

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

***Staphylococcus aureus* con sensibilidad disminuida a tigeciclina. Análisis de los mecanismos de resistencia involucrados**

Bioq. Melina Elizabeth Herrera

Director de Tesis: Dr. José Di Conza

Co-director de Tesis: Dra. Marta Mollerach

Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Adventista del Plata

Cátedra de Microbiología General. FBCB. UNL

-2017-

AGRADECIMIENTOS

En esta etapa de finalización de la tesis, vienen a mi mente un montón de recuerdos y personas que han pasado por mi vida a lo largo de todos estos años. Este trabajo ha significado mucho esfuerzo y dedicación, pero ha sido sumamente gratificante y enriquecedor, tanto en lo académico como en mi desarrollo personal. Son muchas las personas que de alguna u otra manera colaboraron y permitieron que hoy pueda estar culminado este hermoso desafío. A todos ellos quiero expresar mi especial y sincero agradecimiento.

A mi director, José Di Conza, por aceptar dirigirme en este trabajo y guiarme en el camino de esta tesis, por estar presente en cada momento y por ser una persona muy accesible, y con una gran calidez humana, que tuvo la paciencia y la dedicación para enseñarme, orientarme e incentivar me, siempre dispuesto a resolver cualquier duda o inconveniente que se me planteara.

A mi co-directora, Marta Mollerach, por aceptar formar parte de mi formación y estar a disposición cada vez que lo necesité, siempre con un excelente trato hacia mí, brindando toda su experiencia en el tema que nos dispusimos a investigar. Gracias por el esfuerzo y dedicación, sobre todo en este último tiempo para ayudarme a cumplir con los tiempos de presentación de la tesis.

A Graciela Posse, quien tuve la suerte de conocer cuando ingresé a la Universidad Adventista del Plata para iniciarme en la investigación y que ha formado parte de este equipo de trabajo, con quien he compartido muchos cursos, congresos, proyectos de investigación y actividad docente. Gracias por estar siempre presente para darme una mano en lo que necesitaba.

A Carlos Bantar, quien me dirigió en mi primer proyecto, cuando me estaba iniciando en la investigación, siempre con muy buena predisposición para aclararme todas las dudas, las cuales eran muchas, y por incentivar me a seguir en este camino. Gracias por brindarme todos sus conocimientos y experiencia.

A todos los integrantes del Laboratorio del Sanatorio Adventista del Plata, que siempre me ayudaron y socorrieron con materiales o reactivos para que pudiera continuar con mis ensayos experimentales. Especialmente a Mariana, técnica del Laboratorio de Bacteriología que me cedió su espacio durante el primer año de trabajo, para que pudiera preparar y esterilizar los materiales, cuando todavía no teníamos autoclave en la Facultad, además de estar siempre presente cuando necesité pedirle ayuda.

A todos los miembros de la Cátedra de Microbiología General de la FBCB, UNL, por aceptarme y permitirme realizar gran parte de los ensayos experimentales allí, especialmente a Martín, que siempre estuvo presente para ayudarme en todo lo que hiciera falta.

A Gabriel Gutkind y todos los integrantes del Laboratorio de Resistencia Bacteriana, Cepario, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA. A cada uno de ellos, gracias por brindarme un lugar y poner todo a disposición cada vez que estuve allí, aprendiendo a realizar las distintas técnicas de Biología Molecular. Siempre me sentí como en casa y disfruté mucho cada vez que estuve por allá, cada visita al Cepario ha significado un enorme aprendizaje para mí. Especialmente, debo agradecer a Sabrina Di Gregorio, dedicada también al estudio de *S. aureus*, quien siempre se tomó todo su tiempo para enseñarme y explicarme cada nueva técnica que tenía que llevar a cabo, con toda la mejor onda y buena predisposición. También, por estar siempre dispuesta a ayudarme o sacarme alguna duda cada vez que tengo que consultar algo a la distancia. También, a Silvina Fernandez por su ayuda y tiempo dedicado. No puedo dejar de agradecer también a Noella Gardella, la persona que me ayudó la primera vez que fui, con la realización de mi primer PFGE, gracias por toda la paciencia.

A la Universidad Adventista del Plata, por abrirme sus puertas y permitirme llevar a cabo mi formación doctoral y la realización de este trabajo a través de la financiación económica del mismo.

A Fabio Pacheco, Secretario de Investigación de la UAP, por mostrarme siempre su apoyo, no solo en lo laboral sino también en lo personal, siempre dándome una palabra de aliento. También a Sandaly de Oliveira Pacheco, por estar siempre presente e interesarse tanto por mi trabajo como por mi persona.

A todos los que forman parte de la Facultad de Ciencias de la Salud, docentes, secretarias, empleados, por compartir el día a día.

A Mirta Solis, quien me brindó su amistad cuando ingresé a la UAP, compartiendo lindos momentos que hacían más amenas todas las horas de trabajo. Gracias por su ayuda y por enseñarse esos “truquitos” de Word que me han servido de mucho en la escritura de esta tesis.

A mi familia, en especial a mis padres, por enseñarme el valor del estudio, la responsabilidad y el esfuerzo, por permitirme estudiar y por el apoyo incondicional en cada momento de mi vida. También a mis hermanos por acompañarme en cada paso y por estar presentes y alegrarse por cada objetivo cumplido.

A mi grupo de amigas de siempre, de la vida, por estar presentes en todo momento, alentándome y alegrándose por cada nuevo desafío.

A Diego, mi amor y compañero, por apoyarme en este camino durante estos años, por escucharme e interesarse en los temas referidos a mi trabajo. Por estar presente y compartir la alegría por cada paso que he dado.

A mi pequeña Francina, por alegrarme cada día de mi vida, y por hacerme crecer en mi tarea como mamá. Gracias por los ratitos que me ha permitido escribir partes de esta tesis en casa, mientras me decía “yo te dejo trabajar mamá”.

A Bautista, que viene en camino y que se convirtió en mi compañero fiel desde la panza, en este último tiempo de escritura de la tesis.

A Dios.

A todos, nuevamente GRACIAS!!!

Los resultados obtenidos en esta tesis han dado lugar a la siguiente publicación.

PUBLICACIONES

- **In vitro selection of *Staphylococcus aureus* mutants resistant to tigecycline with intermediate susceptibility to vancomycin.** Herrera M, Di Gregorio S, Fernandez S, Posse G, Mollerach M, Di Conza J. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2016 Mar 8;15:15.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	15
RESUMEN	21
ABSTRACT	25
INTRODUCCIÓN.....	31
<i>Staphylococcus aureus</i> : características microbiológicas	31
Importancia clínica de <i>S. aureus</i>	32
Virulencia en <i>S. aureus</i>	33
Factores de virulencia estructurales	33
Factores de virulencia de secreción.....	34
Características genéticas	36
Características e importancia de IS256 en <i>S. aureus</i>	37
El sistema regulador <i>agr</i>	38
Mecanismos de resistencia a los antibióticos	39
Sistemas de eflujo en <i>S. aureus</i>	39
Resistencia antibiótica en <i>Staphylococcus aureus</i>	42
Resistencia a penicilina	42
Resistencia a meticilina	44
Resistencia a meticilina: <i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i> (<i>SCCmec</i>).....	46
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina asociado a la comunidad.....	51
Resistencia a vancomicina.....	53
Epidemiología de SARM.....	56
Tratamiento de las infecciones causadas por <i>S. aureus</i>	58
Tigeciclina	60
Hipótesis y justificación del estudio	63
OBJETIVOS	66
Objetivo general	66
Objetivos específicos.....	66

CAPÍTULO 1: Selección <i>in vitro</i> y caracterización fenotípica de mutantes resistentes a tigeciclina	69
MATERIALES Y MÉTODOS	70
1.1- Microorganismos	70
1.2- Identificación fenotípica de los aislamientos	71
1.3- Evaluación de la sensibilidad a los antimicrobianos	71
1.3.1- Determinación cualitativa de la sensibilidad a los antimicrobianos	72
1.3.2- Determinación cuantitativa de la sensibilidad a los antimicrobianos	72
1.3.2.1- Método de dilución en agar.....	72
1.3.2.2- Determinación de la concentración inhibitoria mínima por método epsilométrico (E-test)	75
1.4- Evaluación de la cinética de muerte frente a tigeciclina	76
1.5- Selección <i>in vitro</i> de mutantes resistentes a tigeciclina.....	77
1.5.1- Método de eficiencia de plaqueo	77
1.5.2- Método de pasajes seriados.....	78
1.6- Análisis de la estabilidad del fenotipo resistente a tigeciclina	81
1.7- Isogenicidad entre aislamientos parentales y mutantes resistentes a tigeciclina	81
1.8- Evaluación de la cinética de muerte frente a tigeciclina en los SARTm.....	84
1.9- Ensayos adicionales sobre aislamientos de SARTm que modificaron su sensibilidad a otros antibióticos	84
1.9.1- Evaluación de la sensibilidad a vancomicina mediante E-test.....	85
1.9.2- Método de Macro E-test.....	85
1.9.3- Método de predifusión	85
RESULTADOS	87
1.1- Sensibilidad a los antibióticos	87
1.1.1- Método de difusión con discos.....	87
1.1.2- Método de dilución en agar: determinación de la CIM	89
1.2- Evaluación de la cinética de muerte frente a tigeciclina	90
1.3- Selección <i>in vitro</i> de mutantes de <i>S. aureus</i> resistentes a tigeciclina.....	95
1.4- Isogenicidad entre cepas mutantes resistentes a tigeciclina y aislamientos parentales	99
1.5- Evaluación de la sensibilidad a los antibióticos de las cepas mutantes resistentes a tigeciclina seleccionadas <i>in vitro</i>	100
1.5.1- Estudio de la sensibilidad a los antibióticos.....	100

1.5.2- Evaluación de la cinética de muerte de los SARTm frente a tigeciclina	104
1.6- Ensayos adicionales sobre aislamientos de SARTm que modificaron su sensibilidad a otros antibióticos	110
1.6.1- Evaluación de la sensibilidad a vancomicina.....	110
DISCUSIÓN.....	111
CAPÍTULO 2: Caracterización genotípica de aislamientos de <i>S. aureus</i> parentales y mutantes resistentes a tigeciclina.....	119
MATERIALES Y MÉTODOS.....	120
2.1- Extracción del ADN genómico.....	120
2.2- Detección del gen <i>mecA</i>	121
2.3- Determinación del tipo de casete <i>SCCmec</i>	122
2.3.1- Determinación del complejo <i>ccr</i>	123
2.3.1.1- Complejo <i>ccrAB1</i> , <i>ccrAB2</i> , <i>ccrAB3</i>	123
2.3.1.2- Complejo <i>ccrC</i>	125
2.3.2- Determinación del complejo <i>mec</i>	126
2.3.2.1- Complejo <i>mec</i> clase A.....	126
2.3.2.2- Complejo <i>mec</i> clase B.....	127
2.3.2.3- Complejo <i>mec</i> clase C.....	129
2.4- Tipificación mediante secuenciación de múltiples <i>loci</i> (<i>Multilocus Sequence Typing</i>): MLST.....	130
2.5- Tipificación mediante determinación del polimorfismo del gen <i>spa</i>	133
2.6- Tipificación genotípica del <i>locus agr</i>	134
2.7- Caracterización fenotípica de la funcionalidad del <i>locus agr</i>	136
RESULTADOS	137
2.1- Amplificación del gen <i>mecA</i>	137
2.2- Determinación del tipo de casete <i>SCCmec</i>	138
2.3- Tipificación genotípica mediante PFGE, MLST, polimorfismos del gen <i>spa</i> y grupo <i>agr</i>	138
2.4- Caracterización fenotípica de la funcionalidad del <i>locus agr</i>	141
DISCUSIÓN.....	142
CAPÍTULO 3: Evaluación de la eficiencia metabólica de los aislamientos de <i>S.aureus</i> parentales y mutantes resistentes a tigeciclina	149
MATERIALES Y MÉTODOS.....	150
3.1- Evaluación de la velocidad de crecimiento	150

3.2- Evaluación de la frecuencia mutacional	150
3.3- Ensayos de autólisis.....	151
RESULTADOS	152
3.1- Evaluación de la velocidad de crecimiento	152
3.2- Evaluación de la frecuencia mutacional	157
3.3- Ensayos de autólisis.....	159
DISCUSIÓN.....	162
CAPÍTULO 4: Estudio molecular de los mecanismos involucrados en la resistencia a tigeciclina.....	168
MATERIALES Y MÉTODOS	169
4.1- Evaluación del sitio diana de tigeciclina	169
4.2- Evaluación de la actividad eflujo.....	170
4.3- Amplificación y secuenciación de genes codificantes de bombas de eflujo	171
4.3.1- Amplificación del gen <i>mepA</i>	171
4.3.2- Amplificación del gen <i>mepR</i>	173
4.3.3- Amplificación del gen <i>norB</i>	174
4.4- Evaluación del nivel de expresión de genes codificantes de bombas de eflujo	175
4.4.1- Extracción de ARN	175
4.4.2- Retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).....	176
4.5- Estudio de posibles mecanismos de resistencia en los SARTm que modificaron su sensibilidad a otros antibióticos	178
4.5.1- Amplificación y secuenciación del gen <i>mecA</i> y <i>blaZ</i>	178
RESULTADOS	182
4.1- Evaluación del sitio diana de tigeciclina	182
4.2- Evaluación de la actividad eflujo.....	182
4.3- Análisis de las bombas de eflujo MepA y NorB: detección de alteraciones nucleotídicas y aminoacídicas.....	185
4.3.1- Análisis de las secuencias del gen <i>mepA</i> y la proteína MepA	185
4.3.2- Análisis de las secuencias del gen <i>mepR</i> y la proteína MepR	189
4.3.3- Análisis de las secuencias del gen <i>norB</i>	191
4.4- Evaluación del nivel de expresión de los genes <i>mepA</i> y <i>norB</i>	192

4.5- Estudio de posibles mecanismos de resistencia en los SARTm que modificaron su sensibilidad a otros antibióticos	194
4.5.1- Amplificación y secuenciación del gen <i>mecA</i> y el operón <i>blaZ</i>	194
DISCUSIÓN	195
CAPÍTULO 5: Evaluación de la movilización de IS256. Secuenciación de genomas completos y análisis de mutaciones	205
MATERIALES Y MÉTODOS	206
5.1- Evaluación de la transposición de la secuencia de inserción IS256	206
5.1.1- Detección de IS256 por PCR	206
5.1.2- <i>Southern blot</i> sobre el perfil de restricción obtenido con <i>SmaI</i>	207
5.1.2.1- Transferencia del ADN	207
5.1.2.2- Preparación de sondas	208
5.1.2.3- Hibridación	208
5.1.2.4- Detección inmunológica	209
5.1.3- <i>Southern blot</i> a partir del perfil de restricción obtenido con <i>EcoRI</i>	209
5.1.3.1- Digestión con <i>EcoRI</i>	209
5.1.3.2- Transferencia del ADN	210
5.2- Evaluación del nivel de expresión del gen codificante de la transposasa (<i>tnp</i>) de IS256	211
5.3- Secuenciación de genomas completos	211
5.3.1- Ensamblaje de los fragmentos de ADN	212
5.3.2- Anotación de secuencias	213
5.3.3- Análisis de secuencias de inserción	213
5.3.4- Análisis comparativo de las secuencias	213
RESULTADOS	214
5.1- Evaluación de la transposición de la secuencia de inserción IS256	214
5.2- Evaluación del nivel de expresión del gen codificante de la transposasa (<i>tnp</i>) de IS256	215
5.3- Secuenciación de genomas	216
5.3.1- Características generales del genoma	216
5.3.2- Análisis de secuencias de inserción	217
5.3.3- Análisis comparativo de las secuencias de los genomas	221
DISCUSIÓN	223

CONCLUSIONES	229
ANEXOS	235
BIBLIOGRAFÍA	242

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABC	<i>Adenosine-triphosphate binding cassette superfamily</i>
ACME	<i>Arginine catabolic mobile element</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMH	Agar Mueller Hinton
AMS	Agar Manitol Salado
ARN	Ácido ribonucleico
ARN_m	Ácido ribonucleico mensajero
ARN_r	Ácido ribonucleico ribosomal
ARN_t	Ácido ribonucleico de transferencia
ATB:	Antibiótico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
ATS	Agar Tripteína Soya
BE	Bromuro de etidio
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> , infusión cerebro corazón
CC	Complejo clonal
<i>ccr</i>	<i>Cassette chromosome recombinase</i>
CDS	Secuencias de ADN codificantes
CEF	Cefalotina
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLI	Clindamicina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	Centímetros
cm²	Centímetros cuadrados
<i>C_q</i>	<i>Quantification cycle</i>
csp	Cantidad suficiente para preparar
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético

EGM	Elementos genéticos móviles
ERI	Eritromicina
ETs	Toxina exfoliativa
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOX	Cefoxitina
g	Gramo
GEN	Gentamicina
h	Horas
h-VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> heterorresistente a vancomicina
IG	Islas genómicas
IS	Secuencia de inserción
kb	kilobases
L	Litro
LPV	Leucocidina de Pantone-Valentine
m	Mutante
mA	Miliampere
MATE	<i>Multidrug and toxic compound extrusion family</i>
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MFS	<i>Major facilitator superfamily</i>
mg	Miligramos
MH	Mueller Hinton
min	Minutos
MIN	Minociclina
mL	Mililitro
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MMR	<i>Methyl directed mismatch repair</i>
Mpb	Mega pares de bases
MSCRAMMs	<i>Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i>
Nº	Número
NARSA	<i>Network on antimicrobial resistance in Staphylococcus aureus</i>
ND	No determinado
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros

NRQ	Cantidades relativas normalizadas
NT	No tipable
OXA	Oxacilina
p	Parental
PaβN	<i>Phenil-arginyl β-naftylamide</i>
pb	Pares de bases
PBP	Proteína de unión a penicilinas
PBP2a	Proteína de unión a penicilinas adicional
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en campo pulsado
PSMs	Modulinas solubles en fenol
PT	Pulsotipo
RE	Reserpina
RIF	Rifampicina
RND	<i>Resistance-nodulation-cell division superfamily</i>
rpm	Revoluciones por minuto
RT-qPCR	Retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
SARM-AC	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina asociado a la comunidad
SARM-AH	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina asociado al ambiente hospitalario
SARTm	<i>Staphylococcus aureus</i> mutante resistente a tigeciclina
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a meticilina
SCCcap1	Genes para cápsula tipo 1
SCCfur	Genes para la resistencia a ácido fusídico
SCCHg	Genes para la resistencia al mercurio
SCCmec	<i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i>
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecil sulfato de sodio
seg	Segundos
seh	Enterotoxinas H
SEs	Enterotoxinas staphylococcicas
SF	Solución fisiológica
SM	Solución madre

SMR	<i>Small multidrug resistance</i>
ST	Secuenciotipo
TAE	Tris-Acetato-EDTA
Taq pol	<i>Taq</i> polimerasa
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEI	Teicoplanina
TES	Tris-EDTA-Sacarosa
TIG	Tigeciclina
Tm	Temperatura de hibridación
TMS	Trimetoprima-sulfametoxazole
Tn	Transposón
TSST-1	Toxina del síndrome del shock tóxico
U	Unidades
UFC	Unidades formadoras de colonias
V	Volt
VAN	Vancomicina
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> con sensibilidad intermedia a vancomicina
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a vancomicina
VSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a vancomicina
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>
X	Promedio
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
°C	Grados centígrados

RESUMEN

RESUMEN

Staphylococcus aureus es uno de los agentes patógenos frecuentemente recuperados de infecciones tanto nosocomiales como de la comunidad. Es causante de una variedad de infecciones, entre ellas: bacteriemias, infecciones del tracto respiratorio inferior e infecciones de piel y partes blandas. Este organismo se caracteriza por su plasticidad genómica y su gran capacidad para adaptarse a diversos ambientes y adquirir rápidamente nuevos mecanismos de resistencia a los antibióticos que se han introducido en la práctica clínica para el tratamiento de las infecciones que causa.

Este patógeno ha incrementado con el correr de los años su perfil de resistencia a los antibióticos, razón por la cual cada vez son más limitadas las opciones de tratamiento. Actualmente, la vancomicina (VAN) continúa siendo la opción de elección para el tratamiento de las infecciones severas causadas por *S. aureus* resistentes a la meticilina (SARM), pero desde el año 1997 han emergido cepas con sensibilidad intermedia (VISA) y luego resistentes a este antibiótico, despertando gran preocupación a nivel mundial en el ámbito de la salud y el control de las infecciones.

Tigeciclina (TIG) es un antibiótico bacteriostático, derivado de la minociclina, perteneciente a la familia de las glicilciclinas, que presenta un amplio espectro de actividad. Fue aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) para el tratamiento de infecciones intra-abdominales complicadas, infecciones de piel y tejido celular subcutáneo complicadas y neumonía bacteriana adquirida en la comunidad. Representa una opción útil en el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos multirresistentes con limitadas opciones de tratamiento.

Teniendo en cuenta que las opciones de tratamiento de las infecciones causadas por *S. aureus* son cada vez más limitadas, sumado a la habilidad y rapidez con la que este organismo ha adquirido diversos mecanismos de resistencia a los distintos antibióticos a lo largo de su evolución, nos propusimos estudiar su comportamiento frente a TIG, un representante de los nuevos antibióticos disponibles.

El objetivo de este trabajo de tesis fue seleccionar mutantes *in vitro* de *S. aureus* con sensibilidad disminuida o resistencia a TIG, para posteriormente realizar una evaluación comparativa de diversos aspectos entre las cepas mutantes seleccionadas y sus correspondientes aislamientos parentales.

Se estudiaron 20 aislamientos clínicos de *S. aureus* (10 SARM y 10 *S. aureus* sensibles a meticlina, SASM), provenientes de pacientes atendidos en diversos centros. Estos aislamientos fueron sometidos a pasajes seriados en concentraciones crecientes de TIG, hasta un máximo de 15 pasajes. Se lograron obtener de esta manera 12 cepas mutantes resistentes a TIG (SARTm) (5 fueron SARM y 7 SASM), las cuales aumentaron entre 16 y 128 veces su CIM a TIG (rango de CIM: 1-16 µg/mL).

Todos los SARTm fueron isogénicos a sus correspondientes aislamientos parentales, según el análisis del perfil de macrorestricción obtenido con la enzima *Sma*I. Se evaluó la sensibilidad a diversos antibióticos diferentes a TIG, con la finalidad de detectar posibles alteraciones como resultado de la presión ejercida por TIG. En dos SARTm se observaron cambios en la sensibilidad a otros antibióticos con respecto a sus aislamientos parentales. En uno de ellos se detectó un aumento en la sensibilidad a OXA, pasando de ser resistente a ser sensible a este antibiótico. En otro SARTm se observó un cambio en el perfil de sensibilidad a OXA, FOX y VAN. Esta cepa aumentó 8 veces la CIM de OXA, mientras que la CIM de FOX aumentó 4 veces con respecto al aislamiento parental. Esta cepa además, disminuyó su sensibilidad a VAN, adquiriendo un fenotipo VISA.

El estudio de la cinética de muerte de los aislamientos parentales confirmó el efecto bacteriostático de TIG, mostrando muy buena actividad *in vitro* a la concentración correspondiente al doble de la CIM, a las 24 h de exposición, donde ejerció una disminución del 99% (-1 y -2 log) en el recuento de células viables en 19/20 aislamientos de *S. aureus* estudiados. En un aislamiento de SASM ejerció efecto bactericida, a la mayor concentración ensayada. Luego, se comparó la cinética de muerte de los aislamientos parentales con la observada en los SARTm. El mayor número de diferencias significativas detectadas fueron a las menores concentraciones de TIG ensayadas (CIM y $\frac{1}{2}$ x CIM), observándose una menor velocidad de muerte en los SARTm.

Según la caracterización genotípica, los aislamientos estudiados pertenecían a 7 linajes genotípicos diferentes. Se evaluó la eficiencia metabólica mediante realización de curvas de crecimiento, determinación de la frecuencia mutacional y del perfil autolítico. Se observó una tendencia de los SARTm a mostrar una menor velocidad de crecimiento que los aislamientos parentales, pero en solo dos casos se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre cepas parentales y mutantes resistentes a TIG. Además, no se observaron cambios en la frecuencia mutacional, ni en el perfil de autólisis, en ninguno de los SARTm con respecto a los aislamientos parentales.

Con la finalidad de elucidar el mecanismo de resistencia involucrado en la disminución de la sensibilidad a TIG en los SARTm, se realizaron una serie de estudios, tanto fenotípicos como a nivel molecular. La evaluación fenotípica de la actividad eflujo empleando inhibidores específicos dio como resultado que los SARTm tenían incrementada esta actividad. Luego, se analizó la participación de dos bombas de eflujo, NorB y MepA, las cuales están involucradas en la expulsión de tetraciclina y glicilciclina respectivamente. Se analizaron las secuencias nucleotídicas y aminoácidas de los genes *norB*, *mepA* y *mepR* (codifica para un regulador transcripcional de *mepA*). Se encontraron diversas mutaciones en las secuencias del gen *mepA* y *mepR* en los SARTm, que dieron lugar a alteraciones en las secuencias de aminoácidos de las proteínas correspondientes, MepA y MepR. Mientras que en *norB* no se encontraron alteraciones entre cepas parentales y mutantes.

Dos SARTm y sus correspondientes aislamientos parentales fueron seleccionados para determinar mediante RT-qPCR el nivel de expresión de los genes *mepA* y *norB*. Los dos SARTm presentaron un nivel de expresión de *mepA* significativamente mayor que los correspondientes aislamientos parentales. La expresión de *norB* fue menor en los dos SARTm, si bien en sólo uno de ellos se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa con respecto al aislamiento parental. Estos dos SARTm también se estudiaron en cuanto a la movilización de la IS256. En uno de ellos, se obtuvo un aumento en el número de copias de IS256 cuando se analizó el perfil de hibridación, luego de la digestión con *EcoRI*. Además, ambas cepas mostraron una expresión mayor del gen *tnp*, que codifica para la transposasa de IS256, que su cepa parental. Por otra parte, mediante el análisis bioinformático de las secuencias de los genomas completos de estos dos SARTm, se detectó la presencia de dos copias extras de IS256 en cada uno

de ellos. En uno de estos SARTm, que fue justamente el que adquirió fenotipo VISA luego de la exposición a TIG, el nuevo sitio de inserción de IS256 se localizó en la región *upstream* del gen *walR*. Este hecho se ha asociado en otros trabajos a la adquisición de fenotipo VISA. Por último, mediante la búsqueda de mutaciones en los genomas de las cepas analizadas, se detectó una mutación en el gen *rpsJ* en uno de los SARTm, lo que produjo una alteración en la proteína codificada, una proteína ribosómica S10. Las mutaciones en esta proteína se han asociado a disminución de la sensibilidad a TIG en otras especies bacterianas.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta tesis, se puede concluir que los aislamientos de *S. aureus* pertenecientes a diferentes linajes genotípicos, presentan la capacidad de seleccionar mutantes resistentes a TIG, en presencia de la presión selectiva ejercida por el antibiótico, pudiendo afectar además la sensibilidad a otras familias de antibióticos. La ganancia de resistencia a TIG, no estuvo asociada a un costo significativo en el *fitness* bacteriano. El mecanismo de resistencia implicado en la disminución de la sensibilidad a TIG está relacionado a un incremento en la actividad de la bomba de eflujo MepA, debido a un aumento en la expresión del gen *mepA*, a causa de la presencia de mutaciones, que afectan la función represora del regulador transcripcional *mepR*. Mutaciones en el gen *mepA* también podrían estar contribuyendo a la mayor actividad eflujo. Además, se evidenció que la presión ejercida por TIG está asociada a un aumento en la frecuencia de transposición de la IS256, provocando rearrreglos genéticos. Es probable que algunos de estos rearrreglos puedan estar implicados en la modificación de la sensibilidad a otras drogas antibacterianas en los SARTm estudiados. Alteraciones mutacionales presentes en el gen *rpsJ* también podrían estar contribuyendo a la disminución de la sensibilidad a TIG.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is one of the major pathogens causing serious infections both within the hospital setting and in the community. *S. aureus* is a common pathogen associated with several infections such as bacteremia, lower respiratory tract infections, and skin and soft tissue infections. This organism is characterized by an extraordinary genomic plasticity and their ability to adapt to different environments and acquire new antibiotics resistance mechanisms.

Over the years, *S. aureus* has increased its resistance profile to different antibiotics; therefore, treatment options are more limited. Currently, vancomycin (VAN) is the therapeutic choice in severe infections caused for methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA); but since 1997, VAN intermediate *S. aureus* (VISA) strains emerged. Afterwards, strains resistant to this antibiotic were reported, causing great concern worldwide in the field of health and infection control.

Tigecycline (TIG) is a bacteriostatic antibiotic, derived from minocycline and belonging to the glycylcyclines class, with an *in vitro* broad spectrum activity. It has been approved by the FDA (*Food and Drug Administration*) for the treatment of complicated intraabdominal infections, complicated skin and skin structure infections and community-acquired bacterial pneumonia. Its represents a useful therapeutic option for the treatment of complicated infections caused for multiresistant organisms, with limited treatment options.

Considering that treatment options for *S. aureus* infections are increasingly limited, added to the ability and speed with which this organism has acquired diverse resistance mechanisms to different antibiotics throughout its evolution, we proposed to study the behavior of this pathogen against TIG, a new available antibiotic.

The aim of this study was to select *in vitro* *S. aureus* mutants resistant or with reduced susceptibility to TIG, and to perform a comparative analysis of various aspects of the selected mutants and their parental isolates.

Twenty *S. aureus* clinical isolates were studied (10 MSSA and 10 MRSA), from patients attending diverse health-care centers. The *in vitro* selection of mutants was performed by serial passage in increasing TIG concentrations with a maximum of 15 passages. Twelve TIG resistant mutants (TRSA_m) were obtained (5 MRSA and 7 MSSA), which showed 16 to 128 fold increase in their MIC values (MIC range: 1-16 µg/mL) compared to their parental strain.

All TRSA_m were isogenic to their parental strains, according to *Sma*I macrorestriction profile. Susceptibility to others class of antibiotics was tested to detect possible alterations as a result of TIG pressure . Two of 12 TRSA_m also showed a modification in susceptibility to other antibiotics. In one of them, an increase in the susceptibility to OXA was detected, going from a parental strain resistant to this antibiotic to a derivative mutant categorized as susceptible. The other TRSA_m showed changes in the susceptibility to OXA, FOX and VAN. This strain increased 8 fold the MIC for OXA, while the MIC for FOX increased 4 fold compared to the parental strain. This mutant also exhibited a decrease in its susceptibility to VAN, acquiring VISA phenotype.

The time-kill curve of parental strains confirmed the bacteriostatic effect of TIG, with good *in vitro* activity at the concentration corresponding to twice of MIC, exerting a 99% decrease in the initial inoculum (1 and 2 log decrease) after 24 h of incubation, in 19 of the 20 *S. aureus* isolates. In addition, TIG was bactericidal against one MSSA at the highest concentration. Then, the killing rate of the parental strains was compared with that observed in TRSA_m. The greatest number of significant differences detected occurred at the lowest TIG concentrations (MIC and ½ x MIC), observing a lower killing rate in the TRSA_m.

The isolates included in this work belonged to 7 different genotypic lineages. The metabolic efficiency was evaluated through growth curves, mutation frequency, and autolysis assays. The TRSA_m showed a trend to slower growth rate compared to parental strains, but in only two cases, the differences were statistically significant. No changes in the mutation frequency neither autolysis activity was found.

Phenotypic and molecular studies were performed to elucidate the TIG resistance mechanism in TRSA_m. Phenotypic evaluation using specific efflux pumps inhibitors

detected an increase in TRSAm efflux activity. The participation of two efflux pumps (NorB and MepA) was analyzed. These pumps are involved in the extrusion of tetracycline and glycylcycline respectively. The nucleotide sequences and the amino acid translation of *norB*, *mepA* and *mepR* (coding for a *mepA* transcriptional regulator) were analyzed. Diverse mutations were found in *mepA* and *mepR* sequences of TRSAm, causing alterations in the amino acid sequences of the corresponding proteins, MepA and MepR. No changes were found in *norB* sequences of TRSAm.

Two TRSAm and their corresponding parental strains were selected to analyze *mepA* and *norB* expression by RT-qPCR. The two TRSAm showed significantly higher *mepA* expression than their parental strains. The *norB* expression was lower in the two TRSAm when compared to their parental strains, although in only one of them this difference was statistically significant. IS256 transposition was also studied in these two TRSAm. Southern analysis of *EcoRI* digested genome showed an increase in the number of IS256 copies in one of the TRSAm. In addition, the expression IS256 transposase coding gene (*tnp*) was higher in both derived mutants. Furthermore, the bioinformatic analysis of complete genome sequences, revealed two extra copies of IS256 in each mutant. One of them, acquired VISA phenotype and the additional IS256 insertion site of was localized upstream *walR* gene. Other authors have previously associated this finding with the acquisition of VISA phenotype. Finally, a mutation in *rpsJ* gene was detected in one of TRSAm, the amino acid translation revealed an alteration in the corresponding ribosomal protein S10. Mutations in this protein have been associated with decreased susceptibility to TIG in other bacterial species.

Considering the results obtained in this thesis, we can conclude that TIG selective pressure could select *S. aureus* resistant mutants in different genotypic lineages of this species. This event can also affect the susceptibility to other antibiotic families. Acquisition of TIG resistance was not associated with a significant cost in bacterial fitness. The resistance mechanism involved in the decrease of TIG susceptibility is related to an increase in the activity of the efflux pump MepA, associated with an increase in *mepA* gene expression, probably due to mutations affecting the transcriptional regulator *mepR*. The possible contribution of *mepA* gene mutations to the higher efflux activity exhibited by TRSAm could not be disregarded. Mutational alterations in *rpsJ* gene could also contribute to decreased susceptibility to TIG. In

addition, TIG pressure could be associated with an increase in transposition of IS256, causing genetic rearrangements. It is likely that some of these rearrangements may be involved in the changes in susceptibility to other antibiotics in the TRSAm.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

***Staphylococcus aureus*: características microbiológicas**

El género *Staphylococcus* está constituido por un grupo de bacterias, que según su morfología, se clasifican como cocos Gram positivos, pertenecientes a la familia *Staphylococcaceae* (Ludwig y col., 2010). Los miembros de este género tienen un diámetro de entre 0,5 y 1,5 μm y se disponen característicamente en forma de “racimos de uvas” cuando se realiza una tinción de Gram, aunque también se pueden disponer en parejas, tétradas o formando cadenas cortas (Figura 1). Son inmóviles, no formadores de esporas y son aerobios o anaerobios facultativos. Algunos producen una cápsula de polisacáridos. Son productores de la enzima catalasa, lo cual permite diferenciarlos de otros géneros bacterianos. Además presentan la capacidad de desarrollarse en medios con altas concentraciones de NaCl. *Staphylococcus aureus* da positiva la reacción de detección de la enzima coagulasa, diferenciándose del resto de las especies que conforman el género *Staphylococcus* (Harris y col., 2002).

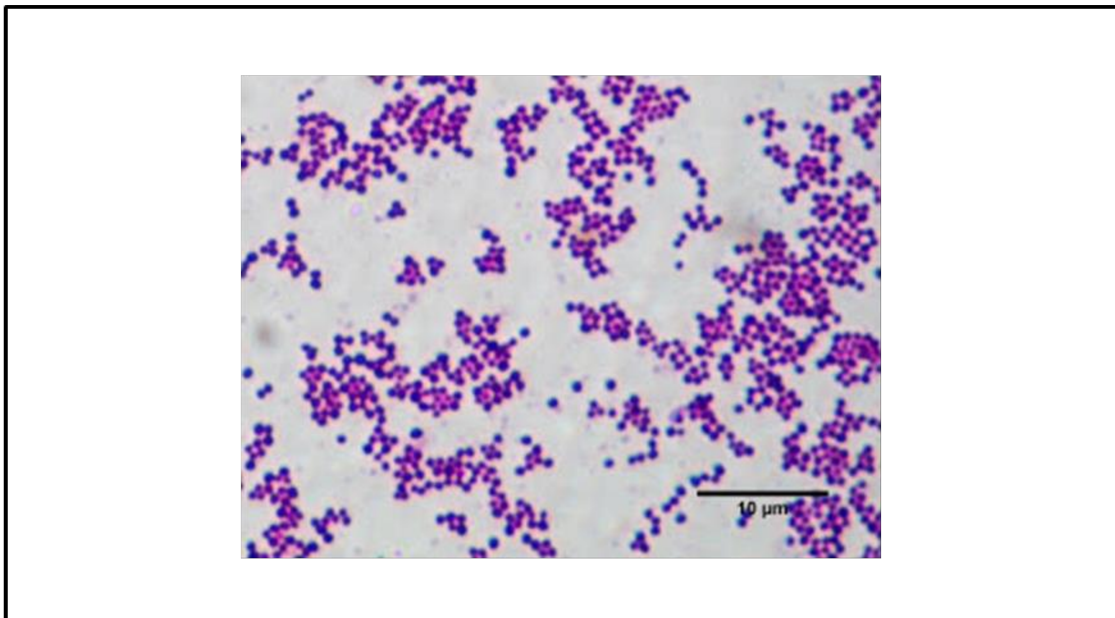


Figura 1. Imagen de una coloración de Gram de *Staphylococcus aureus*.

El género *Staphylococcus* incluye una variedad de especies diferentes, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, encontrándose principalmente colonizando la piel y membranas mucosas de los mamíferos y pájaros. Dentro de las especies que se comportan como patógenos en los seres humanos se encuentran: *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus saprophyticus*, entre otros.

S. aureus constituye la especie con mayor virulencia y patogenicidad dentro del género *Staphylococcus*. Se caracteriza por colonizar e infectar a los animales y humanos, siendo capaz de causar una amplia variedad de infecciones tanto adquiridas en la comunidad como en el ambiente hospitalario (Bannerman y Peacock, 2007).

Importancia clínica de *S. aureus*

S. aureus es parte de la flora normal de los seres humanos, siendo muy común la colonización asintomática. El sitio más frecuente de colonización lo constituyen las narinas anteriores, aunque existen otros sitios de colonización como son las axilas, ingle y el tracto gastrointestinal. Aproximadamente el 20% de los individuos son portadores nasales asintomáticos de *S. aureus* de manera persistente, mientras que un 30% lo es de forma intermitente. Esto constituye un riesgo no sólo para la infección de la propia persona que lo porta sino para su diseminación entre otras personas (Wertheim y col., 2005).

Las infecciones por *S. aureus* se producen cuando se alteran las barreras mecánicas que constituyen la piel y membranas mucosas, de manera que la bacteria puede penetrar e invadir los tejidos profundos del huésped, pudiendo luego diseminarse por distintos órganos. *S. aureus* produce una gran variedad de infecciones que van desde infecciones menores de piel y tejidos blandos, como por ejemplo impétigo, abscesos y celulitis, hasta infecciones de mucha gravedad, como son la bacteriemia, endocarditis, sepsis, osteomielitis, infecciones del sistema nervioso central, infecciones respiratorias y del tracto urinario, entre otras. Además, *S. aureus* es uno de los patógenos que frecuentemente se aísla de infecciones de heridas quirúrgicas, siendo una de las

principales causas de infecciones intrahospitalarias. Por otra parte, es agente causal de intoxicaciones alimentarias por la producción de toxinas entéricas (Tong y col., 2015).

Virulencia en *S. aureus*

S. aureus cuenta con una gran variedad de factores de virulencia, que le permiten colonizar, invadir y diseminarse en las células del huésped causando infecciones de distinta gravedad. Estos factores pueden ser tanto estructurales como de secreción (Lowy, 1998).

Factores de virulencia estructurales

Los factores de virulencia estructurales son producidos principalmente durante la fase exponencial de crecimiento bacteriano. Dentro de este grupo se encuentran numerosas proteínas de superficie que median la adhesión a las células del huésped. Este conjunto de proteínas son llamadas MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) y son componentes de la superficie bacteriana que reconocen las moléculas de adhesión de la matriz extracelular. Existen diversas de estas proteínas que se pueden unir a distintas moléculas de los tejidos del huésped, como por ejemplo colágeno, fibrinógeno, fibronectina y elastina (Foster y Hook, 1998).

Además de adherirse a las células del huésped, estas proteínas permiten la adhesión a materiales protésicos, siendo capaces de crecer y persistir en ellos, formando lo que se conoce con el nombre de *biofilm* o biopelícula. El *biofilm* se crea cuando comunidades de microorganismos se adhieren a una superficie y producen polímeros extracelulares que facilitan la adhesión, formando una matriz estructural. Esta película le permite a la bacteria evadir las defensas del huésped y resistir la acción de los antimicrobianos, complicando en gran medida los tratamientos de las infecciones asociadas a dispositivos protésicos, por lo que generalmente se requiere la remoción de estos materiales para lograr la erradicación de la infección (Gordon y Lowy, 2008; Donlan, 2001).

S. aureus posee además otros mecanismos estructurales que le permiten evadir las defensas del huésped, como es la presencia de una cápsula de polisacáridos en algunas

cepas, lo cual le otorga la capacidad de resistir la fagocitosis. Se han descrito 13 serotipos capsulares diferentes siendo el serotipo 5 y 8 los más frecuentemente asociados a aislamientos clínicos (von Eiff y col., 2007).

Otro determinante de virulencia ampliamente estudiado es la proteína A, la cual es específica de *S. aureus*. Esta proteína que se encuentra en la superficie celular se ha demostrado que se une a la porción Fc de las inmunoglobulinas y previene de esta manera la opsonización por parte de los componentes del sistema complemento del huésped y la posterior eliminación del microorganismo, contribuyendo a la patogénesis de *S. aureus* (Falugi y col., 2013).

Factores de virulencia de secreción

S. aureus posee muchas toxinas y enzimas que actúan como factores de virulencia, los cuales son secretados por la célula bacteriana para ejercer su acción, permitiendo al microorganismo invadir y destruir los tejidos del huésped. Los factores de virulencia de secreción son producidos durante la fase post exponencial y estacionaria temprana. Entre las principales enzimas se encuentran proteasas, lipasas, nucleasas, hialuronidasas y colagenasas (Gordon y Lowy, 2008).

S. aureus produce una gran variedad de toxinas citolíticas. Algunas de ellas actúan dañando las membranas celulares, uniéndose a un receptor específico. Dentro de este grupo se encuentran las hemolisinas y leucocidinas. Las hemolisinas se incluyen dentro de cuatro tipos distintos, denominadas alfa, beta, gamma y delta hemolisinas. Son producidas por la mayoría de las cepas de *S. aureus* y presentan actividad hemolítica y citolítica sobre una variedad de células del huésped (Otto, 2014a).

La alfa toxina es probablemente la toxina de *S. aureus* más estudiada. Es un tipo de hemolisina (α -hemolisina), que actúa produciendo un poro en la membrana celular que lleva a la expulsión de iones divalentes, ATP y moléculas de bajo peso molecular. Esta toxina está involucrada en necrosis de la piel e infecciones letales (Berube y Bubeck Wardenburg, 2013).

Una citotoxina importante que posee *S. aureus* es la llamada Leucocidina de Pantón-Valentine (LPV), la cual es producida por menos del 5% de las cepas de *S.*

aureus. Estructuralmente, está constituida por dos proteínas denominadas LukS y LukF. Tiene capacidad para destruir leucocitos y producir necrosis de tejidos (Lina y col., 1999).

Otras toxinas de *S. aureus* producen daño en las membranas celulares sin necesidad de unirse a un receptor específico. Incluidas en este grupo se encuentran las llamadas Modulinas Solubles en Fenol (PSMs, por sus siglas en inglés), las cuales fueron descubiertas en 2007 y son producidas por la mayoría de las cepas de *S. aureus*. Estos péptidos actúan favoreciendo entre otras cosas la lisis de los neutrófilos, luego de la fagocitosis, contribuyendo a diversos tipos de infecciones, como infecciones de piel y bacteriemias (Otto, 2014b). Colaboran además en el desarrollo de *biofilm*, interviniendo en la estructuración del mismo y formación de los canales característicos. A su vez, se cree que actuarían favoreciendo el desprendimiento y diseminación de las células incluidas en el *biofilm* a otros sitios de infección secundarios, posiblemente gracias a sus propiedades surfactantes (Periasamy y col., 2012).

Por otra parte se encuentran las exotoxinas, las cuales no causan daño en las membranas, sino que interfieren con las funciones de algunos receptores. Se incluyen en este grupo las enterotoxinas staphylococcicas (SEs, por sus siglas en inglés) y la toxina del Síndrome del shock tóxico (TSST-1). Ambas tienen propiedades de superantígenos, estimulando la proliferación de células T. Son pirogénicas y responsables de intoxicación alimentaria y síndrome del shock tóxico, respectivamente.

Se han identificado más de 20 SEs diferentes en *S. aureus*, siendo las denominadas SEA y SEB las más estudiadas. Son termorresistentes y están asociadas a cepas de *S. aureus* productoras de intoxicación alimentaria, interfiriendo con la función intestinal y causando generalmente vómitos y diarrea (Pinchuk y col., 2010).

La TSST-1 es responsable de la enfermedad sistémica denominada Síndrome del shock tóxico, que se caracteriza por la proliferación de células T y liberación de citoquinas, lo que desencadena un cuadro agudo de fiebre, hipotensión, erupción y posterior descamación de la piel, que puede llevar finalmente a un fallo multiorgánico (Dinges y col., 2000).

Por otra parte, se encuentra la toxina exfoliativa (ETs, por sus siglas en inglés), una exotoxina epidermolítica responsable del denominado síndrome de piel escaldada.

Esta patología causada por *S. aureus* afecta principalmente a neonatos y niños, y se caracteriza por la pérdida de las capas superficiales de la piel, deshidratación e infecciones secundarias. Se han identificado tres serotipos de esta toxina, denominados ETA, ETB y ETD (Bukowski y col., 2010; Yamaguchi y col., 2002).

