiago del Estero.

Cuenta con una cobertura de actividad de 19 (diecinueve) servicios de internación con una dotación de 350 (trescientos cincuenta) camas, 28 (veintiocho) consultorios externos y 12 (doce) centros asistenciales pertenecientes a su Área Programática, para una población de 250.000 habitantes. La actividad asistencial hospitalaria se divide en: internación y asistencia ambulatoria a través de la Sala de Guardias y Urgencias, Consultorios Externos y Hospital de Día.

Los aislamientos se obtuvieron durante el período comprendido entre el 1 de Junio de 2006 al 31 de Diciembre de 2007; cada aislamiento se rotuló con las siglas SAMS, se les asignó un número correlativo y fueron conservados en leche a -70° C hasta el momento de su procesamiento.

III.1.1.3.2. Pruebas de sensibilidad

III.1.1.3.2.1. *Difusión con discos*

Se realizó la prueba de difusión con discos de oxacilina (1µg) (BBL) y cefoxitina (30µg) (BBL) para determinar la sensibilidad a meticilina según normas del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Se utilizó como cepa control *S. aureus* ATCC 25923 (CLSI, 2006; 2007; 2008b; 2009b).

Una vez confirmada la susceptibilidad por el método de difusión se procedió a realizar el método de dilución en caldo.

III.1.1.3.2.2. Concentración inhibitoria mínima (CIM)

III.1.1.3.2.2.1. Solución de antibiótico

Se utilizó cefalotina (CEFALOTINA ARGENTIA - Bristol Myers Squibb). Las diluciones estudiadas estuvieron comprendidas entre 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se preparó una solución de trabajo de 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, es decir 4 veces la dilución del tubo más concentrado (Figura III.2), (CLSI, 2008c).

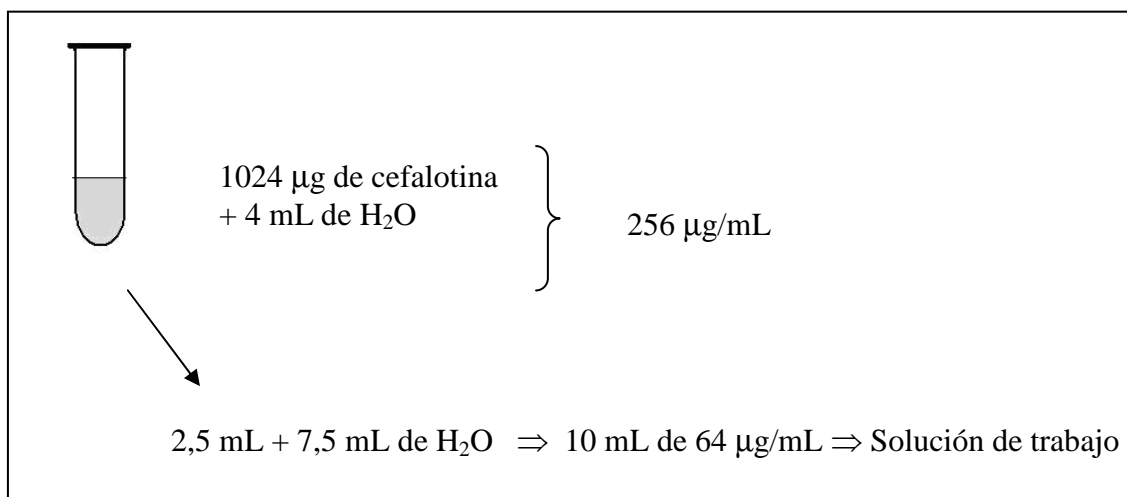


Figura III.2: Preparación de solución de trabajo de cefalotina.

H_2O : agua; mL: mililitros; μg : microgramos

III.1.1.3.2.2.2. Inóculo

Se partió de un cultivo puro de 24 horas de incubación, a 35-37°C; se tomaron varias colonias hasta lograr una turbidez igual a la escala 0,5 Mc-Farland. Posteriormente se procedió a realizar el inóculo como se muestra en la Figura III.3. El inóculo de trabajo se obtuvo realizando una dilución de 1/100 del 0,5 Mc-Farland (CLSI, 2008a; 2008c).

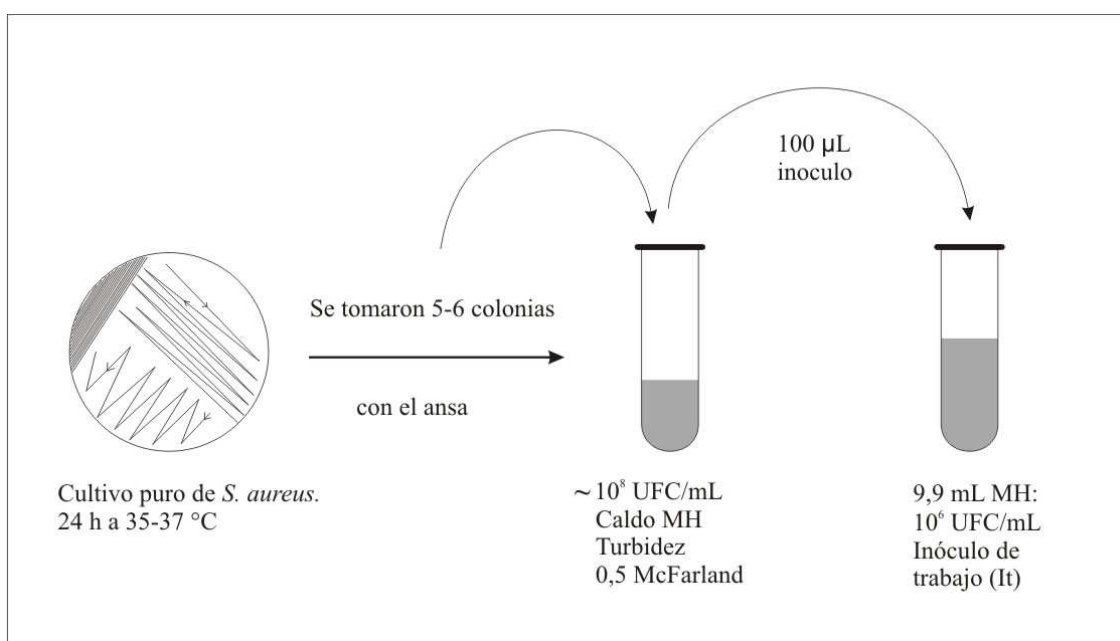


Figura III.3: Preparación del inóculo de trabajo.

h: horas; °C: grados centígrados; UFC: unidades formadoras de colonias; MH: Mueller-Hinton; mL: mililitros

III.1.1.3.2.2.3. Recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL del inóculo inicial

Se realizaron diluciones sucesivas (1/10) del inóculo de trabajo. Se tomaron 10 µL y se depositaron en un cuarto de placa de Mueller-Hinton (Laboratorios Britania - Argentina); luego con un asa se realizó una estría. Se incubó 24 horas a 35-37°C, al cabo de las cuales se procedió al recuento de colonias de cada sector de la placa. Se sumaron los cuatro recuentos y se promediaron para obtener el valor final de UFC, éste se multiplicó por 10² (para referirlo a 1 mL) y por 10 elevado a la dilución del inóculo de trabajo (Figura III.4).

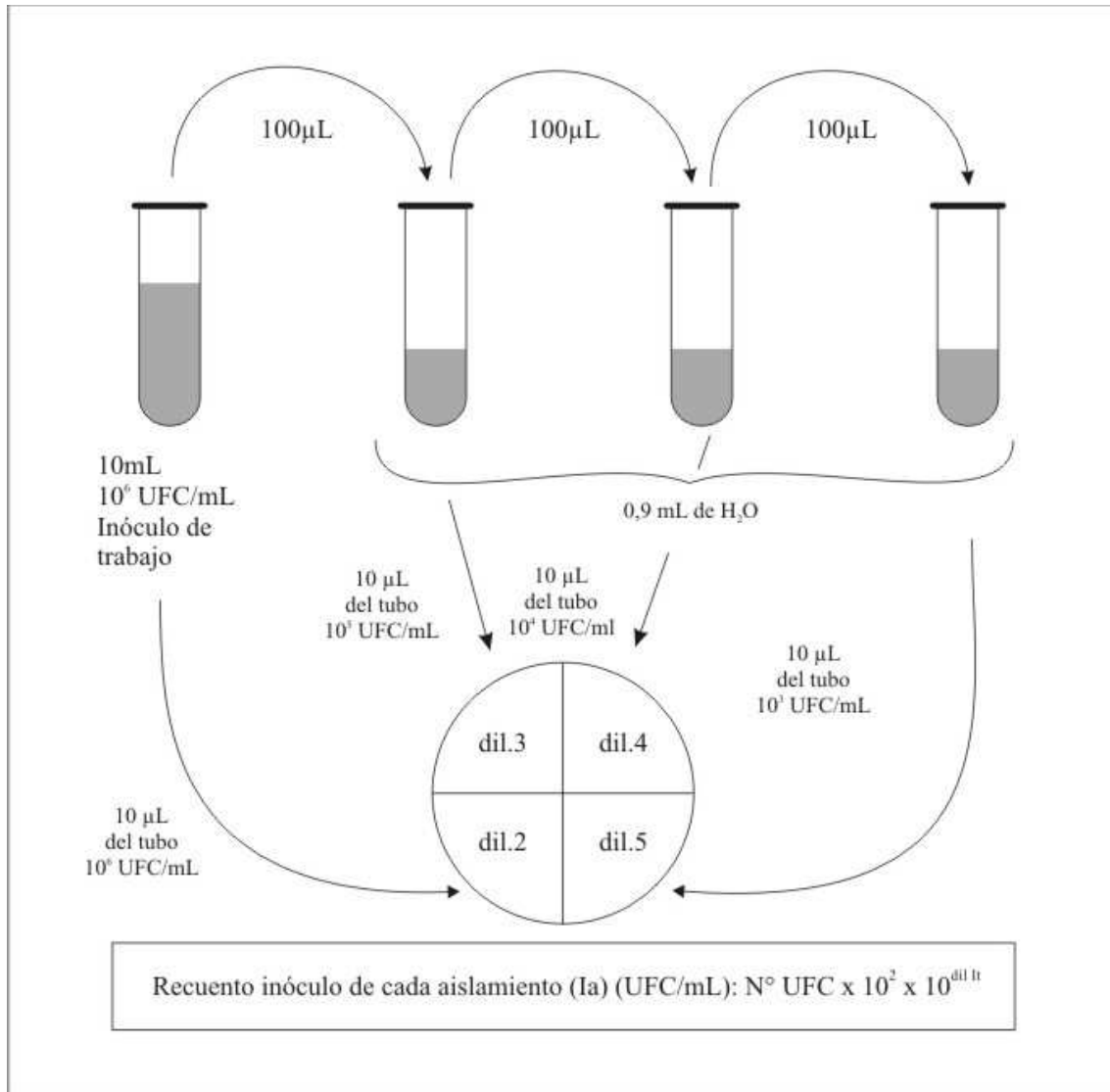


Figura III.4: Recuento del inóculo de trabajo.

µL: microlitros; **UFC:** unidades formadoras de colonias; **mL:** mililitro; **dil:** dilución; **H₂O:** agua; **Ia:** inóculo de cada aislamiento; **It:** inóculo de trabajo.

III.1.1.3.2.2.4. CIM

Se determinó por la técnica de macrodilución utilizando caldo Mueller-Hinton (Difco Culture Media) con pH controlado y concentraciones de cationes ajustadas, según normas CLSI. Se realizaron diluciones sucesivas al medio del AM y se adicionó un volumen fijo de inóculo, incubándose 24 horas a 35-37° C. Se prepararon tubos controles: Control de caldo (sólo caldo Mueller-Hinton), control antibiótico (caldo más solución de antibiótico) y control de inóculo (caldo más inóculo) (Figura III.5), (CLSI 2008c).

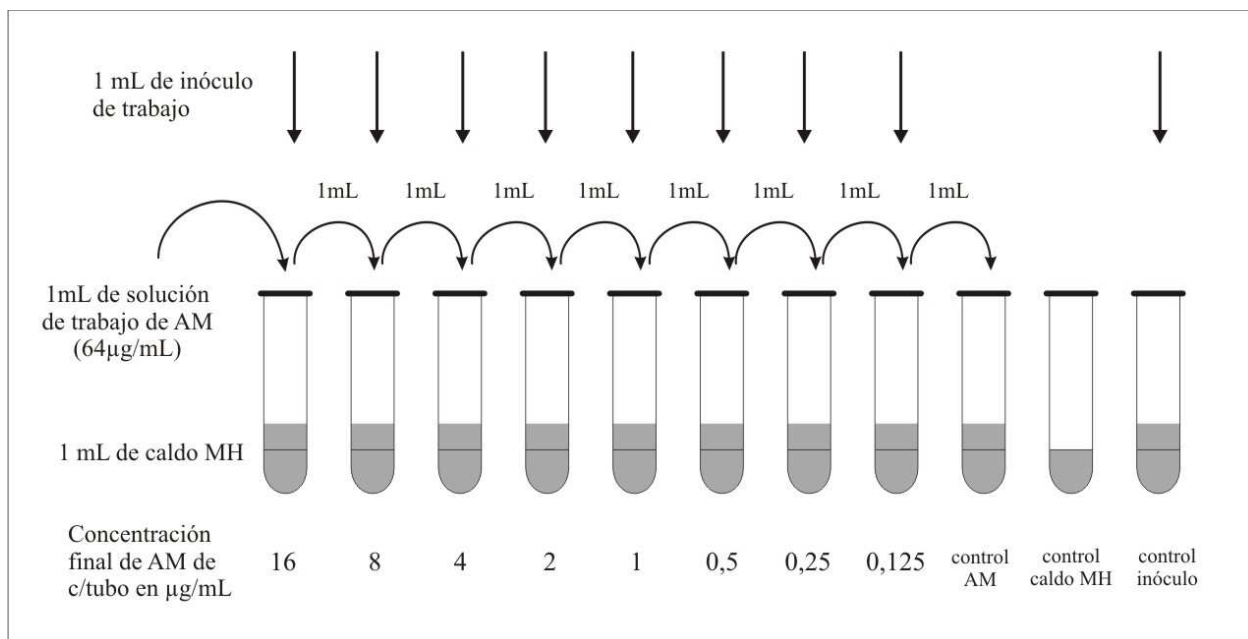


Figura III.5: CIM de cefalotina.

mL: mililitros; **AM:** antimicrobiano; **µg:** microgramos; **MH:** Müeller-Hinton.

III.1.1.3.2.2.5. *Cepa control*

Se utilizó *S. aureus* ATCC 29213. Se procedió de igual manera que para la incógnita realizando diluciones del AM entre 0,125 µg/mL y 1 µg/mL (Figura III.6), (Amsterdam, 2005).

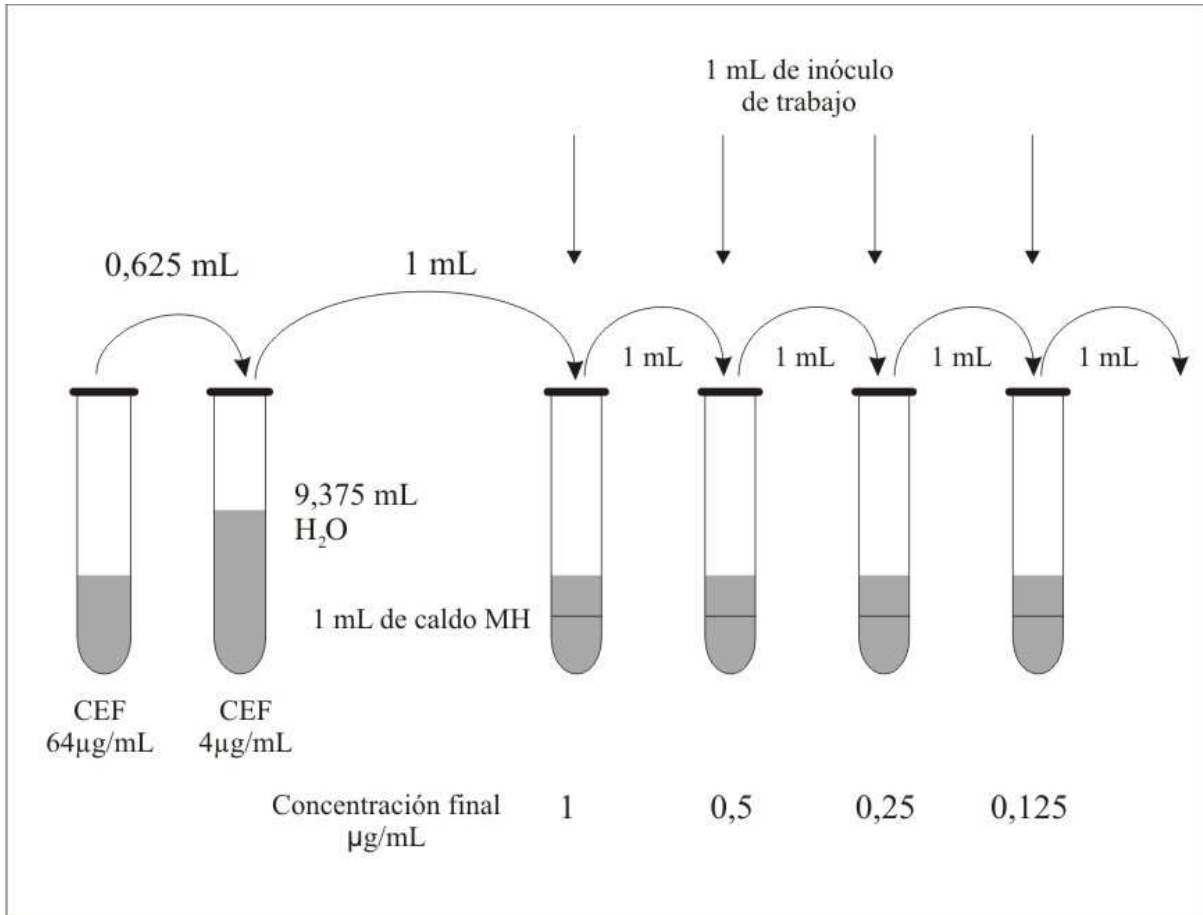


Figura III.6: CIM para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. (Diluciones 0,125 µg/mL a 1 µg/mL). mL: mililitros; H₂O: agua; CEF: cefalotina; µg: microgramos.

III.1.1.3.2.2.6. Lectura e interpretación de la CIM

Luego de 24 horas de incubación a 35° C se observaron primero, los tubos controles y luego las incógnitas.

Interpretación de los resultados.

- Control de caldo: Límpido.
- Control de antibiótico: Límpido
- Control de inóculo: Turbio
- CIM: mínima concentración de antibiótico en la que el tubo correspondiente se observó macroscópicamente límpido (Islam y col., 2008).
- Puntos de corte según CLSI para cefalotina: Sensible: $\leq 8 \mu\text{g/mL}$; Intermedio: $16 \mu\text{g/mL}$; Resistente: $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ (CLSI, 2008a).

III.1.1.3.2.3. *Concentración bactericida mínima (CBM)*

III.1.1.3.2.3.1. Inóculos

Se partió de los tubos que resultaron límpidos al realizar la CIM. Se homogeneizó cada tubo en vortex durante unos minutos.

III.1.1.3.2.3.2. CBM

Se tomaron 5 μL de cada tubo y se depositaron en un cuarto de placa de agar Müeller-Hinton (Laboratorios Britania - Argentina). Se dejaron reposar 15 minutos para diluir la concentración en el medio y evitar así el efecto *carry-over* del antibiótico vehiculizado. Luego de dicho tiempo y habiendo verificado que la gota depositada estaba seca, se procedió a estriar con un ansa. Se incubó 24 horas a 35 °C (Figura III.7), (NCCLS, 1999b).

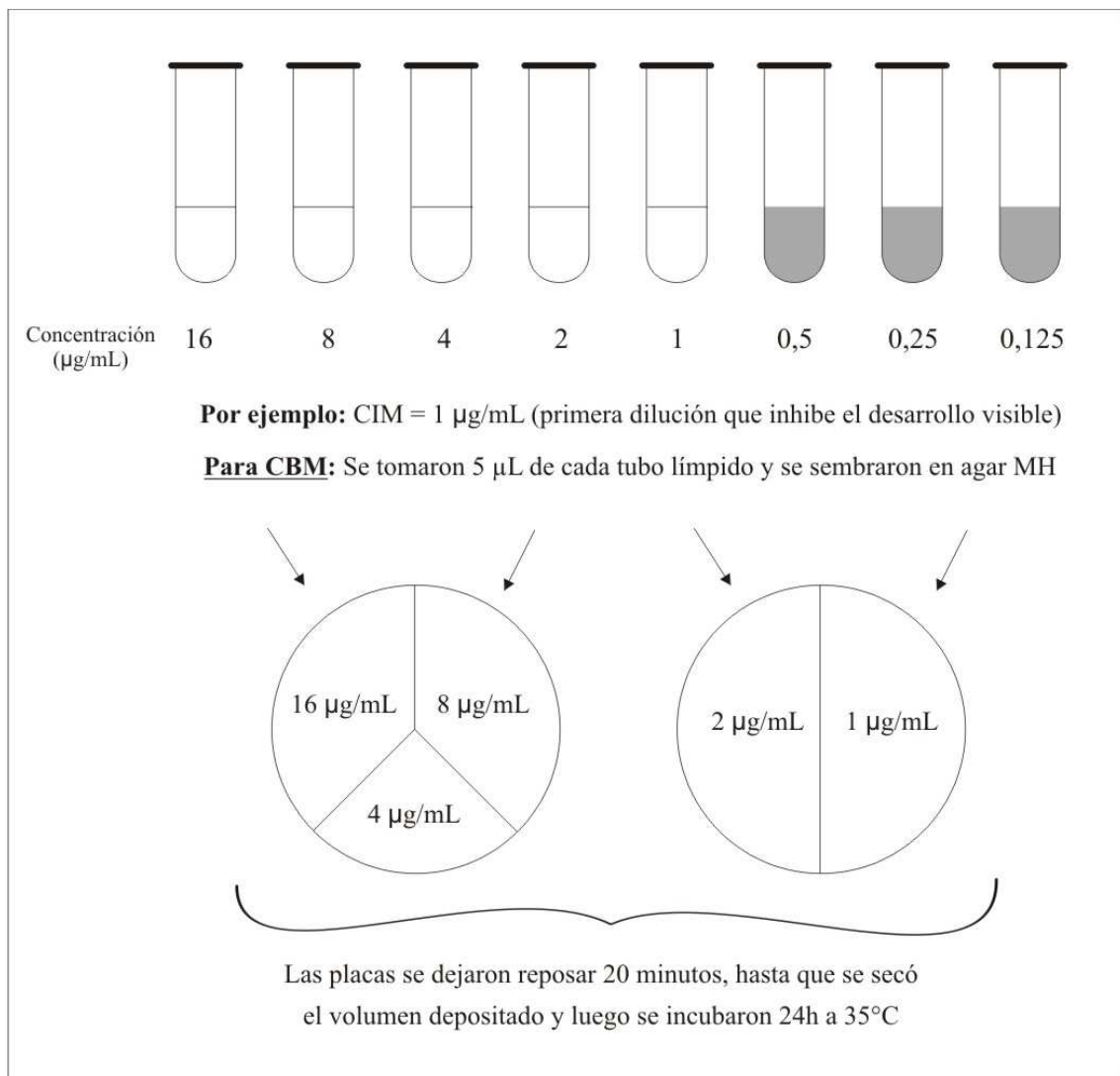


Figura III.7: CBM de cefalotina.

CIM: concentración inhibitoria mínima; **μg :** microgramos; **mL:** mililitro; **CBM:** concentración bactericida mínima; **μL :** microlitros; **MH:** Müeller-Hinton.

III.1.1.3.2.3.3. Cálculo de la CBM

Luego de 24 horas se procedió al recuento de colonias que crecieron a partir del volumen depositado proveniente de cada uno de los tubos límpidos. Se consideró como la CBM a aquella dilución que mató el 99,9 % del inóculo original (Figura III.8). Esto equivale a la disminución de 3 logaritmos decimales con relación al recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) del inóculo inicial (Finberg y col., 2004).

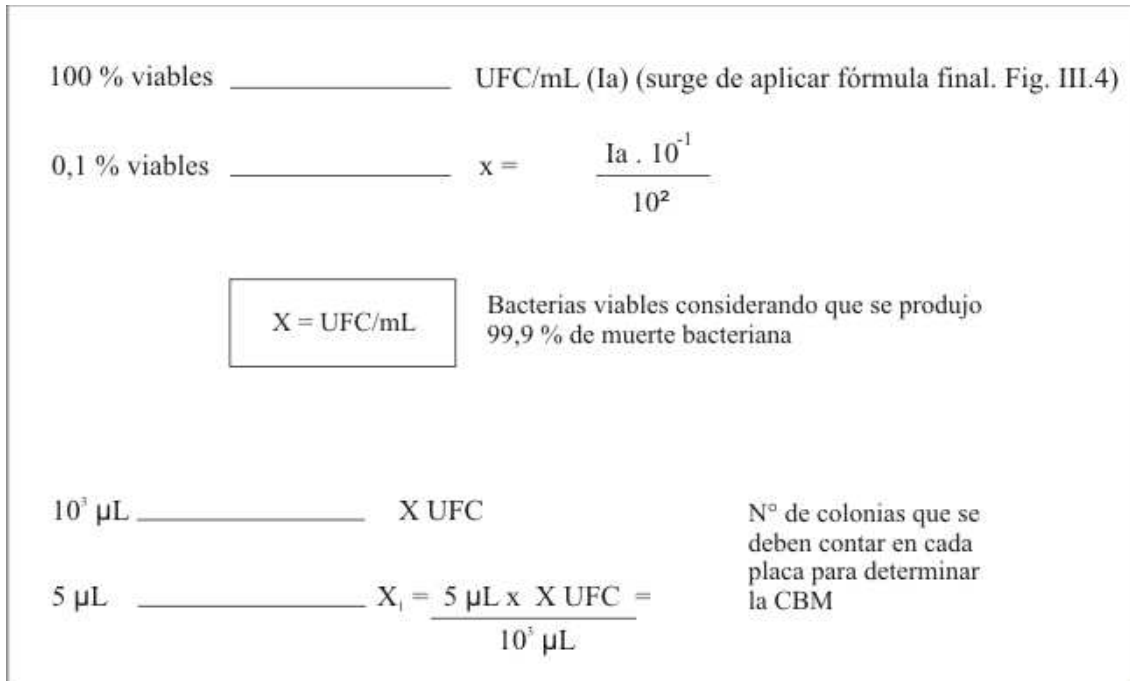


Figura III.8: Cálculo de la CBM.

UFC: unidades formadoras de colonias; **mL:** mililitros; **Ia:** inóculo de cada aislamiento; **µL:** microlitros; **CBM:** concentración bactericida mínima.

III.1.1.3.2.3.4. Bactericidia y tolerancia

La **bactericidia** se definió cuando la CBM de cefalotina para la bacteria estudiada resultaba ≤ 4 veces la CIM.

Un aislamiento se consideró **tolerante** cuando la relación CBM/CIM fue ≥ 32 o cuando dicha relación CBM/CIM resultó ≥ 16 y la CBM ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ (Traczewski y col., 2009).

III.1.1.3.2.4. Curva de cinética de muerte o de letalidad

III.1.1.3.2.4.1. Aislamientos bacterianos

Se partió de un cultivo de 24 horas de los 25 aislamientos cuya relación CBM/CIM de CEF resultó mayor o igual a 8, según los criterios de diversos autores que definen esta relación para una cepa tolerante (Rajashekaraiah y col., 1980).

III.1.1.3.2.4.2. Inóculo

Se preparó un inóculo inicial como se muestra en la Figura III.9.

III.1.1.3.2.4.3. Recuento de UFC/mL del inóculo inicial

Se realizaron diluciones decimales sucesivas y se tomaron 100 μL de cada una de ellas y se esparcieron por toda la placa. El volumen depositado en cada placa se dispersó en la misma con una espátula de Drigalsky. Luego de 24 horas de incubación a 35-37°C se contaron las colonias de cada dilución y se aplicó la fórmula de la Figura III.9.

III.1.1.3.2.4.4. Preparación de la solución de antibiótico

Se partió de una dilución original de antibiótico igual a 4000 veces la CIM de cada aislamiento. Se realizaron diluciones sucesivas hasta llegar a una concentración final de 4 veces la CIM de cada aislamiento.

III.1.1.3.2.4.5. Curva de cinética de muerte

Se prepararon dos tubos con caldo Müller-Hinton (MH):

1) Curva de vida (CV): A un tubo, se agregaron 100 μL de inóculo de trabajo

2) Curva de muerte (CM): Al otro tubo, se agregaron además del inóculo, 100 μL de solución de antibiótico a una concentración 400 veces la CIM de cada aislamiento.

Se realizaron recuentos de UFC/mL a las 0 horas (coinciden la curva de vida con la de letalidad) y luego recuentos a las 3, 6 y 24 horas. A cada tiempo se realizaron diluciones sucesivas y se realizaron recuentos de inóculo tanto del tubo de curva de vida como del de cinética de muerte (CM). El volumen depositado en cada placa se dispersó en la misma con una espátula de Drigalsky.

La metodología realizada se muestra en la Figura III.9 (NCCLS, 1999b).

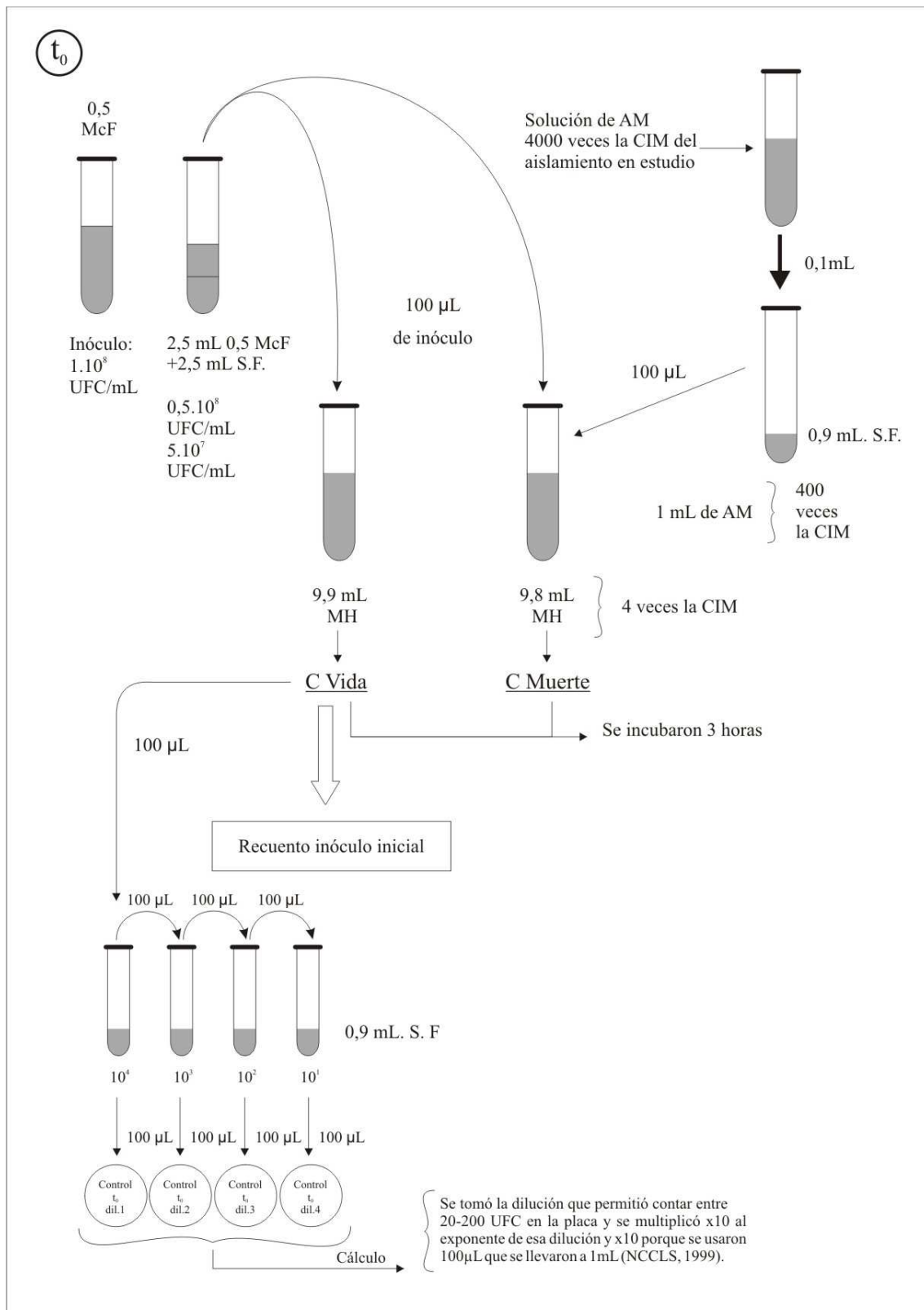


Figura III.9: Curva de cinética de muerte o de letalidad. Metodología aplicada y recuentos de UFC/mL a t₀; 0h; t₃; 3h; t₆; 6h; t₂₄; 24h de incubación.

McF: escala de turbidez Mc Farland; **UFC:** unidades formadoras de colonias; **mL:** mililitros; **S.F:** solución fisiológica; **µL:** microlitros; **AM:** antimicrobianos; **CIM:** concentración inhibitoria mínima; **C:** curva; **n°:** número; **MH:** Mueller-Hinton; **dil:** dilución.

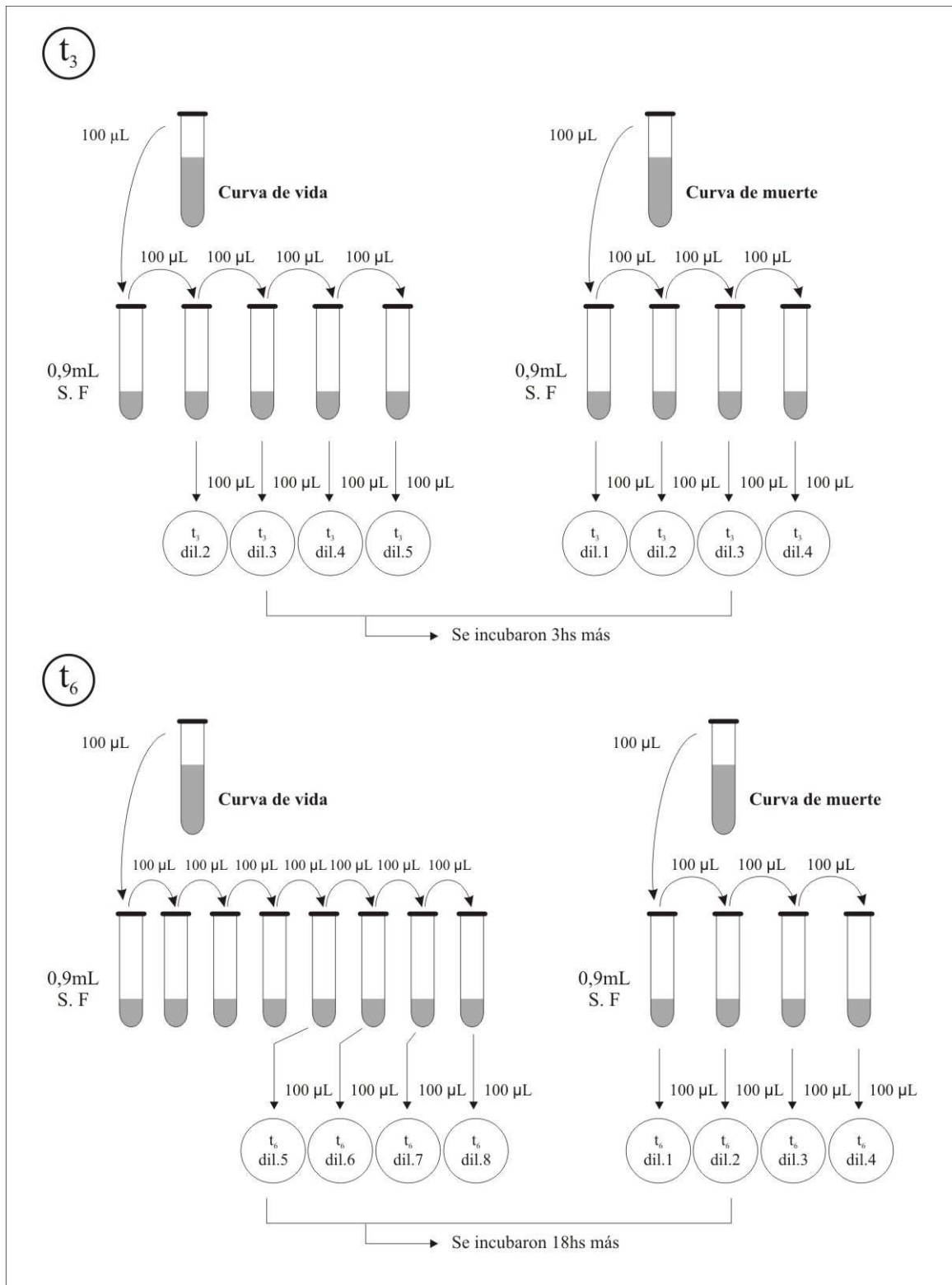


Figura III.9: Curva de cinética de muerte o de letalidad. Metodología aplicada y recuentos de UFC/mL a t_0 : 0h; t_3 : 3h; t_6 : 6h; t_{24} : 24h de incubación. (Cont.)

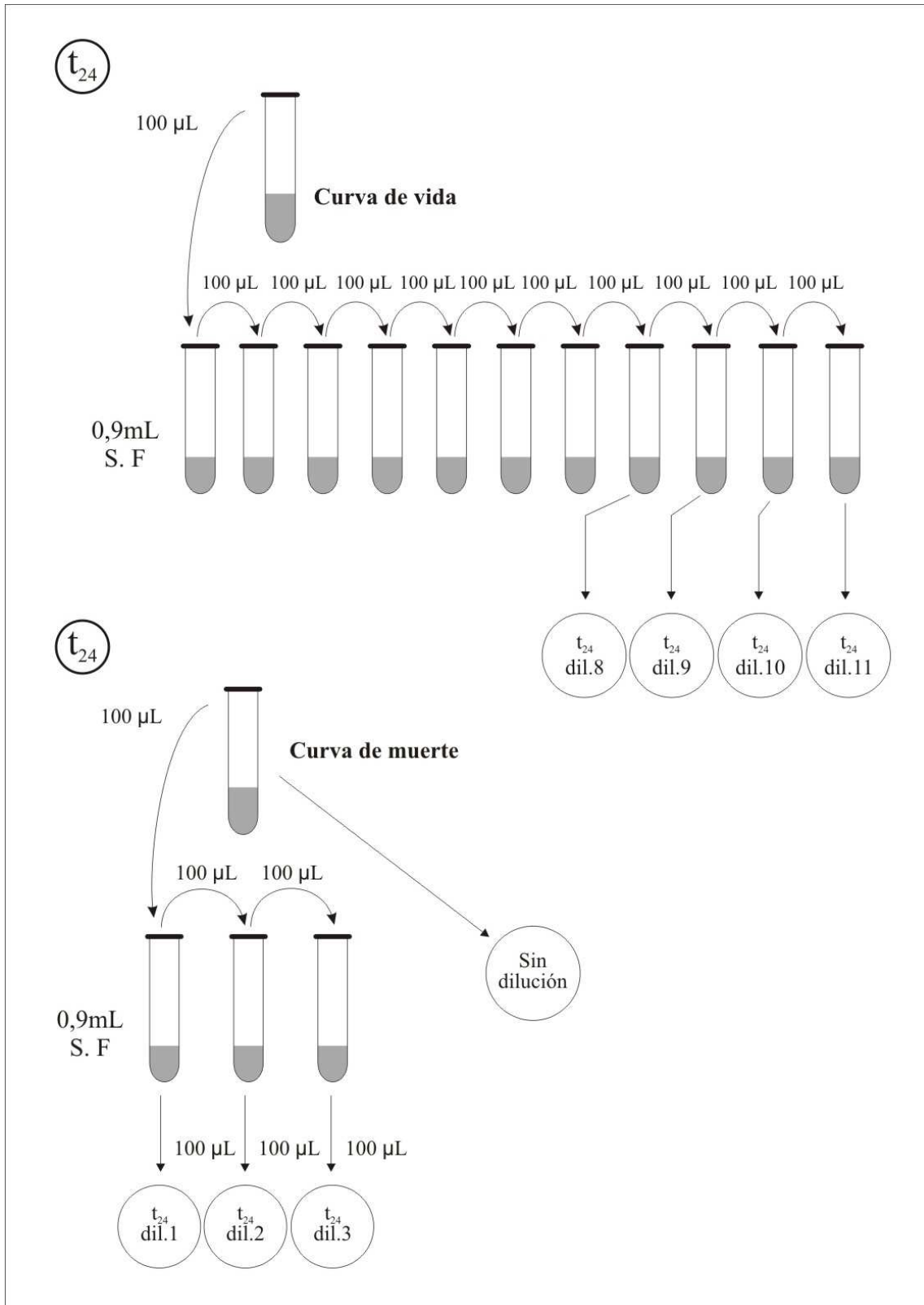


Figura III.9: Curva de cinética de muerte o de letalidad. Metodología aplicada y recuentos de UFC/mL a t_0 : 0h; t_3 : 3h; t_6 : 6h; t_{24} : 24h de incubación. (Cont.)

I

III.1.1.3.2.4.6. Bactericidia y tolerancia

Se consideró **bactericidia** a la reducción en \geq a 3 \log_{10} UFC/mL del inóculo final a las 24 horas (French, 2006).

Se consideró **tolerancia** a la disminución en $<$ 3 \log_{10} UFC/mL a las 24 horas o en $<$ 1 \log_{10} UFC/mL a las 6 horas (May y col., 1998; NCCLS, 1999b; Bourgeois y col., 2007).

III.1.1.4. Resultados

III.1.1.4.1. CIM, CBM, relación CBM/CIM y muestras clínicas

En la tabla III.1 se presentan los resultados obtenidos para la CIM, la CBM, la relación CBM/CIM de CEF y el origen de los aislamientos.

El 50% de los aislamientos de *S. aureus* estudiados fue inhibido por 0,5 µg/mL de CEF (CIM₅₀ = 0,5 µg/mL) y la CBM₉₀ (concentración que inhibió el 90%) fue igual a 1 µg/mL.

La CBM₅₀ fue 1 µg/mL y la CBM₉₀ igual a 8 µg/mL.

Respecto a las muestras clínicas, 58 SAMS (53,21%) provenían de PPB, 9 (8,26%) de lavado bronquioalveolar (BAL), 26 (23,85 %) de sangre, de estos 1 se aisló también en líquido pleural y uno produjo bacteriemia asociada a catéter y 10 (9,17%) fueron recuperados de hueso. Las 6 (5,51%) muestras restantes correspondieron: 1 a DIU, 1 a líquido pleural, 2 a líquido articular y 2 a LCR.

De los 109 *S. aureus* estudiados, 1 aislamiento tuvo CBM/CIM = 128, 2 dieron una CBM/CIM = 64 y 2, igual a 32. De estos 5 aislamientos, 4 provenían de PPB y el otro de sangre. Nueve mostraron CBM/CIM igual a 16; 4 de estos recuperados de PPB, 2 de sangre, 2 de hueso y 1 de líquido articular. La relación fue igual a 8 en 11 cepas; de las cuales, 5 procedían de PPB, 4 de sangre, 1 de hueso y 1 de BAL.

El resto de los aislamientos mostró una relación CBM/CIM ≤ a 4.

Teniendo en cuenta la relación CBM/CIM, 6 SAMS (5,5%) fueron tolerantes; de los cuales 5 aislamientos presentaron CBM/CIM ≥ 32 (SAMS N° 1 a 5) y 1 (SAMS N° 11) mostró CBM/CIM ≥ 16 con CBM = 64 µg/mL.

La bactericidia de cefalotina, considerando la relación CBM/CIM, se logró en 84 SAMS (77,1%).

Tabla III.1: Concentración Inhibitoria Mínima y Concentración Bactericida Mínima para cefalotina. Relación CBM/CIM y origen de 109 aislamientos de *Staphylococcus aureus* meticilino sensibles.

AISLAMIENTOS	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CBM/CIM	MUESTRA CLÍNICA	AISLAMIENTOS	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CBM/CIM	MUESTRA CLÍNICA
SAMS 1	0,25	32	128	PPB	SAMS 22	0,25	2	8	SANGRE
SAMS 2	0,5	32	64	PPB	SAMS 23	0,5	4	8	PPB
SAMS 3	0,5	32	64	PPB	SAMS 24	0,125	1	8	PPB
SAMS 4	2	64	32	SANGRE	SAMS 25	1	8	8	SANGRE
SAMS 5	2	64	32	PPB	SAMS 26	0,25	1	4	PPB
SAMS 6	0,5	8	16	PPB	SAMS 27	1	4	4	BAL
SAMS 7	0,5	8	16	SANGRE	SAMS 28	0,5	2	4	BAL
SAMS 8	0,25	4	16	PPB	SAMS 29	0,5	2	4	PPB
SAMS 9	0,5	8	16	PPB	SAMS 30	0,5	2	4	SANGRE/L.PI.
SAMS 10	0,5	8	16	HUESO	SAMS 31	0,5	2	4	PPB
SAMS 11	4	64	16	PPB	SAMS 32	0,5	2	4	PPB
SAMS 12	0,5	8	16	SANGRE	SAMS 33	0,5	2	4	SANGRE
SAMS 13	0,5	8	16	HUESO	SAMS 34	0,25	1	4	SANGRE
SAMS 14	0,25	4	16	LIQ. ART.	SAMS 35	0,25	1	4	LCR
SAMS 15	1	8	8	PPB	SAMS 36	0,25	1	4	PPB
SAMS 16	0,25	2	8	PPB	SAMS 37	0,5	2	4	SANGRE
SAMS 17	0,5	4	8	BAL	SAMS 38	0,5	2	4	SANGRE
SAMS 18	1	8	8	SANGRE	SAMS 39	2	8	4	PPB
SAMS 19	0,5	4	8	SANGRE	SAMS 40	0,5	2	4	HUESO

SAMS 20	0,25	2	8	HUESO	SAMS 41	0,5	2	4	PPB
SAMS 21	0,25	2	8	PPB	SAMS 42	0,5	2	4	PPB
SAMS 43	0,25	1	4	HUESO	SAMS 68	0,5	1	2	PPB
SAMS 44	0,5	2	4	SANGRE	SAMS 69	0,5	1	2	PPB
SAMS 45	0,25	1	4	PPB	SAMS 70	1	2	2	PPB
SAMS 46	1	4	4	SANGRE	SAMS 71	0,5	1	2	PPB
SAMS 47	1	4	4	SANGRE	SAMS 72	0,5	1	2	LCR
SAMS 48	0,25	1	4	PPB	SAMS 73	0,5	1	2	PPB
SAMS 49	0,5	2	4	PPB	SAMS 74	0,5	1	2	PPB
SAMS 50	0,25	1	4	SANGRE	SAMS 75	1	2	2	PPB
SAMS 51	0,5	2	4	HUESO	SAMS 76	0,5	1	2	PPB
SAMS 52	0,25	1	4	HUESO	SAMS 77	0,5	1	2	PPB
SAMS 53	1	4	4	PPB	SAMS 78	0,5	1	2	BAL
SAMS 54	0,125	0,5	4	SANGRE	SAMS 79	0,25	0,5	2	HEMO
SAMS 55	1	4	4	PPB	SAMS 80	0,25	0,5	2	PPB
SAMS 56	1	4	4	BAL	SAMS 81	0,5	1	2	BAL
SAMS 57	0,25	1	4	PPB	SAMS 82	0,5	1	2	PPB
SAMS 58	1	4	4	SANGRE	SAMS 83	0,5	1	2	PPB
SAMS 59	0,25	1	4	SANGRE/CAT.	SAMS 84	0,25	0,5	2	PPB
SAMS 60	0,25	1	4	PPB	SAMS 85	0,25	0,5	2	PPB
SAMS 61	0,125	0,5	4	SANGRE	SAMS 86	0,12	0,25	2	PPB
SAMS 62	0,25	1	4	PPB	SAMS 87	0,12	0,25	2	SANGRE
SAMS 63	0,25	1	4	PPB	SAMS 88	1	2	2	SANGRE
SAMS 64	0,25	0,5	2	HUESO	SAMS 89	1	2	2	PPB

SAMS 65	0,5	1	2	BAL	SAMS 90	1	2	2	PPB
SAMS 66	0,5	1	2	BAL	SAMS 91	1	2	2	L.PI.
SAMS 67	0,5	1	2	HUESO	SAMS 92	1	2	2	PPB
SAMS 93	0,125	0,25	2	PPB	SAMS102	1	1	1	PPB
SAMS 94	0,25	0,5	2	PPB	SAMS 103	1	1	1	PPB
SAMS 95	0,5	0,5	1	SANGRE	SAMS 104	1	1	1	DIU
SAMS 96	1	1	1	PPB	SAMS 105	0,5	0,5	1	PPB
SAMS 97	0,5	0,5	1	LIQ. ART.	SAMS 106	0,25	0,25	1	PPB
SAMS 98	0,5	0,5	1	SANGRE	SAMS 107	0,5	0,5	1	PPB
SAMS 99	0,5	0,5	1	PPB	SAMS 108	0,5	0,5	1	PPB
SAMS 100	0,5	0,5	1	HUESO	SAMS 109	0,5	0,5	1	BAL
SAMS 101	0,25	0,25	1	SANGRE					

SAMS: *S. aureus* metilino sensibles; **SAMS 1 a SAMS 25:** aislamientos SAMS a los que se les realizó curvas de cinética de muerte; **SAMS 3, SAMS 4, SAMS 11, SAMS 15** se distinguen por tratarse de los aislamientos tolerantes por curvas de cinética de muerte; **CIM:** concentración inhibitoria mínima; **CBM:** concentración bactericida mínima; **PPB:** piel y partes blandas; **LIQ. ART:** líquido articular; **BAL:** lavado bronquioalveolar; **L.PI.:** líquido pleural; **CAT:** catéter; **LCR:** líquido céfalo-raquídeo; **DIU:** dispositivo intrauterino.

III.1.1.4.2. Curvas de cinética de muerte o de letalidad

Se realizaron curvas de cinética de muerte a los 25 aislamientos de SAMS con CBM/CIM de CEF ≥ 8 (SAMS 1 a 25 de la Tabla III.1). Los datos del recuento de colonias a las 0, 3, 6 y 24 horas se muestran en la Tabla III. 2.

Tabla III.2: Recuento de células viables (UFC/mL) a las 0, 3, 6 y 24 horas. Curvas de vida y de muerte de 25 aislamientos de *Staphylococcus aureus* meticilino sensibles que mostraron CBM/CIM de cefalotina ≥ 8 .

AISLAMIENTOS	0 HORAS	3 HORAS		6 HORAS		24 HORAS	
	(UFC/mL)	(UFC/mL)	(UFC/mL)	(UFC/mL)	(UFC/mL)	(UFC/mL)	(UFC/mL)
	INÓCULO INICIAL	CV	CM	CV	CM	CV	CM
SAMS 1	1. 10 ⁶	1.10 ⁸	2.10 ³	1. 10 ¹⁰	2.10 ³	2.10 ¹¹	10 ²
SAMS 2	1. 10 ⁶	7.10 ⁷	9.10 ³	1. 10 ¹⁰	3. 10 ³	5.10 ¹¹	10 ²
SAMS 3	3. 10⁶	1.10⁶	5. 10⁵	1.10⁸	9. 10⁵	1.10¹⁰	6.10²
SAMS 4	1. 10⁶	1.10⁷	9. 10⁵	7.10⁹	9. 10⁵	1.10¹¹	9. 10³
SAMS 5	1. 10 ⁶	5.10 ⁷	1.10 ⁴	1.10 ⁹	1.10 ³	2.10 ¹⁰	10 ²
SAMS 6	1,4. 10 ⁶	1.10 ⁷	4.10 ²	1.10 ¹⁰	1.10 ²	3.10 ¹¹	0
SAMS 7	1. 10 ⁶	3.10 ⁸	1,3.10 ⁵	2.10 ⁹	2.10 ⁴	1.10 ¹¹	0
SAMS 8	1. 10 ⁶	1.10 ⁷	6.10 ³	5.10 ⁹	0	6.10 ¹⁰	0
SAMS 9	1. 10 ⁶	2. 10 ⁶	2.10 ⁴	1.10 ⁹	2.10 ⁴	7.10 ¹⁰	0
SAMS 10	8. 10 ⁶	8.10 ⁶	6.10 ³	7.10 ⁹	6. 10 ²	3.10 ¹⁰	0
SAMS 11	3. 10⁶	7.10⁶	9 10⁵	8.10⁹	9. 10⁵	1.10¹¹	1. 10²
SAMS 12	1. 10 ⁶	4.10 ⁷	1.10 ⁴	7.10 ¹⁰	1.10 ³	1.10 ¹¹	10 ²
SAMS 13	1. 10 ⁶	5.10 ⁶	6.10 ³	1.10 ⁹	1.10 ³	2.10 ¹¹	10 ²
SAMS 14	2. 10 ⁶	1. 10 ⁸	1. 10 ³	1. 10 ⁹	3. 10 ²	3. 10 ¹⁰	0
SAMS 15	3. 10⁶	1.10⁷	3. 10⁶	1.10⁹	9. 10⁵	1.10¹¹	3.10²
SAMS 16	1. 10 ⁶	6.10 ⁷	6.10 ⁴	1.10 ⁹	1,5. 10 ⁴	1.10 ¹¹	0
SAMS 17	4. 10 ⁶	7.10 ⁷	1.10 ⁴	8.10 ⁹	0	1.10 ¹¹	0
SAMS 18	1. 10 ⁶	1.10 ⁸	5. 10 ³	1.10 ¹⁰	2. 10 ²	1.10 ¹¹	10 ²
SAMS 19	1. 10 ⁶	7.10 ⁷	4.10 ⁴	7.10 ⁸	1. 10 ⁴	1. 10 ¹¹	10 ²
SAMS 20	1. 10 ⁶	2.10 ⁶	5. 10 ³	8.10 ⁹	1. 10 ⁴	2.10 ¹⁰	10 ²
SAMS 21	1. 10 ⁶	5.10 ⁷	2.10 ⁵	4.10 ⁹	8.10 ³	1.10 ¹¹	10 ²
SAMS 22	1. 10 ⁶	3. 10 ⁸	1. 10 ⁵	1. 10 ⁹	1. 10 ³	2. 10 ¹⁰	10 ²
SAMS 23	1. 10 ⁶	2. 10 ⁷	1, 10 ⁵	7. 10 ⁹	1,5. 10 ⁴	1. 10 ¹¹	0
SAMS 24	1. 10 ⁶	1.10 ⁶	4.10 ³	4.10 ⁹	1.10 ³	1.10 ¹¹	10 ²
SAMS 25	1. 10 ⁶	3.10 ⁶	3.10 ³	5.10 ¹⁰	2.10 ³	2.10 ¹¹	10 ²

SAMS 3, SAMS 4, SAMS 11, SAMS 15 se distinguen por tratarse de los aislamientos tolerantes por curvas de cinética de muerte; **CV:** curva de vida; **CM:** curva de muerte; **UFC/mL:** unidades formadoras de colonias /mL.

Las curvas se presentan en las figuras III.10, III.11 y III.12 agrupadas según relación CBM/CIM.

De las 25 curvas realizadas, 4 aislamientos (SAMS 3, 4, 11 y 15) resultaron tolerantes por CM. Estos 4 aislamientos resultaron tolerantes según el criterio de May y col. (1998), es decir redujeron el inóculo inicial en $< 1 \log_{10}$ UFC/mL a las 6 horas, mientras que uno de ellos (SAMS 4) fue tolerante cumpliendo además el criterio propuesto por NCCLS (NCCLS, 1999b).

El aislamiento SAMS 15, proveniente de PPB, resultó tolerante por CM pero no por relación CBM/CIM ya que esta última resultó 8.

La bactericidia de cefalotina considerando los estudios de cinética de muerte fue 99,1% ya que sólo un aislamiento (SAMS 4) no redujo \geq de $3 \log_{10}$ UFC/mL el inóculo inicial.