Características genéticas

El genoma de *S. aureus* está formado por un único cromosoma circular de un tamaño aproximado de 2,8 Mpb, con un contenido en G+C relativamente bajo, de aproximadamente 32% (Kuroda y col., 2001). Se caracteriza por tener elementos genéticos móviles (EGM), que son fragmentos de ADN que codifican una variedad de determinantes de virulencia y de resistencia a antibióticos, así como también todas aquellas enzimas necesarias para su escisión e integración dentro del cromosoma del huésped. Estos fragmentos de ADN son adquiridos por transferencia horizontal de genes entre células bacterianas, constituyendo de esta manera la principal forma de transferencia de información genética dentro de la misma especie o entre especies diferentes. Los EGM incluyen secuencias de inserción (IS) transposones, fagos, plásmidos, islas genómicas (IG) y casetes cromosomales (Malachowa y DeLeo, 2010).

La adquisición de la gran mayoría de los EGM se debe a la transferencia horizontal de las islas genómicas en las que están incluidos (Alibayov y col., 2014). Las IG son fragmentos discretos de ADN que difieren entre cepas estrechamente relacionadas. Su transferencia contribuye a la evolución y diversificación de los microorganismos y por lo tanto, brinda una plasticidad genómica que tiene gran impacto en la evolución bacteriana y contribuye a la diseminación de la resistencia a los antibióticos y de genes de virulencia. Las IG están usualmente localizadas en el cromosoma, insertadas en el extremo 3' de genes de ARN_t, rodeadas por regiones nucleotídicas cortas, repetidas directas. Generalmente llevan también genes que codifican factores involucrados en la movilidad genética, como integrasas, transposasas y secuencias de inserción. De acuerdo al tipo de genes que contengan se pueden describir como islas de patogenicidad, metabólicas, de simbiosis o de resistencia (Juhás y col., 2009).

Tres tipos de islas genómicas han sido identificadas en los genomas de los aislamientos de *S. aureus* que han sido secuenciados y se denominan: vSaa, vSaβ y vSaγ. Ellas portan una gran variedad de genes que influyen en la patogenicidad de la bacteria (Malachowa y DeLeo, 2010).

Las IS son un tipo de EGM que están ampliamente distribuidos en *S. aureus* e involucrados en su evolución genómica. Son elementos transponibles, que contienen información genética para su propia movilización, pudiendo encontrarse en una o múltiples copias dentro del cromosoma o asociados a otros EGM. Si bien carecen de genes de resistencia en sí mismos, su movilización está implicada en la recombinación y estabilización, así como también en la inactivación o modificación de la expresión de algunos genes que como resultado puede llevar a la resistencia a antibióticos (Malachowa y DeLeo, 2010).

Características e importancia de IS256 en *S. aureus*

La IS256 es una secuencia de inserción descrita en una variedad de aislamientos clínicos de *S. aureus*. Se encuentra presente en múltiples copias dentro del genoma (Dyke y col., 1992), debido a que su transposición está mediada por un mecanismo de “copia y pega” (Loessner y col., 2002), pudiendo estar flanqueando los extremos de transposones, como en el caso del Tn4001, formando un promotor híbrido que lleva los determinantes de resistencia a aminoglucósidos (*aacA-aphD*) (Rouch y col., 1987; Lyon y col., 1987; Byrne y col., 1989).

La acumulación de múltiples copias de IS256 dentro del genoma de *S. aureus* tiene implicancia en la flexibilidad genómica y el desarrollo de resistencia a los antibióticos. Se ha postulado previamente que el stress provocado por la presión de algunos antibióticos como ciprofloxacina, vancomicina, cloranfenicol o linezolid, puede desencadenar la activación o autoactivación de la transposición de la IS256, teniendo implicancia en la adquisición de resistencia a diferentes antibióticos (Nagel y col., 2011; Schreiber y col., 2013).

Algunos autores han asociado la presencia de IS256 con el desarrollo de sensibilidad intermedia a vancomicina, debido a su inserción dentro del gen *walkR*, el cual está involucrado en la regulación de genes asociados al metabolismo de la pared

celular (McEvoy y col., 2013). Además, la atenuación de la virulencia de diversos aislamientos de *S. aureus* se ha relacionado con la interrupción del locus *agr* a causa de la inserción de IS256 (Shopsin y col., 2010).

El sistema regulador *agr*

El locus *agr* (gen regulador accesorio) es un sistema de “quórum sensing” de dos componentes, que regula y modula la expresión de diversos factores de virulencia. Reprime la transcripción de genes que codifican proteínas de superficie implicadas en la colonización y activa la transcripción de exoproteínas asociadas con daño celular durante la fase post-exponencial de crecimiento bacteriano (Novick y Geisinger, 2008). El locus *agr* consiste en dos unidades de transcripción divergentes conducidas por los promotores P₂ y P₃. El operón dirigido por el promotor P₂ está constituido por 4 genes (*agrB*, *agrD*, *agrC* y *agrA*), que codifican un sistema de señalización de dos componentes, siendo AgrA el regulador y AgrC el receptor. Por otro lado, *agrB* y *agrD* codifican dos proteínas que se combinan para producir y secretar un péptido autoinductor que es el ligando para AgrC. Durante el crecimiento bacteriano, el péptido autoinductor se acumula en el medio extracelular hasta que alcanza una concentración umbral (“quórum sensing”) y desencadena la activación del sistema de dos componentes mediante fosforilación de AgrA, el cual activa la transcripción del promotor P₂, amplificando la respuesta y se inicia entonces la transcripción del promotor P₃. El promotor P₃ conduce la síntesis de RNAlIIII, que codifica también entre otras proteínas de virulencia una δ -hemolisina. De esta manera, la expresión de la δ -hemolisina es utilizada como una forma de evaluar la funcionalidad del locus *agr* (Gilot y col., 2002; Traber y col., 2008). La pérdida de función del locus *agr* ha sido asociado a una mayor duración de infecciones como bacteriemias y también al desarrollo de reducida sensibilidad a vancomicina (Fowler y col., 2004; Sakoulas y col., 2002).

El locus *agr* además regula de forma negativa la formación de *biofilm*, favoreciendo la dispersión del mismo, de manera que los aislamientos que tienen afectada la funcionalidad de este locus presentan una mayor habilidad para el desarrollo de *biofilm* (Boles y Horswill, 2008).

El locus *agr* posee una región variable polimórfica que abarca la región codificante de la secuencia de *agrD*, la región de *agrB* codificante del extremo C-terminal y una porción de *agrC* codificante de la región N-terminal de la correspondiente proteína. Esta variabilidad ha permitido diferenciar 4 tipos alélicos de *agr* (*agr* tipo I a IV), que sirven como una herramienta más para llevar a cabo la genotipificación de aislamientos de *S. aureus* (Gilot y col., 2002).

Mecanismos de resistencia a los antibióticos

S. aureus posee una variedad de mecanismos de resistencia a los antibióticos, los cuales pueden ser naturales o adquiridos a partir de la transferencia de material genético, de la misma u otras especies bacterianas. También, puede ser el resultado de mutaciones en su ADN. Dentro de los mecanismos de resistencia detectados en *S. aureus* se incluyen: la modificación o inactivación de la droga por producción de enzimas, alteración o protección del sitio diana y reducción de la concentración intracelular del antibiótico por la expulsión del mismo a través de un sistema de eflujo (Aleksun y Levy, 2007).

Sistemas de eflujo en *S. aureus*

La actividad eflujo es un importante mecanismo de resistencia presente en *S. aureus*, que otorga resistencia a una amplia variedad de drogas, incluyendo, no sólo antimicrobianos, sino también distintos colorantes, biocidas ambientales y desinfectantes. Los sistemas de eflujo están constituidos por las denominadas bombas de eflujo, las cuales son proteínas transportadoras que se encuentran ancladas a la membrana celular bacteriana y producen la extrusión de compuestos tóxicos para la bacteria, disminuyendo su concentración intracelular.

Muchos sistemas de eflujo bacterianos presentan selectividad para un determinado compuesto, mientras que otros pueden dar resistencia simultáneamente a una amplia variedad de antibióticos o clases de antibióticos no relacionados estructuralmente, confiriendo a la bacteria de un fenotipo mutliresistente (MDR, por su denominación en inglés: *multidrug resistance*) (Poole, 2005).

Los genes que codifican para las bombas de eflujo pueden encontrarse en plásmidos o en el cromosoma. En general, los genes que codifican para bombas específicas para una droga se encuentran en plásmidos y son fácilmente transmisibles, mientras que los que codifican para bombas que confieren fenotipo MDR se encuentran localizados en el cromosoma y muy difícilmente se transfieren a otros organismos. La resistencia antimicrobiana mediada por bombas de eflujo cromosomales se debe generalmente a un aumento en la expresión de sus genes codificantes, que se puede producir como resultado de una activación transcripcional inducida por el sustrato, o por mutaciones en sus genes reguladores (Schindler y Kaatz, 2016).

Todas las proteínas transportadoras que constituyen los sistemas de eflujo MDR se encuentran incluidas en cinco familias, de acuerdo a su estructura, mecanismo de acción, y requerimientos energéticos. Las familias de proteínas transportadoras MDR se mencionan a continuación: MFS (*major facilitator superfamily*), SMR (*small multidrug resistance*), MATE (*multidrug and toxic compound extrusion family*), RND (*resistance-nodulation-cell division superfamily*) y ABC (*adenosine-triphosphate binding cassette superfamily*) (Schindler y Kaatz, 2016; Costa y col., 2013).

De todas estas familias de transportadores, las cuatro primeras (MFS, SMR, MATE y RND) constituyen sistemas de transporte secundario, donde su actividad es llevada a cabo gracias a un gradiente de protones. La familia ABC, por el contrario es un sistema de transporte activo primario, que utiliza la hidrólisis del ATP para ejercer su actividad transportadora. En la Tabla 1 se describen las distintas bombas de eflujo MDR que han sido caracterizadas en *S. aureus*. Aún no se ha caracterizado ningún miembro de la familia RND en esta especie (Schindler y Kaatz, 2016; Costa y col., 2013).

Dentro de las bombas de eflujo que confieren resistencia para un solo tipo de droga en *S. aureus* se encuentran la TetA(K) y Tet38 que otorgan resistencia a tetraciclina y FexA, cuyo sustrato es el cloranfenicol (Hassan y col., 2007).

Tabla 1. Bombas de eflujo MDR caracterizadas en *S. aureus*.

Familia de proteínas	Bomba de eflujo	Sustratos
MFS	NorA	Fluoroquinolonas, acriflavina, bromuro de etidio, compuestos de amonio cuaternario
	NorB	Fluoroquinolonas, tetraciclina, ceftrimida, bromuro de etidio
	NorC	Fluoroquinolonas, bromuro de etidio
	MdeA	Fluoroquinolonas, novobiocina, mupirocina, ácido fusídico, bromuro de etidio, acriflavina, rodamina, compuestos de amonio cuaternario
	SdrM	Norfloxacin, acriflavina, bromuro de etidio
	LmrS	Aminoglucósidos, cloranfenicol, eritromicina, ácido fusídico, linezolid, lincosamida, bromuro de etidio
	QacA/B (plasmídica)	Colorantes, compuestos de amonio cuaternario
SMR	Smr (plasmídica)	Colorantes, compuestos de amonio cuaternario
MATE	MepA	Tigeciclina, fluoroquinolonas, bromuro de etidio, compuestos de amonio cuaternario
ABC	MsrA	Macrólidos, streptograminas
	Sav1866	Bromuro de etidio
Familia no determinada	SepA	Acriflavina, compuestos de amonio cuaternario

La familia MATE está compuesta por diversas bombas de eflujo que han sido mayormente caracterizadas en organismos Gram negativos. La primera bomba de eflujo perteneciente a la familia MATE que ha sido identificada y caracterizada en *S. aureus* es la bomba de eflujo MepA, la cual es una proteína compuesta por 12 residuos transmembrana (Kaatz y col., 2005; McAleese y col., 2005). Interviene en el intercambio de drogas con carga positiva o que contengan al menos un átomo de nitrógeno que pueda adquirir carga positiva. De esta manera, MepA otorga reducida susceptibilidad a compuestos de amonio cuaternario, diversos colorantes y biocidas, así como también a tigeciclina, antibiótico perteneciente a la familia de las gliciliclinas. Asimismo, se ha considerado que las fluoroquinolonas, como ciprofloxacina y norfloxacina son débiles sustratos de MepA (Kaatz y col., 2005).

La bomba de eflujo MepA está codificada por el gen *mepA*, el cual forma parte del operón *mepRAB*. LA expresión de *mepA* está controlada por MepR, proteína codificada por el gen *mepR* ubicado *upstream* a *mepA*. La proteína MepB tiene función desconocida hasta el momento (Kaatz y col., 2005). MepR actúa como un represor de la expresión de tanto *mepA* como de *mepR*, interactuando con la región operadora de estos genes. En presencia de sustratos de MepA, se evita la unión de MepR a la región operadora en *mepA* (Kaatz y col., 2006).

Resistencia antibiótica en *Staphylococcus aureus*

S. aureus es un patógeno extraordinariamente adaptable y con una notable capacidad para adquirir rápidamente resistencia a los antibióticos introducidos en la práctica clínica. Esta adquisición de determinantes de resistencia ocurre generalmente por transferencia horizontal de genes a partir de otras bacterias, aunque también son muy importantes las mutaciones cromosomales y la presión selectiva ejercida por los antibióticos. De esta manera, *S. aureus* se ha convertido en un problema en la salud pública a nivel mundial, limitando las opciones de tratamiento para enfrentar las infecciones que causa (Chambers y DeLeo, 2009).

Resistencia a penicilina

Previo al descubrimiento de los antibióticos, la mortalidad asociada a las bacteriemias producidas por *S. aureus* era mayor al 80%. Esto mejoró notablemente con la introducción de la penicilina en 1940, lo que dio inicio a la denominada “era antibiótica”. Rápidamente, *S. aureus* adquirió resistencia a la penicilina y se diseminó por todo el mundo. Hoy en día el 90% de los aislamientos son resistentes a este antibiótico.

El primer aislamiento resistente a penicilina fue reportado a mediados de los años 40, y surgió posteriormente a la presión ejercida por el amplio uso de este antibiótico para combatir las infecciones producidas por *S. aureus* (Voladri y Kernodle, 1998).

La resistencia a penicilina está mediada por el gen *blaZ* que codifica para una enzima β -lactamasa, denominada penicilinasas, la cual es capaz de hidrolizar el anillo β -

lactámico de la penicilina, produciendo su inactivación. Esta enzima extracelular, se encuentra codificada en un plásmido, que puede ser fácilmente transmitido entre los microorganismos. La síntesis de la enzima β -lactamasa es inducida por la presencia de penicilina y se encuentra regulada por dos genes adyacentes, el gen represor *blaI* y el antirepresor *blaR1*, que junto con el gen *blaZ* forman el denominado operón *blaZ* (Figura 2) (Lowy, 2003).

En ausencia de penicilina, la proteína de unión al ADN, BlaI, se encuentra unida a la región operadora del operón *blaZ*, reprimiendo la transcripción de los genes *blaZ* y *blaI/blaR1*. De esta manera la enzima β -lactamasa es sintetizada a bajo nivel.

Cuando el microorganismo está expuesto a penicilina, ésta se une a la proteína transmembrana, BlaR1. Esta proteína actúa como un transductor de señales. Se estimula así la activación autocatalítica de BlaR1. Una vez activado BlaR1, produce de manera directa o indirecta (a través de la proteína BlaR2) la escisión de BlaI en dos fragmentos. Se permite entonces la transcripción de *blaZ* y *blaI/blaR1*, lo que lleva a un aumento de la síntesis de la enzima β -lactamasa, que inactiva a la penicilina produciendo la hidrólisis del anillo β -lactámico (Zhang y col., 2001).

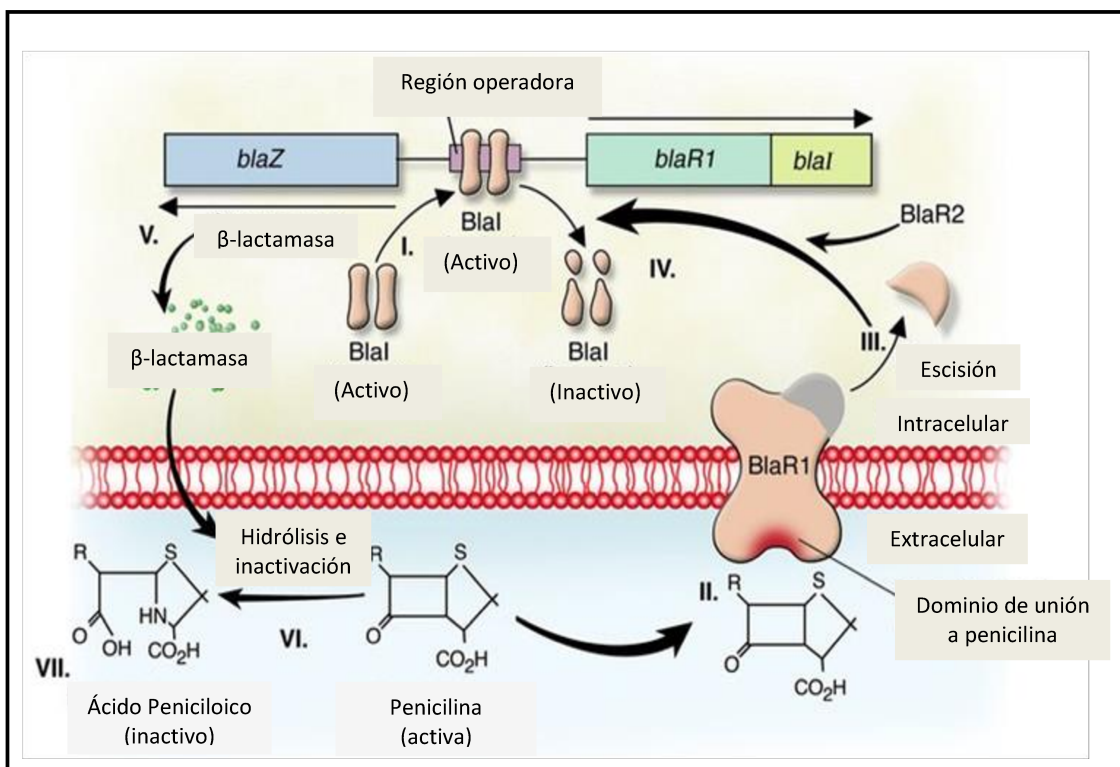


Figura 2. Síntesis de la enzima β -lactamasa en presencia de penicilina (Figura modificada de Lowy, 2003).

Los aislamientos de *S. aureus* resistentes a penicilina pronto comenzaron a causar infecciones en la comunidad, además de los hospitales y en los años 50 se convirtieron en pandémicos. Estas cepas resistentes a la penicilina correspondían a un único clon denominado Fagotipo 80/81 (Chambers y DeLeo, 2009).

En el año 1959, para combatir el creciente problema de las infecciones causadas por cepas resistentes a penicilina se introdujo en la práctica clínica la meticilina, un antibiótico semisintético derivado de la penicilina, el cual resistía la acción de las penicilinasas. Tan solo dos años después del primer uso de la meticilina, en 1961, apareció el primer aislamiento de *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) (Jeovens, 1961).

Resistencia a meticilina

La resistencia a meticilina se debe a la producción de una proteína de unión a penicilinas adicional (PBP2a), con baja afinidad para antibióticos β -lactámicos. Las PBPs son enzimas unidas a la membrana, que catalizan reacciones de transpeptidación, necesarias para lograr el entrecruzamiento característico de las cadenas de peptidoglicano. *S. aureus* posee normalmente 4 PBPs, que cumplen la función de actuar en el ensamblaje y regulación de la síntesis de la pared celular en sus últimas etapas. Cuando la actividad transpeptidasa de estas PBPs se encuentra inhibida por la acción de los antibióticos β -lactámicos, la PBP2a tiene la capacidad de cooperar activamente en la síntesis de peptidoglicano de la célula bacteriana, cumpliendo la función transpeptidasa de las otras PBPs inhibidas (Fuda y col., 2004).

El gen que codifica la PBP2a y que confiere resistencia a meticilina es el denominado gen *mecA*. A diferencia de la resistencia mediada por penicilinasas, que sólo confiere resistencia a penicilina, la resistencia mediada por el gen *mecA* aporta un espectro mucho más amplio de resistencia, afectando no sólo a la penicilina sino a todos los antibióticos β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes) excepto a la ceftarolina (Chambers y DeLeo, 2009).

La expresión del gen *mecA* está regulada por los genes *mecI* y *mecR1*, que codifican una proteína represora, MecI y una proteína transductora de señales, MecR1 respectivamente (Figura 3). Este sistema regulatorio es similar en su organización

molecular, estructura y función al sistema que regula la expresión de β -lactamasa (*blaR1-blaI-blaZ*) (Hiramatsu y col., 1992). La proteína MecR1 se encuentra unida a la membrana de *S. aureus*. MecI es una proteína de unión al ADN que se une a la región operadora del gen *mecA* y reprime su expresión. En presencia del antibiótico meticilina, éste se une al MecR1, el cual actúa produciendo la ruptura del represor MecI, que de esta manera no puede unirse al ADN, aumentando entonces la expresión del gen *mecA*. Esto produce un incremento en la síntesis de PBP2a llevando a la aparición de la resistencia a meticilina (Lowy, 2003).

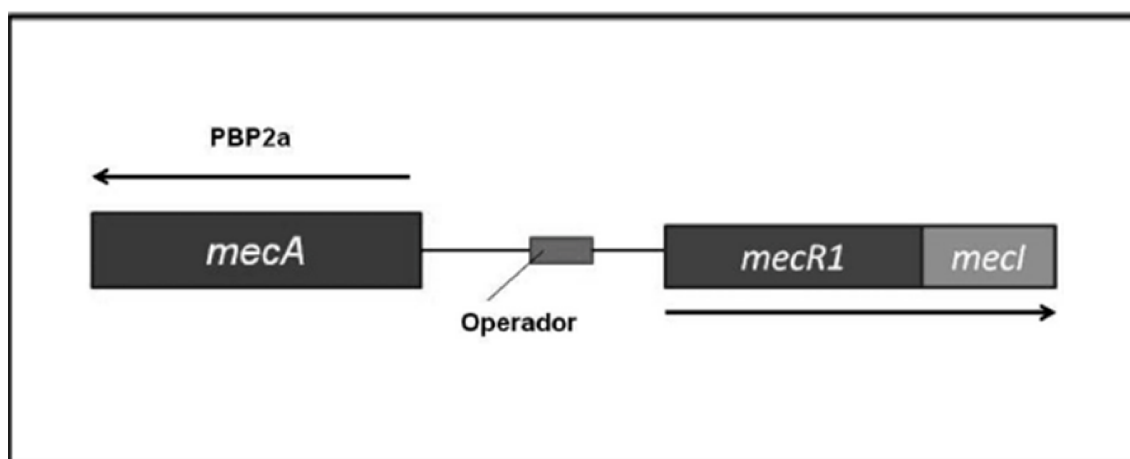


Figura 3. Esquema del operón *mec* (Figura modificada de Lowy, 2003).

El origen del gen *mecA* en los SARM no se conoce exactamente, pero se ha sugerido que pudo haber provenido de otras especies de *Staphylococcus* coagulasa negativos. Se han identificado genes homólogos al gen *mecA*, en especies como *Staphylococcus fleurettii*, *Staphylococcus sciuri* y *Staphylococcus vitilinus* con 99,8%; 80% y 91% de identidad nucleotídica respectivamente con el gen *mecA* encontrado en el cromosoma de los SARM. De esta manera, se considera que el gen *mecA* de *S. fleurettii* sería la fuente del gen *mecA* original que se incorporó en los *S. aureus*, y que junto con *S. vitilinus* contribuyeron al armado del complejo *mec*, siendo *S. sciuri* quien probablemente aportó el elemento genético móvil en el cual se insertó el complejo *mec* y así se constituyó la resistencia a meticilina, convirtiendo a estos aislados en los conocidos SARM (Tsubakishita y col., 2010; Rolo y col., 2017).

Aunque *S. aureus* sensible a la meticilina (SASM) produce infecciones hospitalarias, estas son en general de menor mortalidad que las producidas por SARM, no sólo porque hay mayores opciones de tratamiento, debido a que son sensibles a una gran variedad de antimicrobianos, sino también porque poseen muchas veces menor virulencia (Ben-David y col., 2009).

Resistencia a meticilina: *Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec)*

El aumento en todo el mundo de las infecciones causadas por SARM se debe en gran parte a dos factores principales: por un lado, a la expansión clonal de los distintos linajes de SARM y por otro lado, a la transformación de linajes exitosos de SASM en SARM por transferencia horizontal del elemento *SCCmec* (Noto y col., 2008).

El gen *mecA*, responsable de la resistencia a meticilina en *S. aureus* se localiza en un elemento genético móvil, dentro el cromosoma bacteriano, denominado *Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec)*. Este elemento se encuentra en un sitio específico del cromosoma, cerca del origen de replicación, en el extremo 3' del marco de lectura abierto, denominado *orfX* (Katayama y col., 2000). Se ha reportado hace poco tiempo que el *orfX* codifica para una ARN metiltransferasa ribosomal (Boundy y col., 2013).

El *SCCmec* es muy variable en su estructura y constitución genética. Este elemento tiene algunos componentes genéticos esenciales que se describen a continuación y que se observan esquemáticamente en la Figura 4.

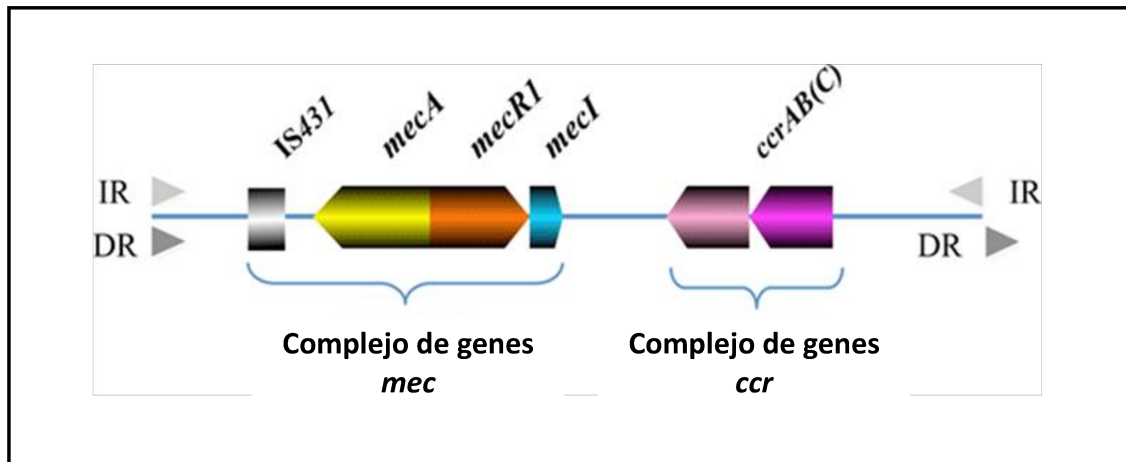


Figura 4. Estructura básica del SCC $_{mec}$ (Figura modificada de Hiramatsu y col., 2014).

1-El **complejo de genes *mec***, que contiene el determinante de resistencia a meticilina *mecA*, sus genes reguladores (*mecR1* y *mecI*) y secuencias de inserción. Cada complejo *mec* tiene una copia intacta del gen *mecA*, una copia de la secuencia de inserción IS431, y puede tener una copia completa o truncada de los genes reguladores *mecR1* y *mecI*. Se han identificado 5 tipos distintos de complejo *mec* en función de su constitución genética (Tabla 2) (IWG-SCC, 2009; Shore y col., 2011).

Los distintos tipos de complejo *mec* están compuestos por los siguientes grupos de genes:

-**Complejo *mec* clase A: IS431-*mecA*-*mecR1*-*mecI***: Es considerado el complejo prototipo y se compone del gen *mecA*, genes reguladores completos *mecR1* y *mecI* *upstream* a *mecA* y la secuencia de inserción IS431 *downstream* a *mecA*.

-**Complejo *mec* clase B: IS431-*mecA*- Δ *mecR1*-IS1272**: Está compuesto por el gen *mecA*, una región truncada del gen *mecR1* debido a la inserción de IS1272 *upstream* a *mecA* y la secuencia de inserción IS431 *downstream* a *mecA*.

-**Complejo *mec* clase C: IS431-*mecA*- Δ *mecR1*-IS431**: Contiene el gen *mecA*, una región truncada del *mecR1* por la inserción de IS431 *upstream* a *mecA* y la IS431 *downstream* a *mecA*. Si las dos secuencias de inserción IS431 se encuentran en la

misma dirección constituyen el complejo *mec* clase C1. Mientras que si se encuentran en direcciones opuestas forman el complejo *mec* clase C2.

-Complejo *mec* clase D: IS431-*mecA*- Δ *mecR1*: Compuesto por el gen *mecA*, una región truncada de *mecR1*, IS431 *downstream* a *mecA*, no posee secuencia de inserción *upstream* a *mecA*.

-Complejo *mec* clase E: *blaZ*-*mecC*-*mecR1c*-*mecIc*: Posee formas divergentes de los genes *mecA*, *mecR1*, *mecI*. Este complejo tiene una característica inusual que es la presencia del gen *blaZ* que codifica para una β -lactamasa (IWG-SCC, 2009; Shore y col., 2011).

2-El complejo de genes de recombinasas *ccr*, denominado *cassette chromosome recombinase*. Estos genes *ccr* codifican una o dos serina-recombinasas específicas, que permiten la movilidad del elemento genético. Estas enzimas recombinasas presentan homología con las enzimas de la familia de resolvasas/invertasas. La escisión e integración del SCC*mec* en el cromosoma bacteriano está mediada por el complejo *ccr*.

Las recombinasas están codificadas por tres genes distintos, denominados *ccrA*, *ccrB* y *ccrC*. Los genes *ccr* con identidad nucleotídica mayor al 85% son considerados pertenecientes al mismo alotipo. Existen identificados hasta el momento 9 tipos de complejos *ccr* (Tabla 2) (IWG-SCC, 2009; Wang y Archer, 2010; Shore y col., 2011; Wu y col., 2015).

3-Secuencias de repeticiones directas (DR) y repeticiones invertidas (IR): estas secuencias nucleotídicas se encuentran en los extremos del SCC*mec*. Las DR contienen las secuencias del sitio de integración específico ISS (*integration site sequence for SCC*). El ISS se encuentra en el extremo 3' del *orfX* y constituye el sitio específico reconocido por las recombinasas, donde se integra el elemento SCC*mec* en el cromosoma bacteriano (IWG-SCC, 2009; Hiramatsu y col., 2013).

4-Las **regiones *junkyard***, posteriormente llamadas *joining*. Estas regiones se denominan J1, J2 y J3. Constituyen regiones variables que rodean los complejos de genes *mec* y *ccr*. J1, es la región entre *ccr* y la región cromosomal que rodea al SCC*mec*. J2, comprende la región entre *mec* y *ccr*. J3, corresponde a la región entre *orfX* y *mec*. Estas regiones J pueden llevar diversos determinantes de resistencia adicionales. Los distintos subtipos de SCC*mec* están definidos por las diferencias encontradas en las regiones J (IWG-SCC, 2009).

Existen diversos tipos de SCC*mec* que difieren en su estructura y contenido genético. Cada tipo de SCC*mec* se define por la combinación del tipo de complejo *mec* y el tipo de complejo *ccr* que posee. Se han identificado hasta el momento 12 tipos diferentes de SCC*mec* (Tabla 2 y Figura 5) (IWG-SCC, 2009; Hiramatsu y col., 2013; Shore y col., 2011). El último casete identificado fue el SCC*mec* tipo XII, el cual tiene como particularidad que presenta en el complejo *ccr* un nuevo alotipo del gen *ccrC* (*ccrC2*). Además posee un complejo *mec* de estructura similar al complejo *mec* clase C2, aunque carece de una de las IS431 (Δ IS431-*mecA*- Δ *mecR1*-IS431) (Wu y col., 2015)

Tabla 2. Tipos de SCC*mec* identificados en *S. aureus*.

Tipo de SCC <i>mec</i>	Complejo de genes <i>ccr</i>	Complejo de genes <i>mec</i>
I	1 (A1B1)	B
II	2 (A2B2)	A
III	3 (A3B3)	A
IV	2 (A2B2)	B
V	5 (C1)	C2
VI	4 (A4B4)	B
VII	5 (C1)	C1
VIII	4 (A4B4)	A
IX	1 (A1B1)	C2
X	7 (A1B6)	C1
XI	8 (A1B3)	E
XII	9 (C2)	C2-like

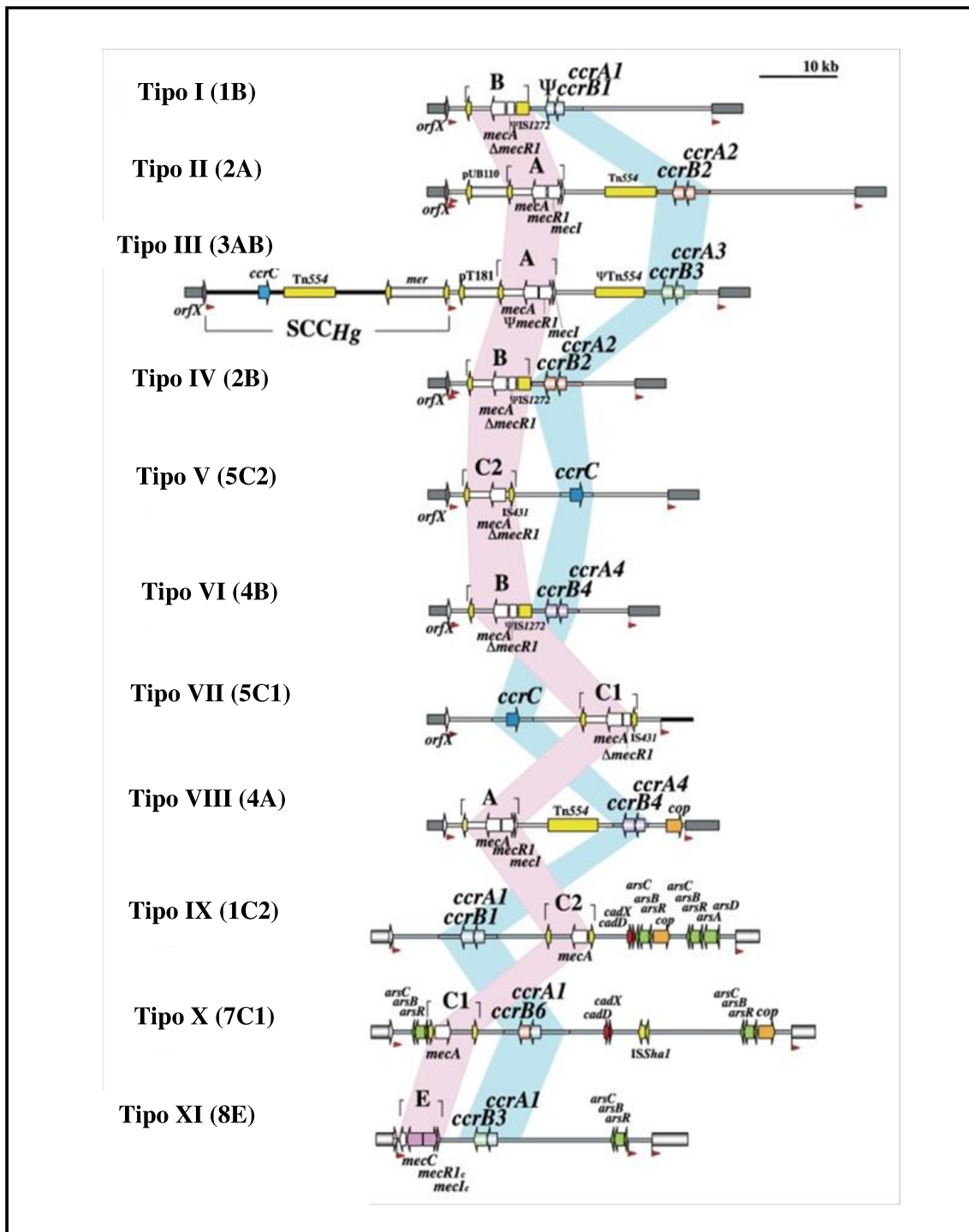


Figura 5. Estructura de los distintos tipos de SCCmec identificados (Figura modificada de Hiramatsu y col., 2013). Las DR están localizadas en ambos extremos (puntas de flechas rojas). Las localizaciones de los 5 tipos de complejo *mec* (A-E) están señalizados con una cinta de color rosa. Las localizaciones de los complejos de genes *ccr* (1-8) están indicadas con una cinta de color celeste. Secuencias de inserción y transposones se encuentran indicadas en amarillo. También se encuentran representados genes asociados a resistencia a metales pesados y plásmidos integrados localizados en las regiones J.

El SCC*mec* se caracteriza también por ser vehículo de genes distintos al *mecA*. Por ejemplo: contiene un grupo de genes para cápsula tipo 1 (SCC*cap1*), genes para la resistencia a ácido fusídico (SCC*fur*), genes para la resistencia al mercurio (SCC*Hg*), PBP4 y enterotoxinas H (*seh*). De esta manera el SCC*mec* contiene no solo genes de resistencia a antibióticos, sino también una gran variedad de genes que sirven para la adaptación bacteriana a diversos ambientes (Hiramatsu y col., 2013).

***S. aureus* resistente a meticilina asociado a la comunidad**

Desde su primera aparición en 1961, SARM rápidamente se diseminó por todo el mundo y estuvo por muchos años asociado a las infecciones hospitalarias (SARM-AH). Estas infecciones ocurren en pacientes con factores de riesgo que favorecen la colonización o infección por esta bacteria (entre otros, tratamiento antibiótico prolongado, internación prolongada, procedimientos invasivos). Sin embargo, a mediados de los años 90 apareció SARM por primera vez en la comunidad (SARM-AC), en pacientes sin los factores de riesgo tradicionales para SARM-AH. El primer aislamiento fue reportado en una población indígena del norte de Australia y a partir de allí se propagó por todo el mundo. Este hecho marcó uno de los eventos más sorprendentes de los últimos años en lo que respecta a enfermedades infecciosas, debido a que las infecciones por *S. aureus* en la comunidad habían sido causadas hasta ese entonces por el SASM, no por la forma resistente y que era más prevalente en los hospitales (Chambers y DeLeo, 2009).

No se sabe con certeza el origen del SARM-AC, aunque se ha sugerido que emergió como consecuencia de la inserción del gen *mecA* en los SASM (DeLeo y col., 2010).

SARM-AC se caracteriza por causar infecciones en individuos sanos, sin factores de riesgo predisponentes para infección por SARM. Afecta sobre todo a personas jóvenes y se asocia principalmente a infecciones de piel y tejidos blandos, aunque también puede causar infecciones severas y mortales como sepsis, fascitis y neumonía necrotizante.

Los factores que favorecen el contagio incluyen el contacto piel con piel con individuos contaminados o infectados, hacinamiento, compartimiento de objetos personales que puedan estar contaminados.

Es sabido que los clones de SARM-AC no son los mismos que circulan por los hospitales. Sus características genóticas no están relacionadas con los clones hospitalarios, además difieren en su perfil de resistencia a los antibióticos y generalmente son cepas más virulentas.

La gravedad de las infecciones por SARM-AC indica que son cepas que tienen una mayor virulencia y con mayor capacidad para evadir las defensas del huésped que los SARM-AH (De Leo y Chambers, 2010).

El SARM-AC posee varios factores de virulencia que le permiten colonizar, invadir y causar las infecciones en el huésped. La mayoría de los aislados de SARM-AC poseen el determinante de virulencia LPV, con capacidad de destruir neutrófilos, mediante la formación de poros en la membrana celular, causando una gran respuesta inflamatoria y daño en el huésped. Se ha asociado con infecciones severas de la piel y neumonía necrotizante severa (Lina y col., 1999). Otros determinantes de virulencia presentes en SARM-AC son las α -hemolisinas, PMS α y en algunos linajes de SAMR-AC, el ACME (*arginine catabolic mobile element*), el cual facilita la colonización y transmisión (DeLeo y col., 2010).

Los SARM-AH poseen SCC*mec* tipo I, II y III. Se caracterizan por ser resistentes a los antibióticos β -lactámicos, además de presentar generalmente co-resistencia a muchos antibióticos no β -lactámicos, siendo considerados organismos multiresistentes. Por el contrario, los aislamientos de SARM-AC difieren de los clones hospitalarios en que poseen frecuentemente SCC*mec* tipo IV o V y genes de virulencia que codifican para la LPV (Naimi y col., 2003b).

Durante muchos años el SARM-AC se caracterizó por presentar un espectro más amplio de sensibilidad a los antibióticos que SARM-AH, pero esta característica ha ido cambiando y se han reportado casos de infecciones causadas por SARM-AC multiresistente (Otto, 2013). Asimismo, en los últimos años se ha observado un creciente número de infecciones hospitalarias causadas por SARM-AC, sugiriendo y

alertando sobre el posible reemplazo de los clones SARM-AH por el SARM-AC (Figueiredo, 2017; D'Agata y col., 2009).

Resistencia a vancomicina

El gran aumento de las infecciones causadas por SARM, llevó al uso masivo de la vancomicina (VAN) para el tratamiento de las infecciones invasivas. Este glucopéptido, representó durante muchos años la última opción disponible con efectividad para el tratamiento de estas infecciones. La intensa presión selectiva ejercida por el antibiótico resultó en la emergencia de cepas denominadas VISA (*vancomycin intermediate S. aureus*) causando gran preocupación en todo el mundo. El primer aislamiento con sensibilidad disminuida a VAN, se reportó por primera vez en Japón en el año 1996, proveniente de una infección de herida quirúrgica, la cual no respondió al tratamiento con VAN. El aislamiento tenía una concentración inhibitoria mínima (CIM) de VAN de 8 µg/mL y se encontraba en el rango de sensibilidad intermedia según los puntos de corte propuestos por el CLSI (Hiramatsu y col., 1997). Posteriormente, se detectaron estas cepas VISA en todo el mundo. Actualmente, las cepas VISA se definen por tener una CIM de VAN entre 4-8 µg/mL (CLSI, 2016).

Existe un estado previo a la adquisición de sensibilidad intermedia a VAN, que está representado por aislamientos de *S. aureus* que presentan valores de CIM en el rango de sensibilidad (≤ 2 µg/mL), pero tienen subpoblaciones (1×10^{-7} o 1×10^{-8}) de células con sensibilidad reducida a VAN (CIM entre 4-8 µg/mL), y por lo tanto no son detectados por los método de rutina en los laboratorios. Estos aislamientos son denominados h-VISA (*heterogeneous VISA*) y se asocian frecuentemente con falla en el tratamiento con VAN. Se ha sugerido que las infecciones causadas por VISA podrían estar precedidas por cepas h-VISA, las cuales debido a la presión selectiva ejercida por VAN se seleccionan y desarrollan posteriormente con un nivel homogéneo de resistencia (Liu y Chambers, 2003).

Dos años después de la aparición del primer aislamiento VISA, se reportó en Michigan, EEUU, el primer hallazgo de un aislamiento de *S. aureus* resistente a VAN y fue denominado VRSA (*vancomycin resistant S. aureus*). El mismo tenía una CIM de

VAN > 128 µg/mL (CDC, 2002). Las cepas VRSA han sido definidas por el CLSI con valores de CIM de VAN \geq 16 µg/mL (CLSI, 2016).

En Argentina se han detectado aislamientos VISA y h-VISA asociados a falla en el tratamiento con VAN en pacientes provenientes de la comunidad (Errecalde y col., 2013; Sola y col., 2011; Di Gregorio y col., 2016). Así mismo, si bien los aislamientos h-VISA se suelen describir en poblaciones de SARM, se han reportado casos en SASM, como en un reporte en Argentina de un caso de Endocarditis aguda causada por SASM, que mostró falla en el tratamiento con VAN y en el que se detectaron subpoblaciones correspondientes a VISA (Perazzi y col., 2011).

La VAN actúa inhibiendo la síntesis del peptidoglicano en una etapa tardía, uniéndose al extremo C-terminal del residuo D-Ala-D-Ala de precursores de peptidoglicano, formando un complejo no covalente, estable, mantenido por uniones puente de hidrógeno, impidiendo de esta manera que continúe la síntesis de la pared celular bacteriana. Si por alguna razón se impide la unión de la VAN al residuo D-Ala-D-Ala se producirá una disminución de la potencia de la droga.

Los mecanismos de resistencia observados en las cepas VISA y VRSA son diferentes. Si bien el mecanismo responsable de la sensibilidad disminuida a VAN en las cepas h-VISA y VISA no ha sido completamente elucidado, se ha descrito la adquisición de una variedad de mutaciones secuenciales en los aislamientos sensibles a VAN, que afectan la biosíntesis de la pared celular, llevando a su engrosamiento y actividad autolítica reducida (Howden y col., 2010).

Las cepas VISA producen cantidades adicionales de peptidoglicano, lo que resulta en una pared celular engrosada. También, se ha descrito una disminución de los entrecruzamientos de las cadenas de peptidoglicano, por lo que quedan más residuos D-Ala-D-Ala disponibles para unirse a la VAN. La unión de VAN a estos residuos impide que más moléculas del antibiótico puedan acceder a la membrana citoplasmática. De esta manera, grandes cantidades de VAN quedan atrapadas en esta capa anormalmente engrosada de peptidoglicano, llevando a una reducida sensibilidad a este antibiótico (Figura 6) (Lowy, 2003).

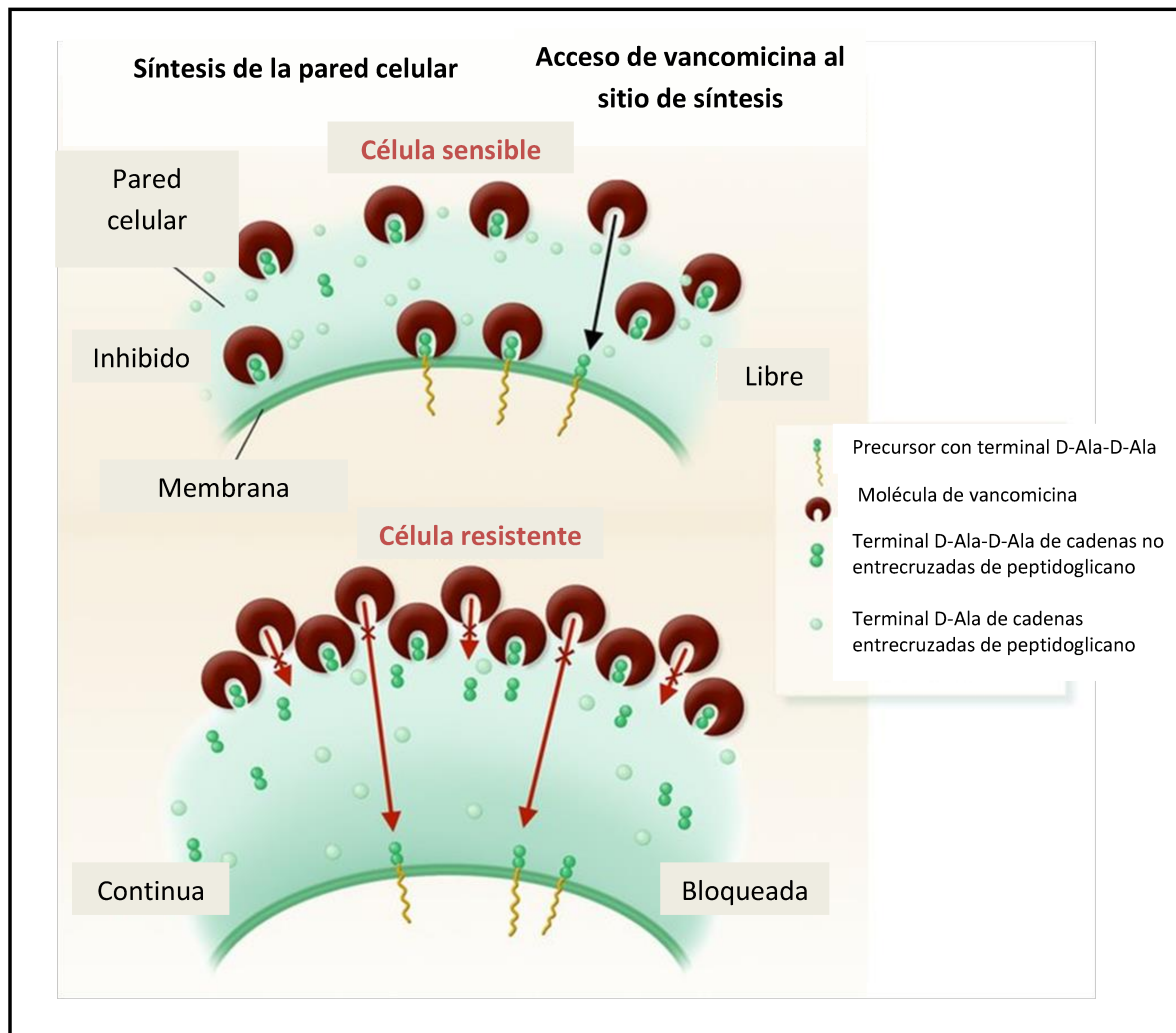


Figura 6. Mecanismo de resistencia a VAN observado en las cepas VISA (Figura modificada de Lowy, 2003).

Los aislamientos VRSA presentan un mecanismo de resistencia diferente a las VISA. Ellos adquirieron el operón *vanA* por conjugación a partir de *Enterococcus faecalis* resistente a VAN. El operón *vanA*, que se encuentra incluido en el transposón Tn1546, codifica enzimas que sintetizan precursores de baja afinidad, en los cuales se ha modificado el residuo C-terminal D-Ala por D-Lac, alterando por lo tanto el sitio de unión de VAN. Además, estas enzimas producen la eliminación de los precursores de alta afinidad, eliminando de esta manera la VAN que se encuentre unida a ellos (Figura 7) (Lowy, 2003).

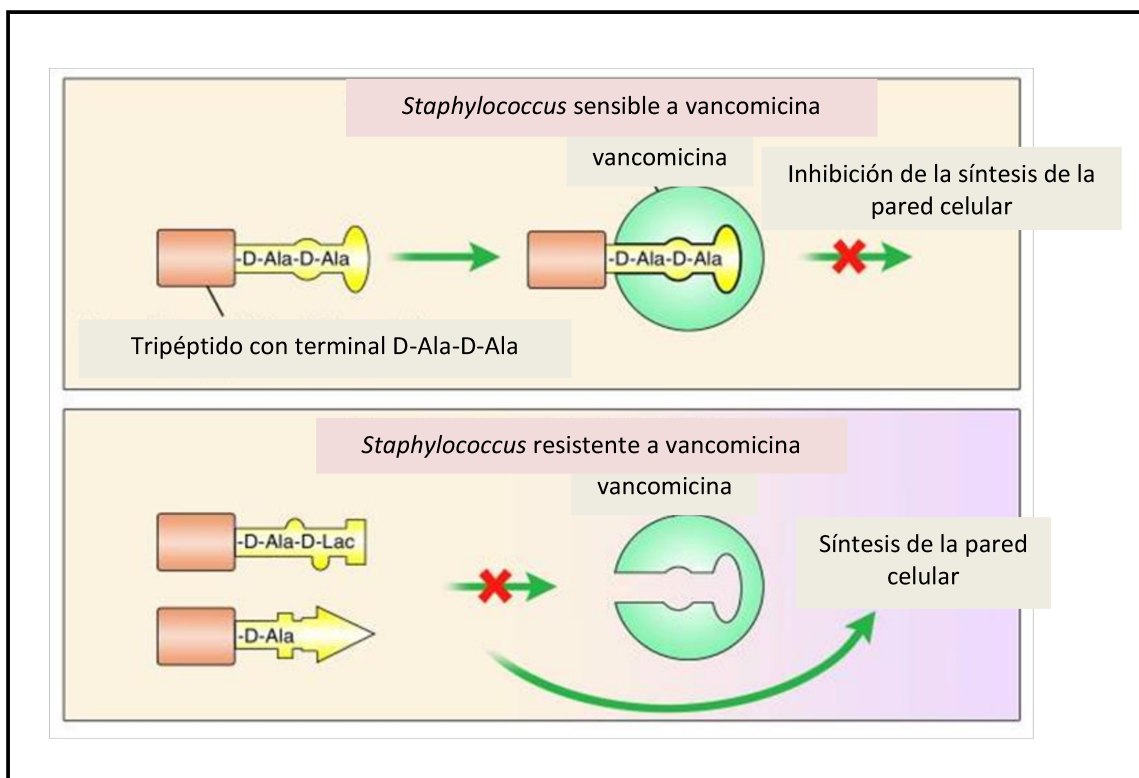


Figura 7. Mecanismo de resistencia a VAN en cepas VRSA (Figura modificada de Lowy, 2003).

Epidemiología de SARM

Los brotes y epidemias producidas por SARM han emergido y se han propagado por todo el mundo. Una característica importante de estas epidemias es que han sido producidas por un número limitado de clones de *S. aureus* que varían según la localización geográfica (Chambers y DeLeo, 2009).

Los datos aportados por los análisis de los aislamientos de SARM hospitalarios, muestran la predominancia de algunos clones epidémicos, ya sea en hospitales situados en la misma zona o separados por grandes distancias. La rápida propagación de estos clones a través de los distintos hospitales e incluso distintos países refleja su elevada epidemividad y habilidad de colonizar pacientes dentro de una determinada comunidad (Da Silva Coimbra y col., 2000).

La diversidad genética que presentan los distintos clones existentes de SARM deriva de mutaciones puntuales, recombinación y/o adquisición-delección de elementos genéticos móviles, dando lugar a una extensa diversidad fenotípica y genotípica. Para el estudio de la epidemiología de SARM es necesario identificar apropiadamente los clones circulantes y diferenciarlos de otros aislamientos. Frecuentemente se utilizan métodos que incluyen la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), la ribotipificación y la electroforesis en campo pulsado (PFGE), que permite poner en evidencia patrones indistinguibles por métodos basados en PCR o en la restricción del ADN genómico (Rodríguez Noriega y col., 2010). Sin embargo, existen otros métodos de tipificación molecular como el MLST (*multilocus sequence typing*), que permite caracterizar el origen de los diferentes linajes y su diseminación a nivel global, haciendo posible el estudio de la evolución histórica de este patógeno (Maiden y col., 1998). La caracterización completa de los clones de SARM requiere además de la identificación del tipo estructural del SCC*mec* presente. Actualmente la introducción de las técnicas de secuenciación masiva ha permitido trazar la evolución y el origen de los diferentes clones a partir del análisis de secuencias de genomas completos (epidemiología genómica) (Aanensen y col., 2016).

En Argentina, de acuerdo al sistema informático de resistencia, SARM está dentro de los patógenos nosocomiales más prevalentes. Según el último informe de resistencia antibiótica presentado por la OMS en el año 2014, la prevalencia de SARM en Argentina es del 54% (WHO, 2014). Por otro lado, según los datos presentes en el informe de resistencia antibiótica de la OPS del año 2015, la prevalencia de SARM de origen hospitalario es de 44%, mientras que la correspondiente al SARM-AC es de 48% (OPS, 2015)

En un estudio multicéntrico, llevado a cabo en Buenos Aires, se halló que el SARM-AC es la causa más común de infecciones de piel y tejidos blandos en los mayores de 14 años, sin contacto previo con establecimientos de salud, principalmente asociadas a lesiones purulentas (López Furst y col., 2013).

Hasta hace algunos años el denominado clon cordobés circulaba mayormente en los hospitales de Argentina, y fue responsable de causar brotes nosocomiales en Córdoba, Buenos Aires y otras regiones del país (Gardella y col., 2011; Sola y col., 2002). El clon cordobés, que posee un secuenciotipo (ST) 5 y SCC*mec* I, fue el que

reemplazó en su momento a los denominados clon brasilero (ST239-SCC*mec* III) y pediátrico (ST5, SCC*mec* IV), previamente diseminados por el país (Corso y col., 1998; Da Silva Coimbra y col., 2000).

Con respecto a lo que sucede con la distribución del SARM-AC, en Argentina, durante algunos años el clon predominante fue el denominado clon CAA (ST5-SCC*mec* IV), que actualmente ha sido reemplazado por un clon que se ha diseminado con mayor prevalencia, perteneciente al ST30, SCC*mec* IV, LPV positivo, el cual es responsable de infecciones de piel, partes blandas y enfermedades invasivas, como la neumonía necrotizante, tanto en pacientes adolescentes y adultos (Fernandez y col., 2013).

Tratamiento de las infecciones causadas por *S. aureus*

El tratamiento de elección para las infecciones causadas por SARM siguen siendo los antibióticos β -lactámicos, los cuales han demostrado los mejores resultados en el manejo de las infecciones causadas por aislamientos de *S. aureus* sensibles a la meticilina (Chan y col., 2012). Por el contrario, si se trata de infecciones causadas por SARM, la VAN sigue representando la opción de elección para su tratamiento, sin embargo el hecho de que hayan aparecido cepas con sensibilidad intermedia y con resistencia hacia este antibiótico, junto con el reporte de fallas en el tratamiento, ha despertado una señal de alarma en todo el mundo y se pretende buscar nuevas opciones de tratamiento para limitar su uso indiscriminado (van Hal y Fowler, 2013).

El descubrimiento de una nueva cefalosporina, denominada ceftarolina, que posee buena actividad frente a SARM, debido a que presenta alta afinidad por las PBP2a, ha permitido considerarla como una opción válida para el tratamiento de las infecciones causadas por SARM (Richter y col., 2011). Sin embargo, en los últimos años se han reportado aislamientos de SARM con alta resistencia a ceftarolina, debido a mutaciones en el gen *mecA*, produciendo una disminución de la afinidad de las PBP2a por este antibiótico (Long y col., 2014).

El linezolid es otro de los nuevos antibióticos, perteneciente a la familia de las oxazolidinonas, que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas mediante la unión a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, interactuando con el ARN 23S y con proteínas

ribosómicas. Este antibiótico se aprobó en el año 2000 para el tratamiento de infecciones de piel y partes blandas complicadas y neumonías causadas por cocos Gram positivos, incluyendo VISA y h-VISA (Leach y col., 2011). No obstante, desde el año 2001 se ha reportado la aparición de aislamientos de *S. aureus* resistentes a linezolid, generalmente debido a alteraciones en los genes que codifican para las proteínas ribosómicas (Tsiodras y col., 2001).

Otro antibiótico usado como una alternativa a la VAN en infecciones por SARM es la daptomicina. Este es un antibiótico lipopéptido, aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) para el tratamiento de infecciones de piel y tejidos blandos, endocarditis y bacteriemias. Es inactivada por el surfactante pulmonar, razón por la cual no ha sido aprobada para el tratamiento de neumonías (Liu y col., 2011). La daptomicina se une a la membrana celular bacteriana mediante un mecanismo dependiente de calcio y provoca el eflujo de potasio llevando a la muerte celular (Steenbergen y col., 2005). Aunque daptomicina es activa frente a cepas de h-VISA y VISA, se ha reportado en los últimos años la aparición de heteroresistencia a daptomicina. Además se ha detectado una relación entre la reducida sensibilidad a daptomicina y la resistencia a VAN en cepas VISA. Es por ello que la selección de resistencia a VAN durante el tratamiento con VAN puede resultar además en la adquisición de resistencia a daptomicina, por lo que se debería tener especial cuidado al utilizar daptomicina en el tratamiento de infecciones causadas por poblaciones de *S. aureus* que puedan contener h-VISA y VISA (Kelley y col., 2011; Cui y col., 2006). Los mecanismos de resistencia a daptomicina no están claros, pero se lo ha relacionado con mutaciones en genes involucrados en la organización y función de la membrana celular (Friedman y col., 2006).

Tres nuevas drogas (oritavancina, dalbavancina y tedizolid) han sido aprobadas por la FDA en el año 2014 para el tratamiento de infecciones de la piel causadas por SARM. Oritavancina y dalbavancina son miembros de la familia de los lipoglicopéptidos y son considerados análogos a la VAN (Tatarkiewicz y col., 2016). Dalbavancina, además de su indicación oficial también se ha demostrado que es activa frente a h-VISA y VISA (Citron y col., 2014).

Tigeciclina

La tigeciclina (TIG) es el primer representante de una nueva familia de antimicrobianos, denominados glicilciclinas. Es un derivado semisintético de la minociclina, que contiene un grupo 9-t-butilglicilamido en el anillo D de la molécula (Sum y Petersen, 1999), como se puede observar en la Figura 8. Este antibiótico posee actividad frente a organismos Gram positivos, Gram negativos, aeróbicos, anaeróbicos y especies bacterianas atípicas. También, es activo frente a varios organismos multiresistentes como SARM, enterococos resistentes a VAN, VISA y algunas especies de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido o carbapenemasas. Esto hace posible su uso como una opción útil para el tratamiento de infecciones causadas por estos organismos, en pacientes hospitalizados, para los cuales no existe otra alternativa terapéutica adecuada disponible (Bradford y col., 2005; Heizmann y col., 2015).

Esta droga no presenta actividad eficiente frente a especies de los géneros *Proteus*, *Pseudomonas* y *Morganella* debido a que presentan resistencia intrínseca mediante mecanismos de eflujo (Visalli y col., 2003; Dean y col., 2003; Ruzin y col., 2005).

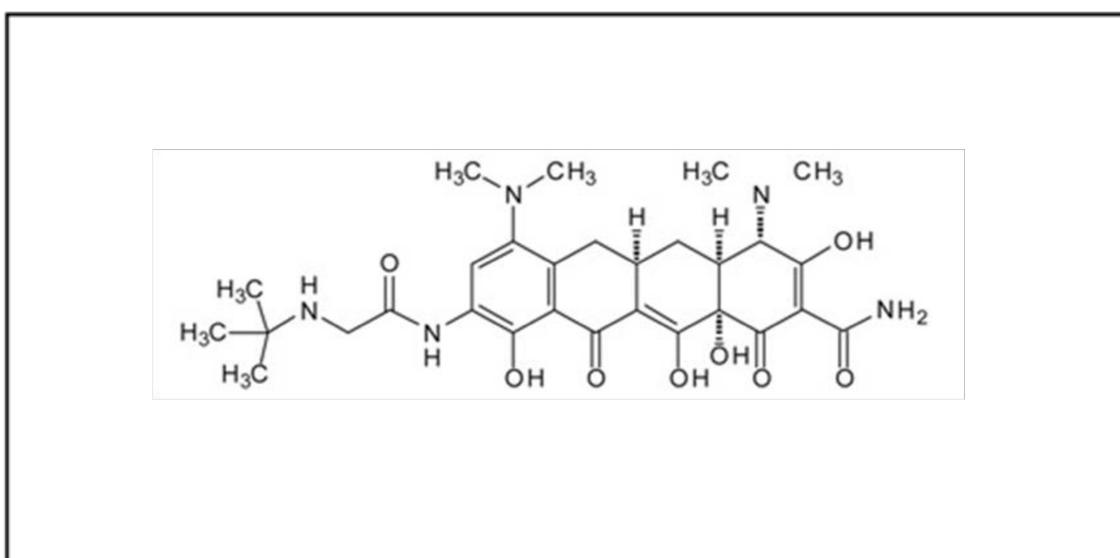


Figura 8. Estructura química de TIG.

La TIG fue aprobada en 2005 por la FDA, para el tratamiento de infecciones intra-abdominales complicadas, infecciones de piel y tejido celular subcutáneo complicadas y neumonía bacteriana adquirida en la comunidad (Babinchak y col., 2005; Ellis-Grosse y col., 2005; Tanaseanu y col., 2009). Sin embargo, su perfil farmacológico y microbiológico resulta alentador para su uso en otras infecciones, causadas por patógenos resistentes, que poseen limitadas opciones de tratamiento, ya sea como monoterapia o en combinación con otros agentes antimicrobianos (Heizmann y col., 2015).

TIG exhibe generalmente acción bacteriostática, sin embargo en algunos casos ha mostrado actividad bactericida frente a microorganismos asociados a infecciones severas (Petersen y col., 2007; Herrera y col., 2013). En diversos ensayos clínicos, TIG ha demostrado ser una opción segura y eficaz, que evade muchos de los mecanismos de resistencia de una gran variedad de patógenos causantes de infecciones graves. Por otra parte, posee ciertas propiedades que facilitan su uso en pacientes con infecciones complicadas, algunas de éstas son, la extensa distribución tisular, larga vida media, amplio espectro de actividad y simple esquema de dosis; a pesar de mostrar relativamente bajas concentraciones en suero. Por otra parte, no requiere ajuste de dosis frente a insuficiencia renal, insuficiencia hepática leve a moderada, ni entre diferentes grupos de edades y sexos, tampoco posee interacción con otros fármacos y alimentos. No es hepatotóxica ni nefrotóxica y no requiere monitoreo de su concentración en el plasma (Nicolau, 2009). Sin embargo, se debe tener en cuenta que en el año 2010 la FDA reportó un incremento en el riesgo de muerte asociado al uso de TIG, ya sea por complicaciones de la infección u otras afecciones médicas (FDA, 2010). No obstante, se han realizado ensayos clínicos en los cuales no se pudo concluir que un incremento en la mortalidad fuera a causa de fallo en el tratamiento con TIG, sino que podría tener que ver con otras complicaciones médicas, o con la presencia de co-morbilidades. Estos autores sugieren que el costo-beneficio de TIG sigue siendo positivo, si se considera el preocupante incremento de las infecciones por organismos multiresistentes, sumado a la escasa disponibilidad de nuevos agentes antimicrobianos (McGovern y col., 2013; Bassetti y col., 2015).

El mecanismo de acción de TIG es muy similar al de las tetraciclinas, este antibiótico inhibe la traducción del ARNm a proteínas, dado que se une reversiblemente

a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. Esta unión bloquea la entrada del aminoacil-ARNt al sitio A del ribosoma, impidiendo así la incorporación de aminoácidos y la posterior elongación de las cadenas peptídicas (Olson y col., 2006). Las glicilciclinas se unen al ribosoma con una afinidad cinco veces superior que las tetraciclinas y han sido diseñadas para superar los dos principales mecanismos de resistencia a las tetraciclinas: la protección ribosomal y las bombas de eflujo. En *S. aureus*, la TIG evade la bomba de eflujo Tet (K), la cual confiere resistencia a tetraciclina pero no a minociclina o doxiciclina. Además se une a los ribosomas que han sido modificados por la proteína Tet (M), un mecanismo que compromete a todas las tetraciclinas disponibles. La evasión de Tet (M) es probablemente debida a que la TIG se une a los ribosomas en orientación diferente a las tetraciclinas clásicas (Bergeron y col., 1996; Rasmussen y col., 1994).

Los estudios de vigilancia de TIG que se han llevado a cabo desde su aprobación siguen mostrando una buena actividad frente a *S. aureus*, con altas proporciones de sensibilidad (99,9%) reportado en diversos países alrededor del mundo (Hoban y col., 2015). También, se ha reportado alta sensibilidad en América Latina, en un estudio realizado con aislamientos de *S. aureus* recolectados entre 2004 y 2015, presentando un rango de CIM entre $\leq 0,008-2 \mu\text{g/mL}$ (Vega y Dowzicky, 2017). Sin embargo, en presencia de presión selectiva, se ha observado que los aislamientos de *S. aureus* son capaces de desarrollar una disminución de la sensibilidad *in vitro* a diversos antibióticos (McAleese y col., 2005; Banerjee y col., 2008; Vidaillac y col., 2013).

Si bien un pequeño número de aislamientos de *S. aureus* no susceptibles a TIG han sido recolectados como parte del programa de vigilancia TEST en América Latina, en el período 2004-2010 (Garza-Gonzales y Dowzicky, 2013), desde el año 2010 hasta 2016 todos los aislamientos de *S. aureus* (incluyendo SARM) fueron sensibles a TIG (Sader y col., 2016). Mientras que en el reporte del año 2017 se volvió a detectar una sensibilidad del 99,9% (Vega y Dowzicky, 2017).

Con respecto a la actividad de TIG frente a otras especies bacterianas se ha reportado resistencia en aislamientos clínicos de algunas especies como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella entérica* y *Serratia marscecens*, en los cuales la resistencia es mediada por mecanismos de eflujo (Barberán y col., 2015).

Hipótesis y justificación del estudio

La gran plasticidad genómica de *S. aureus* sugiere que así como ha ocurrido anteriormente en la historia evolutiva de esta especie bacteriana, la introducción de tigeciclina en la práctica clínica también podría contribuir a la selección de mutantes resistentes.

Las opciones de tratamiento de las infecciones causadas por *S. aureus* son cada vez más limitadas, debido a la rápida y continua adaptación y desarrollo de resistencia de esta bacteria hacia los antibióticos utilizados más frecuentemente. Teniendo esto presente, nos propusimos estudiar el comportamiento de este microorganismo frente a tigeciclina, que representa una de las opciones terapéuticas disponibles para el tratamiento de infecciones serias, causadas por bacterias multirresistentes.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es contribuir al saber general de *S. aureus* frente a la presión antibiótica y en particular, aportar nuevos conocimientos en lo que respecta a su comportamiento frente a tigeciclina (una alternativa antimicrobiana para las infecciones causadas por este microorganismo) y a la selección de mutantes resistentes.

Objetivos específicos

1- Caracterizar los aislamientos seleccionados para este estudio, recuperados de materiales clínicos, procedentes de pacientes asistidos en distintos centros hospitalarios.

- Evaluar la sensibilidad de los aislamientos a los antibióticos utilizados más frecuentemente en la práctica clínica, para el tratamiento de las infecciones causadas por *S. aureus*, incluyendo tigeciclina.
- Caracterizar genótipicamente los aislamientos en estudio.
- Evaluar la cinética de muerte de los aislamientos de *S. aureus* frente a tigeciclina.

2- Seleccionar *in vitro* mutantes con sensibilidad disminuida o resistentes a tigeciclina y realizar un estudio comparativo entre aislamientos parentales y mutantes.

- Corroborar la isogenicidad entre las cepas mutantes con sensibilidad disminuida, o resistentes a tigeciclina y los aislamientos parentales respectivos.
- Evaluar la sensibilidad de las cepas mutantes a diferentes antibióticos. Compararlas con los respectivos aislamientos parentales.
- Evaluar y comparar la cinética de muerte de las cepas mutantes resistentes a tigeciclina y de los aislamientos parentales.

3- Evaluar la eficiencia metabólica o fisiológica (*fitness*) de las cepas mutantes resistentes a tigeciclina y compararla con el correspondiente aislamiento sensible parental.

- Determinar y analizar la velocidad de crecimiento, la frecuencia mutacional y el perfil de autólisis.

4- Analizar los posibles mecanismos involucrados en el desarrollo de resistencia a tigeciclina.

- Evaluar el sitio diana de tigeciclina, tanto en los aislamientos parentales como en las cepas mutantes resistentes a tigeciclina.
- Evaluar fenotípicamente y comparar la actividad eflujo entre las cepas mutantes y los aislamientos parentales.
- Estudiar a nivel molecular los sistemas de eflujo que podrían estar involucrados en la disminución de la sensibilidad a tigeciclina.

5- Analizar el impacto de la presión selectiva ejercida por tigeciclina sobre la movilización de la secuencia de inserción IS256.

6- Secuenciar el genoma completo de dos aislamientos parentales y sus correspondientes cepas mutantes resistentes a tigeciclina seleccionadas *in vitro*.

- Analizar comparativamente mediante herramientas bioinformáticas, las posibles alteraciones nucleotídicas en las secuencias genómicas de las cepas mutantes con respecto a los aislamientos parentales.
- Analizar posibles alteraciones en el número de copias y localización de secuencias de inserción presentes en el genoma de *S. aureus*, tanto en las cepas mutantes resistentes a tigeciclina como en los aislamientos parentales.

CAPÍTULO 1

**Selección *in vitro* y caracterización fenotípica de
mutantes resistentes a tigeciclina**

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1- Microorganismos

Se seleccionaron 20 aislamientos de *S. aureus* (10 SASM y 10 SARM) recuperados de materiales clínicamente significativos, provenientes de pacientes atendidos en dos centros hospitalarios de la provincia de Entre Ríos (Sanatorio Adventista del Plata, de Libertador San Martín y Hospital San Martín de Paraná) (Tablas 3 y 4). Los aislamientos fueron recuperados durante el período comprendido entre enero de 2004 y diciembre de 2008.

Tabla 3. Aislamientos seleccionados de SARM.

Aislamiento	Material clínico	Probable Adquisición
477	Espuito	Comunidad
1870	Orina	Comunidad
497	Forúnculo	Comunidad
2028	Secreción de miembro superior	Hospitalaria
94159	Orina	Comunidad
34131	Secreción de columna	Comunidad
220	Catéter venoso	Hospitalaria
74016	Prótesis de cadera	Comunidad
101995	Herida quirúrgica	Hospitalaria
4261	Herida quirúrgica	Hospitalaria

Tabla 4. Aislamientos seleccionados de SASM.

Aislamiento	Material clínico	Probable Adquisición
54081	Tejido calcáneo	Hospitalaria
74111	Secreción pleural	Hospitalaria
14298	Secreción de herida	Comunidad
74073	Partes blandas	Comunidad
14069	Absceso	Comunidad
14267	Secreción de herida	Comunidad
34076	Espujo	Comunidad
34204	Herida quirúrgica	Hospitalaria
44213	Secreción de herida	Comunidad
34023	Líquido articular	Comunidad

1.2- Identificación fenotípica de los aislamientos

Se confirmó la identificación de los aislamientos recolectados, a nivel de especie a través de la realización de pruebas bioquímicas convencionales.

Los aislamientos confirmados como *S. aureus* se almacenaron en caldo Mueller Hinton (MH, Britania) con glicerol al 15% en freezer a -20°C y en termo de nitrógeno líquido, hasta su posterior recuperación.

1.3- Evaluación de la sensibilidad a los antimicrobianos

Se realizó el estudio cualitativo y cuantitativo de la sensibilidad a los antibióticos utilizados más frecuentemente en la práctica clínica, además de TIG. Ambas determinaciones se realizaron por duplicado.

1.3.1- Determinación cualitativa de la sensibilidad a los antimicrobianos

Se realizó por el método de difusión con discos, conocido como método de Kirby Bauer, siguiendo las recomendaciones del CLSI 2013 (*Clinical and Laboratory Standard Institute*) (CLSI, 2013).

A partir de un cultivo de 24 h se preparó un inóculo en solución fisiológica estéril, ajustando la turbidez al estándar 0,5 McFarland (10^7 - 10^8 UFC/mL). Se sembró con hisopo estéril el inóculo en una placa de agar Mueller Hinton (MH, Britania). Luego, se aplicaron los discos de antibiótico y se incubó a 35°C durante 24 h. Se midieron los halos de inhibición, teniéndose en cuenta los puntos de corte propuestos por el CLSI (Tabla 5). Para el caso de TIG se tuvieron en cuenta los puntos de corte recomendados por la FDA (*Pfizer Tygacil Package Insert*, 2010).

Los antibióticos ensayados fueron los siguientes: oxacilina 1 µg (OXA, Britania), cefoxitina 30 µg (FOX, Britania), cefalotina 30 µg (CEF, Britania), gentamicina 10 µg (GEN, Britania), ciprofloxacina 5 µg (CIP, Britania), clindamicina 2 µg (CLI, Britania), eritromicina 15 µg (ERI, Britania), minociclina 30 µg (MIN, Britania), trimetoprima-sulfametoxazol 1,25/23,75 µg (TMS, Britania), rifampicina 5 µg (RIF, Britania) y TIG 15 µg (Rosco Diagnóstica). Se utilizó como control la cepa *S. aureus* ATCC 25923.

1.3.2- Determinación cuantitativa de la sensibilidad a los antimicrobianos

1.3.2.1- Método de dilución en agar

Se determinó la CIM por método de dilución en agar siguiendo las recomendaciones del CLSI (CLSI, 2013).

La CIM es definida como la mínima concentración de antimicrobiano que inhibe el crecimiento bacteriano luego de 18-24 h de incubación (CLSI, 2009).

Los antibióticos ensayados por este método fueron: OXA, FOX, VAN, GEN, CIP, ERI, TMS, RIF y TIG.

Para determinar la CIM de cada uno de los antibióticos se realizaron diluciones seriadas al medio de la solución madre de antibiótico. Luego se colocó 1 mL de éstas en tubos conteniendo 9 mL de agar MH fundido a una temperatura de 45°C y se vertió en placas de Petri para su solidificación.

Preparación de las soluciones de antibiótico

Oxacilina

Se utilizó oxacilina en polvo (*Oxacillin sodium salt*, Sigma-Aldrich). El rango de concentraciones ensayadas fue de 0,06-16 $\mu\text{g/mL}$. Se partió de una solución 10 veces mayor que la concentración más alta a estudiar, por lo tanto se partió de una concentración de 160 $\mu\text{g/mL}$. Se siguió el esquema representado en la Figura 9 para la preparación de las diluciones del antibiótico. Para el resto de los antibióticos se siguió un esquema similar.

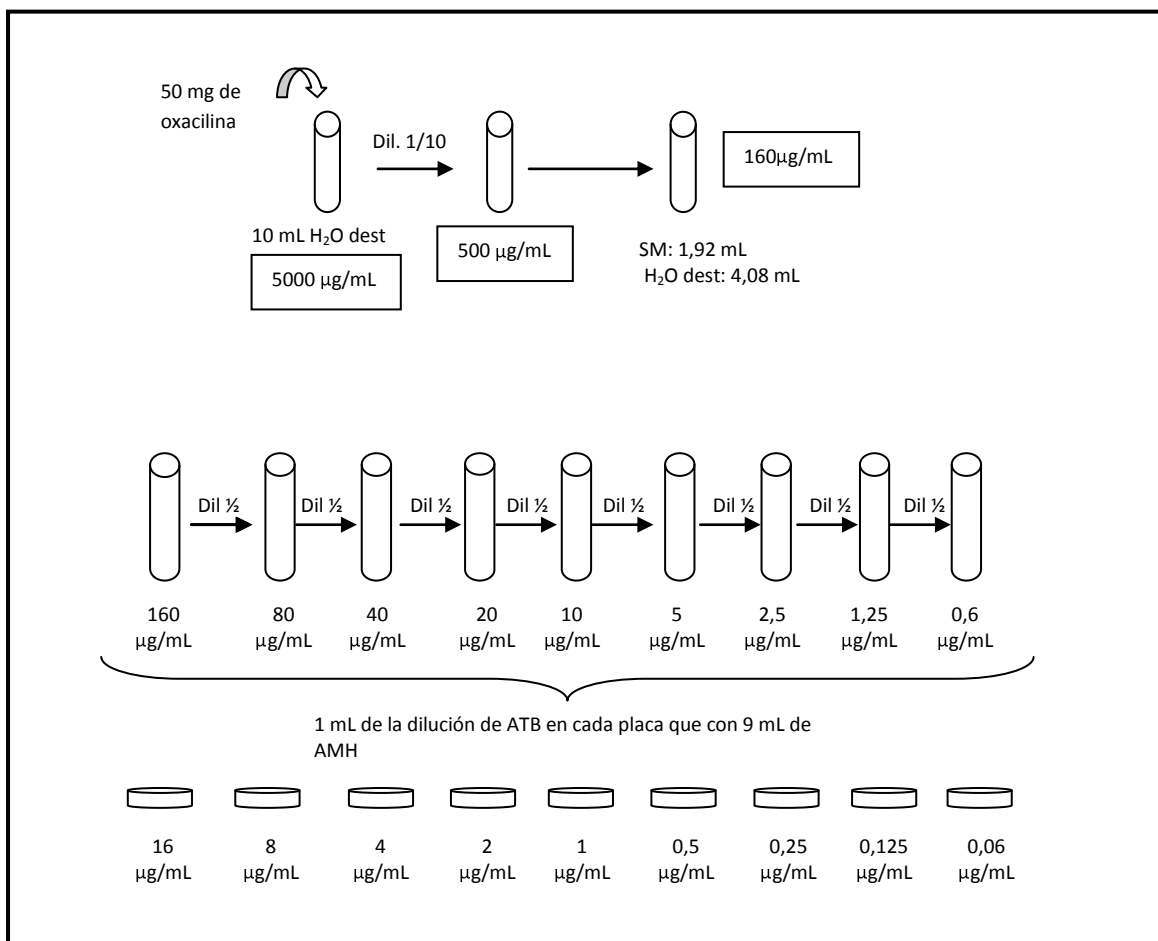


Figura 9. Esquema seguido para la preparación de las diluciones de OXA.

Cefoxitina

Se utilizó cefoxitina en polvo (*Cefoxitin sodium salt*, Sigma-Aldrich). El rango de concentraciones ensayadas fue de 0,5-64 $\mu\text{g/mL}$.

Vancomicina

Se utilizó vancomicina en polvo (Vancomicina clorhidrato, Fada Pharma, Argentina). El rango de concentraciones ensayadas fue de 0,25-32 µg/mL.

Gentamicina

Se utilizó gentamicina en polvo (Gentamicina sulfato, Fada Pharma, Argentina). El rango de concentraciones ensayadas fue de 0,125-32 µg/mL.

Ciprofloxacina

Se utilizó ciprofloxacina en polvo (Ciprofloxacina clorhidrato monohidrato, Fada Pharma, Argentina). El rango de concentraciones ensayadas fue de 0,125-16 µg/mL.

Eritromicina

Se utilizó eritromicina en polvo (*Erythromycin hydrate*, Sigma Aldrich). El rango de concentraciones ensayadas fue de 0,125-32 µg/mL.

Trimetoprima sulfametoxazol

Se utilizaron los antibióticos en polvo, trimetoprima y sulfametoxazol (Sigma-Aldrich). Se preparó una solución conteniendo ambos antibióticos. El rango de concentraciones ensayadas fue de 0,25-16 µg/mL para trimetoprima y de 4,75-304 µg/mL para sulfametoxazol.

Rifampicina

Se utilizó rifampicina en polvo (Sigma-Aldrich). El rango de concentraciones ensayadas fue de 0,04-8 µg/mL.

Preparación del inóculo

Se partió de un cultivo puro de 24 h y se preparó un inóculo en solución fisiológica estéril ajustando la turbidez a 0,5 McFarland. Posteriormente, se hizo una dilución 1/10 de este inóculo y se sembraron las placas de agar MH conteniendo las concentraciones seriadas de cada uno de los antibióticos ensayados.

Para la inoculación de las placas se utilizó un multi-inoculador de 25 agujas, esto permite inocular hasta 25 cepas en una misma placa. Se incluyeron dos placas de agar

MH sin antibiótico, de las cuales una se utilizó como control del crecimiento bacteriano y se inoculó al inicio de la serie de placas con antibiótico y la otra se usó como control de posible contaminación y se inoculó al final del proceso.

Una vez inoculadas las placas, se incubaron en estufa de cultivo a 35°C durante 18-24 h. Luego de ese tiempo, se procedió a la lectura de los resultados.

Se utilizó como control la cepa *S. aureus* ATCC 29213 y para interpretar los resultados se tuvieron en cuenta los puntos de corte propuestos por el CLSI (CLSI, 2013) (Tabla 5).

1.3.2.2- Determinación de la concentración inhibitoria mínima por método epsilométrico (E-test)

El método epsilométrico, conocido como E-test, se usó para la determinación de la CIM de TIG. Se preparó un inóculo de la misma manera que se describió anteriormente y se hisopó con el mismo una placa de Petri conteniendo agar MH. Posteriormente, se depositó una tira de E-test de TIG (E-test®, BioMérieux) y se dejó incubando a 35°C por 18-24 h, para luego leer los valores de CIM obtenidos. Se tuvieron en cuenta los puntos de corte propuestos por la FDA (Tabla 5).

Tabla 5. Puntos de corte de las pruebas de sensibilidad antibiótica para *S. aureus*.

Antibióticos	Puntos de corte para método de difusión (mm)			Puntos de corte para método de dilución (µg/mL)		
	S	I	R	S	I	R
	OXA*	≥ 13	11-12	≤ 10	≤ 2	-
FOX	≥ 22	-	≤ 21	≤ 4	-	≥ 8
CEF	≥ 18	15-17	≤ 14	≤ 8	16	≥ 32
VAN**	≥ 15	-	-	≤ 2	4-8	≥ 16
GEN	≥ 15	13-14	≤ 12	≤ 4	8	≥ 16
CIP	≥ 21	16-20	≤ 15	≤ 1	2	≥ 4
CLI	≥ 21	15-20	≤ 14	≤ 0,5	1-2	≥ 4
ERI	≥ 23	14-22	≤ 13	≤ 0,5	1-4	≥ 8
MIN	≥ 19	15-18	≤ 14	≤ 4	8	≥ 16
TMS	≥ 16	11-15	≤ 10	≤ 2/38	-	≥ 4/76
RIF	≥ 20	17-19	≤ 16	≤ 1	2	≥ 4
TIG***	≥ 19	-	-	≤ 0,5	-	-

S: sensible, I: sensibilidad intermedia, R: resistente

*En el año 2013 el CLSI eliminó los puntos de corte para OXA para el método de difusión. Se aconseja el uso sustituto del disco de FOX para detectar resistencia a meticilina. Los valores que se muestran en la tabla corresponden a los puntos de corte usados hasta el año 2012 (CLSI, 2012).

** En el año 2009 el CLSI eliminó los puntos de corte para VAN para el método de difusión. Se aconseja hacer CIM para evaluar la sensibilidad a VAN en todos los aislamientos de *S. aureus* (CLSI, 2009). Los puntos de corte mostrados en la tabla corresponden al CLSI 2007 (CLSI, 2007)

***Puntos de corte propuestos por la FDA.

1.4- Evaluación de la cinética de muerte frente a tigeciclina

Se llevó a cabo mediante el método de recuento de células viables en función del tiempo conocido como curva de tiempo de muerte o curva de letalidad, para determinar y confirmar el poder bacteriostático de TIG frente a los aislamientos de SARM y SASM estudiados (Bantar y col., 2000).

Se partió de un cultivo puro de 24 h de incubación a 35°C y se preparó un inóculo de los microorganismos en solución fisiológica estéril, ajustando la turbidez a 0,5 McFarland. Posteriormente, se hizo una dilución 1/10 de este inóculo y se colocó 1 mL del mismo en un tubo conteniendo 9 mL de caldo MH (tubo control). Además, se

colocó 1 mL del inóculo en cada uno de los tubos conteniendo 8,9 mL de caldo MH, más 0,1 mL de una solución de TIG preparada a cuatro concentraciones diferentes, con el propósito de alcanzar concentraciones finales de $\frac{1}{2}$ x CIM, CIM, 2 x CIM y 4 x CIM de cada microorganismo. Estos tubos se incubaron a 35°C y se realizaron recuentos de células viables a diferentes tiempos post-incubación (0, 2, 4, 6, 8 y 24 h). Para llevar a cabo los recuentos, a cada tiempo se hicieron diluciones en solución fisiológica estéril (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) y se esparció con espátula de Drigalsky, un volumen de 5 μ L de cada dilución en la superficie de una placa de agar Tripteína Soya (ATS, Britania). Se hizo este procedimiento por duplicado. Las placas se incubaron a 35°C durante 24 h y posteriormente se realizó el recuento de colonias.

Con estos resultados se construyó una curva de muerte de 24 h para cada aislamiento. La actividad bactericida se definió como una disminución mayor o igual a 3 unidades de \log_{10} en las UFC/mL, luego de 24 h de incubación. Por otro lado, la actividad bacteriostática se definió como una disminución menor de 3 unidades de \log_{10} de UFC/mL.

1.5- Selección *in vitro* de mutantes resistentes a tigeciclina

1.5.1- Método de eficiencia de plaqueo

Los aislamientos fueron expuestos a concentraciones puntuales de TIG, por el método de eficiencia de plaqueo (Sherris y Minshew, 1996). Este método consiste en crear un gradiente de concentración del antibiótico en estudio en una sola placa. Para lo cual se procedió a colocar 10 mL de agar MH fundido a una temperatura de 45-50°C y se dejó secar la placa de manera inclinada en un ángulo de aproximadamente 20°. Posteriormente, se colocó la placa en posición horizontal y se vertió una igual cantidad de agar MH pero conteniendo el antibiótico a las concentraciones correspondientes ensayadas (2 x CIM y 4 x CIM). De esta manera, se creó un gradiente de concentración del antibiótico sobre la placa. Una vez solidificadas las placas se dejaron secar en la estufa. Luego se sembró un inóculo 0,5 McFarland de las cepas a ensayar y se dejó incubar en estufa de cultivo a 35°C por 24 - 48 h.

1.5.2- Método de pasajes seriados

Se realizó la selección de mutantes resistentes a TIG, mediante pasajes seriados en caldo MH, con concentraciones crecientes de TIG. Para esto, se partió de una concentración sub-inhibitoria del antibiótico hasta superar ampliamente el valor de CIM. El antibiótico y el inóculo, se pusieron en contacto en un tubo conteniendo caldo MH. Este tubo se dejó en estufa de cultivo durante 24-48 h a 35°C. Luego se pasó una alícuota de 100 µL a una placa de agar MH, preparado con una concentración de antibiótico igual a la del caldo de cultivo, para confirmar el crecimiento bacteriano. Se esparció sobre el medio de cultivo con espátula de Drigalsky (Figura 10). De la misma manera, se sembraron placas de ATS libre de antibiótico.

Se confirmó que los organismos seleccionados correspondían a *S. aureus* sembrando en una placa de agar Manitol Salado (AMS, Britania). De este modo, las colonias desarrolladas en la placa de agar MH con antibiótico en cada pasaje seriado, fueron expuestas de manera progresiva a concentraciones crecientes del antibiótico, realizando como máximo 15 pasajes consecutivos (aproximadamente 200 veces la CIM). Una vez finalizados los pasajes seriados se determinó la CIM de TIG de las mutantes seleccionadas por método de E-test. Aquellas en las que se confirmó que tenían un valor mayor de CIM que su correspondiente aislamiento parental se almacenaron en caldo MH con glicerol al 15% en freezer a -20°C y en termo de nitrógeno líquido hasta su uso posterior.

Preparación del inóculo inicial de trabajo: a partir de un cultivo *overnight* en ATS de los aislamientos en estudio se preparó un inóculo en solución fisiológica estéril, ajustando la turbidez según el estándar 0,5 McFarland. Se realizó una dilución 1/10 del mismo en solución fisiológica estéril, alcanzando entonces una concentración de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL. Este fue el denominado inóculo de trabajo, que posteriormente al ponerlo en contacto con el antibiótico en un tubo con caldo MH (dil 1/10), llegó a tener una concentración final de $1,5 \times 10^5$ UFC/mL.

Preparación de la solución de antibiótico: cada aislamiento fue expuesto a una concentración inicial de TIG correspondiente a $\frac{1}{4}$ de su CIM, para realizar pasajes seriados hasta alcanzar concentraciones que superen aproximadamente 200 veces la CIM. Para esto, se partió de una solución madre del antibiótico de una concentración de 10 000 $\mu\text{g/mL}$, disolviendo el contenido de 50 mg de una ampolla de TIG (Tygacil, Pfizer) en 5 mL de agua destilada estéril. Esta solución madre se utilizó para preparar una solución de una concentración 100 veces mayor a la concentración a ensayar para cada aislamiento en particular. Se comenzó con una concentración de $\frac{1}{4}$ de la CIM y se fue aumentando progresivamente la concentración en cada uno de los pasajes seriados realizados.