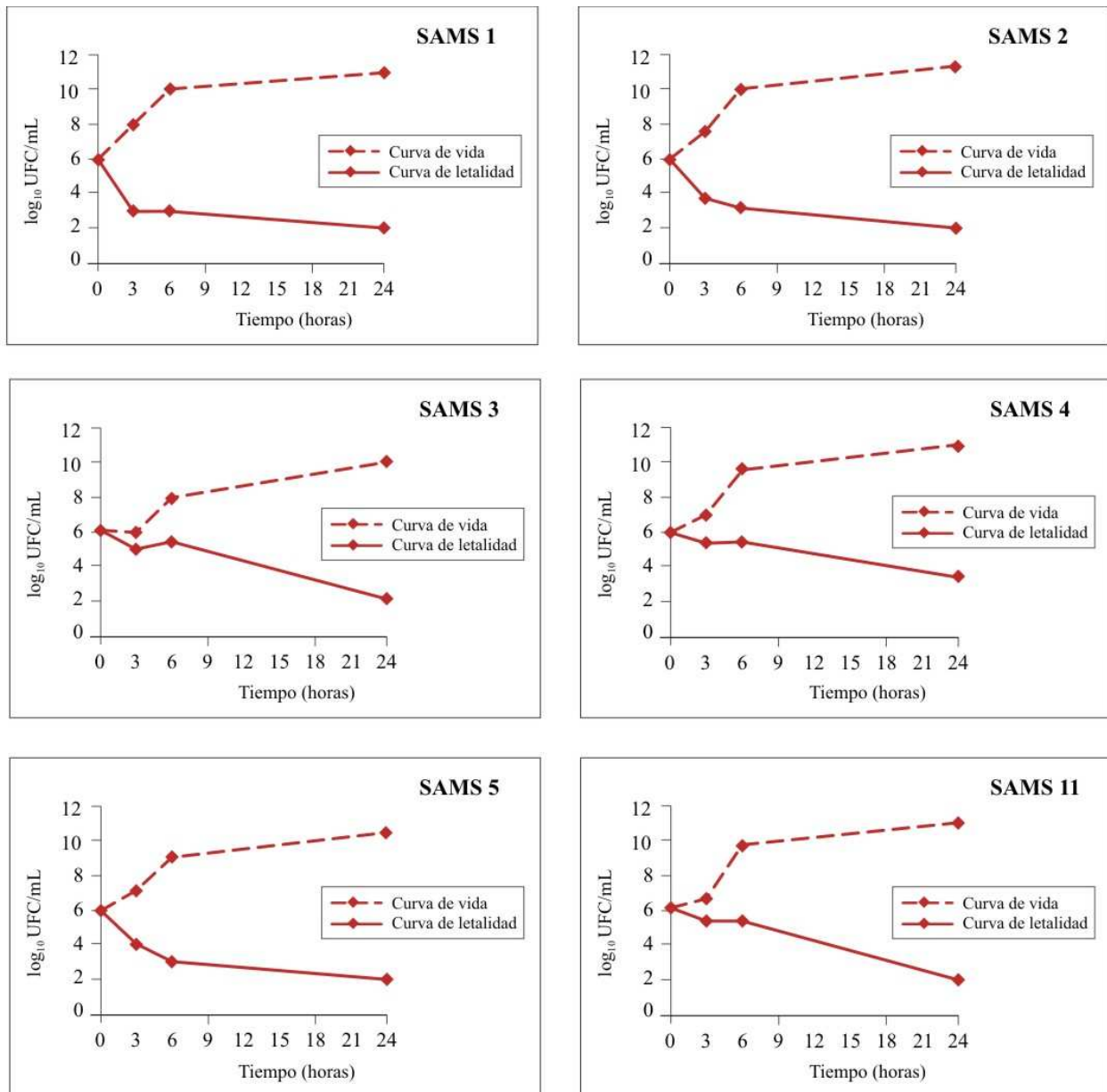


Figura III.10: Curvas de muerte o de letalidad de seis aislamientos SAMS tolerantes a cefalotina considerando la relación $CBM/CIM \geq 32$ o $CBM/CIM \geq 16$ y $CBM \geq 32 \mu\text{g/mL}$. SAMS: *Staphylococcus aureus* meticilino sensibles. SAMS 3, SAMS 4 y SAMS 11: tolerantes por curva de cinética de muerte.

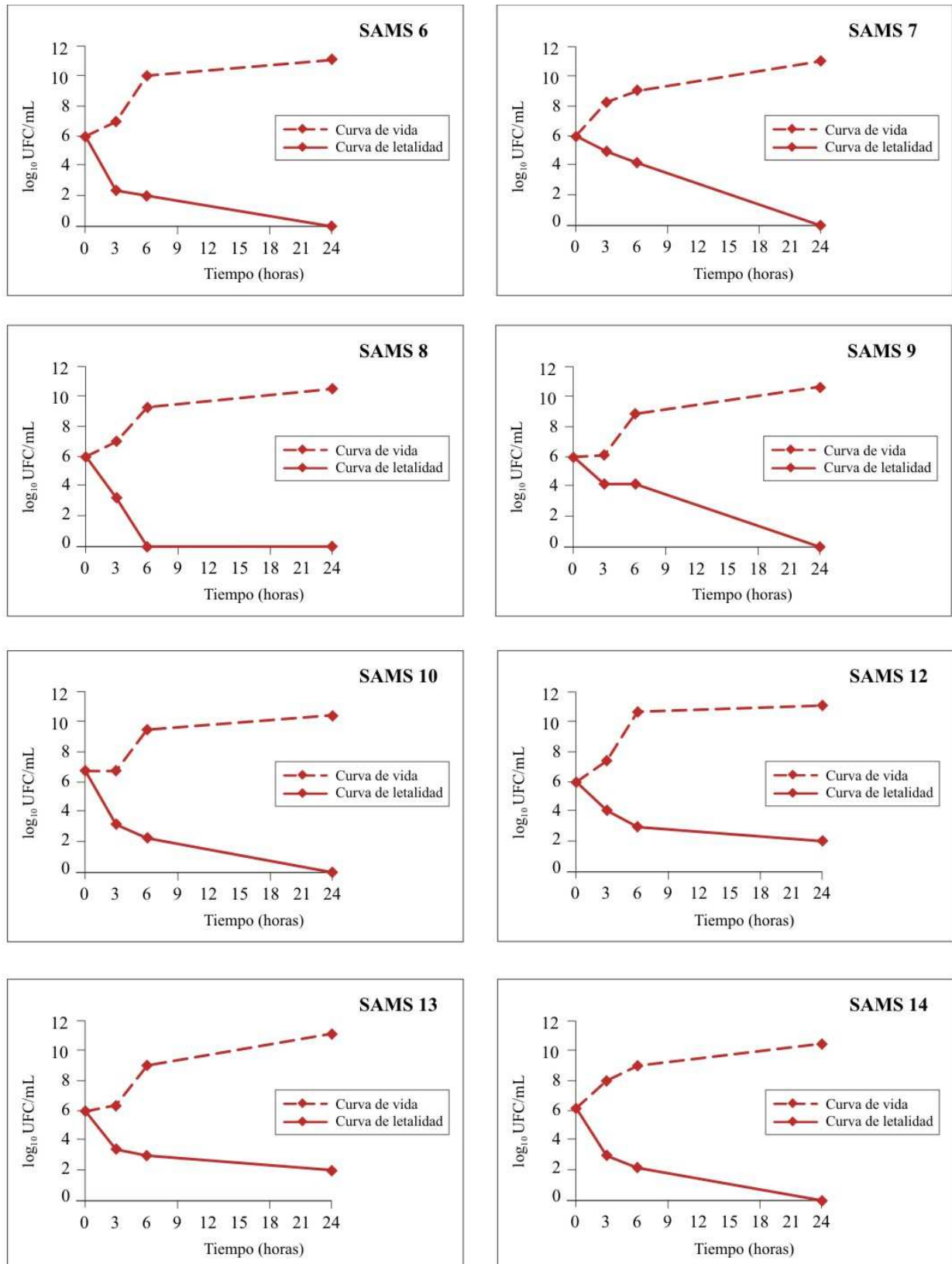


Figura III.11: Curvas de muerte o de letalidad de SAMS con relación CBM/CIM de cefalotina = 16 (no tolerantes).

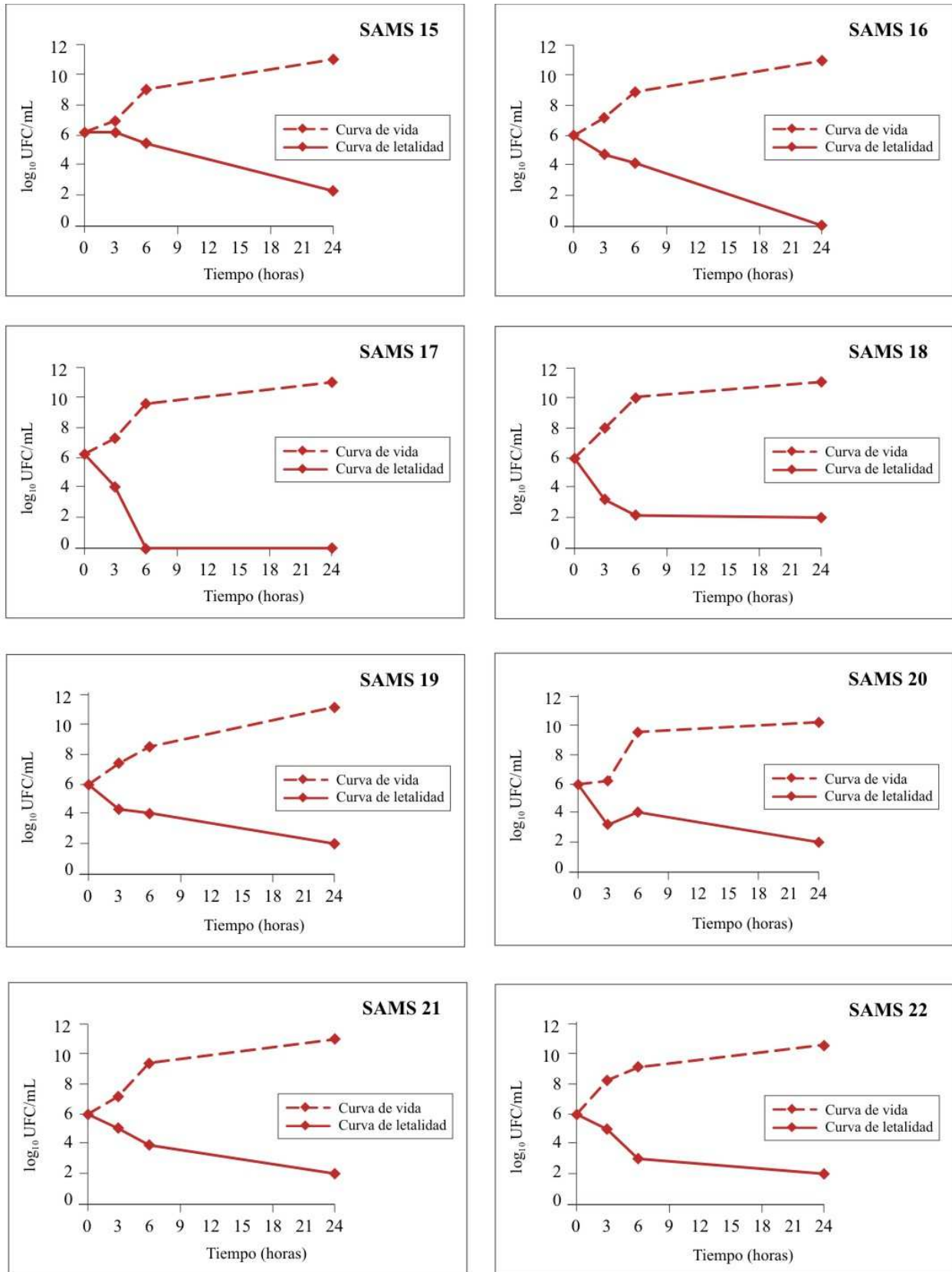


Figura III.12: Curvas de muerte o de letalidad de 11 aislamientos SAMS cuya CBM/CIM de cefalotina resultó = 8. SAMS 15: tolerante por CM y no por relación CBM/CIM.

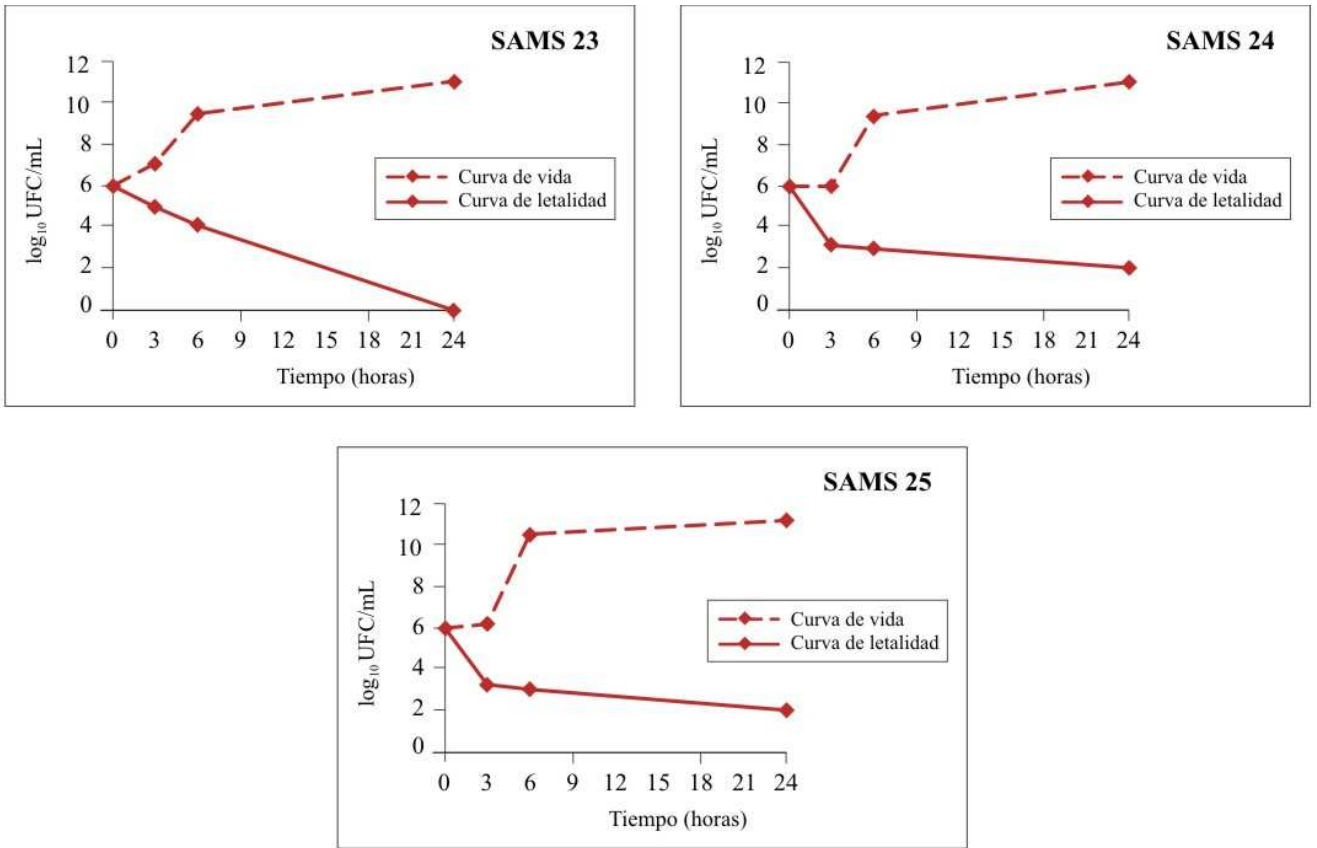


Figura III.12: Curvas de muerte o de letalidad de 11 aislamientos SAMS cuya CBM/CIM resultó = 8. (Cont.).

III.1.1.5. Discusión

Numerosas investigaciones demuestran que los AM betalactámicos, especialmente las cefalosporinas de primera generación (CEF 1G) son más efectivos que vancomicina para el tratamiento de las infecciones por SAMS.

Kim y col. (2008) realizaron un estudio de casos y controles en 294 pacientes con bacteriemia por SAMS en dos hospitales universitarios de Seul, South Korea, comparando pacientes tratados con VAN y CEF 1G llegando a la conclusión de que VAN es menos efectiva que CEF 1G para tratar bacteriemias por SAMS.

De igual manera, Stryjewski y col. (2007) comunicaron que en pacientes en hemodiálisis con bacteriemia por SAMS tratados con VAN tuvieron mayor riesgo de experimentar fracaso terapéutico que los que recibieron CEF 1G sugiriendo enfáticamente que los pacientes en diálisis con este tipo de bacteriemias no deberían someterse a terapias empíricas con VAN.

En el presente trabajo se intentó investigar el comportamiento de *S. aureus* meticilino sensibles aislados de procesos infecciosos de pacientes ambulatorios e internados que asistieron al hospital “Dr. José María Cullen”. Dada la importancia de la institución de donde proceden los aislamientos estudiados en esta tesis, se desprende de la misma, que los datos aquí recolectados tienen un fuerte impacto clínico local, provincial y hasta nacional.

Si consideramos que el CLSI (CLSI, 2010) establece actualmente como punto de corte para considerar *S. aureus* sensible a CEF, valores de CIM $\leq 8 \mu\text{g/mL}$, la CIM₅₀ = 0,5 $\mu\text{g/mL}$ y la CIM₉₀ = 1 $\mu\text{g/mL}$ resultantes de este estudio, demostraron un buen poder inhibitorio de este AM.

Teniendo en cuenta que este antibiótico se utiliza para tratar infecciones graves causadas por este microorganismo y está indicado en la profilaxis de cirugías limpias tales como osteosíntesis, prótesis de cadera, cirugías cardiovasculares, la presente investigación aporta además, datos muy importantes a la epidemiología local y nacional.

En EEUU este antimicrobiano no está disponible comercialmente desde hace cierto tiempo, cosa que no ocurre en Argentina; es por ello que los datos de las últimas publicaciones internacionales se refieren a cefazolina (cefalosporina de primera generación), que comparte su identidad con cefalotina.

No obstante, se puede disponer de datos anteriores. Smith y col. (1988) y Rolston y col. (1989) establecieron como $CIM_{50} = 0,125 \mu\text{g/mL}$ y $CIM_{90} = 0,5 \mu\text{g/mL}$ valores no muy alejados a los obtenidos en esta tesis, a pesar de los años transcurridos.

En una interesante comparación de CIM de cefazolina de SAMS aislados en EEUU (N=509), de Canadá (N=80) y de Latinoamérica (N=128) se pudo observar que la $CIM_{50/90}$ resultó igual a $\leq 2 / \leq 2 \mu\text{g/mL}$ en los tres trabajos. El porcentaje de sensibilidad informado fue 98,8% en EEUU y Canadá, mientras que en Latinoamérica fue igual a 100% (Fritsche y col., 2005).

Los datos aquí obtenidos coinciden con Perazzi y col. (2010) donde informaron para SAMS una $CIM_{50/90}$ de oxacilina (OXA) igual a 0,5 y 1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Se debe aclarar que las actividades de OXA y CEF son equivalentes; de hecho que CLSI recomienda ensayar el disco de cefoxitina (FOX) y OXA para detectar la sensibilidad a CEF. Respecto a la CIM, en este trabajo de tesis, se utilizó CEF ya que no se dispone comercialmente de OXA en Argentina como en otros países. Por tal motivo, resulta válido discutir con autores que hayan realizado CIM a OXA para detectar la sensibilidad de *S. aureus*.

En el presente estudio un solo aislamiento tuvo $CIM = 4 \mu\text{g/mL}$ (SAMS 11) y ninguno de ellos mostró un valor mayor, es decir que según los puntos de corte de CLSI, hubo un 100% de sensibilidad a cefalotina, coincidiendo con los autores anteriormente citados.

Si se analizan los datos de la CBM, si bien la CBM_{90} resultó 8 $\mu\text{g/mL}$ hubo 2 aislamientos que tuvieron valores máximos de 64 $\mu\text{g/mL}$. Estos hallazgos coinciden con los reportes de Wiedemann y Grimm (1996) quienes comunicaron que las CBM para

este microorganismo frente a cefalotina estaban comprendidos entre 3 a más de 100 $\mu\text{g/mL}$.

La bactericidia según la relación CBM/CIM fue del 77,1% detectándose 6 (5,5%) aislamientos tolerantes. Esta tolerancia es mucho menor que los hallazgos de Pasticci y col. (2011) quienes informaron sobre un total de 49 SAMS causantes de endocarditis, 31 (63,2%) tolerantes, debiéndose destacar que el total de cepas fue algo menor al del presente trabajo.

La bactericidia obtenida en este trabajo según el criterio CBM/CIM, no coincidió con el aplicado para determinarla teniendo en cuenta la CM. Según las curvas de letalidad, la bactericidia de cefalotina para SAMS se obtuvo en un 99,1% ya que sólo un aislamiento (SAMS 4) no disminuyó en $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL del inóculo inicial (French, 2006; Méndez y col., 2007).

Tampoco coincidió el porcentaje de tolerancia ya que por CM fue de 3,66%. Se debe destacar que un aislamiento fue tolerante por CM y no por CBM/CIM lo que jerarquiza lo propuesto por French (2006) quien sostiene que los estudios de cinética de muerte detectan tolerancia genotípica o verdadera tolerancia.

Del análisis de las CM obtenidas para los SAMS tolerantes según relación CBM/CIM, se deduce que, para todos ellos, la muerte de las bacterias se logró lentamente en función del tiempo, no llegando ningún recuento a 0 UFC/mL, a las 24 horas. En este grupo hay que destacar que los tres aislamientos tolerantes por CM, lo fueron por el criterio de May y col. (1998), a las 6 horas, observando que SAMS 3, SAMS 4 y SAMS 11 mantienen sus recuentos hasta ese tiempo; SAMS 3, desciende a las 3 horas y hay un re-crecimiento a las 6 horas. Para este mismo aislamiento, la CV crece mucho más lentamente que el resto de los SAMS.

En cambio, analizando las CM cuya relación CBM/CIM fue igual a 16 (no tolerantes), sólo dos de ellos (SAMS 12 y SAMS 13) no redujeron a 0 UFC/mL el inóculo inicial; pero la CEF fue bactericida para todos ellos.

En las CM con relación $CBM/CIM = 8$; se deben destacar dos aislamientos. Uno de ellos, SAMS 15 que resultó tolerante por curva de letalidad (a las 6 horas no redujo más de $1 \log_{10}$ UFC/ml) ni tampoco llegó a 0 UFC/ml el recuento a las 24 horas. El segundo es SAMS 20, cuyo comportamiento resultó distinto ya que a las 3 horas descendió y a las 6 horas se observó un recrecimiento, sin llegar a ser tolerante, ni tampoco logró eliminar totalmente las bacterias a las 24 horas. En este grupo, tres aislamientos redujeron a 0 UFC/mL el inóculo inicial (SAMS 16, SAMS 17 y SAMS 23); en SAMS 17 se logró a las 6 horas y se mantuvo, mientras que en los otros, recién se obtuvo a las 24 horas.

Del análisis exhaustivo de las CM, se deduce que si bien la bactericidia se logró en el 99,1% de los aislamientos, el comportamiento de los mismos a lo largo del tiempo muestra diferencias destacables, lo que hace que los estudios de cinética de muerte tengan un gran impacto a la hora de decidir un tratamiento en el caso de infecciones graves por SAMS.

III.1.1.6. Conclusiones

- Todos los SAMS estudiados tuvieron una CIM categorizada en el rango sensible por CLSI.
- La actividad bactericida de CEF se logró en el 99,1% de los aislamientos estudiados por cinética de muerte, pero no coincidió con el resultado obtenido considerando la relación CBM/CIM (77,1%).
- Respecto a los aislamientos tolerantes, hubo 6 según CBM/CIM y 4 según CM; incluso un tolerante por CM tuvo CBM/CIM=8.
- De la experiencia obtenida a través de los experimentos realizados en esta tesis, se recomienda estudiar la tolerancia de los aislamientos de infecciones severas mediante métodos de cinética de muerte.
- Se concluye que, dado que en el Hospital Dr. J. M. Cullen de Santa Fe, Argentina, las infecciones causadas por SAMS representan el 56%, cefalotina continúa siendo una excelente opción terapéutica y puede ser sugerida en la profilaxis de las cirugías limpias traumatológicas y cardiovasculares.

III.2. SECCIÓN B

III.2.1. HISTORIA CLÍNICA DE PACIENTES INFECTADOS CON *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILINO SENSIBLES TOLERANTES A CEFALOTINA DETECTADOS POR CURVAS DE CINÉTICA DE MUERTE

III.2.1.1. Presentación

III.2.1.1.1. Paciente infectado con SAMS 3

Hombre de 50 años, diabético que ingresa el 23 de diciembre de 2006 por desorientación con cetoacidosis metabólica. Presenta lesiones pustulosas y eritematosas en cuello y espalda de varios días de evolución. Se toma muestra de piel y partes blandas por punción-aspiración y se inicia tratamiento con ampicilina-sulbactama 1,5 gramos cada 8 horas. El laboratorio de ingreso revela: leucocitosis ($19.500/\text{mm}^3$); glucemia: 5,58 mg/dL y creatinina: 1,66 mg/dL. Luego del resultado de los cultivos y ante la mala evolución del paciente se rota a cefalotina endovenosa 1g cada 6 horas más gentamicina (160 mg/día) durante siete días. El 2 de enero se aumenta la dosis de cefalotina a 2 g cada 6 horas debiendo realizarse el 3 de enero un curetaje de una colección purulenta de la espalda. El 9 de enero se rota a cefalexina (2 g/día) y dos días después se da el alta continuando el tratamiento oral hasta completar los 21 días en forma ambulatoria. El aislamiento obtenido en el laboratorio resultó SAMS con CIM y CBM de cefalotina igual a 0,5 y 32 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. El aislamiento resultó tolerante por relación CBM/CIM y por CM.

III.2.1.1.2. Paciente infectado con SAMS 4

Mujer de 68 años que ingresa el 2 de octubre de 2006. Historia previa de insuficiencia renal crónica y desde hace un mes se encuentra en diálisis, con múltiples tratamientos con cefalotina.

Al ingreso presenta disnea súbita, excitación sicomotriz, hipotensión y se encuentra sin fiebre. Se realiza hemocultivo. Dado que se observa secreción pericatóter de diálisis, se retira el mismo y se comienza empíricamente con vancomicina (1g/día) y

gentamicina (80 mg/día). Al día siguiente ingresa en Unidad de Terapia Intensiva, entra en shock séptico y hemodinámico, hace un paro cardiorrespiratorio y la paciente fallece.

De la muestra de sangre se aísla SAMS. La CIM y CBM de cefalotina resultaron igual a 2 y 64 µg/mL, respectivamente. El aislamiento resultó tolerante por relación CBM/CIM y por CM.

III.2.1.1.3. Paciente infectado con SAMS 11

Hombre de 45 años que ingresa el 4 de setiembre de 2006 por un dolor agudo en el recto, fiebre y decaimiento. Se le efectúan numerosos estudios: rectosigmoideoscopia, tomografía y ecografía y se lo interna en sala de cirugía. Se realizan análisis de sangre detectándose leucocitosis.

Posteriormente se diagnostica absceso perianal por lo que se decide realizar intervención quirúrgica. Se administra profilaxis con cefalotina (2 g).

El absceso es drenado y se envía muestra al laboratorio para cultivo. Se aísla SAMS. La CIM y la CBM resultaron 4 y 64 µg/mL, respectivamente. Este aislamiento resultó tolerante por relación CBM/CIM y por CM.

Dado que el paciente se le dio el alta a las 24 horas no se pudo registrar la evolución del mismo.

III.2.1.1.4. Paciente infectado con SAMS 15

Hombre de 61 años, diabético, etilista, tabaquista que ingresa el 1 de enero de 2007 a Unidad Coronaria con fiebre, infección de pie y leve derrame pericárdico al estudio radiológico. Se toma muestra por punción aspiración y hemocultivos. Se inicia tratamiento con ceftriaxona 1 g cada 12 horas dado el estado crítico del paciente. El 2 de enero no presenta mejoría y se agrega vancomicina 1 g cada 12 horas. Se realiza ecocardiograma que resulta normal, no observándose vegetaciones. Se aísla en la muestra de piel y partes blandas SAMS. Se rota a cefalotina (1 g/día) más gentamicina

(160 mg/día). El 5 de enero entra en insuficiencia renal aguda, falla hematológica, disfunción hepática e insuficiencia respiratoria. Se observa una marcada pericarditis, neumonía y lesiones múltiples de embolización periférica. El 16 de enero pasa a Unidad de Cuidados intermedios, hemodinámicamente estable pero el 19 de enero se observa derrame pericárdico severo y al día siguiente hace un paro cardiorrespiratorio y fallece. El aislamiento tuvo una CIM y CBM de CEF igual a 1 y 8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Fue tolerante por CM y no por relación CBM/CIM que resultó igual a 8.

En síntesis, del análisis de las historias clínicas de los pacientes a los que se les pudo realizar el seguimiento; se concluye que en el paciente 1 (SAMS 3), infectado con un aislamiento tolerante, se debió recurrir a aumento de dosis de cefalotina y a un curetaje ya que el paciente no respondió con la dosis habitual. En el paciente 2 (SAMS 4), los múltiples tratamientos con CEF pudieron seleccionar el aislamiento tolerante y el tratamiento con vancomicina más gentamicina pudo no haber sido el adecuado. El paciente 4 (SAMS 15), poseía numerosos factores de riesgo, hecho que predispuso a una infección más severa y se evidenció un fracaso tanto con ceftriaxona como con CEF más gentamicina lo que sugiere que la tolerancia de este aislamiento a dicho AM, contribuyó a la ineficacia del mismo.

Si bien los aislamientos tolerantes de esta tesis fueron escasos y confirmados sólo *in vitro*, se coincide con numerosos autores que consideran que es difícil demostrar el impacto clínico del fenómeno de tolerancia en humanos, pues la actividad bactericida depende tanto de factores farmacocinéticos y farmacodinámicos del AM como de las condiciones del paciente, su estado inmunológico, comorbilidades acompañantes y la severidad de cada caso.

III.3. SECCIÓN C

III.3.1. PROPUESTA DE TÉCNICA SENCILLA PARA DETECTAR LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA

III.3.1.1. Introducción

Staphylococcus aureus meticilino sensibles (SAMS), responsable de gran parte de infecciones graves, requiere antibióticos betalactámicos intravenosos, especialmente las cefalosporinas de primera generación (Stryjewski, 2007).

Ocasionalmente algunos facultativos continúan administrando empíricamente vancomicina pero existen numerosos estudios que han demostrado, como ya se comentara anteriormente, que este antimicrobiano (AM) es menos eficaz que los betalactámicos; incluso la mortalidad de pacientes con bacteriemia por SAMS tratados con vancomicina es significativamente mayor que en los que recibieron betalactámicos (Kim y col., 2008).

Diferentes autores sugieren que, en situaciones clínicas tales como endocarditis, meningitis, osteomielitis e infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos, debe elegirse un agente bactericida (Sader y col., 2006).

Las técnicas que detectan actividad bactericida (CBM, CM, poder bactericida del suero, etc.) proveen información muy útil pero a veces son difíciles de estandarizar intra e interlaboratorios, requieren métodos laboriosos y consumen mucho tiempo.

Masuda y Tomioka (1978) y Yourassowsky y col. (1975) han propuesto métodos para determinar la actividad bactericida mediante inactivación enzimática de antibióticos betalactámicos en placas con medios agarizados. Peterson y col. utilizaron el método de difusión con discos inactivándolos con solución de betalactamasa comercial para detectar la actividad bactericida de los AM (Peterson y col., 1980; Peterson y Shanholtzer, 1992)

En nuestro país esta solución es onerosa y, a veces, difícil de conseguir.

III.3.1.2. Objetivos

- General:

Desarrollar algún método fenotípico de tamizaje que facilite la detección, *in vitro*, del fenómeno de tolerancia a los antimicrobianos betalactámicos.

- Específicos:

Evaluar una técnica simple y sencilla para determinar la actividad bactericida de cefalotina frente a SAMS utilizando discos de cefalotina (CEF), oxacilina (OXA) y cefoxitina (FOX) inactivados con solución de betalactamasa obtenida en el laboratorio.

Comparar la efectividad en la detección de la actividad bactericida de los tres discos utilizados.

III.3.1.3. Materiales y Métodos

III.3.1.3.1. Aislamientos bacterianos y AM utilizados

Se seleccionaron 42 SAMS de los estudiados en esta tesis; 22 con CBM/CIM de $CEF \geq 8$ y 20 con $CBM/CIM \leq 2$.

Los discos utilizados para aplicar la técnica propuesta fueron: cefalotina (CEF) (30 μ g) (Laboratorios Britania - Argentina), oxacilina (OXA) (1 μ g) (Laboratorios Britania - Argentina) y cefoxitina (FOX) (30 μ g) (Laboratorios Britania - Argentina).

III.3.1.3.2. Preparación de la solución de betalactamasa (SBL)

La solución de betalactamasa se preparó a partir de un aislamiento de *Citrobacter freundii* BSFE 1310 resistente a todos los antibióticos betalactámicos, excepto a carbapenemes, perteneciente al cepario de la Cátedra de Bacteriología Clínica de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral.

Luego de 24 horas de incubación en agar base a 35°-37°C, se inocularon dos ansadas completas (equivalente a un cuarto de placa) en 200 μ L de buffer de fosfato, 0,01 M, pH = 7.

La suspensión se transfirió a un tubo Eppendorf con 300 mg de zirconio (Cole-Parmer 36270-62 - Cientist S.A.), homogeneizando en vortex durante 3 minutos y centrifugando 1 minuto a 6000 rpm. El sobrenadante fue pasado a través de un filtro 0,45 μ m de tamaño de poro (Minisart^R de Sartorius). Al filtrado obtenido se lo fraccionó de manera de obtener SBL sin diluir, SBL diluída 1/2 y SBL diluída 1/10 (Marchiaro y col., 2008).

III.3.1.3.3. Control de calidad de la SBL

Una placa de Müeller-Hinton fue inoculada con una suspensión de *S. aureus* ATCC 25923 con una turbidez 0,5 Mc Farland. Una vez transcurridos 15 minutos, se colocaron dos discos de CEF (30 µg); luego uno de ellos fue goteado con 10 µL de SBL pura. Luego de 24 horas de incubación a 35°C se observó que el diámetro del disco de CEF no goteado estaba dentro del rango de sensibilidad establecido por CLSI mientras que no se observó inhibición alguna alrededor del disco goteado (CLSI, 2008b; 2009b).

III.3.1.3.4. Cuantificación de la SBL

Se utilizó el ensayo iodométrico de “*rapid-fixed time*” betalactamasa (Sawai y col., 1978; Brayn y Godfrey, 1991).

Los reactivos usados fueron:

- Reactivo de yodo: I₂ 0,32 Normal y IK 1,2 M
- Buffer 0,1 M, pH=7(Na₂HPO₄:KH₂ PO₄)
- Solución *stock* de cefalotina (CEFALOTINA ARGENTIA - Bristol Myers Squibb) 20 mM (sustrato) en buffer 0,1 M pH=7
- Betalactamasa comercial BD Difco™ Penase Concentrate : potencia: 20000 LU(Levit Unit)/mL/min; penicilinas 10000000 UI/mL (enzima estándar)
- Solución de betalactamasa preparada en el laboratorio (SBL)

III.3.1.3.4.1. *Construcción de la curva patrón para definir la dilución óptima de la SBL a utilizar*

Solución estándar: Se incubaron 2,5 mL de la enzima estándar a 30°C durante 5 minutos. Al cabo de ese tiempo, se agregó 0,5 mL de solución stock de sustrato hasta alcanzar una concentración final de 10 µmol de CEF y se continuó la incubación 10 minutos más. La reacción se detuvo con 5 mL de reactivo de I₂ el que se agregó en forma rápida y mezclando inmediatamente. Se leyó la absorbancia a 540 nanómetros.

Se prepararon dos blancos:

- blanco de I₂ (BI₂): buffer 0, M, pH:7 y reactivo de I₂
- blanco de sustrato (BS): preparado de igual manera que la solución estándar excepto que la enzima se agregó al final.

Se realizaron 4 diluciones (1/4, 1/8, 1/16 y 1/32) de la enzima estándar y se leyó la absorbancia de cada una de ellas.

Se construyó una gráfica en donde se representó en el eje de las abscisas las diluciones crecientes realizadas de la solución de enzima estándar y en las ordenadas las lecturas de las absorbancias expresadas en nanómetros.

Estas curvas se repitieron con distintas diluciones de la solución de yodo (1/10, 1/50, 1/100 y 1/1000).

Se repitió el experimento hasta lograr la mejor pendiente para la curva, siendo las diluciones óptimas 1/8 y 1/16.

III.3.1.3.4.2. Cálculo de la concentración de la SBL preparada en el laboratorio

Una vez establecidas las mejores condiciones, se determinó la absorbancia de la SBL preparada en el laboratorio.

Con dicho valor de absorbancia se realizó el cálculo de la concentración de la betalactamasa incógnita con la siguiente fórmula:

$$\text{Beta lactamasa } (\mu\text{mol/mL}) = \frac{\text{Abs}(\text{BS}) - \text{Abs}(\text{SBL})}{\text{Abs}(\text{BI}_2)} \times \frac{40}{F} \times \frac{1}{T} \times \frac{1}{V}$$

F: moles de I₂ consumido por moles de sustrato hidrolizado (para cefalotina=1,7); **T:** tiempo en minutos (10 minutos); **V:** volumen de enzima estándar agregado (2,5 mL); **Abs:** absorbancia; **BS:** blanco de sustrato; **SBL:** solución de betalactamasa; **μmol:** micromol; **mL:** mililitros; **BI₂:** blanco de I₂.

Se aplicó esta fórmula descrita para determinar la concentración de la SBL utilizada.

III.3.1.3.5. Ensayo para discos de CEF y OXA

Se efectuó por método de difusión con inóculo de la cepa 0,5 Mc Farland colocando cuatro discos de CEF (Figura III.13) y OXA por placa. Se incubaron 24 h a 35 °C según normas CLSI, para ambos discos (CLSI, 2008b; 2009b).

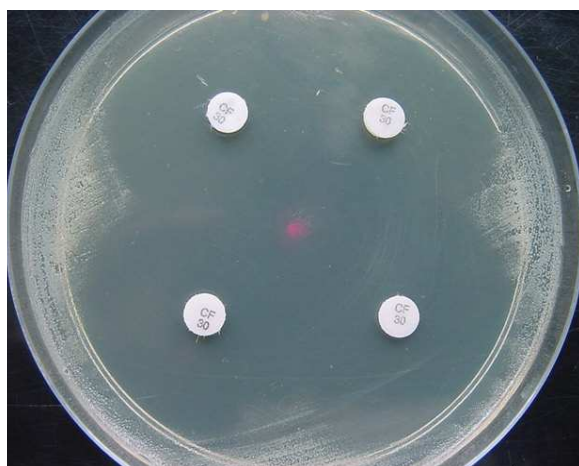


Figura III.13: Prueba de sensibilidad de cefalotina frente a *S. aureus* según normas CLSI.

Se removieron los discos y tres de ellos se reemplazaron por discos goteados con la solución de betalactamasa (SBL) pura, diluída al $\frac{1}{2}$ y al $\frac{1}{10}$ respectivamente, dejando el cuarto lugar sin ocupar. (Figura III.14)



Figura III.14: Agar Müller-Hinton con una cepa incógnita de *S. aureus* luego de 24 horas de incubación donde 3 discos de cefalotina fueron reemplazados por discos goteados con SBL pura, diluída al medio y al décimo. El cuarto lugar quedó sin disco.

Se incubó 24 h más en las mismas condiciones y luego se contaron las colonias que crecieron alrededor de los discos goteados y se comprobó fenotípicamente la identificación bacteriana.

Se interpretó como persistencia de la acción bactericida al desarrollo de *S. aureus* alrededor de los discos goteados con SBL.

III.3.1.3.6. Ensayo con discos de FOX

Se procedió de igual manera que la descrita en **III.3.1.3.5** con discos de FOX y a las 24 h se reemplazaron por otros goteados con solución de betalactamasa VIM-2 (SBL VIM-2), solución cedida por la Dra. Adriana Limansky de la Universidad Nacional de Rosario.

III.3.1.3.7. SBL VIM-2

Se utilizó SBL VIM-2 en 10mM buffer Hepes, 200mM NaCl, pH=7,5, concentración 293 μ M para gotear los discos de FOX usando diluciones 1/80, 1/100, 1/150, siendo esta última la mínima dilución que destruyó la carga del disco.

III.3.1.3.8. Método estadístico

Se utilizó el test Mann-Whitney para comparación de muestras independientes con un nivel de significancia del 5%. Se empleó el software SPSS para Windows 10.0 (Altman, 1997).

III.3.1.4. Resultados

III.3.1.4.1. Ensayos con discos de CEF y OXA

De los 42 aislamientos que se estudiaron con el disco de CEF y OXA, 22 correspondieron a $CBM/CIM \geq 8$ y 20 a $CBM/CIM \leq 2$.

Aplicando la fórmula descrita en **III.3.1.3.4.2** la concentración de la solución de betalactamasa preparada en el laboratorio resultó igual a 0,98 $\mu\text{mol/mL}$ y ésta fue la utilizada para gotear los discos de CEF y OXA.

Los datos obtenidos del recuento de colonias que crecieron alrededor del disco de CEF y OXA goteados con SBL pura, diluída al medio y al décimo de los dos grupos estudiados, se muestran en las tablas III.3, III.4, III.5 y III.6.

Tabla III.3: Estudio de 24 aislamientos de *S. aureus* con CBM/CIM de cefalotina ≥ 8 . Recuento de las UFC que desarrollaron alrededor de los discos de CEF goteados con SBL pura, diluída al medio y al décimo.

AISLAMIENTOS	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM/ CIM	SBL (UFC)	SBL1/2 (UFC)	SBL1/10 (UFC)
SAMS 1	0,25	32	128	480	960	640
SAMS 2	0,5	32	64	1120	1120	720
SAMS 3	0,5	32	64	200	160	45
SAMS 4	2	64	32	130	130	80
SAMS 5	2	64	32	304	300	180
SAMS 6	0,5	8	16	200	400	150
SAMS 7	0,5	8	16	400	480	120
SAMS 8	0,25	4	16	800	480	320
SAMS 9	0,5	8	16	210	180	100
SAMS 10	0,5	8	16	520	440	240
SAMS 11	4	64	16	50	80	60
SAMS 12	0,5	8	16	25	80	25
SAMS 13	0,5	8	16	130	130	130
SAMS 14	0,25	4	16	160	400	140
SAMS 15	1	8	8	150	90	30
SAMS 16	0,25	2	8	120	50	45
SAMS 18	1	8	8	150	280	130
SAMS 19	0,5	4	8	120	160	240
SAMS 20	0,25	2	8	60	70	30
SAMS 21	0,25	2	8	360	130	90
SAMS 23	0,5	4	8	100	170	70
SAMS 24	0,125	1	8	100	50	110

SAMS: *Staphylococcus aureus* meticilino sensible; **CIM:** concentración inhibitoria mínima; **μg :** microgramos; **mL:** mililitros; **CBM:** concentración bactericida mínima; **SBL:** solución de betalactamasa preparada en el laboratorio; **SBL1/2:** solución de betalactamasa diluída al medio; **SBL1/10:** solución de betalactamasa diluída al décimo; **UFC:** unidades formadoras de colonias.

Tabla III.4: Estudio de 20 aislamientos de *S. aureus* con CBM/CIM de cefalotina \leq 2. Recuento de las UFC que desarrollaron alrededor de los discos de CEF goteados con SBL pura, diluída al medio y al décimo.

AISLAMIENTOS	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	MBC/ CIM	SBL (UFC)	SBL1/2 (UFC)	SBL1/10 (UFC)
SAMS 65	0,5	1	2	25	15	11
SAMS 66	0,5	1	2	80	64	64
SAMS 67	0,5	1	2	45	25	38
SAMS 68	0,5	1	2	18	12	10
SAMS 71	0,5	1	2	72	64	16
SAMS 73	0,5	1	2	7	6	3
SAMS 74	0,5	1	2	80	240	100
SAMS 76	0,5	1	2	38	64	30
SAMS 77	0,5	1	2	200	120	80
SAMS 78	0,5	1	2	64	48	100
SAMS 79	0,25	0,5	2	200	130	100
SAMS 81	0,5	1	2	180	100	100
SAMS 82	0,5	1	2	250	120	100
SAMS 83	0,5	1	2	200	200	130
SAMS 84	0,25	0,5	2	56	80	120
SAMS 85	0,25	0,5	2	72	48	30
SAMS 95	0,5	0,5	1	25	41	12
SAMS 99	0,5	0,5	1	3	2	5
SAMS 100	0,5	0,5	1	200	80	20
SAMS 101	0,25	0,25	1	250	80	25

SAMS: *Staphylococcus aureus* meticilino sensible; **CIM:** concentración inhibitoria mínima; **μg :** microgramos; **mL:** mililitros; **CBM:** concentración bactericida mínima; **SBL:** solución de betalactamasa preparada en el laboratorio; **SBL1/2:** solución de betalactamasa diluída al medio; **SBL1/10:** solución de betalactamasa diluída al décimo; **UFC:** unidades formadoras de colonias.

Tabla III.5: Estudio de 22 aislamientos de *S. aureus* con CBM/CIM de cefalotina ≥ 8 . Recuento de las UFC que desarrollaron alrededor de los discos de OXA goteados con SBL pura, diluída al medio y al décimo.

AISLAMIENTOS	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM/ CIM	SBL (UFC)	SBL1/2 (UFC)	SBL1/10 (UFC)
SAMS 1	0,25	32	128	144	200	120
SAMS 2	0,5	32	64	40	40	48
SAMS 3	0,5	32	64	46	60	25
SAMS 4	2	64	32	64	80	36
SAMS 5	2	64	32	400	160	120
SAMS 6	0,5	8	16	80	100	80
SAMS 7	0,5	8	16	80	60	40
SAMS 8	0,25	4	16	200	86	80
SAMS 9	0,5	8	16	80	60	120
SAMS 10	0,5	8	16	40	70	40
SAMS 11	4	64	16	32	20	40
SAMS 12	0,5	8	16	25	25	25
SAMS 13	0,5	8	16	200	160	180
SAMS 14	0,25	4	16	24	40	38
SAMS 15	1	8	8	20	50	56
SAMS 16	0,25	2	8	88	64	40
SAMS 18	1	8	8	100	40	38
SAMS 19	0,5	4	8	3200	2400	2000
SAMS 20	0,25	2	8	15	20	56
SAMS 21	0,25	2	8	20	37	30
SAMS 23	0,5	4	8	44	56	40
SAMS 24	0,125	1	8	100	40	80

SAMS: *Staphylococcus aureus* meticilino sensible; **CIM:** concentración inhibitoria mínima; **μg :** microgramos; **mL:** mililitros; **CBM:** concentración bactericida mínima; **SBL:** solución de betalactamasa preparada en el laboratorio; **SBL1/2:** solución de betalactamasa diluída al medio; **SBL1/10:** solución de betalactamasa diluída al décimo; **UFC:** unidades formadoras de colonias.

Tabla III.6: Estudio de 20 aislamientos de *S. aureus* con CBM/CIM de cefalotina ≤ 2 . Recuento de las UFC que desarrollaron alrededor de los discos de OXA goteados con SBL pura, diluída al medio y al décimo.

AISLAMIENTOS	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	MBC/ CIM	SBL (UFC)	SBL1/2 (UFC)	SBL1/10 (UFC)
SAMS 65	0,5	1	2	40	38	25
SAMS 66	0,5	1	2	33	37	34
SAMS 67	0,5	1	2	10	10	2
SAMS 68	0,5	1	2	8	16	6
SAMS 71	0,5	1	2	38	50	20
SAMS 73	0,5	1	2	19	22	11
SAMS 74	0,5	1	2	12	9	10
SAMS 76	0,5	1	2	10	1	5
SAMS 77	0,5	1	2	30	40	35
SAMS 78	0,5	1	2	8	10	10
SAMS 79	0,25	0,5	2	32	40	28
SAMS 81	0,5	1	2	10	15	30
SAMS 82	0,5	1	2	10	7	26
SAMS 83	0,5	1	2	40	42	28
SAMS 84	0,25	0,5	2	40	25	20
SAMS 85	0,25	0,5	2	35	23	25
SAMS 95	0,5	0,5	1	25	25	20
SAMS 99	0,5	0,5	1	10	9	10
SAMS 100	0,5	0,5	1	8	10	10
SAMS 101	0,25	0,25	1	40	15	10

SAMS: *Staphylococcus aureus* meticilino sensible; **CIM:** concentración inhibitoria mínima; **μg :** microgramos; **mL:** mililitros; **CBM:** concentración bactericida mínima; **SBL:** solución de betalactamasa preparada en el laboratorio; **SBL1/2:** solución de betalactamasa diluída al medio; **SBL1/10:** solución de betalactamasa diluída al décimo; **UFC:** unidades formadoras de colonias.

Cuando se aplicó el test Mann Whitney para comparar las UFC desarrolladas alrededor del disco de CEF y OXA goteados con SBL pura, diluída al medio y al décimo en ambos grupos, se obtuvieron los datos mostrados en la tabla III.7.

Tabla III.7: Test de Mann-Whitney para los discos de CEF y OXA goteados con SBL pura, diluída al medio y al décimo.

	DISCO CEF GOTEADO			DISCO OXA GOTEADO		
	SBL PURA	SBL 1/2	SBL 1/10	SBL PURA	SBL 1/2	SBL 1/10
Mann-Whitney U	114,000	71,500	93,000	62,000	45,000	16,500
Wilcoxon W	324,000	281,500	303,000	272,000	255,000	226,500
Z	- 2,675	- 3,746	- 3,205	- 3,990	-4,417	-5,139
Asymp. Sig. (2-tailed)	,007	,0001	,001	,0005	,0003	,0001

CEF: cefalotina; **OXA:** oxacilina; **SBL:** solución de betalactamasa; **SBL 1/2:** solución de betalactamasa diluída al medio; **SBL 1/10:** solución de betalactamasa diluída al décimo.

■ Diferencias más significativas halladas para el ensayo de los discos de CEF y OXA (permitió una mayor discriminación entre ambos grupos).

En las figuras III.15 y III.16 se puede observar un aislamiento CBM/CIM ≥ 8 con tres discos de CEF goteados luego de 24 horas de incubación a 35°C y un aislamiento CBM/CIM ≤ 2 , respectivamente.



Figura III.15: Aislamiento de *S. aureus* con CBM/CIM de cefalotina ≥ 8 después de 24 horas de incubación a 35°C con los tres discos reemplazados y goteados con SBL.



Figura III.16: Aislamiento de *S. aureus* con CBM/CIM de cefalotina ≤ 2 después de 24 horas de incubación a 35°C con los tres discos reemplazados y goteados con SBL.

En las figuras III.17 y III.18 se observan las ampliaciones de las Figuras III.15 y III.16, respectivamente. En cada una de ellas se visualiza el desarrollo bacteriano descrito.



Figura III.17: Ampliación de la figura III.15. Aislamiento de *S. aureus* con CBM/CIM de cefalotina ≥ 8 y el disco reemplazado de CEF y goteado con SBL diluída al medio.



Figura III.18: Ampliación de la figura III.16. Aislamiento de *S. aureus* con CBM/CIM de cefalotina ≤ 2 con el disco reemplazado y goteado con SBL diluída al medio.

Obsérvese la diferencia en el crecimiento de colonias de los dos grupos alrededor del disco goteado con la misma dilución.

III.3.1.4.2. Ensayo con disco de FOX

Los recuentos de colonias obtenidos alrededor de los discos de FOX goteados con SBL VIM-2 diluída 1/80, 1/100 y 1/150 se muestran en las tablas III.8 y III.9.

Tabla III.8: Estudio de 22 aislamientos de *S. aureus* con CBM/CIM de cefalotina ≥ 8 . Recuento de las UFC que desarrollaron alrededor de los discos de FOX goteados con VIM-2 diluída 1/80, 1/100 y 1/150.

AISLAMIENTOS	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM/ CIM	VIM-2 1/80 (UFC)	VIM-2 1/100 (UFC)	VIM-2 1/150 (UFC)
SAMS 1	0,25	32	128	36	38	88
SAMS 2	0,5	32	64	6	11	68
SAMS 3	0,5	32	64	9	7	30
SAMS 4	2	64	32	7	6	22
SAMS 5	2	64	32	20	25	100
SAMS 6	0,5	8	16	6	40	100
SAMS 7	0,5	8	16	7	3	44
SAMS 8	0,25	4	16	1	7	44
SAMS 9	0,5	8	16	3	9	62
SAMS 10	0,5	8	16	0	3	45
SAMS 11	4	64	16	5	1	50
SAMS 12	0,5	8	16	4	1	44
SAMS 13	0,5	8	16	64	60	63
SAMS 14	0,25	4	16	11	2	192
SAMS 15	1	8	8	18	20	44
SAMS 16	0,25	2	8	34	15	88
SAMS 18	1	8	8	7	18	50
SAMS 19	0,5	4	8	224	256	450
SAMS 20	0,25	2	8	13	5	44
SAMS 21	0,25	2	8	2	0	30
SAMS 23	0,5	4	8	15	25	30
SAMS 24	0,125	1	8	15	8	88

SAMS: *Staphylococcus aureus* meticilino sensible; **CIM:** concentración inhibitoria mínima; **μg :** microgramos; **mL:** mililitros; **CBM:** concentración bactericida mínima; **VIM-2:** solución de betalactamasa preparada en el laboratorio; **VIM-2 1/80:** solución de betalactamasa diluída 1/80; **VIM-2 1/100:** solución de betalactamasa diluída 1/100; **VIM-2 1/150:** solución de betalactamasa diluída 1/150; **UFC:** unidades formadoras de colonias.

Tabla III.9: Estudio de 20 aislamientos de *S. aureus* con CBM/CIM de cefalotina ≤ 2 . Recuento de las UFC que desarrollaron alrededor de los discos de FOX goteados con VIM-2 diluída 1/80, 1/100 y 1/150.

AISLAMIENTOS	CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CBM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MBC/ CIM	VIM-2 1/80 (UFC)	VIM-2 1/100 (UFC)	VIM-2 1/150 (UFC)
SAMS 65	0,5	1	2	0	0	70
SAMS 66	0,5	1	2	3	0	20
SAMS 67	0,5	1	2	16	10	30
SAMS 68	0,5	1	2	0	1	36
SAMS 71	0,5	1	2	32	12	32
SAMS 73	0,5	1	2	5	2	40
SAMS 74	0,5	1	2	0	0	56
SAMS 76	0,5	1	2	0	8	30
SAMS 77	0,5	1	2	0	1	40
SAMS 78	0,5	1	2	28	36	80
SAMS 79	0,25	0,5	2	4	6	36
SAMS 81	0,5	1	2	15	18	40
SAMS 82	0,5	1	2	2	4	10
SAMS 83	0,5	1	2	1	0	17
SAMS 84	0,25	0,5	2	13	15	40
SAMS 85	0,25	0,5	2	9	6	48
SAMS 95	0,5	0,5	1	9	25	18
SAMS 99	0,5	0,5	1	2	2	52
SAMS 100	0,5	0,5	1	5	3	20
SAMS 101	0,25	0,25	1	2	0	30

SAMS: *Staphylococcus aureus* meticilino sensible; **CIM:** concentración inhibitoria mínima; **μg :** microgramos; **mL:** mililitros; **CBM:** concentración bactericida mínima; **VIM-2:** solución de betalactamasa preparada en el laboratorio; **VIM-2 1/80:** solución de betalactamasa diluída 1/80; **VIM-2 1/100:** solución de betalactamasa diluída 1/100; **VIM-2 1/150:** solución de betalactamasa diluída 1/150; **UFC:** unidades formadoras de colonias.

A los recuentos de colonias que desarrollaron alrededor del disco de FOX reemplazados y goteados con SBL VIM-2 diluída 1/80, 1/100 y 1/150 se les aplicó el análisis estadístico obteniéndose los valores mostrados en la tabla III.10.

Tabla III.10: Test de Mann-Whitney para el disco de FOX goteado con SBL-VIM2 diluída 1/80, 1/100 y 1/150.

	DISCO FOX GOTEADO		
	SBL-VIM 2 1/80	SBL-VIM 2 1/100	SBL-VIM 2 1/150
Mann-Whitney U	134,000	143,000	99,500
WilcoxonW	344,000	353,000	309,500
Z	-2,172	-1,944	-3,044
Asymp. Sig. (2-tailed)	,030	,052	,002

FOX: cefoxitina; **SBL-VIM 2 1/80:** solución de betalactamasa VIM 2 diluída 1/80; **SBL-VIM 2 1/100:** solución de betalactamasa VIM 2 diluída 1/100; **SBL-VIM 2 1/150:** solución de betalactamasa VIM 2 diluída 1/150

Diferencia más significativa hallada para el ensayo de disco FOX goteado (dilución que permitió una mayor discriminación entre ambos grupos)

Las frecuencias acumuladas de ambos grupos, con los tres discos ensayados y goteados con la correspondiente solución a la dilución que logró una mejor diferenciación entre ambos grupos estudiados, se observan en la tabla III.11.

Tabla III.11: Frecuencias de UFC acumuladas para los discos de cefalotina, oxacilina y ceftioxina goteados con la dilución de SBL que logró mejor diferenciación.

CEFALOTINA				OXACILINA				CEFTIOXINA			
≥8		≤2		≥8		≤2		≥8		≤2	
UFC	FA	UFC	FA	UFC	FA	UFC	FA	UFC	FA	UFC	FA
50	9,1	6	10,0	25	9,1	2	5,0	22	4,5	10	5,0
70	13,6	12	15,0	30	13,6	5	10,0	30	18,2	17	10,0
80	22,7	15	20,0	36	18,2	6	15,0	44	40,9	18	15,0
90	27,3	25	25,0	38	27,3	10	40,0	45	45,5	20	25,0
130	40,9	41	30,0	40	50,0	11	45,0	50	54,5	30	40,0
160	50,0	48	40,0	48	54,5	20	60,0	62	59,1	32	45,0
170	54,5	64	55,0	56	63,6	25	70,0	63	63,6	36	55,0
180	59,1	80	70,0	80	77,3	26	75,0	68	68,2	40	75,0
280	63,6	100	75,0	120	90,9	28	85,0	88	81,8	48	80,0
300	68,2	120	85,0	180	95,5	30	90,0	100	90,9	52	85,0
400	77,3	130	90,0	2000	100	34	95,0	192	95,5	56	90,0
440	88,0	200	95,0			35	100	450	100	70	95,0
480	90,9	240	100							80	100
960	95,5										
1120	100										

≥8: aislamientos con relación CBM/CIM de cefalotina ≥ 8; ≤2: aislamientos con relación de CBM/CIM de cefalotina ≤ 2; UFC: unidades formadoras de colonias que crecieron alrededor de los discos goteados; FA: porcentaje de frecuencia acumulativa.

■ Puntos de corte para cada AM que permitió separar las poblaciones con porcentajes superiores al 70% a excepción del disco de ceftioxina que alcanzó un 59.1%.

III.3.1.5. Discusión

Como se comentó previamente, esta técnica fue desarrollada por Peterson y col. (1980) quienes utilizaron discos de penicilina goteados con betalactamasa comercial para *Streptococcus viridans*. Estos autores demostraron que es una técnica simple y rápida para la detección de cepas tolerantes y sugirieron que la tolerancia puede estar más asociada a las cefalosporinas que a la penicilina. A partir de estos hallazgos, varios autores propusieron diversas técnicas para detectar la actividad bactericida (Dankert y col., 1982; Cunha y col., 2010).

Masuda y Tomioka (1975) comunicaron que, si bien estos estudios fueron realizados utilizando cefalosporinas y penicilina inestables a las betalactamasas, dicho método puede ser aplicado a cualquier antibiótico siempre que se disponga de enzimas óptimas y potentes. Los datos obtenidos en esta tesis concordaron con lo expresado por estos autores ya que para el disco de FOX se usó SBL VIM-2.