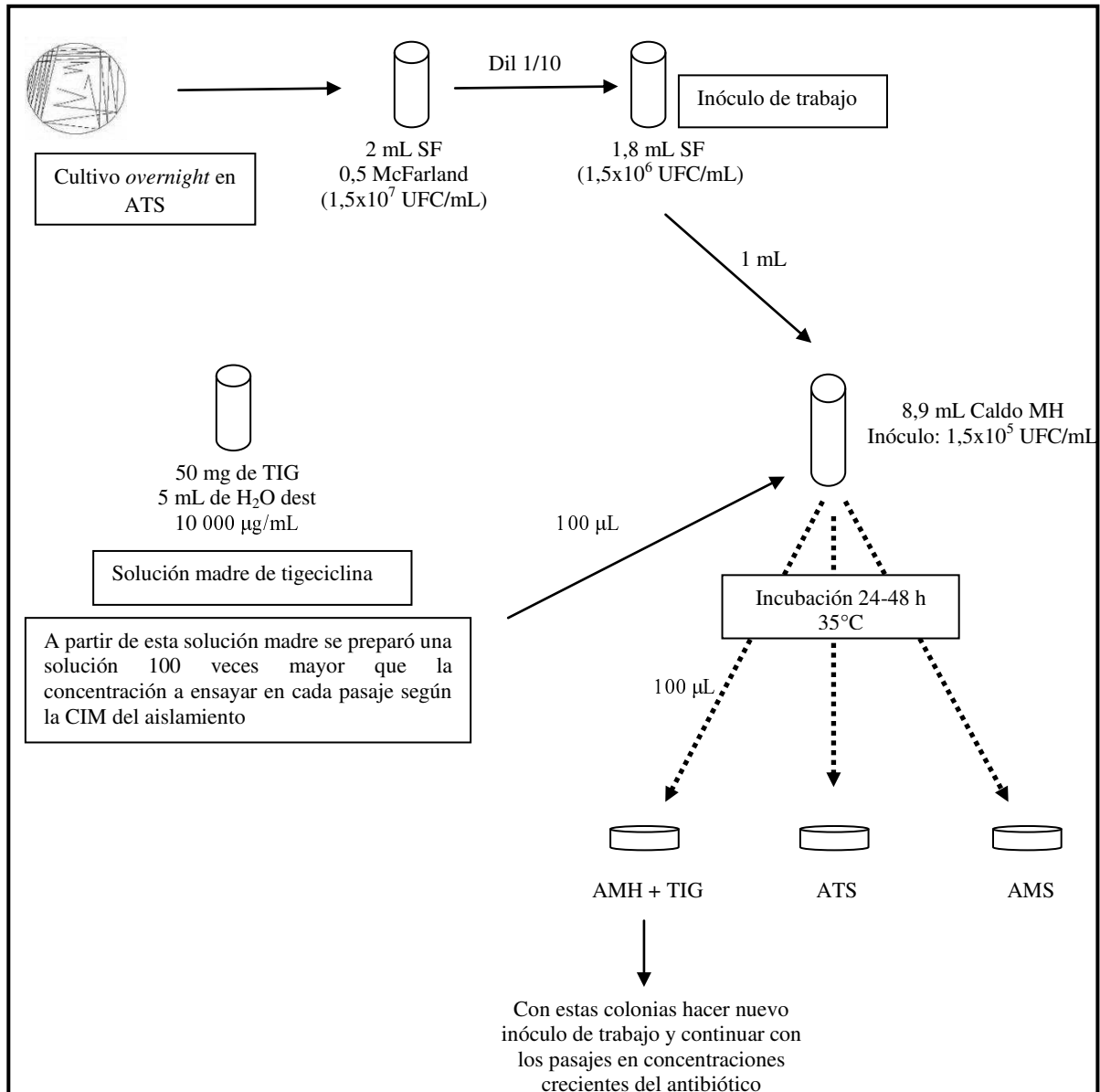


Figura 10. Procedimiento realizado para la selección *in vitro* de mutantes resistentes a TIG, mediante pasajes seriados en concentraciones crecientes del antibiótico.

1.6- Análisis de la estabilidad del fenotipo resistente a tigeciclina

Una vez seleccionados los aislamientos de *S. aureus* mutantes resistentes a TIG (SARTm), se corroboró su estabilidad, mediante pasajes diarios consecutivos, de varias colonias seleccionadas al azar de la cepa mutante, en medio ATS sin antibiótico. Una vez realizados 10 pasajes se procedió a determinar nuevamente la CIM de TIG por método de E-test.

1.7- Isogenicidad entre aislamientos parentales y mutantes resistentes a tigeciclina

Se corroboró la isogenicidad entre los SARTm y sus respectivas cepas parentales mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), según el protocolo descrito por Chung y col. (Chung y col., 2000). Se utilizaron como controles los clones de *S. aureus* circulantes en nuestro país, clon comunitario (ST5-SCCmec IV; Gardella y col., 2008), clon brasilero (ST239-SCCmec III; Da Silva Coimbra y col., 2000) y clon cordobés (ST5, SCCmec I, Sola y col., 2002). En la sección de Anexos se describe la composición de los *buffers* y reactivos utilizados. Se siguió el siguiente protocolo:

Preparación de “plugs”

Se inocularon 3 o 4 colonias aisladas dentro de 5 mL de caldo BHI (infusión cerebro corazón, Difco). Se incubó a 35°C por 16-18 h en agitación. Se colocó 1 mL de cultivo en un tubo eppendorf de 1,5 mL y se centrifugó en microcentrífuga por 2 min a máxima velocidad.

Se eliminó el sobrenadante con pipeta automática y se resuspendió el *pellet* bacteriano en 1 mL de *buffer* PIV. Se centrifugó nuevamente, se descartó el sobrenadante y se eliminó todo el líquido posible del *pellet*.

El *pellet* bacteriano se resuspendió en 200 µL de PIV (se consideró que este volumen inicial era de 210 µL).

Se colocaron 10 µL de la suspensión bacteriana en una cubeta conteniendo 1 mL de PIV. Se cubrió la cubeta con parafilm y se homogeneizó por inversión. Se midió la

DO₆₂₀ nm, usando PIV como blanco, y se calculó el volumen de PIV necesario a agregar a la suspensión bacteriana, para alcanzar una DO₆₂₀ de 5 unidades, según la siguiente fórmula:

$$\text{Vol. PIV a agregar } (\mu\text{L}) = (\text{DO}_{\text{medida}} \times 20 \times 210) - 210$$

Se transfirieron 150 μL de la suspensión bacteriana (DO₆₂₀ = 5 unidades) a un tubo eppendorf de 1,5 mL y se incubaron por 10 min a 42°C. Se agregó a la suspensión bacteriana 150 μL de agarosa “*low melting*” 1,5% (Bio-Rad), precalentada a 42°C y se mezcló rápidamente con vortex. Se armaron los bloques de agarosa o “plugs” en los moldes correspondientes (Bio-Rad). Se dejó solidificar a temperatura ambiente y luego a -20°C durante 5 min.

Lisis celular de “plugs” de agarosa

Una vez solidificados se removieron cuidadosamente los “plugs” de los moldes y se colocaron en tubos de 15 mL conteniendo 1 mL de *buffer* EC-Lisis. Se incubó a 37°C al menos 5 h, y se eliminó el *buffer* EC-Lisis. Luego, se agregó 1mL de *buffer* ES-P y se incubó a 50°C al menos 17 h (*overnight*).

Lavados de “plugs” de agarosa

Se descartó el *buffer* ES-P y se transfirieron los “plugs” a un tubo falcon de 15 mL con aproximadamente 10 mL de *buffer* TE. Se lavaron con agitación horizontal por 30 min. Se repitió este paso al menos 5 veces más, para eliminar la proteinasa K. Se conservó a 4°C hasta su uso.

Digestión de “plugs” con SmaI

A 15 mL del *buffer* Pre-*SmaI* 1 X se le agregó en el momento de uso 6,3 µL de β-mercaptoetanol. Posteriormente, se transfirieron 500 µL del *buffer* Pre-*SmaI* 1 X a tubos eppendorf de 1,5 mL y se agregó 1 “plug” a cada uno. Se incubó en baño de agua a 25°C durante 1 h, y se eliminó luego el *buffer* de Pre-*SmaI* 1 X con pipeta automática, cuidando de no romper el “plug”.

Se preparó la mezcla de restricción: *Buffer* Pre-*SmaI* 1 X + *SmaI*, según se detalla, logrando una concentración final de *SmaI* de 15 U/plugs.

Reactivo	µL/plug	µL/ 10 plugs
<i>Buffer</i> Pre- <i>SmaI</i>	45	450
<i>SmaI</i> (10 U/µL)	1,5	15
Volumen final	46,5	465

Secolocarón 45 µL de la mezcla de restricción en cada tubo, y se incubó la mezcla de restricción en baño de agua a 25°C durante 18 h. Se retiró la mezcla de restricción del baño de agua y se agregaron 5 µL de *buffer* TBE 0,5 X para detener la restricción y se equilibró por 10 min a temperatura ambiente. Luego, se cargaron los “plugs” dentro del gel.

Preparación del gel de agarosa y corrida electroforética

Se prepararon 2 L de *buffer* TBE 0,5 X. Se separó el volumen de *buffer* TBE 0,5 X necesario para la preparación del gel y el resto se colocó en la cuba electroforética, a la temperatura de la corrida (11,3°C).

Se preparó agarosa calidad PFGE (Bio-Rad) al 1% en *buffer* TBE 0,5 X. Se armó el molde para el gel, colocando el peine apropiado con los “plugs” apoyados en él, y se agregó la agarosa fundida a una temperatura de 50-55°C dentro del molde. Se dejó enfriar la agarosa en el molde al menos 30 min. Se retiró el peine del gel solidificado y los agujeros se sellaron con la agarosa sobrante. Se ubicó el gel dentro de la cuba de electroforesis con el *buffer* TBE 0,5 X y se llevó a cabo la corrida electroforética, con pulsos de 5 seg a 35 seg, a un voltaje de 6 V/cm a 11,3°C durante 21 h en un equipo CHEF DRIII (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Coloración del gel de PFGE

Una vez finalizada la corrida electroforética, se retiró el gel de la cuba de electroforesis y se colocó en un recipiente conteniendo 300 mL de una solución de bromuro de etidio de 1 µg/mL. Se dejó colorear durante 30 min en agitación suave. El gel se visualizó en transiluminador UV y se digitalizó la imagen para su análisis.

Interpretación de los perfiles de restricción obtenidos por PFGE

La interpretación de los perfiles genéticos, obtenidos luego de la digestión con la enzima de restricción *SmaI*, se realizó teniendo en cuenta los criterios definidos por Tenover y col. (Tenover y col., 1995). A cada patrón de bandas diferente obtenido se le asignó una letra que representa un pulsotipo. Dentro de un mismo pulsotipo se incluyeron aquellos perfiles que mostraron el mismo número y tamaño de las bandas, mientras que se definieron subtipos cuando se encontraban diferencias de 3 o menos bandas en los perfiles de restricción.

1.8- Evaluación de la cinética de muerte frente a tigeciclina en los SARTm

En los SARTm seleccionados *in vitro* se evaluó la cinética de muerte frente a TIG, comparando su comportamiento con respecto a los aislamientos parentales. Se llevó a cabo la metodología como se describió en el punto 1.4. Las pendientes de las curvas de muerte de los aislamientos parentales y de los SARTm se compararon estadísticamente utilizando análisis de pendientes por regresión lineal con el programa *GraphPad Prism* versión 6.0.

1.9- Ensayos adicionales sobre aislamientos de SARTm que modificaron su sensibilidad a otros antibióticos

Un SARTm (94159m) incrementó su CIM a VAN con respecto al aislamiento parental, adquiriendo fenotipo VISA (CIM entre 4-8 µg/mL). Además de determinar la CIM por método de dilución se determinó mediante E-test y se evaluó el

comportamiento de la cepa 94159m frente a los métodos de *screening* disponibles para detección de cepas VISA y h-VISA (macro E-test y predifusión).

1.9.1- Evaluación de la sensibilidad a vancomicina mediante E-test

Se siguió el procedimiento descrito en el punto 1.3.2.2, tanto para la preparación de las placas de agar MH como para la preparación del inóculo bacteriano. Se tuvieron en cuenta los puntos de corte definidos por el CLSI (Tabla 5).

1.9.2- Método de Macro E-test

El método conocido como Macro E-Test constituye un método de *screening* para la detección de aislamientos h-VISA. Los aislamientos h-VISA, se caracterizan por tener CIMs en el rango de susceptible ($\leq 2 \mu\text{g/mL}$), pero contienen sub-poblaciones de células con valores de CIM que se encuentran en el rango de sensibilidad intermedia, que caracteriza a las cepas VISA.

Se partió de un cultivo *over night* de los aislamientos en agar sangre de carnero y se preparó un inóculo en solución fisiológica estéril, ajustando la turbidez según el estándar 2,0 McFarland (6×10^8 UFC/mL). Por otra parte, se prepararon placas conteniendo agar BHI, sobre las cuales se vertieron e hisoparon 200 μL del inóculo bacteriano. Posteriormente, se depositaron sobre las placas de BHI inoculadas, las tiras de E-test de VAN. Las placas se incubaron a 35°C durante 48 h. Valores mayores o iguales a 6 $\mu\text{g/mL}$ fueron considerados positivos para VISA (Di Gregorio y col., 2015).

1.9.3- Método de predifusión

El método de predifusión constituye un método de difusión para determinar la sensibilidad a los antibióticos, caracterizado por un paso previo, donde se deja que el antibiótico difunda antes de la inoculación de las placas con el inóculo bacteriano. Constituye un método utilizado para detectar cepas VISA, usando tabletas de VAN y teicoplanina (TEI).

Se prepararon placas conteniendo agar MH. Sobre estas placas se depositaron tabletas *Neo-Sensitab* (Rosco Diagnóstica, Dinamarca) de 30 μg de VAN y de 30 μg de

TEI, y se dejaron difundir en el medio agar MH durante 2 h a temperatura ambiente. Luego se removieron las tabletas y las placas permanecieron a temperatura ambiente por 18-22 h. Se preparó un inóculo de los microorganismos en solución fisiológica estéril, ajustando la turbidez equivalente al estándar 0,5 McFarland y se hisoparon las placas de agar MH. Las placas fueron incubadas a 35°C durante 24 h. Luego de ese tiempo, se leyeron los halos de inhibición. Para la interpretación de los resultados se tuvieron en cuenta las recomendaciones del fabricante (Rosco Diagnostica, 2010).

Un halo de inhibición de VAN \leq 22 mm y/o halo de inhibición de TEI $<$ 20 mm se consideró resultado positivo para la detección de cepas VISA.

RESULTADOS

1.1- Sensibilidad a los antibióticos

1.1.1- Método de difusión con discos

Todos los aislamientos estudiados, tanto de SARM como de SASM, fueron sensibles a TIG por método de difusión con discos, presentando todos ellos halos de inhibición mayores a 19 mm. En las Tablas 6 y 7 se muestran los valores en mm de los halos de inhibición, además del porcentaje de resistencia de los aislamientos a los distintos antibióticos ensayados.

Siete de los 10 aislamientos categorizados como SARM (resistentes a FOX) mostraron resistencia a OXA por el método de difusión cuando se emplearon los puntos de corte recomendados por CLSI 2013. En la actualidad, FOX constituye el antibiótico tomado en cuenta por el CLSI para determinar si un aislamiento de *S. aureus* es sensible o resistente a meticilina.

Estos aislamientos presentaron en su mayoría, resistencia a los demás antibióticos ensayados. En 8/10 aislamientos de SARM se detectó resistencia a GEN y en 7/10 a CIP. En 5/10 se observó resistencia a CLI y ERI. Resistencia a TMS y RIF se detectó en 2/10 de los SARM y sólo 1/10 mostró resistencia a MIN.

Como era de esperar, los aislamientos de SASM, no presentaron resistencia a los antibióticos ensayados por método de difusión. Sólo uno de los aislamientos presentó resistencia a ERI y otro a RIF.

Tabla 6. Sensibilidad antibiótica por método de difusión con discos para los aislamientos de SARM.

Aislamiento	Halos de inhibición (mm)											
	OXA	FOX	CEF	VAN	GEN	CIP	CLI	ERI	MIN	TMS	RIF	TIG
477	6	6	6	19	6	10	6	6	26	22	28	23
1870	6	6	6	20	6	10	6	6	27	22	29	22
497	6	18	21	19	22	26	26	26	30	30	34	22
2028	6	6	6	21	6	6	6	6	19	6	6	24
94159	12	16	27	20	6	27	27	27	28	28	17	22
34131	6	11	23	19	20	19	24	23	27	24	30	22
220	6	6	9	18	6	6	6	6	14	6	29	24
74016	17	18	21	20	6	11	29	26	28	27	18	23
101995	6	6	6	20	6	6	6	6	27	21	29	23
4261	11	15	24	18	8	9	24	22	24	24	14	22
% de resistencia	70	100	50	0	80	70	50	50	10	20	20	0

OXA: oxacilina, FOX: ceftioxitina, CEF: cefalotina, VAN: vancomicina, GEN: gentamicina, CIP: ciprofloxacina, ERI: eritromicina, MIN: minociclina, TMS: trimetoprima-sulfametoxazol, RIF: rifampicina, TIG: tigeciclina.

Tabla 7. Sensibilidad antibiótica por método de difusión con discos para los aislamientos de SASM.

Aislamiento	Halos de inhibición (mm)											
	OXA	FOX	CEF	VAN	GEN	CIP	CLI	ERI	MIN	TMS	RIF	TIG
54081	26	34	40	19	20	30	26	28	30	28	32	22
74111	15	22	30	19	22	26	23	25	26	26	30	22
14298	16	25	21	18	21	25	24	25	24	25	28	22
74073	19	28	22	18	20	25	26	25	24	26	11	22
14069	16	28	27	19	24	28	23	25	24	25	30	21
14267	32	32	40	20	15	24	26	23	32	36	34	24
34076	27	28	40	20	22	22	24	25	29	26	30	23
34204	18	25	28	20	22	28	26	6	28	26	30	23
44213	19	26	28	20	20	26	26	25	28	26	30	22
34023	16	24	27	20	20	26	25	25	28	27	30	24
% de resistencia	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	10	0

OXA: oxacilina, FOX: ceftioxitina, CEF: cefalotina, VAN: vancomicina, GEN: gentamicina, CIP: ciprofloxacina, ERI: eritromicina, MIN: minociclina, TMS: trimetoprima-sulfametoxazol, RIF: rifampicina, TIG: tigeciclina.

1.1.2- Método de dilución en agar: determinación de la CIM

La determinación de la CIM es considerado el método de referencia para evaluar la sensibilidad a los antibióticos. Como era de esperar, todos los aislamientos categorizados como SARM fueron resistentes a OXA y FOX. Por otra parte, todos los aislamientos, tanto de SARM como de SASM, tuvieron valores de CIM sensibles a VAN y TIG (Tablas 8 y 9).

En general, los aislamientos categorizados como resistentes a otros antimicrobianos mediante la CIM, coincidieron con lo obtenidos por método de difusión. Sin embargo, se encontraron diferencias para CIP y RIF, donde por el método de CIM se detectó un porcentaje mayor de resistencia, lo cual es un error muy importante del método de difusión, ya que brinda un resultado de falsa sensibilidad.

La mayoría de los aislamientos de SAMS fueron sensibles a los antibióticos ensayados por este método. Se detectó un solo aislamiento con resistencia para ERI y RIF coincidiendo con lo hallado por método de difusión.

Tabla 8. CIM de los antibióticos ensayados para los aislamientos de SARM.

Aislamiento	CIM (µg/mL)								
	OXA	FOX	VAN	GEN	CIP	ERI	TMS	RIF	TIG
477	≥16	≥64	0,5	≥32	≥16	≥32	0,5/9,5	≤0,004	0,125
1870	≥16	≥64	1	≥32	≥16	≥32	0,5/9,5	0,007	0,064
497	8	16	1	0,5	0,5	0,25	0,5/9,5	0,015	0,125
2028	≥32	≥128	1	≥64	≥16	≥64	≥16/304	≥16	0,125
94159	8	16	1	≥64	0,5	0,25	0,5/9,5	4	0,125
34131	16	32	1	0,5	4	0,25	0,25/4,75	0,007	0,125
220	≥16	≥64	0,5	≥32	≥16	≥32	≥16/304	0,007	0,125
74016	4	32	0,5	≥32	16	0,25	0,5/9,5	4	0,125
101995	≥16	≥64	1	≥32	≥16	≥32	0,5/9,5	0,007	0,125
4261	8	16	1	32	≥16	0,25	0,5/9,5	4	0,064
% de resistencia	100	100	0	80	80	50	20	40	0

OXA: oxacilina, FOX: cefoxitina, VAN: vancomicina, GEN: gentamicina, CIP: ciprofloxacina, ERI: eritromicina, TMS: trimetoprima-sulfametoxazol, RIF: rifampicina, TIG: tigeciclina.

Tabla 9. CIM de los antibióticos ensayados para los aislamientos de SASM.

Aislamiento	CIM ($\mu\text{g/mL}$)								
	OXA	FOX	VAN	GEN	CIP	ERI	TMS	RIF	TIG
54081	0,125	$\leq 0,5$	1	1	0,25	0,25	0,5/9,5	0,007	0,064
74111	0,25	4	1	0,25	0,5	0,25	0,25/4,75	0,007	0,064
14298	0,25	4	1	0,25	0,25	0,25	0,25/4,75	$\leq 0,004$	0,064
74073	0,5	4	1	0,5	0,5	0,5	0,25/4,75	≥ 8	0,064
14069	0,5	4	1	0,25	1	0,25	0,125/2,375	0,007	0,064
14267	$\leq 0,06$	2	1	2	1	1	0,25/4,75	0,007	0,064
34076	0,125	2	1	0,25	1	0,25	0,25/4,75	0,015	0,125
34204	0,25	4	1	0,25	0,5	≥ 32	0,25/4,75	0,007	0,064
44213	0,25	4	1	0,5	0,5	0,25	0,25/4,75	0,007	0,125
34023	0,5	4	0,5	0,25	0,5	0,5	0,25/4,75	0,007	0,064
% de resistencia	0	0	0	0	0	10	0	10	0

OXA: oxacilina, FOX: cefoxitina, VAN: vancomicina, GEN: gentamicina, CIP: ciprofloxacina, ERI: eritromicina, TMS: trimetoprima-sulfametoxazol, RIF: rifampicina, TIG: tigeciclina.

1.2- Evaluación de la cinética de muerte frente a tigeciclina

Para determinar y confirmar el poder bacteriostático que presenta la TIG, se realizaron estudios de cinética de muerte en todos los aislamientos (10 SARM y 10 SASM) con los cuales se inició este trabajo. Se construyeron las correspondientes curvas de tiempo de muerte frente a TIG a las cuatro concentraciones ensayadas (4 x CIM, 2 x CIM, CIM y $\frac{1}{2}$ x CIM), las cuales se pueden observar en las Figuras 11 y 12.

Para cada concentración de TIG ensayada, se estimó el grado de actividad bactericida, teniendo en cuenta el número de aislamientos que mostraron una disminución en el rango de 1 a 3 \log_{10} UFC/mL en los recuentos de células viables a diferentes tiempos de incubación (Tablas 10 y 11). La disminución de 1, 2, y 3 unidades en el \log_{10} UFC/ mL representa el 90%, 99% and 99,9% de bacterias muertas respectivamente.

Como era de esperar, en casi la totalidad de los aislamientos no se observó disminución de 3 o más unidades logarítmicas en el recuento de UFC/mL a las 24 h de exposición a TIG, permitiendo confirmar la actividad bacteriostática de este antibiótico. Sólo en un aislamiento de SASM (34076) se evidenció actividad bactericida frente a

TIG a la concentración correspondiente a 4 x CIM, mostrando una disminución mayor a 3 log₁₀ UFC/mL, a las 24 h de incubación.

La magnitud de la actividad bactericida a las 24 h de incubación, mostró ciertas diferencias al analizar las distintas concentraciones ensayadas, produciéndose una mayor reducción en los recuentos de células viables a las mayores concentraciones.

En dos aislamientos de SARM (220 y 4261) se observó un recrecimiento a la concentración correspondiente a ½ x CIM.

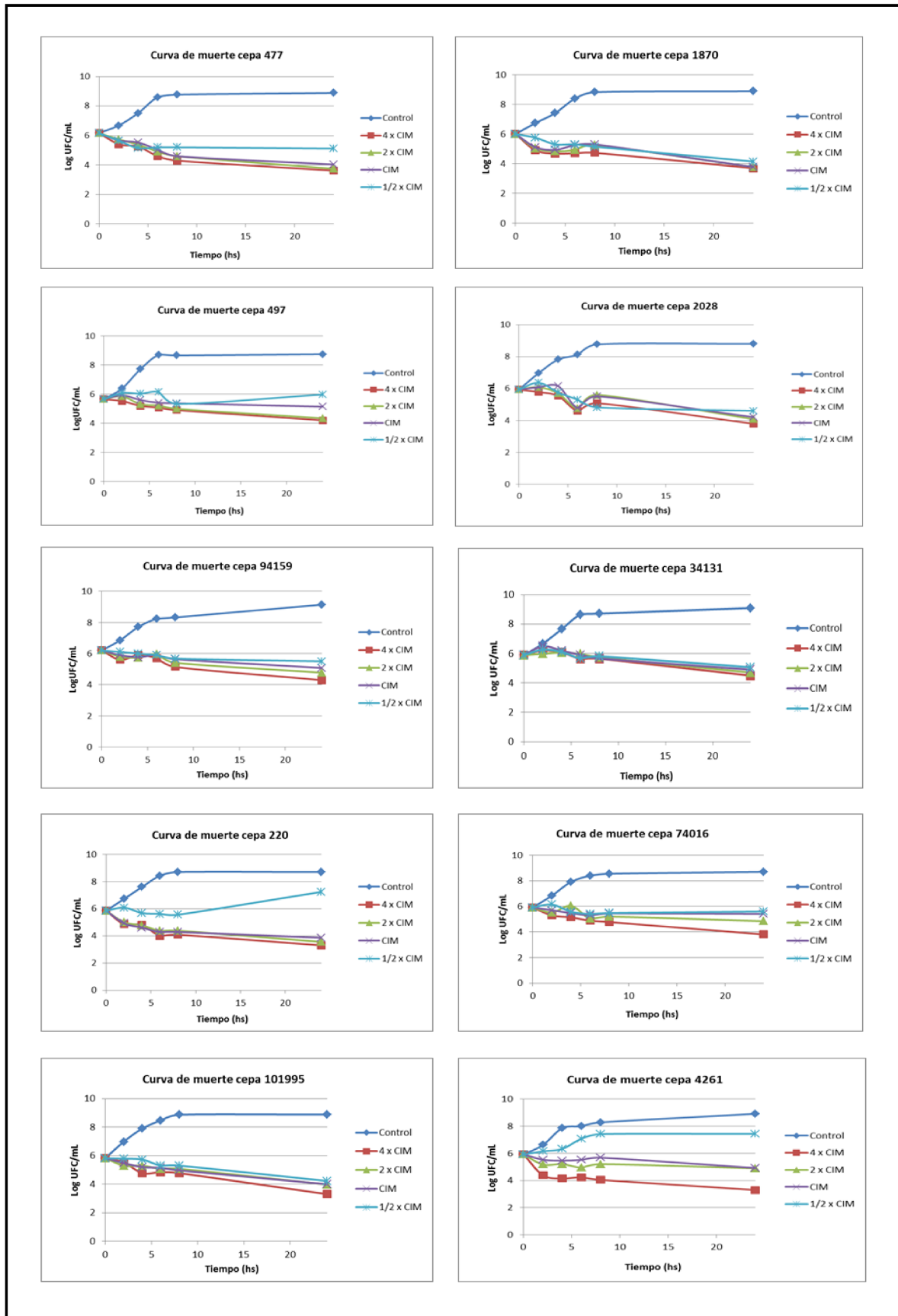


Figura 11. Curvas de tiempo de muerte para los aislamientos de SARM frente a TIG.

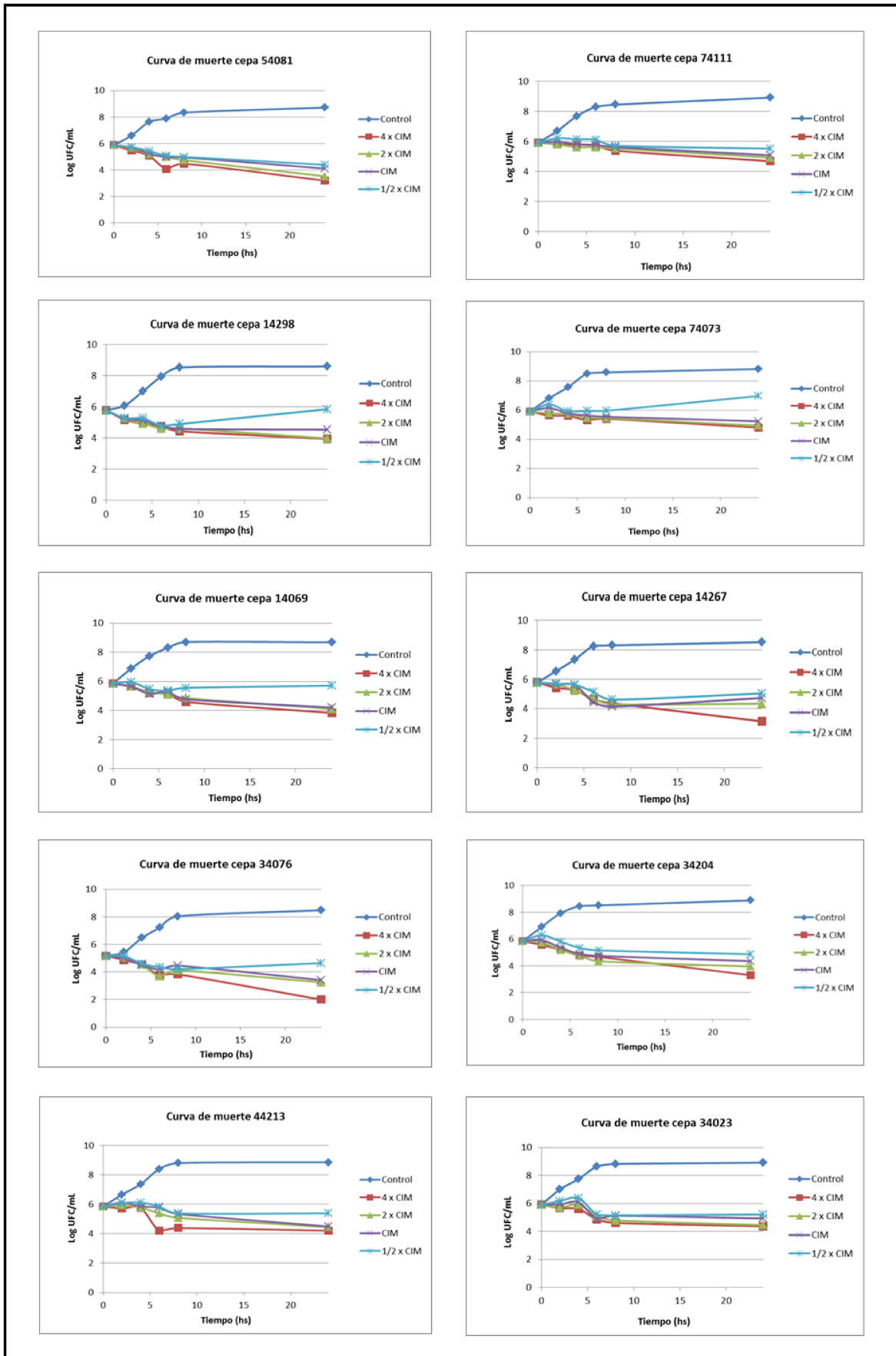


Figura 12. Curvas de tiempo de muerte para los aislamientos de SASM frente a TIG.

Tabla 10. Grado de actividad bactericida ejercido por TIG a lo largo del tiempo frente a los aislamientos de SAMR.

Concentración de TIG (µg/mL)	N° de aislamientos que muestran disminución del log ₁₀ UFC/mL al correspondiente tiempo de incubación														
	2 h			4 h			6 h			8 h			24 h		
	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3
4 x CIM	2	0	0	4	0	0	6	0	0	7	0	0	3	7	0
2 x CIM	0	0	0	2	0	0	4	0	0	2	0	0	7	3	0
CIM	0	0	0	2	0	0	3	0	0	2	0	0	5	2	0
½ x CIM	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	4	0	0

Tabla 11. Grado de actividad bactericida ejercido por TIG a lo largo del tiempo frente a los aislamientos de SAMS.

Concentración de TIG (µg/mL)	N° de aislamientos que muestran disminución del log ₁₀ UFC/mL al correspondiente tiempo de incubación														
	2 h			4 h			6 h			8 h			24 h		
	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3
4 x CIM	0	0	0	0	0	0	7	0	0	8	0	0	5	4	1
2 x CIM	0	0	0	0	0	0	4	0	0	7	0	0	8	1	0
CIM	0	0	0	0	0	0	4	0	0	4	0	0	7	0	0
½ x CIM	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0

1.3- Selección *in vitro* de mutantes de *S. aureus* resistentes a tigeciclina

Por el método de eficiencia de plaqueo no se lograron obtener mutantes de *S. aureus* con sensibilidad disminuida a TIG, en ninguno de los aislamientos en estudio.

Mediante el método de selección de mutantes resistentes por pasajes seriados, se lograron obtener un total de 12 cepas de *S. aureus* mutantes resistentes a TIG (SARTm), que aumentaron el valor de su CIM de TIG con respecto a los aislamientos parentales de los que provenían. De los 12 SARTm obtenidos, 5 correspondieron a aislamientos de SARM y 7 a aislamientos de SASM.

En las Tablas 12 y 13 se muestran los resultados obtenidos de la selección de mutantes resistentes, tanto en los aislamientos de SARM (Tabla 12), como en los de SASM (Tabla 13). Se encuentran detalladas allí las concentraciones de TIG utilizadas en cada pasaje y a la que fueron expuestas las cepas en estudio, comenzando por una concentración sub-inhibitoria correspondiente a $\frac{1}{4}$ de su CIM. Se realizaron como máximo 15 pasajes en concentraciones crecientes del antibiótico. Luego, varias colonias obtenidas a la mayor concentración ensayada de TIG fueron sometidas a una serie de 10 pasajes consecutivos en medio ATS libre de antibiótico, para corroborar la estabilidad del nuevo fenotipo con resistencia a TIG. Para esto, luego de los pasajes en medio libre de antibiótico se determinó la CIM de TIG mediante E-test. Se seleccionaron un total de 12 mutantes *in vitro* resistentes a TIG. En la Figura 13 se puede observar la imagen del resultado del método de E-test para un aislamiento parental y su correspondiente mutante resistente a TIG, donde se puede ver claramente la reducción del tamaño del halo en la cepa mutante.

El rango obtenido de CIM de TIG para los SARTm fue de 1-16 $\mu\text{g/mL}$, con un aumento entre 16 y 128 veces en la CIM de TIG con respecto a sus correspondientes parentales. En la Figura 14 se pueden ver representados en un eje de coordenadas los valores de CIM de TIG obtenidos para las SARTm y sus aislamientos parentales.

Tabla 12. Resultados de la selección de mutantes de *S. aureus* resistentes a TIG por pasajes seriados. Aislamientos de SARM.

Aislamiento	CIM inicial TIG (µg/mL)	Concentraciones de TIG en cada pasaje (µg/mL)															CIM TIG (µg/mL) luego de 10 pasajes en medio libre de ATB
		0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	0,6	0,7	0,8	1	2	4	8	12	16	24	
477	0,125	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	0,6	0,7	0,8	1	2	4	8	12	16	24	0,5
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
1870	0,064	0,016	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	0,6	0,7	0,8	1	2	4	8	12	16	0,5
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
497	0,125	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	0,6	0,7	0,8	1	2	4	8	12	16	24	4
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
2028	0,125	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	0,6	0,7	0,8	1	2	4	8	12	16	24	16
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
94159	0,125	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	0,6	0,7	0,8	1	2	4	8	12	16	24	16
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
34131	0,125	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	0,6	0,7	0,8	1	2	4	8	12	16	24	0,25
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
220	0,125	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	0,6	0,7	0,8	1	2	4	8	12	16	24	0,25
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
74016	0,125	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	0,6	0,7	0,8	1	2	4	8	12	16	24	4
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
101995	0,125	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	0,6	0,7	0,8	1	2	4	8	12	16	24	0,5
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
4261	0,064	0,016	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	0,6	0,7	0,8	1	2	4	8	12	16	8
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

ATB: antibiótico. Con signos + se indica la presencia de desarrollo de colonias en la placa de agar MH con antibiótico, a la concentración correspondiente, según el número de pasaje. Mientras que con signo - se indica la ausencia de crecimiento en dichas placas preparadas a la concentración mencionada. En color rojo se muestran los aislamientos que seleccionaron mutantes resistentes a TIG.

Tabla 13. Resultados de la selección de mutantes de *S. aureus* resistentes a TIG por pasajes seriados. Aislamientos de SASM.

Aislamiento	CIM inicial TIG (µg/mL)	Concentraciones de TIG en cada pasaje (µg/mL)															CIM TIG (µg/mL) luego de 10 pasajes en medio libre de ATB
		0,016	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	0,6	0,7	0,8	1	2	4	8	12	16	
54081	0,064	0,016	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	0,6	0,7	0,8	1	2	4	8	12	16	8
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
74111	0,064	0,016	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	0,6	0,7	0,8	1	2	4	8	12	16	0,5
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
14298	0,064	0,016	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	0,6	0,7	0,8	1	2	4	8	12	16	0,5
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
74073	0,064	0,016	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	0,6	0,7	0,8	1	2	4	8	12	16	8
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
14069	0,064	0,016	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	0,6	0,7	0,8	1	2	4	8	12	16	1
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
14267	0,064	0,016	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	0,6	0,7	0,8	1	2	4	8	12	16	0,25
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
34076	0,125	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	0,6	0,7	0,8	1	2	4	8	12	16	24	16
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
34204	0,064	0,016	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	0,6	0,7	0,8	1	2	4	8	12	16	8
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
44213	0,125	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	0,6	0,7	0,8	1	2	4	8	12	16	24	4
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
34023	0,064	0,016	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	0,6	0,7	0,8	1	2	4	8	12	16	1
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	

ATB: antibiótico. Con signos + se indica la presencia de desarrollo de colonias en la placa de agar MH con antibiótico, a la concentración correspondiente, según el número de pasaje. Mientras que con signo - se indica la ausencia de crecimiento en dichas placas preparadas a la concentración mencionada. En color rojo se muestran los aislamientos que seleccionaron mutantes resistentes a TIG.

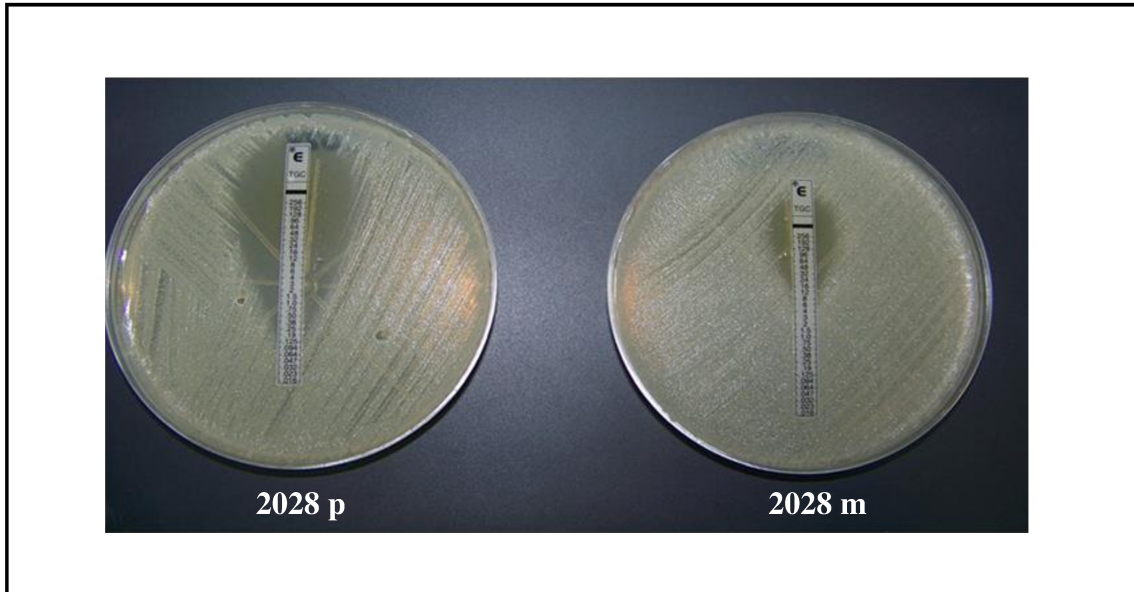


Figura 13. CIM de TIG mediante método de E-test. Se muestra una imagen de la placa de agar MH correspondiente al aislamiento 2028p y su correspondiente SARTm, 2028m.

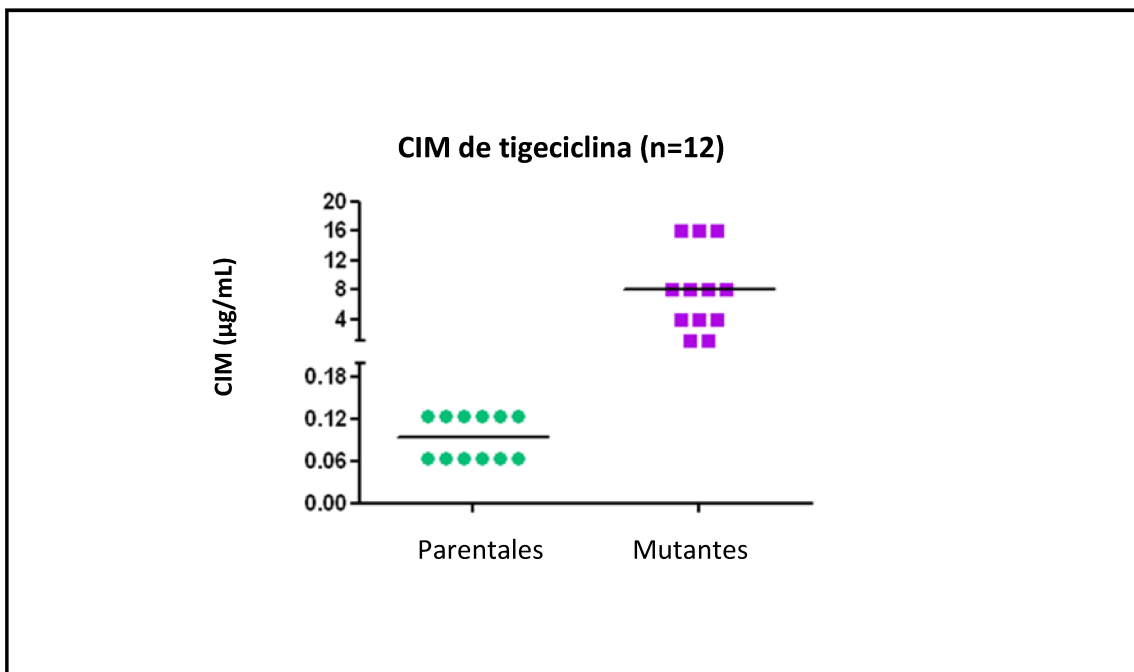


Figura 14. Representación de los valores de CIM de TIG para los SARTm y sus respectivos aislamientos parentales. En círculos verdes se muestran los valores de CIM de TIG para los aislamientos parentales, mientras que en color violeta se muestran los correspondientes valores de CIM para las cepas de SARTm obtenidas *in vitro*.

1.4- Isogenicidad entre cepas mutantes resistentes a tigeciclina y aislamientos parentales

Como resultado de la digestión del ADN genómico con la enzima *SmaI* se obtuvo un perfil electroforético de bandas que se muestra en la Figura 15. También, se muestran los perfiles de bandas de PFGE correspondientes a los clones de *S. aureus* circulantes en nuestro país (clon cordobés, clon brasilero y clon de la comunidad). Todos los patrones de restricción obtenidos mostraron al menos diez bandas, producto de la digestión enzimática.

A cada patrón de bandas diferente obtenido se le asignó una letra que representa un pulsotipo y se definieron los subtipos según los criterios mencionados en materiales y métodos. De los 12 pares de cepas analizados se obtuvieron 8 pulsotipos diferentes (A, B, C, D, E, F, G y H), muchos de ellos con subtipos.

En la Figura 15 se presentan agrupados de a pares, los perfiles de restricción obtenidos, para cada cepa mutante con su correspondiente parental.

En 9/12 cepas SARTm y sus parentales, no se observaron diferencias en el número y tamaño de las bandas obtenidas, por lo tanto son considerados clones indistinguibles. Para algunas cepas hubo diferencias en 2 o 3 bandas, por lo que son consideradas cepas estrechamente relacionadas, según los criterios tenidos en cuenta (Tenover y col., 1995).

En 2/12, se detectaron diferencias de una banda en el perfil electroforético; mientras que 1/12, tiene una diferencia de 3 bandas entre la cepa SARTm y su aislamiento parental. Al tener una diferencia de no más de 3 bandas, todas las cepas SARTm se consideraron isogénicas a sus correspondientes aislamientos parentales.

Estas diferencias sugieren la ocurrencia de al menos un único evento genético, como puede ser una mutación puntual, una inserción o una delección de ADN, que afectó un sitio de restricción de la enzima *SmaI*.

Los distintos tipos de patrones de PFGE también se tuvieron en cuenta para la caracterización genotípica de los aislamientos que se describe en el Capítulo 2.

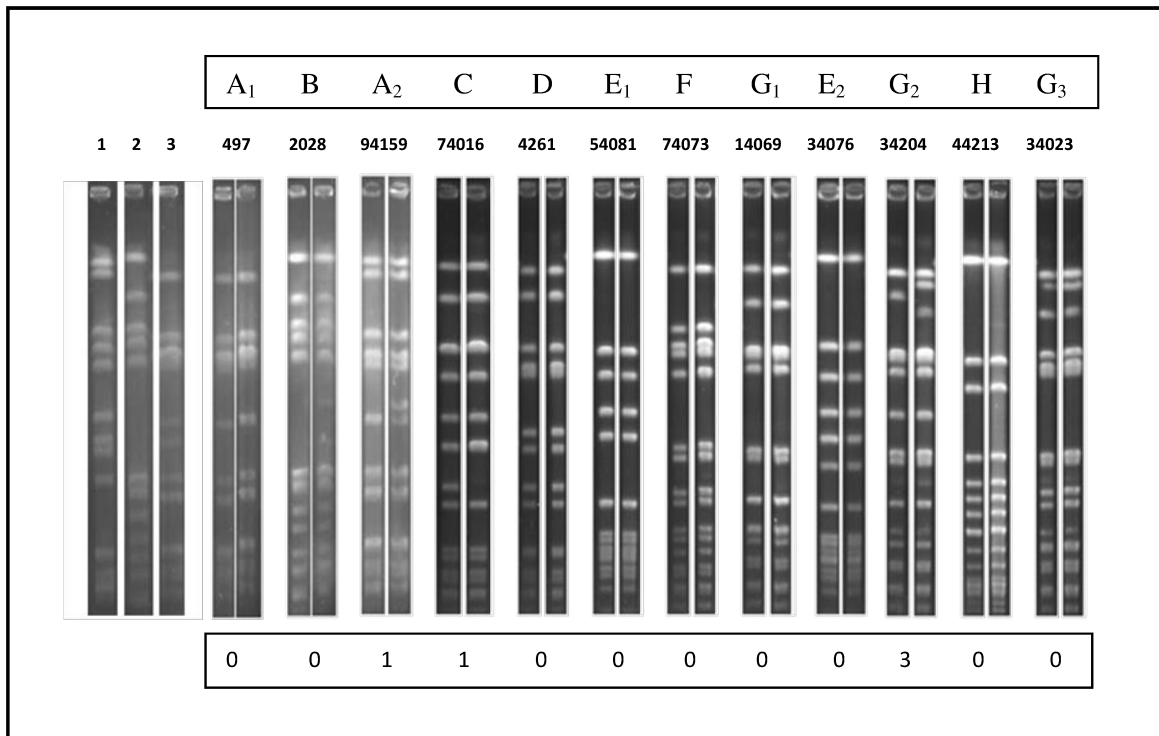


Figura 15. Perfil de restricción obtenido por PFGE para los aislamientos parentales y las respectivas mutantes resistentes a TIG. Se muestran de a pares, cada aislamiento parental con su correspondiente SARTm. 1: clon cordobés, 2: clon brasilero, 3: clon de la comunidad. Por encima de los números de las cepas se muestran los pulsotipos. Debajo de los perfiles de bandas correspondientes a cada par parental/SARTm, se detalla el número de bandas en las que difieren.

1.5- Evaluación de la sensibilidad a los antibióticos de las cepas mutantes resistentes a tigeciclina seleccionadas *in vitro*

1.5.1- Estudio de la sensibilidad a los antibióticos

La sensibilidad a distintos antibióticos utilizados para el tratamiento de las infecciones causadas por *S. aureus*, se evaluó en las cepas seleccionadas de SARTm, y se compararon los resultados con los obtenidos cuando se determinó la sensibilidad antibiótica en los aislamientos parentales. Al igual que se hizo para los aislamientos parentales, se determinó la sensibilidad antibiótica por método de difusión con discos y luego por método de dilución en agar, mediante la determinación de la CIM. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 14 (método de difusión) y Tabla 15 (método de dilución).

Teniendo en cuenta los puntos de corte para TIG propuestos por la FDA (Tabla 5), todos los SARTm resultaron ser resistentes a TIG por los dos métodos evaluados. Por método de difusión, todos los SARTm mostraron una marcada reducción del tamaño del halo de inhibición de TIG con respecto a los aislamientos parentales, con tamaños comprendidos entre 10 y 18 mm. La CIM de TIG para los SARTm estuvo comprendida entre 1 y 16 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 15).

Con respecto a los otros antibióticos ensayados, en general los SARTm mostraron, por método de difusión, antibiotipos coincidentes con sus respectivos aislamientos parentales. Se observaron en algunos casos, pequeñas diferencias en los tamaños de los halos pero que no implican cambios en el patrón de resistencia de los aislamientos parentales. Una excepción a esto se observó en la cepa 497m, donde se detectó un aumento considerable en el tamaño del halo de OXA. Esta cepa mutante mostró un halo de 21 mm, mientras que su aislamiento parental tenía un halo de 6 mm (Tabla 14). El cambio en la sensibilidad a OXA en esta cepa mutante, se observó también por método de dilución, donde la CIM para este antibiótico paso de 8 $\mu\text{g/mL}$ a 1 $\mu\text{g/mL}$. Es decir, la sensibilidad a OXA en este SARTm aumento 8 veces respecto al aislamiento parental, pasando de la categoría de resistente a sensible. Es importante mencionar que la CIM de FOX en esta cepa mutante se mantuvo dentro del rango determinado de resistencia.

Otro cambio detectado en el método de difusión se observó en la cepa 74016m; en este caso el halo de OXA se redujo con respecto a su aislamiento parental (pasó de 17 mm a 6 mm). La CIM de OXA en la cepa mutante 74016m mostró un aumento en una sola dilución con respecto al aislamiento parental, manteniendo en ambas cepas la categoría de resistentes a este antibiótico.

Es importante aclarar, que por el método de dilución si bien en algunos casos se detectaron diferencias entre aislamientos parentales y mutantes, si éstas eran de una sola dilución se consideraron diferencias aceptables propias de la metodología empleada y no se tuvieron en cuenta para definir un cambio en la sensibilidad.

En otro SARTm (94159m), se detectaron cambios en la CIM de tres antibióticos, además de TIG. En esta cepa, la CIM de OXA aumentó 8 veces y la CIM de FOX aumentó 4 veces con respecto al aislamiento parental. Lo más llamativo fue el

incremento observado en la CIM de VAN, la cual pasó de tener un valor de 1 µg/mL en el aislamiento parental a 4 µg/mL en la cepa mutante. El nuevo valor de CIM de la cepa 94159m se encuentra en la categoría de sensibilidad intermedia según el CLSI y pertenece al fenotipo conocido como VISA (*vancomycin intermediate S. aureus*).

Tabla 14. Determinación cualitativa de la sensibilidad a antibióticos para los SARTm y sus respectivos aislamientos parentales.

Cepas	Halos de inhibición (mm)											
	OXA	FOX	CEF	VAN	GEN	CIP	CLI	ERI	MIN	TMS	RIF	TIG
497p	6	18	21	19	22	26	26	26	30	30	34	22
497m	21	19	31	20	22	26	27	24	30	30	34	12
2028p	6	6	6	21	6	6	6	6	19	6	6	24
2028m	6	6	6	22	6	6	6	6	17	6	6	10
94159p	12	16	27	20	6	27	27	27	28	28	17	22
94159m	14	12	28	20	6	27	27	27	22	28	17	12
74016p	17	18	21	20	6	11	29	26	28	27	18	23
74016m	6	15	22	20	6	11	26	24	26	28	16	15
4261p	11	15	24	18	8	9	24	22	24	24	14	22
4261m	15	14	21	20	9	6	24	24	31	30	18	14
54081p	26	34	40	19	20	30	26	28	30	28	32	22
54081m	26	35	40	20	23	30	26	27	30	29	34	11
74073p	19	28	22	18	20	25	26	25	24	26	11	22
74073m	29	28	32	22	24	34	31	30	25	28	6	15
14069p	16	28	27	19	24	28	23	25	24	25	30	21
14069m	19	27	27	19	20	28	23	24	25	25	28	18
34076p	27	28	40	20	22	22	24	25	29	26	30	23
34076m	26	26	40	19	21	20	26	24	25	27	30	13
34204p	18	25	28	20	22	28	26	6	28	26	30	23
34204m	19	25	30	20	24	29	26	6	25	28	30	13
44213p	19	26	28	20	20	26	26	25	28	26	30	22
44213m	16	25	31	20	25	25	28	26	24	28	32	13
34023p	16	24	27	20	20	26	25	25	28	27	30	24
34023m	17	24	25	20	20	23	26	26	26	26	30	18

p: parental, m: mutante. En color rojo se muestran los valores que se vieron alterados en las cepas mutantes con respecto al aislamiento parental.

Tabla 15. CIM de los distintos antibióticos ensayados para los SARTm y sus respectivas cepas parentales.

Cepas	CIM ($\mu\text{g/mL}$)								
	OXA	FOX	VAN	GEN	CIP	ERI	TMS	RIF	TIG
497p	8	16	1	0,5	0,5	0,25	0,5/9,5	0,015	0,125
497m	1	32	1	0,5	1	0,25	0,5/9,5	0,015	4
2028p	≥ 32	≥ 128	1	≥ 64	≥ 16	≥ 64	$\geq 16/304$	≥ 16	0,125
2028m	≥ 32	≥ 128	1	≥ 64	≥ 16	≥ 64	$\geq 16/304$	≥ 16	16
94159p	8	16	1	≥ 64	0,5	0,25	0,5/9,5	4	0,125
94159m	64	64	4	≥ 64	0,5	0,25	0,5/9,5	4	16
74016p	4	32	0,5	≥ 32	16	0,25	0,5/9,5	4	0,125
74016m	8	32	1	32	16	0,5	0,5/9,5	4	4
4261p	8	16	1	32	≥ 16	0,25	0,5/9,5	4	0,064
4261m	16	32	1	32	≥ 16	0,5	0,25/4,75	8	8
54081p	0,125	$\leq 0,5$	1	1	0,25	0,25	0,5/9,5	0,007	0,064
54081m	0,125	$\leq 0,5$	1	0,5	0,5	0,25	0,5/9,5	0,015	8
74073p	0,5	4	1	0,5	0,5	0,5	0,25/4,75	≥ 8	0,064
74073m	0,5	4	1	0,5	1	0,25	0,25/4,75	≥ 8	8
14069p	0,5	4	1	0,25	1	0,25	0,125/2,375	0,007	0,064
14069m	0,25	4	1	0,5	0,5	0,5	0,25/4,75	0,015	1
34076p	0,125	2	1	0,25	1	0,25	0,25/4,75	0,015	0,125
34076m	0,125	4	1	0,5	2	0,5	0,125/2,375	0,015	16
34204p	0,25	4	1	0,25	0,5	≥ 32	0,25/4,75	0,007	0,064
34204m	0,5	4	1	0,25	0,5	≥ 32	0,125/2,375	0,015	8
44213p	0,25	4	1	0,5	0,5	0,25	0,25/4,75	0,007	0,125
44213m	0,5	4	1	0,25	0,5	0,5	0,25/4,75	0,007	4
34023p	0,5	4	0,5	0,25	0,5	0,5	0,25/4,75	0,007	0,064
34023m	0,5	4	1	0,5	1	0,5	0,25/4,75	0,015	1

p: parental, m: mutante. En color rojo se muestran los valores que se vieron alterados en las cepas mutantes con respecto al aislamiento parental.

1.5.2- Evaluación de la cinética de muerte de los SARTm frente a tigeciclina

Se llevó a cabo el estudio de la cinética de muerte frente a TIG en los 12 SARTm seleccionados *in vitro*, con la finalidad de analizar su comportamiento y compararlo con los correspondientes aislamientos parentales. En la Figura 16 se muestran las curvas de tiempo de muerte construidas para cada SARTm, a las cuatro concentraciones de TIG ensayadas, junto con las curvas correspondientes a los aislamientos parentales.

Las pendientes de las curvas obtenidas para los SARTm y sus parentales se compararon a través del análisis de pendientes por regresión lineal. Un valor de $p < 0,05$ se consideró como indicativo de la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las parejas (Tabla 16).

Tabla 16. Análisis comparativo de las Pendientes obtenidas por regresión lineal (promedio y desviación estándar) de las curvas de tiempo de muerte, a las diferentes concentraciones de TIG.

Cepas	4 x CIM		2 x CIM		CIM		½ x CIM	
	X ± SD	p	X ± SD	p	X ± SD	p	X ± SD	p
497p	-0,0584 ± 0,0074	0,04817	-0,0583 ± 0,0103	0,0003	-0,02588 ± 0,0086	<0,0001	0,0026 ± 0,0180	0,0940
497m	-0,0385 ± 0,0043		0,0064 ± 0,0033		0,0565 ± 0,0046		0,0628 ± 0,0261	
2028p	-0,0866 ± 0,0183	0,4506	-0,0821 ± 0,0156	0,5269	-0,0778 ± 0,0239	0,9806	-0,0636 ± 0,0229	0,4622
2828m	-0,0695 ± 0,0112		-0,0708 ± 0,0113		-0,0788 ± 0,0073		-0,0443 ± 0,0104	
94159p	-0,0738 ± 0,0126	0,8150	-0,0544 ± 0,0099	0,8171	-0,0420 ± 0,0061	0,5648	-0,0279 ± 0,0064	0,0013
94159m	-0,0688 ± 0,0162		-0,0589 ± 0,0158		-0,0512 ± 0,0140		0,0349 ± 0,0114	
74016p	-0,0768 ± 0,0123	0,3542	-0,0415 ± 0,0186	0,5419	-0,0139 ± 0,0109	0,0168	-0,0132 ± 0,015	0,2175
74016m	-0,0611 ± 0,010		-0,0541 ± 0,0067		-0,0505 ± 0,0053		-0,0357 ± 0,0076	
4261p	-0,0764 ± 0,0321	0,7932	-0,0264 ± 0,0165	0,1037	-0,0338 ± 0,0088	<0,0001	0,0592 ± 0,0025	0,1863
4261m	-0,0642 ± 0,0317		0,04525 ± 0,0354		0,0895 ± 0,0059		0,1083 ± 0,0229	
54081p	-0,1028 ± 0,0243	0,4766	-0,0947 ± 0,0099	0,0263	-0,0695 ± 0,0120	0,0001	-0,0590 ± 0,0114	0,0220
54081m	-0,0827 ± 0,0109		-0,0599 ± 0,0081		0,0596 ± 0,0136		0,0199 ± 0,0254	
74073p	-0,0416 ± 0,0067	0,0346	-0,0392 ± 0,0048	0,0113	-0,0319 ± 0,0087	0,0827	0,0404 ± 0,0142	0,1716
74073m	-0,0647 ± 0,0061		-0,0595 ± 0,0040		-0,0509 ± 0,0041		0,0641 ± 0,0070	
14069p	-0,0814 ± 0,0132	0,1043	-0,0686 ± 0,0101	0,2022	-0,0643 ± 0,0130	0,0449	-0,0034 ± 0,0131	0,0883
14069m	-0,0472 ± 0,0132		-0,0480 ± 0,0107		-0,0319 ± 0,0039		0,0296 ± 0,0108	
34076p	-0,1289 ± 0,0135	0,0046	-0,0745 ± 0,0231	0,6708	-0,0676 ± 0,0131	0,0008	-0,0169 ± 0,0217	0,0035
34076m	-0,0469 ± 0,0161		-0,0621 ± 0,0160		0,0531 ± 0,0191		0,0912 ± 0,0152	
34204p	-0,1013 ± 0,0106	0,0027	-0,0758 ± 0,0215	0,1380	-0,0617 ± 0,0192	0,0005	-0,0489 ± 0,0177	0,0001
34204m	-0,0462 ± 0,0073		-0,0388 ± 0,0061		0,0598 ± 0,0103		0,0848 ± 0,0070	
44213p	-0,0672 ± 0,0340	0,3983	-0,0625 ± 0,0102	<0,0001	-0,0650 ± 0,0093	<0,0001	-0,0274 ± 0,0130	0,0001
44213m	-0,0358 ± 0,0089		0,0454 ± 0,0062		0,0803 ± 0,0095		0,0810 ± 0,0102	
34023p	-0,0613 ± 0,0207	0,9599	-0,0615 ± 0,0192	0,2159	-0,0436 ± 0,0233	0,0450	-0,0382 ± 0,0256	0,0248
34023m	-0,0602 ± 0,0053		-0,0316 ± 0,0112		0,0278 ± 0,0190		0,0585 ± 0,0240	

En color rojo se destacan los valores de p que dieron diferencias significativas entre cepas parentales y mutantes resistentes a TIG.

La concentración de TIG ensayada, correspondiente al valor de la CIM, fue a la concentración en la que mayor número de cepas mostraron diferencias significativas entre parentales y mutantes resistentes (9/12). En 6/12 cepas, se obtuvieron diferencias significativas a la concentración de $\frac{1}{2}$ x CIM. Por otra parte, sólo en 4/12 cepas se observaron diferencias significativas a las concentraciones correspondientes a 4 x CIM y 2 x CIM. En todos los casos en los que se observó diferencia, las cepas mutantes mostraron una velocidad de muerte más lenta que las cepas parentales, detectándose en muchos casos, un recrecimiento luego de las 24 h de incubación.

A excepción de la dupla conformada por las cepas 2028p y 2028m, todas las parejas mostraron diferencias significativas en la cinética de muerte en al menos una concentración de TIG ensayada.

Como se mencionó anteriormente, el aislamiento parental 34076p, había sido el único caso donde la TIG había ejercido efecto bactericida, disminuyendo más de 3 \log_{10} UFC/mL a las 24 h de incubación, al usar una concentración 4 x CIM. La cepa mutante resistente correspondiente (34076m) disminuyó solo 1,4 \log_{10} UFC/mL a las 24 h de incubación para las mismas condiciones de ensayo.

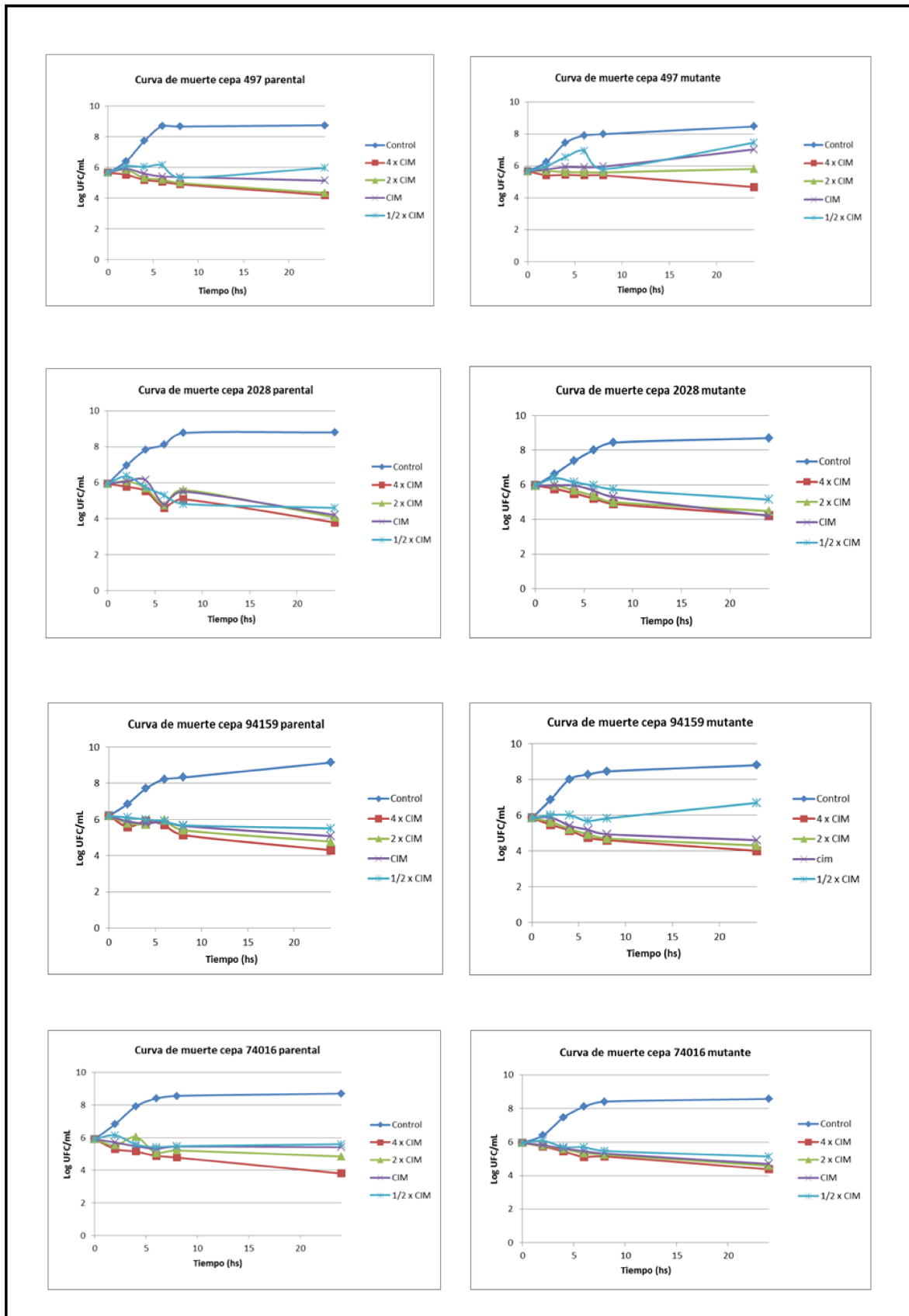


Figura 16. Curvas de tiempo de muerte de cepas parentales y mutantes resistentes a TIG.

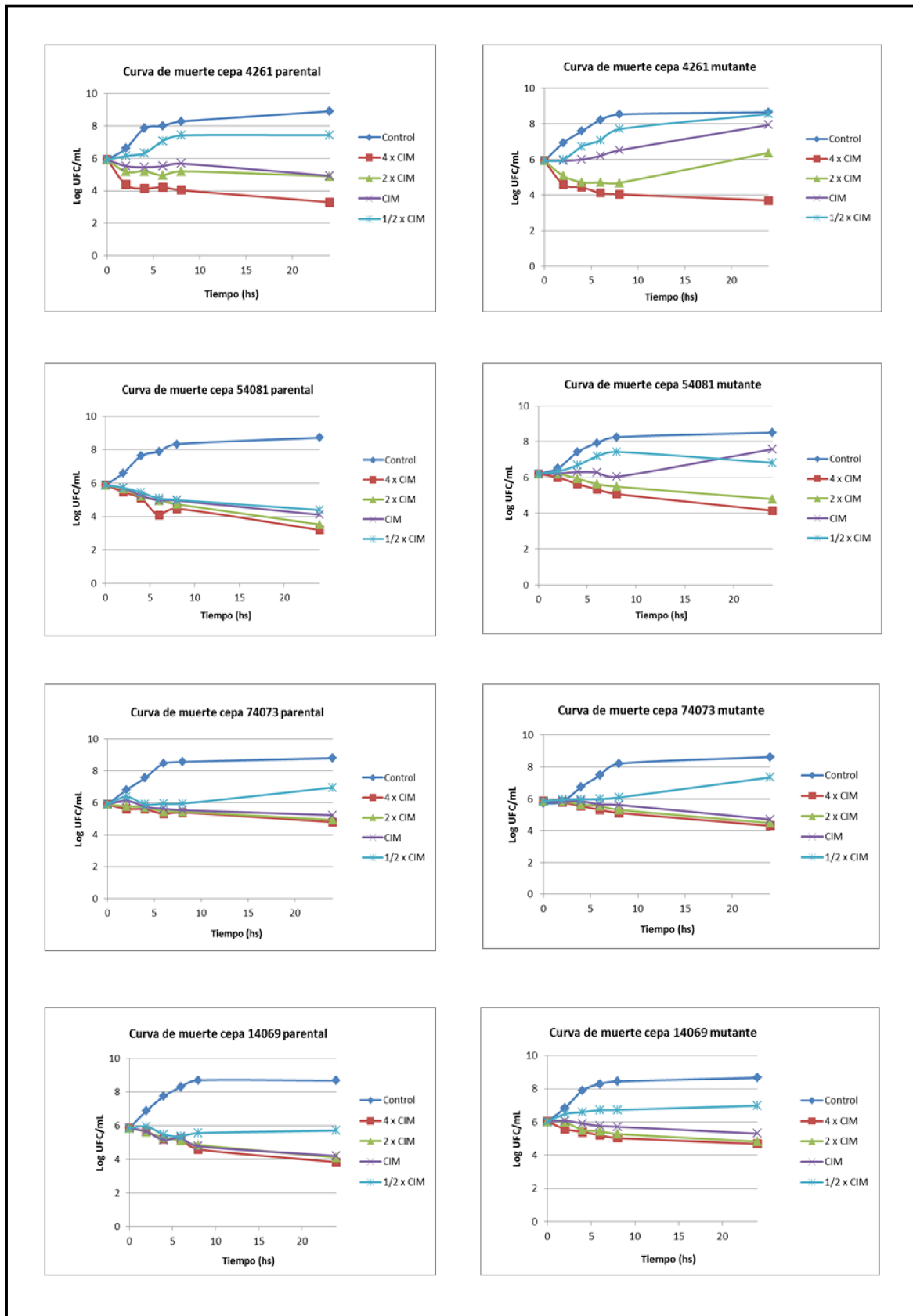


Figura 16. Curvas de tiempo de muerte de cepas parentales y mutantes resistentes a TIG (continuación).

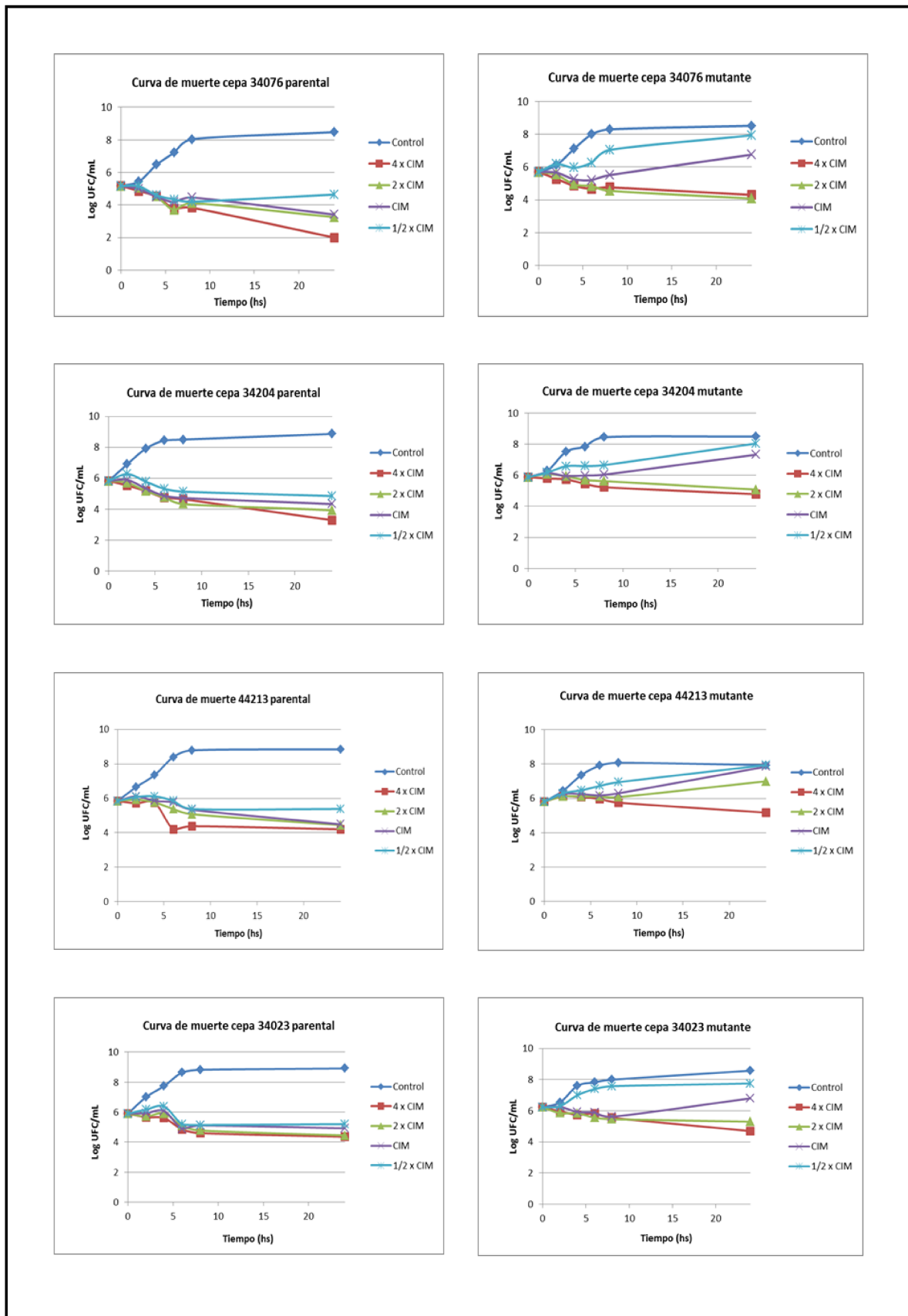


Figura 16. Curvas de tiempo de muerte de cepas parentales y mutantes resistentes a TIG (continuación).

1.6- Ensayos adicionales sobre aislamientos de SARTm que modificaron su sensibilidad a otros antibióticos

Un SARTm (94159m), mostró un cambio en la CIM de OXA (aumentó 8 veces), en la CIM de FOX (aumentó 4 veces), y también mostró un cambio en la CIM de VAN. En este caso, aumentó 4 veces la CIM de VAN con respecto al aislamiento parental, adquiriendo de esta manera un fenotipo VISA, ya que tuvo una CIM de 4 µg/mL.

1.6.1- Evaluación de la sensibilidad a vancomicina

Según los puntos de corte propuestos por el CLSI, un aislamiento es considerado VISA si su CIM se encuentra entre 4-8 µg/mL. Por método de dilución, la cepa 94159m obtuvo un valor de 4 µg/mL. Se realizó esta determinación por método de E-test y se confirmó este valor. Al realizar el método de macro E-test, se obtuvo un valor de 12 µg/mL. Se consideró a un aislamiento como probable VISA si tiene un valor mayor o igual a 6 µg/mL por éste método. Por último, al realizar el método de predifusión, se obtuvo para la cepa 94159m un tamaño de halo para VAN de 15 mm y para TEI de 25 mm. Por lo tanto, se pudo confirmar por todos los métodos ensayados, el fenotipo VISA adquirido en la cepa 94159m (Tabla 17).

Tabla 17. Sensibilidad a VAN por método de dilución, E-test, macro E-test y predifusión.

Cepas	CIM VAN (µg/mL)	CIM VAN (E-test) (µg/mL)	Macro E-test VAN (µg/mL)	Predifusión VAN/TEI (mm)	Interpretación
94159p	1	ND	ND	23/24	VSSA
94159m	4	4	12	15/24	VISA

ND: no determinado. VSSA: *Staphylococcus aureus* sensible a VAN. VISA: *Staphylococcus aureus* con sensibilidad intermedia a VAN.

DISCUSIÓN

Para la realización de este trabajo de tesis se partió de 20 aislamientos clínicos de *S. aureus* (10 SARM y 10 SASM) y se sometieron a pasajes seriados en concentraciones crecientes de TIG con la finalidad de obtener mutantes *in vitro* con disminución en la sensibilidad o resistencia a este antibiótico.

La TIG, es un antibiótico relativamente nuevo, que fue aprobado por la FDA en el año 2005 para el tratamiento de las infecciones complicadas de piel y partes blandas, e infecciones intraabdominales complicadas. Además, también se utiliza en el tratamiento de neumonía adquirida en la comunidad. Si bien existen resultados controvertidos acerca de su efectividad y seguridad, es considerado un antibiótico que puede ser útil en casos de infecciones graves, causadas por microorganismos multirresistentes, donde se encuentran limitadas las opciones de tratamiento (Shen y col., 2015). En un estudio randomizado sobre la eficacia y seguridad de TIG, comparada con VAN y linezolid para el tratamiento de las infecciones causadas por *S. aureus*, se concluyó que TIG constituye una buena alternativa para pacientes hospitalizados, con alto riesgo de adquirir microorganismos multirresistentes, debido a la buena actividad demostrada frente a *S. aureus* y a su amplio espectro de actividad frente a otros patógenos (Florescu y col., 2008).

Las opciones de tratamiento de las infecciones causadas por *S. aureus* son cada vez más reducidas, debido al rápido y continuo desarrollo de resistencia que presenta esta bacteria frente a los distintos antibióticos introducidos en la práctica clínica y que ha sido demostrado a lo largo de la historia de su evolución (Chambers y DeLeo, 2009).

Se ha descrito y evidenciado en múltiples oportunidades el impacto de la presión selectiva ejercida por los antibióticos en la emergencia de bacterias resistentes, ya sea por su uso indiscriminado o inadecuado. Esto ocurre no sólo en instituciones de salud, donde no siempre se cuenta con una vigilancia estricta del uso de antibióticos, sino también aplicándolos en forma masiva en el medio ambiente o la industria. Un ejemplo muy difundido es el uso de estas drogas en la actividad agropecuaria, donde son usadas

para optimizar el crecimiento de muchos animales de consumo (Andersson y Hughes, 2014).

Cuando una población bacteriana es expuesta por períodos prolongados, no sólo a altas concentraciones de antibióticos, sino también a concentraciones que se encuentran por debajo de la CIM (concentraciones sub-CIM), se expone a una situación de estrés que dispara diferentes mecanismos celulares que conducen a alteraciones genotípicas y fenotípicas. Este hecho, muchas veces lleva a la adquisición de mecanismos de resistencia y en presencia de presión antibiótica se seleccionan aquellos miembros de la población que son capaces de resistir y así permiten a la bacteria adaptarse y persistir frente a las condiciones adversas del medio (Andersson y Hughes, 2014). De esta manera, han emergido bacterias con mayores niveles de resistencia a los antibióticos y se han diseminado en los ambientes hospitalarios y en la comunidad, haciendo que sea cada vez más difícil combatir las infecciones, y causando gran preocupación a nivel mundial.

Al evaluar la sensibilidad a los antibióticos más utilizados para el tratamiento de las infecciones por *S. aureus*, se encontró que todos los aislamientos parentales, tanto de SARM como de SASM fueron sensibles a VAN y TIG. Esto concuerda con los estudios de vigilancia nacionales sobre sensibilidad en *S. aureus*, los cuales han reportado hasta el momento la ausencia de resistencia a VAN y a TIG en aislamientos de SARM-AH (OPS, 2015). La VAN, constituye desde hace algunos años la opción de elección para el tratamiento de las infecciones por SARM. Muchas veces, representa la única opción disponible, debido al incremento en la resistencia al resto de los antibióticos.

Se sabe que los SARM son portadores del gen *mecA*, que le confiere resistencia a los antibióticos pertenecientes al grupo de los β -lactámicos, y que en ocasiones, presentan resistencia acompañante a otras familias de antibióticos, mostrando un fenotipo de multiresistencia. Los aislamientos de SARM estudiados mostraron resultados variables de resistencia a los antibióticos ensayados. Además de la resistencia a OXA y FOX, se encontró un elevado nivel de resistencia a CIP y GEN (8/10 aislamientos en ambos). En menor medida se observó resistencia a ERI (en 5/10) y a RIF (en 4/10), mientras que en 2/10 aislamientos se detectó resistencia a TMS. En cuanto a la sensibilidad antibiótica observada en los SASM, sólo se detectó resistencia hacia ERI y RIF en un aislamiento en cada caso. Aún teniendo en cuenta que los

criterios de selección y la finalidad de los estudios fueron completamente diferentes, Perazzi y col., obtuvo resultados similares en un trabajo llevado a cabo en Argentina en el año 2010 (Perazzi y col., 2010), donde describe la sensibilidad antibiótica de aislamientos de SARM y SASM, destacando que los SARM-AH presentaron resistencia simultánea a ERI, CLI, GEN y CIP, mientras que el 100% fue sensible a VAN, TEL, TIG y linezolid. En dicho trabajo, en los SARM-AC y SASM se observó sensibilidad a la mayoría de los antibióticos no β -lactámicos, siendo la resistencia a ERI, CLI, GEN y CIP de alrededor del 10% en los SASM.

Mediante pasajes seriados en concentraciones crecientes de TIG se obtuvieron *in vitro*, 12 cepas de *S. aureus* (12/20) que aumentaron entre 16 y 128 veces la CIM a este antibiótico con respecto a los aislamientos parentales. Cinco de las 12 cepas, correspondían a SARM y 7 a SASM. Esto demuestra que la capacidad de seleccionar nuevos mecanismos de resistencia, debido a la presión selectiva ejercida por este antibiótico, puede ocurrir en ambos grupos bacterianos. Este hecho se ha visto también con la aparición *in vivo* de cepas h-VISA, las cuales si bien han surgido en mayor número en SARM, también se han documentado casos en SASM, incluso uno de ellos fue reportado en Argentina (Bobin-Dubreux y col., 2001; Perazzi y col., 2011). Esto demostraría que, independientemente de la sensibilidad o la resistencia a la meticilina, la plasticidad genómica que presenta *S. aureus* le brinda un potencial para adquirir nuevos mecanismos de resistencia.

En la actualidad, poco se conoce sobre la emergencia o selección de aislamientos de *S. aureus in vivo* que toleren el tratamiento con TIG. Particularmente, los estudios de vigilancia de TIG realizados sobre *S. aureus*, demuestran la buena actividad que sigue manteniendo este antibiótico frente a esta especie bacteriana, con un 99,9% de sensibilidad observado en varios países alrededor del mundo (Hoban y col., 2015). También, se ha reportado alta proporción de sensibilidad en América Latina en un estudio realizado en 2004-2015 (Vega y Dowzicky, 2017). A pesar de que un pequeño número de aislamientos de *S. aureus* no susceptibles a TIG, fueron recolectados de centros de América Latina como parte del programa TEST en el período 2004-2010 (Garza-Gonzales y Dowzicky, 2013), desde el año 2010 en adelante todos los aislamientos de *S. aureus* (incluyendo SARM) fueron sensibles a TIG (Sader y col., 2016). Sin embargo, se ha observado que esta especie bacteriana presenta la capacidad

de desarrollar *in vitro* una disminución de la sensibilidad a diversos antibióticos en presencia de presión selectiva (McAleese y col., 2005; Banerjee y col., 2008; Vidailac y col., 2013).

Se analizó la clonalidad mediante PFGE de las cepas mutantes resistentes a TIG, y sus correspondientes aislamientos parentales, con la finalidad de corroborar la isogenicidad entre ellas. De esta manera, se pudo observar que todas las cepas mutantes fueron isogénicas a sus respectivos aislamientos parentales. La mayoría de las cepas mutantes (9/12), tuvieron un perfil de restricción idéntico al aislamiento parental, es decir que tenían el mismo número y tamaño de las bandas. Las diferencias observadas en el número de bandas en algunas de las cepas mutantes, puede deberse a la ocurrencia de algún evento genético, como consecuencia de la presión selectiva del antibiótico durante el proceso de selección de resistencia, que dio lugar a la pérdida o ganancia de un sitio de restricción de la enzima *SmaI* (Tenover y col., 1995).

Todos los aislamientos parentales fueron sensibles a TIG, con un rango de CIM de 0,064-0,125 $\mu\text{g/mL}$. Luego de la exposición a concentraciones crecientes de TIG, durante un máximo de 15 pasajes diarios, todas los aislamientos parentales (20/20) seleccionaron mutantes, con valores de CIM en el rango de resistencia, según los puntos de corte propuestos por la FDA. Luego de realizar pasajes consecutivos en medio libre de antibiótico, los valores de CIM resistente se mantuvieron en 12/20 cepas mutantes, que fueron las que se reservaron para continuar con los estudios.

Las 12 cepas mutantes con resistencia estable a TIG, tuvieron un rango de CIM de 1-16 $\mu\text{g/mL}$. Estos valores de CIM son similares a los que se obtuvieron en un trabajo en el que también se lograron obtener mediante pasajes seriados *in vitro*, dos cepas de *S. aureus* mutantes resistentes a TIG, con valores de CIM de TIG de 4 y 16 $\mu\text{g/mL}$ (McAleese y col., 2005).

Para determinar si la presión selectiva ejercida por TIG producía además, algún cambio en la sensibilidad a otros agentes antimicrobianos, se evaluó la sensibilidad antibiótica a otras drogas en las cepas mutantes. Se observaron cambios en el patrón de sensibilidad en dos cepas mutantes resistentes. En una de ellas (cepa 497m), la CIM de OXA disminuyó 8 veces con respecto al aislamiento parental, pasando de 8 $\mu\text{g/mL}$ a 1 $\mu\text{g/mL}$. Evaluando la CIM de OXA, esta cepa mutante se categoriza como sensible a la

meticilina, aún en presencia del gen *mecA*, como se pudo corroborar mediante la amplificación de este gen por PCR (ver Capítulo 2). Sin embargo, la CIM de FOX no presentó cambios, y se mantuvo en el rango de resistencia. Por lo tanto, este cambio de sensibilidad a OXA tendría su origen con alguna alteración a nivel de otros genes.

Se ha documentado en varias ocasiones, la existencia *in vivo* de cepas de *S. aureus*, que por métodos de determinación de la susceptibilidad resultan ser sensibles a OXA, pero que al realizar estudios genotípicos son portadoras del gen *mecA* (Sharff y col., 2012; Hososaka y col., 2007). Este fenotipo, si no se detecta correctamente, podría llevar a una situación de fracaso terapéutico, razón por la cual se debe recurrir a técnicas moleculares como la amplificación y detección del gen *mecA*.

Otra cepa mutante resistente a TIG seleccionada *in vitro* (94159m), se caracterizó por un cambio en el perfil de sensibilidad a OXA, FOX y VAN. Se observó en esta cepa un aumento de 8 veces la CIM de OXA, mientras que la CIM de FOX aumentó 4 veces con respecto al aislamiento parental. Este incremento en ambos valores de CIM “refuerza” su categorización como SARM. Lo más llamativo en esta mutante fue el aumento evidenciado en la CIM de VAN, que pasó de 1 µg/mL en el aislamiento parental, a 4 µg/mL en la cepa mutante. Es importante destacar que ese valor de CIM corresponde a la definición del fenotipo VISA según los puntos de corte actuales del CLSI (CLSI, 2016). Este fenotipo VISA fue confirmado mediante la determinación de la sensibilidad a VAN por método de E-test. Además, los resultados fueron positivos al evaluar el comportamiento de esta cepa por los métodos de *screening* recomendados para detectar el fenotipo VISA (macro E-test y predifusión) (Howden y col., 2010).

Un incremento en la CIM de VAN ha sido asociado en algunas oportunidades, con una disminución en la CIM de OXA, tanto en mutantes resistentes a VAN seleccionadas *in vitro* como en aislamientos de VISA obtenidos *in vivo* (Naimi y col., 2003a; Sieradzki y col., 2003a). Sin embargo, en nuestro trabajo la emergencia del fenotipo VISA fue acompañado de un aumento en los valores de CIM de OXA y FOX. A diferencia de nuestros resultados, en el trabajo realizado por McAleese y col. en 2005, las mutantes resistentes a TIG, no mostraron cambios en la sensibilidad a OXA y VAN, pero sí tuvieron cambios en la sensibilidad a otros antibióticos como CIP, MIN y tetraciclina (McAleese y col., 2005).

Los cambios de sensibilidad detectados, muestran que durante el proceso de selección *in vitro* de mutantes resistentes a TIG podrían producirse modificaciones que afectan los valores de sensibilidad a otras familias de antibióticos. Estos cambios también podrían ocurrir en situaciones *in vivo*, por ejemplo, durante los tratamientos antibióticos prolongados, afectando y limitando las opciones de tratamiento.

Se evaluó además la cinética de muerte de TIG frente a los aislamientos parentales y las cepas mutantes resistentes, para evidenciar cambios en el comportamiento de las cepas, como consecuencia de las modificaciones genotípicas y fenotípicas seleccionadas bajo la presión selectiva. Cuando se realizaron las curvas de tiempo de muerte en los aislamientos parentales, se confirmó el poder bacteriostático de la TIG, que mostró muy buena actividad *in vitro* a la concentración correspondiente al doble de la CIM a las 24 h de exposición, donde ejerció una disminución del 99% (-1 y -2 log) en el recuento de células viables en 19/20 aislamientos de *S. aureus* estudiados. En uno de los aislamientos (SASM), TIG mostró un poder bactericida cuando se empleó en concentración 4 x CIM. Por último, se observó que TIG evitó el recrecimiento en la mayoría de los aislamientos estudiados a la menor concentración ensayada. Su efecto bacteriostático frente a *S. aureus* ha sido demostrado en otros trabajos de cinética de muerte, donde se obtuvieron resultados similares, mostrando algún recrecimiento bacteriano luego de las 10 h de incubación (Noviello y col., 2008). También se ha demostrado su efecto bacteriostático frente a otros agentes patógenos pertenecientes a otros géneros bacterianos, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *Enterococcus faecalis* (Pankey y Ashcraft, 2009). Se puede sugerir que la TIG podría ser una opción útil en las infecciones causadas por SARM, donde no se requiera actividad bactericida, teniendo en cuenta siempre el sitio de infección, para poder lograr una buena penetración en los tejidos y alcanzar las concentraciones necesarias.