Además estos investigadores expresaron que el método era simple y ahorra tiempo para detectar la actividad bacteriostática y bactericida de los antibióticos betalactámicos (Masuda y Tomioka, 1975), lo que sería coincidente con las conclusiones deducidas del presente trabajo.

Si bien algunos autores sostienen que la superioridad de AM bactericidas sobre los bacteriostáticos permanece controversial, Traczewski y col. (2009) utilizaron la relación CBM/CIM y la CBM_{90} para demostrar la potencia de nuevos AM tales como daptomicina frente a *Staphylococcus aureus*. Estos investigadores concluyeron además que, a pesar de la relativa facilidad del rendimiento, la CBM puede ser una herramienta útil en la decisión de los clínicos a la hora de elegir un tratamiento frente a determinados pacientes; lo que valoriza el uso de la técnica aplicada en este trabajo de tesis.

En el presente estudio se intentó comparar los aislamientos de SAMS con CBM/CIM de $CEF \geq 8$ y ≤ 2 utilizando discos de CEF, OXA y FOX reemplazados y goteados con soluciones de betalactamasa producidas en el laboratorio y de calidad controlada.

Se coincide con Peterson y col. (1980) quienes concluyeron que se trata de una técnica fácil y accesible y que permite establecer puntos de corte en función de las colonias que crecen alrededor de los distintos discos previamente goteados.

Se observó que cuando se usaron discos de CEF con dilución 1/2 de SBL preparada en el laboratorio, se pudo establecer una diferencia altamente significativa entre ambos grupos en su respuesta a la bactericidia ($p < 0,0001$), (Tabla III.7).

De las frecuencias acumuladas para el disco de CEF se dedujo que cuando el recuento de UFC fue mayor a 90, el 72.7% de las cepas eran $CBM/CIM \geq 8$, mientras que un 30 % cepas del grupo $CBM/CIM \leq 2$ alcanzaron valores superiores (Tabla III.11), (Méndez y col., 2008).

Para FOX la dilución 1/150 mostró mejores resultados ($p < 0,002$), (Tabla III.10). El 60.1% de los aislamientos con $CBM/CIM \geq 8$ crecieron con más de 40 UFC y se encontró que el 25 % de las cepas $CBM/CIM \leq 2$ tuvieron valores superiores a 40 UFC (Tabla III.11), (Méndez y col., 2009b).

En cuanto al disco de OXA, los mejores resultados se lograron con la dilución 1/10 de BLS ($p < 0,0001$), (Tabla III.7). Se demostró que un número de aislamientos mayor a 30 UFC, en el 81.8 % de los casos perteneció al grupo $CBM/CIM \geq 8$ en contraste con sólo el 10 % de cepas $CBM/CIM \leq 2$ que alcanzaron recuentos máximos de hasta 35 UFC.

Se destaca que esta técnica se puso a punto y se desarrolló en esta tesis no existiendo bibliografía o reportes al respecto, aunque otros investigadores efectuaron ensayos con discos de penicilina. Además se utilizó SBL producida en el laboratorio, no comercial y estandarizada.

III.3.1.6. Conclusiones

- La utilización del disco de OXA resultó mejor que la de discos de CEF y de FOX ya que permitió contener un mayor porcentaje de cepas con valores elevados en la relación $CBM/CIM \geq 8$, minimizando la superposición de cepas $CBM/CIM \leq 2$ a sólo un 10%.
- La técnica ensayada resultó simple y accesible para la detección de SAMS tolerantes a la acción bactericida de cefalotina. Esto la hace clínicamente útil para ser aplicada en los laboratorios de microbiología a fin de orientar la selección del tratamiento adecuado siendo más rápida que los estudios de tiempo de muerte.

CAPÍTULO IV

STAPHILOCOCCUS AUREUS **METICILINO RESISTENTES**

IV.1. SECCIÓN A

IV.1.1. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA Y BACTERICIDA MÍNIMAS Y CURVAS DE CINÉTICA DE MUERTE

IV.1.1.1. Introducción

Al poco tiempo de la introducción de la meticilina para el tratamiento de las infecciones estafilocócicas, emerge en Inglaterra, en el año 1960, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR) (Jevons, 1961), destacándose como importante patógeno nosocomial, principalmente en las unidades de cuidados intensivos (UTI). SAMR fue reconocido por primera vez en EEUU como causa de un brote en el Boston City Hospital a finales de los '60. Por razones no claras hubo relativamente pocos casos hasta 1975 donde comenzaron a reportarse brotes hasta llegar actualmente a representar más del 60% de los aislamientos hospitalarios (Boucher y Corey, 2008).

IV.1.1.1.1. Aumento de la frecuencia y complejidad de las infecciones por SAMR

Las infecciones por este agente son comunicadas cada vez con mayor frecuencia en todo el mundo (Grundmann y col., 2006; Zeller y Golub, 2011). En el año 2003 se reportó en EEUU, el ingreso de 400.000 pacientes anuales debido a infecciones por esta bacteria (Noskin y col., 2005). Los problemas derivados de estos pacientes son cada vez más complejos debido a las exigencias del sistema de salud actual que se ha tornado técnicamente avanzado y complejo. Consecuentemente, el tratamiento de estas infecciones se hace cada vez más difícil ya que conlleva un progresivo aumento de los gastos de dichos centros y mayor morbi-mortalidad (Cosgrove y Fowler, 2008).

En la Tabla IV.1 se presenta el número de muertes estimado que se producen por enfermedades infecciosas en los EEUU (Boucher y Corey, 2008). Como se puede observar, las infecciones por SAMR causan anualmente la muerte de 19.000 pacientes hospitalizados, similar al número producido por SIDA, tuberculosis y hepatitis viral combinadas.

Tabla IV.1: Número de muertes estimado según enfermedades infecciosas en EEUU. (Boucher y Corey, 2008).

Tipo infección	Nº muertes (estimado)	Año
Infección por SAMR	19.000 (muertos en el hospital)	2005
SIDA	15.798	2004
Tuberculosis	662	2004
Hepatitis viral	5793	2002
SRAG	0	2002-2005
Influenza aviar	0	2002-2005

SAMR: *Staphylococcus aureus* metilino resistentes; **Nº:** número; **SIDA:** síndrome de inmunodeficiencia adquirida; **SRAG:** síndrome respiratorio agudo grave.

Los elevados costos que ocasionan pacientes con bacteriemia por SAMR asociada a catéter se duplican si se trata de bacteriemias adquiridas en el hospital. En pacientes con este tipo de dispositivo endovenoso, la mortalidad es del 17% si se trata de catéteres colocados por períodos prolongados de hasta 12 semanas, y aumenta a 35%, si se trata de pacientes con prótesis o válvulas cardíacas (Cosgrove y Fowler, 2008).

La endocarditis infecciosa es una de las complicaciones más severas y su incidencia ha ido en aumento. Se ha reportado que el 30% de endocarditis diagnosticadas se deben a este agente, y que esto sucede no sólo en EEUU sino en todo el mundo (Casabe, 2008).

IV.1.1.1.2. Infección hospitalaria por SAMR

A pesar que SAMR se identificó en 1961, recién a mediados de los '80 se transformó en un patógeno importante. El aumento de las infecciones por SAMR refleja probablemente el creciente impacto de las intervenciones médicas, la mayor utilización de dispositivos intravasculares y la mayor edad y co-morbilidad de los pacientes. El uso y abuso de los AM también contribuyó a la emergencia de la resistencia (Cosgrove y Fowler, 2008).

Existen cada vez más estudios que reportan el aumento de estas infecciones. El Centers for Disease Control (CDC) de EEUU informó que entre los años 1999-2000 hubo 125.969 hospitalizaciones, incluyendo bacteriemias y neumonías (Kuehnert y col., 2005).

El programa de vigilancia de bacteriemias por SAMR que se llevó a cabo en EEUU demostró que los aislamientos por SAMR aumentaron de 22% en 1995 a 57% en 2001 (Wisplinghoff y col., 2004). También se determinó que existía variación geográfica con mayor número de infecciones en el sur de ese país.

De manera similar, en Europa se detectaron diferencias en la incidencia comunicada entre los años 1999 y 2002 variando desde el 0,5% en Islandia hasta el 44% en Grecia (Tiemersma y col., 2004).

La importancia de estas infecciones radica en la alta morbi-mortalidad. Dos meta análisis demostraron que, entre los años 1980 y 2000, la mortalidad debida a las infecciones por SAMR fue mayor que las producidas por SAMS (Cosgrove y col., 2003). Hasta la fecha, los investigadores no se han puesto de acuerdo respecto a las causas que motivan la mayor mortalidad. Algunos argumentan que ciertos factores se deben a la mayor virulencia de SAMR mientras que otros sugieren que las diferencias radican en el tipo de paciente que contrae estas infecciones, ya que se trata de individuos de mayor edad y con enfermedades de base. Otros, sostienen que el uso de antibióticos inefectivos juega un rol importante en la respuesta de la terapia.

IV.1.1.1.3. SAMR en Argentina

En nuestro país, Catalano y col. (1982) reportaron por primera vez el caso de un aislamiento de *S. aureus* tolerante, o sea, con un efecto bactericida disminuido a CEF 1G, en un paciente que ingresó con una pancreatitis aguda y focos necrohemorrágicos desarrollando una sepsis por este microorganismo. Llamaba la atención que esta bacteria era sensible a cefalotina y resistente a meticilina por el método de difusión con discos.

Comenzaba, sin sospecharlo la comunidad científica, la era del SAMR en Argentina.

En 1989, nuevamente estos autores publicaron otros estudios de sensibilidad de *Staphylococcus* sp. frente a 15 antimicrobianos registrando la aparición de cepas oxacilino-resistentes (Catalano y col., 1989).

Posteriormente diversos investigadores de nuestro país realizaron numerosas comunicaciones en eventos nacionales e internacionales sobre este agente (Bogado y col., 1995; Bantar y col., 1998; Rossi y col., 1999).

En un estudio realizado recientemente, sobre 39 casos de bacteriemia por *S. aureus*, 22 (56,4%) fueron causados por SAMS y 17 (43,6%) por SAMR. A pesar que la incidencia de SAMS fue mayor, la mortalidad global fue del 51,3% y estuvo significativamente asociada con la resistencia a la meticilina (Traversa y col., 2010).

En la ciudad de Santa Fe, específicamente en el Hospital Dr. José María Cullen, centro donde se obtuvieron las cepas de este estudio, se comunicó en el año 1993, que la resistencia a meticilina en *S. aureus*, determinada por el método de dilución en caldo, era del 23% (Méndez y col., 1993; Méndez y col., 1995).

Como se desprende de la lectura de esta tesis la prevalencia de SAMR en dicha institución aumentó del 23% en el año 1993 al 44 % en la actualidad, coincidiendo con la mayoría de los reportes nacionales e internacionales.

IV.1.1.1.4. Resistencia intrínseca a meticilina

La resistencia a la meticilina se debe a la presencia del gen *mecA*. Este gen es un segmento de ADN cromosomal de 30 a 50 Kb, que posee dos elementos regulatorios (*mecR1* y *mecI*) que controlan la transcripción de dicho gen. Éste, codifica una proteína ligando penicilina (PLP o PBP) anómala denominada PBP2a que participa en la síntesis de la pared celular. La expresión del gen puede ser inducible o constitutiva (Utsui y Yokota, 1985).

Se ha sugerido que *mecA* y su ADN asociado son elementos móviles; probablemente los plásmidos de betalactamasas pueden proveer un sitio de inserción temporal para el transposón que contiene el *mec*. Su región promotora, constituida por los 300 primeros nucleótidos más los genes regulatorios, es similar en secuencias a las regiones análogas de las betalactamasas estafilocócicas. Los genes regulatorios *mecI* y *mecR1* reprimen (*mecI*) o conducen (*mecR1*) la expresión de *mecA* (Goldstein y col., 2007).

La región *mec* es inestable. Por estudios con enzimas de restricción se ha hecho el mapeo del cromosoma que porta el gen *mec* en cepas recuperadas de hospitales y se ha observado que presentan, además, genes de resistencia para otros AM y metales pesados. Hay transposones y secuencias de inserción presentes, incluyendo el Tn554 que contiene a *ermA* (codifica resistencia a eritromicina) localizado en la posición 5' del *mecA*, además del TS431 en la posición 3' asociado a determinantes de resistencia incluyendo cadmio, mercurio y tetraciclina. La facilidad de recombinación homóloga para agrupar determinantes de resistencia con elementos de inserción similares, explica esta resistencia a múltiples fármacos (de Lencastre y col., 2007).

IV.1.1.1.5. Detección de la resistencia a la meticilina

SAMR son resistentes a todos los betalactámicos y a la combinación de estos con inhibidores. La detección es complicada dado que en muchas cepas su expresión fenotípica es heterogénea; esto ocurre cuando sólo una fracción de la población la expresa (Giannouli y col., 2010).

Se han desarrollado varias alternativas para su detección fenotípica, tales como la prueba de tamizaje en agar Müeller-Hinton con 6 µg/mL de OXA, adicionado de 4 % de cloruro de sodio, técnica estandarizada por CLSI. Se ha diseñado esta técnica utilizando otros AM tales como FOX usando distintas concentraciones (Lorenz y col., 2006). También existen métodos comerciales tales como el ensayo de aglutinación que detecta la presencia de la PBP2a (Felten y col., 2002) con excelentes resultados según trabajos realizados en los que se compara este método con la detección del *mecA* (Soloaga y col., 2004).

A pesar de todos estos intentos para determinar la meticilino resistencia de manera sencilla, el método “*gold standard*” es la investigación del gen *mecA* por PCR.

IV.1.1.1.6. SAMR adquiridos en la comunidad

SAMR siempre fue considerado un patógeno intrahospitalario. Sin embargo, desde mediados de los '90, se ha producido una “explosión” en el número de infecciones por SAMR en poblaciones que carecen de factores de riesgo y que no han sido expuestas al sistema de salud (Elliott y col., 2009; David y Daum, 2010). Este aumento ha sido asociado al reconocimiento de nuevos SAMR, comúnmente llamados “SAMR adquirido en la comunidad” (SAMR-AC). Estos aislamientos parecen haberse diseminado rápidamente entre la población general de EEUU y actualmente afectan a pacientes con o sin exposición al entorno del sistema de salud.

Las cepas SAMR-AC se han diferenciado de las cepas SAMR asociadas a cuidados de la salud (SAMR-AH) por características moleculares distintivas. Las cepas de SAMR-AH poseen un elemento genético móvil conocido como “*staphylococcal chromosomal cassette mec*” (SCC*mec*) relativamente de gran tamaño tipo I, II, IV. (Todos los tipos de SCC*mec* tienen en común la presencia del gen *mecA*, el cual es universal en los aislamientos SAMR). Estas cepas con frecuencia son resistentes a otras clases de antibióticos no beta-lactámicos (es decir son multi-resistentes) y rara vez presentan el factor de virulencia LPV. Por el contrario, las cepas de SAMR-AC poseen elementos SCC*mec* más pequeños, principalmente IV y V, los cuales serían más móviles (aunque es poca la evidencia que apoya esta teoría). Estas cepas son resistentes

a pocos antibióticos no beta-lactámicos (no presentan multi-resistencia) y frecuentemente poseen LPV (Berglund y Soderquist, 2008). Actualmente se han descubierto otros nuevos elementos asociados a SAMR-AC.

Además de estas diferencias en las características genóticas, SAMR-AC infecta a una población distinta de la afectada por SAMR-AH y causa síndromes clínicos también diferentes. Las infecciones por SAMR-AC tienden a producirse en pacientes jóvenes previamente sanos. Se han asociado principalmente con infecciones de PPB pero también con síndromes clínicos severos tales como neumonía necrotizante y sepsis grave (Rouzic y col., 2010). Por el contrario, SAMR-AH se ha aislado principalmente de personas mayores, con una o más condiciones mórbidas, exposición previa al ambiente de la salud y tienden a producir neumonía, bacteriemia e infecciones invasivas (Shor y col., 2006).

Las infecciones por SAMR-AC han llevado a una crisis de salud pública en los servicios de emergencia de EEUU. Un estudio realizado en San Francisco, CA, EEUU, desde 2004 hasta 2005 demostró que el 90% de las infecciones por SAMR tenían inicio en la comunidad con una incidencia de 316 casos/100.000 personas (Liu y col., 2008). Otra investigación realizada entre 1997 y 2005, estimó que la concurrencia anual de pacientes externos a los servicios de emergencia por abscesos o celulitis se duplicó desde 17,3 a 32,5 casos cada 1.000 personas (Hersh y col., 2008), atribuyéndosele a los aislamientos de SAMR-AC la principal responsabilidad. En algunas regiones, estos aislamientos se recuperan del 75% de infecciones por *S. aureus* asociadas a la comunidad en niños (Sdougkos y col., 2008; Ezcurra y col., 2009).

Para complicar aún más el marco epidemiológico, algunas de las infecciones por “SAMR de inicio en la comunidad” (SAMR-CO), son producidas por cepas de SAMR-AH, tal vez relacionadas al creciente manejo de las complicadas infecciones por SAMR-AH tratadas en el domicilio del paciente.

Por lo tanto, SAMR en la comunidad tiene una compleja epidemiología que surge del “escape” de las SAMR-AH a la población general, las llamadas cepas

“salvajes” y de las cepas SAMR-AC reconocidas recientemente y cuyo surgimiento tiene importantes implicancias clínicas (Bygott y col., 2008).

En la actualidad, existen grandes reservorios de SAMR fuera de los centros de salud. Esto implica que los intentos llevados a cabo en EEUU para controlar este microorganismo utilizando métodos basados en control de la infección nosocomial, probablemente no sean exitosos sino se acompañan de un esfuerzo similar para contrarrestar la diseminación en la comunidad (Fosch y col., 2010; Nagel y col., 2010; Giusti y col., 2011b; Cristobal y col., 2011; Otter y French, 2011).

Además las infecciones por SAMR ocasionan mayores erogaciones y son más difíciles de tratar que las producidas por SAMS.

Este hecho se agrava ya que, en la actualidad, existen relativamente pocos antibióticos disponibles para el tratamiento de los mismos. Más aún, los agentes antimicrobianos utilizables, tienen importantes limitaciones y el desarrollo de nuevas clases de antibióticos ha disminuido (Wenzel y col., 2008). Se han reportado, últimamente, aislamientos de *S. aureus* que son resistentes a las pocas drogas antiestafilocócicas efectivas contra SAMR elevando las posibilidades de infecciones por *S. aureus* multi-resistentes imposibles de tratar (Silver, 2011).

De todo lo expresado anteriormente, se desprende la dificultad del tratamiento de estas infecciones y la necesidad de estudiar la actividad de la vancomicina frente a los aislamientos SAMR-AH y SAMR-AC.

IV.1.1.1.7. Vancomicina: historia de un AM exitoso

A pesar de que han pasado ya más de 50 años desde su descubrimiento, existe un creciente interés en la vancomicina. Paralelamente (Figura IV.1) han aumentado las publicaciones relacionadas con el conocimiento y uso de este interesante antibiótico (Levine, 2006).

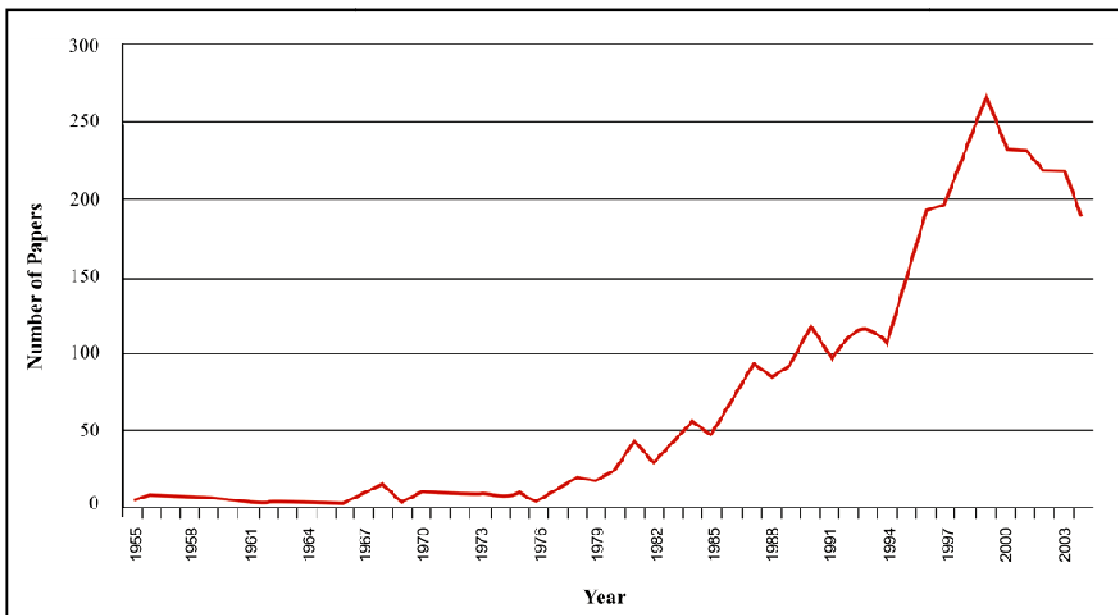


Figura IV.1: Cantidad de artículos en inglés en cuyo título se menciona VAN. Años 1950-2003. (Extraído de Levine, 2006).

En 1950, con ya pocas opciones para tratar infecciones estafilocócicas resistentes a la penicilina, el laboratorio Eli Lilly and Company inició un programa dirigido a descubrir nuevos AM con actividad frente a este patógeno. En 1952 un misionero de Borneo (isla del sudeste asiático) envió una muestra de tierra a su amigo Dr. Kornfield, un químico orgánico que trabajaba en esa compañía. Este investigador aisló de esa muestra *Streptomyces orientalis*, aislamiento que resultó activo frente a organismos gram-positivos.

Inicialmente esta droga se denominó “*Mississippi mud*” debido a su color marrón y se realizaron con ella experimentos *in-vitro* para determinar su sensibilidad frente a todos los aislamientos disponibles en el mundo. Luego debió ser purificada; obteniéndose otra que se llamó “vancomicina” derivada de la palabra inglesa “*vanquish*”: “vencer a”. Fue así que estuvo disponible para ensayos clínicos.

IV.1.1.1.8. Vancomicina: uso clínico

Como se expresó anteriormente, una vez introducida la VAN fue eclipsada por otros AM menos tóxicos y con igual o mayor eficacia. No obstante, a comienzos de los años '80 ocurre un “dramático” aumento en el uso de este ATB (Figura IV.2).

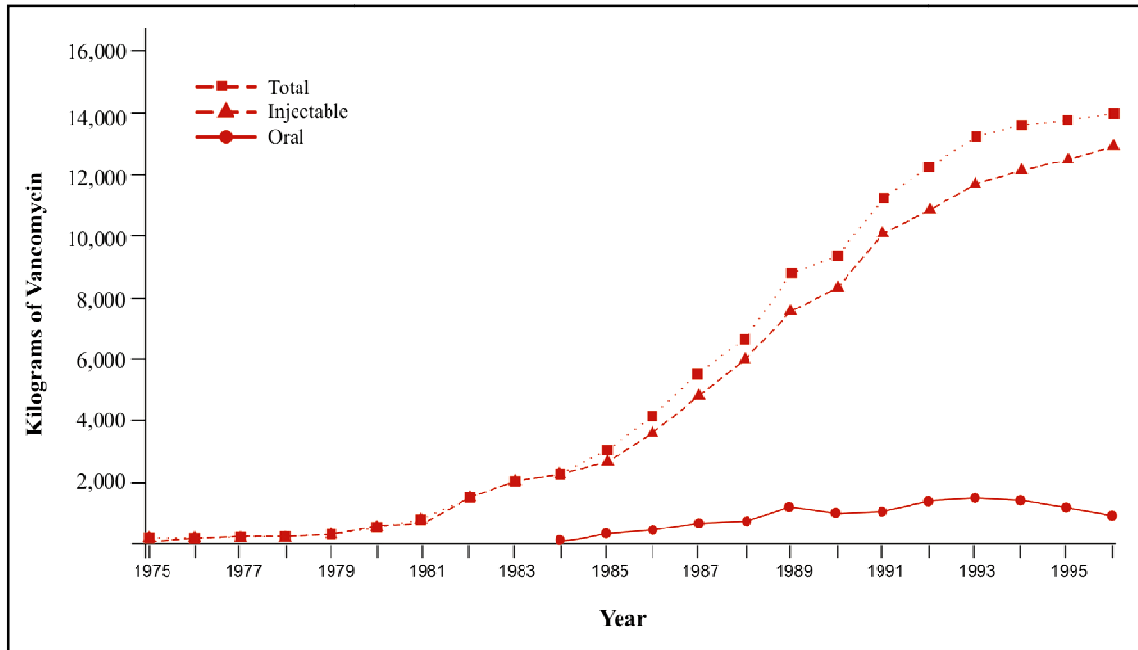


Figura IV.2: Uso de VAN en los EEUU, Francia, Italia, Alemania e Inglaterra desde 1975 a 1995. (Extraído de Levine, 2006).

Dos eventos fueron responsables de este incremento. El primero, fue el diagnóstico de la colitis pseudomembranosa, infección que tuvo una excelente respuesta debido a que la VAN es pobremente absorbida por el tracto intestinal. Lo que motivó que se transformara en la droga de elección para esta patología. Sin embargo, el uso indiscriminado de VAN, especialmente por vía oral, fue responsable en parte, de la aparición de *Enterococcus* sp. resistente a VAN (Sethi y col., 2009).

El segundo evento que llevó al aumento del uso de VAN fue la emergencia de patógenos resistentes; primero SAMR y luego *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina (Sakoulas y Moellering, 2008).

Posteriormente se comunicaron *S. aureus* con sensibilidad intermedia a VAN y luego resistentes a ella, pero aún no son considerados como problema de salud pública (Howden y col., 2010; Mollerach y col., 2010; Pitz y col., 2011).

A pesar de haber comenzado la era de la resistencia a la VAN, es importante reconocer que puede haber fracasos en aislamientos sensibles. Además Fowler y col. (2005) encontraron que en pacientes con bacteriemia por SAMR con CIM de VAN = 0,05 $\mu\text{g/mL}$, tenían 55,6% de éxito terapéutico comparado con un 9,5% en los pacientes cuyos aislamientos tenían una CIM entre 1 y 2 $\mu\text{g/mL}$.

Con el conocimiento de la concentración terapéutica y de la CIM de VAN frente a los principales patógenos se podrían mejorar las deficiencias intrínsecas y la utilidad de esta droga. Por ejemplo conocer el nivel sérico de VAN jugaría un rol importante en el tratamiento de la neumonía ya que la penetración de este AM en los pulmones es pobre resultando en fracasos terapéuticos. Sin embargo, cuando las concentraciones séricas se mantienen por encima de la CIM del organismo infectante la mejoría es significativamente mayor.

Levine (2006) en su excelente revisión sobre este AM expresa que *“luego de 50 años hemos aprendido bastante sobre la VAN, pero necesitamos conocer más sobre ella, a fin de lograr un tratamiento exitoso para los pacientes y, que aún después de 50 años, hay mucho para agregar a la historia de este AM”*.

Mohr y Murray (2007) consideran que VAN no es obsoleta para el tratamiento de SAMR ya que millones de dosis son administradas por año para tratar dichas infecciones y que, a pesar de que algunos investigadores sugieren que los nuevos AM logran mejores resultados, VAN continúa teniendo igual o mejor actividad que ellos y se debe tener en cuenta su menor costo. VAN resulta un AM seguro, no presenta interacciones con otras drogas, puede ser administrado por vena periférica y es económico.

IV.1.1.2. Objetivos:

- Investigar la actividad bacteriostática y bactericida de vancomicina frente a aislamientos infectantes de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes.
- Diferenciar los aislamientos tolerantes a VAN según la relación CBM/CIM con los obtenidos mediante curvas de cinética de muerte.

IV.1.1.3. Materiales y Métodos

IV.1.1.3.1. Aislamientos bacterianos

Se recolectaron 112 SAMR, consecutivos y únicos, provenientes de diferentes tipos de muestras de pacientes asistidos en el Hospital Dr. José María Cullen de la ciudad de Santa Fe, Argentina, durante el período comprendido entre el 25 de Febrero de 2006 al 16 de Agosto de 2008. Cada aislamiento se denominó con la sigla SAMR y el número correspondiente y fueron conservados en leche a -70°C hasta el momento de su procesamiento.

IV.1.1.3.2. Pruebas de sensibilidad

IV.1.1.3.2.1. *Difusión con discos de OXA y FOX*

Se realizó la prueba de difusión con discos de oxacilina (1µg) (BBL) y cefoxitina (30µg) (BBL) para determinar la sensibilidad a meticilina según normas del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Se utilizó como cepa control *S. aureus* ATCC 25923 (CLSI, 2009b).

IV.1.1.3.2.2. *Concentración inhibitoria mínima (CIM) de VAN*

Una vez confirmada la resistencia a meticilina por el método de difusión, se procedió a realizar el método de dilución a vancomicina.

IV.1.1.3.2.2.1. *Solución de antibiótico y sus diluciones.* Se preparó una solución de trabajo de 64 $\mu\text{g/mL}$ a partir de VAN (Lab. Abbott Argentina), es decir 4 veces la dilución del tubo más concentrado. Las diluciones estudiadas oscilaron entre 0,125 $\mu\text{g/mL}$ a 16 $\mu\text{g/mL}$ (Figura IV.3).

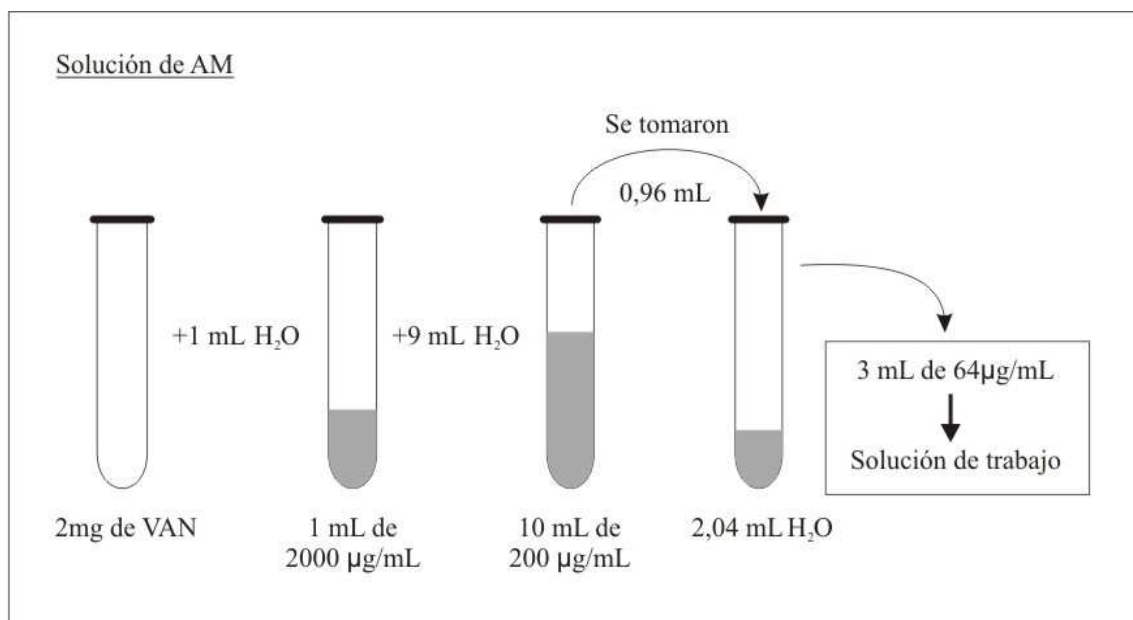


Figura IV.3: Preparación de la solución de trabajo de vancomicina (64 $\mu\text{g/mL}$) para determinar concentración inhibitoria mínima.

AM: antimicrobiano; mL: mililitro; H₂O: agua; VAN: vancomicina; μg : microgramos.

IV.1.1.3.2.2.2. *Inóculo.* El inóculo de trabajo (10^6 UFC/mL) se obtuvo efectuando una dilución del caldo con una turbidez de 0,5 de la escala de McFarland obtenido de igual manera como se describió en **III.1.1.3.2.2.2.**

IV.1.1.3.2.2.3. *Recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL del inóculo inicial.* Se realizaron diluciones sucesivas del inóculo de trabajo, tomando 100 μL del mismo y agregándolos a 0,9 mL de agua estéril. Se agitaron y de allí se tomaron otros 100 μL y así sucesivamente hasta completar el tercer tubo con un recuento igual a 10^3 UFC/mL. Se tomaron 10 μL de cada dilución y se repicaron en un cuarto de placa de agar Müeller-Hinton (Laboratorios Britania - Argentina). Se abrió la estría con el ansa. Se incubó 24 horas a 35°C. El cálculo del inóculo inicial se realizó de la misma forma que para cefalotina (Figura III.4).

IV.1.1.3.2.2.4. CIM. Se determinó por la técnica de macrodilución utilizando caldo Mueller Hinton (Difco Culture Media) con pH controlado según las normas CLSI (CLSI, 2009a). Se realizaron diluciones sucesivas al medio del AM y se adicionó un volumen fijo de inóculo incubándose 24 horas a 35° C. Se efectuaron además, un control de caldo (sólo caldo Mueller Hinton), un control del antibiótico (caldo más solución de antibiótico) y un control de inóculo (caldo más inóculo) (Figura IV.4).

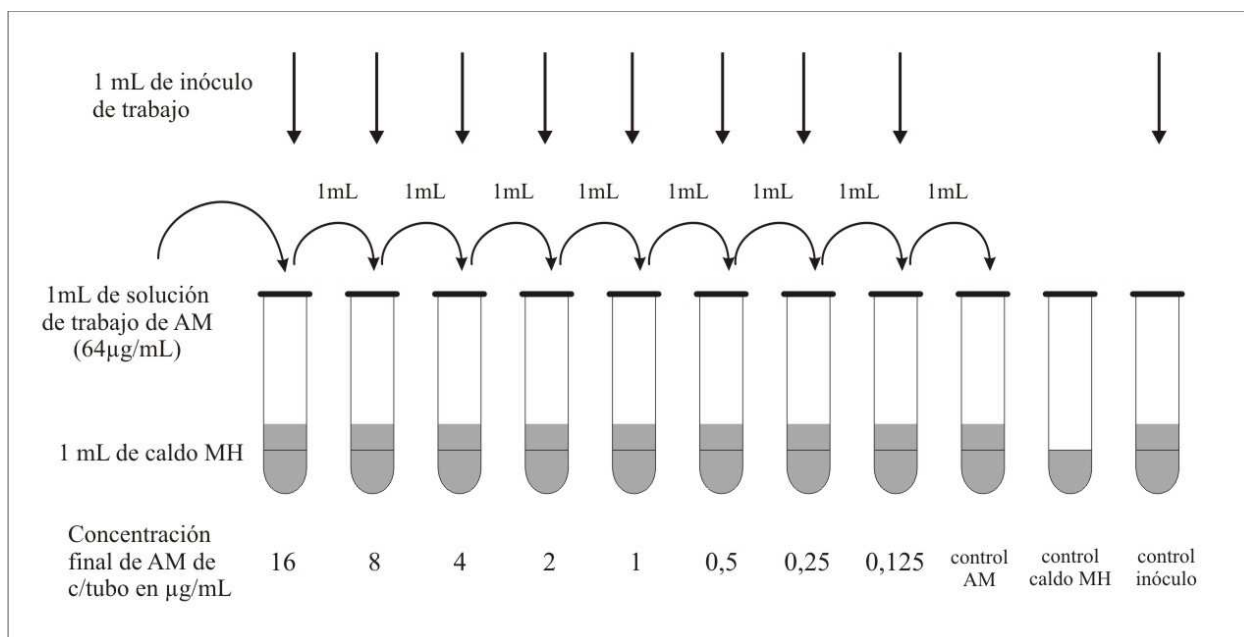


Figura IV.4: Determinación de CIM de vancomicina.

mL: mililitros; **AM:** antimicrobiano; **MH:** Mueller-Hinton; **µg:** microgramos.

IV.1.1.3.2.2.5. Cepa control. Se utilizó *S. aureus* ATCC 29213 que tiene para vancomicina una CIM = 0,2-2 µg/mL. Se procedió de igual manera que para las cepas incógnitas realizando diluciones del AM entre 0,125 µg/mL y 0,5 µg/mL.

IV.1.1.3.2.2.6. Lectura e interpretación de la CIM. Luego de 24 horas de incubación a 35°C se observaron primero, los tubos controles y luego las incógnitas.

Se consideró que la técnica era correcta cuando se obtuvieron los siguientes resultados:

Control de caldo: Límpido.

Control de antibiótico: Límpido

Control de inóculo: Turbio

CIM: Mínima concentración de antibiótico en la que el tubo correspondiente se observó macroscópicamente límpido.

IV.1.1.3.2.3. Concentración bactericida mínima (CBM) de VAN

IV.1.1.3.2.3.1. Inóculos. Se partió de los tubos que resultaron límpidos al realizar la CIM. Se homogeneizó cada tubo en vortex durante unos minutos.

IV.1.1.3.2.3.2. CBM. Se tomaron 5 µL de cada tubo homogeneizado y se depositó en un cuarto de placa de Müeller-Hinton (Laboratorios Britania - Argentina). Se dejaron reposar 15 minutos para diluir la concentración en el medio y evitar así el efecto *carry-over* del antibiótico vehiculizado. Luego de dicho tiempo o habiendo observado la gota seca, se procedió a estriar con un ansa. Se incubó 24 horas a 35 °C. (Figura IV. 5).

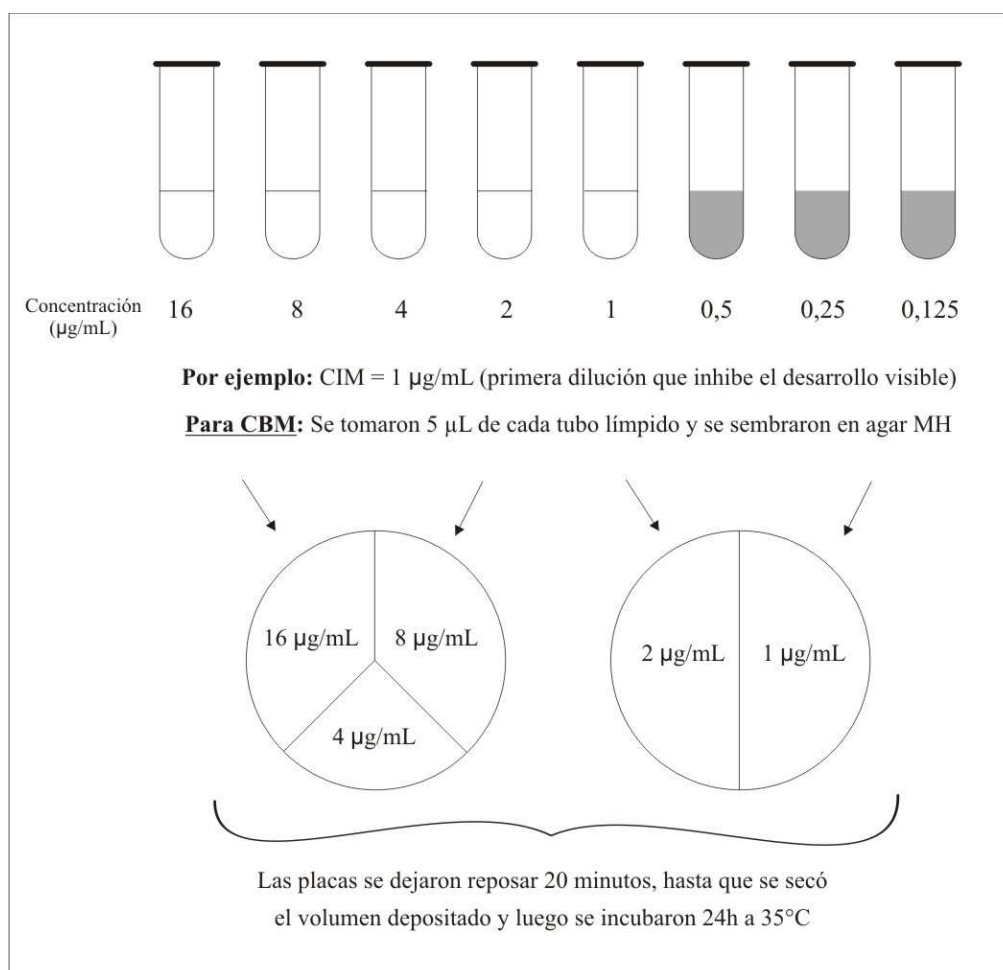


Figura IV.5: Determinación de CBM de vancomicina.

µg: microgramos; mL: mililitros; CIM: concentración inhibitoria mínima; CBM: concentración bactericida mínima; µL: microlitros; MH: Müeller-Hinton

IV.1.1.3.2.3.3. Cálculo de la CBM. Luego de las 24 horas se procedió al recuento de UFC que crecieron de cada tubo macroscópicamente límpido. Se consideró la CBM a aquella dilución que mató el 99,9 % de inóculo original. Esto equivale a la disminución de 3 logaritmos decimales con relación al recuento de colonias (UFC) del inóculo inicial. (Figura IV. 6).

100 % viables		inóculo de trabajo (UFC/mL)	
0,1 % viables		x =	$\frac{\text{inóculo de trabajo} \cdot 10^{-1}}{10^2}$
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 5px 20px;">X = UFC/mL</div>			
10 ³ µL		X UFC	Nº de colonias que se deben contar para determinar la CBM
5 µL		$X_1 = \frac{5 \mu\text{L} \cdot X \text{ UFC}}{10^3 \mu\text{L}} =$	

Figura IV.6: Cálculo de la CBM.

UFC: unidades formadoras de colonias; **mL:** mililitros; **µL:** microlitros; **Nº:** número; **CBM:** concentración bactericida mínima.

IV.1.1.3.2.3.4. Bactericidia y tolerancia. Dado que las normas CLSI establecen los siguientes intervalos para vancomicina: Sensible: ≤ 2 µg/mL; Intermedio: 4 -8 µg/mL; Resistente: ≥ 16 µg/mL, se consideró **bactericidia** cuando la CBM resultó menor o igual a 4 veces la CIM (CLSI, 2009a).

Un aislamiento fue **tolerante** cuando la relación CBM/CIM era ≥ 32 o cuando la relación CBM/CIM resultó ≥ 16 y la CBM ≥ 16 µg/mL (Traczewski y col., 2009).

IV.1.1.3.2.4. Curva de cinética de muerte o de letalidad

IV.1.1.3.2.4.1. Aislamientos bacterianos. Para cada uno de los 39 aislamientos cuya CBM/CIM de VAN resultó mayor o igual a 8, se partió de un cultivo de 24 horas

IV.1.1.3.2.4.2. Inóculo. Se partió de un inóculo 0,5 McFarland de cada uno de los aislamientos y se procedió de igual manera que para cefalotina (Figura III.9).

IV.1.1.3.2.4.3. Recuento de UFC/mL del inóculo inicial. Se realizaron diluciones decimales sucesivas tomando 100 μ L de cada una de ellas y agregándolos a 0,9 mL de solución fisiológica estéril. Luego de cada dilución, se tomaron 100 μ L y se depositaron en una placa de agar MH. El volumen depositado en cada placa se dispersó en la misma con una espátula de Drigalsky. Luego se incubaron las placas 24 horas a 35°C-37°C y se realizó el recuento de colonias como se indicó en la Figura III.9.

IV.1.1.3.2.4.4. Preparación de la solución de antibiótico. Se partió de una dilución original de antibiótico igual a 4000 veces la CIM obtenida para cada aislamiento. En todos los casos se realizaron diluciones sucesivas hasta llegar a una concentración final equivalente a 4 veces la CIM de cada SAMR.

IV.1.1.3.2.4.5. Curva de cinética de muerte o de letalidad. Se prepararon dos tubos con caldo Müeller-Hinton:

1) Curva de vida (CV): Se agregó al caldo sólo 100 μ L de inóculo de trabajo

2) Curva de muerte (CM): Se agregó además del inóculo, 100 μ L de solución de antibiótico a una concentración 4 veces la CIM correspondiente al aislamiento en estudio.

La metodología realizada fue similar a la que se aplicó para cefalotina (Figura III.9).

Se realizaron recuentos microbiológicos a las 0 horas (coinciden la curva de vida con la de letalidad) y a las 3, 6 y 24 horas. A cada tiempo se realizaron diluciones sucesivas y se realizaron recuentos de inóculo tanto del tubo de curva de vida como del de cinética de muerte. El volumen depositado se dispersó en la placa con una espátula de Drigalsky.

IV.1.1.3.2.4.6. Curva de cinética de muerte o de letalidad: interpretación

Se consideró **bactericidia** a la disminución en $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL del inóculo inicial a las 24 horas (French, 2006).

Se categorizó una cepa como **tolerante** cuando se obtuvo una disminución $< 3 \log_{10}$ UFC/mL a las 24 horas (NCCLS, 1999b) o $< 1 \log_{10}$ UFC/mL a las 6 horas del inóculo inicial (May y col., 1998; Bourgeois y col., 2007).

IV.1.1.4. Resultados

IV.1.1.4.1. CIM, CBM, relación CBM/CIM y muestras clínicas

El origen de los aislamientos y los resultados de las CIM, CBM así como la relación CBM/CIM se presentan en la Tabla IV.2.

En cuanto a las muestras clínicas, 65 provenían de infecciones de piel y partes blandas (58.1%); 22 (19,6%) provenían de sangre, 2 de ellos fueron bacteriemias asociadas a catéter. Dieciocho (16,1%) SAMR se recuperaron de muestras óseas, 3 de infecciones asociadas a prótesis (2,7%) y 4 (3,5%) de muestras respiratorias (2 de lavadobronquioalveolar, 1 de esputo y 1 de líquido pleural).

Todas las cepas resultaron sensibles según puntos de corte de CLSI. Sobre el total de aislamientos estudiados, 108 tuvieron una CIM ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$ y sólo en 4 la CIM fue igual a 2 $\mu\text{g/mL}$. La CIM₅₀ de vancomicina resultó 0,5 $\mu\text{g/mL}$ y la CIM₉₀ igual a 1 $\mu\text{g/mL}$.

La concentración bactericida de VAN que mató el 50% y el 90% de todos los SAMR estudiados, fueron 1 $\mu\text{g/mL}$ y 8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

De los 112 aislamientos estudiados, 2 tuvieron CBM/CIM = 128, 3 dieron una CBM/CIM = 64 y 5, igual a 32. Trece mostraron CBM/CIM igual a 16 y esta relación fue igual a 8, en 16 cepas.

El resto de los aislamientos mostró una relación CBM/CIM ≤ 4 .

Se obtuvieron 12 cepas tolerantes (10,71%) según los criterios establecidos: 10 correspondieron a aquellos cuya CBM/CIM fue ≥ 32 (SAMR 1 a 10 de la Tabla IV.2) y 2 (SAMR 11 y 23 de la misma Tabla) con CBM/CIM ≥ 16 y CBM = 16 $\mu\text{g/mL}$.

La bactericidia de vancomicina según CBM/CIM fue del 65,2% ya que 73 SAMR tuvieron una relación CBM/CIM ≤ 4 .

Tabla IV.2: Resultados de CIM y CBM de vancomicina (expresados en µg/mL), relación de CBM/CIM y origen de los SAMR estudiados.

AISLAMIENTOS	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CBM/CIM	MUESTRA CLÍNICA	AISLAMIENTOS	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CBM/CIM	MUESTRA CLÍNICA
SAMR 1	0,25	32	128	PPB	SAMR 21	0,5	8	16	PPB
SAMR 2	0,25	32	128	PPB	SAMR 22	0,5	8	16	ESPUTO
SAMR 3	0,5	32	64	PPB	SAMR 23	1	16	16	PPB
SAMR 4	0,25	16	64	PPB	SAMR 24	1	8	8	BAL
SAMR 5	0,5	32	64	PPB	SAMR 25	0,5	4	8	PPB
SAMR 6	0,25	8	32	HUESO	SAMR 26	0,25	2	8	PPB
SAMR 7	1	32	32	PPB	SAMR 27	0,25	4	8	L.PI.
SAMR 8	2	64	32	HUESO	SAMR 28	0,5	4	8	SANGRE
SAMR 9	0,12	4	32	PPB	SAMR 29	0,25	2	8	PPB
SAMR 10	0,5	16	32	PPB	SAMR 30	0,5	4	8	PPB
SAMR 11	1	16	16	PPB	SAMR 31	0,5	4	8	PPB
SAMR 12	0,25	4	16	PPB	SAMR 32	1	8	8	PPB
SAMR 13	0,25	4	16	PROT.OSTEOART.	SAMR 33	1	8	8	PPB
SAMR 14	0,5	8	16	PPB	SAMR 34	0,5	4	8	PPB
SAMR 15	0,12	2	16	SANGRE	SAMR 35	0,5	4	8	PPB
SAMR 16	0,5	8	16	PPB	SAMR 36	1	8	8	PPB
SAMR 17	0,5	8	16	PPB	SAMR 37	1	8	8	PPB
SAMR 18	0,5	8	16	SANGRE	SAMR 38	1	8	8	PPB
SAMR 19	0,5	8	16	PPB	SAMR 39	1	8	8	PPB
SAMR 20	0,25	4	16	SANGRE	SAMR 40	1	4	4	PPB

SAMR 41	0,5	2	4	HUESO	SAMR 65	0,5	2	4	PPB
SAMR 42	0,5	2	4	SANGRE	SAMR 66	0,5	2	4	SANGRE
SAMR 43	1	4	4	SANGRE	SAMR 67	0,5	2	4	PPB
SAMR 44	1	4	4	SANGRE/CAT	SAMR 68	0,5	2	4	SANGRE/CAT
SAMR 45	2	8	4	HUESO	SAMR 69	0,5	2	4	SANGRE
SAMR 46	1	4	4	PPB	SAMR 70	0,5	2	4	PPB
SAMR 47	1	4	4	PPB	SAMR 71	0,12	0,5	4	PPB
SAMR 48	1	4	4	PPB	SAMR 72	0,25	1	4	PPB
SAMR 49	0,5	2	4	SANGRE	SAMR 73	0,5	2	4	BAL
SAMR 50	0,25	1	4	SANGRE	SAMR 74	2	8	4	PPB
SAMR 51	0,25	1	4	HUESO	SAMR 75*	1	4	4	PPB
SAMR 52	0,12	0,5	4	HUESO	SAMR 78	0,5	2	4	PPB
SAMR 53	0,25	1	4	HUESO	SAMR 79	1	4	4	PPB
SAMR 54	0,25	1	4	SANGRE	SAMR 80	0,5	2	4	PPB
SAMR 55	0,25	1	4	PPB	SAMR 81	1	4	4	PPB
SAMR 56	0,06	0,25	4	SANGRE	SAMR 82	0,5	2	4	PPB
SAMR 57	0,5	2	4	SANGRE	SAMR 83	1	4	4	HUESO
SAMR 58	0,5	2	4	PPB	SAMR 84	0,5	1	2	SANGRE
SAMR 59	0,5	2	4	PPB	SAMR 85	1	2	2	SANGRE
SAMR 60	1	4	4	HUESO	SAMR 86	0,25	0,5	2	HUESO
SAMR 61	0,5	2	4	HUESO	SAMR 87	0,25	0,5	2	SANGRE
SAMR 62	1	4	4	PPB	SAMR 88	0,25	0,5	2	HUESO
SAMR 63	0,5	2	4	SANGRE	SAMR 89	0,25	0,5	2	HUESO
SAMR 64	0,5	2	4	SANGRE	SAMR 90	0,25	0,5	2	PPB

*SAMR 76	1	4	4	PPB	*SAMR 77	1	4	4	PPB
SAMR 91	0,5	1	2	PPB	SAMR 102	0,5	1	2	PROT.OSTEOART.
SAMR 92	0,25	0,5	2	PPB	SAMR 103	0,5	1	2	HUESO
SAMR 93	0,25	0,5	2	PPB	SAMR 104	0,5	1	2	HUESO
SAMR 94	0,25	0,5	2	SANGRE	SAMR 105	1	2	2	PPB
SAMR 95	0,12	0,25	2	PPB	SAMR 106	0,5	1	2	PPB
SAMR 96	0,25	0,5	2	PPB	SAMR 107	0,12	0,25	2	PPB
SAMR 97	0,25	0,5	2	PPB	SAMR 108	1	1	1	HUESO
SAMR 98	0,25	0,5	2	PPB	SAMR 109	2	2	1	PPB
SAMR 99	0,25	0,5	2	SANGRE	SAMR 110	0,5	0,5	1	HUESO
SAMR 100	0,25	0,5	2	PPB	SAMR 111	1	1	1	PPB
SAMR 101	0,25	0,5	2	HUESO	SAMR 112	0,5	0,5	1	PROT.OSTEOART.

SAMR: *Staphylococcus aureus* metilino resistente; **SAMR 1 a SAMR: 39** aislamientos SAMR a los que se les realizó curvas cinéticas de muerte; **SAMR 6, SAMR 10, SAMR 11 y SAMR 12:** se distinguen por tratarse de los aislamientos tolerantes por curvas de cinética de muerte; **CIM:** concentración inhibitoria mínima; **CBM:** concentración bactericida mínima; **PPB:** piel y partes blandas; **L.PI:** líquido pleural; **SANGRE/CAT:** bacteriemia asociada a catéter; **BAL:** lavado bronquioalveolar; **PROT.OSTEOART:** prótesis osteoarticular.

IV.1.1.4.2. Curvas de cinética de muerte o de letalidad

Se realizaron curvas de cinética de muerte a los 39 aislamientos de SAMR cuya relación CBM/CIM fue ≥ 8 (SAMR 1 a 39 de la Tabla IV.2). Los datos de los recuentos microbiológicos de colonias a las 0, 3, 6 y 24 horas se muestran en la Tabla IV.3.

Tabla IV.3: Recuento de células viables (UFC/mL) a las 0, 3, 6 y 24 horas. Curvas de vida y de muerte de 39 aislamientos de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes que mostraron CBM/CIM de vancomicina ≥ 8 .

AISLAMIENTOS	0 HORAS (UFC/mL)	3 HORAS (UFC/mL)		6 HORAS (UFC/mL)		24 HORAS (UFC/mL)	
	INÓCULO INICIAL	CV	CM	CV	CM	CV	CM
SAMR 1	1.10 ⁶	3.10 ⁸	5 10 ⁴	5.10 ⁹	1.10 ³	5.10 ¹¹	0
SAMR 2	2.10 ⁶	2.10 ⁷	8.10 ³	1.10 ⁹	1.10 ⁴	1.10 ¹¹	3.10 ²
SAMR 3	5.10 ⁶	1.10 ⁸	1.10 ⁴	2.10 ¹⁰	1.10 ⁴	1.10 ¹¹	0
SAMR 4	6.10 ⁶	1.10 ⁷	1.10 ⁵	1.10 ⁸	1.10 ²	2.10 ¹⁰	2.10 ²
SAMR 5	1.10 ⁶	3.10 ⁶	4.10 ³	7.10 ⁹	5.10 ²	4.10 ¹¹	30
SAMR 6	1.10⁶	4.10⁶	1.10⁴	4.10⁸	1.10⁴	2.10¹¹	1.10⁴
SAMR 7	5.10 ⁶	2.10 ⁸	1.10 ⁴	5.10 ⁹	3.10 ³	7.10 ¹⁰	0
SAMR 8	2.10 ⁶	1.10 ⁷	7.10 ³	6.10 ⁸	3.10 ³	4.10 ¹¹	1.10 ²
SAMR 9	4.10 ⁶	1.10 ⁸	3.10 ⁴	1.10 ⁹	6.10 ⁴	3.10 ¹¹	0
SAMR 10	1.10⁶	5.10⁷	3.10⁴	1.10⁸	5.10⁴	1.10¹¹	2.10⁴
SAMR 11	1.10⁶	1,5.10⁵	9.10⁴	1.10⁹	1.10⁴	1.10¹¹	1.10⁴
SAMR 12	1.10⁶	1.10⁶	5.10⁵	2.10⁹	3.10⁴	2.10¹¹	7.10⁴
SAMR 13	1.10 ⁶	5.10 ⁵	1.10 ⁴	1.10 ⁹	6.10 ³	1.10 ¹⁰	0
SAMR 14	1.10 ⁶	4.10 ⁸	1.10 ⁴	1. 10 ¹⁰	10	2.10 ¹¹	0
SAMR 15	1.10 ⁶	2.10 ⁷	3.10 ⁴	5.10 ⁹	2.10 ⁴	4.10 ¹⁰	10
SAMR 16	1.10 ⁶	4.10 ⁷	1.10 ⁴	7.10 ⁸	7.10 ³	2.10 ¹¹	0
SAMR 17	4.10 ⁶	3.10 ⁷	1.10 ³	3.10 ⁸	1.10 ³	6.10 ¹⁰	0
SAMR 18	2.10 ⁶	1.10 ⁸	1.10 ⁴	1.10 ⁹	1.10 ⁴	1.10 ¹¹	4.10 ²
SAMR 19	1.10 ⁶	3.10 ⁸	5.10 ³	1.10 ¹⁰	3. 10 ³	5.10 ¹¹	0
SAMR 20	2.10 ⁶	5.10 ⁷	1.10 ⁵	1.10 ⁸	1.10 ³	1.10 ¹¹	1.10 ²
SAMR 21	7.10 ⁶	5.10 ⁸	2.10 ³	5.10 ⁹	0	2.10 ¹¹	0
SAMR 22	3.10 ⁶	3.10 ⁸	8.10 ⁴	1.10 ¹⁰	7.10 ⁴	6.10 ¹¹	3.10 ²
SAMR 23	1.10 ⁶	4.10 ⁶	3.10 ⁴	3.10 ⁸	7.10 ²	7.10 ¹⁰	0
SAMR 24	1. 10 ⁶	2.10 ⁵	1.10 ⁴	3.10 ⁸	0	1.10 ¹¹	0
SAMR 25	1.10 ⁶	1.10 ⁶	5.10 ⁴	3.10 ⁹	2.10 ³	1.10 ¹¹	0

SAMR 26	1.10^6	5.10^8	1.10^3	1.10^{11}	1.10^3	7.10^{11}	10
SAMR 27	1.10^6	5.10^8	3.10^3	3.10^9	10^2	7.10^{10}	0
SAMR 28	1.10^6	8.10^8	1.10^4	1.10^{10}	1.10^4	2.10^{11}	0
SAMR 29	1.10^6	3.10^8	5.10^4	5.10^9	1.10^4	5.10^{11}	0
SAMR 30	4.10^6	5.10^8	8.10^5	5.10^9	8.10^4	2.10^{11}	0
SAMR 31	2.10^6	2.10^8	6.10^4	2.10^9	6.10^4	5.10^{10}	20
SAMR 32	2.10^6	2.10^8	7.10^4	7.10^9	7.10^4	6.10^{11}	1.10^2
SAMR 33	6.10^6	4.10^8	1.10^4	5.10^9	5.10^3	3.10^{10}	0
SAMR 34	6.10^6	4.10^8	3.10^4	1.10^{10}	2.10^3	2.10^{11}	0
SAMR 35	1.10^6	2.10^7	1.10^4	4.10^9	3.10^3	4.10^{11}	1.10^2
SAMR 36	1.10^6	2.10^7	2.10^4	3.10^9	0	2.10^{11}	0
SAMR 37	1.10^6	3.10^6	4.10^4	7.10^9	8.10^2	5.10^{10}	0
SAMR 38	1.10^6	2.10^6	1.10^4	7.10^9	3.10^2	3.10^{10}	0
SAMR 39	1.10^6	3.10^8	6.10^4	1.10^9	6.10^4	1.10^{11}	0

SAMR: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente; SAMR 6, SAMR 10, SAMR 11 y SAMR 12 se distinguen por tratarse de los aislamientos tolerantes por curvas de cinética de muerte; **CV:** curva de vida; **CM:** curva de muerte; **UFC:** unidades formadoras de colonias; **mL:** mililitros

Las figuras IV.7, IV.8, IV.9 y IV.10 muestran las figuras de CM de los aislamientos agrupados según relación CBM/CIM.