La cinética de muerte de TIG en las cepas mutantes, mostró diferencias significativas en su comportamiento con respecto a los aislamientos parentales, en proporciones variables. A las mayores concentraciones ensayadas (4 x CIM y 2 x CIM) se obtuvo el menor número de cepas con diferencias significativas entre los pares parental y mutante (sólo 4/12). En cambio, a las menores concentraciones de TIG evaluadas, se detectaron mayores diferencias en la velocidad de muerte de las cepas

mutantes con respecto a los aislamientos parentales. A la concentración correspondiente a la CIM, 9/12 cepas mutantes mostraron diferencias significativas, mientras que 6/12, tuvieron diferencias a la concentración de $\frac{1}{2}$ x CIM. En todos los casos, excepto en uno (cepa 74016), las diferencias estuvieron dadas por una menor magnitud de la velocidad de muerte de la cepa mutante a las 24 h de incubación. En 10/12 cepas mutantes se observó un recrecimiento a la concentración de $\frac{1}{2}$ x CIM; en 7 de las 10 cepas parentales, ese recrecimiento no había sido observado. Incluso, en algunas mutantes (6/12) se observaron recrecimientos a la concentración correspondiente a la CIM y una sola (1/12), mostró también un recrecimiento bacteriano cuando la concentración ensayada fue el doble de la CIM.

Como es de esperar, las cepas que han adquirido algún mecanismo de resistencia frente a TIG se vieron afectadas en su cinética de muerte a bajas concentraciones del antibiótico, mostrando en estos casos ser más refractarios a la acción antibacteriana ejercida.

CAPÍTULO 2

Caracterización genotípica de aislamientos de *S. aureus* parentales y mutantes resistentes a tigeciclina

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1- Extracción del ADN genómico

Se realizó la extracción del ADN bacteriano de todos los aislamientos parentales y mutantes resistentes a TIG seleccionados *in vitro*. Se siguió el protocolo modificado de Harris-Warrick y col. (la preparación de los *buffers* se detalla en la sección de Anexos).

Se partió de un cultivo *overnight* de los aislamientos, se tomaron 2 mL y se centrifugó dos veces a 6 000 rpm, durante 3 min. Se resuspendió el *pellet* en 1mL de *buffer* TE (Tris-EDTA) y se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 min. Luego, el *pellet* se resuspendió en 100 µL de *buffer* TES (Tris-EDTA-Sacarosa) más 20 µL de lisozima (Sigma-Aldrich) (10 mg/mL) y 3 µL de lisostafina (Sigma-Aldrich) (10 mg/mL). Se incubó en baño de agua a 37°C durante 1 h. Se agregó 40 µL de *buffer* TE + dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10 % y 20 µL de EDTA 0,5 M pH = 8,00 mezclando suavemente por inversión. Se agregó 2 µL de RNAsa (Fermentas) (1 mg/mL) y se incubó a 37°C durante 50 min. Posteriormente, se agregó 2 µL de proteinasa K (Fermentas) (20 mg/mL) y se incubó a 37°C hasta ver clarificación, aproximadamente 40 min. Se agregó una mezcla de 120 µL de fenol y 120 µL de cloroformo y se mezcló por inversión para luego centrifugar a 6 000 rpm durante 5 min. Se separó la fase superior en otro tubo conteniendo 320 µL de la mezcla fenol-cloroformo y se volvió a centrifugar durante 5 min. Se pasó luego la fase superior a otro tubo con 240 µL de cloroformo y se centrifugó 5 min a 6 000 rpm. La fase superior se trasvasó a otro tubo pre-enfriado conteniendo 1 mL de etanol al 100%. Se dejó en freezer *overnight*. Luego, se centrifugó durante 10 min a 13 000 rpm y se eliminó el alcohol. El ADN extraído se dejó secar y posteriormente se resuspendió en 200 µL de agua milliQ estéril y se almacenó en freezer a -20°C hasta su posterior uso.

2.2- Detección del gen *mecA*

El gen *mecA*, que codifica la resistencia a meticilina en *S. aureus*, se detectó mediante la amplificación de un fragmento interno del gen por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (Murakami y col., 1991). Se utilizaron las cepas de *S. aureus* ATCC 43300 y 29213 como controles positivo y negativo respectivamente.

Se preparó la siguiente mezcla de reacción para un volumen final de 50 μ L.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (μ L)	Concentración final
H ₂ O milliQ	-	20,3	csp 50 μ L
<i>Buffer</i>	10 X	5	1 X
MgCl ₂	25 mM	5	2,5 mM
dNTP	10 mM	2,5	500 μ M
3' <i>mecA</i>	5 μ M	8	0,8 μ M
5' <i>mecA</i>	5 μ M	8	0,8 μ M
ADN	50 ng/ μ L	1	1 ng/ μ L
<i>Taq</i> pol	5 U/ μ L	0,2	1 U

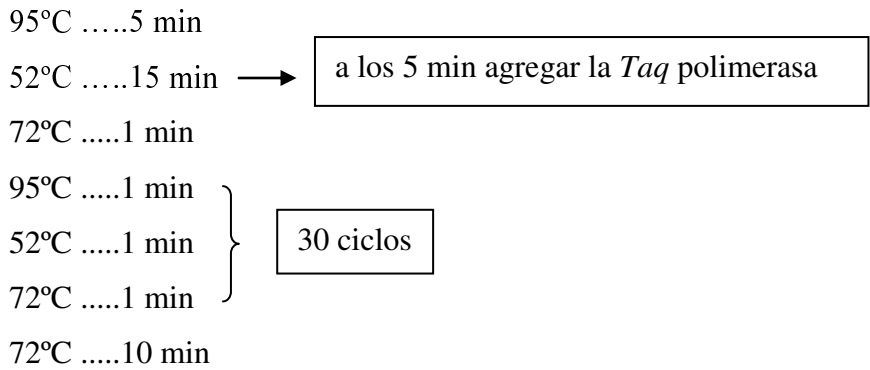
csp: cantidad suficiente para preparar.

Para obtener un volumen final de 50 μ L, en cada tubo de PCR se colocó 48,8 μ L de la mezcla de reacción y se agregó 1 μ L de ADN. El agregado de la *Taq* polimerasa se realizó en “*hot start*”, a los 5 min de iniciado el ciclado (1 U por reacción). El tamaño de amplicón esperado fue de 550 pb. En la Tabla 18 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados.

Tabla 18. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la detección del gen *mecA*.

Oligonucleótidos	Secuencias (5' - 3')	Tamaño de amplicón (pb)
3' <i>mecA</i>	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	550
5' <i>mecA</i>	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	

Protocolo de ciclado



Detección de los productos de PCR

Para realizar la detección de los productos obtenidos en todas las reacciones de PCR llevadas a cabo en este trabajo de tesis se procedió de la misma manera.

Los fragmentos de ADN amplificados fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa. Dependiendo del tamaño de los fragmentos se usó una concentración de agarosa del 0,8 al 1,5%, en *buffer* TAE 1 X (Tris-Acetato-EDTA). Se fundió la agarosa y se añadió una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/mL). Una vez armado el gel, se sembró en cada calle, 9 µL de los productos de PCR más 1 µL de *buffer* de carga 10 X. Las bandas se visualizaron en un transiluminador UV (Bio-Rad).

2.3- Determinación del tipo de casete SCC*mec*

El tipo de SCC*mec* se determinó en todos los aislamientos de SARM (parentales y mutantes resistentes a TIG) por caracterización del complejo *ccr* y del complejo *mec*, mediante una serie de reacciones de multiplex PCR (Kondo y col., 2007; Milherico y col., 2007). A través de la combinación de ambos tipos de complejos se asignó el tipo de SCC*mec* presente en cada aislamiento en estudio.

2.3.1- Determinación del complejo *ccr*

2.3.1.1- Complejo *ccrAB1*, *ccrAB2*, *ccrAB3*

Para amplificar los genes que componen el complejo *ccr*, se realizó una multiplex PCR. Se preparó la siguiente mezcla de reacción para un volumen final de 50 μ L.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (μ L)	Concentración final
H ₂ O milliQ	-	4,3	csp 50 μ L
<i>Buffer</i>	10 X	5	1 X
MgCl ₂	25 mM	5	2,5 mM
dNTP	10 mM	2,5	500 μ M
<i>ccr</i> - β 2	5 μ M	8	0,8 μ M
<i>ccr</i> - α 2	5 μ M	8	0,8 μ M
<i>ccr</i> - α 3	5 μ M	8	0,8 μ M
<i>ccr</i> - α 4	5 μ M	8	0,8 μ M
ADN	50 ng/ μ L	1	1 ng/ μ L
<i>Taq</i> pol	5 U/ μ L	0,2	1 U/ μ L

csp: cantidad suficiente para preparar.

En cada tubo de PCR se adicionó 49 μ L de la mezcla de reacción y se agregó 1 μ L de ADN. Se utilizaron distintos aislamientos clínicos que representan un determinado tipo de complejo *ccr* como cepas controles. Se emplearon los oligonucleótidos descritos por Ito y col., 2001 (Tabla 19).

Tabla 19. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de genes del complejo *ccrAB1*, *ccrAB2*, *ccrAB3* mediante multiplex PCR.

Tipo de complejo <i>ccr</i>	Secuencias (5' - 3')	Tamaño amplicón (pb)	Cepa control
<i>ccrAB1</i>	<i>ccr</i> -β2: ATTGCCTTGATAATAGCCITCT <i>ccr</i> -α2: AACCTATATCATCAATCAGTACGT	700	A1C (clon cordobés)
<i>ccrAB2</i>	<i>ccr</i> -β2: ATTGCCTTGATAATAGCCITCT <i>ccr</i> -α3: TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	1 000	Cepa 6 (clon de la comunidad-ST5-SCC <i>mec</i> IV, pulstipo A)
<i>ccrAB3</i>	<i>ccr</i> -β2: ATTGCCTTGATAATAGCCITCT <i>ccr</i> -α4: AGCTCAAAGCAAGCAATAGAAT	1 600	A3 (clon brasileiro)

Protocolo de ciclado

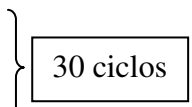
95°C.....5 min

95°C.....1 min

60°C.....1 min

72°C.....1 min 30 seg

72°C.....5 min



2.3.1.2- Complejo *ccrC*

Se preparó la siguiente mezcla de reacción de un volumen final de 50 µL.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (µL)	Concentración final
H ₂ O milliQ	-	28,3	-
<i>Buffer</i>	10 X	5	1 X
MgCl ₂	25 mM	5	2,5 mM
dNTP	10 mM	2,5	500 µM
<i>ccrC</i> F2	10 µM	4	0,8 µM
<i>ccrC</i> R2	10 µM	4	0,8 µM
ADN	50 ng/µL	1	1 ng/µL
<i>Taq</i> pol	5 U/µL	0,2	1 U/µL

csp: cantidad suficiente para preparar.

En cada tubo de PCR se adicionó 49 µL de la mezcla de reacción y se agregó 1 µL de ADN. Se utilizó como cepa control un aislamiento clínico de *S. aureus* correspondiente al clon brasilero, que contiene en la estructura de su SCC*mec* un fragmento con *ccrC*. Se emplearon oligonucleótidos descritos por Milherico y col. (Milherico y col., 2007) (Tabla 20).

Tabla 20. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la amplificación del complejo *ccrC*.

Tipo de complejo <i>ccr</i>	Secuencias (5' - 3')	Tamaño amplicón (pb)	Cepa control
<i>ccrC</i>	<i>ccrC</i> F2: GTACTCGTTACAATGTTTGG <i>ccrC</i> R2: ATAATGGCTTCATGCTTACC	450	A3 (clon brasilero)

Protocolo de ciclado

94°C.....5 min
 94°C.....2 min }
 50°C.....1 min } 30 ciclos
 72°C.....1 min }
 72°C.....2 min
 10°C.....20 min

2.3.2- Determinación del complejo *mec*

2.3.2.1- Complejo *mec* clase A

Se preparó la siguiente mezcla de reacción para un volumen final de 50 µL.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (µL)	Concentración final
H ₂ O milliQ	-	32,3	csp 50 µL
<i>Buffer</i>	10 X	5	1 X
MgCl ₂	25 mM	5	2,5 mM
dNTP	10 mM	2,5	500 µM
<i>Primer R</i>	10 µM	2	0,4 µM
<i>Primer F</i>	10 µM	2	0,4 µM
ADN	50 ng/µL	1	1 ng/µL
<i>Taq pol</i>	5 U/µL	0,2	1 U/µL

csp: cantidad suficiente para preparar.

En cada tubo de PCR se adicionó 49 µL de la mezcla de reacción y se agregó 1 µL de ADN. Se usó como cepa control un aislamiento clínico correspondiente al clon brasilero (SCC*mec* III). Se usaron los oligonucleótidos descritos por Katayama y col. (Katayama y col., 2001) (Tabla 21). Para la determinación del complejo *mec* clase A, se llevaron a cabo dos reacciones de PCR. Una con los oligonucleótidos mI-1/mI-2 y otra con mcR-2/mcR-3.

Tabla 21. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la amplificación del complejo *mec* clase A.

Tipo de complejo <i>mec</i>	Secuencias (5' - 3')	Tamaño amplicón (pb)	Cepa control
<i>mec</i> clase A	mI-1: AATGGCGAAAAAGCACAACA	480	A3 (Clon brasileiro)
	mI-2: GACTTGATTGTTTCCTCTGTT		
	mcR-2: CGCTCAGAAATTTGTTGTGC	1597	
	mcR-3: ATCTCCACGTTAATTCCATT		

Protocolo de ciclado

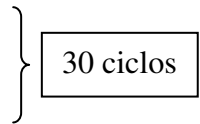
95°C.....5 min

95°C.....1 min

52°C.....1 min

72°C.....1 min 30 seg

72°C.....10 min



2.3.2.2- Complejo *mec* clase B

Se preparó la siguiente mezcla de reacción para un volumen final de 50 µL.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (µL)	Concentración final
H ₂ O milliQ	-	20,3	csp 50 µL
<i>Buffer</i>	10 X	5	1 X
MgCl ₂	25 mM	5	2,5 mM
dNTP	10 mM	2,5	500 µM
<i>IS1272</i>	5 µM	8	0,8 µM
<i>mecR1</i>	5 µM	8	0,8 µM
ADN	50 ng/µL	1	1 ng/µL
<i>Taq</i> pol	5 U/µL	0,2	1 U/µL

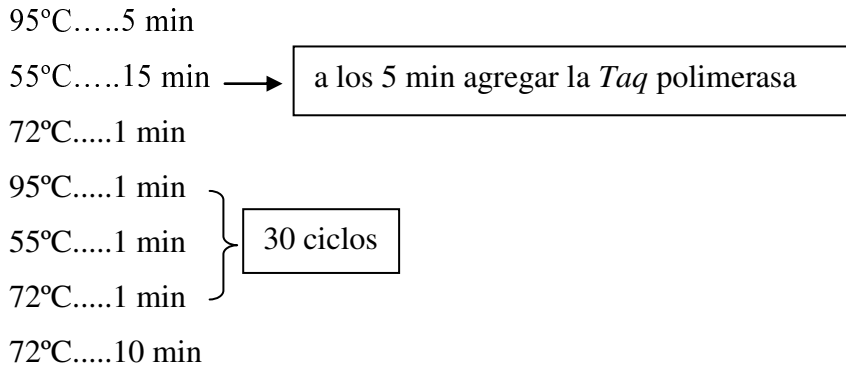
csp: cantidad suficiente para preparar.

En cada tubo de PCR se adicionó 48,8 μL de la mezcla de reacción y se agregó 1 μL de ADN. El agregado de la *Taq* polimerasa se realizó en “*hot start*”, a los 5 min de iniciado el ciclado (1 U por reacción). Se usó como cepa control un aislamiento clínico correspondiente al clon cordobés (SCC*mec* I). Se utilizaron oligonucleótidos descritos por Di Gregorio y col. (Di Gregorio y col., 2015) cuyas secuencias y tamaño de amplicón se describen en la Tabla 22.

Tabla 22. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la amplificación del complejo *mec* clase B.

Tipo de complejo <i>mec</i>	Secuencias (5' - 3')	Tamaño amplicón (pb)	Cepa control
<i>mec</i> clase B	<i>IS1272</i> : ATTTTGGGTTTCACTCGGAT <i>mecR1</i> : CAAATATTAAAGAACGTGTT	565	A1C (clon cordobés)

Protocolo de ciclado



2.3.2.3- Complejo *mec* clase C

Se preparó la siguiente mezcla de reacción para un volumen final de 50 µL.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (µL)	Concentración final
H ₂ O milliQ	-	28,8	csp 50 µL
<i>Buffer</i>	10 X	5	1 X
MgCl ₂	25 mM	5	2,5 mM
dNTP	10 mM	2	400 µM
<i>Primer R</i>	10 µM	4	0,8 µM
<i>Primer F</i>	10 µM	4	0,8 µM
ADN	50 ng/µL	1	1 ng/µL
<i>Taq pol</i>	5 U/µL	0,2	1 U/µL

csp: cantidad suficiente para preparar.

El complejo *mec* clase C, comprende el complejo *mec* clase C₁ y *mec* clase C₂. Para poder detectar estos dos complejos se usaron dos pares de oligonucleótidos (Katayama y col., 2001) cuyas secuencias se describen en la Tabla 23. Se utilizaron como controles las cepas de *S. aureus* 57748 y 56432 (Di Gregorio y col., 2015), los cuales son aislamientos clínicos de *S. aureus* con este tipo de complejo *mec*.

Tabla 23. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la amplificación del complejo *mec* clase C.

Tipo de complejo <i>mec</i>	Secuencias (5' - 3')	Tamaño amplicón (pb)
<i>mec</i> clase C ₁	mA6: TATACCAAACCCGACAAC Is1: ACATTAGATATTTGGTTGCGT	1 566
<i>mec</i> clase C ₂	mA6: TATACCAAACCCGACAAC Is2: TGAGGTTATTCAGATATTTTCGATGT	803

Protocolo de ciclado

94°C.....5 min
 94°C.....1 min
 50°C.....1 min
 72°C.....1 min
 72°C.....10 min

} 30 ciclos

2.4- Tipificación mediante secuenciación de múltiples loci (*Multilocus Sequence Typing*): MLST

La técnica de tipificación molecular MLST es altamente discriminatoria para caracterizar aislamientos bacterianos. Se basa en la secuenciación de un fragmento interno de 7 genes conservados, denominados *housekeeping*, que proveen un perfil alélico para cada aislamiento bacteriano. Este perfil alélico define un determinado secuenciotipo (ST). Un grupo de aislamientos que tienen secuencias idénticas de los 7 genes *housekeeping* son asignados con un mismo ST. Un grupo de aislamientos que tienen secuencias idénticas de al menos 5 genes *housekeeping* pertenecen a un mismo complejo clonal (CC).

Se aplicó MLST a 8 aislamientos representativos de los distintos tipos clonales detectados por PFGE. Solo se llevó a cabo en las cepas parentales de los tipos clonales elegidos, debido a que las mutantes seleccionadas resultaron ser isogénicas a sus respectivas cepas parentales, por lo tanto se asume que tendrán el mismo ST.

Se amplificaron, purificaron y secuenciaron fragmentos de los 7 genes metabólicos descritos en la base de datos de MLST para *S. aureus*: *arcC* (Carbamato quinasa), *aroE* (Shikimato deshidrogenasa), *glpF* (Glicerol quinasa), *gmk* (Guanilato quinasa), *pta* (Fosfato acetiltransferasa), *tpi* (Triosafosfatoisomerasa), *yqiL* (Acetil coenzima A acetiltransferasa). Para la amplificación de los genes por PCR, se utilizaron los oligonucleótidos descritos para este fin por Enright y col. (Enright y col., 2000) (Tabla 24).

Se preparó la siguiente mezcla de reacción para un volumen final de 25 μL .

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (μL)	Concentración final
H ₂ O milliQ	-	12,55	csp 25 μL
<i>Buffer</i>	10 X	2,5	1 X
MgCl ₂	25 mM	2,5	2,5 mM
dNTP	10 mM	1,25	500 μM
<i>Primer R</i>	10 μM	2,5	1 μM
<i>Primer F</i>	10 μM	2,5	1 μM
ADN	50 ng/ μL	1	2 ng/ μL
<i>Taq pol</i>	5 U/ μL	0,2	1 U/ μL

csp: cantidad suficiente para preparar.

Se colocaron 24 μL de la mezcla de reacción en cada tubo de PCR y se agregó 1 μL de ADN. Se siguió el siguiente protocolo de ciclado teniendo en cuenta que para los genes *arcC* y *tpi*, la temperatura de *annealing* usada fue de 50°C, y para los genes *pta*, *glpF*, *aroE*, *yqiL*, *gmk* se usó una temperatura de *annealing* de 55°C.

Protocolo de ciclado

95°C.....5 min

95°C.....1 min

50°C.....30 seg

72°C.....30 seg

72°C.....10 min

30 ciclos

Tabla 24. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes de MLST.

Gen	Oligonucleótidos	Secuencias (5' - 3')	Tamaño de amplicón (pb)
<i>arcC</i>	<i>arcC</i> -up	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC	456
	<i>arcC</i> -dn	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	
<i>aroE</i>	<i>aroE</i> -up	ATCGGAAATCCTATTTACATTC	456
	<i>aroE</i> -dn	GGTGTGTATTAATAACGATATC	
<i>glpF</i>	<i>glpF</i> -up	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC	465
	<i>glpF</i> -dn	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	
<i>gmk</i>	<i>gmk</i> -up	ATCGTTTTATCGGGACCATC	429
	<i>gmk</i> -dn	TCATTA ACTACAACGTAATCGTA	
<i>pta</i>	<i>pta</i> -up	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG	474
	<i>pta</i> -dn	GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA	
<i>tpi</i>	<i>tpi</i> -up	TCGTTCAATTCTGAACGTCGTGAA	402
	<i>tpi</i> -dn	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC	
<i>yqiL</i>	<i>yqiL</i> -up	CAGCATA CAGGACACCTATTGGC	516
	<i>yqiL</i> -dn	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	

Purificación y secuenciación

Los productos de amplificación se purificaron utilizando el Kit comercial *AccuPrep* (Bioneer, Argentina), siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, los productos purificados fueron enviados para su secuenciación al servicio MacroGen, en Korea.

Análisis de secuencias y determinación del secuenciotipo

El análisis y ensamblaje de las secuencias obtenidas se llevó a cabo mediante el *software* Vector NTI 11.0. Las secuencias resultantes se alinearon con las secuencias correspondientes a cada gen, las cuales se encuentran publicadas en la base de datos de MLST para determinar la longitud exacta del fragmento que se debe utilizar para la tipificación por MLST.

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

2.5- Tipificación mediante determinación del polimorfismo del gen *spa*

Se realizó la amplificación, purificación y secuenciación de la región polimórfica X del gen *spa*, que codifica para la proteína A de *S. aureus*. Esta región contiene un número variable de secuencias repetitivas de aproximadamente 24 pares de bases y es utilizado como un método eficiente para la tipificación de aislamientos, tanto como marcador en epidemiología local como global (Hallin y col., 2007; Harmsen y col., 2003). Se realizó esta determinación en los 12 aislamientos parentales estudiados, asumiendo que sus respectivas SARTm, al ser isogénicas, poseen el mismo tipo de polimorfismo del gen *spa*.

Se preparó la siguiente mezcla de reacción para un volumen final de 50 μ L.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (μ L)	Concentración final
H ₂ O milliQ	-	26,8	csp 50 μ L
<i>Buffer</i>	10 X	5	1 X
MgCl ₂	25 mM	5	2,5 mM
dNTP	10 mM	2	400 μ M
<i>spa</i> -1113f	10 μ M	5	1 μ M
<i>spa</i> -1514r	10 μ M	5	1 μ M
ADN	50 ng/ μ L	1	1 ng/ μ L
<i>Taq</i> pol	5 U/ μ L	0,2	1 U/ μ L

csp: cantidad suficiente para preparar.

Se colocaron 49 μ L de la mezcla de reacción en cada tubo de PCR y se agregó 1 μ L de ADN. Se siguió el siguiente protocolo de ciclado y se utilizaron los oligonucleótidos descritos en la Tabla 25.

Protocolo de ciclado

95°C.....5 min
 95°C.....45 seg
 58°C.....45 seg
 72°C.....1 min 30 seg
 72°C.....10 min

} 30 ciclos

Tabla 25. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la región polimórfica del gen *spa*.

Oligonucleótidos	Secuencias (5' - 3')	Tamaño de amplicón (pb)
<i>spa</i> -1113f	TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC	450
<i>spa</i> -1514r	CAGCAGTAGTGCCGT TTGCTT	

Secuenciación y análisis de secuencias

Posteriormente, los productos amplificados fueron purificados y secuenciados. Los datos obtenidos de las secuencias resultantes se analizaron a través de la base de datos <http://www.ridom.de/spaserver>, para obtener el tipo de *spa*.

2.6- Tipificación genotípica del locus *agr*

El locus *agr* posee una región polimórfica (*agrC* y *agrD*) que ha permitido diferenciar 4 tipos alélicos de *agr* (*agr* tipo I a IV), que sirven como una herramienta más para llevar a cabo la genotipificación de aislamientos de *S. aureus*. El tipo de grupo de *agr* se determinó en todos los aislamientos, mediante la PCR múltiple descrita por Gilot y col. (Gilot y col., 2002).

Se preparó la siguiente mezcla de reacción para un volumen final de 25 μL .

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (μL)	Concentración final
H ₂ O milliQ	-	12	csp 50 μL
<i>Buffer</i>	10 X	2,5	1 X
MgCl ₂	25 mM	5	5 mM
dNTP	10 mM	0,5	200 μM
<i>pan</i>	10 μM	0,75	0,3 μM
<i>agr1</i>	10 μM	0,75	0,3 μM
<i>agr2</i>	10 μM	0,75	0,3 μM
<i>agr3</i>	10 μM	0,75	0,3 μM
<i>agr4</i>	10 μM	0,75	0,3 μM
ADN	50 ng/ μL	1	1 ng/ μL
<i>Taq pol</i>	5 U/ μL	0,25	1,25 U/ μL

csp: cantidad suficiente para preparar.

Se colocaron 24 μL de la mezcla de reacción en cada tubo de PCR y se agregó 1 μL de ADN. Se siguió el siguiente protocolo de ciclado y se utilizaron los oligonucleótidos descritos en la Tabla 26. Se usaron como control, las cepas provenientes de NARSA (*Network on antimicrobial resistance in Staphylococcus aureus*).

Protocolo de ciclado

94°C.....5 min

94°C.....30 seg

55°C.....30 seg

72°C.....1 min

72°C.....10 min

26 ciclos

Tabla 26. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las regiones del locus *agr* que definen los distintos grupos.

Grupo <i>agr</i>	Oligo-nucleótidos	Secuencias (5' - 3')	Tamaño amplicón (pb)	Cepa control
I	<i>pan</i>	ATGCACATGGTGCACATGC	441	NRS 384
	<i>agr1</i>	GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT		
II	<i>pan</i>	ATGCACATGGTGCACATGC	575	NRS 156
	<i>agr2</i>	TATTACTAATTGAAAAGTGGCCATAGC		
III	<i>pan</i>	ATGCACATGGTGCACATGC	323	NRS 123
	<i>agr3</i>	GTAATGTAATAGCTTGTATAATAATACCCAG		
IV	<i>pan</i>	ATGCACATGGTGCACATGC	659	NRS 153
	<i>agr4</i>	CGATAATGCCGTAATACCCG		

2.7- Caracterización fenotípica de la funcionalidad del locus *agr*

El locus *agr* (gen regulador accesorio) es un regulador transcripcional que controla la expresión de genes codificantes de proteínas asociadas a virulencia en *S. aureus*. Está constituido por los promotores P₂ y P₃. El promotor P₃ dirige la transcripción de RN_{III}, y junto con ésta, la de la δ -hemolisina. De esta manera, de la observación de la producción de ésta δ -hemolisina se puede analizar la funcionalidad del locus *agr*.

La funcionalidad del locus *agr* se evaluó mediante la observación de la expresión de δ -hemolisina en agar sangre de carnero (Traber y col., 2008). A partir de cultivos de 24 h de incubación, se realizó una suspensión de cada aislamiento correspondiente a 0,5 Mc Farland en solución fisiológica estéril. Se realizó una estría central de la cepa *S. aureus* RN 4220 en agar sangre de carnero, y de manera perpendicular a ésta se depositaron en forma de estrías los aislamientos a ensayar. Se incubó a 37°C durante 24 h y se observó la actividad hemolítica producida. La cepa RN 4220 produce sólo β -hemolisina actuando sinérgicamente frente a la δ -hemolisina de la cepa evaluada produciendo así una zona de mayor hemólisis. A su vez, inhibe la producción de α -hemolisina. Como control negativo se usó la cepa *S. aureus* N315, la cual no produce hemólisis.

RESULTADOS

2.1- Amplificación del gen *mecA*

La amplificación del gen *mecA*, que codifica la resistencia a meticilina, se llevó a cabo en los aislamientos parentales y mutantes resistentes a TIG, tanto de SARM como SASM para confirmar este fenotipo de resistencia o sensibilidad a meticilina.

Para los 5 aislamientos de SARM y sus correspondientes SARTm se obtuvo el amplicón esperado de 550 pb (Figura 17 A, calles 1 a 10). Por el contrario, para los 7 aislamientos de SASM y sus respectivos SARTm, como era de esperar, no se obtuvo amplificación del gen *mecA* (Figura 17 A, calle 11 y 12; Figura 17 B, calles 1 a 12), confirmando que estos aislamientos sensibles a meticilina no son portadores del gen *mecA*.

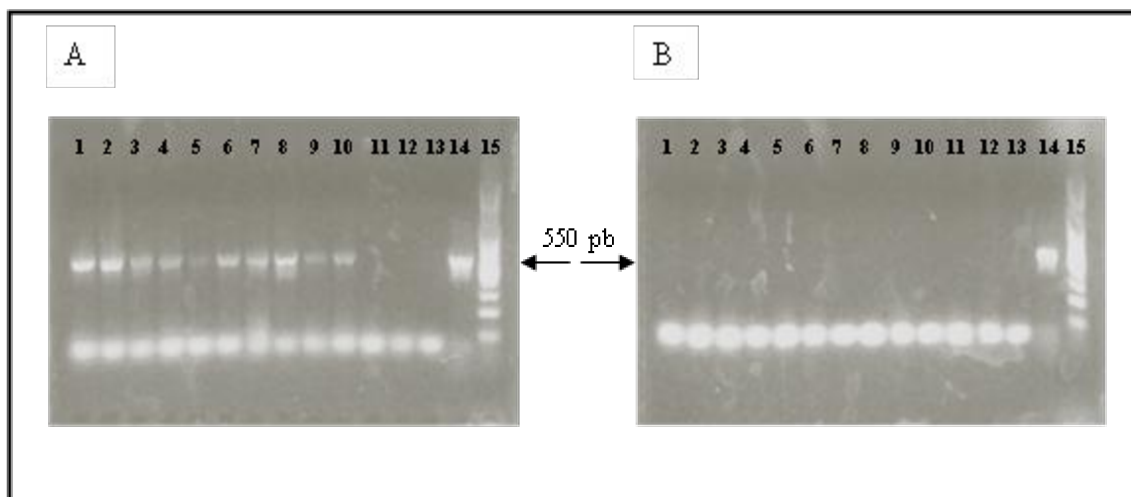


Figura 17. PCR gen *mecA*. A) Calles: 1: 497p, 2: 497m, 3: 2028p, 4: 2028m, 5: 94159p, 6: 94159m, 7: 74016p, 8: 74016m, 9: 4261p, 10: 4261m, 11: 54081p, 12: 54081m, 13: control negativo, 14: control positivo, 15: marcador de peso molecular 100-1000 pb. B) Calles: 1: 74073p, 2: 74073m, 3: 14069p, 4: 14069m, 5: 34076p, 6: 34076m, 7: 34204p, 8: 34204m, 9: 44213p, 10: 44213m, 11: 34023p, 12: 34023m, 13: control negativo (*S. aureus* ATCC 29213), 14: control positivo (*S. aureus* ATCC 43300), 15: marcador de peso molecular 100-1000 pb.

2.2- Determinación del tipo de casete SCCmec

La determinación del tipo de casete SCCmec se llevó a cabo en todos los aislamientos de SARM y sus SARTm, por combinación de la determinación del tipo de complejo *ccr* y de complejo *mec* que poseen los aislamientos (Tabla 27).

Del total de 5 aislamientos de SARM y sus SARTm, 3 poseen SCCmec tipo IV y 1 contiene SCCmec III. Un aislamiento no se pudo tipificar con las reacciones de PCR realizadas.

Tabla 27. Tipificación del SCCmec presente en los aislamientos de SARM parentales y mutantes resistentes a TIG.

Aislamientos	Complejo <i>ccr</i>	Complejo <i>mec</i>	SCCmec
497 p/m	AB2	B	IV
2028 p/m	AB3	A	III
94159 p/m	AB2	B	IV
74016 p/m	NT	NT	NT
4261 p/m	AB2	B	IV

p: parental, m: mutante, NT: no tipable.

2.3- Tipificación genotípica mediante PFGE, MLST, polimorfismos del gen *spa* y grupo *agr*

En la Tabla 28 se encuentran descriptos los resultados de la caracterización genotípica de los aislamientos. Los aislamientos parentales y mutantes resistentes a TIG seleccionados *in vitro* compartieron las mismas características genotípicas evaluadas. Por esta razón los números de los aislamientos mostrados en la tabla no se diferenciaron como parentales y mutantes.

Una de las características genotípicas tenidas en cuenta fueron los pulsotipos obtenidos por PFGE. Como puede verse en la Tabla 28, se observaron 8 pulsotipos, 3 de ellos con subtipos, es decir que mostraban diferencias de 3 bandas o menos en el patrón de restricción electroforético.

La tipificación mediante MLST se llevó a cabo en 8 aislamientos representativos de los distintos tipos clonales detectados por PFGE. Esto permitió asignar un ST a cada cepa en estudio, tanto parentales como mutantes resistentes a TIG seleccionadas *in vitro*. En la Tabla 28, se muestran los perfiles alélicos y ST de cada uno de los aislamientos, así como también se describe el CC al que pertenece cada ST. Se obtuvieron 7 ST diferentes, pertenecientes a 6 CC distintos. El ST que se encontró con mayor frecuencia en los aislamientos estudiados fue el ST 188 (3/12).

La región polimórfica X del gen *spa* contiene un número variable de repeticiones, que permiten asignar un determinado tipo de *spa* a cada aislamiento, según el orden específico de estas repeticiones. En la Tabla 28, se encuentran descritas las repeticiones encontradas y el tipo de *spa* para cada aislamiento en estudio.

Los tipos de *spa* más frecuentemente encontrados en los aislamientos estudiados fueron el t002 y t189.

Por otro lado, también se llevó a cabo la caracterización del grupo *agr* presente en los aislamientos. El grupo I de *agr* se encontró con mayor frecuencia (7/12 aislamientos), seguido por el grupo II (4/12), mientras que sólo un aislamiento perteneció al grupo III. Ningún aislamiento presentó *agr* tipo IV.

Los aislamientos pertenecientes al pulsotipo A₁ y A₂ presentan el mismo ST y grupo *agr*, pero se diferenciaron en el tipo de *spa*. Los aislamientos correspondientes al pulsotipo E₁ y E₂, también tienen el mismo ST y grupo *agr* pero diferente tipo de *spa*. Los aislamientos que presentaron pulsotipo G₁, G₂ y G₃ comparten las mismas características genotípicas, ya que tienen el mismo ST, grupo *agr* y tipo de *spa*. Por otra parte, los aislamientos que pertenecen a los pulsotipos C y D, si bien presentaron diferente patrón de PGFE, comparten el resto de las características genotípicas evaluadas. Si se observa la imagen del gel de agarosa con los perfiles electroforéticos obtenidos por PFGE para estas cepas (Figura 15, Capítulo 1), podría decirse que tienen un patrón de restricción muy similar, pero al hacer el análisis minucioso de las bandas de cada cepa, resulta que poseen diferencias de más de 3 bandas, por lo que se les asignó diferentes pulsotipos.

Tabla 28. Caracterización genotípica de los aislamientos mediante PFGE, MLST, *spa* y grupo *agr*.

Cepas	PT	MLST							Tipificación <i>spa</i>			<i>agr</i>	
		Perfil alélico							ST	CC	Repeticiones		<i>spa</i>
		<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqiL</i>					
497	A ₁	1	4	1	4	12	1	10	5	5	r26-r23-r17-r34-r20-r17-r12-r17-r16	t311	II
2028	B	2	3	1	1	4	4	3	239	8	r15-r12-r16-r02-r25-r16-r17-r24	t654	I
94159	A ₂	1	4	1	4	12	1	10	5	5	r26-r23-r17-r34-r17-r20-r17-r12-r17-r16	t002	II
74016	C	1	65	1	4	12	1	10	100	5	r26-r23-r17-r34-r17-r20-r17-r12-r17-r16	t002	II
4261	D	1	65	1	4	12	1	10	100	5	r26-r23-r17-r34-r17-r20-r17-r12-r17-r16	t002	II
54081	E ₁	10	14	8	6	10	3	2	45	45	r09-r02-r16-r34-r34-r17-r34-r16-r34	t330	I
74073	F	12	4	1	4	12	1	3	6	6	r11-r10-r21-r17-r34-r24-r34-r22-r25-r25	t701	I
14069	G ₁	3	1	1	8	1	1	1	188	1	r07-r23-r12-r21-r17-r34	t189	I
34076	E ₂	10	14	8	6	10	3	2	45	45	r08-r16-r02-r16-r34	t230	I
34204	G ₂	3	1	1	8	1	1	1	188	1	r07-r23-r12-r21-r17-r34	t189	I
44213	H	2	2	2	2	6	3	2	30	30	r15-r12-r16-r02-r16-r02-r25-r17-r24	t021	III
34023	G ₃	3	1	1	8	1	1	1	188	1	r07-r23-r12-r21-r17-r34	t189	I

PT: pulsotipo, ST: secuenciotipo, CC: complejo clonal.

2.4- Caracterización fenotípica de la funcionalidad del locus *agr*

Se realizó el ensayo de funcionalidad del locus *agr*, comparando los comportamientos de los aislamientos parentales y las cepas mutantes resistentes a TIG. En sólo una de las cepas mutantes se observó diferente expresión de la δ -hemolisina con respecto al correspondiente aislamiento parental. En esta cepa mutante (94159m), la cual posee *agr* tipo II, se produjo la pérdida de la expresión de la δ -hemolisina, lo que se puede observar en la Figura 18 como la pérdida de la punta de flecha que muestra la hemólisis correspondiente a la cepa parental. Se recuerda que en ésta cepa además de la disminución en la sensibilidad a TIG se evidenció un cambio en la CIM de VAN, la cual aumentó 4 veces, adquiriendo el fenotipo de una cepa VISA.

El resto de las cepas evaluadas mediante este ensayo mostraron el mismo tipo de hemólisis con sus correspondientes cepas mutantes resistentes a TIG. En dos cepas (4261 y 34076) no se observó expresión fenotípica de la δ -hemolisina (ausente tanto en las cepas parentales, como en las mutantes seleccionadas). A modo de ejemplo, en la Figura 18 se muestra la imagen obtenida para la cepa 34076 (sin hemólisis) y la imagen de la hemólisis producida por una de las cepas en las cuales no se observaron cambios entre parentales y mutantes resistentes seleccionadas.

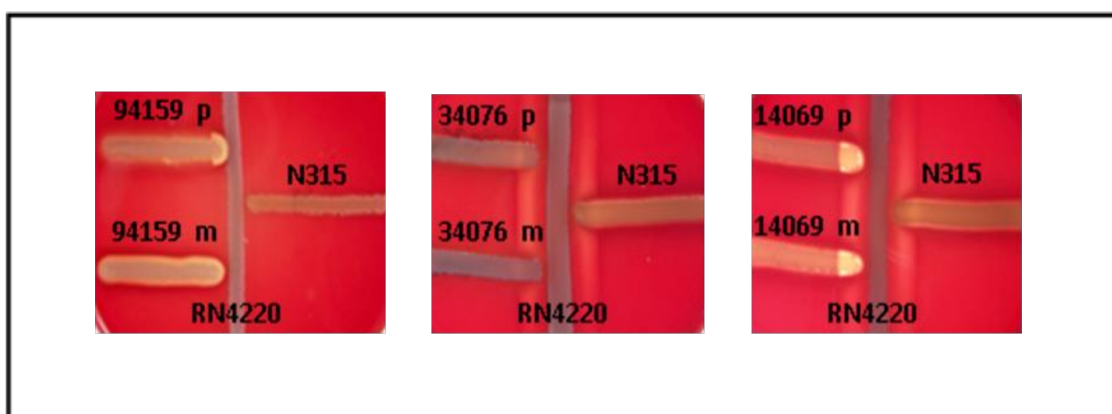


Figura 18. Ensayo de funcionalidad del locus *agr*. Los números sobre la figura corresponden a las cepas ensayadas.

DISCUSIÓN

La caracterización genotípica de los aislamientos parentales de *S. aureus* y sus correspondientes mutantes resistentes a TIG seleccionados *in vitro*, se llevó a cabo mediante determinación del tipo de casete SCC*mec*, PFGE, MLST, tipificación del tipo *spa* y del grupo *agr*.

Todos los aislamientos de SARM estudiados fueron positivos para el gen *mecA* y, por otra parte y, como era de esperar, ninguno de los aislamientos de SASM dio positiva la reacción de PCR para este gen. Si bien esta distinción entre SARM y SASM en función de la presencia del gen *mecA* está muy bien aceptada, existen casos documentados donde no siempre es así. Se han reportado casos de aislamientos de *S. aureus* que son sensibles a la meticilina pero portadores del gen *mecA* (Sharff y col., 2012) y, por otro lado se ha demostrado también la existencia de aislamientos de SARM que poseen un gen *mecA* divergente que da negativa la reacción de amplificación por PCR convencional y ha sido denominado gen *mecC* (Shore y col., 2011; Ito y col., 2012).

De los 5 SARM que seleccionaron mutantes resistentes a TIG, 3 poseen un casete SCC*mec* tipo IV (497, 94159 y 4261), el cual está asociado a los aislamientos de SARM provenientes de la comunidad (SARM-AC). Un aislamiento (2028) fue caracterizado con un SCC*mec* tipo III, que se asocia a los aislamientos de origen hospitalario (SARM-AH). Por último, el SCC*mec* del aislamiento 74016 no fue tipificable mediante las reacciones de PCR utilizadas. Con respecto a esto, se han documentado casos de aislamientos del mismo ST y tipo de *spa* (ST100, *t002*) que el aislamiento de este trabajo, en donde no puede tipificarse su SCC*mec* mediante reacciones de PCR convencionales, debido a la existencia de reordenamientos genéticos dentro del complejo *mec*. Este tipo de SCC*mec* denominado NV (*new variant*), está relacionado genéticamente con el SCC*mec* IV, aunque carece de elementos típicos presentes en otros SCC*mec* descritos (Sola y col., 2006).

Teniendo en cuenta el patrón de sensibilidad antibiótica, y el tipo de *SCCmec* determinado en los SARM, se pudo observar una concordancia con el hecho de que el *SCCmec* tipo III, al igual que el tipo I, se encuentra asociado con un mayor espectro de resistencia a los antibióticos e involucra microorganismos multirresistentes. El aislamiento 2028, como se muestra en los resultados del Capítulo 1, presentó resistencia a todos los antibióticos ensayados con excepción de VAN y TIG, siendo éstos los únicos antibióticos para los que este aislamiento fue sensible.

Por otra parte, los aislamientos que tienen casete *SCCmec* IV, como se ha descrito para los SARM-AC, presentan un perfil más amplio de sensibilidad antibiótica, mostrando en algunos casos resistencia a CIP, GEN y RIF.

Mediante el análisis por PFGE de las 12 cepas de SARTm y sus parentales se obtuvieron 8 pulsotipos diferentes, algunos de ellos con subtipos. Las tres cepas con *SCCmec* IV (497, 94159 y 4261), presentaron perfiles de bandas de PFGE similares al correspondiente clon de la comunidad utilizado como control, aunque no idénticos. La cepa 497 y 94159 pertenecen al mismo pulsotipo A, pero a diferentes subtipos (A₁ y A₂ respectivamente), mientras que la cepa 4261 fue asignada con otro pulsotipo diferente (D) por tener más de 3 bandas de diferencia.

Se llevó a cabo también la tipificación mediante MLST para determinar los linajes de las distintas cepas y relacionarlo con los clones prevalentes. En este caso se obtuvieron 7 ST diferentes, pertenecientes a 6 CC.

Del análisis mediante técnicas de tipificación molecular, surge que las infecciones por SARM están causadas por unos pocos clones epidémicos, que se agrupan dentro de cinco principales CC (CC5, CC8, CC22, CC30 y CC45), los cuales muestran la propiedad de propagarse rápidamente por todo el mundo, causando infecciones tanto nosocomiales, como de inicio en la comunidad. Por otra parte, los aislamientos de SARM se agrupan dentro de un número más variable de CC, si bien también se los puede encontrar formando parte de los CC antes mencionados (Enright y col.,2002). Esto concuerda con lo obtenido en este trabajo de tesis, donde 4/5 aislamientos de SARM pertenecen al CC5 (ST5 y ST100) y uno pertenece al CC8 (ST239). Los aislamientos de SARM pertenecen a otros CC, como el CC1 (ST188, que incluyó 3

aislamientos), el CC45 (ST45, con 2 aislamientos), el CC6 (ST6) y CC30 (ST30) con un aislamiento incluido en cada complejo.

En este trabajo, la mayoría de los aislamientos que fueron asignados a un mismo ST, pertenecen a un mismo pulsotipo de PFGE aunque se le hayan asignado distintos subtipos.

Dos aislamientos (74016 y 4261) fueron asignados a distintos pulsotipos (C y D) por PFGE, pero al realizar MLST, se pudo ver que comparten el mismo ST y son considerados pertenecientes al mismo clon por ésta técnica. Se ha sugerido que la rápida acumulación de variaciones genéticas que surgen en los aislamientos durante su evolución, puede modificar los patrones de bandas resultantes de la digestión con *Sma*I, por lo que lleva a diferenciar cepas de un mismo ST como pertenecientes a clones diferentes (Enright y col., 2002). Confirmando que pertenecen al mismo ST, estos dos aislamientos también compartieron el mismo tipo de *spa* (*t002*) y grupo *agr* (II).