De las 39 curvas realizadas, 4 aislamientos (SAMR 6, 10, 11 y 12) resultaron tolerantes según CLSI ($< 3 \log_{10}$ UFC/mL a las 24 horas). Ninguno fue tolerante a las 6 horas. El nivel de tolerancia obtenido fue igual a 3,6 % según CM.

El aislamiento SAMR 12 proveniente de PPB, resultó tolerante por CM pero no por relación CBM/CIM que fue igual a 16 con $CBM = 4 \mu\text{g/mL}$.

La bactericidia de vancomicina según CM fue 96,4% ya que 4 aislamientos no redujeron $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL el inóculo inicial.

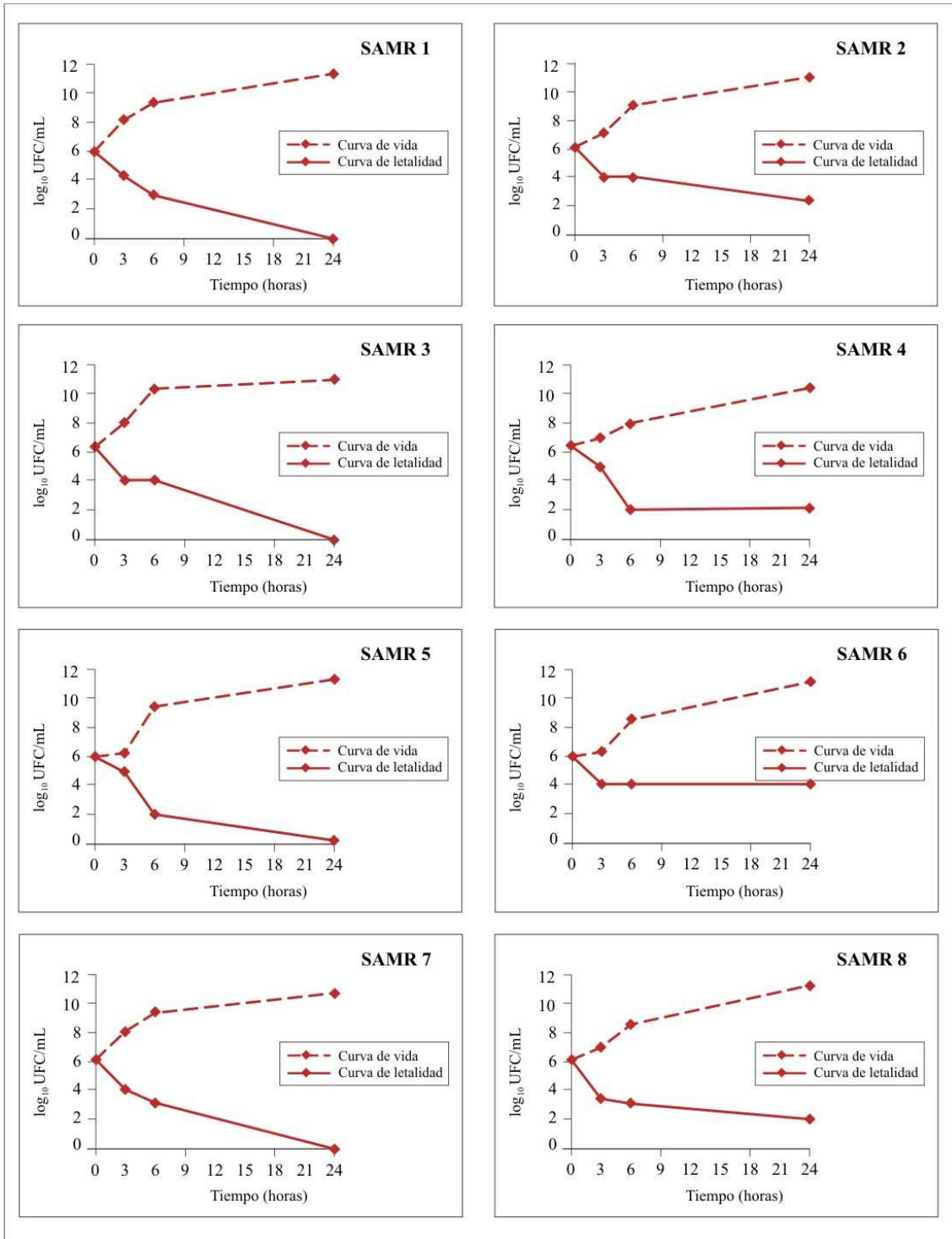


Figura IV.7: Curvas de cinética de muerte o de letalidad de SAMR tolerantes a VAN según relación CBM/CIM ($CBM/CIM \geq 32$).

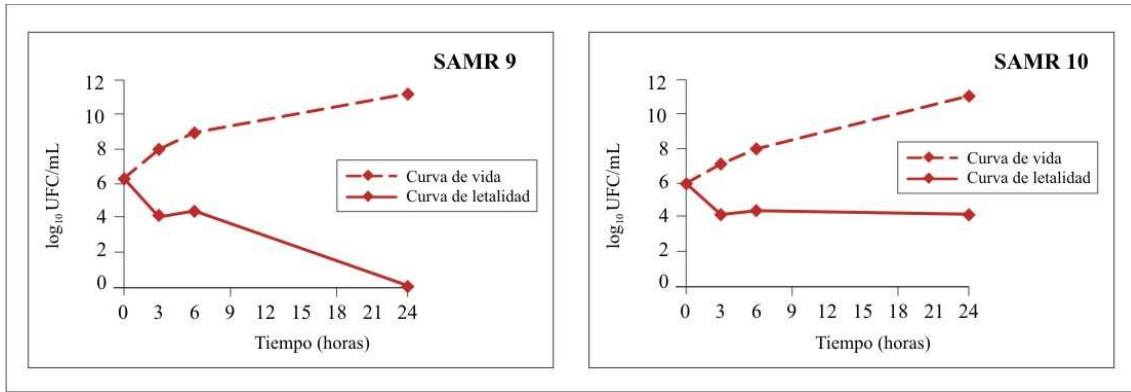


Figura IV.7: Curvas de cinética de muerte o de letalidad de SAMR tolerantes a VAN según relación CBM/CIM (CBM/CIM \geq 32). (Cont.).

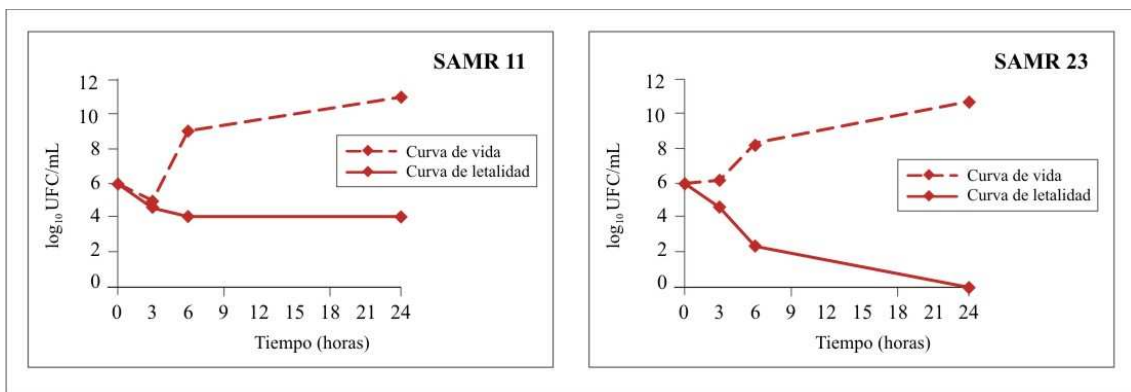


Figura IV. 8: Curvas de cinética de muerte o de letalidad de SAMR tolerantes a VAN según relación CBM/CIM (CBM/CIM \geq 16 y CBM \geq 16 μ g/mL). SAMR 11: tolerante por CM.

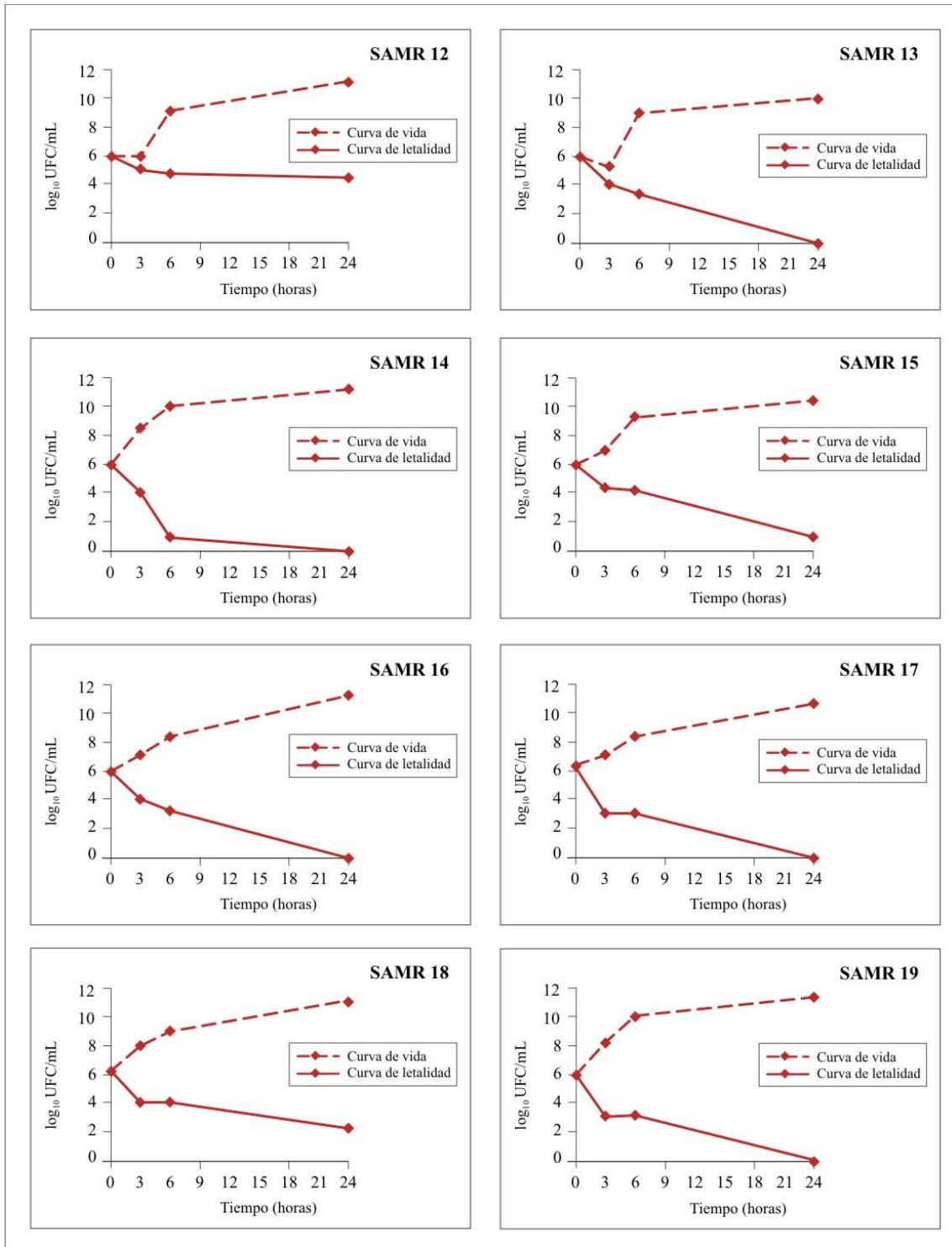


Figura IV.9: Curvas de cinética de muerte o de letalidad a VAN de los aislamientos SAMR cuya relación CBM/CIM de VAN resultó igual a 16. SAMR 12: Aislamiento tolerante por CM.

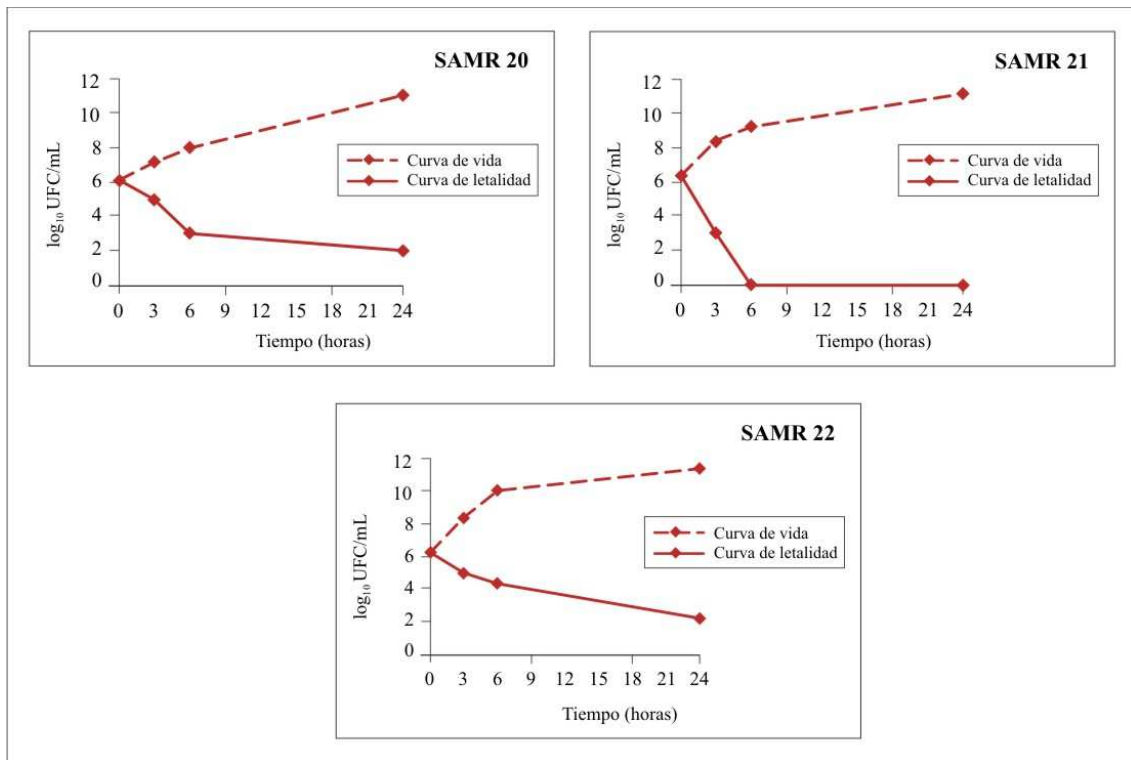


Figura IV.9: Curvas de cinética de muerte o de letalidad a VAN de los aislamientos SAMR cuya relación CBM/CIM de VAN resultó igual a 16. (Cont.).

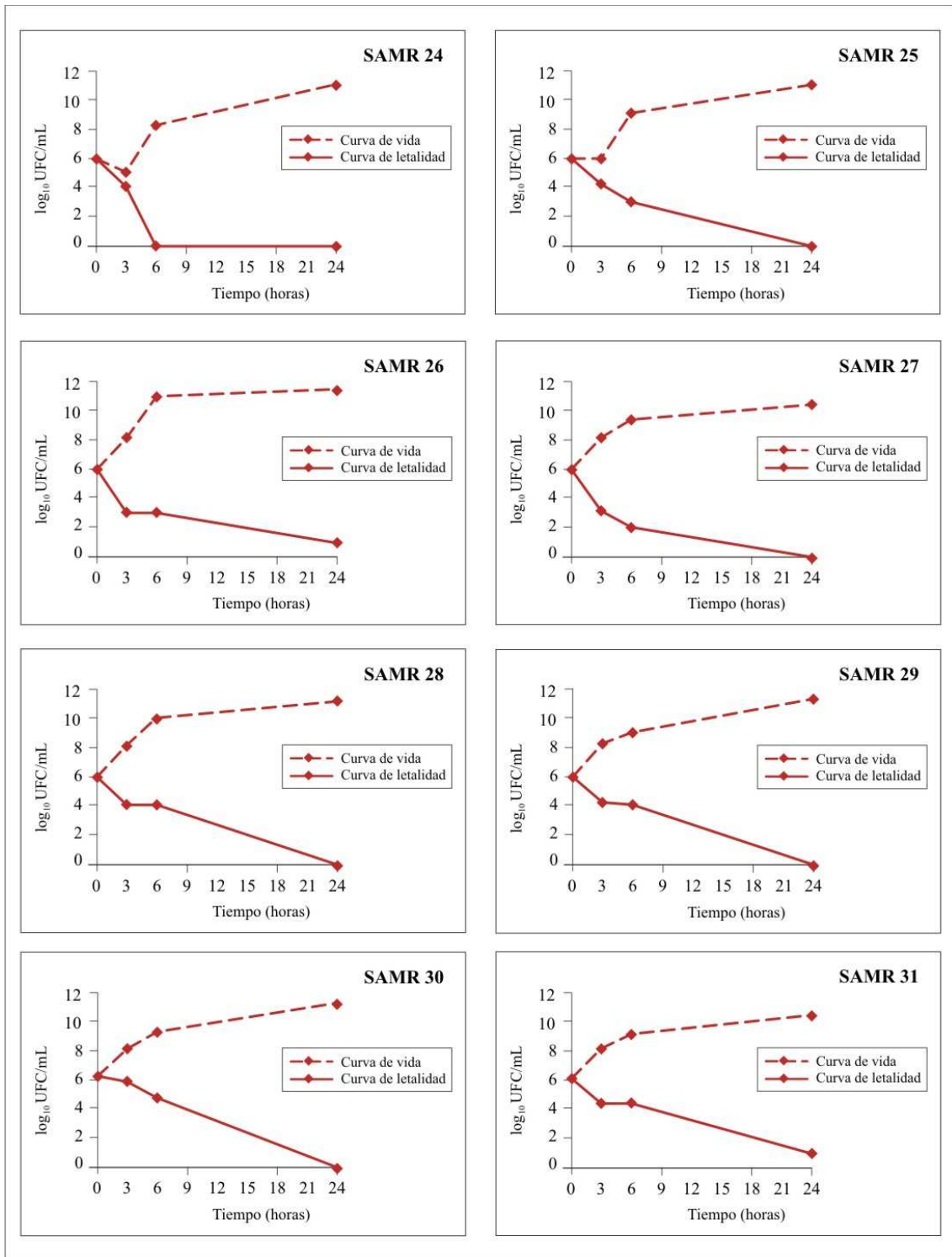


Figura IV.10: Curvas de cinética de muerte o de letalidad a VAN de los aislamientos SAMR cuya relación CBM/CIM de VAN resultó igual a 8.

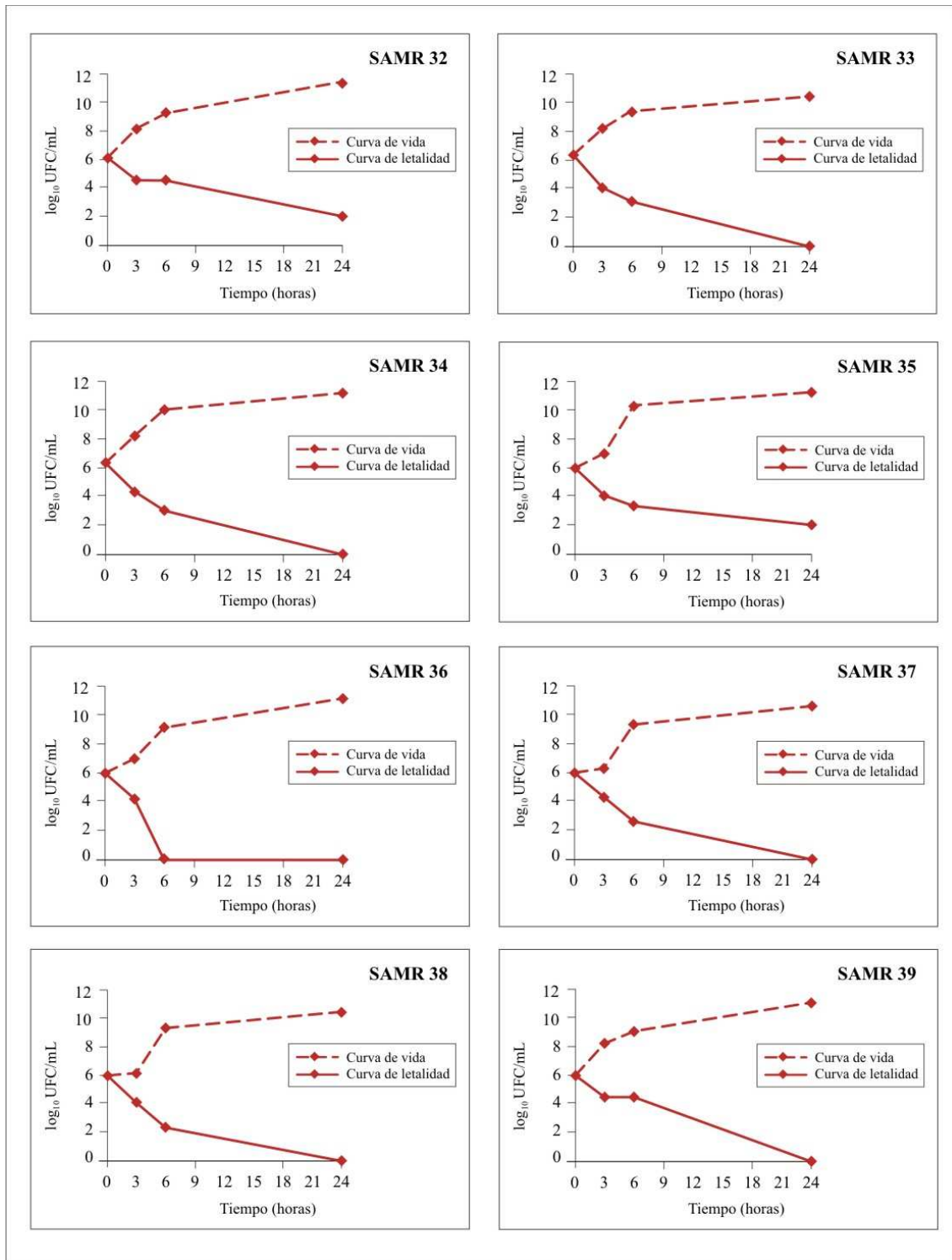


Figura IV.10: Curvas de cinética de muerte o de letalidad a VAN de los aislamientos SAMR cuya relación CBM/CIM de VAN resultó igual a 8. (Cont.)

IV.1.1.5. Discusión

A pesar de los nuevos AM introducidos en el sistema de salud, vancomicina sigue siendo la droga de elección para la terapia empírica de las infecciones por SAMR (Mohr y Murray, 2007).

Por tal motivo, resulta interesante determinar el comportamiento de los aislamientos en cada lugar de trabajo, para poder sugerir normas o pautas de terapia según la epidemiología local, o esquemas profilácticos para las diversas cirugías, fundamentalmente las protésicas y cardiovasculares.

En el presente estudio, realizado entre 2006 y 2008 se determinó que todos los aislamientos SAMR obtenidos en el Hospital Dr. José María Cullen, resultaron sensibles a VAN, según los puntos de corte establecidos por CLSI ($CIM \leq 2 \mu\text{g/mL}$). Estos datos coinciden con los ya publicados por el grupo de trabajo que dirige esta tesis, entre los años 2008 a 2010 (Mollerach y col., 2010).

Los valores de $CIM_{50/90}$ de VAN frente a SAMR fueron 0,5 y 1 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, coincidiendo con recientes publicaciones nacionales como las de Perazzi y col. (2010). Estos autores informaron una $CIM_{50/90}$ de VAN igual a 0,25 y 0,5 $\mu\text{g/mL}$ sobre 118 SAMR obtenidos de muestras procesadas en el Hospital de Clínicas de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, durante el año 2006, no habiendo encontrado resistencia a este AM.

Los datos encontrados en esta tesis coinciden también con autores internacionales quienes no encontraron resistencia a vancomicina (Holmes y Jorgensen, 2008).

Si se comparan los datos de Argentina con un reporte de 4 hospitales de la ciudad de Sao Paulo, Brasil, los valores argentinos difieren de los brasileros ya que estos, sobre un total de 395 SAMR estudiados durante los años 1998-2000, encontraron que sólo el 10,5 % de los aislamientos tuvieron una $CIM = 0,5 \mu\text{g/mL}$, el 41,3% una

CIM = 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y el 6,1 % una CIM = 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estos últimos, según criterio de CLSI deberían considerarse con sensibilidad intermedia (Oliveira y col. 2001; CLSI, 2010).

Ronald Jones en una revisión publicada en 2006, analizando los datos del Programa de Vigilancia de EEUU – SENTRY comunicó que sobre 35.458 *S. aureus* durante los años 1998 a 2003, no se encontraron diferencias entre las CIM_{50/90} en todos los años ya que resultaron 1 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente, lo que coincide con los datos de esta tesis. También hay coincidencia en cuanto a las CBM ya que sobre 105 SAMR, Jones (2006) informó una CBM_{50/90} igual a 1 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente, no superando este último valor al punto de corte de resistencia de CLSI ($R \geq 16 \mu\text{g}/\text{mL}$). Los CBM_{50/90} de los aislamientos obtenidos en esta tesis fueron 1 y 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente (Méndez y col., 2010).

En cuanto a la tolerancia informada por el mismo investigador según la relación CBM/CIM, sobre 105 SAMR, 9 tenían una relación CBM/CIM ≥ 32 y 7 CBM/CIM ≥ 16 con CBM resistente. Estos valores coinciden con los de esta tesis cuando se aplicó el criterio CBM/CIM ≥ 32 ; en cambio resultaron algo menores (2 aislamientos) cuando se consideró CBM/CIM ≥ 16 con CBM $\geq 16 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Jones, 2006).

Los valores del presente trabajo coincidieron con Traczewski y col. (2009) quienes informaron CIM_{50/90} de VAN frente a SAMR igual a 1/1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y CBM_{50/90} 1 y 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente, pero obtuvieron un porcentaje de 6,1 de tolerancia (criterio CBM/CIM), valor que resultó algo menor al de esta tesis.

Sader y col. (2006) al estudiar 102 SAMR comunicaron una CIM_{50/90} de VAN igual a 0,5/0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ siendo la CBM_{50/90} igual a 1 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente, valores similares a los aquí obtenidos. En cuanto a la tolerancia, informaron 14,7%, ligeramente superior al 10,7% de este trabajo.

Fuchs y col. (2002) en un reporte con menor número de cepas, 28 SAMR, informaron una CIM_{50/90} de VAN igual 2/2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y una CBM_{50/90} = 2 y 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Como se podrá observar, estos valores también concuerdan. Lo interesante de este trabajo es que realizaron estudios de cinética de muerte a 5 SAMR,

logrando una bactericidia de VAN del 100% a las 15 horas cuando se ensayó el AM en concentraciones iguales al punto de corte de la CIM. Esto coincide con los hallazgos de esta tesis donde se logró un 96,42% de muerte detectada al efectuar curvas de cinética de muerte.

Los aislamientos tolerantes, según CBM/CIM aquí obtenidos (10,7%), difieren de los comunicados en los hospitales brasileros donde Oliveira y col (2001) concluyeron que el porcentaje 49,1% de tolerancia encontrado en ese país, fue elevado.

Aunque numerosos autores sostienen que los estudios de cinética de muerte son más representativos de la tolerancia, existen pocos trabajos donde se determine la actividad bactericida de nuevos AM mediante estos métodos; quizás sea porque son algo engorrosos, poco accesibles al trabajo diario de un laboratorio de microbiología clínica e insumen mucho tiempo. Sin embargo, la experiencia obtenida del trabajo de esta tesis demuestra que la correcta determinación de la actividad bactericida de un AM se obtiene aplicando estudios de cinética de muerte.

May y col. (1998) quienes establecieron el criterio de tolerancia por CM como la reducción en $< 1 \log_{10}$ UFC/mL del inóculo inicial a las 6 horas, estudiaron dicho fenómeno en 14 SAMR provenientes de bacteriemias de pacientes del St. Thomas Hospital (Londres, Inglaterra) usando ambas determinaciones: la relación CBM/CIM y estudios de cinética de muerte. Siete pacientes con diagnóstico de endocarditis y 7 sin endocarditis. La CIM de todos los aislamientos fue menor o igual a 2 $\mu\text{g/mL}$, valores similares a este trabajo; pero, la CBM resultó elevada ya que la $\text{CBM}_{50/90}$ de los SAMR de pacientes con endocarditis fue $512 / > 512 \mu\text{g/mL}$ y la $\text{CBM}_{50/90}$ de los SAMR de pacientes sin endocarditis resultó $4 / > 512 \mu\text{g/mL}$. En cuanto al fenómeno de tolerancia, de los 7 aislamientos de pacientes con endocarditis, todos fueron tolerantes por relación CBM/CIM y 6 por CM; mientras que en los de los pacientes sin endocarditis los 2 tolerantes encontrados cumplían ambos criterios. La tolerancia encontrada en estos aislamientos coincidió según se considerara la relación CBM/CIM o CM; lo que difiere de lo obtenido en esta tesis ya que 12 SAMR fueron tolerantes por CBM/CIM y sólo 4 por CM.

IV.1.1.6. Conclusiones

- Vancomicina resultó bactericida para el 96% de los SAMR, mientras que los niveles de tolerancia fueron 10,7% según CBM/CIM y 3,5% según CM.
- No hubo coincidencia en la detección de la tolerancia según se considere uno u otro criterio.
- VAN continúa siendo una excelente opción a utilizar tanto para tratamiento como para profilaxis en el hospital Dr. José María Cullen de la ciudad de Santa Fe, de donde se obtuvieron los aislamientos para este estudio.

IV.2. SECCIÓN B

IV.2.1. HISTORIA CLÍNICA DE PACIENTES INFECTADOS CON *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILINO RESISTENTES TOLERANTES A VANCOMICINA DETECTADOS POR CURVAS DE CINÉTICA DE MUERTE

IV.2.1.1. Presentación

IV.2.1.1.1. Paciente infectado con SAMR 6

Mujer de 21 años. Ingresa por hemorragia intracerebral el 12 de Setiembre de 2006. Al día siguiente, previa profilaxis con cefalotina (2g), se somete a cirugía intracraneana y se observa el hueso de la calota rarefacto por lo que se toma muestra y se envía para cultivo. Pasa a Unidad de Cuidados Intensivos durante el post operatorio. Se trata con vancomicina (2g/día) y ceftriaxona (4g/día). A las 48 horas se descompensa, entra en insuficiencia renal, distress respiratorio, shock séptico y obita el 16 de Setiembre del mismo año. Se recupera del hueso, SAMR tolerante a vancomicina.

IV.2.1.1.2. Paciente infectado con SAMR 10

Hombre joven sin factores de riesgo, ingresa por lesión en piel y partes blandas ya que se trata de un obrero de la construcción. Relata no tener enfermedad de base, ni haber asistido en los 6 meses previos, a ningún centro de salud. Dado el aspecto de la lesión se toma muestra por punción-aspiración y se le da el alta con tratamiento con trimetoprimasulfametoxazol (TMS), dosis: 160mg / 800mg cada 12 horas durante 7 días. En el laboratorio se obtiene SAMR, sensible al resto de los AM ensayados con lo que se deduce que se trata de SAMR-AC. El paciente evolucionó favorablemente.

IV.2.1.1.3. Paciente infectado con SAMR 11

Paciente diabética de 65 años. Ingresa el 16 de Marzo de 2007 con lesiones de piel y partes blandas. Ha realizado varios tratamientos antibióticos por infecciones repetidas de úlcera de pie diabético. Se la atiende por consultorio externo y se toma muestra por punción de piel y partes blandas del pie. Retorna a su domicilio con

tratamiento con TMS (160mg / 800mg cada 12 horas durante 7 días). Realizado el cultivo se aísla SAMR, resistente no sólo a betalactámicos sino también a eritromicina. La paciente a las 48 horas retorna a la consulta y se constata una franca mejoría.

IV.2.1.1.4. Paciente infectado con SAMR 12

Mujer de 45 años con antecedentes de cáncer de tiroides y de endometrio. Ha recibido múltiples tratamientos quimioterápicos y con AM. Ha consultado varias veces entre 2004 y 2006 por metrorragia. Ingresa el 3 de Marzo de 2007 por presentar un absceso de mama recidivante que no mejoraba con múltiples tratamientos con cefalexina (2g/día). Se toma muestra por punción aspiración y se envía para cultivo. Se indica tratamiento con clindamicina (300 mg cada 6 horas) y ciprofloxacina (1g/día). Se aísla SAMR, resistente a betalactámicos. El absceso evolucionó favorablemente.

Se concluye que si bien la vancomicina tiene actividad bactericida para *S. aureus*, la CIM de este AM no predice el fenómeno de tolerancia que está presente en los aislamientos SAMR. De las historias clínicas aquí revisadas se pudo observar que un aislamiento produjo la muerte de un paciente, el cual recibió una profilaxis incorrecta para una cirugía intracraneana y que en el resto fue necesario recurrir a otros AM. Estos hechos podrían deberse al fenómeno de tolerancia de estos aislamientos.

Si bien son cuatro los aislamientos tolerantes a la VAN hallados en esta tesis, se sabe que las infecciones severas no revierten sólo con antimicrobianos; a veces es necesario recurrir a drenajes del foco séptico, a la remoción de la prótesis y disponer de un sistema inmune competente. Sin embargo, la terapia AM es esencial para una mejoría rápida y exitosa ya que disminuye la carga bacteriana. Por tal motivo es necesario tener en cuenta la actividad bactericida al decidir una terapia antimicrobiana frente a una infección tolerante a los distintos antimicrobianos (French, 2006).

CAPÍTULO V

ESTUDIO GENOTÍPOCO DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* TOLERANTES A BETALACTÁMICOS Y GLUCOPÉPTIDOS

V.1. SECCIÓN A

V.1.1. AISLAMIENTOS TOLERANTES A ANTIMICROBIANOS BETALACTÁMICOS

V.1.1.1. Introducción

Las pruebas fenotípicas de sensibilidad son un instrumento de utilidad indiscutible, no sólo para el correcto tratamiento sino para la vigilancia de la resistencia a los AM. Durante los últimos años ha habido un importante desarrollo de las técnicas moleculares y en los últimos diez han avanzado tan rápidamente que ha dejado de ser sólo tema de investigación, sino que ha llegado a los laboratorios de diagnóstico microbiológico. Por este motivo se han desarrollado ensayos basados en la utilización de sondas o técnicas de PCR para detectar genes de resistencia, de virulencia, o para identificar microorganismos (Maslow y col., 1993).

V.1.1.1.1. Técnicas moleculares usadas para detección de la resistencia a AM

V.1.1.1.1.1. *Historia*

Las técnicas moleculares para la detección de genes de resistencia se basan en la utilización de sondas (hibridación de ácidos nucleicos) o en la técnica de PCR (amplificación de ácidos nucleicos). La hibridación fue la primera técnica usada para la detección de genes de resistencia. Estos ensayos se realizan utilizando sondas o segmentos de ADN o ARN marcados con radioactividad o con quimioluminiscencia o con sustrato antigénico. Este análisis requiere primero lisis celular y desnaturalización del ADN, así la sonda puede unirse específicamente a secuencias complementarias si estas, están presentes. En general se usa un soporte sólido (membranas de nitrocelulosa o nylon) al cual han sido transferidas las colonias a analizar (*colony blot*) o sobre la cual se han depositado alícuotas de los extractos bacterianos (*dot blot*). La amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR, permite desde hace 20 años sintetizar millones de copias de una secuencia determinada de ADN molde, mediante la utilización de una polimerasa termoestable en una reacción cíclica. La reacción incluye ciclos de calentamiento de la muestra para desnaturalizar el ADN, hibridación de los

oligonucleótidos que actuarán como cebadores y elongación de los mismos mediada por una polimerasa termoestable. Una vez finalizada la reacción, el amplicón comúnmente llamado producto de PCR, se analiza como el blanco buscado mediante el análisis de su tamaño por electroforesis en geles de agarosa. Otros métodos empleados para el análisis de los productos incluyen hibridación con una sonda, el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP), el análisis de polimorfismo conformacional de simple cadena (SSCP) o la secuenciación. La secuenciación del producto de PCR es el *gold standard* para la identificación del mismo (Mollerach, 2008).

V.1.1.1.1.2. Avances

En los últimos años se produjeron nuevos desarrollos que ampliaron las aplicaciones de estas técnicas, tal es el caso de los ADN *microarrays* y las sondas llamadas *molecular beacons* o balizas moleculares, usadas como sistemas de detección de productos de PCR en tiempo real (*real time PCR*). Las mismas consisten en oligonucleótidos marcados con un fluoróforo que posee una estructura tal que cuando se produce la hibridación de esta sonda a la secuencia blanco, se emite fluorescencia. El uso de diferentes fluoróforos, con distintos espectros de emisión, hace posible monitorear en tiempos reales, múltiples secuencias blanco en una reacción PCR *multiplex*; también permite llevar a cabo la cuantificación de los productos formados, en función de la fluorescencia detectada. Mediante estas sondas, la reacción de PCR es analizada permanentemente en tiempo real, no siendo necesario la realización de electroforesis en geles de agarosa, como ocurre con la PCR convencional. Los ADN *microarrays* son soportes sólidos pequeños sobre los cuales se han inmovilizado miles de fragmentos de ADN diferentes, en localizaciones definidas. Su utilización se basa en el principio de hibridación, pero a diferencia de los ensayos convencionales en los cuales el ADN blanco se ha inmovilizado sobre una membrana, en estos sistemas, gran cantidad de sondas diferentes están unidas a un soporte sólido en localizaciones definidas. El ADN blanco se marca generalmente con fluoresceína y luego de la hibridación se procede a la detección de fluorescencia y posterior análisis (Tenover y col., 1994; Trindale y col., 2003).

V.1.1.1.2. Resistencia a meticilina/oxacilina y detección fenotípica

La resistencia a meticilina/oxacilina se relaciona, como ya se mencionara, a la producción de la proteína PBP2a, mediada por el gen *mecA*. La expresión puede ser homogénea o heterogénea. Esta última, sólo es expresada por una parte de la población (1 de 10⁴ a 1 de 10⁸ UFC/mL) y por eso a veces es muy difícil de determinar; sobretodo, si es baja, resulta indetectable por el método de difusión (Gordon y Lowy, 2008).

Por otra parte, en *S. aureus* puede observarse, con menos frecuencia otros mecanismos de resistencia tales como hiperproducción de penicilinasas o modificaciones en la PBP. Como se explicó anteriormente la técnica de tamizaje para detectarla es la placa de oxacilina 6µg/mL más 4% de cloruro de sodio (CLSI, 2001; Lorenz y col., 2006).

La detección de la PBP2a por aglutinación de latex o la detección del gen *mecA* por métodos moleculares no siempre están disponibles en el laboratorio de microbiología clínica (Felten y col., 2002; Soloaga y col., 2004).

En los últimos años se han descrito diversas sondas y ensayos de PCR para la detección de SAMR, todos ellos, han sido revisados recientemente. Además de los ensayos que utilizan un único par de *primers* para la detección del gen *mecA*, se han propuesto otros que incluyen, además, un par de oligonucleótidos para la amplificación de un gen específico de la especie (ej.: el gen *nuc* que codifica la termonucleasa específica de *S. aureus* o el gen *femA* o *femB*, ambos involucrados en la síntesis del péptidoglicano). Esta modificación de la PCR en la cual se incorpora más de un par de oligonucleótidos con el objetivo de amplificar más de una secuencia blanco en una misma reacción se denomina *multiplex* PCR. En este último caso, la principal ventaja es que además del control de las características de la muestra en cuanto a la posibilidad de amplificar ADN a partir de la misma, permite la confirmación de la identificación a nivel de especie (Mothershed y Whitney, 2006).

Actualmente la detección del gen *mecA* por PCR se considera la técnica más sólida para la detección de la resistencia a meticilina y es frecuentemente utilizada como

el “*gold standard*” para comparar otros métodos de detección de SAMR. Un resultado positivo para dicho gen permite diferenciar aislamientos *borderline* resistentes a meticilina por cantidades elevadas de betalactamasa o, SAMS tolerantes a cefalotina de aquellos que son verdaderamente resistentes (Gordon y Lowy, 2008).

V.1.1.1.3. Factor de virulencia: leucocidina de Pantón-Valentine

LPV es una proteína formadora de poros constituida por dos componentes codificados por los genes *lukF-PV* y *lukS-PV*. Fue descrita por primera vez en 1894 por Van de Velde (1894) y en 1932 se asoció por primera vez a infecciones de piel y partes blandas (Panton y col., 1932a).

Antes de la aparición de SAMR-AC en los años '90, se pensaba que los genes que codifican para LPV y que pueden diseminarse de cepa a cepa por bacteriófagos, estaban presentes en menos del 5% de aislamientos de *S. aureus* y que ocurrían azarosamente (Lina y col., 1999), aunque estos genes ya se habían encontrado transitoriamente en un clon ST30 circulante en Japón entre 1979 y 1985 (Ma y col., 2006).

LPV es una leucocidina que puede lisar la membrana celular de los neutrófilos humanos, sin embargo su importancia en la patogénesis es controvertida. Evidencias recientes sugieren que LPV también podría inactivar las mitocondrias de las células humanas y culminar en apoptosis (Löffler y col., 2010).

En estudios realizados con modelos animales, LPV mostró ser dermonecrótica, explicando así la patobiología de las lesiones características de las PPB, especialmente las asociadas a SAMR-AC que, con frecuencia, se asemejan a las heridas producidas por picaduras de arañas (Ward y Turner, 1980).

Recientemente, se comenzó a cuestionar la importancia de la LPV en la patogénesis de las PPB y en la neumonía necrotizante. Voyich y col. (2006) encontraron que la presencia o ausencia de LPV en cepas SAMR no afectaba su virulencia cuando

producían PPB ni sepsis en ratones, ya que su presencia no disminuía la supervivencia de neutrófilos en ensayos *in vitro*.

Wardenburg y col. (2008) obtuvieron resultados similares al observar que la ausencia o presencia de LPV no afectaba la mortalidad por neumonía por *S. aureus* en un modelo animal. El mismo grupo de investigación encontró, en otro estudio realizado con roedores, que no había diferencia en las neumonías y los abscesos de piel producidos después de la inoculación con cepas USA300 o su mutante isogénica carente de LPV. Se debe recordar que las características de la cepa USA300 incluye portación de *SCCmec* tipo IV, de genes *pvl* y en la mayoría de los aislamientos se encuentra el elemento conocido en inglés “ACME” (elemento móvil para el catabolismo de la arginina), el que jugaría un rol en la patogénesis colonizando la piel de personas sanas, pudiéndose diseminar, por lo tanto con mayor facilidad entre la población (Diep y col., 2006b).

Por el contrario, Lavandería-Rey y col. (2007) demostraron que tanto la proteína LPV purificada como el derivado RN6390 con genes LPV sobreexpresados introducidos en un fago, causaban neumonía necrotizante en ratones.

La controversia en los resultados sobre el rol de la LPV en la patogénesis de las infecciones por SAMR-AC puede relacionarse a la cantidad producida de esta leucocidina por las distintas cepas. Por ejemplo, Varshney y col. (2010) demostraron que la producción de este factor de virulencia variaba en aislamientos clínicos, tanto de SAMS como de SAMR. Cuando usaron un modelo murino, las cepas con mayor producción de LPV producían, a los 7 días, lesiones más extensas de PPB y con mayor carga bacteriana.

De todas estas experiencias se deduce que la presencia de LPV es un factor de virulencia, que agrava las infecciones por *S. aureus* y que está presente tanto en aislamientos SAMS, SAMR y en el más estudiado actualmente, SAMR- AC.

V.1.1.1.4. Staphylococcus aureus meticilino sensibles tolerantes a cefalotina

Resulta de interés investigar, en los aislamientos SAMS tolerantes a CEF si estas cepas no son portadoras del gen *mecA*.

La PCR permite amplificar *in vitro* un fragmento de ADN de interés. Básicamente, esta amplificación enzimática se lleva a cabo en tres etapas temperatura-dependiente, que se repiten cíclicamente: 1) desnaturalización de la doble cadena de ADN a amplificar, 2) apareamiento (*annealing*) de los cebadores (*primers*) a las secuencias complementarias en el ADN molde y 3) elongación (extensión) de los nuevos fragmentos de ADN (amplicones).

La elongación de las cadenas se lleva a cabo a través de la actividad de una ADN polimerasa termoestable dependiente de ADN, en la dirección 5' → 3' a partir del sitio de unión de los cebadores.

Sobre estas características básicas se pueden realizar modificaciones dependiendo de los objetivos de cada trabajo en particular. Es decir, se pueden modificar la longitud y las características de los cebadores utilizados, las temperaturas de cada uno de los pasos y el tiempo de duración de los mismos, así como el número de ciclos realizados.

V.1.1.2. Objetivos

- Investigar la presencia de los genes *mecA*, *hlg* y *pvl* en los aislamientos SAMS tolerantes a cefalotina.

V.1.1.3. Materiales y Métodos

V.1.1.3.1. Aislamientos estudiados

Se estudiaron los aislamientos SAMS 3, 4, 11 y 15 de la tabla III.1. Se utilizaron como cepas controles: *S. aureus* ATCC 29213 (control negativo) y *S. aureus* ATCC 43300 para gen *mecA* y para gen *pvl* una cepa de referencia del cepario del Laboratorio de Resistencia Bacteriana. Cátedra de Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, Argentina.

V.1.1.3.2. Extracción del ADN genómico

Se llevó a cabo con cada una de las cepas incógnitas y con los controles según la metodología propuesta por Gardella y col. (2005; 2011).

Los aislamientos se cultivaron en 4 mL de caldo LB (Luria Bertani) durante 24 horas a 37°C. Luego de este tiempo se tomaron 2 mL y se centrifugaron 2 minutos a 13000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se repitió la operación dos veces más.

El *pellet* de cada tubo fue resuspendido en 1 mL de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA). Se centrifugaron nuevamente durante 10 minutos a 13000 rpm y los *pellets* se resuspendieron en 100 µL de TES (buffer TE más 50% sacarosa).

Los *pellets* resuspendidos se trataron con 20 µL de lisozima (10 mg/mL), (Sigma, Chemical Co, St Louis, USA) y 3 µL de lisostafina (10 mg/mL), (Sigma, Chemical Co, St Louis, USA) y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Luego, se agregaron a cada tubo: 40 µL de buffer TE con SDS 10% (sulfato dodecil de sodio) y 20 µL de EDTA 0.5 M pH 8.0.

El contenido de los tubos fue mezclado suavemente por inversión y a cada tubo se le agregó 2 µL de proteinasa K (20 mg/mL) (BRL, Gaithersburg, USA). La digestión de las proteínas fue realizada a 37°C hasta ver clarificación, durante aproximadamente 40 minutos.

Para separar y purificar al ADN genómico de lípidos y proteínas, se realizaron dos extracciones sucesivas con fenol-cloroformo de la fase acuosa. Para ello a cada tubo se le agregaron 120 µL de fenol equilibrado y 120 µL de cloroformo, se mezcló suavemente por inversión durante 4 minutos y luego las fases fueron separadas por centrifugación a temperatura ambiente en centrífuga Rolco de mesada a 5000 rpm durante 10 minutos.

La fase acuosa superior fue traspasada a otro tubo con la mezcla fenol-cloroformo (320 µL) y se centrifugó 10 minutos.

Se extrajo con 240 µL de cloroformo y se centrifugó nuevamente 10 minutos.

Luego la fase acuosa superior se pasó a otro tubo pre-enfriado con 1 mL de etanol al 100% y se dejó agitando. Se centrifugó 5 a 10 minutos a 13500 rpm.

El *pellet* final se resuspendió en 200 µL de agua MilliQ estéril.

V.1.1.3.3. Amplificación genes *mecA*, *hlg* y *luk-PV*

Para el gen *mecA* se trabajó según el protocolo de Murakami y col. (1991). Los oligonucleótidos utilizados fueron:

3'*mecA*: 5'-AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C-3'

5'*mecA*: 5'- AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C-3'

Para los genes *lpv* y *hlg* se trabajó según el protocolo de Lina y col. (1999). Los oligonucleótidos utilizados fueron:

***luk-PV-1*:** ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC A

***luk-PV-2*:** GCA TCA AST GTA TTG GAT AGC AAA AGC

hlg-1: GCC AAT CCG TTA TTA GAA AAT GC

hlg-2: CCA TAG ACG TAG CAA CGG AT

V.1.1.3.4. Mezcla de reacción

La mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera:

	Concentraciones iniciales	Volúmenes a usar
Agua destilada estéril	-	23 μ L
Primer-3'	5 mM	8 μ L
Primer-5'	5 mM	8 μ L
Buffer	10 x	5 μ L
MgCl₂	50 mM	2.5 μ L
dNTP	10 mM	2.5 μ L
ADN	50 ng/ μ L	1 μ L

MgCl₂: cloruro de magnesio; **mM**: milimolar; **μ L**: microlitro; **ng**: nanogramos; **dNTP**: deoxinucleótidos trifosfatos; **ADN**: ácido desoxirribonucleico

Idéntica mezcla de reacción se preparó para el resto de los genes estudiados.

Para un volumen final de 50 μ L: se colocaron 49 μ L de la mezcla de reacción en cada tubo de PCR y se agregó 1 μ L de ADN. Se realizó “*Hot-start*”, se agregó la *Taq*-polimerasa (5U/ μ L) a los 5 min de *annealing* (1U por reacción).

V.1.1.3.5. Protocolo de ciclado

Se utilizó un termociclador Eppendorf Master y el protocolo cumplimentado fue:

95 °C – 5 min
52°C – 15min → a los 5 min se agregó la *Taq-pol*
72°C – 1 min
95°C – 1 min } 30 ciclos
52°C – 1 min }
72°C – 1 min }
72°C – 10 min

Se mantuvo a 4°C.

V.1.1.3.6. Análisis del tamaño de los productos de PCR

Los productos de amplificación fueron resueltos por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE. Para ello, se mezclaron 9 µL de cada producto con 1 µL de buffer de carga de ADN 10X y se sembró todo el volumen en el gel. Se incluyeron marcadores de peso molecular (ADN Ladder, Invitrogen). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) y las bandas resultantes se visualizaron con un transiluminador UV.

Los fragmentos esperados fueron: para *mecA*, *pvl* y *hlg* de 550 pb, 433 pb y 937 pb, respectivamente.

V.1.1.4. Resultados

Las bandas obtenidas para el gen *mecA* se muestran en la figura V.1.

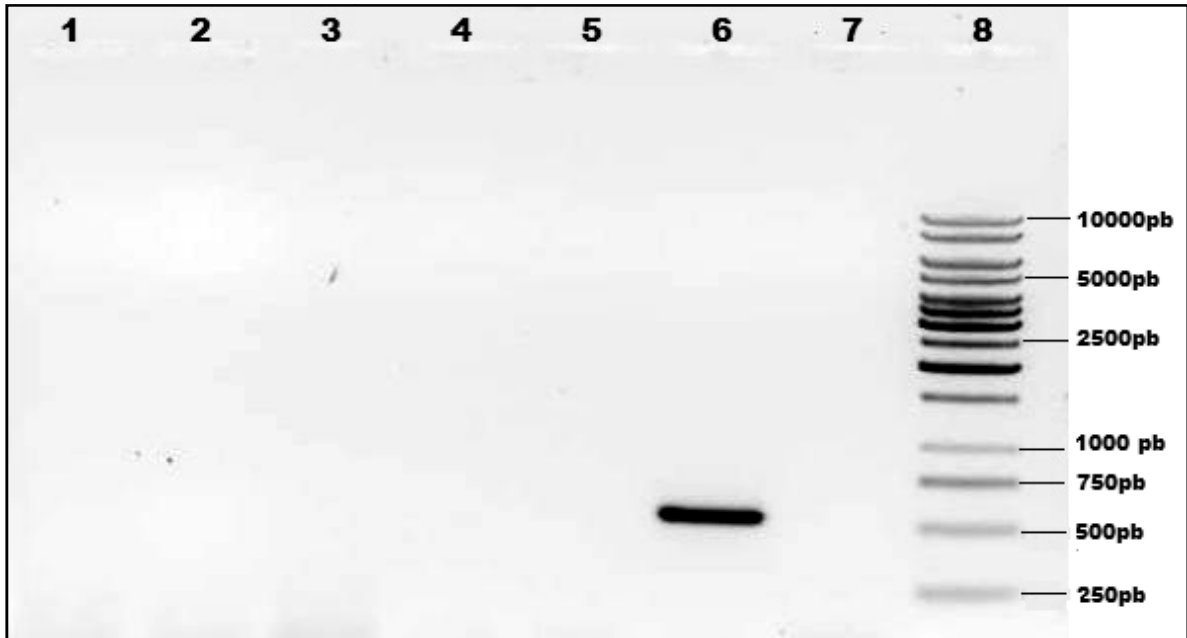


Figura V.1: Detección del gen *mecA* en los aislamientos de *Staphylococcus aureus* meticilino sensibles tolerantes a cefalotina.

Calles 1 y 2: SAMS 3 y 15; **Calles 3 y 4:** dos colonias de aspectos diferentes (grande y pequeña respectivamente) del mismo SAMS 4; **Calle 5:** SAMS 11; **Calle 6:** *Staphylococcus aureus* ATCC 4330, meticilino resistente (Control positivo); **Calle 7:** *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, meticilino sensible (Control negativo); **Calle 8:** marcador de peso molecular (1Kb), ADN Ladder, Invitrogen.

Los amplicones de *mecA* obtenidos con estos *primers* tienen un tamaño de aproximadamente 550 pb.

Las bandas obtenidas para los genes *hlg* y *pvl* se observan en las Figuras V.2 y V.3, respectivamente.

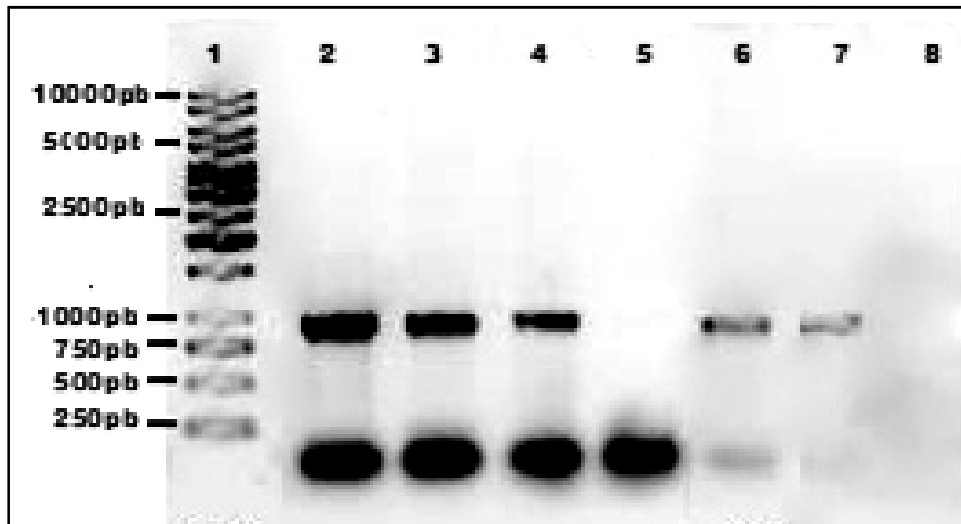


Figura V.2: Investigación del gen *hlg* en los aislamientos de *Staphylococcus aureus* meticilino sensibles tolerantes a cefalotina.

Calle 1: patrón de peso molecular (1 Kb), ADN Ladder, Invitrogen; **Calle 2, 3 y 4:** SAMS 11, 3 y 15; **Calles 5 y 6:** dos aspectos distintos de colonias (5: grande; 6: pequeña) de SAMS 4; **Calle 7:** *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, control positivo; **Calle 8:** control negativo. Cepa del cepario del Laboratorio de Resistencia Bacteriana. Cátedra de Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, de la Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Los amplicones del gen *hlg* obtenidos con estos *primers* tienen un tamaño de aproximadamente 937 pb.

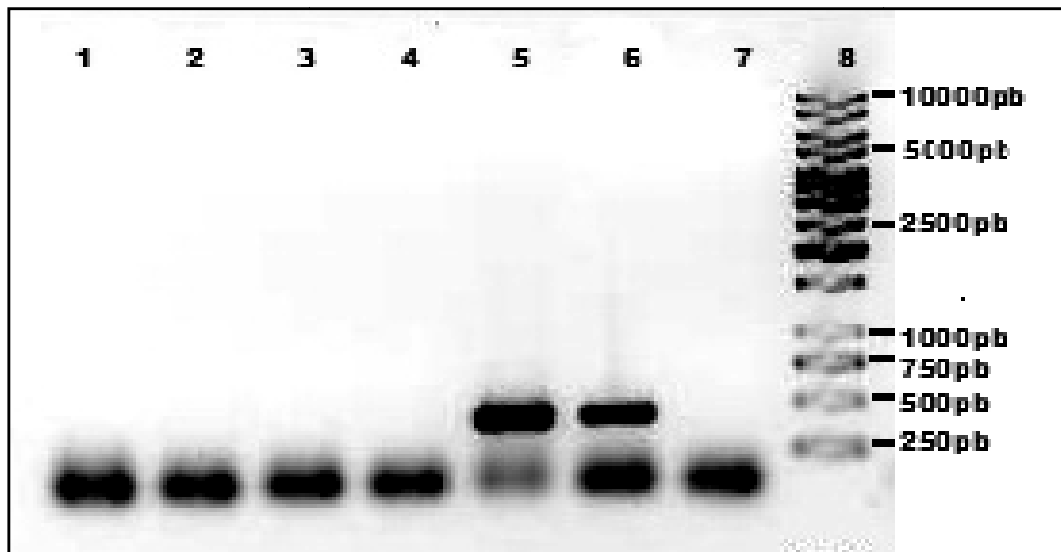


Figura V.3: Investigación de los genes *pvl* en los aislamientos de *Staphylococcus aureus* meticilino sensibles tolerantes a cefalotina.

Calle 1 y 2: SAMS 3 y 15; **Calles 3 y 4:** dos aspectos distintos de colonias (grande y pequeña respectivamente) de SAMS 4; **Calle 5:** SAMS 11, LPV (+); **Calles 6 y 7:** controles positivo y negativo respectivamente; cepas del cepario del Laboratorio de Resistencia Bacteriana. Cátedra de Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, Argentina; **Calle 8:** patrón de peso molecular (1 Kb)

Los amplicones del gen *pvl* obtenidos con estos *primers* tienen un tamaño de aproximadamente 433 pb.

Los aislamientos estudiados fueron todos *S. aureus* meticilino-sensibles ya que no se detectó el gen *mecA* en ninguno de ellos.

Respecto a la presencia del gen que codifica la hemolisina, se observa que todos ellos, excepto la colonia de aspecto macroscópico pequeño, portaron el gen *hlg*. Esto confirmó que todos los aislamientos eran *S. aureus*.

El único aislamiento que portó el gen *pvl* fue SAMS 11.

V.1.1.5. Discusión

Dado que todos los aislamientos fueron *mecA* negativos, se confirmaría el hecho de que la disminución en la actividad bactericida de cefalotina, no se debe al mecanismo de resistencia sino que se trata de una disminución de la actividad del AM, es decir a un fenómeno de tolerancia a dicho AM.

En cuanto al gen *pvl* vemos que un aislamiento (SAMS 11) es LPV (+) lo que concuerda con muchos autores que demuestran la presencia de este gen en aislamientos meticilino sensibles. Laifer y col. (2006) comunicaron que las forunculosis por esta bacteria son mucho más complicadas si las cepas causantes portan la leucocidina de Pantón-Valentine. Estos datos coinciden con Pérez-Roth y col. (2010) quienes comunicaron que la portación de LPV está asociada a infecciones de PPB y pulmonares, constituyendo un grave problema de salud pública. Estos autores reportaron que sobre 22 aislamientos de pacientes y del grupo familiar al que pertenecían, recuperaron 14 SAMS portadores de LPV.

En la presente tesis, el aislamiento LPV (+) fue recuperado de un hombre de 45 años que ingresó por dolor agudo en el recto, fiebre y decaimiento. Se le efectuaron numerosos estudios: rectosigmoideoscopia, tomografía y ecografía y se lo internó en sala de cirugía. Se trataba de un paciente normoinmune y se realizaron análisis de sangre detectándose leucocitosis; se le diagnosticó absceso perianal por lo que se decidió realizar intervención quirúrgica para drenar el absceso ya que no cedía con tratamientos de cefalotina. El aislamiento fue tolerante a cefalotina y LPV (+), quizás esto explicaría el relativo mal estado general del paciente. También sería coincidente con Pérez-Roth y col. (2010) quienes informaron que en algunos de los pacientes estudiados, se debió recurrir a incisión quirúrgica, además del tratamiento con AM.

Los datos aquí obtenidos coinciden con los reportados por Alvela-Suarez y col. (2011) quienes presentaron un caso de un joven español de 16 años, sin factores de riesgo y con un cuadro severo de neumonía necrotizante con afectación cutánea por SAMS adquirido en la comunidad con múltiples factores de virulencia, entre ellos la producción de LPV. Estos autores agregaron además que la literatura española reporta,

fundamentalmente, *S. aureus* resistente a meticilina. No existen publicaciones españolas que describan la prevalencia de SAMS positivo para LPV.

Obando y col. (2011) describieron el caso de dos pacientes pediátricos con osteomielitis aguda producida por SAMS productores de LPV asociadas a complicaciones de trombosis venosa profunda y embolismo sépticos pulmonares. Estos autores alertaron sobre la emergencia de cepas estafilocócicas meticilino sensibles, LPV positivas que, generalmente han sido asociadas a meticilino resistentes, y resultan altamente virulentas y producen infecciones invasivas.

En la ciudad de Santa Fe, Argentina se realizó un estudio de portación nasal en 40 estudiantes de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL), con una edad promedio de 24.8 ± 2.3 años y con predominio del sexo femenino (85%) y se recuperó en 13 de ellos, *S. aureus*, correspondiendo el 85% a SAMS y el 15% a SAMR. Se observó una fuerte asociación entre los antecedentes de infecciones de piel y partes blandas (como forunculosis a repetición) y la portación nasal de SAMS en estudiantes que presentaban como principal factor de riesgo el uso de antimicrobianos en los últimos 6 meses (Giusti y col., 2011a). Estos autores sugirieron que, la ausencia de infecciones de mayor severidad en los alumnos, portadores de *S. aureus* podría ser atribuida a la ausencia en su genoma de los genes que codifican el factor de virulencia, leucocidina de Pantón-Valentine.

Aunque son pocas las cepas estudiadas en esta tesis, sobre 4 SAMS se obtuvo un portador de LPV; esto sería coincidente con Havaei y col. (2011) quienes observaron, sobre 83 SAMS, una elevada prevalencia (19,7%) de portación de LPV, destacando estos autores, la importancia de la presencia de dicho factor de virulencia como coadyuvante de la severidad de las infecciones.

V.1.1.6. Conclusiones

- Todos los aislamientos SAMS tolerantes a cefalotina fueron confirmados por la presencia del gen *hlg*.
- Se confirmó la tolerancia a la acción bactericida del AM betalactámico.
- Se detectó la leucocidina de Panton-Valentine en uno de los aislamientos de SAMS, proveniente de un paciente de la comunidad, con una infección relativamente severa de PPB.

V.2. SECCIÓN B

V.2.1. AISLAMIENTOS TOLERANTES A ANTIMICROBIANOS GLUCOPÉPTIDOS: VANCOMICINA. DETECCIÓN DE POLIMORFISMO GENÓMICO EN SAMR.

V.2.1.1. Introducción

V.2.1.1.1. Generalidades

La aparición de SAMR en la comunidad y el riesgo potencial de su entrada en el hospital son también temas de interés, más aún, el aumento de la prevalencia de aislamientos multi-resistentes como la emergencia de cepas con sensibilidad intermedia a VAN, enfatizan la importancia de extremar las medidas de control de la infección (Vindel y col., 2009).

A pesar de que la prevalencia de SAMR ha ido en aumento, propagándose a través de las distintas áreas geográficas; en las últimas décadas, las tasas son muy variables, alcanzando en algunas regiones, más del 50% mientras que en otras, los valores son mucho menores y en algunas parece haberse estabilizado. No obstante la emergencia mundial de estas cepas; sólo existe un número limitado de clones que se han diseminado en la mayoría de los países (Rodríguez-Noriega y col., 2010).

Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado la utilización de los métodos de tipificación molecular debido a la diseminación de los diversos clones epidémicos de SAMR, tales como los denominados EMRSA tipo 15 (EMRSA-15), EMRSA-16 encontrados frecuentemente en Gran Bretaña, el clon ibérico (España), el clon brasileño (Brasil), el clon cordobés (Argentina) y el clon SAMR USA300 asociado a SAMR-AC (Cox y col., 1995; Moore y Lindsay, 2002; Perez-Roth y col., 2004; Sola y col., 2006; Tenover, 2006; Vindel y col., 2006).

Por otra parte, el estudio epidemiológico molecular de las enfermedades infecciosas tiene por objeto determinar la relación clonal que existe entre varios aislados de una misma especie. Esta información es muy útil, sobre todo cuando se producen brotes epidémicos causados por cepas multi-resistentes, porque permite determinar el

número de clones circulantes, identificar la fuente de contaminación o reservorio y los vehículos de transmisión, evaluar la eficacia de las medidas de control dirigidas a evitar la diseminación de clones y diferenciar entre infección y recidiva (Maslow y col., 1993).

Como ya se comentara, los métodos de tipificación se clasifican en dos grandes grupos: fenotípicos (basados en características fisiológicas o bioquímicas) y genotípicos (basados en el estudio del ADN). Los métodos fenotípicos de tipificación son menos reproducibles y poseen menor poder de discriminación que los métodos genotípicos. Ello se debe a que la expresión de un carácter fenotípico es el resultado de la interacción del genotipo con el ambiente y, por lo tanto, es susceptible de modificarse cuando las condiciones ambientales varían (Fernández-Cuenca, 2004).

El extraordinario avance de la biología molecular en los últimos años ha permitido desarrollar nuevos métodos genotípicos de tipificación. La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) es la técnica estándar de referencia para tipificar la mayoría de bacterias, hongos y parásitos con importancia clínica, debido a que posee un elevado poder de discriminación y una excelente reproducibilidad. Esta técnica de tipificación tiene el inconveniente de que es muy laboriosa y consume mucho tiempo (la mayoría de los protocolos de trabajos requieren más de cuatro días para poder obtener y analizar los pulstipos), por lo que su uso diario en el laboratorio es poco práctico. Esto hace que sea necesaria la búsqueda de otros métodos de tipificación alternativos a la PFGE que sean más flexibles y rápidos, y menos laboriosos (Balajee y col., 2007).

Los criterios para evaluar las técnicas de tipificación se dividen en 2 categorías: criterio de rendimiento (eficacia) y de conveniencia (eficiencia). Los primeros incluyen: tipificabilidad, reproducibilidad, poder discriminatorio, y acuerdo entre las técnicas de tipificación; mientras que versatilidad, rapidez, facilidad de ejecución e interpretación se consideran criterios de conveniencia. La tipificabilidad significa la proporción de los aislamientos que puede ser asignado como perteneciente a un “tipo” por técnica de tipificación. Reproducibilidad refiere a la habilidad de la técnica para producir el mismo resultado cuando la muestra es ensayada repetidamente. El poder discriminatorio depende de la probabilidad que los aislamientos compartan perfiles idénticos o parecidos, siendo realmente un clon o parte de una misma cadena de transmisión.

Numerosas técnicas genotípicas se han desarrollado en las últimas décadas, las cuales, inicialmente se usaron con fines de investigación; pero, actualmente, se emplean cada vez más en la práctica clínica (Trindale y col., 2003).

V.2.1.1.1.1. *Técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos*

Por lo general, las técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR poseen un elevado poder de discriminación, son menos laboriosas, más rápidas y más flexibles que la PFGE, y permiten trabajar con un mayor número de muestras. Las técnicas de PCR son útiles para diferenciar grupos de cepas no relacionadas clonalmente, pero son menos discriminativas que la PFGE para diferenciar subtipos entre cepas relacionadas clonalmente (Bucci y col., 2011).

Estas técnicas pueden presentar problemas metodológicos relacionados con la inhibición de la PCR y la contaminación de las muestras durante el proceso de preamplificación. Algunas de estas técnicas tienen que ser validadas en el laboratorio (estandarización de protocolos, equipos y reactivos) debido a que presentan una baja reproducibilidad, mientras que otras técnicas pueden requerir un *software* adecuado para analizar patrones de bandas de ADN que son complejos y difíciles de interpretar visualmente. Otros problemas son los criterios utilizados para interpretar los patrones de bandas y la dificultad para comparar los patrones de ADN entre varios geles, aunque esto último puede resolverse con la utilización de programas informáticos que analizan automáticamente los patrones y los junta en agrupaciones (*clusters*) (Fernández-Cuenca, 2004).

En la amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD) o PCR con iniciadores arbitrarios (AP-PCR) se utilizan uno o varios cebadores con secuencias de nucleótidos aleatorias y de corta longitud (8-12 nucleótidos) que hibridan con regiones inespecíficas del genoma en condiciones de baja estringencia (temperatura de anillamiento a 36-45 °C y 2 mM MgCl₂), (Welsh y McClelland, 1993).

Las ventajas más interesantes de la RAPD y AP-PCR son su rapidez, flexibilidad, fácil interpretación y relativamente bajo costo. Existen diversos estudios

que indican que ambas técnicas poseen una baja reproducibilidad (sobre todo cuando se comparan patrones de bandas entre laboratorios diferentes), por lo que es recomendable que estas técnicas se validen y se optimicen en cada laboratorio (Vanhee y col., 2009). La baja reproducibilidad se debe a que son muy sensibles a pequeñas variaciones metodológicas, como el procedimiento de extracción de ADN, el tipo de termociclador, la concentración de molde de ADN, la temperatura de anillamiento, la concentración de iones magnesio, etc. (Li y col., 2009).

En general, la AP-PCR suele tener un poder de discriminación inferior al de la PFGE, aunque puede incrementarse con la utilización de varios cebadores y mediante la optimización de la PCR. La AP-PCR se ha utilizado en diversos estudios para tipificar bacterias (SAMR, enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Legionella pneumophila*, etc.) y hongos (*Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*) (Vila y col., 1996).

La rep-PCR es otra técnica de tipificación en la que se utilizan cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas o repetitivas (secuencias rep) que se encuentran distribuidas en el cromosoma de muchas enterobacterias y algunas bacterias gram-positivas y hongos. Con esta técnica se amplifican las regiones que separan las secuencias rep, por lo que el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones de ADN (Fernandez-Cuenca, 2004).

Las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (secuencias REP) y las secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (secuencias ERIC) son algunas de las secuencias rep que más se han utilizado en estudios epidemiológicos de brotes infecciosos (Cookson y col. 2007).

La técnica de REP-PCR se caracteriza por su simplicidad (no requiere el uso de enzimas de restricción, ni técnicas electroforéticas especiales), rapidez (menos de 24 h) y su relativo bajo costo, una vez que se dispone de un termociclador. Los patrones de bandas suelen ser sencillos en algunas bacterias y algo más dificultosa en otras, debido a la proximidad que existe entre algunas bandas y al mayor número de bandas. Esta

técnica posee un poder de discriminación y reproducibilidad inferiores a los de la PFGE. Estudios realizados por Tenover y col. (1994), y van Belkum y col. (1995) indican que la rep-PCR es tan discriminatoria como la AP-PCR y el PFGE para tipificar *S. aureus*. El poder de discriminación de la rep-PCR puede incrementarse con la utilización de cebadores fluorescentes, aunque esto encarece bastante la técnica debido a que se necesita un secuenciador automatizado de ADN para analizar los patrones de bandas de ADN.

La amplificación de secuencias ERIC mediante PCR (ERIC-PCR) es otra técnica de tipificación utilizada para estudiar la relación clonal en diversas bacterias gram-negativas, como *Acinetobacter baumannii*. Los patrones de ADN que se obtienen con la ERIC-PCR suelen ser menos complejos que los generados mediante REP-PCR.

La técnica de PCR-RFLP se basa en la digestión con enzimas de restricción de productos de amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas. Con esta técnica se estudia una región muy limitada del genoma (p. ej., gen *coa* que codifica para la coagulasa o el gen *spa* que codifica para la proteína A de *S. aureus* resistente a meticilina), por lo que su poder de discriminación y reproducibilidad suelen ser algo inferiores al de los métodos de tipificación citados anteriormente. En general, el poder de discriminación de esta técnica depende de una serie de factores como la especie del microorganismo, el gen analizado y el tipo de enzima de restricción. El poder de discriminación de la técnica de PCR-RFLP es inferior al de la PFGE aunque puede incrementarse utilizando varias enzimas de restricción. La principal ventaja de la PCR-RFLP radica en la rapidez y simplicidad de la técnica, que permite la obtención de resultados en una sola jornada, y la reproducibilidad de los patrones de restricción (Montesinos y col., 2002).

El estudio del polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) se fundamenta en la amplificación mediante PCR de fragmentos de restricción (generados a partir de ADN cromosómico) a los que previamente se les han unido unos adaptadores que hibridan con cebadores específicos. Existen variaciones metodológicas del AFLP, dependiendo del número de cebadores (normalmente se utilizan 1 ó 2), del tipo de marcaje de los cebadores (radiactivo o fluorescente) y del número de enzimas de

restricción utilizadas (1 ó 2). Los protocolos de AFLP más utilizados suelen emplear 2 enzimas de restricción y cebadores fluorescentes. Las ventajas más interesantes de este método son su elevada sensibilidad y su excelente poder de discriminación. La técnica de AFLP suele ser menos discriminativa que la PFGE, aunque para algunos microorganismos, como *Enterococcus faecium*, se ha observado que el poder de discriminación de ambos métodos son muy similares (Chuang y col., 2010).

Entre los principales inconvenientes de esta técnica hay que destacar su laboriosidad, el elevado costo del equipo (se requiere un secuenciador automatizado de ADN), la obtención de patrones de bandas complejos (entre 30 y 50 fragmentos de distinto tamaño) y el análisis de los mismos con un *software* adecuado. Todo esto hace que el AFLP se utilice fundamentalmente en centros de referencia (Lan y Reeves, 2007).

Sin embargo, la utilización de *primers* adecuados para una correcta identificación de un determinado microorganismo, especialmente cocos gram-positivos, puede ofrecer alguna dificultad (Maslow y col., 1993). Estas bacterias parecerían ser más refractarias a ser caracterizadas por técnicas de amplificación. Debido a que los oligonucleótidos degenerados (OD-PCR) permiten la investigación simultánea de un número de *primers* potencialmente útiles, el proceso de tamizaje, con esta técnica, puede ser simplificada (Limansky y col., 1995).

En los últimos años se ha desarrollado una técnica de tipificación (MLST: del inglés “*multilocus sequence typing scheme*”) basada en la amplificación y secuenciación de genes denominados *housekeeping*, genes ribosomales y/o genes relacionados con factores de virulencia. Esta técnica es laboriosa y requiere un equipo costoso y personal con experiencia, por lo que actualmente se utiliza en centros especializados o laboratorios de referencia (Vázquez y Berrón, 2004).

En resumen, hoy día, disponemos de algunas técnicas de tipificación basadas en la PCR que pueden utilizarse para el estudio de la relación clonal entre microorganismos de una misma especie. La elección de la técnica más adecuada depende de muchos factores, siendo los técnicos los más importantes (técnica rápida,

poco laboriosa, fácil de interpretar y con un elevado poder de discriminación y reproducibilidad) y también los económicos (bajo costo).

V.2.1.2. Objetivos

- Investigar el polimorfismo genómico de los aislamientos SAMR tolerantes a vancomicina mediante la técnica de OD-PCR

V.2.1.3. Materiales y Métodos

V.2.1.3.1. Aislamientos bacterianos

Se estudiaron en total 7 aislamientos. Cuatro SAMR tolerantes a vancomicina obtenidos por el método de cinética de muerte, método aplicado en esta tesis, y además se seleccionaron otros 3 aislamientos para determinar la relación clonal. Estos aislamientos fueron: SAMR 8 (tolerante por relación CBM/CIM); SAMR 132 (aislado en el mismo centro hospitalario pero en otro período de tiempo, junio de 2009) y SAMS 244 (*S. aureus* meticilino sensible recuperado durante el mismo período en que se realizó esta tesis).

V.2.1.3.2. Purificación de ADN

Se realizó lisis rápida mediante ebullición. Se tomaron 4 a 5 colonias del microorganismo crecido en agar MH durante 24 horas a 35°C y se suspendieron en 200µL de agua destilada estéril. Se centrifugó 5 minutos a 6000 rpm. Se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el *pellet* en 200 µL de tritón-X al 1% en buffer Tris-acetato EDTA (TAE) 1x y se sometió a 95°C durante 15 minutos. Se centrifugó 5 minutos a 6000 rpm, y se separó el sobrenadante para trabajar con él. Se conservó a -20°C, por no más de 48 horas.

V.2.1.3.3. Protocolo de PCR empleando oligonucleótidos degenerados

Se empleó PCR con oligonucleótidos degenerados siguiendo la técnica de Limansky y Viale (2002).

V.2.1.3.3.1. *Secuencia de cebadores usados*

Se empleó el cebador 19 (5'-GGTCGACYTTNGYNGGRTC-3'), y el cebador 5314 (5'-GGTCGACYNGGRTC-3'), donde N: A, T, C o G; Y: C o T y R: A o G.

V.2.1.3.3.2. Mezcla de reacción para volumen final: 50µL

	Concentraciones iniciales	Volúmenes a usar
Agua destilada estéril		25,5 µL
Buffer	1 x	5 µL
MgCl ₂	3 mM	3 µL
Mezcla dNTPs	200 µM	5 µL
Cebador (Sigma)	2,5 µL	1 µL

MgCl₂: cloruro de magnesio; dNTP: deoxinucleótidos trifosfatos; mM: milimolar; µL: microlitro; µM: micromolar.

Se emplearon para la mezcla 10 µL de ADN y 0,5 µL de *Taq*-polimerasa: 0,05 U/µL (Invitrogen, Life Technologies).

V.2.1.3.3.3. Programa empleado

Se aplicó una PCR *hot-start*. El termociclador usado fue Perkin-Elmer/CETUR 480 y se cumplimentó el siguiente protocolo:

95 °C – 5 min → (luego se agregó la enzima)
 93°C – 1 min }
 36°C – 1,5 min } 40 ciclos
 72°C – 2 min }

72°C- 10 minutos (para complementar la polimerización)

Luego 20 µL de la mezcla del producto amplificado fue analizado por electroforesis en geles de 1,2 % de agarosa conteniendo 0,5 µL/mL de bromuro de etidio, siguiendo procedimientos convencionales (Limansky y Viale, 2002).

Se utilizó como marcador de peso molecular fago λ digerido con HindIII y EcoRI.

V.2.1.3.3.4. *Interpretación de resultados*

Se consideró que dos aislamientos pertenecían a clones distintos cuando se observaron al menos, dos bandas de diferencia entre ellos.

V.2.1.4. Resultados

En la Figura V.4 se observan los perfiles de amplificación obtenidos.

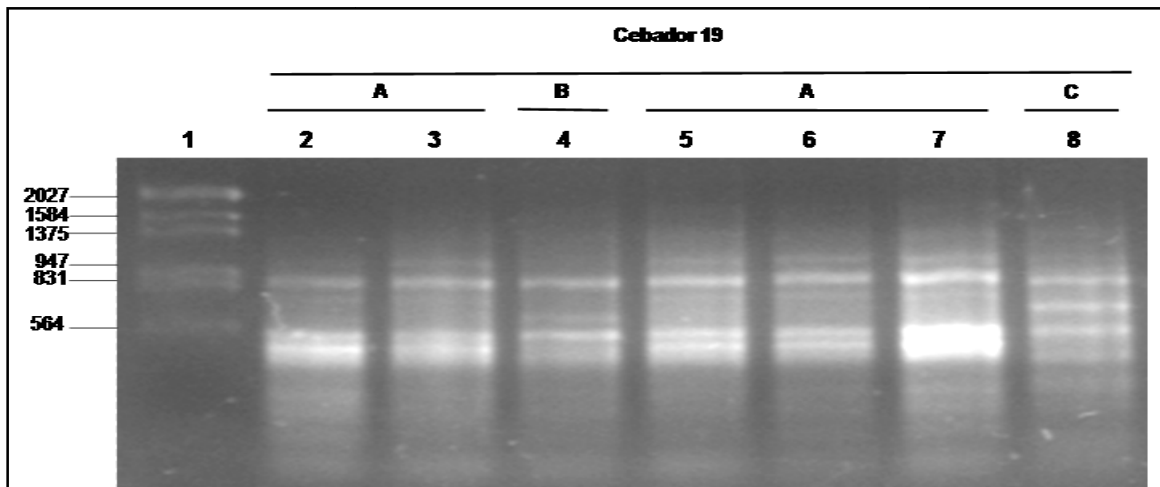


Figura V.4: Perfiles OD-PCR de aislamientos de *Staphylococcus aureus*.

Calle 1: fago λ digerido con HindIII y EcoRI; **Calles 2, 3, 5, 6 y 7:** SAMR 6, SAMR 11, SAMR 12, SAMS 244 y SAMR 132, respectivamente (clon A); **Calle 4:** SAMR 10 (clon B); **Calle 8:** SAMR 8 (clon C).

Se puede deducir de las cepas estudiadas que hubo 3 clones. El clon A que incluyó tres SAMR tolerantes por CM, y dos más (1 SAMS y 1 SAMR) cuyos aislamientos no estaban relacionados en el tiempo.

El clon B estuvo conformado por SAMR 10, tolerante por CM y el clon C resultó conformado por SAMR 8, tolerante por el criterio CBM/CIM y relacionado en el tiempo con los tolerantes por CM.

Semejantes resultados se obtuvieron con el cebador 5314.

V.2.1.5. Discusión

La técnica OD-PCR fue descrita por primera vez por Telenius y col. (1992) quienes expresaron que esta técnica para la amplificación de ADN es rápida, eficiente e independiente de la especie estudiada.

El uso de cebadores aleatorios con la técnica de PCR tiende a detectar la heterogeneidad del genoma entre los distintos aislamientos de un patógeno en particular y ha sido ampliamente aceptado por sus bajos requerimientos técnicos, fácil aplicabilidad y costos (Maslow, y col., 1993). Limansky y col. (1995) utilizaron el oligonucleótido 19 para determinar la diversidad genómica de *Streptococcus agalactiae* y concluyeron que dicha metodología es útil para demostrar un amplio grado de discriminación entre aislamientos de *S. agalactiae*. En este contexto, estos autores concluyeron que esta técnica resulta una herramienta útil, relativamente económica y técnicamente accesible para ser aplicada con otros patógenos. Esto coincide con los resultados obtenidos en esta tesis.

Peng y col. (2003) han obtenido buenos resultados aplicando esta técnica y demostraron que estos son mejores cuando se utilizan pequeñas cantidades de ADN. Shen y col. (1998) consideraron que es eficiente para identificar genes de resistencia en plantas.

Si bien esta metodología es comúnmente usada, la cantidad de templado de ADN es importante ya que, según Arneson y col. (2008) una menor producción de templado puede conducir a resultados menos confiables.

Por lo tanto, resulta importante tener en cuenta estas consideraciones al momento de usar la técnica OD-PCR.

V.2.1.6. Conclusiones

- La técnica aplicada resultó de utilidad para detectar el polimorfismo genómico de los aislamientos SAMR tolerantes a vancomicina por CM pudiéndose distinguir 2 clones (clon A y clon B) y una tercera cepa establecida tolerante por CBM/CIM presentó un nuevo clon (clon C).
- Este estudio permitió demostrar que los aislamientos estudiados no correspondían a la misma cepa que se presentó en distintos pacientes; sino que se trató de varios aislamientos no relacionados genéticamente y que presentaron tolerancia a la VAN.

V.3. SECCIÓN C

ACTIVIDAD BACTERICIDA DE VANCOMICINA FRENTE A *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ADQUIRIDOS EN LA COMUNIDAD Y SU RELACIÓN CON LA PRODUCCIÓN DE LEUCOCIDINA PANTON-VALENTINE

V.3.1. Introducción

SAMR como se dijo anteriormente, produce infecciones de alta morbi-mortalidad y fue hasta hace pocos años un patógeno nosocomial (David y Daum, 2010).

Según un programa de vigilancia de EEUU publicado en el año 2004 la presencia de este tipo de bacteria en hospitales y, principalmente en las salas de cuidados intensivos, alcanzó cifras mayores al 60% (NNIS, 2004).

A fines de la década del 80, se reportaron, cada vez con mayor frecuencia, infecciones por estas bacterias en pacientes sin ningún factor de riesgo (FR), ni contacto previo con centros de salud (Boucher y Corey, 2008).

Estas infecciones comenzaron a informarse en todo el mundo (Grundmann y col., 2006) y, consecuentemente, el tratamiento se ha tornado más difícil, por el incremento de la resistencia. Por ejemplo, en Baltimore, durante 2003-2004 se identificaron cuatro casos de neumonía necrotizante en adultos sin FR; los aislamientos resultaron portadores del factor de virulencia: la leucocidina de Pantón-Valentine y se demostró que poseían el SCC*mec* tipo IVa y que pertenecían al tipo USA300 (Francis y col., 2005).

Varios investigadores han demostrado que SAMR-AC ha evolucionado a partir de clones de *S. aureus* metilino sensible de la comunidad y que poseían la toxina LPV (Diep y col., 2006a). Pareciera que la inserción de un SCC*mec* tipo IV móvil más pequeño en una cepa de MSSA-LPV positivo determinó que SAMR-AC adquiriera el determinante de resistencia y una mayor actividad toxigénica, aumentando su poder patógeno (Diep y col., 2006b).

Cercenado y Ruiz de Gopegui (2008) comunicaron que, los factores de riesgo (FR) que se detectan en las personas con infecciones por SAMR hospitalarios y que no poseen las personas infectadas con SAMR-AC, son:

- historia previa de infección o colonización por dicho agente,
- hospitalización en el año previo al aislamiento,
- asistencia a centros médicos,
- pacientes en diálisis,
- haber sido sometido a una cirugía,
- poseer prótesis o cualquier dispositivo médico,
- convivir con un trabajador sanitario.

Se han descrito algunos factores no asociados a centros de salud que predisponen a dicha infección como la transmisión persona a persona, hombres que tienen sexo con hombres, militares reclutados, prisioneros, atletas, mujeres post-parto, drogadictos intravenosos, parejas heterosexuales y jugadores de fútbol (Ellis y col., 2004; Fridkin y col., 2005; Cook y col., 2007; Shastry y col., 2007; Garza y col., 2009; Giannouli y col., 2010).

Varios estudios demuestran que la prevalencia de SAMR-AC varía geográficamente. Se reportaron brotes en USA, Arabia Saudita y Nueva Zelanda (Rybak, 2006) y se documentaron también estos aislamientos en Latinoamérica (Uruguay, Brasil y Argentina), incluyendo la ciudad de Santa Fe (Galiana Villar, 2003; Ribeiro y col., 2005; von Spetch y col., 2006; Palombarini y col., 2007; Sola y col., 2008; Casellas y col., 2009; Giusti y col., 2011b).

Si bien los genes *pvl* son prevalentes en SAMR-AC y considerados genes de virulencia, recientemente algunos estudios han sugerido que no se encuentran homogéneamente distribuidos entre dichas cepas y que existen factores múltiples que coadyuvan a la gravedad de las infecciones por este agente (Voyich y col., 2006).

SAMR-AC LPV (-) son predominantes en los países del Pacífico asiático tales como Australia, Japón, China y Corea del Sur. En particular, un nuevo clon de SAMR-

AC (ST72)-SCC*mec* tipo IVa que ha perdido el gen *pvl* es prevalente en Corea del Sur (Kim y col., 2007) y ya se han descrito casos de infecciones invasivas por estos agentes (Lee y col., 2010).

La resistencia y la gravedad de las infecciones producidas por estos aislamientos han incrementado el uso de VAN, como terapia de primera línea para su tratamiento, a pesar de la incorporación de los nuevos antimicrobianos tales como teicoplanina, linezolid o daptomicina, entre otros (Mohr y Murray, 2007).

Los regímenes que poseen actividad bactericida han demostrado ser superiores a los bacteriostáticos en el tratamiento de las infecciones graves por SAMR, por lo que resulta relevante valorizar la actividad bactericida de este antimicrobiano (Finberg y col., 2004; Pankey y Sabath, 2004).

V.3.2. Objetivos

- Estudiar la actividad bactericida de vancomicina frente a SAMR-AC aislados de adultos sin factores de riesgo.
- Evaluar la relación de dicha actividad bactericida con la producción de LPV.

V.3.3. Materiales y Métodos

V.3.3.1. Pacientes y aislamientos bacterianos

Se estudiaron 30 SAMR resistentes sólo a beta-lactámicos, aislados de pacientes adultos sin FR que asistieron al hospital Dr. José María Cullen de la ciudad de Santa Fe-Argentina, durante julio 2007 a agosto 2008.

Los criterios de inclusión para seleccionar los pacientes fueron: no tener historia previa de infección y/o colonización por SAMR, no haber asistido a centros de salud, ni haber sido sometidos a cirugía o implantación de catéteres u otros dispositivos médicos y no convivir con trabajadores sanitarios.

V.3.3.2. Pruebas de sensibilidad

Concentración inhibitoria y bactericida mínimas y estudios de cinética de muerte

Se determinaron la CIM y CBM de vancomicina, según la metodología propuesta por CLSI. Para la CIM se aplicó la técnica de macrodilución en caldo (CLSI, 2009a). Se estableció la relación CBM/CIM, efectuándose estudios de cinética de muerte a aquellos aislamientos con una relación ≥ 8 (NCCLS, 1999b).

V.3.3.3. Detección de LPV

Se siguieron los protocolos de Greisen y col. (1994) y Lina y col. (1999), adaptados según validación de la Asignatura Bacteriología de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL) (Giusti y col, 2011b; Cercenado y Marín, 2011).

Para cada uno de los aislamientos se trabajó de la siguiente manera:

V.3.3.3.1. Extracción del ADN

A partir de un cultivo de 24 h, se realizó un inóculo 0.5 McFarland en Tris-EDTA pH: 8 – 0,1M. Se llevó a ebullición 15 minutos y luego se centrifugó 5 minutos a 10000 rpm para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se usó como templado para la PCR.

V.3.3.3.2. PCR

Para detectar la presencia de los genes *pvl* se llevó a cabo una PCR, utilizando como control de amplificación ARNr 16S. Como cebadores se utilizaron los oligonucleótidos descritos por Greisen y col. (1994) y Lina y col. (1999). La amplificación se efectuó en un termociclador Eppendorf Master, siendo el volumen final de reacción de 25 μ L, conteniendo 1x buffer de PCR (Invitrogen), 3 mM MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 0,2 μ M de cada cebador, 1 U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen) y 2,5 de ADN blanco. Las muestras fueron desnaturizadas durante 5 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de: desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 52°C durante 30 segundos, extensión a 72°C 30 segundos y una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio 0,5 μ g/mL.

Se usaron como controles positivos para PCR las siguientes cepas: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 43300 y *S. aureus* meticilino-resistente portadora de LPV, cedida por la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) “Dr. Carlos Malbrán”, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas - Buenos Aires, Argentina

V.3.3.3.3. Análisis estadístico

Se realizó una Prueba Chi cuadrado para comparación de proporciones en muestras independientes con un nivel de significancia del 5% (Altman, 1997).

V.3.4. Resultados

De las 30 cepas estudiadas, 19 mostraron $CBM/CIM \geq 8$ y de estos, 8 portaban el factor LPV. La relación CBM/CIM de VAN de los 11 aislamientos restantes resultó < 8 ; de los cuales 7 fueron LPV positivo.

En la Tabla V.1 se presentan los aislamientos cuyos valores resultaron $CBM/CIM \geq 8$, así como su origen y los resultados de la detección para LPV.

Tabla V.1: Aislamiento, origen, relación CBM/CIM de vancomicina y producción de LPV de las cepas SAMR que mostraron $CBM/CIM \geq 8$.

Aislamientos	Muestra clínica	CBM/CIM	LPV	Aislamientos	Muestra clínica	CBM/CIM	LPV
SAMR 2	PPB	128	P	SAMR 33	PPB	8	N
SAMR 7	PPB	32	N	SAMR 34	PPB	8	P
SAMR 8	Hueso	32	N	SAMR 35	PPB	8	N
SAMR 9	PPB	32	P	SAMR 36	PPB	8	N
SAMR10	PPB	32	N	SAMR 37	PPB	8	N
SAMR 17	PPB	16	P	SAMR 38	PPB	8	N
SAMR 21	PPB	16	N	SAMR 39	PPB	8	N
SAMR 22	Espuito	16	P				
SAMR 23	PPB	16	N				
SAMR 30	PPB	8	P				
SAMR 31	PPB	8	P				
SAMR 32	PPB	8	P				

SAMR: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente; **SAMR 10:** se distingue por ser tolerante a VAN por ambos criterios y no productor de LPV; **PPB:** piel y partes blandas; **CIM:** concentración inhibitoria mínima; **CBM:** concentración bactericida mínima; **LPV:** leucocidina de Panton -Valentine; **P:** productor de LPV; **N:** no productor de LPV

Los aislamientos que presentaron valores de CBM/CIM de VAN < 8 , así como su origen y los resultados de la detección para LPV, se presentan en la Tabla V.2.

Tabla V.2: Aislamiento, origen, relación CBM/CIM de vancomicina y producción de LPV de las cepas SAMR con CBM/CIM < 8.

Aislamientos	Muestra Clínica	CBM/CIM	LPV	Aislamientos	Muestra Clínica	CBM/CIM	LPV
SAMR 74	PPB	4	P	SAMR 80	PPB	4	P
SAMR 75	PPB	4	P	SAMR 81	PPB	4	N
SAMR 76	PPB	4	P	SAMR 82	PPB	4	N
SAMR 77	PPB	4	N	SAMR 105	PPB	2	P
SAMR 78	PPB	4	P	SAMR 107	PPB	2	P
SAMR 79	PPB	4	N				

SAMR: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente; **PPB:** piel y partes blandas; **CIM:** concentración inhibitoria mínima; **CBM:** concentración bactericida mínima; **LPV:** leucocidina de Panton -Valentine; **P:** productor de LPV; **N:** no productor de LPV.

De los 15 aislamientos LPV (+), 8 tuvieron una relación CBM/CIM ≥ 8 (χ^2 :1.29; p= 0.25).

Las curvas de cinética de muerte de *S. aureus* frente a VAN, efectuados a los 19 aislamientos con CBM/CIM ≥ 8 , se dividieron en 4 grupos: 1) CBM/CIM ≥ 32 (5 aislamientos); 2) CBM/CIM = 16 (4 aislamientos); 3) CBM/CIM = 8, LPV (+) (4 cepas) y 4) CBM/CIM = 8, LPV (-) (6 cepas). Los resultados obtenidos se observan en las figuras V.5, V.6, V.7 y V.8, respectivamente.

De las 11 LPV (-); a las 6 horas, 9 redujeron en 3 log₁₀ UFC/mL el inóculo inicial y 2 lo disminuyeron en 2 log₁₀ UFC/mL en el mismo período (6 horas) (χ^2 : 6,13; p= 0,024).

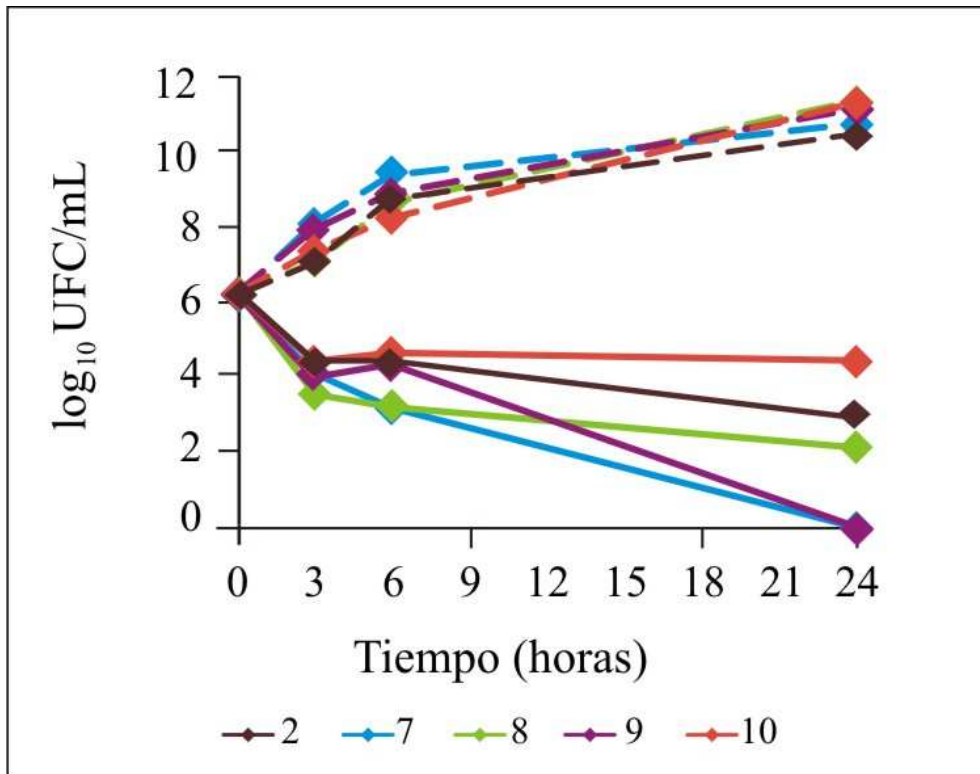


Figura V.5: Curvas de vida y de cinética de muerte de los 5 aislamientos de *S. aureus* con CBM/CIM de vancomicina ≥ 32 .

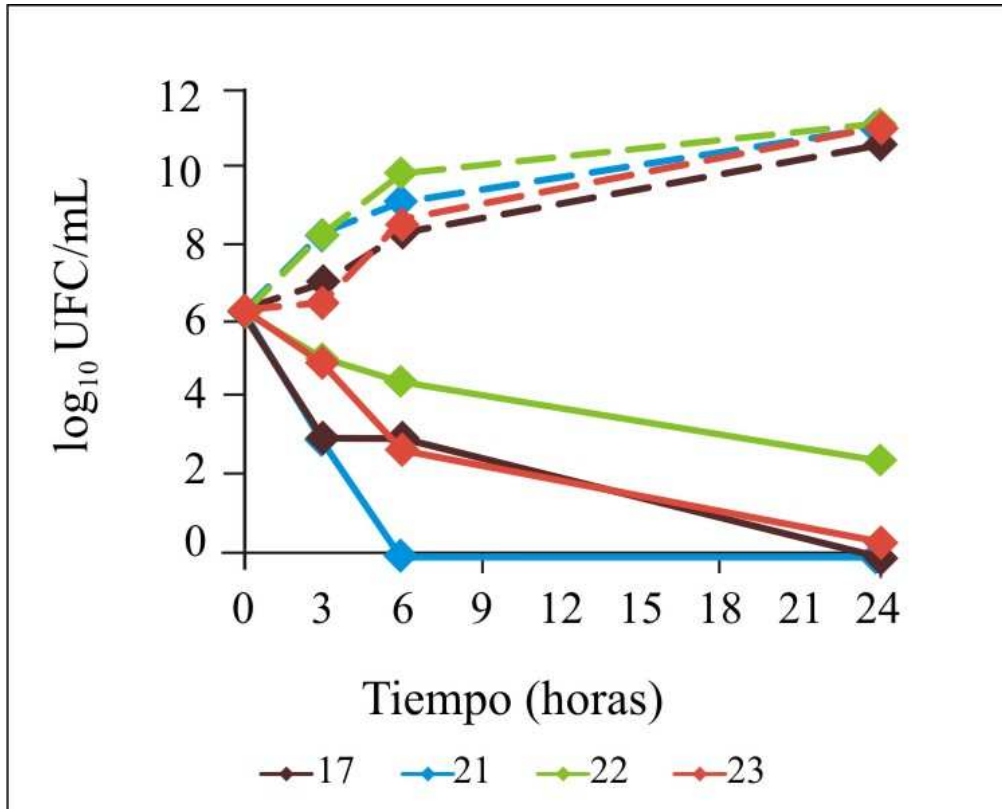


Figura V.6: Curvas de vida y de cinética de muerte de los 4 aislamientos de *S. aureus* con CBM/CIM de vancomicina igual a 16.

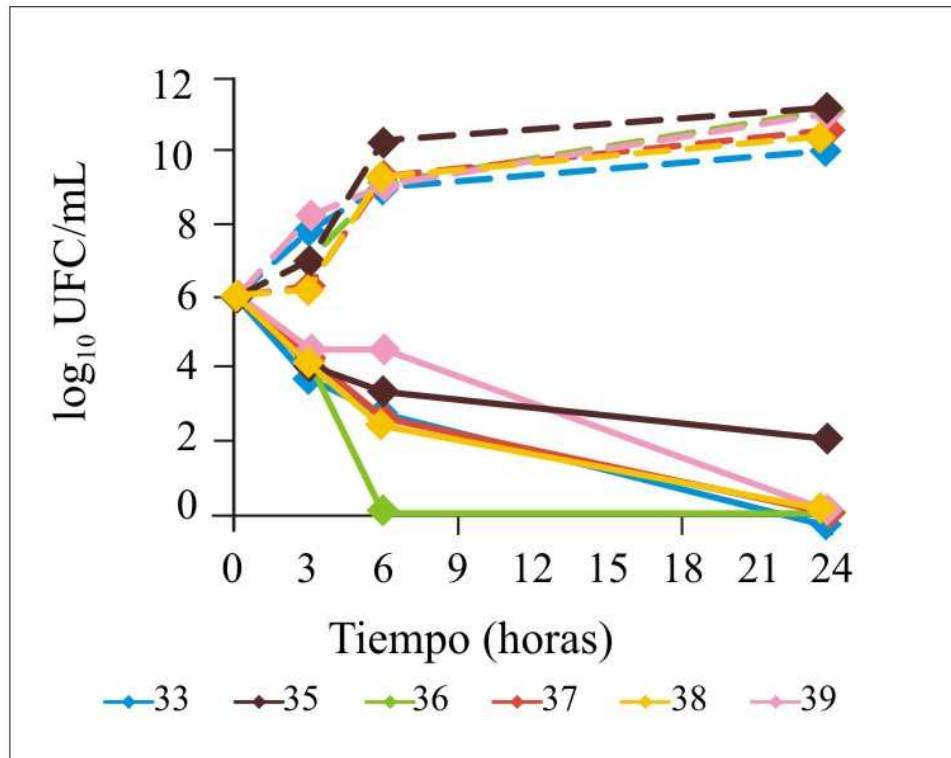


Figura V.7: Curva de vida y de cinética de muerte de los 6 aislamientos de *S. aureus* con una relación de CBM/CIM de vancomicina igual a 8 y no productores de LPV.

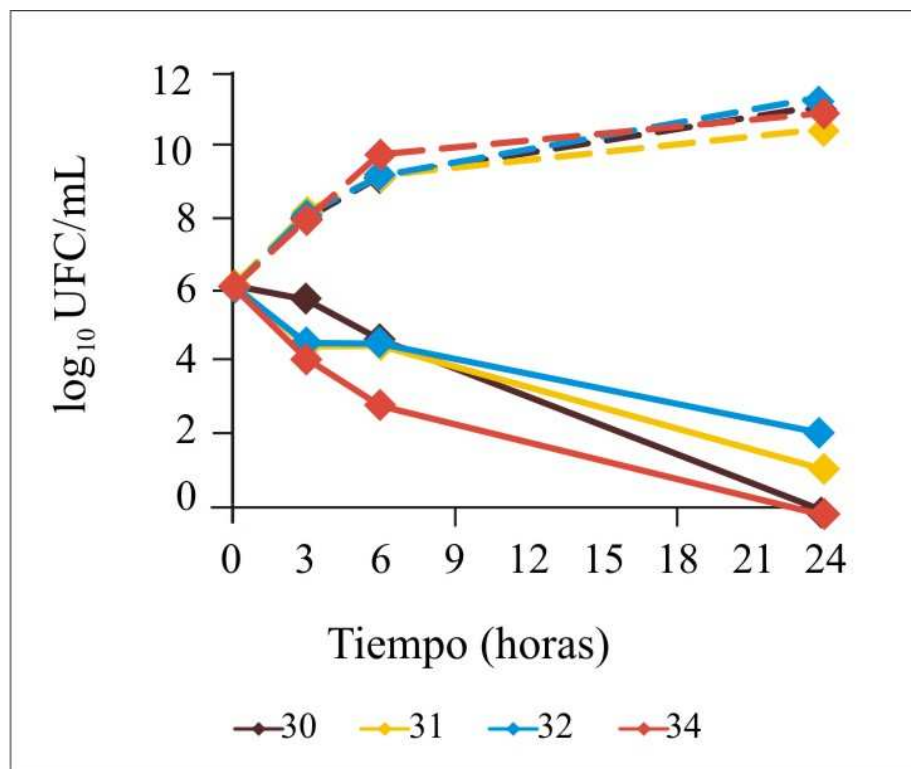


Figura V. 8: Curvas de vida y de cinética de muerte de los 4 aislamientos de *S. aureus* con una relación CBM/CIM de vancomicina igual a 8 y productores de LPV.

V.3.5. Discusión

Fridkin y col. (2005) en un estudio efectuado durante 2000-2001 sobre 2107 casos de infecciones por SAMR-AC informaron que estas representaban desde el 8 al 20% de todos los aislamientos SAMR según las áreas geográficas y eran en su mayoría provenientes de PPB.

Coincidentemente con otros autores; en el presente trabajo, de los 30 aislamientos ensayados, se observó que 25 provenían de PPB (Gorwitz, 2007; Larsen y col., 2009).

Según Gorwitz (2007) la LPV es un factor de virulencia de gran importancia en ciertos síndromes clínicos tales como neumonía y que contribuye a la patogenicidad de las infecciones de PPB o invasivas severas en personas previamente sanas. Este autor sugiere, al igual que Etienne (2005), que debería investigarse de manera rutinaria la presencia de LPV ya que dicha leucocidina es transmitida entre familiares y, sobre todo, en comunidades con mayor promiscuidad (Cristóbal y col., 2011).

La única cepa de este trabajo, procedente de una neumonía adquirida en la comunidad fue LPV (+) lo que concuerda con otros investigadores que encontraron una fuerte asociación entre *S. aureus* LPV (+) y neumonía necrotizante en adultos jóvenes inmunocompetentes (Balis y col., 2007; Méndez y col., 2009a).

En este trabajo de tesis se investigó la presencia de LPV en 30 aislamientos obtenidos de adultos sin FR. Los resultados obtenidos son coincidentes con los reportados por Fridkin y col. quienes sostienen que SAMR-AC no está asociado con FR, aún cuando la mayoría producen infecciones relevantes que requieren internación.

En el presente estudio, el 50% de las cepas portaron el factor LPV. Este hallazgo difiere de Valsesia y col. (2010) quienes informaron que el 28% portaba LPV en un estudio realizado durante 2007-2008 en un hospital escuela de Suiza Central y con el de Hamilton y col. (2007) que detectaron, sobre 29 SAMR-AC, 28 LPV (+).

Otros autores (Saïd-Salim y col., 2005) coinciden en señalar que las cepas que codifican LPV no se encuentran uniformemente distribuidas entre los SAMR-AC, como se demostró en este trabajo.

VAN ha sido la piedra angular de la terapia para infecciones severas desde los años 80 cuando SAMR emergió como un patógeno nosocomial importante en EEUU, y continúa siendo la terapia empírica de elección (Chambers, 2005).

Sin embargo, los fracasos en el tratamiento con VAN son comunes en las infecciones por SAMR aún con cepas sensibles ($CIM \leq 2 \mu\text{g/mL}$); por ello se consideró relevante determinar la actividad bactericida de este antimicrobiano frente a SAMR-AC (Sakoulas y Moellering, 2008).

En este trabajo se investigó la actividad bactericida *in vitro* de VAN frente a SAMR-AC y su relación con la producción del factor de virulencia LPV. Se demostró que no existe diferencia estadísticamente significativa en la distribución de cepas productoras de LPV en las poblaciones estudiadas ($\chi^2: 1.29$; $p = 0.25$), (Méndez y col., 2011).

Se encontraron 5 cepas cuya CBM/CIM fue ≥ 32 las que a menudo se definen como tolerantes pero al identificarlas por curvas de cinética de muerte, sólo una de ellas, resultó tolerante y LPV (-).

Habiendo analizado gran parte de la bibliografía disponible no se encontraron reportes de tolerancia a VAN en aislamientos SAMR-AC.

Respecto a la actividad bactericida de VAN se observó que las cepas portadoras de LPV mueren más lentamente que las LPV (-) ($\chi^2: 6,13$; $p = 0,024$).

V.3.6. Conclusiones

- La presencia de LPV en los aislamientos estudiados fue independiente de la relación CBM/CIM de VAN.
- Las cepas LPV (+) redujeron más lentamente el número de UFC/mL a las 6 horas cuando se realizaron estudios de cinética de muerte.
- Se demostró que la actividad bactericida de VAN en SAMR-AC fue efectiva en el 96% de los aislamientos, independientemente de la presencia del factor de virulencia estudiado.

CAPÍTULO VI

ESTUDIO DE SINERGIA DE ANTIMICROBIANOS FRENTE A SAMR TOLERANTES A VANCOMICINA DETECTADOS POR CINÉTICA DE MUERTE

VI.1. COMBINACIONES DE ANTIMICROBIANOS

VI.1.1. INTRODUCCIÓN

Las combinaciones de AM son usadas frecuentemente a los fines de tener una mejor cobertura empírica para pacientes graves o sépticos.

Menos común es la elección de combinaciones de AM cuando el agente patógeno es inhibido o muerto por dosis convencionales de un único AM, pero es más sensible a la acción de dos combinados.

En ambos casos la mejora clínica depende de las interacciones entre ambos, frente al microorganismo (Pillai, 2005).

VI.1.1.1. Consideraciones sobre combinaciones de AM

Hay diferentes razones para seleccionar un tratamiento combinado de AM.

VI.1.1.1.1. Disminución de emergencia de cepas resistentes

A veces la combinación de dos AM es usada para disminuir la emergencia de subpoblaciones resistentes de un patógeno. Con el uso de dos o más agentes contra los cuales la bacteria desarrolla resistencia por diferentes mecanismos, la probabilidad de que las colonias emerjan como resistentes a todos los AM usados, es teóricamente muy baja.

A modo de ejemplo, en el tratamiento de la tuberculosis donde se usan simultáneamente múltiples drogas, se reduce claramente el riesgo de la aparición de la resistencia intra-tratamiento. Esto es relevante también en combinaciones de AM con rifampicina (RFA), ya que se trata de un AM al cual las bacterias desarrollan rápidamente resistencia. Las combinaciones de VAN con RFA son utilizadas exitosamente en endocarditis de pacientes con válvula protésica y en casos de espondilodiscitis u osteomielitis.

Aunque el uso de tales combinaciones parece suprimir la emergencia de resistencia a RFA se han descrito algunos fracasos asociados al desarrollo de aislamientos resistentes (Hassoun, 2007).

Esto puede deberse a la emergencia de clones resistentes en el foco de la infección donde puede haber diferente penetración de la droga. De igual manera, la combinación de OXA con RFA evita la emergencia de poblaciones de *S. aureus* resistentes a esta última a pesar de que en realidad la RFA puede ser antagonista *in vitro* con la actividad bactericida de los betalactámicos (Dumitrescu y col., 2008).

VI.1.1.1.2. Disminución de la toxicidad relacionada a la droga como resultado del uso de dosis reducida

Algunos AM clínicamente importantes tienen una significativa toxicidad relacionada a la dosis lo que limita su uso, por ejemplo: cloranfenicol, 5-fluorocitosina, aminoglucósidos (AG) y sulfonamidas. Existen criterios teóricos que sugieren reducir la dosis de la droga potencialmente tóxica adicionando un agente que asegure éxito terapéutico. Este enfoque se basa en datos previos de uso de combinaciones de sulfonamidas para reducir la formación de cristales y de cálculos. Esto es un hecho histórico. Actualmente no existen combinaciones de AM específicamente diseñadas para reducir la toxicidad sin comprometer la actividad de los mismos. El enfoque más reciente ha sido desarrollar AM con perfiles de seguridad superiores que pueden, en muchos casos, sustituir agentes más viejos y más tóxicos (Mohr, 2008).

VI.1.1.1.3. Infecciones polimicrobianas

Otro uso interesante para combinaciones de AM es el tratamiento de infecciones polimicrobianas o mixtas documentadas, para las cuales es necesario que los AM estén dirigidos a diferentes puntos de acción. Por ejemplo, en la peritonitis, se deben usar asociaciones de AM efectivos frente a enterobacterias y anaerobios. Aunque estas combinaciones son frecuentemente utilizadas, actualmente existen AM como los nuevos betalactámicos, carbapenemes o betalactámicos más inhibidores que tienen un amplio espectro de acción (Talaie y col., 2008).

VI.1.1.1.4. Sinergismo antimicrobiano

Las combinaciones de AM fueron usadas en los primeros tiempos de la era antibiótica cuando se observó que no todas las infecciones respondían con penicilina, sulfonamida o estreptomina utilizadas como monodrogas. A pesar del empirismo, algunas de estas experiencias fueron útiles tales como la acción bactericida demostrada con la asociación de penicilina más estreptomina contra *Enterococcus* sp. (Jawetz y col., 1950). Este uso de combinaciones de AM logra una eficacia clínica y bactericida que continúa teniendo gran relevancia (Pillai, 2005).

Actualmente existen numerosas publicaciones que demuestran el importante rol del sinergismo AM en el tratamiento de las infecciones por bacterias gram-positivas y negativas. Sin embargo, si bien existe una buena documentación sobre la combinación bactericida sinérgica de penicilina más AG o combinaciones tales como trimetoprimasulfametoxazol (TMS) en determinadas circunstancias, no hay documentación *in vitro* que asegure que las combinaciones logren mejor eficacia clínica (Zhanel y col., 2008).

Otros autores expresan que no se sabe si la acción bactericida se debe a la actividad bactericida de las combinaciones o porque se logra mayor concentración sérica. El estímulo para estudiar las interacciones de AM radica en que algunas pueden tener efectos antagonistas. Varias fueron descritas a lo largo del tiempo pero las más recientes son las interacciones entre dos betalactámicos usados contra gram-negativos productores de betalactamasas inducibles, mediadas cromosómicamente. Basado en estos hechos resulta útil confirmar las interacciones sinérgicas entre dos AM contra un agente infectante o para excluir acciones antagonistas (Muller-Serieys y col., 2009).