El análisis mediante secuenciación de la región polimórfica X del gen *spa*, que codifica para la proteína A en *S. aureus* constituye una técnica muy utilizada de tipificación molecular.

La tipificación mediante el tipo de gen *spa* dio resultados más variables que por MLST. Aislamientos como el 497 y 94159 que pertenecen al mismo ST y grupo *agr*, y que además fueron incluidas en el mismo pulsotipo de PFGE pero en distintos subtipos, presentaron distinto tipo de *spa* (*t311* y *t002*, respectivamente); dónde la diferencia estuvo dada por sólo una repetición. Algo similar ocurrió con dos aislamientos de SASM pertenecientes al ST45 (54081 y 34076), pero que pertenecían a distintos subtipos del pulsotipo E (E₁ y E₂), y presentaron distinto tipo de *spa* (*t330* y *t230*).

Mientras que otras aislamientos, como el 14069, 34204 y 34023, pertenecientes al ST 188, presentaron además, el mismo tipo de *spa* (*t189*) e igual grupo *agr* (I) y fueron asignados a distintos subtipos del mismo pulsotipo G (G₁, G₂ y G₃).

Esta variabilidad observada en cepas del mismo ST y diferente *spa* tipo y/o patrón de PFGE, se asocia con las características propias de las diferentes herramientas de tipificación molecular, y fueron también destacadas en trabajos como el realizado por Hallin y col. (Hallin y col., 2007), donde se compararon estas técnicas entre sí. Allí, se

sugiere que el caso de aislamientos con el mismo ST pero distinto tipo de *spa* podría tener que ver con recombinaciones intragenómicas dentro del locus *spa*, que darían lugar a la asignación de distintos tipos.

Los aislamientos de *S. aureus* se han incluido dentro de cuatro grupos según los polimorfismos presentes en el locus *agr*, y esto se utiliza como una herramienta más de tipificación genotípica (Gilot y col., 2002). En este trabajo, la mayoría de los aislamientos poseen un *agr* tipo I (7/12), seguido por el *agr* tipo II (4/12), mientras que sólo una cepa presenta *agr* tipo III y no se observó ninguna con *agr* tipo IV. Resultados similares en cuanto a la distribución de los distintos grupos de *agr* se han visto en otros trabajos, donde también se ha encontrado una mayor proporción de aislamientos pertenecientes al *agr* tipo I, seguido del tipo II (Gilot y van Leeuwen, 2004; Traber y col., 2008).

Los aislamientos 497 y 94159 tuvieron cambios en la sensibilidad a otros antibióticos como consecuencia de la presión selectiva ejercida por TIG. Sus características genotípicas (ST5, CC5, SCC*mec* IV, *agr* tipo II) están relacionadas con aquellas del principal clon de SARM-AC que circulaba en la Argentina en el período de tiempo comprendido entre 2004 y 2006; en el que los aislamientos en estudio fueron recolectados (Sola y col., 2006; Gardella y col., 2008).

El CC5 posee una elevada habilidad para adquirir nuevos determinantes de resistencia y una gran capacidad para sobrevivir en diferentes ambientes, que ha sido asociada a su gran plasticidad genómica. La mayoría de los aislamientos de h-VISA, VISA y VRSA corresponden a este linaje genético (Howe y col., 2004; Kos y col., 2012). Así mismo, la emergencia de aislamientos de h-VISA pertenecientes al CC5 ha sido recientemente reportada en la Argentina (Di Gregorio y col., 2015).

El aislamiento 2028 (ST239, SCC*mec* III, *spa* t654), pertenece al clon brasilero, el cual es un clon multirresistente de SARM-AH y fue uno de los clones más prevalentes en las infecciones nosocomiales durante varios años en Argentina (Sola y col., 2006; Da Silva Coimbra y col., 2000).

Una forma muy utilizada de evaluar la funcionalidad del locus *agr* es mediante el análisis de la expresión de la δ -hemolisina. La pérdida de la expresión de la δ -hemolisina, se asocia con la falta de funcionalidad de este locus y, se ha visto que está

involucrada en la persistencia de las infecciones como las bacteriemias. Este fenómeno, cuando está presente en los aislamientos clínicos de *S. aureus*, se encuentra relacionado con una mayor habilidad para adherirse al poliestireno, permitiendo de esta manera, una mejor formación de *biofilm* (Fowler y col., 2004; Sakoulas y col., 2002).

En este trabajo, se llevó a cabo el ensayo de funcionalidad del locus *agr* y la única cepa de SARTm que presentó la pérdida de la expresión de la δ -hemolisina, con respecto a su aislamiento parental, fue la cepa 94159m. Esta cepa tiene *agr* tipo II y presentó la característica de disminuir la sensibilidad a VAN, adquiriendo un fenotipo VISA. Los datos publicados sugieren la existencia de una relación entre la pérdida de la funcionalidad del locus *agr* y un incremento en la CIM de VAN, lo que ha sido detectado en una variedad de aislamientos VISA. El mecanismo de esta relación continúa sin esclarecerse ya que si bien se ha sugerido que podría deberse a la existencia de mutaciones que afectan el locus *agr*, existen también cepas VISA con pérdida de la funcionalidad del locus, que no presentan estas mutaciones (Howden y col., 2010). Otros autores han documentado un aumento en la transposición de la secuencia de inserción IS256 en una cepa VISA seleccionada luego de la exposición a VAN, en la cual la inserción de la IS256 se localizó en el locus *agr*, llevando a la pérdida de la expresión de la δ -hemolisina (Di Gregorio y col., 2016).

Este fenómeno además, parece ser común en diversas regiones geográficas y también se ha relacionado su aparición más frecuentemente en aislamientos de *S. aureus* que poseen *agr* tipo II, como es el caso de la cepa 94159m (Sakoulas y col., 2002).

Es interesante resaltar que 2 de los 12 aislamientos parentales analizados no presentaron ningún tipo de hemólisis al realizar el ensayo de funcionalidad del locus *agr*. Coincidiendo con esto, se ha observado la existencia de aislamientos de *S. aureus* que carecen de actividad hemolítica. Esto ha sido detectado tanto en aislamientos clínicos hospitalarios como en cepas de laboratorio. Un grupo de investigadores llevó a cabo un estudio más profundo de la funcionalidad del locus *agr* en este tipo de aislamientos sin actividad hemolítica y pudieron observar que el locus era aparentemente normal y funcional, a pesar de no presentar actividad hemolítica. En estos casos se detectaron mutaciones en el *agrA* (denominada mutación 8A), que no llegan a inactivar el locus, sino que hacen que la traducción del RNAIII se haga de

forma tardía, razón por la cual no hay producción de α ni δ -hemolisinas, resultando en un fenotipo no hemolítico (Traber y Novick, 2006).

Teniendo en cuenta las técnicas de tipificación genotípica descritas en este capítulo, se pudo detectar que la selección de mutantes de *S. aureus* resistentes a TIG se produjo en 7 linajes genotípicos diferentes, lo cual indica que este evento no está limitado a un solo tipo de fondo genético. De este modo, se pone en evidencia nuevamente la gran plasticidad genómica y la capacidad de adaptación que presenta esta especie bacteriana.

CAPÍTULO 3

**Evaluación de la eficiencia metabólica de los
aislamientos de *S. aureus* parentales y mutantes
resistentes a tigeciclina**

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1- Evaluación de la velocidad de crecimiento

Este ensayo se realizó por triplicado en todos los aislamientos de *S. aureus*, tanto parentales como sus correspondientes SARTm. Se partió de un cultivo de 16 h en caldo MH, se diluyó 1/1000 y se incubó a 37°C con agitación. Una vez alcanzada una DO a 620 nm de aproximadamente 0,1, se midió la DO cada media hora, durante un periodo de 4 h.

En cada punto de medición de DO, se realizó el recuento de células viables en placas de ATS por duplicado. Para esto, se realizaron diluciones decimales del caldo en tubos conteniendo solución fisiológica estéril, de manera de incluir la dilución que en la placa de recuento se puedan obtener entre 30-300 colonias. Se depositaron 100 µL de cada una de las diluciones en placas de ATS (por duplicado) y se esparció por toda la placa con espátula de Drigalsky. Estas placas se incubaron a 37°C durante 24 h, posteriormente se procedió al recuento de las colonias desarrolladas.

Se construyó una curva de crecimiento para cada aislamiento, graficando el logaritmo de UFC/mL en función del tiempo. Las pendientes de éstas curvas se compararon estadísticamente, utilizando análisis de pendientes por regresión lineal, con el programa *GraphPad Prism* versión 6.0. Se consideró la existencia de diferencias significativas en la velocidad de crecimiento entre parentales y mutantes si $p < 0,05$.

3.2- Evaluación de la frecuencia mutacional

Se partió de un cultivo de 16 h en caldo MH, se diluyó 1/1000 y se incubó a 37°C con agitación constante hasta alcanzar fase de crecimiento exponencial (DO_{620 nm} = 0,5-0,7). Se realizaron las diluciones correspondientes para poder hacer posteriormente los recuentos y se depositaron 100 µL en placas de ATS para el recuento de células viables totales. Además, se depositaron 100 µL de éste caldo y las diluciones en placas de agar

MH conteniendo CIP a una concentración correspondiente a 4 x CIM del aislamiento en estudio. También, se sembraron placas conteniendo RIF a una concentración de 100 µg/mL. Las placas de ATS se incubaron a 37°C por 24 h y las placas que contenían CIP y RIF se dejaron incubar hasta 48 h. Luego se realizaron los recuentos de las colonias desarrolladas. La frecuencia mutacional se calculó como el número de colonias desarrolladas en las placas con antibióticos con respecto al número total de células viables. Este ensayo se realizó por triplicado (O'Neill y col., 2001). Para el análisis estadístico comparativo se aplicó el test de *Student*, considerando como significativo un valor asociado a $p < 0,05$.

3.3- Ensayos de autólisis

A partir de cultivos *overnight* en caldo MH, se realizó una dilución 1/1000 y se incubó a 37°C en agitación hasta llegar a fase exponencial ($DO_{620\text{ nm}} = 0,5-0,7$). Las células se enfriaron sobre hielo durante 10 min y se centrifugaron a 5 000 rpm durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y el *pellet* se lavó dos veces con agua destilada fría para eliminar el medio de cultivo. Posteriormente, se resuspendió el *pellet* en *buffer* glicina 50 mM pH = 8,0 - Triton X-100 0,01% (ver en Anexos la composición del *buffer*), usando un volumen de modo que se alcance una $DO_{620\text{ nm}} = 1$ y se incubó en agitación a 37°C. La autólisis se evaluó como el descenso de la DO a 620 nm en función del tiempo. Se realizaron mediciones cada 30 min, durante 4 h. El ensayo se realizó por triplicado (Sieradzki y Tomasz, 2003b).

RESULTADOS

3.1- Evaluación de la velocidad de crecimiento

Se construyeron las curvas de crecimiento, teniendo en cuenta los recuentos de UFC/mL en función del tiempo (Figura 19). Este ensayo se realizó por triplicado y se obtuvieron los valores promedios de las pendientes de las curvas de crecimiento para cada aislamiento. En la Tabla 29 se muestran los valores promedios de las pendientes junto con el valor de p resultante del análisis de comparación de las pendientes entre aislamientos parentales y sus respectivos SARTm.

Como se puede observar, sólo dos cepas mutantes resistentes a TIG mostraron diferencias estadísticamente significativas en la velocidad de crecimiento con respecto a sus aislamientos parentales (497, $p = 0,0257$ y 4261, $p = 0,0011$), y en ambos casos las mutantes mostraron un crecimiento más lento que su respectiva cepa parental.

Durante la realización del ensayo, se pudo detectar en la mayoría de las cepas mutantes una mayor lentitud para alcanzar la DO de 0,1; la cual se tomó como punto de inicio para realizar las mediciones. Para evaluar la existencia de diferencias significativas entre todas las cepas parentales y todas las mutantes en este parámetro, se calculó el promedio y desviación estándar del tiempo necesario para alcanzar la DO de inicio y se aplicó el test de *Student* considerando un valor de $p < 0,05$ para indicar la existencia de diferencias estadísticamente significativas. Se obtuvo diferencia estadísticamente significativa entre las cepas parentales y mutantes resistentes a TIG, mostrando las cepas mutantes una mayor lentitud en alcanzar la DO de inicio (Tabla 30 y Figura 20).

Tabla 29. Promedios y desviación estándar de las pendientes de las curvas de crecimiento de cepas parentales y mutantes resistentes a TIG.

Cepas	Pendientes de las curvas de crecimiento	
	(X ± SD)	<i>p</i>
497 p	0,9751 ± 0,1089	0,0257
497 m	0,6080 ± 0,1103	
2028 p	0,4632 ± 0,0479	0,5357
2028 m	0,5082 ± 0,0533	
94159 p	0,6374 ± 0,0560	0,4690
94159 m	0,5417 ± 0,1206	
74016 p	0,5154 ± 0,0596	0,3690
74016 m	1,027 ± 0,5744	
4261 p	0,7520 ± 0,0550	0,0011
4261 m	0,3644 ± 0,0816	
54081 p	0,5876 ± 0,0773	0,2603
54081 m	0,4446 ± 0,0960	
74073 p	0,4913 ± 0,0733	0,4806
74073 m	0,5475 ± 0,0304	
14069 p	0,6141 ± 0,0703	0,9287
14069 m	0,6227 ± 0,0638	
34076 p	0,7377 ± 0,0667	0,9768
34076 m	0,7414 ± 0,1084	
34204 p	0,6084 ± 0,0956	0,6008
34204 m	0,5282 ± 0,1165	
44213 p	0,7249 ± 0,1499	0,2974
44213 m	0,5297 ± 0,1097	
34023 p	0,6100 ± 0,0717	0,3757
34023 m	0,7043 ± 0,0763	

X: promedio, SD: desviación estándar, p: parental, m: mutante. En color rojo se destacan los valores de *p* asociados a diferencias significativas entre cepas parentales y mutantes resistentes a TIG.

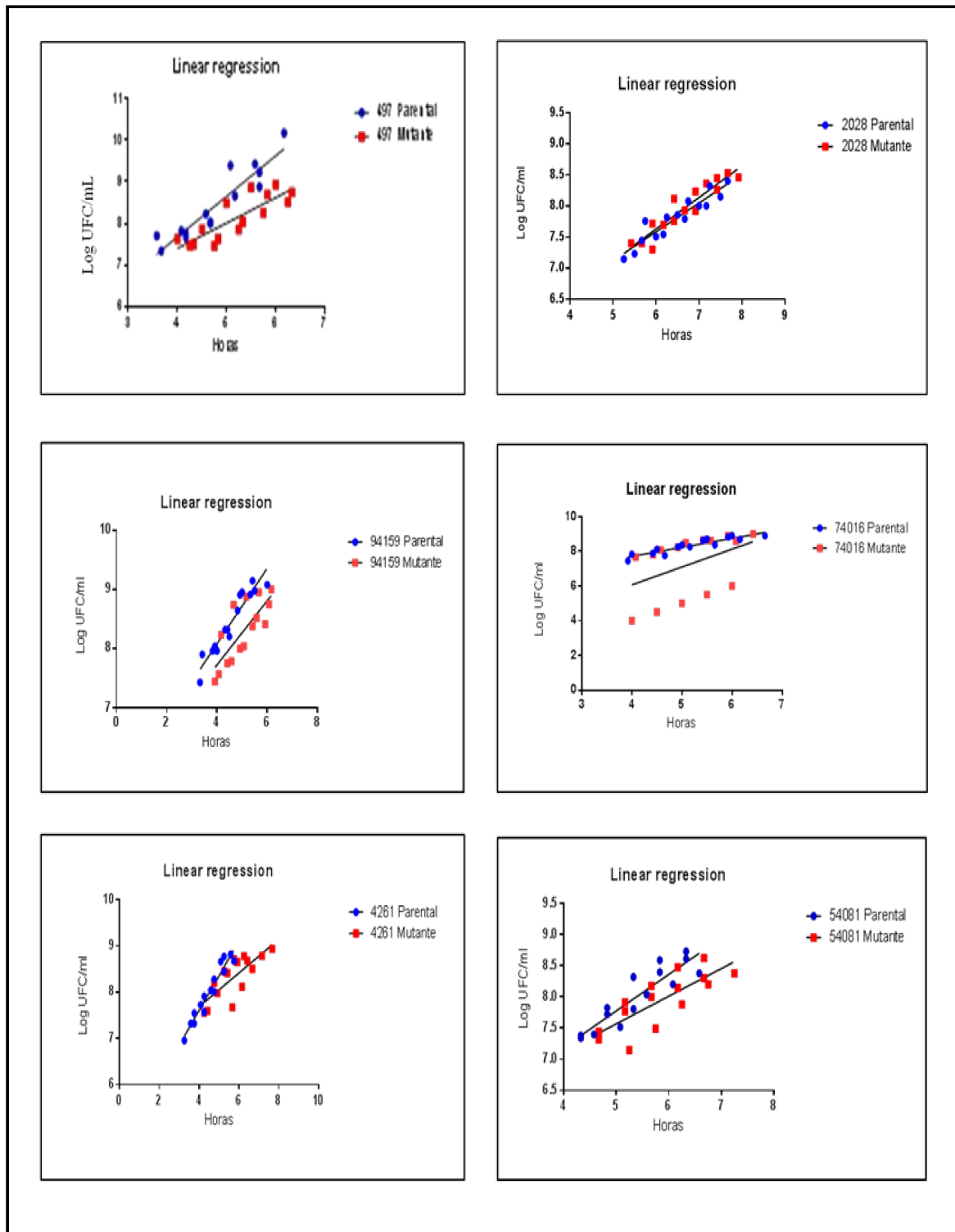


Figura 19. Curvas de crecimiento de cepas parentales y mutantes resistentes a TIG. Comparación de pendientes mediante análisis por regresión lineal.

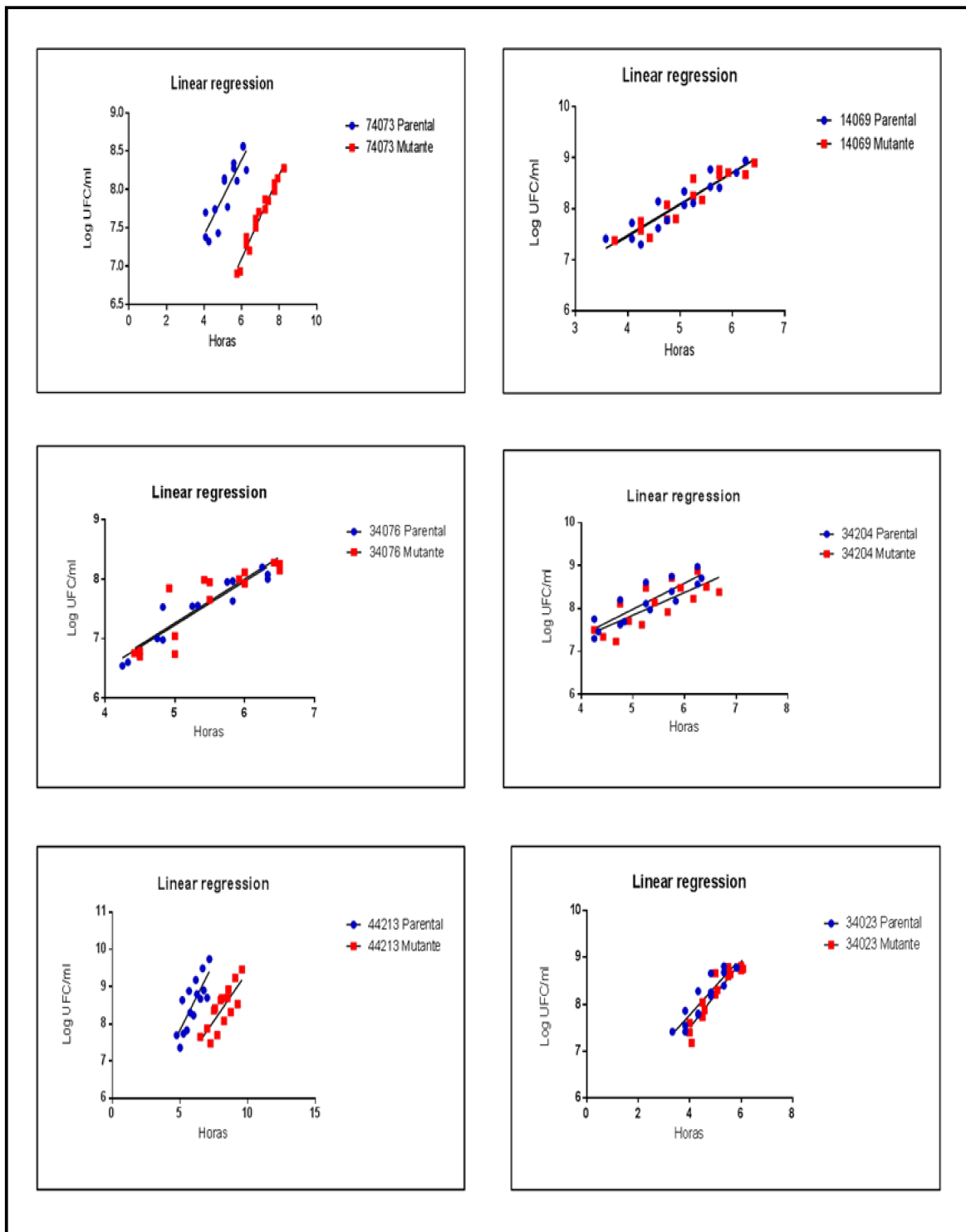


Figura 19. Curvas de crecimiento de cepas parentales y mutantes resistentes a TIG (continuación). Comparación de pendientes mediante análisis por regresión lineal.

Tabla 30. Promedios y desviación estándar del tiempo en alcanzar la DO de 0,1; en cepas parentales y mutantes resistentes a TIG.

Cepas	Tiempo en alcanzar DO de 0,1 (h)	
	(X ± SD)	<i>p</i>
Parentales	4,19 ± 0,57	0,0105
Mutantes	4,82 ± 0,95	

X: promedio, SD: desviación estándar.

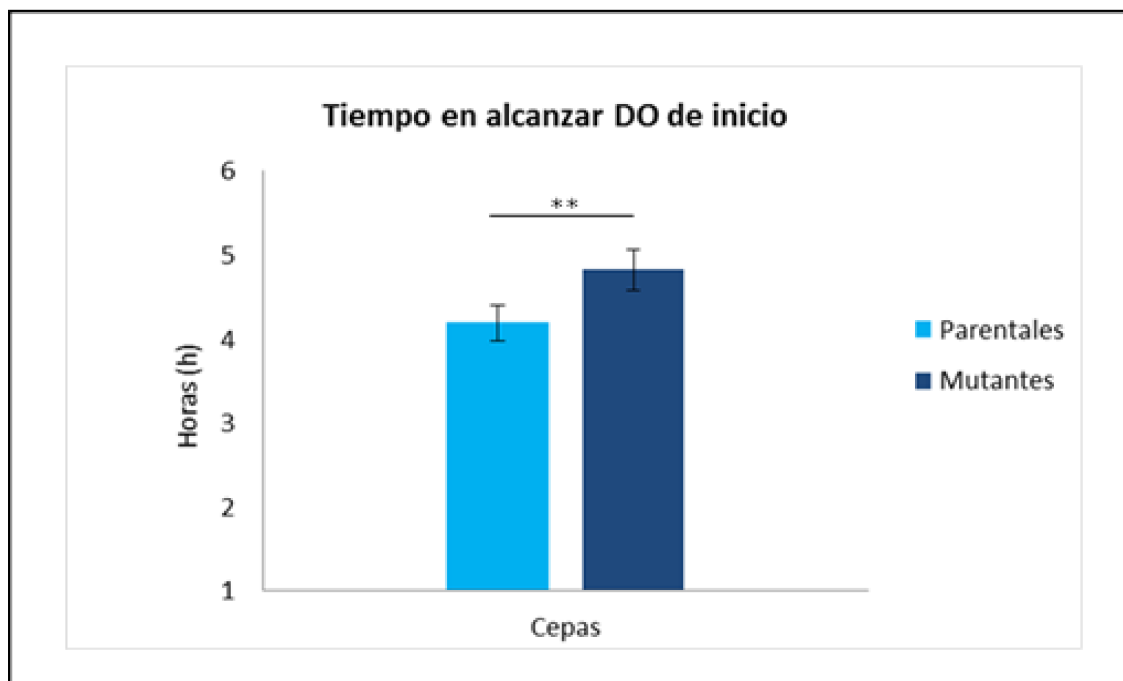


Figura 20. Tiempo en alcanzar la DO de inicio (0,1) para las cepas parentales y mutantes resistentes a TIG. ** $p = 0,0105$.

3.2- Evaluación de la frecuencia mutacional

Los ensayos para determinar la frecuencia de mutación fueron realizados por triplicado. En las placas que contenían CIP a una concentración correspondiente a 4 x CIM no se detectó crecimiento de colonias para ninguno de los aislamientos en estudio.

En las placas que contenían 100 µg/mL de RIF se obtuvo desarrollo de colonias y los resultados se expresaron como la media del número de colonias desarrolladas en las placas con RIF con respecto al número total de células viables. Para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los aislamientos parentales y sus SARTm se aplicó el test de *Student*, considerando un valor de $p < 0,05$.

Para los aislamientos parentales estudiados, el rango de frecuencia mutacional obtenido estuvo comprendido entre $1,13 \times 10^{-8}$ y $5,65 \times 10^{-7}$, mientras que para las cepas mutantes resistentes a TIG fue entre $1,27 \times 10^{-8}$ y $6,32 \times 10^{-7}$.

En ninguno de los SARTm estudiados se observó aumento de la frecuencia mutacional con respecto a sus aislamientos parentales. En la Tabla 31 se muestra el promedio y desviación estándar de la frecuencia mutacional y el valor correspondiente de p obtenido con el test de *Student*.

Tabla 31. Frecuencia mutacional de cepas parentales y mutantes resistentes a TIG.

Cepas	Frecuencia mutacional (10^{-8})	
	($\bar{X} \pm SD$)	<i>p</i>
497 p	1,70 ± 2,26	0,7911
497 m	1,27 ± 0,25	
2028 p	11,40 ± 3,04	0,1200
2028 m	4,47 ± 2,06	
94159 p	1,13 ± 0,76	0,4466
94159 m	3,47 ± 3,59	
74016 p	16,90 ± 8,36	0,1388
74016 m	5,00 ± 3,75	
4261 p	36,00 ± 4,71	0,5865
4261 m	63,00 ± 72,60	
54081 p	13,00 ± 10,50	0,3617
54081 m	6,73 ± 3,46	
74073 p	56,50 ± 37,00	0,6024
74073 m	35,50 ± 48,60	
14069 p	5,57 ± 4,58	0,0615
14069 m	3,97 ± 3,86	
34076 p	16,80 ± 9,44	0,1143
34076 m	7,27 ± 3,33	
34204 p	3,40 ± 0,36	0,4344
34204 m	5,20 ± 3,12	
44213 p	3,10 ± 2,63	0,2697
44213 m	3,77 ± 3,30	
34023 p	2,87 ± 0,38	0,3701
34023 m	2,20 ± 1,08	

X: promedio, SD: desviación estándar, p: parental, m: mutante.

3.3- Ensayos de autólisis

Se evaluó la actividad autolítica en presencia de un inductor de autólisis (Tritón X-100). Los SARTm mostraron un perfil de autólisis similar al de sus correspondientes aislamientos parentales. En la Figura 21 se muestran las gráficas obtenidas.

Se puede observar en la Figura 21 que 6/12 cepas SARTm (497, 94159, 4261, 54081, 34204 y 34023) no muestran ningún cambio con respecto a al aislamiento parental, sus curvas de autólisis se ven solapadas. En 3/12 pares de cepas parental/mutante (2028, 14069 y 34076) se observa una ligera tendencia a una menor autólisis en las cepas mutantes con respecto a los aislamientos parentales. En estos tres casos se aplicó el test de *Student* para determinar si las diferencias observadas a los 240 min son estadísticamente significativas. Para las tres cepas se obtuvo un valor de $p > 0,05$ (0,2194, 0,0673 y 0,1517 respectivamente), por lo tanto las diferencias no fueron significativas.

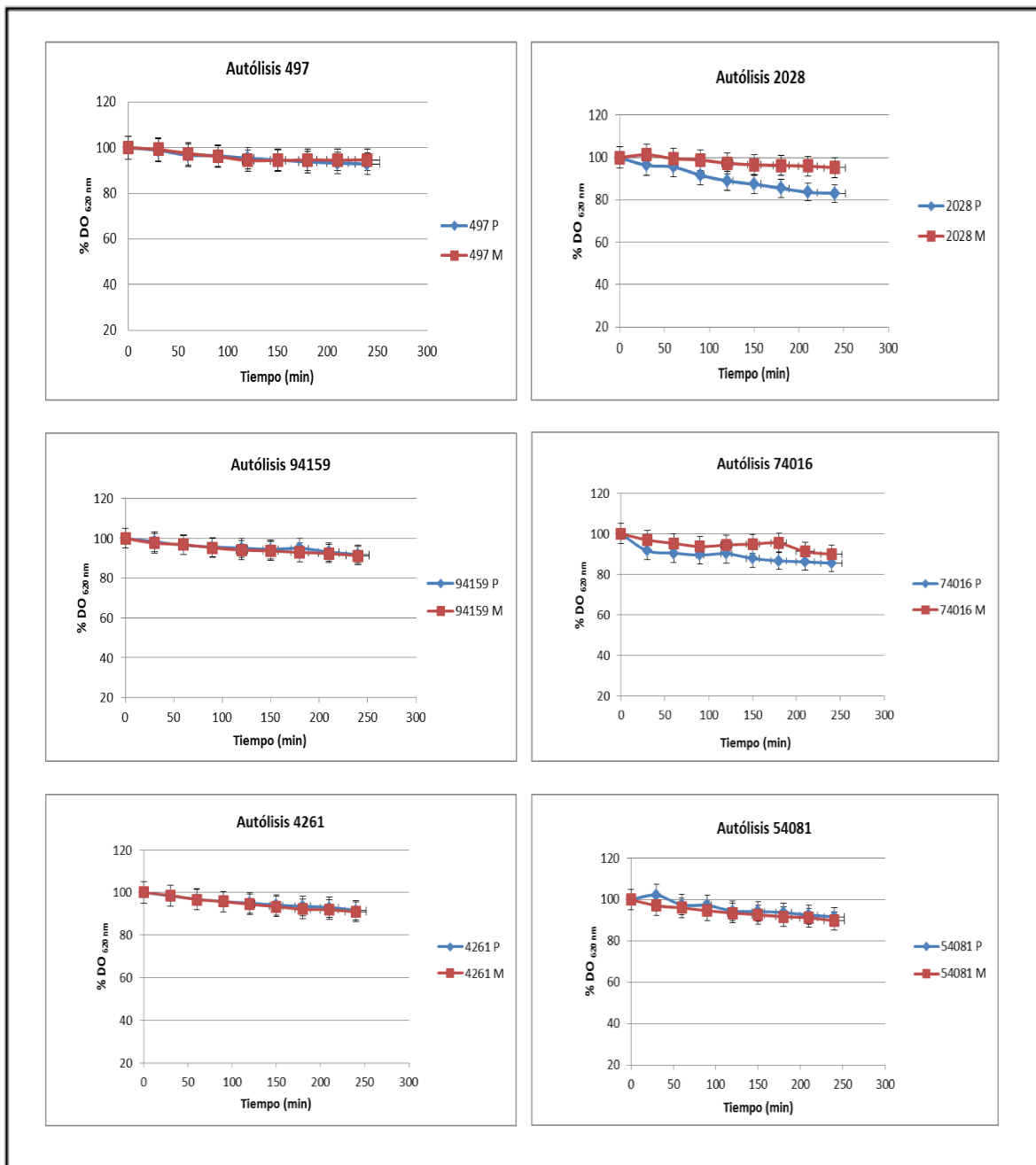


Figura 21. Curvas de autólisis de cepas parentales y mutantes resistentes a TIG.

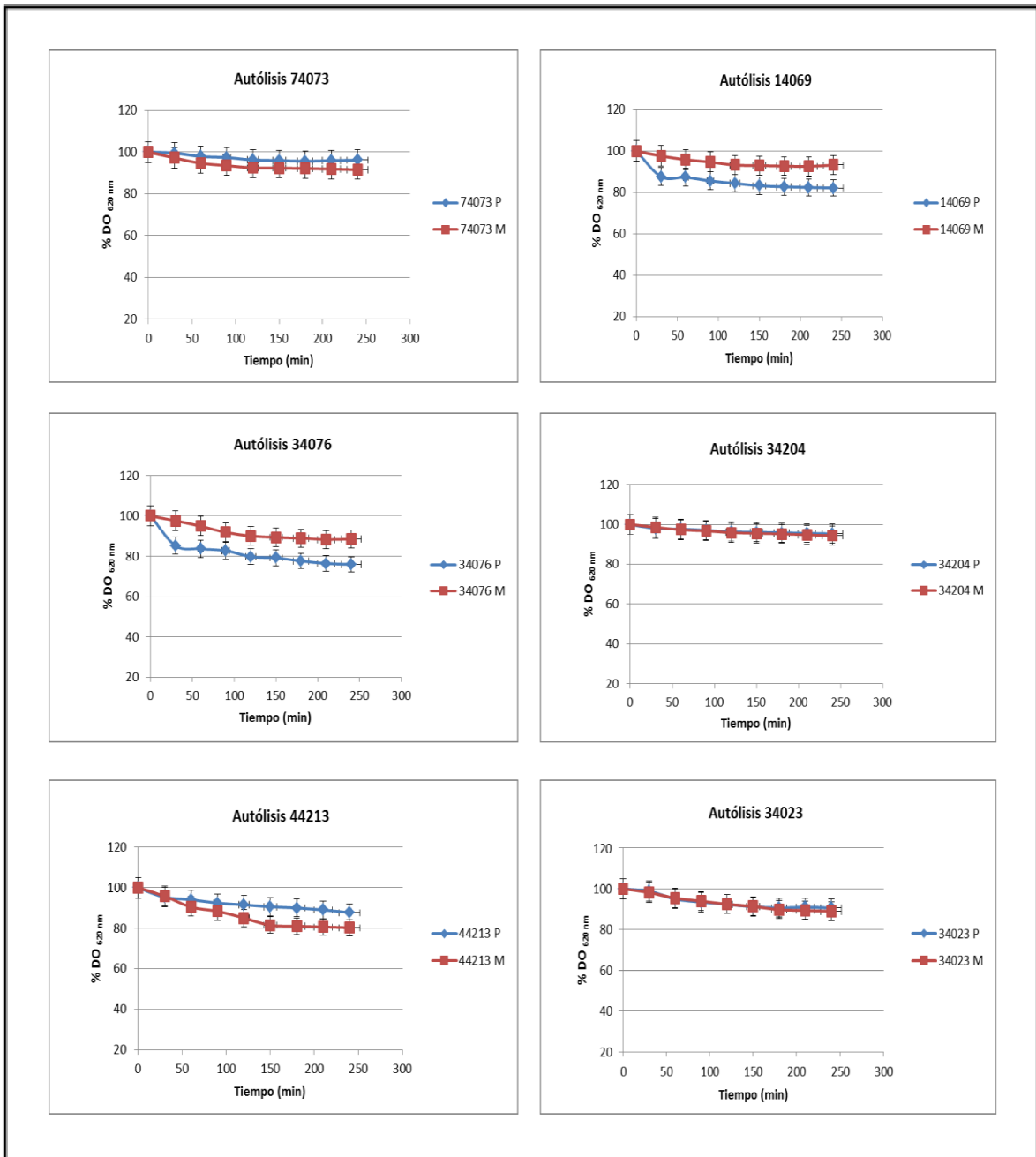


Figura 21. Curvas de autólisis para cepas parentales y mutantes resistentes a TIG (continuación).

DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis, se obtuvieron *in vitro* 12 mutantes de *S. aureus* resistentes a TIG mediante pasajes seriados en concentraciones crecientes del antibiótico. Luego de evaluar la sensibilidad a diversos antibióticos y de llevar a cabo la caracterización fenotípica y genotípica de las cepas mutantes y sus correspondientes aislamientos parentales, se realizaron una serie de ensayos para analizar la eficiencia metabólica (*fitness*) de las mutantes y compararla con los correspondientes aislamientos parentales. El *fitness* bacteriano se define como la capacidad de las bacterias para sobrevivir o replicarse en diversos ambientes.

Es asumido que la adquisición de resistencia a los antibióticos, ya sea mediante la ganancia de determinantes genéticos, o a través de mutaciones, generalmente se produce a expensas de una reducción del *fitness* de la bacteria (Andersson y Levin, 1999). Este efecto comúnmente se pone en evidencia por una reducción en la velocidad de crecimiento, además de una alteración en los factores de virulencia, ya sea incrementando o disminuyendo su expresión y una disminución en la diseminación de los organismos. Las diferencias en el *fitness* entre los distintos aislamientos bacterianos contribuyen a la supervivencia y propagación de determinados patógenos permitiendo el desarrollo de los más aptos o exitosos para producir una infección (Andersson y Hughes, 2010).

Para evaluar estos cambios metabólicos, entre las cepas parentales y las cepas mutantes resistentes a TIG, se llevaron a cabo ensayos de velocidad de crecimiento, frecuencia mutacional y ensayos de autólisis.

Sólo dos cepas de *S. aureus* mutantes resistentes a TIG (cepas 497m y 4261m), mostraron diferencias estadísticamente significativas en la velocidad de crecimiento, con respecto a sus correspondientes aislamientos parentales. En ambos casos se observó que las mutantes presentaban una menor velocidad de crecimiento que los aislamientos parentales. En principio, en estos dos aislamientos existe costo extra para el crecimiento de la cepa mutante resistente a TIG.

En el resto de las cepas evaluadas, si bien no se obtuvieron diferencias significativas entre mutantes y parentales, se pudo apreciar una tendencia de las cepas mutantes a presentar una mayor lentitud para alcanzar la DO que marcaba el inicio para realizar las mediciones en el tiempo. De hecho, al comparar este comportamiento en el conjunto total de cepas mutantes con respecto a las cepas parentales se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ellas, donde las cepa mutantes tardaron más que las cepas parentales en alcanzar la DO de inicio. No obstante, debido a que en la mayoría de los casos el análisis estadístico comparativo de la velocidad de crecimiento dio como resultado la ausencia de diferencias entre parentales y mutantes, se podría decir, que la presión selectiva ejercida por TIG no alteró significativamente la capacidad de desarrollo de las mutantes. Si se trasladan estos resultados a una situación *in vivo*, podría sugerirse que las cepas tanto sensibles como resistentes a TIG tendrían una capacidad similar para crecer dentro de un huésped y permitir de esta manera que colonice o desarrolle una infección.

Estudios similares con TIG se han realizado en otros géneros bacterianos como en *Escherichia coli*, en donde se obtuvieron mutantes *in vitro* con reducida sensibilidad a TIG, donde las mutantes mostraron una menor velocidad de crecimiento con respecto al aislamiento parental (Linkevicius y col., 2013). En otro estudio donde se obtuvieron mutantes *in vitro* de *S. aureus* resistentes a ceftobiprole mediante pasajes seriados en concentraciones crecientes del antibiótico, se observó que las mutantes tenían una velocidad de crecimiento reducida en comparación con los aislamientos parentales (Banerjee y col., 2008). Los aislamientos VISA constituyen otro ejemplo de cómo se ve afectada la velocidad de crecimiento ante la adquisición de resistencia antibiótica, ya que se ha documentado que poseen una menor velocidad de crecimiento que los aislamientos sensibles a VAN (Howden y col., 2010). En nuestro trabajo, como se describió en el Capítulo 1, se obtuvo una cepa SARTm que además disminuyó su sensibilidad a VAN y adquirió el fenotipo VISA (94159m). A pesar de que el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas entre la cepa parental y la mutante, la tendencia observada fue correspondiente a una menor velocidad de crecimiento en la cepa mutante.

La frecuencia mutacional de una población bacteriana se determina comúnmente usando RIF como marcador de mutantes ya que la resistencia a este antibiótico está

asociada a mutaciones espontáneas en el gen *rpoB* que codifica para la ARN polimerasa (Aubry-Damon y col., 1998). De esta manera, es posible detectar cepas mutadoras/hipermutadoras, las cuales tienen aumentada su frecuencia de mutación (Prunier y Leclercq, 2005). Este estado hipermutable podría estar presente en los aislamientos de *S. aureus* estudiados, ya que se seleccionaron mutantes resistentes a TIG. Otro marcador empleado para determinar la frecuencia mutacional fue CIP, cuya resistencia está directamente asociada a mutaciones en los genes *gyrA* o *parC* (Hooper, 2002).

En este trabajo de tesis se observó una frecuencia mutacional en el rango de 10^{-7} y 10^{-8} para las diferentes cepas estudiadas. Este rango de valores es acorde a lo que presentan los diversos aislamientos de *S. aureus* en estudios de frecuencia mutacional (Trong y col., 2005; O'Neill y Chopra, 2002). Además, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de mutación entre los aislamientos parentales y las correspondientes mutantes resistentes a TIG. Un fenotipo mutador es definido por un incremento de su frecuencia mutacional de más de 10 000 veces con respecto a la correspondiente cepa *wild-type* (Miller, 1996).

En diversos géneros bacterianos se ha detectado la existencia de un fenotipo mutador que se acompaña de una elevada frecuencia de mutación y ha sido asociado a una alteración en el sistema encargado de reparar los errores durante la replicación del ADN, denominado sistema MMR (*methyl directed mismatch repair*). El defecto en el sistema MMR se debe generalmente a mutaciones en los genes *mutS* y *mutL* (Miller, 1996; Prunier y Leclercq, 2005). Se considera generalmente que el fenotipo mutador en los organismos patógenos representa un riesgo para el desarrollo de resistencia en diversas especies bacterianas (Chopra y col., 2003).

Sin embargo, en la literatura científica se encuentran resultados contradictorios con respecto al rol de la hipermutabilidad en la adquisición de resistencia en *S. aureus*. Por un lado, hay autores que sugieren que la prevalencia de aislamientos clínicos de *S. aureus* con fenotipo mutador es baja, considerando además que la hipermutabilidad no sería un factor importante en la evolución de la resistencia en *S. aureus* (O'Neill y Chopra, 2002) a diferencia de lo que sucede en otras especies bacterianas como *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, en las cuales se ha demostrado la existencia de alta

prevalencia de hipermutabilidad (Denamur y col., 2002; Oliver y col., 2000). En el caso de *S. aureus*, existen trabajos que han documentado la existencia de una alta proporción de aislamientos con fenotipo hipermutable provenientes de pacientes con fibrosis quística (Prunier y col., 2003). Por otra parte, lo postulado en su momento por Schaaff y col., de que una elevada frecuencia de mutación en *S. aureus* favorecía el desarrollo de resistencia a VAN (Schaaff y col., 2002) fue luego contrarrestado por O'Neill y Chopra, quienes evidenciaron lo opuesto (O'Neill y Chopra, 2003). En nuestro trabajo, mediante la evaluación de la frecuencia mutacional de los aislamientos de *S. aureus* estudiados, no se pudo detectar la presencia de un fenotipo hipermutador. Esto no quiere decir que no se hayan producido mutaciones que alteren otros genes y que sean responsables de la adquisición de resistencia a TIG. En un trabajo realizado en Argentina por Di Gregorio y col., se evaluó la frecuencia de mutación en aislamientos VISA obtenidos *in vivo* e *in vitro* y tampoco se encontraron diferencias entre las cepas parentales y las mutantes con sensibilidad intermedia a VAN, sin embargo se debe tener en cuenta que en dicho estudio la frecuencia de mutación fue determinada con CIP ya que los aislamientos presentaban resistencia a RIF (Di Gregorio y col., 2016).

Por último, se evaluó la actividad autolítica tanto en los aislamientos parentales como mutantes resistentes a TIG. En general, no se observaron diferencias en los perfiles de autólisis mostrados por cepas mutantes con respecto a los aislamientos parentales.

Varios autores han demostrado que los aislamientos VISA, tanto seleccionados *in vivo* como *in vitro* poseen una actividad autolítica disminuida (Howden y col., 2010; Sieradzki y Tomasz, 2003b). En nuestro trabajo esto no pudo demostrarse ya que la cepa 94159m, (SARTm que adquirió además un fenotipo VISA) no mostró diferencias en su actividad autolítica con respecto al aislamiento parental, las curvas de autólisis estuvieron completamente solapadas.

Teniendo en cuenta los resultados de los estudios de velocidad de crecimiento, frecuencia mutacional y actividad autolítica, no se detectó un costo significativo en el *fitness* asociado a la selección de las mutantes resistentes a TIG, ya que no se detectaron diferencias significativas entre las parejas de aislamientos.

Estudios llevados a cabo sobre mutantes de *E. coli* con sensibilidad disminuida a TIG, han mostrado la existencia de un elevado costo en el *fitness* de las cepas mutantes, por lo que sugieren que sería muy difícil que este tipo de mutantes con elevados niveles de resistencia *in vitro* pudieran tener la capacidad de producir una infección *in vivo* (Linkevicius y col., 2013). A diferencia de esto, teniendo en cuenta nuestros resultados sobre los aislamientos de *S. aureus* estudiados, se podría postular que las cepas con niveles elevados de resistencia a TIG, en caso de que surjan *in vivo*, podrían ser capaces de desencadenar una infección exitosa. No obstante, en estudios futuros se debería profundizar en la realización de ensayos adicionales, como por ejemplo ensayos de virulencia *in vivo* con ratones, para poder confirmar que no existe realmente costo en el *fitness* bacteriano.

Generalmente, cuando se produce una reducción del *fitness* se debe a mutaciones en diversos genes que afectan la capacidad metabólica del organismo. Se ha demostrado que en ese caso se pueden producir otras mutaciones adicionales, en otros genes que resultan compensatorias y permiten restablecer el *fitness* (zur Wiesch y col., 2010). Entonces, se puede también postular que no se vieron afectados los genes que regulan la capacidad metabólica de las cepas de SARTm seleccionadas en este trabajo, o bien podría plantearse la selección de cepas con un mecanismo compensatorio.