VI.1.1.1.5. Definiciones de interacciones de AM in vitro

A pesar de los métodos experimentales y los criterios usados para definir cualitativamente los resultados de las combinaciones AM existe un acuerdo general acerca de las definiciones cualitativas de sinergismo y antagonismo.

Sinergismo es una interacción positiva en la que el efecto combinado de las drogas es superior a la acción de cada una de ellas independientemente. El **antagonismo** es una interacción negativa ya que el efecto combinado es significativamente menor que los efectos independientes cuando son ensayadas por separado. Muchos de los problemas involucrados en el ensayo de la combinación de AM son los que arrojan un resultado incierto y aquellos en los que no hay interacción entre ellos resultando en lo que se llama **aditividad, indiferencia o autonomía**. La aditividad es la base del método de tablero de damas y asume que el resultado obtenido con más de una droga debe ser la suma de los efectos de cada una cuando actúan por separado. En la autonomía o indiferencia se asume que no interactúan una con otra sino que se logra el efecto de la más activa (Tan y col., 2010).

VI.1.1.2. Actividad de combinaciones de antimicrobianos: métodos de laboratorio

VI.1.1.2.1. Métodos de difusión

Se han explorado una variedad de métodos de difusión con discos, para determinar las interacciones entre AM, siendo estos cualitativos.

VI.1.1.2.1.1. *Técnica de discos*

La ventaja de esta técnica es que se utiliza agar MH y discos comerciales, embebidos en los distintos AM.

Se realiza siguiendo las normas del método de difusión con discos estandarizados por CLSI (CLSI, 2009b). Los discos que tienen el AM A y el AM B se ubican en la placa que ha sido inoculada con la bacteria a estudiar. La distancia entre los discos puede variar, pero debe ser igual o ligeramente mayor a la suma de los radios del halo de inhibición de cada una de las drogas a estudiar. Luego de 16 a 18 - 24 horas de incubación (dependiendo de la bacteria), a 35°C, se examinan las placas.

VI.1.1.2.1.1.1. *Interpretación de los resultados*

El patrón en el que se observan dos zonas de inhibición independientes una de la otra, se considera combinación **aditiva o indiferente**. (Figura VI.1).



Figura VI.1: Efecto aditivo o indiferente entre dos discos de AM.

OXA: oxacilina; **FOX:** cefoxitina. Prueba de difusión de SAMR con discos de OXA y FOX donde se observa que cada disco tiene una inhibición independiente del otro.

Cuando se observa un agrandamiento o un puente cerca de la unión de los halos de inhibición de los dos discos se considera combinación **sinérgica**. Ninguna de las dos drogas ensayadas por separado produce halo de inhibición y se observa una zona de inhibición entre ellos. (Figura VI.2)



Figura VI.2: Sinergia entre meropenem, imipenem y ácido etilendiaminotetraacético

IMI: imipenem; **MER:** meropenem; **EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético.

Se muestra un antibiograma por el método de difusión con discos, de un bacilo gram-negativo. Se observa **sinergia** (agrandamiento en la unión de las zonas de inhibición de ambos discos) entre IMI y EDTA (derecha). Una situación especial en la cual esta técnica puede ser importante (arriba-izquierda) es cuando se observa que los discos de MER y EDTA no producen halos por sí solos, pero se ve agrandamiento de la inhibición de MER cerca de EDTA.

La combinación **antagonista** se obtiene cuando existe inhibición cerca de la unión del halo que forman cada uno de los discos.

VI.1.1.2.1.2. Técnica con tiras**VI.1.1.2.1.2.1. Tiras de papel**

Primeramente fueron utilizadas tiras de papel de filtro embebidas en los distintos AM a ensayar y se colocaban en ángulo recto sobre una placa de agar. Luego de una incubación de 24 horas a 35°C se observaba la unión de ambas tiras. (Figura VI.3).

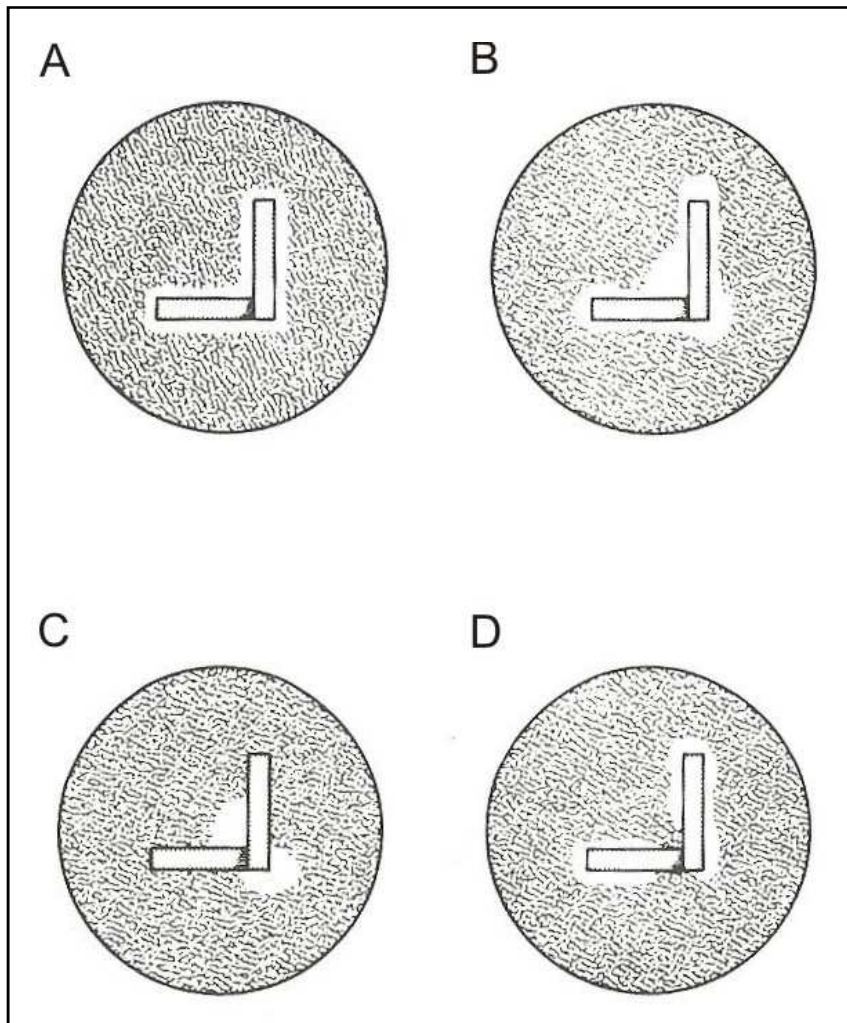


Figura VI.3: Ensayo de combinaciones de AM usando tiras de papel embebidas en soluciones de AM preparadas en el laboratorio. A: efecto aditivo (o indiferente); B y C: sinergia; D: antagonismo (Extraído de Pillai, 2005, p. 378).

VI.1.1.2.1.2.2. *Tiras comerciales*

Recientemente se intentaron realizar estas técnicas con las tiras preparadas comercialmente con un gradiente de concentración de AM (Epsilometer Etest, AB Biodisk; Solna, Suecia), (Tan y col., 2010). Esta técnica se muestra en la Figura VI.4.

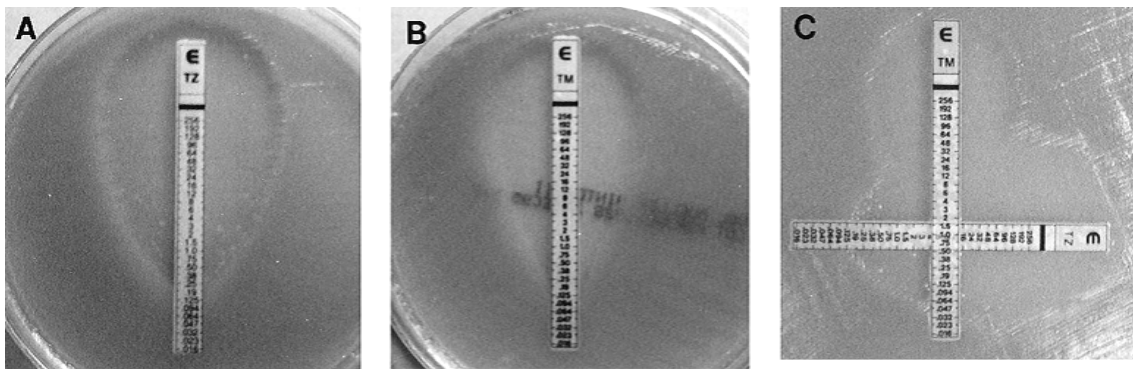


Figura VI.4: Efecto sinérgico entre un betalactámico y un aminoglucósido con una cepa control. Método epsilométrico **A:** tira con betalactámico; **B:** tira con aminoglucósido; **C:** sinergia entre ambos AM.

VI.1.1.2.1.3. Series en “tablero de damas”

Se trata de un método que ha sido frecuentemente usado para estudiar combinación de AM *in vitro*, debido a varias razones:

- es fácil de entender,
- el análisis matemático necesario para su cálculo es simple,
- puede ser realizado en los laboratorios de microbiología usando equipamiento ya disponible ,
- ha sido la técnica más usada para sugerir terapias sinérgicas en el tratamiento de pacientes neutropénicos con septicemia por gram-negativos.

El término “tablero de damas” refiere al modelo (de tubos, pocillos o placas de agar) formadas por múltiples diluciones de los dos AM ensayados, en concentraciones iguales, por debajo o por encima de la CIM según el microorganismo en estudio. Este método fue estandarizado por NCCLS en el año 1993 (NCCLS, 1993).

Las concentraciones ensayadas para cada AM varían desde 4 a 5 diluciones debajo de la CIM a 2 veces la CIM esperada (o mayor si se sospecha antagonismo); usando

diluciones al medio de cada AM. Además se incluye una columna donde se colocan cada uno de los AM como controles.

Por lo tanto, el tablero de damas consiste en dos columnas una vertical y la otra horizontal. En cada una de ellas el tubo (o pocillo o placa) contiene la misma cantidad de AM (AM A) diluida horizontalmente y la columna con el AM B diluido verticalmente. El resultado de cada tubo (pocillo o placa) contiene una única combinación de las dos drogas ensayadas.

La definición del punto final se realiza luego de una incubación a 35°C de 16 o 20 horas según la bacteria ensayada. Los datos bactericidas se obtienen si en los tubos sin crecimiento visible se demuestra que se ha producido la muerte del 99,9 % del inóculo inicial (Tan y col., 2010).

- Límites de la técnica

Excepto que cada tubo sea pasado a medios sólidos, la observación macroscópica muestra capacidad inhibitoria. Esta pérdida de datos bactericidas puede ser una importante limitación debido a que las bacterias sometidas a estos ensayos provienen de pacientes con infecciones graves (endocarditis, meningitis, osteomielitis, etc).

Otra limitación es que al ser examinados los resultados en un punto final, este método provee una interacción AM estática más que dinámica. No obstante, es una técnica fácil aunque con las limitaciones descritas; en la actualidad, fue reemplazada por las técnicas de cinética de muerte.

VI.1.1.2.1.4. Estudios de cinética de muerte

En contraste con el tablero de damas, las curvas de cinética de muerte miden la actividad microbicida. Por esta razón, son más relevantes para situaciones clínicas en la cual se necesita una terapia bactericida combinada.

Otra ventaja es que puede proveer información dinámica e interacción con el transcurso del tiempo porque se realizan recuentos de UFC a distintos intervalos. Debido a que se utiliza con una determinada concentración de AM, ésta debe ser cuidadosamente seleccionada.

Para el desarrollo de este trabajo de tesis, se utilizó esta técnica.

VI.1.1.2.1.4.1. *Interpretación de los resultados*

La actividad de ambos AM se definió como sinergia, aditividad o antagonismo según los criterios explicados (Lin y col., 2010).

Aplicando las curvas de cinética de muerte la **sinergia** se obtiene cuando, luego de 24 horas de incubación, el recuento se reduce en $\geq 2 \log_{10}$ UFC/mL en presencia de los dos antimicrobianos, respecto al AM más activo.

Se dice que hay **antagonismo** cuando el recuento a las 24 horas es $\leq 2 \log_{10}$ UFC/mL del inóculo inicial con la combinación de los 2 AM, comparado a la muerte bacteriana resultante del AM más activo (Leonard y col. 2008).

VI.1.2. OBJETIVOS

- Determinar la concentración inhibitoria mínima de diferentes AM de uso clínico: ciprofloxacina, rifampicina, gentamicina e imipenem, frente a los aislamientos SAMR tolerantes a vancomicina.
- Investigar el efecto sinérgico de la combinación de vancomicina con las drogas antes ensayadas.

VI.1.3. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1.3.1. Aislamientos bacterianos

Se seleccionaron los 4 aislamientos SAMR tolerantes a vancomicina determinados por técnicas de cinética de muerte (SAMR 6, 10, 11 y 12).

VI.1.3.2. Pruebas de sensibilidad

VI.1.3.2.1. Concentración inhibitoria mínima

VI.1.3.2.1.1. *Solución de antibiótico*

Se determinó la CIM de ciprofloxacina (CIP) (Lab. Roemmers), rifampicina (RFA) (Novartis Argentina), gentamicina (GEN) (Lab. Larjan) e imipenem (IMI) (Merck & Co., Inc).

Las concentraciones mínima y máxima ensayadas de cada uno de ellos fueron:

- CIP: 0,06 a 8 µg/mL
- RFA: 0,25 a 8 µg/mL
- GEN: 0,5 a 32 µg/mL
- IMI: 0,06 a 32 µg/mL

Se partió de soluciones de trabajo con una concentración de cada AM igual a 4 veces la concentración máxima ensayada.

VI.1.3.2.1.2. *Inóculo*

Se partió de un cultivo puro de 24 horas de incubación, se tomaron varias colonias hasta lograr una turbidez igual a la escala 0,5 McFarland (10^8 UFC/mL). Se tomó 100 µL de este tubo y se lo llevó a 9,9 mL de caldo Müeller-Hinton, obteniéndose el inóculo de trabajo (10^6 UFC/mL).

VI.1.3.2.1.3. CIM

Se determinó por la técnica de macrodilución en caldo Müeller-Hinton (Difco Culture Media) con pH controlado según normas CLSI (CLSI, 2009a). Se realizaron diluciones sucesivas al medio del AM y se adicionó un volumen fijo de inóculo incubándose 24 horas a 35° C. Se prepararon tubos controles: Control de caldo (sólo caldo Müeller-Hinton), control antibiótico (caldo más solución de antibiótico) y control de inóculo (caldo más inóculo). Se procedió de igual manera que para la determinación de las CIMs de cefalotina y vancomicina.

VI.1.3.2.1.4. Cepa control

Se utilizó *S. aureus* ATCC 29213. Se procedió de igual manera que para las incógnitas, realizando diluciones del AM según el ATB ensayado, en el intervalo:

- CIP: 0,004 – 0,016 µg/mL
- RFA: 0,004 – 0,016 µg/mL
- GEN: 0,12 – 1 µg/mL
- IMI: 0,015 – 0,06 µg/mL

Se partió de una solución de trabajo de AM con una concentración igual a 4 veces la concentración más alta.

VI.1.3.2.1.5. Lectura e interpretación de la CIM

Luego de 24 horas de incubación a 35° C se observaron primero, los tubos controles y luego las incógnitas.

Interpretación de los resultados.

Control de caldo: Límpido.

Control de antibiótico: Límpido

Control de inóculo: Turbio

CIM: mínima concentración de antibiótico en el que el tubo correspondiente se observó macroscópicamente límpido.

VI.1.3.2.2. Determinación de la combinación de los AM por curva de cinética de muerte o de letalidad

VI.1.3.2.2.1. Aislamientos bacterianos

Para cada uno de los aislamientos SAMR tolerantes a vancomicina, se partió de un cultivo de 24 horas.

VI.1.3.2.2.2. Inóculo

Se preparó un inóculo 0,5 McFarland de cada uno de los aislamientos y se procedió según la figura VI.5.

VI.1.3.2.2.3. Recuento de UFC/mL del inóculo inicial

Se realizaron diluciones decimales sucesivas, se tomaron 100 μ L de cada una de ellas, se repicaron sobre agar MH y se incubaron 24 horas a 35°C. Se efectuaron los recuentos microbiológicos de cada una de ellas y se obtuvo el promedio para determinar el número de UFC/mL iniciales. Esto se consideró tiempo cero (t_0), (Figura VI.5)

VI.1.3.2.2.4. Preparación de las soluciones de antibiótico

Se partió de una dilución original de cada antibiótico igual a 4000 veces la CIM de cada microorganismo para ese AM. Se realizaron diluciones sucesivas hasta llegar a una concentración final igual a 4 veces la CIM de cada SAMR (NCCLS, 1999b).

VI.1.3.2.2.5. Curvas para determinar actividad de combinación de antibióticos mediante cinética de muerte o de letalidad

Se prepararon cuatro tubos con caldo Müller-Hinton:

1) Curva de vida (CV): Se agregó al tubo con 9,9 mL de caldo MH sólo 100 μ L de inóculo de trabajo.

2) Curva de muerte (CM): A dos tubos con 9,8 mL de caldo MH, se les agregó 100 µL de cada antibiótico a una concentración 4 veces la CIM. Se realizó un tercer tubo con 9,7 mL de caldo MH y se le agregó 100 µL de cada uno de los dos AM a ensayar. A todos ellos se les agregó 100 µL del tubo con inóculo $5 \cdot 10^7$ UFC/mL.

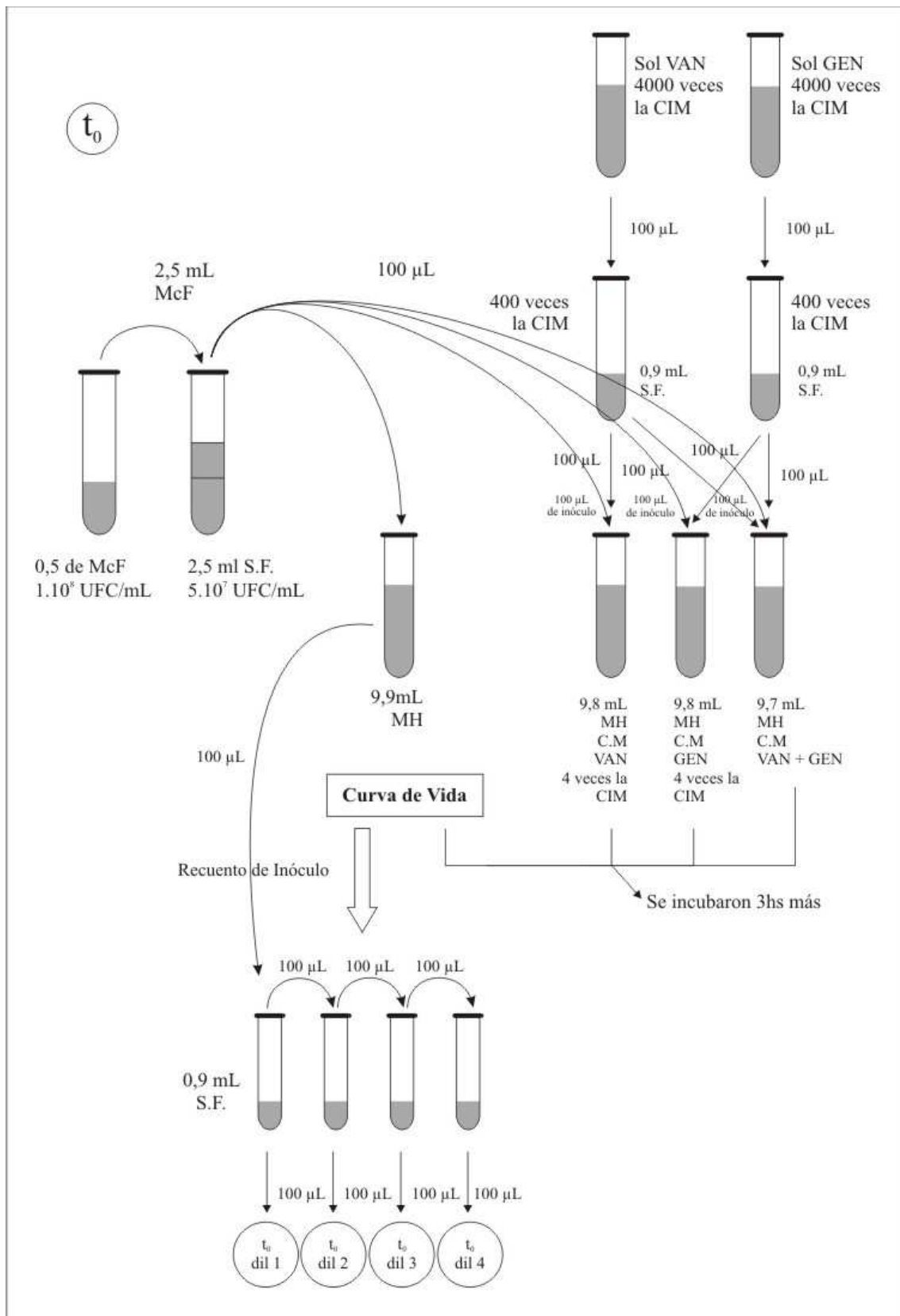


Figura VI.5: Técnica para determinar actividad combinada de AM.

(Se ejemplifica el caso de combinación vancomicina más gentamicina). t_0 : tiempo 0; mL: mililitro; McF: escala de turbidez Mc Farland; UFC: unidades formadoras de colonias; S.F.: solución fisiológica; MH: Müeller-Hinton; μL : microlitro; VAN: vancomicina; GEN: gentamicina; CIM: concentración inhibitoria mínima; C.M.: curva de muerte; dil: dilución.

Se realizaron recuentos a las 0, 3, 6 y 24 horas de cada uno de los 4 tubos (uno CV y tres tubos CM). A cada tiempo se realizaron diluciones sucesivas y se obtuvieron recuentos de inóculo tanto del tubo de curva de vida como de los de cinética de muerte (Figura VI.6). El volumen depositado en cada placa se dispersó en la misma con una espátula de Digrafsky.

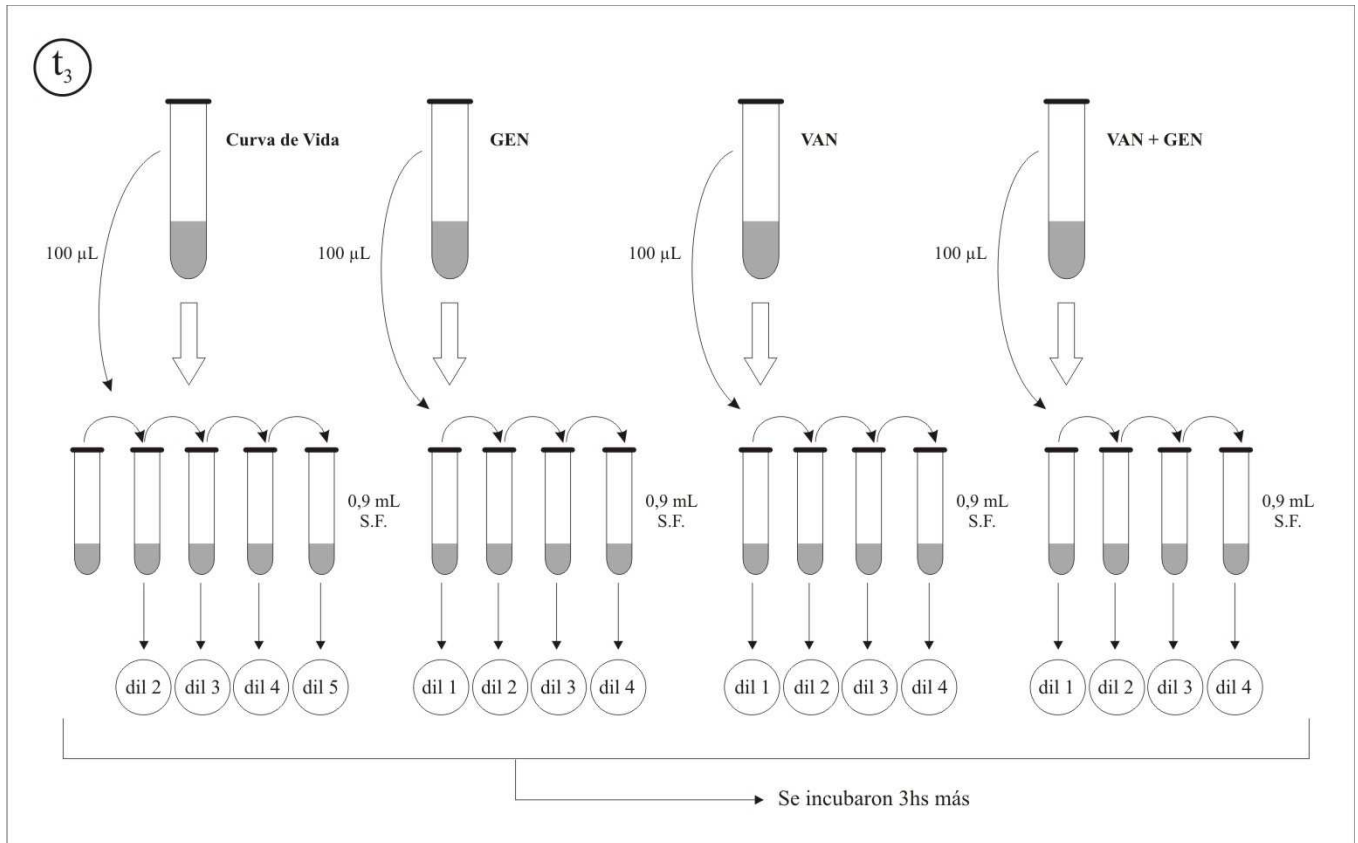


Figura VI.6: Técnica de detección de combinación antimicrobiana y recuento de UFC/mL a las 3, 6 y 24 horas de incubación a 35°C.

t_3 : tiempo (3 horas); GEN: gentamicina; VAN: vancomicina; mL: mililitro; µL: microlitro; dil: dilución; S.F: solución fisiológica; t_6 : tiempo (6 horas); t_{24} : tiempo (24 horas).

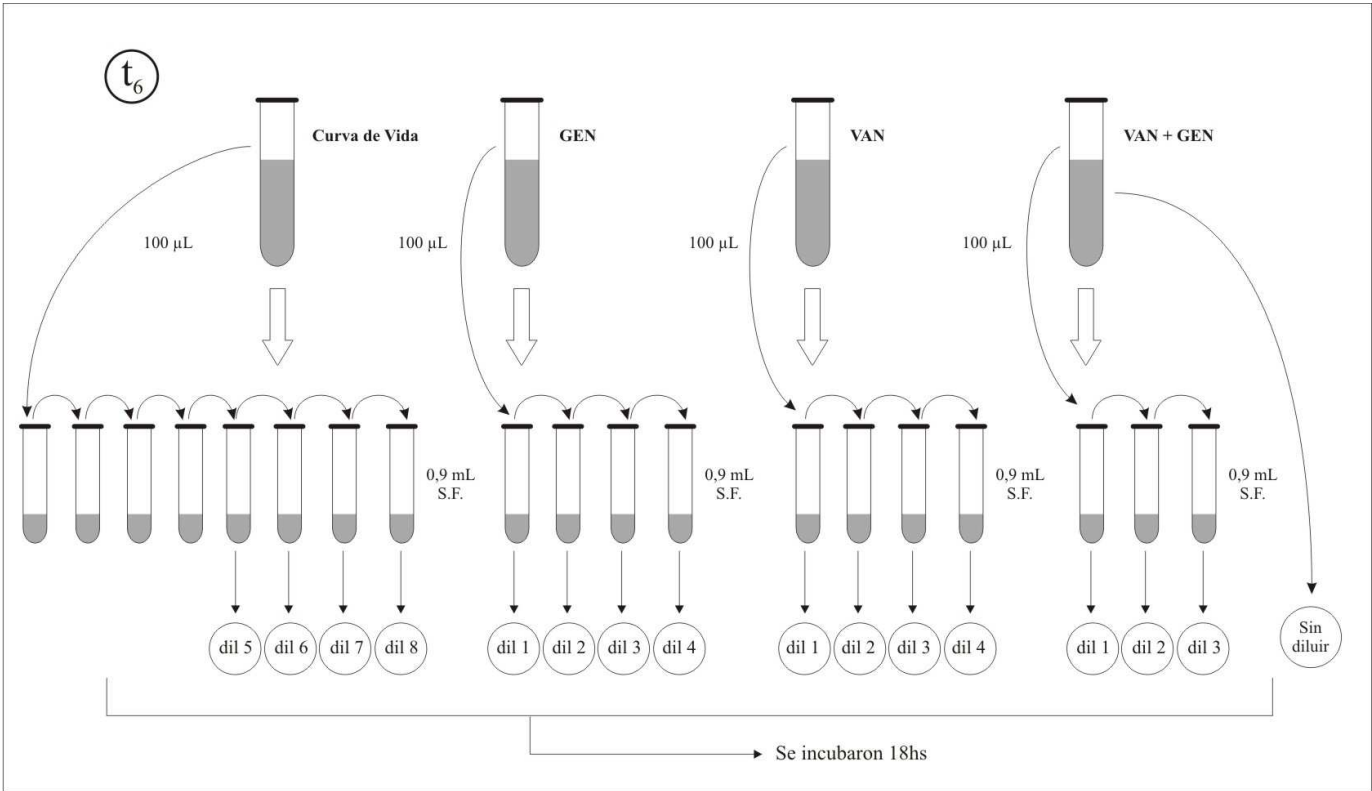


Figura VI.6: Técnica de detección de combinación antimicrobiana y recuento de UFC/mL a las 3, 6 y 24 horas de incubación a 35°C. (Cont.).

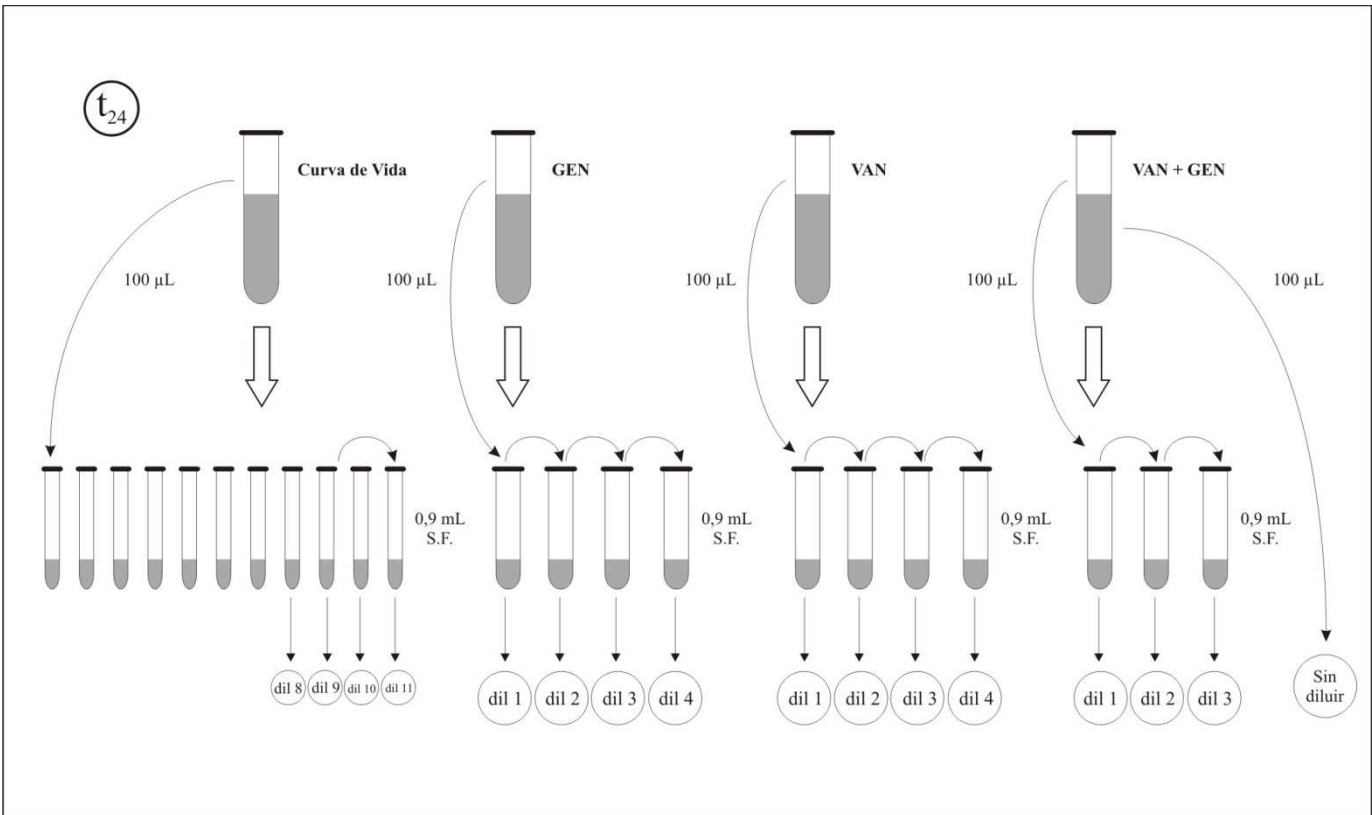


Figura VI.6: Técnica de detección de combinación antimicrobiana y recuento de UFC/mL a las 3, 6 y 24 horas de incubación a 35°C. (Cont.).

VI.1.3.2.2.6. Interpretación de resultados

Se consideró **sinergia** cuando a las 24 horas de incubación el recuento de colonias del tubo de CM con los dos AM resultó $\leq 2 \log_{10}$ UFC/mL respecto del correspondiente al AM que disminuyó mayor cantidad de UFC/mL en el mismo tiempo.

Se categorizó **antagonismo** cuando el recuento de colonias a las 24 horas fue $\geq 2 \log_{10}$ UFC/mL del recuento original de los dos AM juntos que por separado (Leonard y col., 2008).

VI.1.4. RESULTADOS

Las CIMs de los distintos AM, obtenidas para cada uno de los aislamientos SAMR tolerantes a VAN estudiados y los valores de punto de corte según CLSI se muestran en la tabla VI.1.

Todos los aislamientos resultaron sensibles a los AM ensayados según la CIM de cada uno de ellos.

Tabla VI.1: CIMs (expresadas en $\mu\text{g/mL}$) para cada uno de los aislamientos frente a los diferentes AM ensayados. Se muestran además los puntos de corte (PC) según CLSI. (CLSI, 2009a)

Aislamiento	CIM ($\mu\text{g/mL}$)				
	CIP	RFA	GEN	IMI	VAN
SAMR 6	0,12	1	4	0,25	0,25
SAMR 10	0,12	1	2	0,12	0,5
SAMR 11	0,25	0,5	1	0,25	1
SAMR 12	0,25	0,5	2	0,25	0,25
PC – CLSI	S<1;R>4	S \leq 1; R>4	S<4; R<16	S<4;R>16	S<2;R>16

SAMR: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente; **CIP:** ciprofloxacina; **RFA:** rifampicina; **GEN:** gentamicina; **IMI:** imipenem; **VAN:** vancomicina; **PC:** punto de corte; **CLSI:** Clinical Laboratory Standards Institute; **S:** sensible; **R:** resistente.

En las figuras VI.7 a VI.22 se observan las curvas de cinética de muerte de VAN, la de los AM ensayados y la combinación de cada uno de ellos para los aislamientos SAMR 6, 10, 11 y 12.

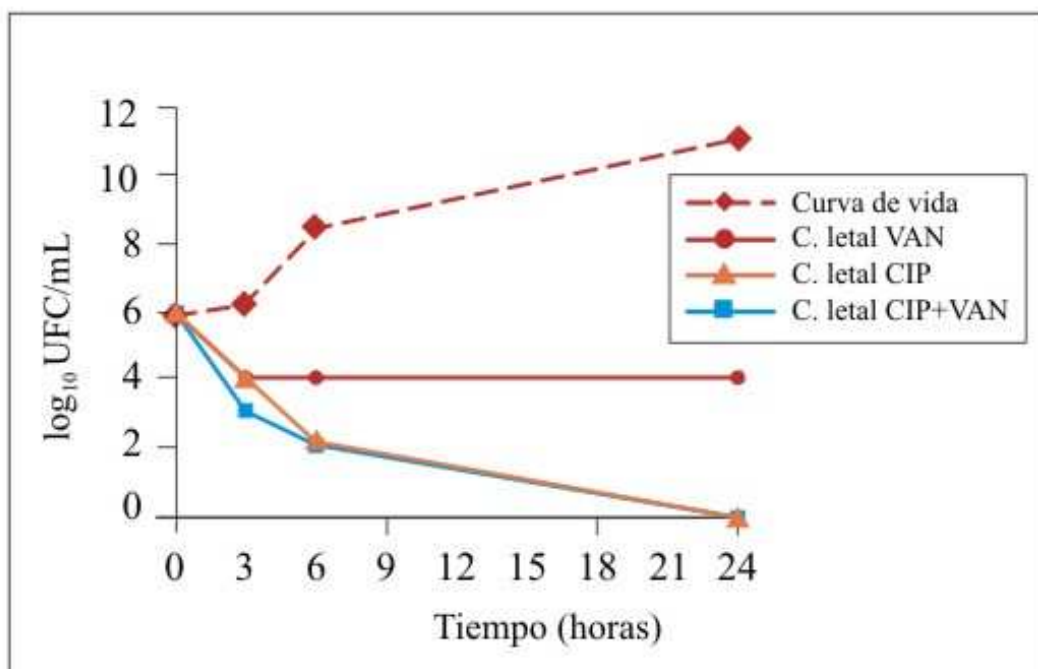


Figura VI.7: Curvas de cinética de muerte de VAN(1 µg/mL), CIP (0,5 µg/mL) y la combinación de ambos AM frente a SAMR 6.

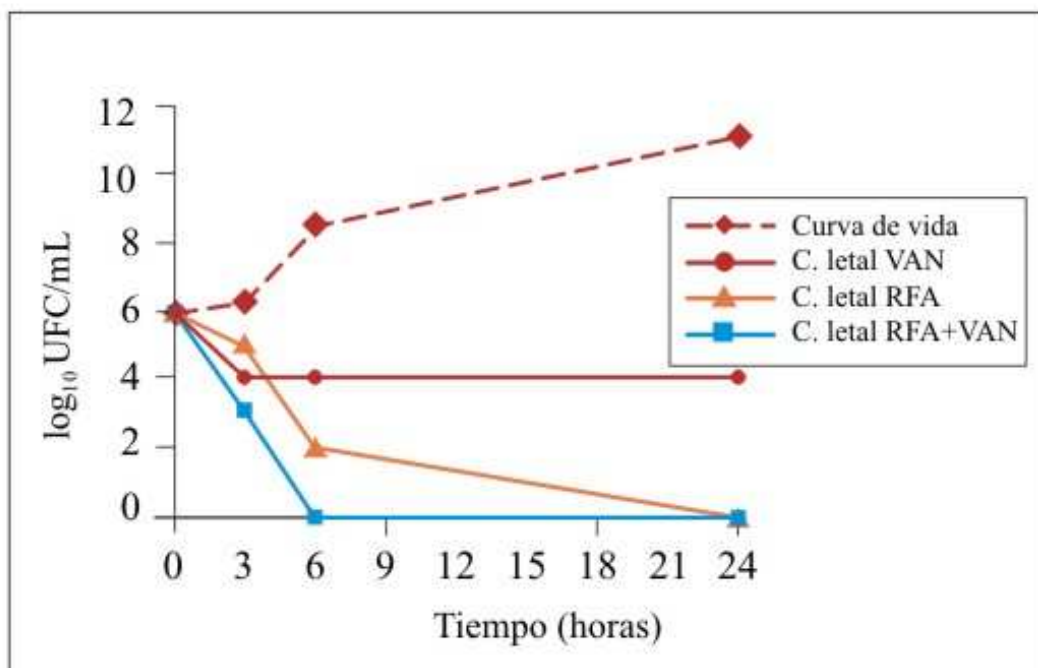


Figura VI.8: Curvas de cinética de muerte de VAN(1 µg/mL), RFA (4 µg/mL) y la combinación de ambos AM frente a SAMR 6.

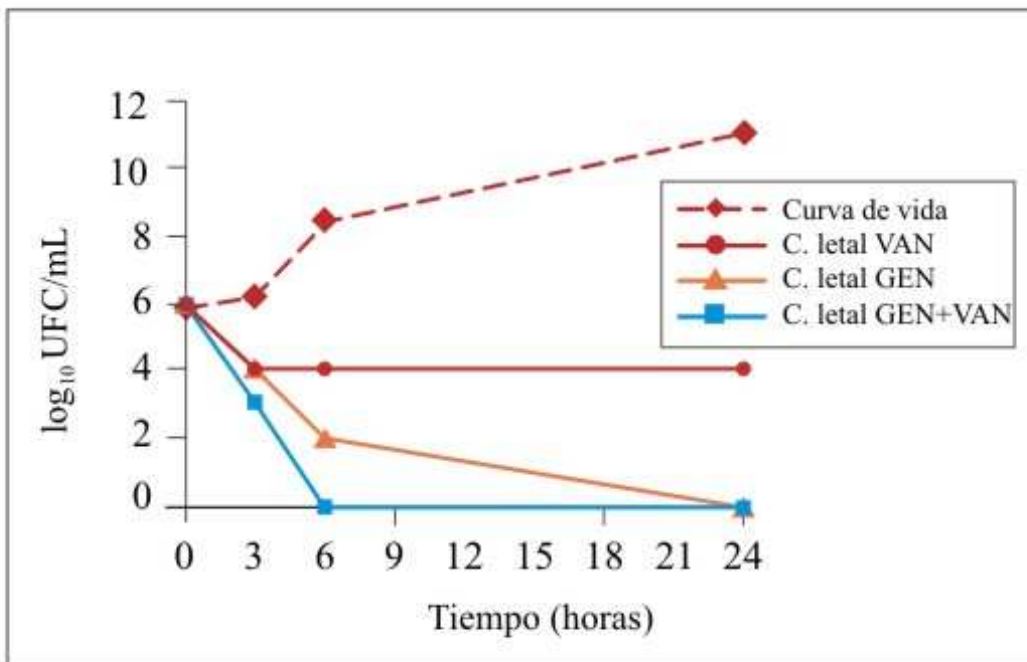


Figura VI.9: Curvas de cinética de muerte de VAN(1 µg/mL), GEN (16 µg/mL) y la combinación de ambos AM frente a SAMR 6.

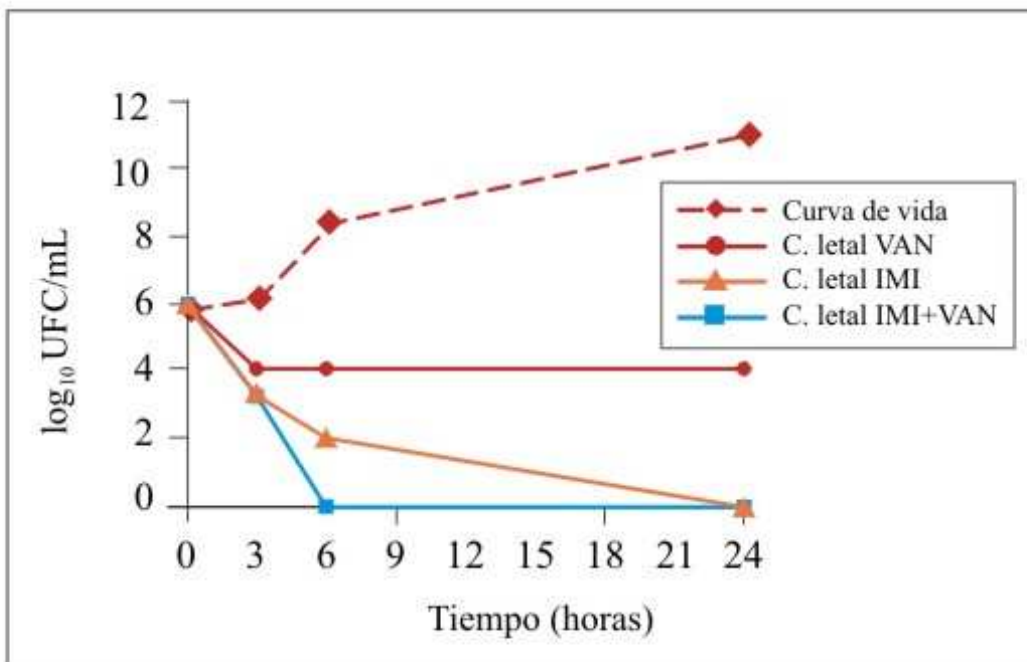


Figura VI.10: Curvas de cinética de muerte de VAN(1 µg/mL), IMI (1 µg/mL) y la combinación de ambos AM frente a SAMR 6.

Si se analiza **SAMR 6** (figuras VI.7, VI.8, VI.9 y VI.10) se ve que todos los AM ensayados, por sí solos tuvieron efecto bactericida (reducción en $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL del inóculo inicial). Obsérvese la bactericidia de IMI. En cuanto a la sinergia se observó que ya a las 6 horas hubo reducción total del inóculo con las combinaciones VAN+GEN, VAN+RFA y VAN+IMI hecho que no se logró con cada uno de los AM ensayados por separado. VAN asociado a CIP, recién logró a las 24 horas, reducir a cero el inóculo inicial. Si se tiene en cuenta el criterio de sinergia; GEN, RFA e IMI lograron aisladamente, la reducción establecida para este criterio a las 24 horas; pero lo que se puede asegurar que la bactericidia resultó más rápida con ambos AM que con cada uno por separado.

No hubo efecto antagonista con ninguna de las combinaciones estudiadas.

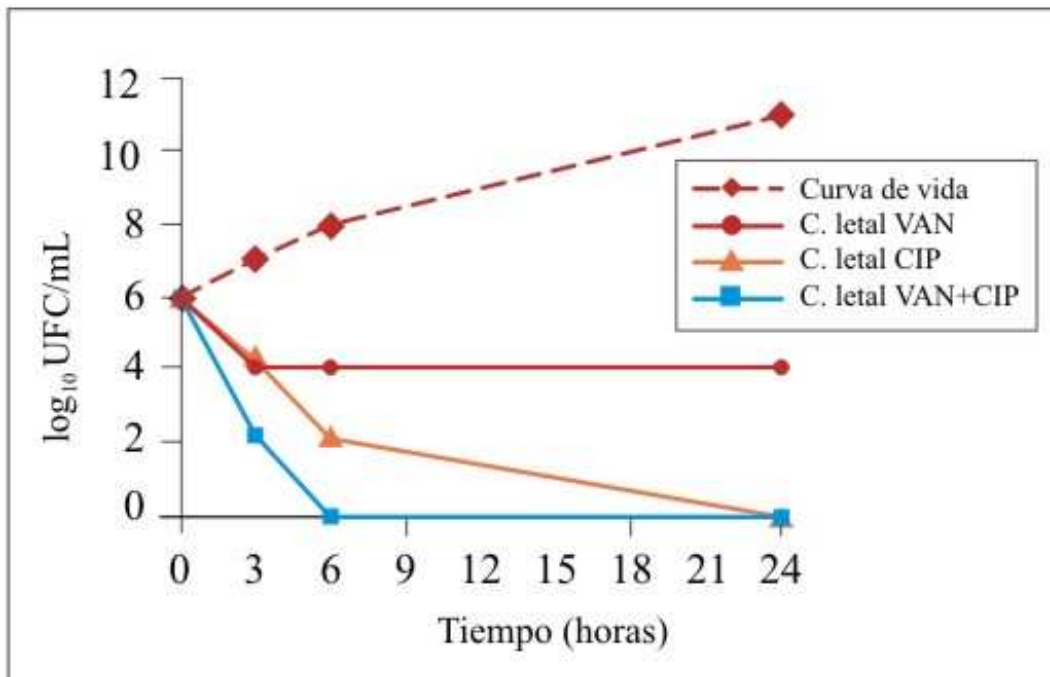


Figura VI.11: Curvas de cinética de muerte de VAN(2 µg/mL), CIP (0.5 µg/mL) y la combinación de ambos AM frente a SAMR 10.

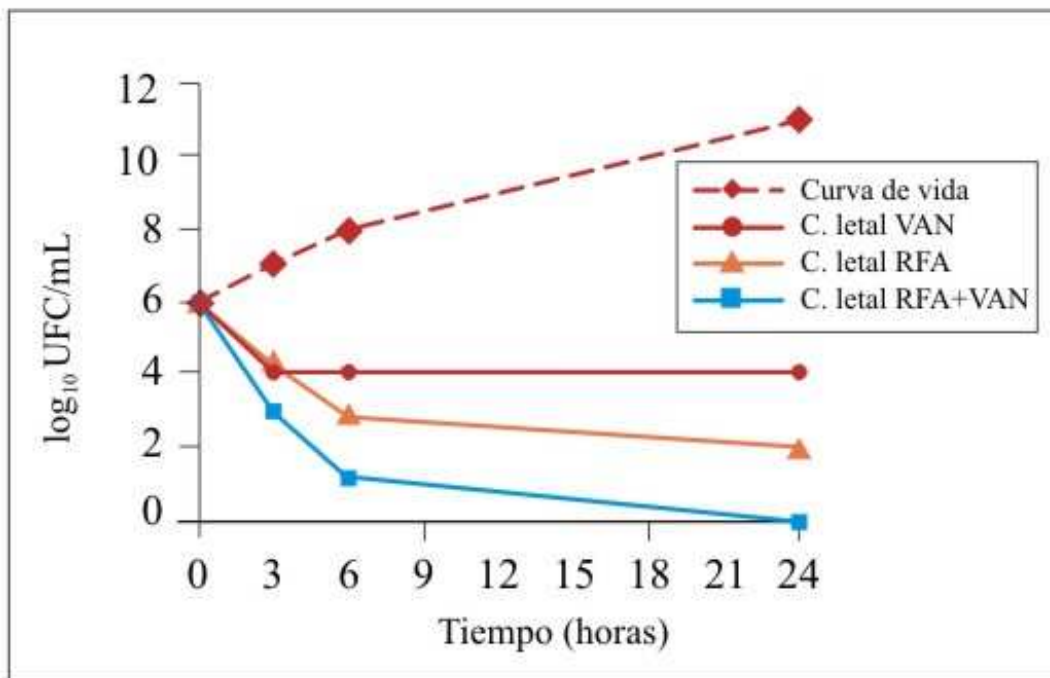


Figura VI.12: Curvas de cinética de muerte de VAN(2 µg/mL), RFA (4 µg/mL) y la combinación de ambos AM frente a SAMR 10.

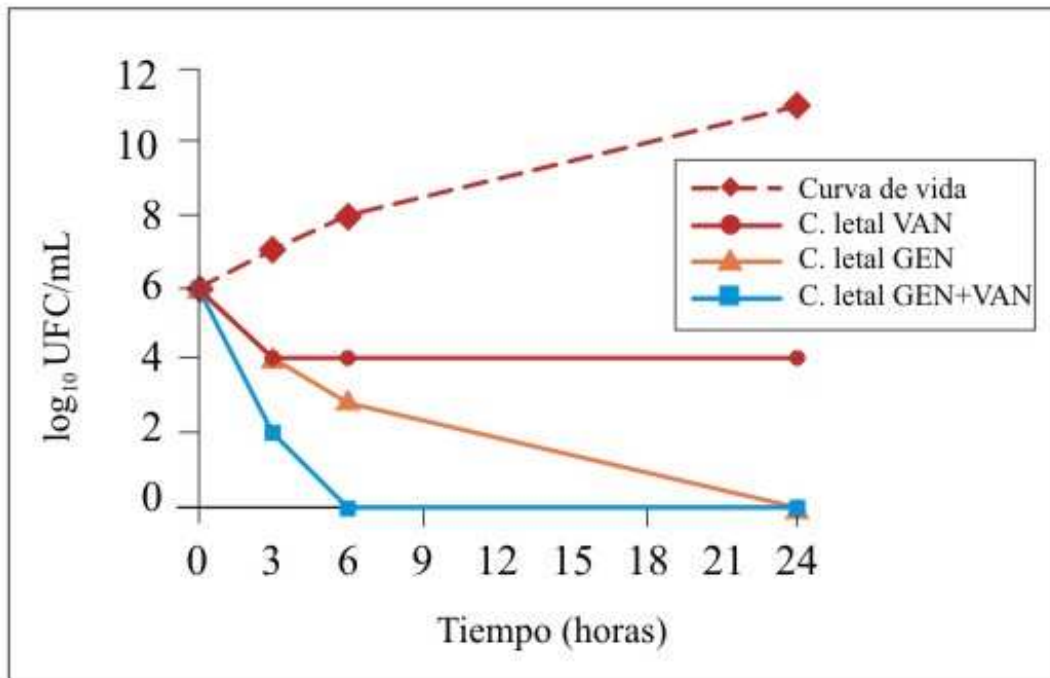


Figura VI.13: Curvas de cinética de muerte de VAN(2 µg/mL), GEN (8 µg/mL) y la combinación de ambos AM frente a SAMR 10.

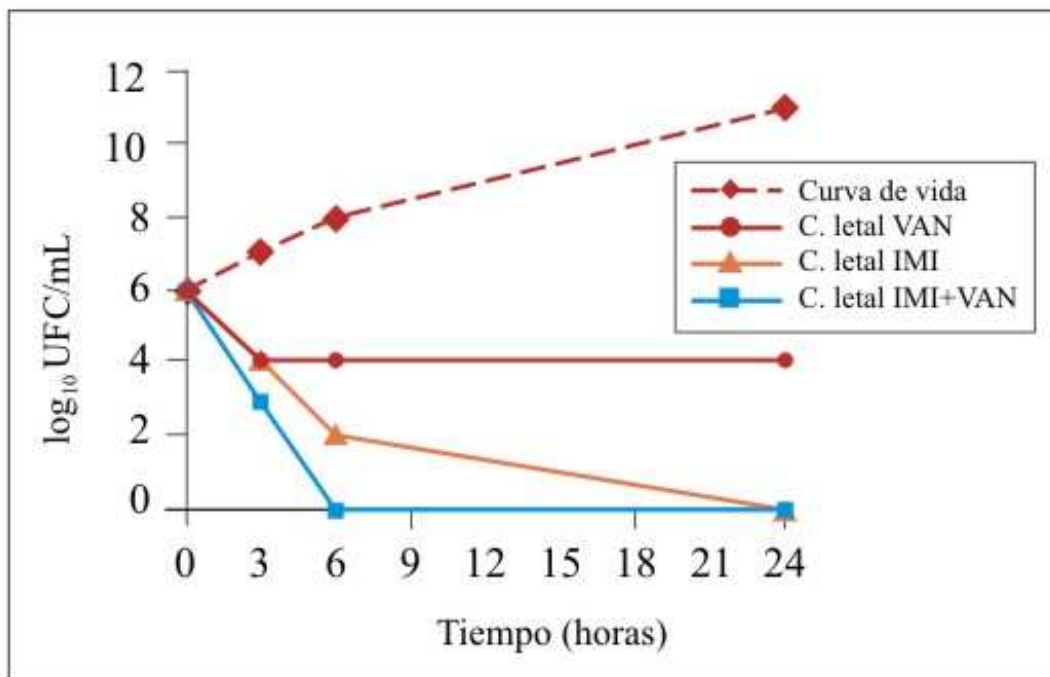


Figura VI.14: Curvas de cinética de muerte de VAN(2 µg/mL), IMI (0,5 µg/mL) y la combinación de ambos AM frente a SAMR 10.

En cuanto a **SAMR 10**, (Figuras VI.11, VI.12, VI.13 y VI.14) todos los AM ensayados, incluso IMI, fueron bactericidas a las 24 horas, efecto que no se logró como ya se demostró con VAN, AM al que resultó tolerante. La asociación VAN con GEN, IMI, CIPRO y RFA fue sinérgica a las 6 horas manteniéndose este efecto a las 24 horas.

No hubo efecto antagonista con ninguna de las combinaciones estudiadas.

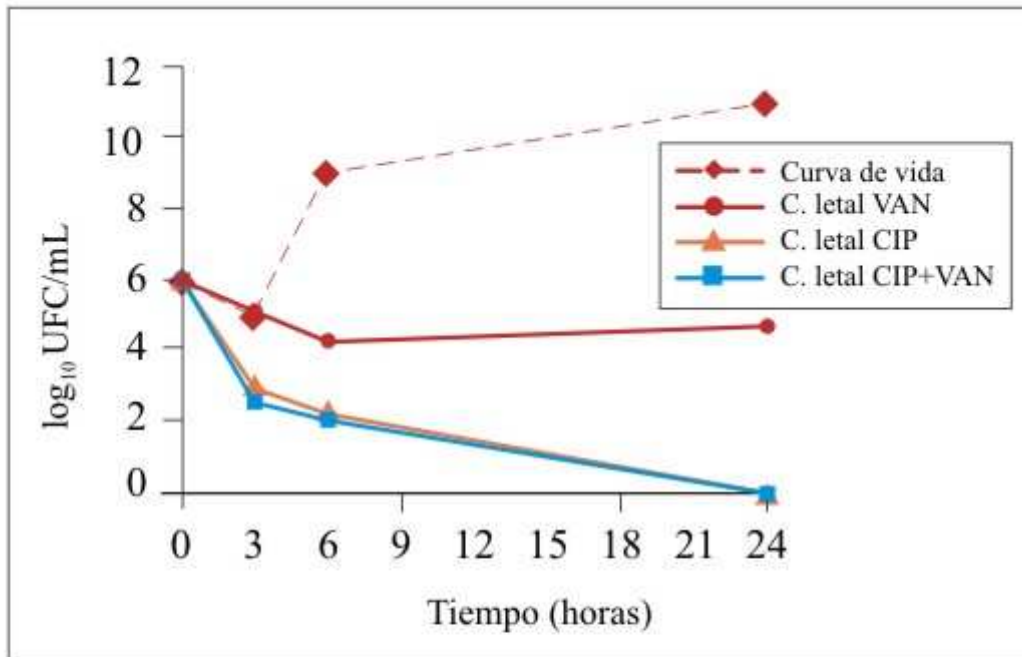


Figura VI.15: Curvas de cinética de muerte de VAN(4 µg/mL), CIP (1 µg/mL) y la combinación de ambos AM frente a SAMR 11.

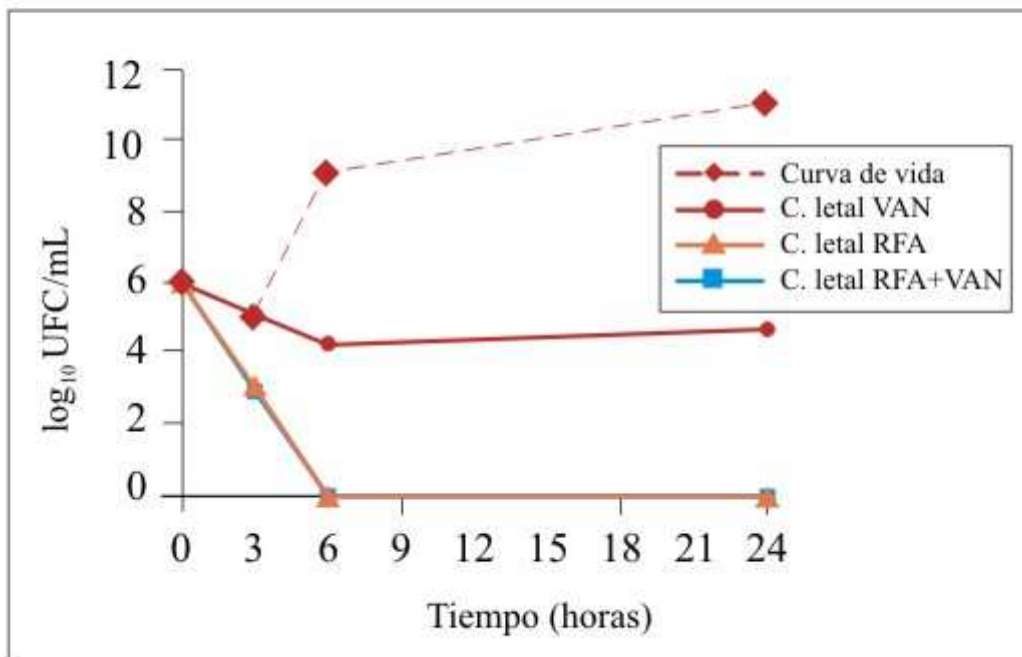


Figura VI.16: Curvas de cinética de muerte de VAN(4 µg/mL), RFA (2 µg/mL) y la combinación de ambos AM frente a SAMR 11.

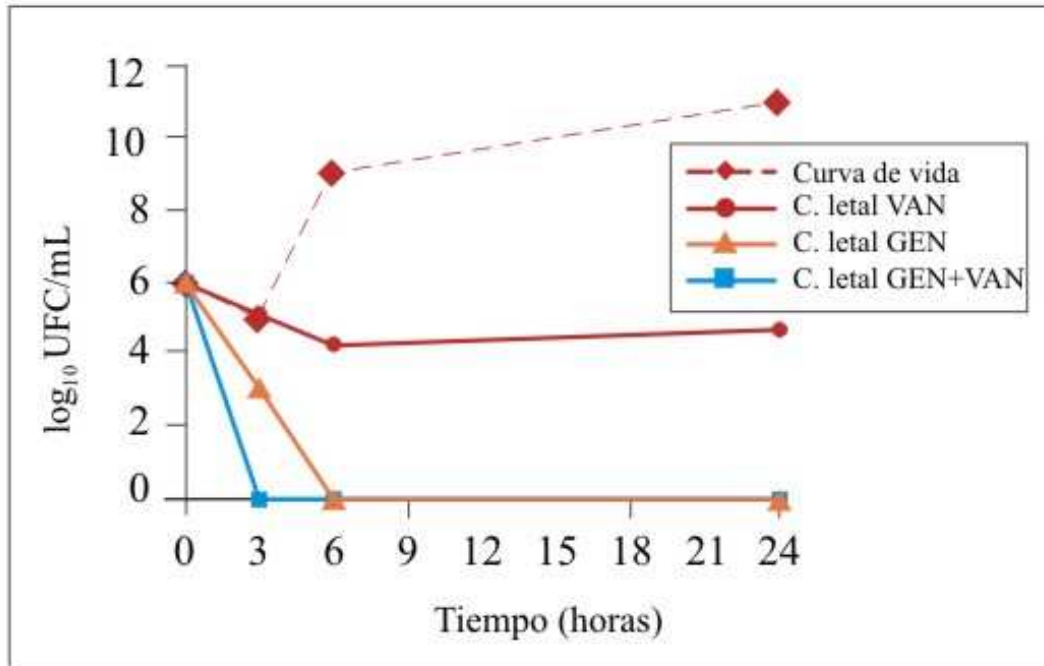


Figura VI.17: Curvas de cinética de muerte de VAN(4 µg/mL), GEN (4 µg/mL) y la combinación de ambos AM frente a SAMR 11.

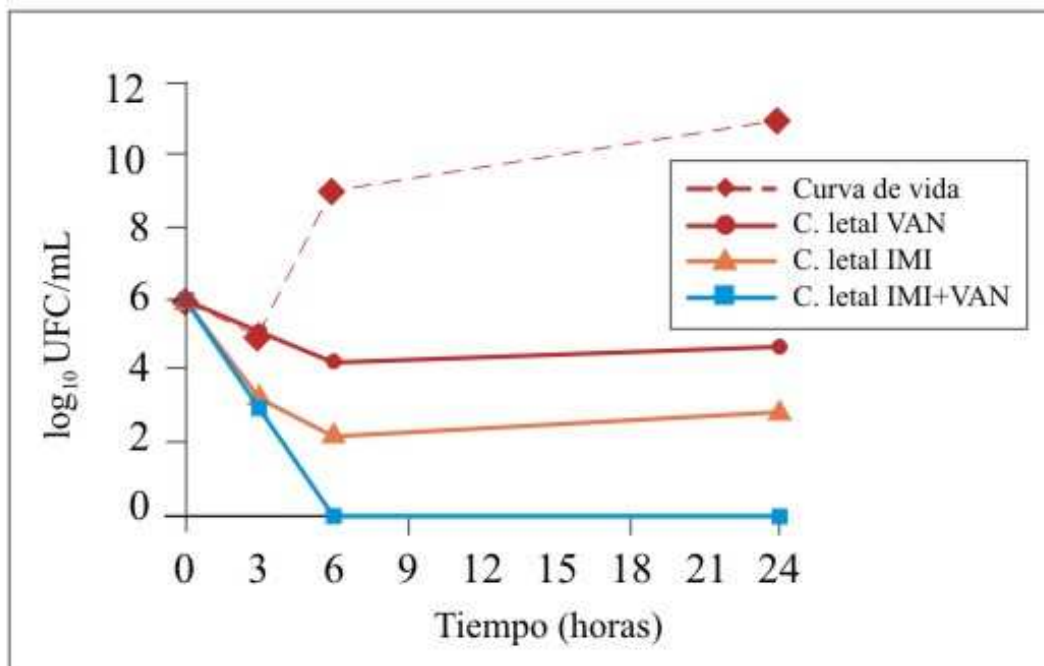


Figura VI.18: Curvas de cinética de muerte de VAN(4 µg/mL), IMI (1 µg/mL) y la combinación de ambos AM frente a SAMR 11.

Respecto a **SAMR 11**, (Figuras VI.15, VI.16, VI.17 y VI.18), el mayor efecto sinérgico fue la combinación VAN+GEN porque se logró a las 3 horas un recuento igual a 0 UFC/mL, manteniéndose éste hasta las 24 horas; en cambio GEN sola redujo a cero el inóculo inicial recién a las 6 horas. CIP+VAN logró sinergia respecto de cada uno de los AM a las 24 horas, ya que los recuentos a las 6 horas fueron iguales para CIP que para la combinación VAN+CIP. La asociación VAN+IMI fue sinérgica respecto a IMI solo, a las 6 horas y se mantuvo a las 24 horas. No hubo efecto antagonista con ninguna de las combinaciones estudiadas.

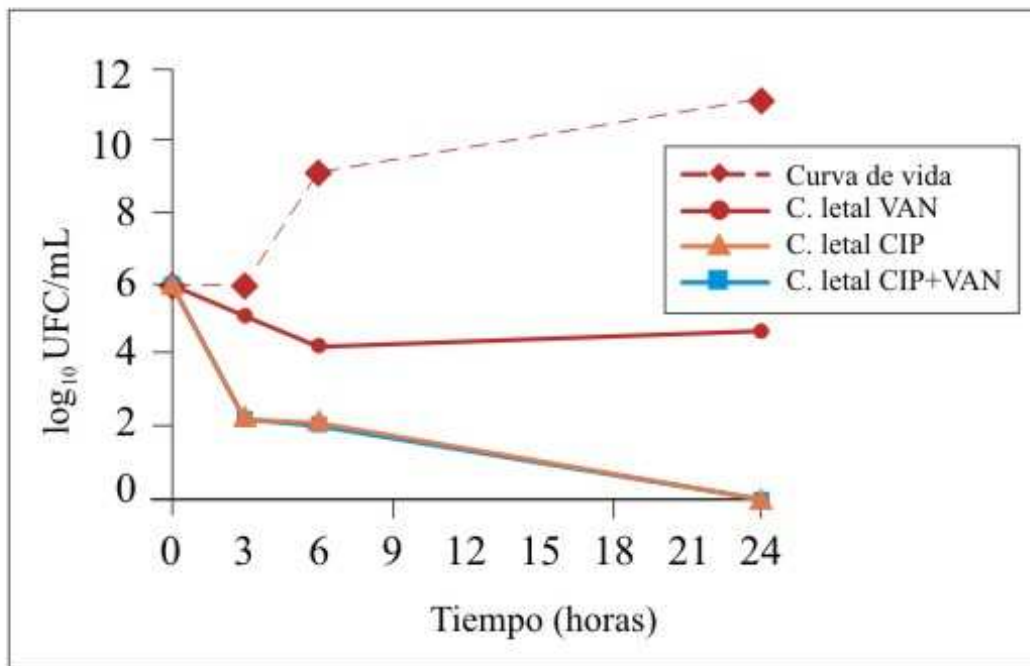


Figura VI.19: Curvas de cinética de muerte de VAN(1 µg/mL), CIP (1 µg/mL) y la combinación de ambos AM frente a SAMR 12.

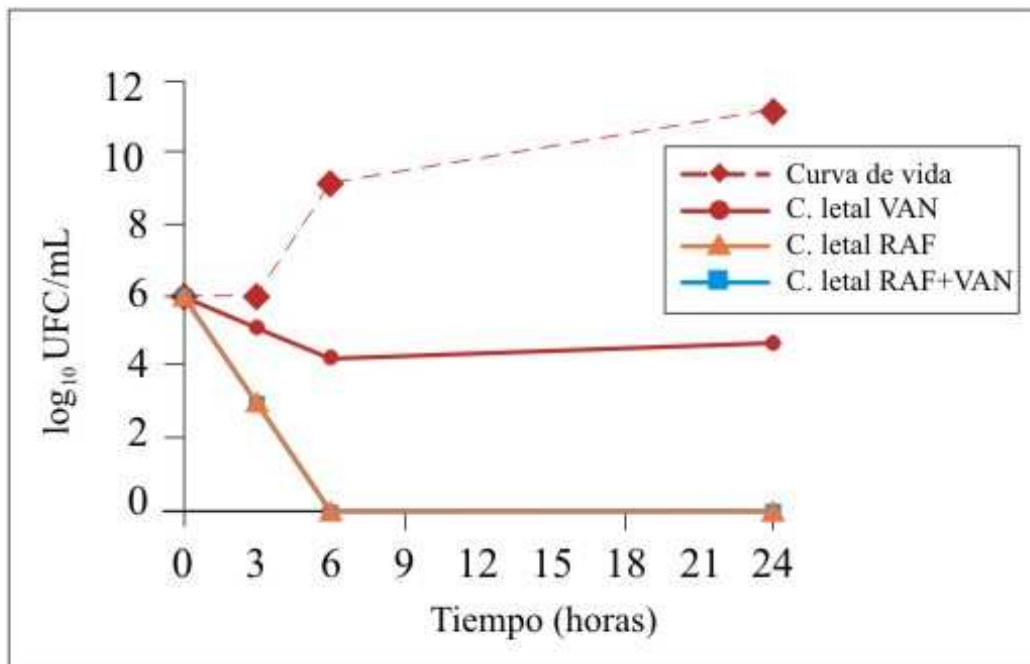


Figura VI.20: Curvas de cinética de muerte de VAN(1 µg/mL), RFA (2 µg/mL) y la combinación de ambos AM frente a SAMR 12.

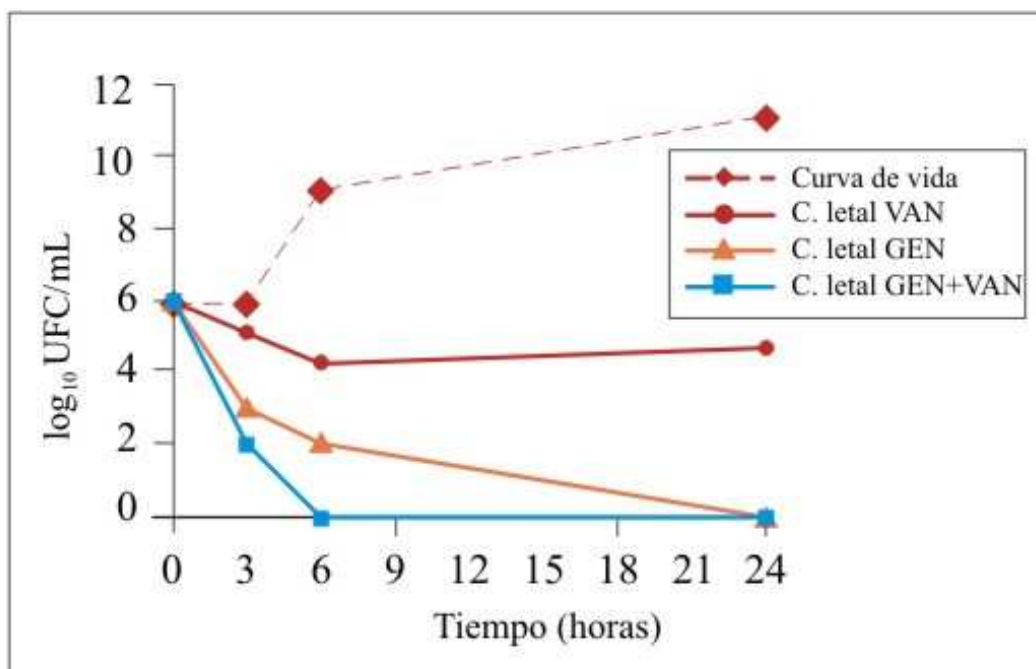


Figura VI.21: Curvas de cinética de muerte de VAN(1 µg/mL), GEN (8 µg/mL) y la combinación de ambos AM frente a SAMR 12.

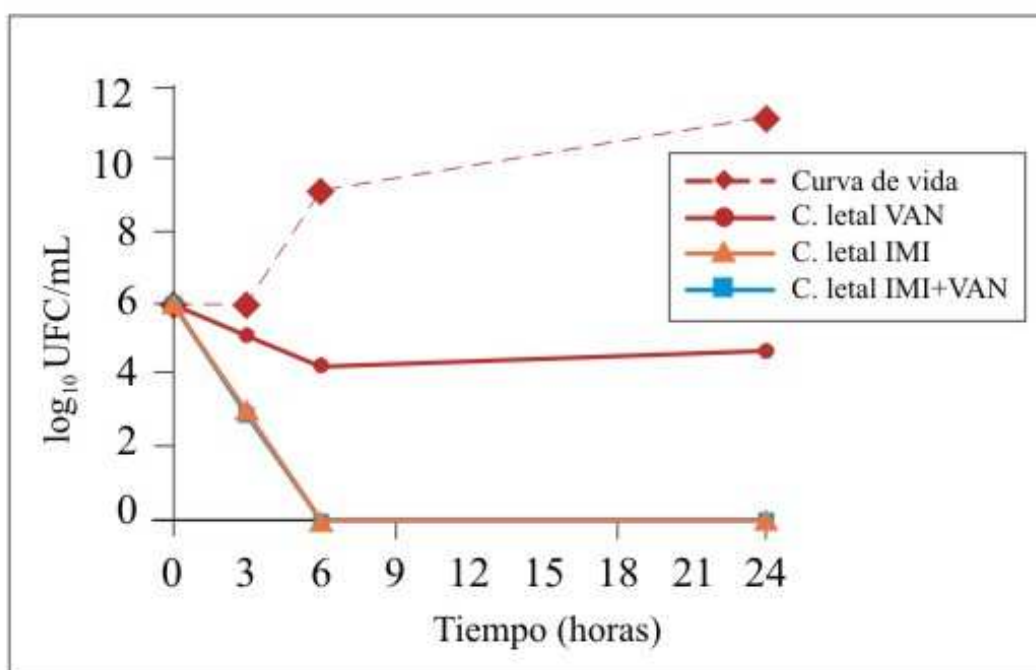


Figura VI.22: Curvas de cinética de muerte de VAN(1 µg/mL), IMI (1 µg/mL) y la combinación de ambos AM frente a SAMR 12.

Si se analizan las curvas obtenidas con **SAMR 12**, (Figuras VI.19, VI.20, VI.21 y VI.22) se observa que RFA e IMI por sí solos lograron a las 6 horas la misma bactericidia que la asociación con VAN. En cambio la sinergia VAN+GEN se logró a las 6 horas, sin embargo a las 24 horas tanto en GEN como en VAN+GEN se obtiene un recuento de UFC igual a cero. En este aislamiento se observa sinergia con la combinación VAN+CIPRO recién a las 24 horas respecto de VAN, pero CIP sola logra al mismo tiempo reducir el inóculo a cero.

En resumen, la asociación VAN+GEN fue la mejor; mientras que se logró también eficacia sinérgica con VAN+RFA y VAN+IMI. La efectividad de la asociación VAN+CIP se logró, pero, en mayor tiempo.

VI.1.5. DISCUSIÓN

En este trabajo se observó que la actividad de cada uno de los AM por sí solos, tendría el mismo efecto que al combinarse con VAN. Si bien esto se cumplió al llevar a cabo los ensayos *in vitro*, no sería aceptable que se pueda tratar una infección grave por esta bacteria con un único AM como GEN o CIPRO, aunque se haya logrado bactericidia con cada uno de ellos, aisladamente.

Los resultados aquí obtenidos coinciden con los de Totsuka y col. (1999) quienes estudiaron los efectos combinados de VAN e IMI frente a SAMR y probaron que, a pesar del alto costo, se logra mayor efectividad administrando los dos AM simultáneos que si se los hace de manera secuencial.

Se coincide también con Yzerman y col. (1998) quienes en un estudio realizado en bacteriemias estafilocócicas asociando TEI (un glucopéptido similar a VAN) adicionando RFA, sugirieron que esta combinación era más efectiva y bien tolerada, aclarando que podía surgir resistencia a RFA en el foco de infección.

En cuanto a la combinación de glucopéptidos con GEN, los datos de esta tesis acuerdan también con (Credito y col., 2007).

Otros investigadores (Lozniewski y col., 2001) también sugirieron combinaciones de VAN con betalactámicos, tales como cefepime ya que observaron actividad sinérgica entre ambos, esquema útil para ser usado en infecciones estafilocócicas graves.

En una reciente revisión, Forrest y Tamura (2010) expresaron que existen numerosos estudios realizados acerca de la terapia combinada de VAN y RFA. Estos autores comunicaron que en la mayoría de los trabajos, la asociación VAN y RFA muestra ser más antagonista, aclarando que hay otros, los menos, como Walsh y col. que demostraron sinergismo (1986). Estas conclusiones no coinciden con los resultados de este trabajo donde se observa una actividad sinérgica con dicha asociación.

Los hallazgos aquí logrados concuerdan con los de Shelburne y col. (2004) quienes en un estudio de combinaciones de antimicrobianos mediante técnicas de

cinética de muerte frente a SAMR-AC sugieren que estos agentes son más inhibidos por la asociación VAN+GEN que por la acción de VAN sola.

VI.1.6. CONCLUSIONES

- Los aislamientos SAMR estudiados fueron tolerantes a VAN y, por lo tanto, no pueden tratarse con monoterapia con este AM.
- Todos los AM ensayados fueron bactericidas.
- Si bien todas las asociaciones fueron sinérgicas, las combinaciones VAN+GEN, VAN+RFA y VAN+IMI lograron una sinergia más rápida (a las 6 horas). En cuanto VAN+CIPRO, en 3 de los SAMR se logró sinergia recién a las 24 horas y sólo en una cepa (SAMR 10) se obtuvo reducción total del inóculo inicial a las 6 horas.
- No hubo efecto antagonista con ninguna de las combinaciones ensayadas.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILINO SENSIBLES

SAMS continúa siendo un patógeno importante en las instituciones de salud públicas y privadas. Durante los últimos años (2009-2010), en el hospital Dr. J. M. Cullen de la ciudad de Santa Fe, Argentina, el 56% de las infecciones por *S. aureus* fueron producidas por SAMS. Estas correspondieron a: 10% neumonías asociadas a respirador en pacientes de UTI, 14% a bacteriemias y el 76% a PPB.

Todos los aislamientos estudiados resultaron sensibles a cefalotina según los puntos de corte de CLSI.

La bactericidia de cefalotina, considerando la relación CBM/CIM, se logró en 84 SAMS y, según este criterio, se obtuvieron 6 aislamientos tolerantes.

Respecto a los estudios de cinética de muerte, la bactericidia de cefalotina fue 99,1%, sólo 1 aislamiento no redujo en más de 3 log₁₀ UFC/mL el inóculo inicial. Se obtuvieron según esta técnica 4 SAMS tolerantes; pero uno de los aislamientos tolerantes por CM no resultó por relación CBM/CIM.

Se diseñó y puso a punto una técnica usando discos de OXA, CEF y FOX para determinar la acción bactericida de cefalotina. El método resultó sencillo y accesible para los laboratorios de bacteriología clínica.

Al realizar estudios genotípicos de los SAMS tolerantes a cefalotina, todos se confirmaron como sensibles ya que ninguno portaba el gen *mecA* y algo interesante fue que uno de ellos resultó LPV(+), coincidiendo con la agresividad de la infección causada al paciente.

Se concluye que cefalotina mantiene su actividad para ser utilizado en el hospital Dr. José María Cullen de la ciudad de Santa Fe, Argentina, tanto como profilaxis como para el tratamiento de infecciones por SAMS.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILINO RESISTENTES

Se observó un aumento en la meticilino-resistencia respecto de años anteriores en los aislamientos aquí estudiados, provenientes del Hospital Dr. J. M. Cullen de Santa Fe, Argentina. La resistencia detectada en 1993 fue 23% mientras que el valor hallado durante el transcurso de esta tesis, utilizando la misma técnica, se incrementó a un 44%.

Todas las cepas resultaron sensibles a VAN según los puntos de corte de CLSI.

La bactericidia de VAN varió según se considere la relación CBM/CIM (65,2%) o los estudios de cinética de muerte (96,42%).

Hubo una marcada diferencia en el porcentaje de tolerancia según se analice la relación CBM/CIM o los estudios de cinética de muerte; siendo 10,71% y 3,57%, respectivamente.

Un aislamiento resultó tolerante por CM y no por CBM/CIM.

VAN continúa siendo un AM útil en el hospital Dr. José María Cullen de Santa Fe, a pesar del paso de los años y a la emergencia internacional de cepas con sensibilidad intermedia y resistentes a VAN. Dado que se trata de un AM accesible y de bajo costo comparado a los nuevos AM emergentes en el mercado, puede continuar siendo la terapia de elección tanto empírica como de tratamiento con documentación microbiológica.

En cuanto al estudio genotípico se pudo observar que 3 de los 4 aislamientos SAMR tolerantes pertenecieron a un clon (clon A), no estando relacionados con el otro.

Las cepas SAMR tolerantes a VAN, resultaron sensibles a CIP, GEN, IMI y RFA según los PC de CLSI. La bactericidia se logró con todos ellos a las 24 horas.

La asociación de VAN con cada uno de los AM antes mencionados, logró reducir más rápidamente el inóculo inicial a 0 UFC/mL, respecto a cada uno de ellos aisladamente.

De los SAMR estudiados, 30 fueron SAMR-AC. La actividad bactericida de VAN en SAMR-AC fue efectiva en el 96% y resultó independiente de la producción de LPV. Se observó que los aislamientos LPV (+) redujeron más lentamente el número de UFC/mL a las 6 horas cuando se realizaron estudios de cinética de muerte.

Se concluye finalmente que, a pesar de estar en la "era posantibiótica", donde se supone que muchas infecciones no tendrán cura, este trabajo de tesis aporta datos de gran valor para no desestimar a dos antimicrobianos, tales como cefalotina y vancomicina, útiles y fácilmente disponibles, al momento de seleccionar una terapia para pacientes infectados por SAMS o SAMR que se asisten en el Hospital Dr. José María Cullen de la ciudad de Santa Fe, Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aguiar-Alves, F.; Medeiros, F.; Fernandes, O.; Gudziki Pereira, R.M.; Perdreau-Remington, F. y Riley, L.W. (2006) *New **Staphylococcus aureus** genotyping method based on exotoxin (set) genes*. J. Clin. Microbiol. 44: 2728 - 2732.
- Aguilar, L.; Barberán, J.; Prieto, J. y Jiménez, M.J. (2008) *Optimización de la actividad bactericida en el tratamiento hospitalario de infecciones por grampositivos*. Rev. Esp. Quimioter. 21: 37 - 44.
- Aguilar, L.; Jiménez, M.J. y Barberán, J. (2009) *Heterorresistencia y tolerancia a glucopéptidos en aislados grampositivos en el hospital: ¿fenómenos “invisibles” para el clínico con posible traducción clínica?*. Rev. Esp. Quimioter. 22: 173 - 179.
- Aligholi, M.; Emaneini, M; Jabalameli, F.; Shahsavan, S.; Dabiri, H. y Sedaght, H. (2008) *Emergence of high-level vancomycin-resistant **Staphylococcus aureus** in the Imam Khomeini Hospital in Tehran*. Med. Princ. Pract. 17: 432 - 434.
- Almuzara, M.; Callejo, R.; de Paulis, A. y Prieto, M. *Identificación microbiana práctica y rápida*. Taller precongreso SADEBAC 2006, Buenos Aires, Argentina, 31 de octubre al 1 de noviembre de 2006.
- Altman, D.G. (1997) *Comparing group categorical data*. En: *Practical Statistics for Medical Research* (Eds.: Altman, D. G.) London, England, p. 230 - 276.
- Alvela-Suárez, L.; Calvo-Sánchez, N.; García-García, M.I.; Godoy-Gijón, E. y Ternavasio de la Vega, H.G. (2011) *Neumonía cavitada por **Staphylococcus aureus** meticilin sensible adquirido en la comunidad productor de leucocidina de Panton-Valentine*. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. doi:10.1016/j.eimc.2011.10.003

- Amsterdam, D. (2005) *Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media*. En: *Antibiotics in laboratory medicine* (Eds.: Lorian, V.) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, p. 61-143.
- Appelbaum, P.C. (2006) *The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant **Staphylococcus aureus***. Clin. Microbiol. Infect. 12: 16 - 23.
- Appleman, M.D. y Citron, D.M. (2010) *Efficacy of vancomycin and daptomycin against **Staphylococcus aureus** isolates collected over 29 years*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 66: 441 - 444.
- Archer, G.L. y Climo, M.W. (2006) ***Staphylococcus epidermidis** y otros estafilococos coagulasa-negativos*. En: *Enfermedades infecciosas. Principios y práctica* (Eds.: Mandell, G. L.; Bennett, J. E. y Dolin, R.) Elsevier, España, p. 2352-2360.
- Arneson, N.; Hughes, S.; Houlston, R. y Done, S. (2008) *Whole-genome amplification by degenerate oligonucleotide primed PCR (DOP-PCR)*. Cold. Spring. Harb. Protoc. On Line. [Http://doi: 10.1101/pdb.prot4919](http://doi:10.1101/pdb.prot4919).
- Bae, I.G.; Federspiel, J.J.; Miró, J.M.; Woods, C.W.; Park, L.; Rybak, M.J.; Rude, T.H.; Bradley, S.; Bukovski, S.; de la Maria, C.G.; Kanj, S.S.; Korman, T.M.; Marco, F.; Murdoch, D.R.; Plesiat, P.; Rodriguez-Creixems, M.; Reinbott, P.; Steed, L.; Tattevin, P.; Tripodi, M.F.; Newton, K.L.; Corey, G.R. y Fowler, V.G. (2009) *Heterogeneous vancomycin-intermediate susceptibility phenotype in bloodstream methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** isolates from an international cohort of patients with infective endocarditis: prevalence, genotype, and clinical significance*. J. Infect. Dis. 200: 1355 - 1366.
- Balis, E.; Diacaki, C.; Tselioti, P.; Perimeni, D.; Vourli, S.; Vatopoulos, A.; Giamarellou, H. y Prekates, A. (2007) *Community-acquired pneumonia and bacteremia due to methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** carrying Panton-*

- Valentine-leukocidin gene in Greece: two case reports and literature review.* J. Chemother. 19: 703 - 708.
- Balajee, S.A.; Sigler, L. y Brandt M.E. (2007) *DNA and the classical way: identification of medically important molds in the 21st century.* Med. Mycol. 45: 475 - 490.
 - Bantar, C.; Famiglietti, A. y Goldberg, M. (1998) *Sistema informático de resistencia (SIR). Análisis comparativo de dos cortes de prevalencia durante 1997.* Asoc. Arg. Microbiol. Boletín: 133: 10 - 13.
 - Bayer, A.S. y Morrison, J.O. (1984) *Disparity between time-kill and checkerboard methods for determination of in vitro bactericidal interactions of vancomycin plus rifampin versus methicillin-susceptible and -resistant **Staphylococcus aureus**.* Antimicrob. Agents Chemother. 26: 220 - 223.
 - Becker, K.J. y von Eiff, C. (2011) ***Staphylococcus**, **Micrococcus** and other catalase-positive cocci.* En: *Manual of clinical microbiology* (Eds.: Versalovic, J.; Carroll, K. C.; Funke, G.; Jorgensen, J. H.; Landry, M. L. y Warnock, D. W.) ASM Press, American Society for Microbiology, Washington, DC, USA, p. 308-330.
 - Berglund, C. y Soderquist, B. (2008) *The origin of a methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** isolate at a neonatal ward in Sweden-possible horizontal transfer of a staphylococcal cassette chromosome mec between methicillin-resistant **Staphylococcus haemolyticus** and **Staphylococcus aureus**.* Clin. Microbiol. Infect. 14: 1048 - 1056.
 - Blumberg, P.M. y Strominger, J.L. (1974) *Interaction of penicillin with the bacterial cell: penicillin-binding proteins and penicillin-sensitive enzymes.* Bacteriol. Rev. 38: 291 - 335.
 - Bogado, I.; Mari, R.; Ebner, G. y Sutich, E. *Análisis de marcadores de metilino-resistencia en cepas de **Staphylococcus aureus** y **Staphylococcus coagulasa***

- negativos. Prevalencia de aislamientos clínicos. VII Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires, Argentina, 8 al 11 de mayo de 1995, L4.*
- Bondi, J.A. y Dietz, C.C. (1945) *Penicillin resistant staphylococci*. Proc. Royal Soc. Exper. Biol. Med. 60: 55 - 58.
 - Boucher, H.W. y Corey, G.R. (2008) *Epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Clin. Infect. Dis. 46: S344 - S349.
 - Bourgeois, I.; Pestel-Caron, M.; Lemeland, J.F.; Pons, J.L. y Caron, F. (2007) *Tolerance to the glycopeptides vancomycin and teicoplanin in coagulase-negative staphylococci*. Antimicrob. Agents Chemother. 51: 740 - 743.
 - Bradley, J.J.; Mayhall, C.G. y Dalton, H.P. (1978) *Incidence and characteristics of antibiotic tolerant strains of Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 13: 1052 - 1056.
 - Brayan, L.E. y Godfrey, A.J. (1991) *β -lactam antibiotics: mode of action and bacterial resistance*. En: *Antibiotics in laboratory medicine* (Eds.: Lorian, V.) Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA, p. 599-664.
 - Brown, M.R.W.; Costerton, J.W. y Gilbert, P. (1991) *Extrapolating to bacterial life outside the test tube*. J. Antimicrob. Chemother. 27: 565 - 567.
 - Brunton, S. (2006) *Overcoming and containing bacterial resistance: appropriate antibiotic use in community-acquired RTIs*. Therapy 3: 527 - 533.
 - Bucci, P.; Nagel, A.; Mollerach, A.; Méndez, E.delosA.; Zalazar, F. *Evaluación genotípica de un probable brote de infección intrahospitalaria debido a Serratia marcescens*. 1er. Congreso Bioquímico del Litoral. Santa Fe, Argentina, 9 al 11 de Junio de 2011, p. 49.

- Bukowski, M.; Wladyka, B. y Dubin, G. (2010) *Exfoliative toxins of Staphylococcus aureus*. Toxins. 2: 1148 - 1165.
- Bustos-Martí, J.A.; Hamdan-Partida, A. y Gutiérrez-Cárdenas, M. (2006) *Staphylococcus aureus: la reemergencia de un patógeno en la comunidad*. Rev. Biomed. 17: 287 – 305.
- Bygott, J.; Enoch, D.A.; Carson, R.P.M. y Karas, J.A. (2008) *Presumed community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates reflect spillover of healthcare-associated MRSA*. J. Hosp. Infect. 69: 197 - 198.
- Casabe, JH. (2008) *Endocarditis infecciosa. Una enfermedad cambiante*. Med.-Buenos Aires. 68: 164 - 174.
- Casellas, J.M.; Lovesio, C.; Sola, C.; Benetti, S.; Notario, R.; Borda, N.; Casabonne, C.; Cocconi, E.; Alcocer, I.; Schmuck, O.; Lovesio, L.; Misto, C.; Morettin, A.; Truscillo, M.; Tomé, G. y Flynn, L. (2009) *Celulitis post-cesárea por CAMRSA en Argentina*. La Gaceta de Infectología y Microbiología Clínica. 3: 12 - 13.
- Catalano, M.; Rouco, A.M.; Pianciola, C.J. y Morel, J. (1982) *Staphylococcus aureus tolerante a cefalosporinas*. Bact. Clin. Arg. 1: 38 - 39.
- Catalano, M.; Rouco, A.M. y Ochoa, L.B. (1989) *Perfiles de resistencia de las distintas especies del género Staphylococcus sp. frente a quince antimicrobianos de uso clínico*. Rev. Arg. Microbiol. 21: 111 - 119.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2002) *Staphylococcus aureus resistant to vancomycin-United States, 2002*. MMWR. 51: 565 - 567.
- Cercenado, E. y Ruiz de Gopegui, E. (2008) *Staphylococcus aureus resistente a la meticilina de origen comunitario*. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 26: 19 - 24.
- Cercenado, E. y Marín, M. (2011) *Detección de leucocidina de Panton-Valentine en Staphylococcus aureus mediante PCR*. En: *Manual de métodos moleculares para*

- estudios microbiológicos* (Eds.: Merino, L. A. y Giusiano, G.) Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina, p. 197-198.
- Chabbert, Y.A. y Baudens, J.G. (1962) *Souches de staphylocoques resistant naturellement a la methicilline et a la 5-methyl-3-phenyl-4-iso-oxazolyl--penicilline*. Annales de l' Institut. Pasteur. 103: 222 - 230.
 - Chait, R.; Craney, A. y Kishony, R. (2007) *Antibiotic interactions that select against resistance*. Nature. 446: 668 - 671.
 - Chambers, H.F. (2005) *Community-associated MRSA-resistance and virulence converge*. N. Engl. J. Med. 352: 1485 - 1487.
 - Chambers, H.F. y Deleo, F.R. (2009) *Waves of resistance: **Staphylococcus aureus** in the antibiotic era*. Nat. Rev. Microbiol. 7: 629 - 641.
 - Choi, C.S.; Yin, C.S.; Bakar, A.A.; Sakewi, Z.; Naing, N.N.; Jamal, F. y Othman, N. (2006) *Nasal carriage of **Staphylococcus aureus** among healthy adults*. J. Microbiol. Immunol. Infect. 39: 458 - 464.
 - Chuang, Y.C.; Wang J.T.; Chen, M.L. y Chen, Y.C. (2010) *Comparison of an automated repetitive-sequence-based PCR microbial typing system with pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of vancomycin-resistant **Enterococcus faecium***. J. Clin. Microbiol. 48: 2897 - 2901.
 - Clinical and Laboratory Standards Institute. (2001) *Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters; approved guideline, 2nd ed. CLSI document M23-A2*. CLSI, Wayne, PA.
 - Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. (2006) *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard, 9th ed. CLSI document M2-A9*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2007) *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement*. CLSI document M100-S17. CLSI, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008a) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 18th Informational Supplement*. CLSI standard M100-S18. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. (2008b) *Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters; approved guideline, 3rd ed. CLSI document M23-A3*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008c) *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 7th edition. CLSI document M07-A7*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2009a) *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 8th ed. Approved standard M7-A8*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2009b) *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 10th ed. Approved standard M2-A10*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Clinical Laboratory Standards Institute. (2010) *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. CLSI document M100-S20*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Conterno, L.O. y da Silva Filho, C.R. (2009) *Antibiotics for treating chronic osteomyelitis in adults*. Cochrane Database of Systematic Reviews Issue 3. Art. No.: CD004439. DOI: 10.1002/14651858.CD004439.pub2.

- Cook, H.A.; Furuya, E.Y.; Larson, E.; Vasquez, G. y Lowy, F.D. (2007) *Heterosexual transmission of community-associated methicillin-resistant **Staphylococcus aureus***. Clin. Infect. Dis. 44: 410 - 413.

- Cookson, B.D.; Robinson, D.A.; Monk, A.B.; Murchan, S.; Deplano, A.; de Ryck, R.; Struelens, M.J.; Scheel, C.; Fusing, V.; Salmenlinna, S.; Vuopio-Varkila, J.; Cuny, C.; Witte, W.; Tassios, P.T.; Legakis, N.J.; van Leeuwen, W.; van Belkum, A.; Vindel, A.; Garaizar, J.; Haeggman, J.; Olsson-Liljequist, B.; Ransjo, U.; Muller-Premru, M.; Hryniewicz, W.; Rossney, A.; O'Connell, B.; Short, B.D.; Thomas, J.; O'Hanlon, S. y Enright, M.C. (2007) *Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** strains: the Harmony collection*. J. Clin. Microbiol. 45: 1830 - 1837.

- Cosgrove, S.E. y Fowler, V.G. (2008) *Management of methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** bacteremia*. Clin. Infect. Dis. 46: S386 - S393.

- Cosgrove, S. E.; Sakoulas, G.; Perencevich, E.N.; Schwaber, M.J.; Karchmer, A. W. y Carmeli, Y. (2003) *Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible **Staphylococcus aureus** bacteremia: a meta-analysis*. Clin. Infect. Dis. 36: 53 - 59.

- Cox, R.A.; Conquest, C.; Mallaghan, C. y Marples, R.R. (1995) *A major outbreak of methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** caused by a new phage-type (EMRSA-16)*. J. Hosp. Infect. 29: 87 - 106.

- Credito, K.; Lin, G. y Appelbaum, P.C. (2007) *Activity of daptomycin alone and in combination with rifampin and gentamicin against **Staphylococcus aureus** assessed by time-kill methodology*. Antimicrob. Agents Chemother. 51: 1504 - 1507.

- Cristóbal, S.; Baroni, M.R.; Roldán, M.L.; Mendosa, M.A.; Spagna, A.; Virgolini, S.M.; Méndez E.delosA. *Transmisión familiar de **Staphylococcus aureus** meticilino resistente adquirido en la comunidad. A propósito de un caso*. 1er. Congreso

Bioquímico del Litoral. Santa Fe, Argentina, 9 al 11 de junio de 2011, p. 47.

- Crum, N.F.; Lee, R.U.; Thornton, S.A.; Stine, O.C.; Wallace, M.R.; Barroza, C.; Keefer-Norris, A.; Judd, S. y Russell, K.L. (2006) *Fifteen-year study of the changing epidemiology of methicillin-resistant **Staphylococcus aureus***. AJM. 119: 943 - 951.
- Cui, L.; Murakami, H.; Kuwahara-Arai, K.; Hanaki, H. y Hiramatsu, K. (2000) *Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by **Staphylococcus aureus** Mu50*. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 2276 - 2285.
- Cunha, B.A.; Nausheen, S. y Schoch, P. (2010) *Persistent methicillin-sensitive **Staphylococcus aureus** (MSSA) bacteremia due to a linezolid “tolerant” strain*. Heart Lung. 39: 173 - 175.
- Dalhoff, A.; Ambrose, P.G. y Mouton, J.W. (2009) *A long journey from minimum inhibitory concentration testing to clinically predictive breakpoints: deterministic and probabilistic approaches in deriving breakpoints*. Infection. 37: 296 - 305.
- Dankert, J.; Holloway, Y.; Joldersma, W. y Hess, J. (1982) *Screening for penicillin tolerance in viridans streptococci by a simple disk method*. J. Clin. Microbiol. 16: 744 - 746.
- Daum, R.S. y Spellberg, B. (2012) *Progress toward a **Staphylococcus aureus** vaccine*. Clin. Infect. Dis. 54: 560 - 567.
- David, M.Z. y Daum, R.S. (2010) *Community-associated methicillin-resistant **Staphylococcus aureus**: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic*. Clin. Microbiol. Rev. 23: 616 - 687.
- Dearborn, A.D.; Spilman, M.S.; Damle, P.K.; Chang, J.R.; Monroe, E.B.; Saad, J.S.; Christie, G.E. y Dokland, T. (2011) *The **Staphylococcus aureus** pathogenicity*

- island 1 protein gp6 functions as an internal scaffold during capsid size determination. J. Mol. Biol. 412: 710 - 722.
- DeGirolani, P.C. y Eliopoulos, G. (1987) *Antimicrobial susceptibility tests and their role in therapeutic drug monitoring.* Clin. Lab. Med. 7: 499 - 513.
 - Deininger, S.; Figueroa-Perez, I.; Sigel, S.; Stadelmaier, A.; Schmidt, R.R.; Hartung, T. y von Aulock, S. (2007) *Use of synthetic derivatives to determine the minimal active structure of cytokine-inducing lipoteichoic acid.* Clin. Vaccine Immunol. 14: 1629 - 1633.
 - de Lencastre, H.; Oliveira, D. y Tomasz, A. (2007) *Antibiotic resistant **Staphylococcus aureus**: a paradigm of adaptive power.* Curr. Opin. Microbiol. 10: 428 - 435.
 - de Paulis, A.N.; Predari, S.C.; Chazarreta, C.D. y Santoianni, J.E. (2003) *Five-test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci.* J. Clin. Microbiol. 41: 1219 - 1224.
 - de Sanctis, J.T.; Swami, A.; Sawarynski, K.; Gerasymchuk, L.; Powell, K.; Robinson-Dunn, B.; Carpenter, C.F. y Sims, M.D. (2011) *Is there a clinical association of vancomycin MIC creep, agr group II locus, and treatment failure in MRSA bacteremia?* Diagn. Mol. Pathol. 20: 184 - 188.
 - Diekema, D.J.; Pfaller, M.A.; Schmitz, F.; Smayevsky, J.; Bell, J.; Jones, R.N.; Beach, M. y the SENTRY participating group. (2001) *Survey of infections due to **Staphylococcus** species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997-1999.* Clin. Infect. Dis. 32: S114 - S132.
 - Diep, B.A.; Carleton, H.A.; Chang, R.F.; Sensabaugh, G.F. y Perdreau-Remington, F. (2006a) *Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-*

- associated strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. J. Infect. Dis. 193: 1495 - 1503.
- Diep, B.A.; Gill, S.R.; Chang, R.F.; Phan, T.H.V.; Chen, J.H.; Davidson, M.G.; Lin, F.; Lin, J.; Carleton, H.A.; Mongodin, E.F.; Sensabaugh, G.F. y Perdreau-Remington, F. (2006b) *Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. The Lancet. 367: 737 - 739
 - Domenech, A.; Ribes, S.; Cabellos, C.; Domínguez, M.A.; Montero, A.; Liñares, J.; Ariza, J. y Gudiol, F. (2004) *A mouse peritonitis model for the study of glycopeptide efficacy in GISA infections*. Microb. Drug. Resist. 10: 346 - 353.
 - Dowling, H.F. (1961) *The newer penicillins*. Clin. Pharmacol. Ther. 2: 572 - 580.
 - Drlica, K.; Hiasa, H.; Kerns, R.; Malik, M.; Mustaev, A. y Zhao, X. (2009) *Quinolones: action and resistance updated*. Curr. Top. Med. Chem. 9: 981 - 998.
 - Dumitrescu, O.; Badiou, C.; Bes, M.; Reverdy, M.E.; Vandenesch, F.; Etienne, J. y Lina, G. (2008) *Effect of antibiotics, alone and in combination, on Panton-Valentine leukocidin production by a Staphylococcus aureus reference strain*. Clin. Microbiol. Infect. 14: 384 - 388.
 - Eagle, H. y Mussleman, A.D. (1948) *The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms*. J. Exp. Med. 88: 99 - 131.
 - Ehrenreich, A. (2006) *DNA microarray technology for the microbiologist: an overview*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 73: 255 - 273.
 - Elliott, D.J.; Zaoutis, T.E.; Troxel, A.B.; Loh, A. y Keren, R. (2009) *Empiric antimicrobial therapy for pediatric skin and soft-tissue infections in the era of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Pediatrics 123: e959 - 966.

- Ellis, M.W.; Hospenthal, D.R.; Dooley, D.P.; Gray, P.J. y Murray, C.K. (2004) *Natural history of community-acquired methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** colonization and infection in soldiers*. Clin. Infect. Dis. 39: 971 - 979.
- Ellner, P.D. (1982) *The laboratory's role in managing infectious diseases*. Med. Lab. Observer. 14: 75 - 90.
- Etienne, J. (2005) *Panton-Valentine leukocidin: a marker of severity for **Staphylococcus aureus** infection?*. Clin. Infect. Dis. 41: 591 - 593.
- European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). (2000) *Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents*. Clin. Microbiol. Infect. 6: 503 - 508.
- Ezcurra, G.; Baroni, M.R.; Méndez, E.delosA.; Mendosa, M.A.; Virgolini, S.; Berenguer, A.; Fontana, F.; Ailan, J.; Garozzo, M.; Barrera, S.; Sabater, S.; Fiore, J. y Gomez, D. *Methicillin – resistant **Staphylococcus aureus** (MRSA) in pediatric patient infections: impact of Panton – Valentine leukocidin (PVL) and its association with epidemiological factors*. 6th World Congress of the World Society for Pediatric Infectious Diseases. Buenos Aires, Argentina, 18 al 22 de noviembre de 2009, Abstract A -181-0002-00597.
- Felten, A.; Grandry, B.; Lagrange, P.H. y Casin, I. (2002) *Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-Screen latex agglutination test*. J. Clin. Microbiol. 40: 2766 - 2771.
- Fen, Q.; Cui, E.; Guo, T.; Li, H.; Chen, S.; Liu, L.; Han, W.; Bao, C.; Mao, Y. y Tang, Y.W. (2010) *Nasal colonization of and clonal transmission of methicillin-susceptible **Staphylococcus aureus** among chinese military volunteers*. J. Clin. Microbiol. 48: 64 - 69.

- Fernández-Cuenca, F. (2004) *Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas*. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 22: 355 - 360.
- Finberg, R.W.; Moellering, R.C.; Tally, F.P.; Craig, W.A.; Pankey, G.A.; Patchen Dellinger, E.; West, M.A.; Joshi, M.; Linden P.K.; Rolston, K.V.; Rotschafer, J.C. y Rybak, M.J. (2004) *The importance of bactericidal drugs: future directions in infectious disease*. Clin. Infect. Dis. 39: 1314 - 1320.
- Firsov, A.; Alferova, I.; Smirnova, M.; Lubenko, I.; Vostrov, S.; Mirchink, E.; Portnoy, S. y Zinner, S. (2005) *Relative abilities of daptomycin and vancomycin to prevent the enrichment of resistant **Staphylococcus aureus** mutants in an in vitro model*. Clin. Microbiol. Infect. 11(Suppl 2): 518.
- Firsov, A.A.; Lubenko, I.Y.; Smirnova, M.V.; Strukova, E.N. y Zinner, S.H. (2008) *Enrichment of fluoroquinolone-resistant **Staphylococcus aureus**: oscillating ciprofloxacin concentrations simulated at the upper and lower portions of the mutant selection window*. Antimicrob. Agents Chemother. 52: 1924 -1928.
- Forrest, G.N. y Tamura, K. (2010) *Rifampin combination therapy for nonmycobacterial infections*. Clin. Microbiol. Rev. 23: 13 - 34.
- Fosch, S.E.; Yones, C.; Trossero, M.; Nepote, A.; Jordán, D.; Mendosa, M.A.; Giusti, A.; Méndez, E.delosA. *Portación nasal de **Staphylococcus aureus** en individuos de la comunidad: sensibilidad antimicrobiana y asociación con factores epidemiológicos*. XIX Congreso Latinoamericano de Bioquímica Clínica. XVI Congreso Chileno de Química Clínica. Santiago, Chile, 20 al 23 de abril de 2010, p. 117.
- Foucault, M.L.; Courvalin, P. y Grillot-Courvalin, C. (2009) *Fitness cost of VanA-type vancomycin resistance in methicillin-resistant **Staphylococcus aureus***. Antimicrob. Agents Chemother. 53: 2354 - 2359.

- Fowler, V.G.; Miro, J.M.; Hoen, B.; Cabell, C.H.; Abrutyn, E.; Rubenstein, E.; Corey, G.R.; Spelman, D.; Bradley, S.F.; Barsic, B.; Pappas, P.A.; Anstrom, K.J.; Wray, D.; Fortes, C.Q.; Anguera, I.; Athan, E.; Jones, P.; van der Meer, J.T.M.; Elliot, T.S.J.; Levine, D.P.; Bayer, A.S. y for the ICE Investigators. (2005) *Staphylococcus aureus* endocarditis: a consequence of medical progress. JAMA. 293: 3012 - 3021.
- Francis, J.S.; Doherty, M.C.; Lopatin, U.; Johnston, C.P.; Sinha, G.; Ross, T.; Cai, M.; Hansel, N.N.; Perl, T.; Ticehurst, J.R.; Carroll, K.; Thomas, D. L.; Nuermberger, E. y Bartlett, J.G. (2005) *Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying the Panton-Valentine leukocidin genes.* Clin. Infect. Dis. 40: 100 - 107.
- François, P., Bento, M.; Renzi, G.; Harbarth, S.; Pittet, D. y Schrenzel, J. (2007) *Evaluation of three molecular assays for rapid identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* J. Clin. Microbiol. 45: 2011 - 2013.
- Fraser, J.D. y Proft, T. (2008) *The bacterial superantigen and superantigen-like proteins.* Immunol. Rev. 225: 226 - 243.
- French, G.L. (2006) *Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections-the potential role of daptomycin.* J. Antimicrob. Chemother. 58: 1107 - 1117.
- Fridkin, S.K.; Hageman, J.C.; Morrison, M.; Thomson Sanza, L.; Como-Sabetti, K.; Jernigan, J.A.; Harriman, K.; Harrison, L.H.; Lynfield, R. ; Farley, M.M. y the active bacterial core surveillance program of the emerging infections program network. (2005) *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus disease in three communities.* N. Engl. J. Med. 352: 1436 - 1444.
- Fritsche, T.R.; Sader, H.S. y Jones, R.N. (2005) *Epidemiology of antimicrobial resistance: species prevalence, susceptibility profiles, and resistance trends.* En: *Antibiotics in laboratory medicine* (Eds.: Lorian, V.) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, p. 815-850.

- Fuchs, P.C.; Barry, A.L. y Brown, S.D. (2002) *In vitro bactericidal activity of daptomycin against staphylococci*. J. Antimicrob. Chemother. 49: 467 - 470.
- Galiana Villar, A. (2003) *Infección por **Staphylococcus aureus** meticilino-resistente adquirido en la comunidad*. Arch. Pediatr. Urug. 74: 26 - 29.
- Gardella, N.; Cuirolo, A. y Mollerach, A. (2011) *Detección y caracterización genotípica de la resistencia a meticilina en **Staphylococcus aureus***. En: *Manual de métodos moleculares para estudios microbiológicos*. (Eds.: Merino, L. A.; Giusiano, G.) Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina, p. 228-231.
- Gardella, N.; Picasso, R.; Predari, S.C.; Lasala, M.; Foccoli, M.; Benchetrit, G.; Famiglietti, A.; Catalano, M.; Mollerach, M. y Gutkind, G. (2005) *Methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** strains in Buenos Aires teaching hospitals: replacement of the multidrug resistant South American clone by another susceptible to rifampin, minocycline and trimethoprim-sulfamethoxazole*. Rev. Argent. Microbiol. 37: 156 - 160.
- Garza, D.; Sungar, G.; Johnston, T.; Rolston, B.; Ferguson, J.D. y Matheson, G.O. (2009) *Ineffectiveness of surveillance to control community-acquired methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** in a professional football team*. Clin. J. Sport Med. 19: 498 - 501.
- Giannouli, S.; Labrou, M.; Kyritsis, A.; Ikonomidis, A.; Pournaras, S.; Stathopoulos, C. y Tsakris, A. (2010) *Detection of mutations in the FemXAB protein family in oxacillin-susceptible mecA-positive **Staphylococcus aureus** clinical isolates*. J. Antimicrob. Chemother. 65: 626 - 633.
- Giusti, A.; Alvarez, C.; Cristóbal, S.; Mendosa, M.A.; Baroni, M.R.; Méndez E. delosA. *Portación nasal de **Staphylococcus aureus** meticilino resistente en una población estudiantil universitaria*. 1er. Congreso Bioquímico del Litoral. Santa Fe, Argentina, 9 al 11 de junio de 2011a, p. 41.

- Giusti, A.; Baroni, M.R.; Mendosa M.A.; Nagel, A.; Virgolini, S.; Ochoteco, C.; Mollerach, A.; Roldán, M.L.; Méndez, E.delosA. (2011b) *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente adquiridos en la comunidad: detección de leucocidina de Pantón-Valentine y su relación con el sitio de aislamiento en pacientes de la ciudad de Santa Fe-Argentina. Rev. Panam. Infectol. 13: 8 - 11.
- Goldstein, F.; Perutka, J.; Cuirolo, A.; Plata, K.; Faccone, D.; Morris, J.; Sournia, A.; Kitzis, M.D.; Ly, A.; Archer, G. y Rosato, A.E. (2007) *Identification and phenotypic characterization of a β -lactam-dependent, methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain*. Antimicrob. Agents Chemother. 51: 2514 - 2522.
- Gonzalez, C.; Rubio, M.; Romero-Vivas, J.; González, M. y Picazo, J.J. (1999) *Bacteremic pneumonia due to Staphylococcus aureus: a comparison of disease caused by methicillin-resistant and methicillin-susceptible organisms*. Clin. Infect. Dis. 29: 1171 - 1177.
- Gordon, R.J. y Lowy, F.D. (2008) *Pathogenesis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection*. Clin. Infect. Dis. 46: S350 - 359.
- Gorwitz, R.J. (2007) *Understanding the success of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains causing epidemic disease in the community*. J. Infect. Dis. 197: 179 - 182.
- Greisen, K.; Loeffelholz, M.; Purohit, A. y Leong, D. (1994) *PCR primers and probes for the 16rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid*. J. Clin. Microbiol. 32: 335 - 351.
- Grundmann, H.; Aires-de-Sousa, M.; Boyce, J. y Tiemersma, E. (2006) *Emergence and resurgence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus as a public health threat*. Lancet 368: 874 - 885.
- Hamilton, S.M.; Bryant, A.E.; Carroll, K.C.; Lockary, V.; Ma, Y.; McIndoo, E.; Miller, L.G.; Perdreau-Remington, F.; Pullman, J.; Risi, G.F.; Salmi, D.B. y Stevens, D.L. (2007) *In vitro production of Pantón Valentine leukocidina among*

- strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus causing diverse infections. Cli. Infect. Dis. 45: 1550 - 1558.*
- Handwerger, S. y Tomasz, A. (1985) *Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. Rev. Infect. Dis. 7: 368 - 386.*
 - Hassoun, A. (2007) *Treatment of Staphylococcus aureus prosthetic valve endocarditis. Am. J. Med. 120: e9.*
 - Havaei, S.A.; Vidovic, S.; Tahmineh, N.; Mohammad, K.; Mohsen, K.; Starnino, S. y Dillon, J.A.R. (2011) *Epidemic methicillin-susceptible Staphylococcus aureus lineages are the main cause of infections at an Iranian University hospital. J. Clin. Microbiol. 49: 3990 - 3993.*
 - Hayashida, A.; Bartlett, A.H.; Foster, T.J. y Park, P.W. (2009) *Staphylococcus aureus beta-toxin induces lung injury through syndecan-1. Am. J. Pathol. 174: 509 - 518.*
 - Hersh, A.L.; Chambers, H.F.; Maselli, J.H. y Gonzales, R. (2008) *National trends in ambulatory visits and antibiotic prescribing for skin and soft tissue infections. Arch. Intern. Med. 168: 1585 - 1591.*
 - Hiramatsu, K. (2001) *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus: a new model of antibiotic resistance. Lancet Infect. Dis. 1: 147 - 155.*
 - Hiramatsu, K.; Aritaka, N.; Hanaki, H.; Kawasaki, S.; Hosoda, Y.; Hori, S.; Fukuchi, Y. y Kobayashi, I. (1997a) *Dissemination in Japanese hospitals of strains of Staphylococcus aureus heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet 350: 1670 - 1673.*
 - Hiramatsu, K.; Hanaki, H.; Ino, T.; Yabuta, K.; Oquri, T. y Tenover, F.C. (1997b) *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J. Antimicrob. Chemother. 40: 135 - 136.*

- Holmes, R.L. y Jorgensen, J.H. (2008) *Inhibitory activities of 11 antimicrobial agents and bactericidal activities of vancomycin and daptomycin against invasive methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** isolates obtained from 1999 through 2006.* Antimicrob. Agents Chemother. 52: 757 - 760.
- Howden, B.P.; Davies, J.K.; Johnson, P.D.R.; Stinear, T.P. y Grayson, M.L. (2010) *Reduced vancomycin susceptibility in **Staphylococcus aureus**, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications.* Clin. Microbiol. Rev. 23: 99 - 139.
- Islam, M.A.; Alam, M.M.; Choudhury, M.E.; Kobayashi, N. y Ahmed, M.U. (2008) *Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of cloxacillin for selected isolates of methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** (MRSA) with their antibiogram.* Bangl. J. Vet. Med. 6: 121 - 126.
- Jawetz, E.; Gunnison, J.B. y Colman, V.R. (1950) *The combined action of penicillin with streptomycin or chloromycetin on enterococci in vitro.* Science 111: 254 - 256.
- Jevons, M.P. (1961) *"Celbenin" resistant staphylococci.* Br. Med. J. 1: 124 - 125.
- Jones, R.N. (2006) *Microbiological features of vancomycin in the 21st century: minimum inhibitory concentration creep, bactericidal/static activity, and applied breakpoints to predict clinical outcomes or detect resistant strains.* Clin. Infect. Dis. 42: S13 - S24.
- Kanafani, Z.A y Fowler, V.G. (2006) *Infecciones por **Staphylococcus aureus**: nuevos retos para un viejo patógeno.* Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 24: 182 - 193.
- Kernodle, D.S. (2000) *Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics.* En: *Gram-positive pathogens* (Eds.: Fischetti, V. A.; Novick, R. P.; Ferretti, J. J.; Portnoy, D. A. y Rood, J. I.) American Society for Microbiology, Washington, DC, USA, p. 609-620.

- Kim, E.S.; Song J.S.; Lee, H.J.; Choe, P.G.; Park, K.H.; Cho, J.H.; Park, W.B.; Kim, S.H.; Bang, J.H.; Kim, D.M.; Park, K.U.; Shin, S.; Lee, M.S.; Choi, H.J.; Kim, N.J.; Kim, E.C.; Oh, M.D.; Kim, H.B. y Choe, K.W. (2007) *A survey of community-associated methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** in Korea*. J. Antimicrob. Chemother. 60: 1108 - 1114.

- Kim, K.S. y Anthony, B.F. (1981) *Importance of bacterial growth phase in determining minimal bactericidal concentrations of penicillin and methicillin*. Antimicrob. Agents Chemother. 19: 1075 - 1077.

- Kim, S.H.; Kim, K.H.; Kim, H.B.; Kim, N.J.; Kim, E.C.; Oh, M. y Choe, K.W. (2008) *Outcome of vancomycin treatment in patients with methicillin-susceptible **Staphylococcus aureus** bacteremia*. Antimicrob. Agents Chemother. 52: 192 - 197.

- Kirby, W.M.M. (1944) *Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci*. Science. 99: 452 - 453.

- Kohanski, M.A.; Dwyer, D.J. y Collins, J.J. (2010) *How antibiotics kill bacteria: from targets to networks*. Microbiology. 8: 423 - 435.

- Kuehnert, M.J.; Hill, H.A.; Kupronis, B.A.; Tokars, J.I.; Solomon, S.L. y Jernigan, D.B. (2005) *Methicillin-resistant-**Staphylooccus aureus** hospitalizations, United States*. Emerg. Infect. Dis. 11: 868 - 872.

- Kuroda, M.; Ohta, T.; Uchiyama, I.; Baba, T.; Yuzawa, H.; Kobayashi, I.; Cui, L.; Oguchi, A.; Aoki, K.; Nagai, Y.; Lian, J.Q.; Ito, T.; Kanamori, M.; Matsumaru, H.; Maruyama, A.; Murakami, H.; Hosoyama, A.; Mizutani-Ui, Y.; Takahashi, N.K.; Sawano, T.; Inoue, R.; Kaito, C.; Sekimizu, K.; Hirakawa, H.; Kuhara, S.; Goto, S.; Yabuzaki, J.; Kanehisa, M.; Yamashita, A.; Oshima, K.; Furuya, K.; Yoshino, C.; Shib, T.; Hattori, M.; Ogasawara, N.; Hayashi, H. y Hiramatsu, K. (2001) *Whole genomic sequencing of methicillin resistant **Staphylococcus aureus***. Lancet. 357: 1225 - 1240.

- Labandeira-Rey, M.; Couzon, F.; Boisset, S.; Brown, E.L.; Bes, M.; Benito, Y.; Barbu, E.M.; Vazquez, V.; Hook, M.; Etienne, J.; Vandenesch, F. y Bowden, M.G. (2007) *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science*. 315: 1130 - 1133.
- Laifer, G.; Frei, R.; Adler, H. y Fluckiger, U. (2006) *Necrotising pneumonia complicating a nasal furuncle*. *Lancet*. 367: 1628.
- Lan, R. y Reeves, P.R. (2007) *Amplified fragment length polymorphism analysis of Salmonella enterica*. *Methods Mol. Biol.* 394: 119 - 132.
- Larsen, A.R.; Stegger, M.; Böcher, S.; Sorum, M.; Monnet, D.L. y Skov, R.L. (2009) *Emergence and characterization of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in Denmark, 1999 to 2006*. *J. Clin. Microbiol.* 47: 73 - 78.
- Laverdiere, M. y Sabath, L.D. (1977) *Historical survey of tests to determine bacterial susceptibility to antimicrobial agents*. *M. Sinai J. Med.* 4: 73 - 88.
- Lee, S.S.; Kim, Y.J.; Chung, D.R.; Jung, K.S. y Kim, J.S. (2010) *Invasive infection caused by a community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain not carrying Panton-Valentine leukocidin in South Korea*. *J. Clin. Microbiol.* 48: 311 - 313.
- Leonard, S.N.; Cheung, C.M. y Rybak, M.J. (2008) *Activities of ceftobiprole, linezolid, vancomycin, and daptomycin against community-associated and hospital-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 2974 - 2976.
- Levine, D.F. (2006) *Vancomycin: a history*. *Clin. Inf. Dis.* 42: S5 - S12.
- Levison, M.E. (2004) *Pharmacodynamics of antimicrobial drugs*. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 18: 451 - 465.

- Lew, D.P. y Waldrogl, F.A. (1997) *Osteomyelitis*. N. Engl. J. Med. 336: 999 - 1007.

- Li, W.; Raoult, D. y Fournier, P.E. (2009) *Bacterial strain typing in the genomic era*. FEMS Microbiol. Rev. 33: 892 - 916.

- Limansky, A.S.; Guardati, M.C.; Sutich E.G.; Toresani, I.E.; Bogado, I.; Joannas, G. y Viale, A. (1995) *Characterization of clinical isolates of **Streptococcus agalactiae** by random amplified polymorphic DNA using degenerate oligonucleotides*. Med.-Buenos Aires. 55: 681 - 684.

- Limansky, A.S. y Viale, A.M. (2002) *Can composition and structural features of oligonucleotides contribute to their wide-scale applicability as random PCR primers in mapping bacterial genome diversity?*. J. Microbiol. Methods. 50: 291 - 297.

- Lin, G.; Pankuch, G.A.; Ednie, L.M. y Appelbaum, P.C. (2010) *Antistaphylococcal activities of telavancin tested alone and in combination by time-kill assay*. Antimicrob. Agents Chemother. 54: 2201 - 2205.

- Lina, G.; Piémont, Y.; Godail-Gamot, F.; Bes, M.; Peter, M.; Gauduchon, V.; Vadenesch, F. y Etienne, J. (1999) *Involvement of Pantone-Valentine leukocidin-producing **Staphylococcus aureus** in primary skin infections and pneumonia*. Clin. Infect. Dis. 29: 1128 - 1132.

- Liu, C.; Graber, C.J.; Karr, M.; Diep, B.A.; Basuino, L.; Schwartz, B.S.; Enright, M.C.; O'Hanlon, J.; Thomas, J.C.; Perdreau-Remington, F.; Gordon, S.; Gunthorpe, H.; Jacobs, R.; Jensen, P.; Leoung, G.; Rumack, J.S. y Chambers H. F. (2008) *A population-based study of the incidence and molecular epidemiology of methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** disease in San Francisco, 2004-2005*. Clin. Infect. Dis. 46: 1637 - 1646.

- Lodise, T.P.; Graves, J.; Evans, A.; Graffunder, E.; Helmecke, M.; Lomaestro, B.M. y Stellrecht, K. (2008) *Relationship between vancomycin MIC and failure among patients with methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** bacteremia treated with vancomycin*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 3315 - 3320.
- Lodise, T.P.; McKinnon, P.S.; Levine, D.P. y Rybak, M.J. (2007) *Impact of empirical-therapy selection on outcomes of intravenous drug users with infective endocarditis caused by methicillin-susceptible **Staphylococcus aureus***. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 3731 - 3733.
- Löffler, B.; Hussain, M.; Grundmeier, M.; Brück, M.; Holzinger, D.; Varga, G.; Roth, J.; Kahl, B.C.; Procto, R.A. y Peters, G. (2010) ***Staphylococcus aureus** Panton-Valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils*. *PLoS Pathog.* 6: e1000715.
- Lorenz, R.; Méndez, E.delosA.; Ahumada, C.; Nagel, A.; Ramos, C.; Mendosa, M.A.; Nardín, M.E.; Morano, S. y Mollerach, A. (2006) *Evaluación de placas de screening de cefoxitina y cefotaxima para la detección de resistencia a meticilina en **Staphylococcus aureus***. *Rev. Arg. Microbiol.* 38: 152 - 154.
- Lowy, F.D. (2003) *Antimicrobial resistance: the example of **Staphylococcus aureus***. *J. Clin. Invest.* 111: 1265 - 1273.
- Lozniewski, A.; Lion, C.; Mory, F. y Weber, M. (2001) *In vitro synergy between cefepime and vancomycin against methicillin-susceptible and resistant **Staphylococcus aureus** and **Staphylococcus epidermidis***. *J. Antimicrob. Chemother.* 47: 83 - 86.
- Ludwig, W.; Schleifer, K.H. y Whitman W.B. (2009) *Class I. Bacilli class nov.* En: *Manual of Systematic Bacteriology. Vol.3. The Firmicutes* (Eds.: De Vos, P.; Garrity, G. M.; Jones, J.; Krieg, N. R.; Ludwig, W.; Rainey, F. A.; Schleifer, K. H. y Whitman, W. B.) Springer, New York, NY, USA, p. 19-20.

- Ma, X.X.; Ito, T.; Chongtrakool, P. y Hiramatsu, K. (2006) *Predominance of clones carrying Panton-Valentine leukocidin genes among methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** strains isolated in Japanese hospitals from 1979 to 1985*. J. Clin. Microbiol. 44: 4515 - 4527.
- Marchiaro, P.; Ballerini, V.; Spalding, T.; Cera, G.; Mussi, M.A.; Morán-Barrio, J.; Vila, A.J.; Viale, M.A. y Limansky, A.S. (2008) *A convenient microbiological assay employing cell-free extracts for the rapid characterization of Gram-negative carbapenemase producers*. J. Antimicrob. Chemother. 62: 336 - 344.
- Maslow, J.N.; Mulligan, M.E. y Arbeit, R.D. (1993) *Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms*. Clin. Infect. Dis. 17: 153 - 164.
- Masuda, G. y Tomioka, S. (1978) *Quantitative assessment of bactericidal activities of β -lactam antibiotics studied by agar plate method*. Antimicrob. Agents Chemother. 14: 587 - 595.
- May, J.; Shannon, K.; King, A. y French, G. (1998) *Glycopeptide tolerance in **Staphylococcus aureus***. J. Antimicrob. Chemother. 42: 189 - 197.
- McDonald, L.C. (2006) *Trends in antimicrobial resistance in health care-associated pathogens and effect on treatment*. Clin. Infect. Dis. 42: S65 - S71.
- Méndez, E.delosA.; Bande, J.; Nagel, A.; Ahumada, C.; Baroni, M.R.; Mendosa, M.A.; Bodrone, R.; Lurá, M.C. y Sutich, E. *Vancomycin bactericidal activity against community-acquired methicillin – resistant **Staphylococcus aureus** in adults without risk factors and its relationship with leukocidin production*. 49th. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Francisco, California, Estados Unidos de Norteamérica, 12 al 15 de setiembre de 2009a, Abstract L1 - 1671.

- Méndez, E.delosA.; Mayoral, C.; Nagel, A.; Mollerach, A. y Girolamo, J. *Combinación de técnicas en la detección de S. aureus meticilino-resistentes (SAMR)*. VII Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires, Argentina, 8 al 11 de mayo de 1995, L3.
- Méndez, E.delosA.; Mayoral, C.; Nagel, A.; Ronchi, S.; Morano, S.; Mollerach, A.; Aranda, S. y Gueler, J. *Determinación de meticilino-resistencia en S.aureus*. Tercer Congreso Internacional de SADEBAC. Buenos Aires, Argentina, 27 al 30 de setiembre de 1993, O2.
- Méndez, E.delosA.; Mendosa, M.A.; Mollerach, A.; Ahumada, C.; Lurá, M.C. y Sutich, E. *Methicillin susceptible Staphylococcus aureus: cephalotin bactericidal activity detection with oxacillin and cefoxitin disks*. 49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Francisco, California, Estados Unidos de Norteamérica, 12 al 15 de setiembre de 2009b, Abstract D - 792.
- Méndez, E.delosA.; Nagel, A.; Bande, J.; Ahumada, C.; Baroni, M.R.; Mendosa, M.A.; Bodrone. R.; Lurá, M.C. y Sutich, E. (2011) *Vancomycin bactericidal activity against community acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus and its relationship with Panton-Valentine leukocidin production*. Rev. Panam. Infectol. 13: 12 - 16.
- Méndez, E.delosA.; Nagel, A.; Bande, J.; Lurá, M.C. y Sutich, E. (2010) *Actividad bactericida y detección de tolerancia de Staphylococcus aureus meticilino resistentes a vancomicina*. Rev. Arg. Microbiol. 42 (Supl.1): p. 157.
- Méndez, E.delosA.; Pérez, L.; Mollerach, A.S.; Ahumada, C.; Lurá, M.C. y Sutich, E. *Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus: a simple methodology to detect cephalotin bactericidal activity*. 48th Annual ICAAC/IDSA 46th Annual Meeting. Washington, DC, Estados Unidos de Norteamérica, 25 al 28 de octubre de 2008, p. 250.
- Méndez, E.delosA.; Pérez, L.; Mollerach, A.S.; Lurá, M.C. y Sutich, E. (2007)

- Tolerancia a cefalotina en Staphylococcus aureus meticilino sensibles.* Rev. Arg Microbiol. 39 (Supl.1): p. 110.
- Mohr, J.F. (2008) *Update on the efficacy and tolerability of meropenem in the treatment of serious bacterial infections.* Clin. Infect. Dis. 47(Supl.1): S41 - S51.
 - Mohr, J.F. y Murray, B.E. (2007) *Point: vancomycin is not obsolete for the treatment of infection caused by methicillin resistant Staphylococcus aureus.* Clin. Infect. Dis. 44: 1536 - 1542.
 - Mollerach, A.; Allignani, L.; Nagel, A.; Mendosa, M.A.; Bodrone, R.; Ramírez, R. y Méndez E.delosA. (2010) *Investigación de Staphylococcus aureus con sensibilidad intermedia y hetero-intermedia a vancomicina; aplicación del método de predifusión con tabletas y discos de papel.* Rev. Arg. Microbiol. 42 (Supl.1): p. 163.
 - Mollerach, M. (2008) *Bases genéticas de la resistencia a los antibacterianos.* En: *Curso de Microbiología clínica. Antimicrobianos* (Eds.: Publicaciones Latinoamericanas S.R.L) Buenos Aires, Argentina, p. 105-112.
 - Montesinos, I.; Salido, E.; Delgado, T.; Cuervo, M. y Sierra, A. (2002) *Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms.* J. Clin. Microbiol. 40: 2119 - 2125.
 - Moore, P.C. y Lindsay, J.A. (2002) *Molecular characterization of the dominant UK methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains, EMRSA-15 and EMRSA-16.* J. Med. Microbiol. 51: 516 - 521.
 - Moreillon, P.; Que, Y.A. y Glauser, M.P. (2006) *Staphylococcus aureus (incluido el síndrome del shock tóxico).* En: *Enfermedades infecciosas. Principios y prácticas* (Eds.: Mandell G. L.; Bennett, J. E.; Dolé, R.) Elsevier España S.A., Madrid, España, p. 2321 - 2351.

- Moscoso, M.; Domenech, M. y García, E. (2010) *Vancomycin tolerance in clinical and laboratory **Streptococcus pneumoniae** isolates depends on reduced enzyme activity of the major LytA autolysin or cooperation between CiaH histidine kinase and capsular polysaccharide.* Mol. Microbiol. 77: 1052 - 1064.
- Mothershed, E.A. y Whitney, A.M. (2006) *Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: present and future considerations for the clinical laboratory.* Clin. Chim. Acta 363: 206 - 220.
- Muller-Serieys, C.; Mghir, A.S.; Massias, L. y Fantin, B. (2009) *Bactericidal activity of the combination of levofloxacin with rifampin in experimental prosthetic knee infection in rabbits due to methicillin-susceptible **Staphylococcus aureus**.* Antimicrobial. Agents and Chemother. 53: 2145 - 2148.
- Muñoz, P.; Hortal, J.; Giannella, M.; Barrio, J.M.; Rodríguez-Créixems, M.; Pérez, M.J.; Rincón, C. y Bouza, E. (2008) *Nasal carriage of **S. aureus** increases the risk of surgical site infection after major heart surgery.* J. Hosp. Infect. 68: 25 - 31.
- Murakami, K.; Minamide, W.; Wada, K.; Nakamura, E.; Teraoka, H. y Watanabe, S. (1991) *Identification of methicillin-resistant staphylococci by polymerase chain reaction.* J. Clin. Microbiol. 29: 2240 - 2244.
- Naber, C.K. y Erbel, R. (2007) *Infective endocarditis with negative blood cultures.* Int. J. Antimicrob. Agents. 30: 32 - 36.
- Nagel, A.; Mendosa, M.A.; Ramírez, R.; Mollerach, A.; Baroni, M.R.; Cristóbal, S.; Morera, G.; Méndez E.delosA. (2010) *Evaluación de la sensibilidad a mupirocina de **Staphylococcus aureus** de portadores nasales prequirúrgicos. Impacto clínico.* Rev. Arg. Microbiol. 42(Supl.1): p. 235.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1987) *Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Document M26-P.* NCCLS. 7(2): 35 - 76.

- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1990) *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically—second edition: Approved Standard M7-A2*. NCCLS, Villanova, PA.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1993) *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically—third edition: Approved Standard M7-A3*. NCCLS, Villanova, PA.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1999a) *Methodology for the serum bactericidal test. Approved Guideline. Document M21-A*. NCCLS, Villanova, Pa.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1999b) *Methods for determining bactericidal activity of antibacterial agents; approved guideline NCCLS document M26-A*. NCCLS, Wayne, Pa.
- National Nosocomial Infections Surveillance System. (2004) *National nosocomial infections surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004*. Am. J. Infect. Control 32: 470 - 485.
- Neoh, H.M.; Hori, S.; Komatsu, M.; Oguri, T.; Takeuchi, F.; Cui, L. y Hiramatsu, K. (2007) *Impact of reduced vancomycin susceptibility on the therapeutic outcome of MRSA bloodstream infections*. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 6: 13.
- Nicola, F. (2008) *Pruebas de sensibilidad a los antibacterianos*. En: *Curso de Microbiología clínica. Antimicrobianos*. (Eds.: Publicaciones Latinoamericanas S.R.L) Buenos Aires, Argentina, p. 47-55.
- Nishino, T. y Nakazawa, S. (1976) *Bacteriological study on effects of b-lactam group antibiotics in high concentrations*. Antimicrob. Agents Chemother. 9: 1033 - 1042..

- Norbury, W.B.; Gallagher, J.J.; Herndon, D.N.; Branski, L.K.; Oehring, P.E. y Jeschke, M.G. (2010) *Neonate twin with staphylococcal scalded skin syndrome from a renal source*. *Pediatr. Crit. Care Med.* 11: e20 - 3.
- Noskin, G.A.; Rubin, R.J.; Schentag, J.J.; Kluytmans, J.; Hedblom, E.C.; Smulders, M.; Lapetina, E. y Gemmen, E. (2005) *The burden of **Staphylococcus aureus** infections on hospitals in the United States: an analysis on the 2000 and 2001 nationwide inpatient sample database*. *Arch. Intern. Med.* 165: 1756 - 1761.
- Obando, I.; Croche, B.; Madrid, D. y Neth, O. (2011) *Osteomielitis aguda por **Staphylococcus aureus** sensible a la meticilina productor de leucocidina de Panton-Valentine asociada a trombosis venosa profunda y embolismos sépticos pulmonares en dos pacientes pediátricos*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 29: 550 - 551.
- Ogston, A. (1833) *Micrococcus poisoning*. *J. Anat. Physiol.* 17: 24 - 58.
- Oliveira, G.A.; Okada, S.S.; Guenta, R.S. y Mamizuka, E.M. (2001) *Evaluation of the tolerance to vancomicina in 395 oxacillin-resistant **Staphylococcus aureus** strains isolated from Brazilian hospitals*. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 37: 239 - 246.
- Otter, J.A. y French, G.L. (2011) *Community-associated meticillin-resistant **Staphylococcus aureus** strains as a cause of healthcare-associated infection* *J. Hosp. Infect.* 79: 189 – 193.
- Palombarini, S.; Gardella, N.; Tuduri, A.; Figueroa, S.; Sly, G.; Corazza, R.; Gutkind, G.; Almuzara, M. y Mollerach, M. (2007) *Infecciones adquiridas en la comunidad por **Staphylococcus aureus** resistente a meticilina en un hospital de agudos*. *Rev. Argent. Microbiol.* 39: 151 - 155.
- Pankey, G.A. y Sabath, L.D. (2004) *Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram positive bacterial infections*. *Clin. Infect. Dis.* 38: 864 - 870.

- Panton, P.N.; Came, M.B.; Valentine, F.C.O. y Lond, M.R.C.P. (1932a) *Staphylococcal toxin*. Lancet. i:506 - 508.
- Panton, P. y Valentine, F. (1932b) *Staphylococcal toxin*. Lancet. 222: 506 - 508.
- Pasticci, M.B.; Moretti, A.; Stagni, G.; Ravasio, V.; Soavi, L.; Raglio, A.; Vailati, F.; Cardaccia, A.; Santucci, A.; Papili, R.; Sgrelli, A.; Pallotto, C. y Baldelli, F. (2011) *Bactericidal activity of oxacillin and glycopeptides against **Staphylococcus aureus** in patients with endocarditis: looking for a relationship between tolerance and outcome*. Ann. Clin. Microb. Antimicrob. 10: 26 - 29.
- Peng, D.F.; Sugihara, H.; Mukaisho, K., Tsubosa, Y. y Hattori, T. (2003) *Alterations of chromosomal copy number during progression of diffuse-type gastric carcinomas: metaphase- and array-based comparative genomic hybridization analyses of multiple samples from individual tumours*. J. Pathol. 201: 439 - 450.
- Perazzi, B.; Camacho, M.; Bombicino, K.; Flores, Z.; Vay, C. y Famiglietti, A. (2010) ***Staphylococcus aureus**: nuevos y antiguos antimicrobianos*. Rev. Arg. Microbiol. 42: 199 - 202.
- Pérez-Roth, E.; Alcoba-Flórez, J.; López-Aguilar, C.; Gutiérrez-González, I.; Rivero-Pérez, B. y Méndez-Álvarez, S. (2010) *Familial furunculosis associated with community-acquired leukocidin-positive methicillin-susceptible **Staphylococcus aureus** ST152*. J. Clin. Microbiol. 48: 329 - 332.
- Perez-Roth, E.; Lorenzo-Diaz, F.; Batista, N.; Moreno, A.; Méndez-Álvarez, S. (2004) *Tracking methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** clones during a 5-year period (1998 to 2002) in a Spanish hospital*. J. Clin. Microbiol. 42: 4649 - 4656.
- Peterson, L.R.; Denny, A.E.; Gerding, D.N. y Hall, W.H. (1980) *Determination of tolerance to antibiotic bactericidal activity on Kirby-Bauer susceptibility plates*. Am. J. Clin. Pathol. 74: 645 - 650.

- Peterson, L.R. y Shanholtzer, C.J. (1992) *Tests for bactericidal effects of antimicrobial agents: technical performance and clinical relevance*. Clin. Microbiol. Rev. 5: 420 - 432.
- Pillai, S.K.; Moellering, R.C. y Eliopoulos, G.M. (2005) *Antimicrobial combinations*. En: *Antibiotics in laboratory medicine* (Eds.: Lorian, V.) Lippincot Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA, p. 365-424.
- Pillai, S.K.; Wennersten, C.; Venkataraman, L.; Eliopoulos, G.M.; Moellering, R.C. y Karchmer, A.W. (2009) *Development of reduced vancomycin susceptibility in methicillin-susceptible **Staphylococcus aureus***. Clin. Infect. Dis. 49: 1169 - 1174.
- Pitz, A.M.; Yu, F.; Hermsen, E.D.; Rupp, M.E.; Fey, P.D. y Olsen, K.M. (2011) *Vancomycin susceptibility trends and prevalence of heterogeneous vancomycin-intermediate **Staphylococcus aureus** in clinical methicillin-resistant **S. aureus** isolates*. J. Clin. Microbiol. 49: 269 - 274.
- Ponessa, A.; Gambandé, T.; All, L.; Fernández de Arroyabe, G.; Ferrari, M.; Dlugovitzky, D. y Notario, R. (2006) ***Enterococos** vancomicina resistentes: colonización en pacientes hospitalizados, en Rosario, Argentina*. Acta Bioquim. Clin. Latinoam. 40: 499 - 502.
- Pragman, A.A.; Ji, Y. y Schlievert, P.M. (2007) *Repression of **Staphylococcus aureus** SrrAB using inducible antisense srrA alters growth and virulence factor transcript levels*. Biochemistry. 46: 314 - 321.
- Proctor, R.A. (2012) *Challenges for a universal **Staphylococcus aureus** vaccine*. Clin. Infect. Dis. On Line. doi: 10.1093/cid/cis033.
- Rajashekaraiyah, K.R.; Rice, T.; Rao, V.S.; Marsh, D.; Ramakrishna, B. y Kallick, C. (1980) *Clinical significance of tolerant strains of **Staphylococcus aureus** in patients with endocarditis*. Ann. Intern. Med. 93: 796 - 801.

- Rammelkamp, C.H. y Maxon, T. (1942) *Resistance of Staphylococcus aureus to the action of penicillin*. Proc. Royal Soc. Exper. Biol. Med. 51: 386 - 389.

- Ribeiro, A.; Dias, C.; Silva-Carvalho, M.C.; Berquó, L.; Antunes Ferreira, F.; Neves Soares Santos, R.; Ferreira-Carvalho, B.T. y Figueiredo, A.M. (2005) *First report of infection with community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus in South America*. J. Clin. Microbiol. 43: 1985 - 1988.

- Rodríguez, C.A.; Atkinson, R.; Bitar, W.; Whitney, C.G.; Edwards, K.M.; Mitchell, L.; Li, J.; Sublett, J.; Li, C.S.; Liu, T.; Chesney, P.J. y Tuomanen, E.I. (2004) *Tolerance to vancomycin in pneumococci: detection with a molecular marker and assessment of clinical impact*. J. Infect. Dis. 190: 1481 - 1487.

- Rodríguez-Noriega, E.; Seas, C.; Guzmán-Blanco, M.; Mejía, C.; Alvarez, C.; Bavestrello, L.; Zurita, J.; Labarca, J.; Luna, C.M.; Salles, M.J.C. y Gotuzzo, E. (2010). *Evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones in Latin America*. Int. J. Infect. Dis. 14: e560-566.

- Rohde, H.; Frankenberger, S.; Zähringer, U. y Mack, D. (2010) *Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to Staphylococcus epidermidis biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections*. Eur. J. Cell. Biol. 89: 103 - 311.

- Rolston, K.; Ho, D.H. y Bodey, G.P. (1989) *In vitro activity of trospectomycin (U-63366F), a novel spectinomycin analog, against Gram-positive isolates from cancer patients*. Eur. J. Clin. Microbiol. 8: 254 - 256.

- Rossi, A.; Galas, M. y Corso, A. (1999). XIII Curso intensivo de actualización en antimicrobianos. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS - Dr. Carlos Malbrán. Servicio de Antimicrobianos. Buenos Aires, República Argentina.

- Rouzic, N.; Janvier, F.; Libert, N.; Javouhey, E.; Lina, G.; Nizou, J.Y.; Pasquier, P.; Stamm, D.; Brinquin, L.; Pelletier, C.; Vandenesch, F.; Floret, D.; Etienne, J. y

- Gillet Y. (2010) *Prompt and successful toxin-targeting treatment of three patients with necrotizing pneumonia due to **Staphylococcus aureus** strains carrying the Panton-Valentine leukocidin genes*. J. Clin. Microbiol. 48: 1952 - 1955.
- Rybak, M.J. (2006) *Pharmacodynamics: relation to antimicrobial resistance*. Am. J. Med. 119: 37 - 44.
 - Sabath, L.D.; Laverdiere, M.; Wheeler, N.; Blazevic, D. y Wilkinson, B.J. (1977) *A new type of penicillin resistance of **Staphylococcus aureus***. Lancet. 1: 443 - 446.
 - Sader, H.S.; Fritsche, T.R. y Jones, R.N. (2006) *Daptomycin bactericidal activity and correlation between disk and broth microdilution method results in testing of **Staphylococcus aureus** strains with decreased susceptibility to vancomycin*. Antimicrob. Agents Chemother. 50: 2330 - 2336.
 - Safdar, A. y Rolston, K.V.I. (2006) *Vancomycin tolerance, a potential mechanism for refractory gram-positive bacteremia observational study in patients with cancer*. Cancer. 106: 1815 - 1820.
 - Saha, B.; Singh, A.K.; Ghosh, A. y Bal, M. (2008) *Identification and characterization of a vancomycin-resistant **Staphylococcus aureus** isolated from Kolkata (South Asia)*. J. Med. Microbiol. 57: 72 - 79.
 - Saïd-Salim, B.; Mathema, B.; Braughton, K.; Davis, S.; Sinsimer, D.; Eisner, W.; Likhoshvay, Y.; DeLeo, F.R. y Kreiswirth, B.N. (2005) *Differential distribution and expression of Panton-Valentine leukocidin among community-acquired methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** strains*. J. Clin. Microbiol. 43: 3373 - 3379.
 - Sakoulas, G. y Moellering, R.C. (2008) *Increasing antibiotic resistance among methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** strains*. Clin. Infect. Dis. 46: S360 - S367.

- Sakoulas, G.; Moise-Broder, P.A.; Schentag, J.; Forrest, A.; Moellering, R.C. y Eliopoulos, G.M. (2004) *Relationship of MIC and bactericidal activity to efficacy of vancomycin for treatment of methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** bacteremia*. J. Clin. Microbiol. 42: 2398 - 2402.
- Satola, S.W.; Farley, M.M.; Anderson, K.F. y Patel, J.B. (2011) *Comparison of detection methods for heteroresistant vancomycin-intermediate **Staphylococcus aureus**, with the population analysis profile method as the reference method*. J. Clin. Microbiol. 49: 173 - 183.
- Sawai, T.; Takahashi, I. y Yamagishi, S. (1978) *Iodometric assay method for beta-lactamase with various beta-lactam antibiotics as substrates*. Antimicrob. Agents and Chemother. 13: 910 - 913.
- Scallan, E.; Hoekstra, R.M.; Angulo, F.J.; Tauxe, R.V.; Widowsson, M.A.; Roy, S.L.; Jones, J.L. y Griffin, P.M. (2011) *Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens*. Emerg. Infect. Dis. 17: 7 - 15.
- Schilchter, J.G. y MacLean, H. (1947) *A method for determining the effective therapeutic level in the treatment of subacute bacterial endocarditis with penicillin: a preliminary report*. Am. Heart J. 34: 209 - 211.
- Scott, J.R. y Barnett, T.C. (2006) *Surface proteins of gram-positive bacteria and how they get there*. Annu. Rev. Microbiol. 60: 397 - 423.
- Sculier, J.P. y Klastersky, J. (1984) *Significance of serum bactericidal activity in gram-negative bacillary bacteremia in patients with and without granulocytopenia*. Am. J. Med. 76: 429 - 435.
- Sdougkos, G.; Chini, V.; Papanastasiou, D.A.; Christodoulou, G.; Stamatakis, E.; Vris, A. y Christodoulidi, I. (2008) *Community-associated **Staphylococcus aureus** infections and nasal carriage among children: molecular microbial data and clinical characteristics*. Clin. Microbiol. Infect. 14: 995 - 1001.

- Sethi, A.K.; Al-Nassir, W.N.; Nerandzic, M.M. y Donskey, C.J. (2009) *Skin and environmental contamination with vancomycin-resistant **Enterococci** in patients receiving oral metronidazole or oral vancomycin treatment for **Clostridium difficile**-associated disease.* Infect. Control Hosp. Epidemiol. 30: 13 - 17.
- Shastry, L.; Rahimian, J. y Lascher, S. (2007) *Community associate methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** skin and soft tissue infection in men who have sex with men in New York City.* Arch. Intern. Med. 167: 854 - 857.
- Shelburne, S.A.; Musher, D.M.; Hulten, K.; Ceasar, H.; Lu, M.Y.; Bhaila, I. y Hamill, R.J. (2004) *In vitro killing of community-associated methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** with drug combinations.* Antimicrob. Agents and Chemother. 48: 4016 - 4019.
- Shen, K.A.; Meyers, B.C.; Islam-Faridi, M.N.; Chin, D.B.; Stelly, D.M. y Michelmore, R.W. (1998) *Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to clusters of resistance genes in lettuce.* Mol. Plant. Microbe Interact. 11: 815 - 823.
- Shor, A.F.; Tabak, Y.P.; Killian, A.D.; Gupta, V.; Liu, L.Z. y Kollef, M.H. (2006) *Healthcare-associated bloodstream infection: a distinct entity? Insights from a large U.S. database.* Crit. Care Med. 34: 2588 - 2595.
- Silver, L.L. (2011) *Challenges of antibacterial discovery.* Clin. Microbiol. Rev. 24: 71 - 109.
- Small, P.M. y Chambers, H.F. (1999) *Vancomycin for **Staphylococcus aureus** endocarditis in intravenous drug users.* Antimicrob. Agents Chemother. 34: 1227 - 1231.
- Smith, R.P.; Baltch, A.L.; Hammer, M.C. y Conroy, J.V. (1988) *In vitro activities of PD 117,596 and reference antibiotics against 448 clinical bacterial strains.* Antimicrob. Agents and Chemother. 32: 1450 - 1455.

- Sola, C.; Cortes, P.; Saka, H.A.; Vindel, A. y Bocco, J.L. (2006) *Evolution and molecular characterization of methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** epidemic and sporadic clones in Córdoba, Argentina*. J. Clin. Microbiol. 44: 192 - 200.
- Sola, C., Saka, H.A.; Vindel, A. y Bocco, J.L. (2008) *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. 46: 1826 - 1831.
- Soloaga, R.; Corso, A.; Gagetti, P.; Faccone, D.; Galas, M. y Grupo colaborador MRSA. (2004) *Detección de metilino-resistencia en **Staphylococcus aureus**: comparación de métodos convencionales y aglutinación con MRSA-Screen late*. Rev. Arg. Microbiol. 36: 36 - 40.
- Stevens, D.L.; Ma, Y.; Salmi, D.B.; McIndoo, E.; Wallace, R.J. y Bryant, A.E. (2007) *Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant **Staphylococcus aureus***. J. Infect. Dis. 195: 202 - 211.
- Stratton, C.W. (2003) *Dead bugs don't mutate: susceptibility issues in the emergence of bacterial resistance*. Emerg. Infect. Dis. 9: 10 - 16.
- Stryjewski, M.E.; Szczech, L.A.; Benjamin, D.K.; Inrig, J.K.; Kanafani, Z.A.; Engemann, J.J.; Chu, V.H.; Joyce, M.J.; Reller, L.B.; Corey, G.R. y Fowler, V.G. (2007) *Use of vancomycin or first-generation cephalosporins for the treatment of hemodialysis-dependent patients with methicillin-susceptible **Staphylococcus aureus** bacteremia*. Clin. Inf. Dis. 44: 190 - 196.

- Talaie, H.; Jabari, H.R.; Shadnia, S.; Pajouhmand, A.; Nava-Ocampo, A.A. y Youssefi, M. (2008) *Cefepime/clindamycin vs. ceftriaxone/clindamycin for the empiric treatment of poisoned patients with aspiration pneumonia*. Acta Biomed. 79: 117 - 122.

- Tallent, S.M.; Langston, T.B.; Moran, R.G. y Christie, G.E. (2007) *Transducing particles of **Staphylococcus aureus** pathogenicity island SaPII are comprised of helper phage-encoded proteins*. J. Bacteriol. 189: 7520 - 7524.

- Tan, T.Y.; Lim, T.P.; Lee, W.H.L.; Sasikala, S; Li, Y.H. y Kwa, A.L.H. (2010) *In vitro antibiotic synergy in extensively drug-resistant **Acinetobacter baumannii**: the effect of testing by time-kill, checkerboard, and E-test methods*. Antimicrob. Agents Chemother. 55: 436 - 438.

- Tang, J.; Kang, M.; Chen, H.; Shi, X.; Zhou, R.; Chen, J. y Du, Y. (2011) *The staphylococcal nuclease prevents biofilm formation in **Staphylococcus aureus** and other biofilm-forming bacteria*. Sci. China Life. Sci. 54: 863 - 869.

- Telenius, H.; Carter, N.P.; Bebb, C.E.; Nordenskjöld, M.; Ponder, B.A. y Tunnacliffe, A. (1992) *Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer*. Genomics. 13: 718 - 725.

- Tenover, F. C. (2006) *Community-associated methicillin-resistant **Staphylococcus aureus**: it's not just in communities any more*. Clin. Microbiol. News. 28: 33 - 36.

- Tenover, F.C.; Arbeit, R.; Archer, G.; Biddle, J.; Byrne, S.; Goering, R.; Hancock, G.; Hébert, G.A.; Hill, B. y Hollis, R. (1994) *Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of **Staphylococcus aureus***. J. Clin. Microbiol. 33: 407 - 415.

- Tenover, F.C.; McAllister, S.; Fosheim, G.; McDougal, L.K.; Carey, R.B.; Limbago, B.; Lonsway, D.; Patel, J.B.; Kuehnert, M.J. y Gorwitz, R. (2008)

- Characterization of Staphylococcus aureus isolates from nasal cultures collected from individuals in the United States in 2001 to 2004. J. Clin. Microbiol. 46: 2837 - 2841.*
- Tiemersma, E.W.; Bronzwaer, S.L.; Lyytikäinen, O.; Degener, J.E.; Schrijnemakers, P.; Bruinsma, N.; Monen, J.; Witte, W.; Grundmann, H. y European Antimicrobial Resistance Surveillance System Participants. (2004) *Methicillin resistant Staphylococcus aureus in Europe, 1999–2002. Emerg. Infect. Dis. 10: 1627 - 1634.*
 - Tomasz, A.; Albino, A. y Zanati, E. (1970) *Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system. Nature. 227: 138 - 140.*
 - Totsuka, K.; Shiseki, M.; Kikuchi, K. y Marsui, Y. (1999) *Combined effects of vancomycin and imipenem against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in vitro and in vivo. J. Antimicrob. Chemother. 44: 455 - 460.*
 - Toumanem, E. (1986) *Phenotypic tolerance: the search for β -Lactam antibiotics that kill nongrowing bacteria. Rev. Inf. Dis. 8 (Suppl.3): S279 - S291.*
 - Traber, K.E.; Lee, E.; Benson, S.; Corrigan, R.; Cantera, M.; Shopsin, B. y Novick, R.P. (2008) *agr function in clinical Staphylococcus aureus isolates. Microbiology. 154: 2265 - 2274.*
 - Traczewski, M.M.; Bradley, D.K.; Steenbergen, J.N. y Brown, S.D. (2009) *Inhibitory and bactericidal activities of daptomycin, vancomycin, and teicoplanin against methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates collected from 1985 to 2007. Antimicrob. Agents Chemother. 53: 1735 - 1738.*
 - Traversa, F.; Peluffo, M.; Louge, M.; Funaro, F.; Suasnabar, R. y Cepeda, R. (2010) *Impacto de la resistencia a la meticilina sobre la mortalidad y vigilancia de la sensibilidad a la vancomicina en bacteriemias causadas por Staphylococcus aureus. Rev. Arg. Microbiol. 42: 274 - 278.*

- Trindale, P.A.; Mc Culloch, J.A.; Oliveira, G.A. y Mamizuka, E.M. (2003) *Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives*. BJID. 7: 32 - 43.
- Turnidge, J. y Paterson, D.L. (2007) *Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints*. Clin. Microbiol. Rev. 20: 391 - 408.
- Utaida, S.; Pfeltz, R.F.; Jayaswal, R.K. y Wilkinson, B.J. (2006) *Autolytic properties of glycopeptide-intermediate **Staphylococcus aureus** Mu50*. Antimicrob. Agents Chemother. 50: 1541 - 1545.
- Utsui, Y. y Yokota, T. (1985) *Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin and cephem-resistant **Staphylococcus aureus***. Antimicrob. Agents Chemmother. 28: 397 - 403.
- Valsesia, G.; Rossi, M.; Bertschy, S. y Pfyffer, G.E. (2010) *Emergence of SCCmec type IV and SSC mec type V methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** containing the Panton-Valentine leukocidin genes in a large academic teaching hospital in central Switzerland: external invaders or persisting circulators?*. J. Clin. Microbiol. 48: 720 - 727.
- van Belkum, A.; Kluytmans, J.; van Leeuwen, W.; Bax, R.; Quint, W.; Peters, E.; Fluit, A.; Vandenbroucke-Grauls, C.; van den Brule, A. y Koeleman, H. (1995) *Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing **Staphylococcus aureus** strains*. J. Clin. Microbiol. 33: 1537 - 1547.
- Van de Velde, H. (1894) *E'tude sur la me'canisme de la virulence du staphylocoque pyoge'ne*. Cellule. 10: 402 - 460.
- Vanhee, L.M.; Symoens, F.; Jacobsen, M.D.; Nelis, H.J. y Coenye, T. (2009) *Comparison of multiple typing methods for **Aspergillus fumigatus***. Clin Microbiol. Infect. 15: 643 - 650.

- Varshney, A.K.; Martinez, L.R.; Hamilton, S.M.; Bryant, A.E.; Levi, M.H.; Gialanella, P.; Stevens, D.L. y Fries, B.C. (2010) *Augmented production of Panton-Valentine leukocidin toxin in methicillin-resistant and methicillin-susceptible **Staphylococcus aureus** is associated with worse outcome in a murine skin infection model.* J. Infect. Dis. 201: 92 - 96.
- Vaudaux, P. y Lew, D.P. (2006) *Tolerance of staphylococci to bactericidal antibiotics.* Injury-Int. J. Care Inj. 37: S15 - S19.
- Vázquez, J.A. y Berrón, S. (2004) *Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de Internet.* Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 22: 113 - 120.
- Verkaik, N.J.; van Wame, W.J.B. y van Belkum, A. (2011) *Immunotherapeutic approaches against **Staphylococcus aureus**.* Immunotherapy. 3: 1063 - 1073.
- Vila, J.; Marcos, M.A. y Jiménez de Anta, M.T. (1996) *A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of **Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii** complex.* J. Med. Microbiol. 44: 482 - 489.
- Vindel, A.; Cuevas, O.; Cercenado, E.; Marcos, C.; Bautista, V.; Castellares, C.; Trincado, P.; Boquete, T.; Pérez-Vázquez, M.; Marín, M.; Bouza, E. y Spanish Group for the study of **Staphylococcus**. (2009) *Methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** in Spain; molecular epidemiology and utility of different typing methods.* J. Clin. Microbiol. 47: 1620 - 1627.
- Vindel, A.; Trincado, P.; Gomez, E.; Cabrera, R.; Boquete, T.; Sola, C.; Valdezate, S.; Saez-Nieto, J.A. (2006) *Prevalence and evolution of methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** in Spanish hospitals between 1996 and 2002.* J. Clin. Microbiol. 44: 266 - 270.
- von Eiff, C.; Becker, K.; Machka, K.; Stammer, H. y Peters, G. (2001) *Nasal carriage as a source of **Staphylococcus aureus** bacteremia.* Study Group. N. Engl. J. Med. 344: 11 - 16.

- von Specht, M.; Gardella, N.; Tagliaferri, P.; Gutkind, G. y Mollerach, M. (2006) *Methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** in community-acquired meningitis*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 25: 267 - 269.
- Voorn, G.P.; Thompson, J.; Goessens, W.H.; Schmal-Bauer, W.C.; Broeders, H.M. y Michel, M.F. (1992) *Role of tolerance in cloxacillin prophylaxis of experimental **Staphylococcus aureus** endocarditis*. J. Infect. Dis. 166: 169 – 173.
- Voorn, G.P.; Thompson, J.; Goessens, W.H.; Schmal-Bauer, W.C.; Broeders, H.M. y Michel, M.F. (1994) *Paradoxical dose effect of continuously administered cloxacillin in treatment of tolerant **Staphylococcus aureus** endocarditis in rats*. J. Antimicrob. Chemother. 33: 585 - 593.
- Voyich, J.M.; Otto, M.; Mathema, B.; Braughton, K.R.; Whitney, A.R.; Welty, D.; Long, R.D.; Dorward, D.W.; Gardner, D.J.; Lina, G.; Kreiswirth, B.N. y DeLeo, F.R. (2006) *Is Panton-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** disease?*. J. Infect. Dis. 194: 1761 - 1770.
- Walsh, T.J.; Auger, F.; Tatem, B.A.; Hansen, S.L. y Standiford, H.C. (1986) *Novobiocin and rifampicin in combination against methicillin-resistant **Staphylococcus aureus**: an in-vitro comparison with vancomycin plus rifampicin*. J. Antimicrob. Chemother. 17: 75 - 82.
- Walsh, T.R. y Howe, R.A. (2002) *The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in **Staphylococcus aureus***. Annu. Rev. Microbiol. 56: 657 - 675.
- Wang, X.J.; Du, G.J.; Zhao, S.Q.; Yan, M. y Gu, L.Q. (2009) *Synthesis and antibacterial activity of a series of alpha-substituted acetylpiperazinyl oxazolidinones*. Chem. Biol. Drug Des. 74: 276 - 281.
- Ward, P.D. y Turner, W.H. (1980) *Identification of staphylococcal Panton-Valentine leukocidin as a potent dermonecrotic toxin*. Infect. Immun. 28: 393 - 397.

- Wardenburg, J.B.; Palazzolo-Balance, A.M.; Otto, M.; Schneewind, O. y DeLeo, F. R. (2008) *Panton-Valentine leukocidin is not a virulence determinant in murine models of community-associated methicillin-resistant **Staphylococcus aureus***. J. Infect. Dis. 198: 1166 - 1170.
- Weinstein, M.P.; Stratton, C.W.; Hawley, H.B.; Ackley, A. y Reller, L.B. (1987) *Multicenter collaborative evaluation of a standardized serum bactericidal test as a predictor of therapeutic efficacy in acute and chronic osteomyelitis*. Am. J. Med. 83: 218 - 222.
- Welsh, J. y McClelland, M. (1993) *The characterization of pathogenic microorganisms by genomic fingerprinting using arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR)*. En: *Diagnostic molecular microbiology* (Eds.: Persing, D. H.; Smith, T. F.; Tenover, F. C. y White, T. J.) ASM Press, Washington, DC , USA, p. 595-602.
- Wenzel, R.P.; Bearman, G. y Edmond, M.B. (2008) *Screening for MRSA: A flawed hospital infection control intervention*. Inf. Control Hosp. Epidemiol. 29: 1012 - 1018.
- Wiedemann, B. y Grimm, H. (1996) *Susceptibility to antibiotics: species incidence and trends*. En: *Antibiotics in laboratory medicine* (Eds.: Lorian, V.) Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA, p. 900-1168.
- Wikler, M.A. y Ambrose, P.G. (2005) *The breakpoint*. En: *Antibiotics in laboratory medicine* (Eds.: Lorian, V.) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA, p. 1-7.
- Wilcox, M.; Nathwani, D. y Dryden, M. (2004) *Linezolid compared with teicoplanin for the treatment of suspected or proven Gram-positive infections*. J. Antimicrob. Chemother. 53: 335 - 344.

- Wisplinghoff, H.; Bischoff, T.; Tallent, S.M.; Seifert, H.; Wenzel, R.P. y Edmond, M.R. (2004) *Nosocomial bloodstream infections in US hospitals análisis of 24179 cases from a prospective nation wide surveillance study*. Clin. Infect. Dis. 118: 1416.
- Yourassowsky, E.; Vanderlinden, M.P.; Lismont, M.J. y Schoutens, E. (1975) *Paradoxical action of penicillin G on **Staphylococcus aureus**: a time study of the effect of a zonal antibiotic concentration gradient on bacterial growth*. Antimicrob. Agents Chemother. 8: 262 - 265.
- Yzerman, E.P.; Boelens, H.A.; Vogel, M. y Verbrugh, H.A. (1998) *Efficacy and safety of teicoplanin plus rifampicin in the treatment of bacteraemic infections caused by **Staphylococcus aureus***. J. Antimicrob. Chemother. 42: 233 - 239.
- Zeana, C.; Kubin, C.; Della-Latta, P. y Hammer, S. (2001) *Vancomycin-resistant **Enterococcus faecium** meningitis successfully managed with linezolid: case report and review of the literature*. Clin. Infect. Dis. 33: 477 - 482.
- Zhanel, G.G.; Lam, A.; Schweizer, F.; Thomson, K.; Walkty, A.; Rubinstein, E.; Gin, A.S.; Hoban, D.J.; Noreddin, A.M. y Karlowsky, J.A. (2008) *Ceftobiprole: a review of a broad-spectrum and anti-MRSA cephalosporin*. Am. J. Clin. Dermatol. 9: 245 - 254.
- Zeller, J.L. y Golub, R.M. (2011) *MRSA infections*. JAMA. 306: 1818.
- Zhang, Y.; Cheng, S.; Ding, G.; Zhu, M.; Pan, X. y Zhan, L. (2011) *Molecular analysis and antibiotic resistance investigation of **Staphylococcus aureus** isolates associated with staphylococcal food poisoning and nosocomial infections*. African. J. Biotech. 10: 2965 - 2972.
- Zurenko, G.E.; Yagi, B.H.; Schaadt, R.D.; Allison, J.W.; Kilburn, J.O.; Glickman, S.E.; Hutchinson, D.K.; Barbachyn, M.R. y Brickner, S.J. (1996) *In vitro activities*

of U-100592 and U-100766, novel oxazolidinone antibacterial agents. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 839 - 845.

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

A) PUBLICACIONES

- Méndez, E.delosA.; Nagel, A.; Bande, J.; Ahumada, C.; Baroni, M.R.; Mendosa, M.A.; Bodrone, R.; Lurá, M.C. y Sutich, E. (2011) *Vancomycin bactericidal activity against community acquired methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** and its relationship with Panton-Valentine leukocidin production*. Rev. Panam. Infectol. 13: 12-16.
- Giusti, A.; Baroni, M.R.; Mendosa M.A.; Nagel, A.; Virgolini, S.; Ochoteco, C.; Mollerach, A.; Roldán, M.L.; Méndez, E.delosA. (2011) *Staphylococcus aureus meticilino-resistente adquiridos en la comunidad: detección de leucocidina de Panton-Valentine y su relación con el sitio de aislamiento en pacientes de la ciudad de Santa Fe-Argentina*. Rev. Panam. Infectol. 13(2): 8 - 11.
- Méndez, E.delosA.; Nagel, A.; Bande, J.; Lurá, M.C. y Sutich, E. (2010) *Actividad bactericida y detección de tolerancia de Staphylococcus aureus meticilino resistentes a vancomicina*. Rev. Arg. Microbiol. 42(Supl.1): p. 157.
- Nagel, A.; Mendosa, M.A.; Ramírez, R.; Mollerach, A.; Baroni, M.R.; Cristóbal, S.; Morera, G.; Méndez E.delosA. (2010) *Evaluación de la sensibilidad a mupirocina de Staphylococcus aureus de portadores nasales prequirúrgicos. Impacto clínico*. Rev. Arg. Microbiol. 42(Supl.1): p. 235.
- Mollerach, A.; Allignani, L.; Nagel, A.; Mendosa, M.A.; Bodrone, R.; Ramírez, R. y Méndez E.delosA. (2010) *Investigación de Staphylococcus aureus con sensibilidad intermedia y hétero-intermedia a vancomicina; aplicación del método de predifusión con tabletas y discos de papel*. Rev. Arg. Microbiol. 42(Supl.1): p. 163.
- Méndez, E.delosA.; Pérez, L.; Mollerach, A.S.; Lurá, M.C. y Sutich, E. (2007) *Tolerancia a cefalotina en Staphylococcus aureus meticilino sensibles*. Rev. Arg. Microbiol. 39 (Supl.1): p. 110.

- Méndez E.delosA, Mendosa, M.A.; Mollerach, A.; Perez, L.; Ahumada, C.; Lurá, M.C. y Sutich, E. *Methicillin susceptible Staphylococcus aureus: a simple methodology to detect cephalothin bactericidal activity*. **En redacción.**

B) PRESENTACIONES EN EVENTOS CIENTÍFICOS

Internacionales

- Méndez, E.delosA.; Pérez, L.; Mollerach, A.S.; Ahumada, C.; Lurá, M.C. y Sutich, E. *Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus: a simple methodology to detect cephalotin bactericidal activity*. 48th Annual ICAAC/IDSA 46th Annual Meeting. Washington, DC, Estados Unidos de Norteamérica, 25 al 28 de octubre de 2008, p. 250.
- Méndez, E.delosA.; Bande, J.; Nagel, A.; Ahumada, C.; Baroni, M.R.; Mendosa, M.A.; Bodrone, R.; Lurá, M.C. y Sutich, E. *Vancomycin bactericidal activity against community-acquired methicillin – resistant Staphylococcus aureus in adults without risk factors and its relationship with leukocidin production*. 49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Francisco, California, Estados Unidos de Norteamérica, 12 al 15 de setiembre de 2009, Abstract L1- 1671.
- Méndez, E.delosA.; Mendosa, M.A.; Mollerach, A.; Ahumada, C.; Lurá, M.C. y Sutich, E. *Methicillin susceptible Staphylococcus aureus: cephalotin bactericidal activity detection with oxacillin and cefoxitin disks*. 49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Francisco, California, Estados Unidos de Norteamérica, 12 al 15 de setiembre de 2009, Abstract D - 792.
- Ezcurra, G.; Baroni, M.R.; Méndez, E.delosA.; Mendosa, M.A.; Virgolini, S.; Berenguer, A.; Fontana, F.; Ailan, J.; Garozzo, M.; Barrera, S.; Sabater, S.; Fiore, J. y Gomez, D. *Methicillin – resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in pediatric patient infections: impact of Panton – Valentine leukocidin (PVL) and its association with epidemiological factors*. 6th World Congress of the World Society for Pediatric Infectious Diseases. Buenos Aires, Argentina, 18 al 22 de noviembre de 2009, Abstract A -181-0002-00597.

- Fosch, S.E.; Yones, C.; Trossero, M.; Nepote, A.; Jordán, D.; Mendosa, M.A.; Giusti, A.; Méndez, E.delosA. *Portación nasal de **Staphylococcus aureus** en individuos de la comunidad: sensibilidad antimicrobiana y asociación con factores epidemiológicos*. XIX Congreso Latinoamericano de Bioquímica Clínica. XVI Congreso Chileno de Química Clínica. Santiago, Chile, 20 al 23 de abril de 2010, p. 117.

Nacionales

- Allignani, L.; Mollerach, A.; Nagel, A.; Mendosa, M.A.; Landolt, N.; Bucci, P.; Zilli, A.; Bodrone, R.; Ramírez, R.; Pérez, L.; Méndez E.delosA. *Métodos para la detección de sensibilidad de vancomicina frente a **Staphylococcus aureus***. 1er. Congreso Bioquímico del Litoral. Santa Fe, Argentina, 9 al 11 de junio de 2011. **Premio al mejor trabajo en el área Bacteriología 6. Evaluación de resistencia y sensibilidad a antimicrobianos.**
- Giusti, A.; Alvarez, C.; Cristóbal, S.; Mendosa, M.A.; Baroni, M.R.; Méndez E. delosA. (2011) *Portación nasal de **Staphylococcus aureus** meticilino resistente en una población estudiantil universitaria*. 1er. Congreso Bioquímico del Litoral. Santa Fe, Argentina, 9 al 11 de junio de 2011, p. 41.
- Cristóbal, S.; Baroni, M.R.; Roldán, M.L.; Mendosa, M.A.; Spagna, A.; Virgolini, S.M.; Méndez E.delosA. *Transmisión familiar de **Staphylococcus aureus** meticilino resistente adquirido en la comunidad. A propósito de un caso*. 1er. Congreso Bioquímico del Litoral. Santa Fe, Argentina, 9 al 11 de junio de 2011, p. 47.
- Landolt, N.; Mollerach, A.; Nagel, A.; Mendosa, M.A.; Corso, A.; Faccione, D.; Méndez E.delosA. *Alerta en el tratamiento con clindamicina en las infecciones por **Staphylococcus aureus***. 1er. Congreso Bioquímico del Litoral. Santa Fe, Argentina, 9 al 11 de junio de 2011, p. 43.
- Giusti, A.; Baroni, M.R.; Mendosa, M.A.; Nagel, A.; Virgolini, S.; Ochoteco, C.; Roldán, M.L.; Méndez E.delosA. ***Staphylococcus aureus** meticilino-resistente adquiridos en la comunidad: detección de leucocidina de Pantón-Valentine y su relación con el sitio de aislamiento en pacientes de la ciudad de Santa Fe*. 5^{to} Expo

Congreso Bioquímico Rosario. Rosario, Santa Fe, Argentina, 3 al 5 de junio de 2010, p. 20. **Premio al mejor trabajo.**