CAPÍTULO 4

**Estudio molecular de los mecanismos involucrados en
la resistencia a tigeciclina**

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1- Evaluación del sitio diana de tigeciclina

Para analizar la posible presencia de mutaciones en el sitio de unión de TIG, que explique el incremento en la resistencia a este antibiótico mostrado por los SARTm, se amplificó por PCR la región codificante del ARNr 16S. Posteriormente, el producto obtenido fue purificado y secuenciado, procediendo de la misma manera que se detalló en el Capítulo 2. Se usaron los oligonucleótidos descritos por Lane (Lane, 1991). Las secuencias de los mismos se muestran en la Tabla 32. El protocolo de PCR usado se describe a continuación.

Se preparó la siguiente mezcla de reacción para un volumen final de 25 μ L.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (μ L)	Concentración final
H ₂ O milliQ	-	13,9	csp 25 μ L
<i>Buffer</i>	10 X	2,5	1 X
MgCl ₂	25 mM	2,4	2,5 mM
dNTP	10 mM	1	500 μ M
16S-27F	10 μ M	2,5	1 μ M
16S-1492R	10 μ M	2,5	1 μ M
ADN	50 ng/ μ L	1	2 ng/ μ L
<i>Taq</i> pol	5 U/ μ L	0,2	1 U/ μ L

csp: cantidad suficiente para preparar.

Se colocaron 24 μ L de la mezcla de reacción en cada tubo de PCR y se agregó 1 μ L de ADN. La *taq* polimerasa se agregó en “*hot start*” a los 6 min de inicio de la temperatura de *annealing* (1 U por reacción).

Protocolo de ciclado

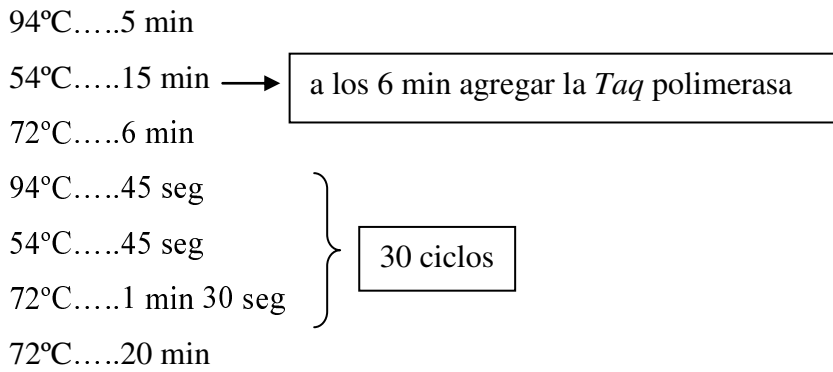


Tabla 32. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la amplificación del ARNr 16S.

Oligonucleótidos	Secuencias (5' - 3')	Tamaño de amplicón (pb)
16S-27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1 500
16S-1492R	GYTACCTTGTTACGACTT	

4.2- Evaluación de la actividad eflujo

El incremento en la actividad de bombas de eflujo podría ser uno de los mecanismos de resistencia responsables de la disminución de la sensibilidad a TIG en los SARTm. Para corroborar esto, se realizó la evaluación fenotípica de la actividad de bombas de eflujo, tanto en los SARTm como en sus correspondientes aislamientos parentales.

El bromuro de etidio (BE) es un compuesto que constituye un sustrato para una variedad de bombas de eflujo. Por esta razón, es utilizado para evaluar el incremento en la actividad de estas proteínas.

La actividad eflujo se evaluó entonces, determinando por duplicado la CIM de TIG y BE, en presencia y ausencia de inhibidores de bombas de eflujo, para lo cual se usó reserpina (RE) y *phenil-arginyl β-naftylamide* (PaβN) a una concentración de 20 µg/mL. Una CIM de BE ≥ 32 µg/mL, sumado a una reducción en la CIM de BE y TIG en presencia de RE o PaβN de al menos 4 diluciones, fue considerado indicativo de incremento en la actividad eflujo. Este criterio fue obtenido de la combinación de los

criterios usados por Patel y col. (CIM de BE ≥ 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y DeMarco y col. (reducción de 4 diluciones en la CIM en presencia de inhibidores de bombas de eflujo) (Patel y col., 2010; DeMarco y col., 2007).

4.3- Amplificación y secuenciación de genes codificantes de bombas de eflujo

Se focalizó el estudio en dos bombas de eflujo presentes en *S. aureus*, denominadas NorB y MepA, las cuales se caracterizan por expulsar tetraciclinas y glicilciclinas, respectivamente. También se estudió el regulador transcripcional de la bomba MepA, denominado MepR.

Los genes codificantes de estas proteínas (*mepA*, *mepR* y *norB*), se amplificaron por PCR y se detectaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Luego de purificar los productos obtenidos se enviaron a un servicio de secuenciación. Toda esta metodología fue descrita en el Capítulo 2. El análisis de las secuencias obtenidas se realizó mediante el *software* Vector NT 11.0 y el sitio *on line* BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

4.3.1- Amplificación del gen *mepA*

El gen *mepA* que codifica para la bomba de eflujo MepA se amplificó por PCR, utilizando oligonucleótidos diseñados en esta tesis. Las secuencias de los mismos se describen en la Tabla 33.

Se preparó la siguiente mezcla de reacción para un volumen final de 50 µL.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (µL)	Concentración final
H ₂ O milliQ	-	29,6	csp 50 µL
<i>Buffer</i>	10 X	5	1 X
MgCl ₂	25 mM	5	2,5 mM
dNTP	10 mM	1	200 µM
<i>mepA-F</i>	10 µM	4	0,8 µM
<i>mepA-R</i>	10 µM	4	0,8 µM
ADN	50 ng/µL	1	1 ng/µL
<i>Taq pol</i>	5 U/µL	0,4	1 U

csp: cantidad suficiente para preparar.

En cada tubo de PCR se adicionó 49 µL de la mezcla de reacción y se agregó 1 µL de ADN. Se siguió el siguiente protocolo de ciclado.

Protocolo de ciclado

94°C.....5 min

94°C.....1 min

55°C.....1 min

72°C.....1 min 30 seg

72°C.....10 min

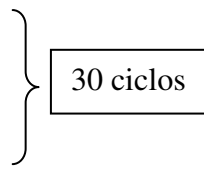


Tabla 33. Secuencias de oligonucleótidos diseñados y utilizados para la amplificación del gen *mepA*.

Oligonucleótidos	Secuencias (5' - 3')	Tamaño de amplicón (pb)
<i>mepA-F</i>	CACTCGTATCGCAGTTATCTG	1 700
<i>mepA-R</i>	CTTAACTTCTGATTCTTCACTA	

4.3.2- Amplificación del gen *mepR*

El gen *mepR* codifica para una proteína denominada MepR, que funciona como un regulador transcripcional de la bomba de eflujo MepA. Este gen se amplificó por PCR, usando los oligonucleótidos descritos por McAleese y col. (McAleese y col., 2005). Las secuencias de los mismos se presentan en la Tabla 34.

Se preparó la siguiente mezcla de reacción para un volumen final de 25 μ L.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (μ L)	Concentración final
H ₂ O milliQ	-	14,25	csp 25 μ L
<i>Buffer</i>	10 X	2,5	1 X
MgCl ₂	25 mM	5	5 mM
dNTP	10 mM	0,5	200 μ M
<i>mepR</i> -F2	10 μ M	0,75	0,3 μ M
<i>mepR</i> -R2	10 μ M	0,75	0,3 μ M
ADN	50 ng/ μ L	1	2 ng/ μ L
<i>Taq</i> pol	5 U/ μ L	0,25	1,25 U

csp: cantidad suficiente para preparar.

En cada tubo de PCR se adicionó 24 μ L de la mezcla de reacción y se agregó 1 μ L de ADN. Se siguió el siguiente protocolo de ciclado.

Protocolo de ciclado

94°C.....5 min

94°C.....30 seg

55°C.....1 min

72°C.....1 min

72°C.....10 min

30 ciclos

Tabla 34. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *mepR*.

Oligonucleótidos	Secuencias (5' - 3')	Tamaño de amplicón (pb)
<i>mepR</i> -F2	CAATAAATGGAATTCACCTTATTCG	539
<i>mepR</i> -R2	CTTTCATTGTTCAATACTCCTTG	

4.3.3- Amplificación del gen *norB*

El gen *norB*, que codifica para la bomba de eflujo NorB fue amplificado por PCR, usando oligonucleótidos diseñados en esta tesis, cuyas secuencias se presentan en la Tabla 35.

Se preparó la siguiente mezcla de reacción para un volumen final de 50 μ L.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (μ L)	Concentración final
H ₂ O milliQ	-	29,6	csp 50 μ L
<i>Buffer</i>	10 X	5	1 X
MgCl ₂	25 mM	5	2,5 mM
dNTP	10 mM	1	200 μ M
<i>norB</i> -F	10 μ M	4	0,8 μ M
<i>norB</i> -R	10 μ M	4	0,8 μ M
ADN	50 ng/ μ L	1	1 ng/ μ L
<i>Taq</i> pol	5 U/ μ L	0,4	1,25 U

csp: cantidad suficiente para preparar.

En cada tubo de PCR se adicionó 49 μ L de la mezcla de reacción y se agregó 1 μ L de ADN. Se siguió el siguiente protocolo de ciclado.

Protocolo de ciclado

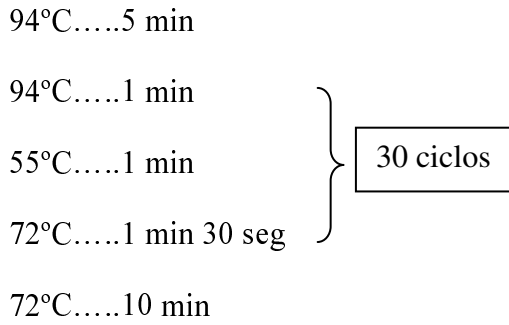


Tabla 35. Secuencias de oligonucleótidos diseñados y utilizados para la amplificación del gen *norB*.

Oligonucleótidos	Secuencias (5' - 3')	Tamaño de amplicón (pb)
<i>norB</i> -F	GGAGGCTTATCTAATTCATGG	1 400
<i>norB</i> -R	CCTAACATTAAACGTCAATACGC	

4.4- Evaluación del nivel de expresión de genes codificantes de bombas de eflujo

El nivel de expresión de los genes *mepA* y *norB* se evaluó mediante RT-qPCR (retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real), en dos SARTm y sus respectivos aislamientos parentales.

4.4.1- Extracción de ARN

A partir de un cultivo de 16 h de los microorganismos, se tomaron 50 µL y se colocaron en 50 mL de caldo BHI. Se incubó a 37°C con agitación, hasta alcanzar fase exponencial de crecimiento ($DO_{620\text{ nm}} = 0,5-0,7$). Posteriormente, se trataron las células durante 1 h con lisozima 15 mg/mL (SIGMA) y luego se extrajo el ARN, utilizando TRIZOL® Reagent (Invitrogen) junto con el kit Pure Link® RNA Mini Kit (AMBION, USA).

Luego, se determinó la concentración del mismo, midiendo la absorbancia a 230, 260 y 280 nm (A_{230} , A_{260} , A_{280}) usando NanoDrop™ 1000 *SpectroPhotometer* (Thermo Scientific). Una relación $A_{260}/A_{280} = 1,8-2,1$ fue indicativa de buena pureza, con baja contaminación con proteínas. Una relación $A_{260}/A_{230} > 1$, fue indicativa de buena pureza, con baja contaminación con isotiocianato de guanidina. El rendimiento de la extracción de ARN fue de 8 µg a 20 µg.

La integridad del ARN se verificó realizando una corrida electroforética en un gel de agarosa al 1,5%, teñido con BE.

La contaminación con ADN se eliminó por tratamiento con la enzima DNAsa I (Promega). Las muestras de ARN fueron conservadas a -70°C hasta su posterior utilización.

4.4.2- Retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

A partir del ARN extraído de los microorganismos, se obtuvo el ADNc mediante el uso de la enzima transcriptasa reversa M-MLV™ *Reverse Transcriptase* (Invitrogen, USA). Se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 1 µL de *random primers* 50 µM (Invitrogen, USA), 1 µL de dNTP Mix 10 mM (Invitrogen, USA), 4 µL de *First-Strand Buffer* 5 X (Invitrogen, USA), 2 µL de Dithiothreitol (DTT) 0,1 M (Invitrogen, USA), 1 µL (40 U) de *RNase OUT™ Recombinant RNase Inhibitor* (Invitrogen, USA), 1 µL (200 U) de M-MLV™ *Reverse Transcriptase* (Invitrogen, USA), 10 µL de ARN (0,5 µg).

Posteriormente, se realizó una dilución 1/100 del ADNc y se amplificaron por qPCR los genes *mepA* y *norB*, utilizando la mezcla de reacción comercial SYBR® *Select Master Mix* (Applied Biosystems, USA) y un equipo 7500 *Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, USA). Se utilizaron los oligonucleótidos descritos por Couto y col. (Couto y col., 2008), para amplificar los genes *mepA* y *norB* (Tabla 36).

La mezcla de reacción para un volumen final de 20 µL consistió en: 10 µL de SYBR® *Select Master Mix* 2 X (Applied Biosystems, USA); 0,3 µL de oligonucleótidos

10 μM (150 nM final); 4,4 μL de agua milliQ libre de nucleasas y 5 μL de ADNc (dilución 1:100).

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

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

Teniendo en cuenta la eficiencia de la reacción de qPCR, obtenida mediante la realización de una curva estándar, se relacionaron los valores de *Cq* con el logaritmo de la cantidad inicial de molde (*No*), y posteriormente, se calcularon las cantidades relativas normalizadas (NRQ) de los genes de interés para cada muestra. La normalización se realizó utilizando los genes de referencia *gyrB* y *pta* (Valihrach y Demnerova, 2012), cuyas secuencias se muestran en la Tabla 36.

Se realizó además, una reacción de control sin la enzima transcriptasa reversa con la finalidad de descartar la contaminación de las muestras con ADN.

Los ensayos fueron realizados por triplicado para cada muestra y condición.

Tabla 36. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para las reacciones de qPCR.

Oligonucleótidos	Secuencias (5' - 3')	Tamaño de amplicón (pb)
MepA_RT (Fw)	TGCTGCTGCTCTGTTCTTTA	198
MepA_RT (Rv)	GCGAAGTTTCCATAATGTGC	
NorB_RT Fw	AGCGCGTTGTCTATCTTTCC	213
NorB_RTRv	GCAGGTGGTCTTGCTGATAA	
<i>gyrB</i> F	CCAGGTAAATTAGCCGATTGC	121
<i>gyrB</i> R	AAATCGCCTGCGTTCTAGAG	
<i>pta</i> F	AAAGCGCCAGGTGCTAAATTAC	121
<i>pta</i> R	CTGGACCAACTGCATCATATCC	

Para realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos, comparando los niveles de expresión de los genes correspondientes a los aislamientos parentales y mutantes se utilizó el test de *Student*. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

4.5- Estudio de posibles mecanismos de resistencia en los SARTm que modificaron su sensibilidad a otros antibióticos

4.5.1- Amplificación y secuenciación del gen *mecA* y *blaZ*

Para los SARTm que modificaron su sensibilidad a OXA (497m y 94159m) se amplificó y secuenció el gen *mecA* y el operón *blaZ* (genes *blaR1*, *blaI* y *blaZ*), para detectar posibles alteraciones en sus secuencias nucleotídicas que estén implicadas en el cambio de sensibilidad detectado. Los productos amplificados se detectaron mediante electroforesis en gel de agarosa, se purificaron y se secuenciaron como se mencionó en materiales y métodos del Capítulo 2. El análisis de las secuencias obtenidas se realizó mediante el *software* Vector NT 11.0 y el sitio *on line* BLAST.

El gen *mecA*, como se mencionó anteriormente, es el gen que codifica para la resistencia a meticilina. Se amplificó el fragmento completo (2 kb), mediante PCR.

Se preparó la siguiente mezcla de reacción para un volumen final de 50 μ L.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (μ L)	Concentración final
H ₂ O milliQ	-	25	csp 50 μ L
<i>Buffer</i>	10 X	5	1 X
MgCl ₂	25 mM	4	2 mM
dNTP	10 mM	4	800 μ M
<i>mecA</i> FL FW	5 μ M	5	0,5 μ M
<i>mecA</i> FL RV	5 μ M	5	0,5 μ M
ADN	50 ng/ μ L	1	1 ng/ μ L
<i>Taq</i> pol	5 U/ μ L	1	1 U

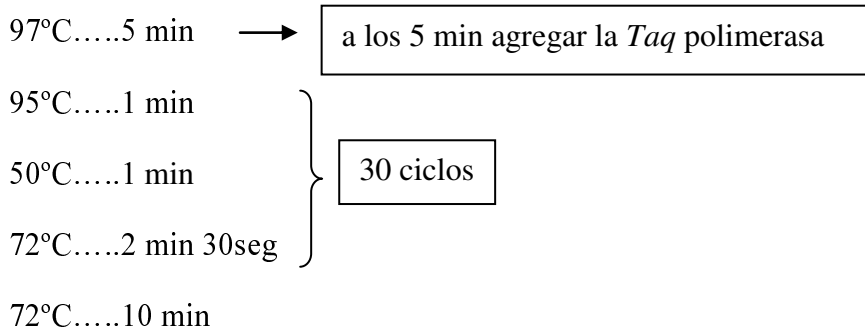
csp: cantidad suficiente para preparar.

Para obtener un volumen final de 50 μ L, en cada tubo de PCR se colocó 48 μ L de la mezcla de reacción y se agregó 1 μ L de ADN. El agregado de la *Taq* polimerasa se realizó en “*hot start*”, a los 5 min de iniciado el ciclado (1 U por reacción). Se diseñaron en esta tesis los oligonucleótidos necesarios para llevar a cabo la amplificación del gen *mecA*, cuyas secuencias se muestran en la Tabla 37.

Tabla 37. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *mecA*.

Oligonucleótidos	Secuencias (5' - 3')	Tamaño de amplicón (pb)
<i>mecA</i> FL FW	AGTTGTAGTTGTCGGGTTTGG	2 000
<i>mecA</i> FL RV	CCATCGTTACGGATTGCTTC	

Protocolo de ciclado



El gen *blaZ*, que codifica una β -lactamasa tipo penicilinas, responsable de la resistencia a penicilina en *S. aureus*, forma parte del denominado operón *blaZ* el cual está constituido por tres genes. Éste se compone del gen *blaZ*, *blaR1* el cual actúa como regulador y *blaI*, que participa como un represor de la transcripción. Para lograr la amplificación de todo el operón *blaZ*, se llevaron a cabo tres reacciones de PCR, correspondientes a cada fragmento.

Estos tres fragmentos se amplificaron por PCR, usando el mismo protocolo de ciclado. Para los genes *blaZ* y *blaR1* se utilizaron las mismas cantidades de los

componentes de la mezcla de reacción. Para amplificar el gen *blaI*, en lugar de utilizar 2,5 μL de dNTPs, se utilizó 1 μL .

Se preparó la siguiente mezcla de reacción para un volumen final de 50 μL .

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (μL)	Concentración final
H ₂ O milliQ	-	28,3	csp 50 μL
<i>Buffer</i>	10 X	5	1 X
MgCl ₂	25 mM	5	2,5 mM
dNTP	10 mM	2,5	500 μM
<i>Primer-3'</i>	5 μM	4	0,4 μM
<i>Primer-5'</i>	5 μM	4	0,4 μM
ADN	50 ng/ μL	1	1 ng/ μL
<i>Taq pol</i>	5 U/ μL	0,2	1 U

csp: cantidad suficiente para preparar.

Para obtener un volumen final de 50 μL , en cada tubo de PCR se colocó 49 μL de la mezcla de reacción y se agregó 1 μL de ADN. Se utilizaron oligonucleótidos diseñados por profesionales del Laboratorio de Resistencia Bacteriana de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA. Las secuencias de dichos oligonucleótidos se describen en la Tabla 38. El protocolo de ciclado se detalla a continuación.

Protocolo de ciclado

94°C.....5 min

94°C.....1 min

55°C.....1 min

72°C.....1 min 30 seg

72°C.....5 min

30 ciclos

Tabla 38. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes *blaZ*, *blaR1* y *blaI*.

Gen	Oligonucleótidos	Secuencias (5' - 3')	Tamaño de amplicón (pb)
<i>blaR1</i>	BlaOPF	TTGGTATCTAACTATGCTTGCTGG	1 200
	BlaR1R2	GCTTGAGTTGAGCCGCAGTATAG	
<i>blaZ</i>	BlaZF	GTTGCTTTTTTCGATTGATGAACACC	1 000
	BlaZR	GTTCACATGCCAAAGAGTTAAATG	
<i>blaI</i>	BlaR1F	GGATCTTTCGTTATGTACAGCATG	1 200
	BlaIR	GGTTATTTTCTGGACACTCTCATC	

RESULTADOS

4.1- Evaluación del sitio diana de tigeciclina

El fragmento correspondiente al ARNr 16S se amplificó y secuenció en los aislamientos parentales de *S. aureus* y sus mutantes resistentes a TIG. En todos los casos se obtuvo el amplicón esperado de 1 500 pb correspondiente al ARNr 16S. Las secuencias obtenidas para los SARTm y sus aislamientos parentales fueron analizadas y comparadas entre sí. Se observó un 100% de identidad nucleotídica entre las mismas, no encontrándose alteraciones entre las secuencias de los aislamientos parentales y las mutantes resistentes a TIG.

4.2- Evaluación de la actividad eflujo

La actividad eflujo se evaluó en todos los SARTm y sus respectivos aislamientos parentales. Como se mencionó en materiales y métodos, una CIM de BE ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$, sumado a una disminución de al menos 4 diluciones en la CIM de TIG y BE en presencia de inhibidores de bombas de eflujo, se consideró indicativo de incremento en la actividad eflujo. De los aislamientos parentales sólo dos (74016p y 74073p) tuvieron CIM de BE ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$, mientras que todos los SARTm tuvieron una CIM de BE ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$, cumpliendo con el criterio establecido.

Cuando fueron expuestos a RE, 9/12 SARTm mostraron una reducción de la CIM de BE en al menos 4 diluciones, mientras que 10/12 SARTm tuvieron tal reducción de la CIM de TIG. Los SARTm que no llegaron a cumplir con el criterio establecido, disminuyeron 3 diluciones la CIM de BE (3/12 SARTm) y de TIG (2/12).

Cuando se utilizó PA β N, en general no se evidenció una reducción de la CIM en el número de diluciones esperadas, ya que sólo en 4 SARTm se obtuvo una reducción de 4 diluciones en la CIM de TIG, mientras que la CIM de BE no alcanzó esta reducción para ninguno de los aislamientos. En la Tabla 39 se exponen los valores de

CIM de TIG y BE obtenidos en presencia y ausencia de RE y PAβN. En la Figura 22, se visualizan gráficamente estos resultados.

Tabla 39. CIM de TIG y BE en presencia y ausencia de inhibidores de bombas de eflujo (RE y PAβN).

Cepas	CIM TIG (µg/mL)	CIM TIG + inhibidor (µg/mL)		CIM BE (µg/mL)	CIM BE + inhibidor (µg/mL)	
		RE	PAβN		RE	PAβN
		497p	0,125		0,016 [3]	0,064 [1]
497m	4	0,064 [6]	1 [2]	64	2 [5]	8 [3]
2028p	0,125	0,064 [1]	0,064 [1]	16	2 [3]	4 [2]
2028m	16	0,25 [6]	1 [4]	64	2 [5]	32 [1]
94159p	0,125	0,064 [1]	0,064 [1]	16	1 [4]	4 [2]
94159m	16	1 [4]	2 [3]	128	8 [4]	32 [2]
74016p	0,125	0,064 [1]	0,064 [1]	32	0,25 [7]	4 [3]
74016m	4	0,125 [5]	0,25 [4]	64	2 [5]	8 [3]
4261p	0,064	0,032 [1]	0,064 [0]	16	0,25 [6]	2 [3]
4261m	8	0,125 [6]	4 [1]	64	4 [4]	32 [1]
54081p	0,064	0,032 [1]	0,032 [1]	16	1 [4]	4 [2]
54081m	8	1 [3]	4 [1]	64	8 [3]	32 [1]
74073p	0,064	0,064 [0]	0,064 [0]	32	1 [5]	4 [3]
74073m	8	0,25 [5]	2 [2]	32	2 [4]	16 [1]
14069p	0,064	0,064 [0]	0,032 [1]	16	0,5 [5]	4 [2]
14069m	1	0,064 [4]	0,064 [4]	64	8 [3]	16 [2]
34076p	0,125	0,064 [1]	0,064 [1]	16	1 [4]	4 [2]
34076m	16	0,25 [6]	4 [2]	64	2 [5]	32 [1]
34204p	0,064	0,064 [0]	0,064 [0]	16	0,5 [5]	4 [2]
34204m	8	0,5 [4]	4 [1]	32	1 [5]	16 [1]
44213p	0,125	0,064 [1]	0,032 [2]	16	0,5 [5]	8 [1]
44213m	4	0,125 [5]	0,5 [3]	32	0,25 [7]	8 [2]
34023p	0,064	0,064 [0]	0,032 [1]	8	0,5 [4]	8 [0]
34023m	1	0,125 [3]	0,064 [4]	32	4 [3]	16 [1]

p: parental, m: mutante. Entre corchetes se muestra el número de diluciones que disminuyó la CIM en presencia de RE y PAβN.

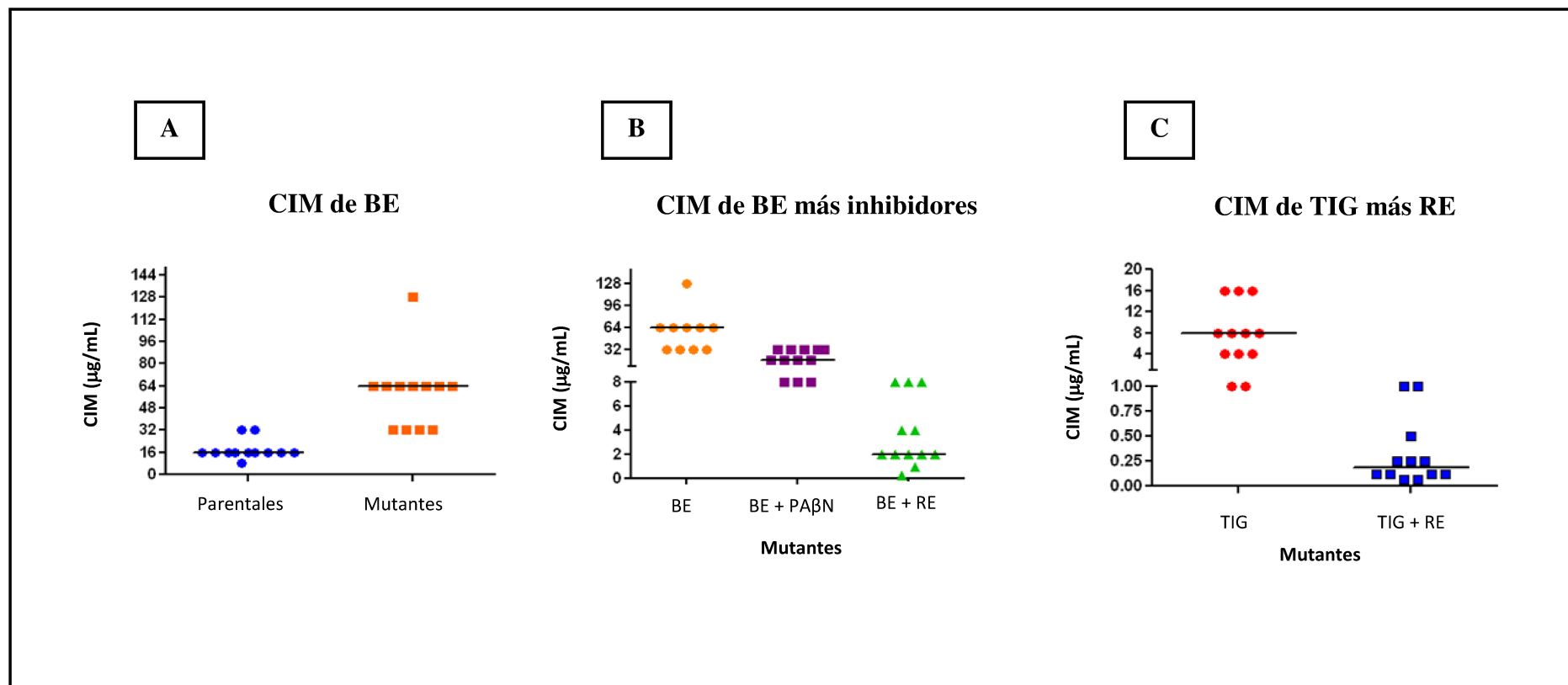


Figura 22. A) CIM de BE en cepas parentales y mutantes resistentes a TIG. B) CIM de BE en ausencia y presencia de inhibidores de bombas de eflujo. C) CIM de TIG en presencia y ausencia de RE.

4.3- Análisis de las bombas de eflujo MepA y NorB: detección de alteraciones nucleotídicas y aminoacídicas

Con la finalidad de detectar alteraciones en las bombas de eflujo que puedan estar involucradas en el incremento en la CIM de TIG en los SARTm, se amplificó y secuenció el gen *mepA*, que codifica para la bomba de eflujo MepA, el gen *mepR*, que codifica para un regulador de la expresión de MepA y el gen *norB*, que codifica para la bomba de eflujo NorB.

Se alinearon y compararon *in silico* las secuencias obtenidas de cada gen, para los aislamientos parentales y las cepas mutantes resistentes a TIG. Posteriormente, se analizaron los cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas traducidas.

4.3.1- Análisis de las secuencias del gen *mepA* y la proteína MepA

Se tomó como referencia el gen *mepA* de la cepa *S. aureus* N315 (N° de acceso en *Gene Bank*, BA000018.3), que está compuesto por 1 356 pb. La proteína traducida MepA, está compuesta por 451 aminoácidos. Sólo un aislamiento parental (497) tuvo 100% de identidad nucleotídica con el gen *mepA* de la cepa de referencia, el resto de los aislamientos tuvo una identidad nucleotídica del 99% con el gen de esta cepa.

Al comparar las secuencias nucleotídicas correspondientes a los SARTm con sus respectivos aislamientos parentales, se observaron algunos cambios en los nucleótidos que las componen.

En todos los SARTm se observaron una o más sustituciones nucleotídicas, que generaron cambios de aminoácidos en la proteína MepA. Dentro de las sustituciones nucleotídicas prevalecieron las transiciones, encontrándose un menor número de transversiones.

La mutación descrita con mayor frecuencia en la secuencia nucleotídica de los SARTm (5/12), fue la transición A x G (posición 860) que conduce al cambio Glu287Gly en la secuencia de aminoácidos de la proteína. En 4/12 SARTm, se observó la transición C x T (posición 86), que se traduce en la sustitución Thr29Ile en la secuencia de aminoácidos. Además, en 3/12 SARTm se encontró la transición C x T

(posición 862) que produce un cambio aminoacídico Leu288Phe. Finalmente, en menor frecuencia se observaron otros cambios de nucleótidos, que dieron lugar a sustituciones en MepA (Ser32Ile (1), Gly44Arg (1), Ala161Thr (1), Gly171Asp (1), Val234Gly (1), Ala274Val (1), Glu287Asp (1), Leu403Glu (1), Val415Leu (1), Val443Gly (1)). En la mayoría de los casos los cambios se produjeron entre aminoácidos químicamente diferentes, no obstante, en menor medida también se produjeron cambios entre aminoácidos similares en cuanto a sus características químicas. En la Figura 23 se observa a modo de ejemplo el alineamiento de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de MepA, para la cepa 497p y 497m. En la Tabla 40, se describen las mutaciones encontradas en las secuencias de nucleótidos de *mepA* y en las secuencias de aminoácidos de MepA.

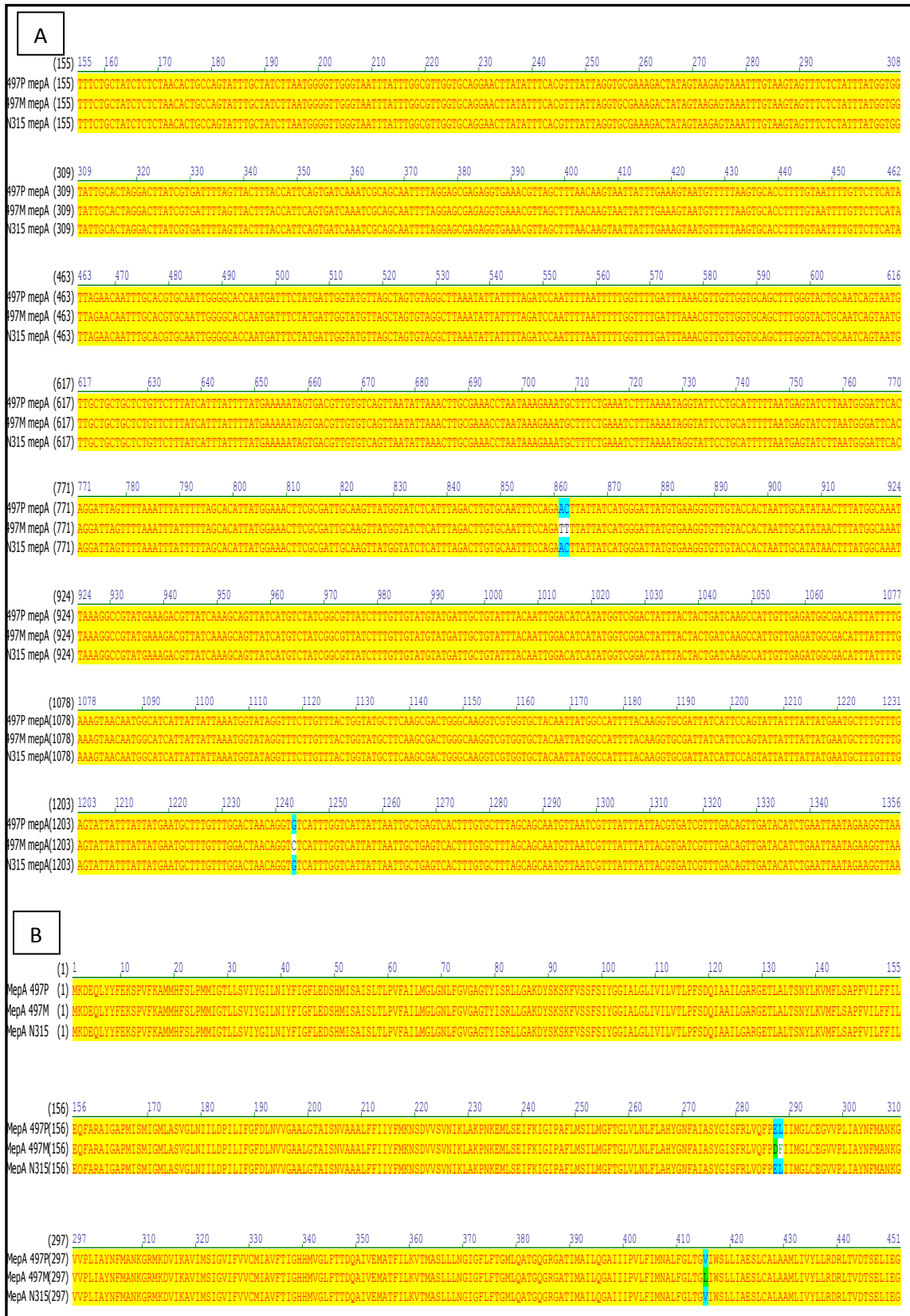


Figura 23. Alineamientos para las cepas 497p, 497m y N315 (cepa de referencia). A) secuencias de *mepA*. B) secuencias de MepA.

Tabla 40. Mutaciones observadas en las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de MepA y MepR en las cepas SARTm.

Cepas	MepA		MepR	
	Secuencia de nucleótidos	Secuencia de aminoácidos	Secuencia de nucleótidos	Secuencia de aminoácidos
497	A x T (861)* C x T (862) G x C (1243)	Glu287Asp Leu288Phe Val415Leu	C x T (185)	Pro62Leu
2028	C x T (86) A x G (860)	Thr29Ile Glu287Gly	G x A (236)	Arg79His
94159	C x T (86)	Thr29Ile	G x T (73)	Cambió Glu por un codón de <i>stop</i> (TAG), en posición 25
74016	C x T (821) C x T (862)	Ala274Val Leu288Phe	C x T (211)	Leu71Phe
4261	C x T (86) A x G (860)	Thr29Ile Glu287Gly	G x A (100) C x A (188)	Gly34Ser Thr63Asn
54081	G x A (130) G x A (481) C x T (862)	Gly44Arg Ala161Thr Leu288Phe	G x C (96)	Glu32Asp
74073	A x G (860)	Glu287Gly	Delección de 72 bases (90 a 161)	Delección de 24 AA desde la posición 31 a 54
14069	T x G (1328)	Val443Gly	G x T (94)	Cambió Glu por un codón de <i>stop</i> (TAG), en posición 32
34076	C x T (86) A x G (860)	Thr29Ile Glu287Gly	G x T (304)	Cambió Glu por un codón de <i>stop</i> (TAA), en posición 102

34204	A x G (860) A x T(1209)	Glu287Gly Leu403Glu	Adición de 12 bases en posición 62 a 73	Adición de 4 AA desde la posición 24 a 27
44213	G x T (95) G x A (512)	Ser32Ile Gly171Asp	Delección de G (275)	Gly92Asp Cambió Leu por un codón de <i>stop</i> (TGA) en posición 93
34023	C x T (735) T x G (1001)	Val234Gly	C x T (172)	Cambió Gln por un codón de <i>stop</i> (TAA) en posición 58

*Entre paréntesis se coloca la posición de la secuencia donde se produjo la alteración.

4.3.2- Análisis de las secuencias del gen *mepR* y la proteína MepR

Se tomó como referencia el gen *mepR* de la cepa *S. aureus* N315 (Nº de acceso en *Gene Bank*, BA000018.3), cuyo tamaño es de 420 pb. La proteína traducida MepR, está compuesta por 139 aminoácidos. De los aislamientos parentales, 4 tuvieron 100% de identidad nucleotídica con el gen *mepR* de la cepa de referencia, en el resto de los aislamientos la identidad nucleotídica fue del 99%. Los cambios nucleotídicos presentes en estos aislamientos no alteraron la proteína traducida.

Al realizar el análisis de las secuencias mediante alineamiento de las mismas, entre los SARTm y sus correspondientes aislamientos parentales, se detectaron alteraciones nucleotídicas en las secuencias de *mepR*, que no sólo correspondieron a sustituciones, sino que también se observaron deleciones y adiciones de nucleótidos en algunos casos.

En 9/12 SARTm se observaron sustituciones de nucleótidos. En 5 de ellos se produjeron cambios de aminoácidos en distintas posiciones de la proteína MepR sin mostrar un patrón común en estos cambios, mientras que en 4 se generó un codón de terminación prematuro. Por otra parte, en 2/12 SARTm se detectaron deleciones en la secuencia de *mepR*. En uno de ellos la delección de un nucleótido dio lugar a una sustitución de aminoácidos y a la aparición de un codón de *stop*, mientras que en el otro la delección observada fue de 72 pb y dio lugar a la pérdida de 24 aminoácidos. Por

último, en 1/12 SARTm se detectó una adición de un fragmento de 12 pb, que dio lugar a una adición de 4 aminoácidos en la secuencia de MepR. En la Figura 24 se muestra el alineamiento de las secuencias del gen *mepR* para el par de cepas 74073 y 34204, que fueron las que presentaron los cambios más notorios con respecto a los aislamientos parentales. En la Tabla 40, se resumen las alteraciones encontradas en las secuencias de nucleótidos de *mepR* y en las secuencias de aminoácidos de MepR.



Figura 24. Alineamiento de las secuencias de *mepR* para el par de cepas 74073 (delección de 72 pb) y 34204 (adición de 12 pb).

En la Figura 25, se presenta una imagen del gel de agarosa que se obtuvo como resultado de la amplificación del gen *mepR* para los aislamientos parentales y sus SARTm. Allí se puede observar que el fragmento correspondiente a la cepa 74073m se encuentra ligeramente por debajo del resto de los fragmentos, es decir que tendría un menor tamaño que el resto de los amplicones, lo cual concuerda con lo encontrado en el análisis de las secuencias, ya que en esta cepa se detectó una delección de 72 pares de bases.

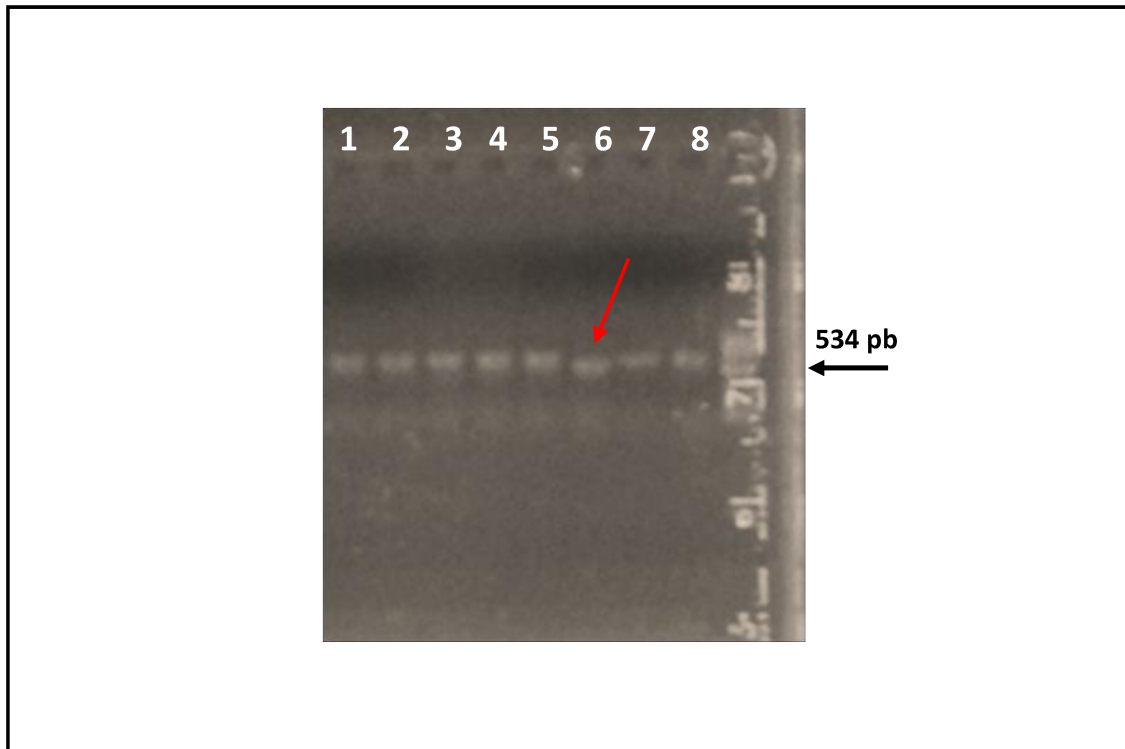


Figura 25. Amplificación por PCR del gen *mepR*. Gel de agarosa 1% correspondiente a: calle 1: 4261p, calle 2: 4261m, calle 3: 54081p, calle 4: 54081m, calle 5: 74073p, calle 6: 74073m, calle 7: 14069p, calle 8: 14069m, calle 9: marcador de peso molecular 100-1000pb. Con una flecha de color rojo se indica la posición del amplicón correspondiente al gen *mepR* de la cepa 74073m, ligeramente por debajo del correspondiente a la cepa 74073m. Con una flecha de color negro se indica la ubicación y tamaño esperado del amplicón correspondiente al gen *mepR*.

4.3.3- Análisis de las secuencias del gen *norB*

Se amplificó el gen *norB* por PCR y se analizaron las secuencias correspondientes. No se encontraron alteraciones nucleotídicas en las secuencias de *norB* de los SARTm con respecto a sus aislamientos parentales. Es decir, que al realizar los alineamientos se obtuvo 100% de identidad nucleotídica entre las secuencias de los aislamientos parentales y las mutantes resistentes a TIG.

4.4- Evaluación del nivel de expresión de los genes *mepA* y *norB*

Con la finalidad de detectar cambios en la expresión de los genes codificantes de bombas de eflujo (*mepA* y *norB*), se realizó RT-qPCR en dos cepas SARTm y sus respectivos aislamientos parentales. Las cepas elegidas para llevar a cabo este ensayo fueron la 94159, cuyo SARTm mostró una mutación por cambio de sentido en *mepA* (C x T en posición 86) y una sin sentido en *mepR* (G x T en posición 73); y la cepa 2028, en cuyo SARTm se detectaron dos mutaciones por cambio de sentido en *mepA* (C x T en posición 86 y A x G en posición 860) y otra en *mepR* (G x A en posición 236). Además, la cepa 94159 mostró modificación en los valores de CIM de OXA, FOX y VAN (ver Capítulo 1).

Para las dos cepas SARTm evaluadas, se obtuvo diferencia significativa en el nivel de expresión del gen *mepA*, con respecto a su aislamiento parental, mostrando en ambos casos un aumento en la expresión de este gen ($p = 0,0009$ y $p < 0,0001$). En la Tabla 41 se muestran los promedios de NRQ y en la Figura 26 se pueden observar los gráficos obtenidos.

Tabla 41. Promedios de NRQ para el gen *mepA*.

Cepas	NRQ <i>mepA</i>	
	Promedio	<i>p</i>
94159p	0,06	0,0009
94159m	17,85	
2028p	0,12	< 0,0001
2028m	24,71	

p: parental, m: mutante.

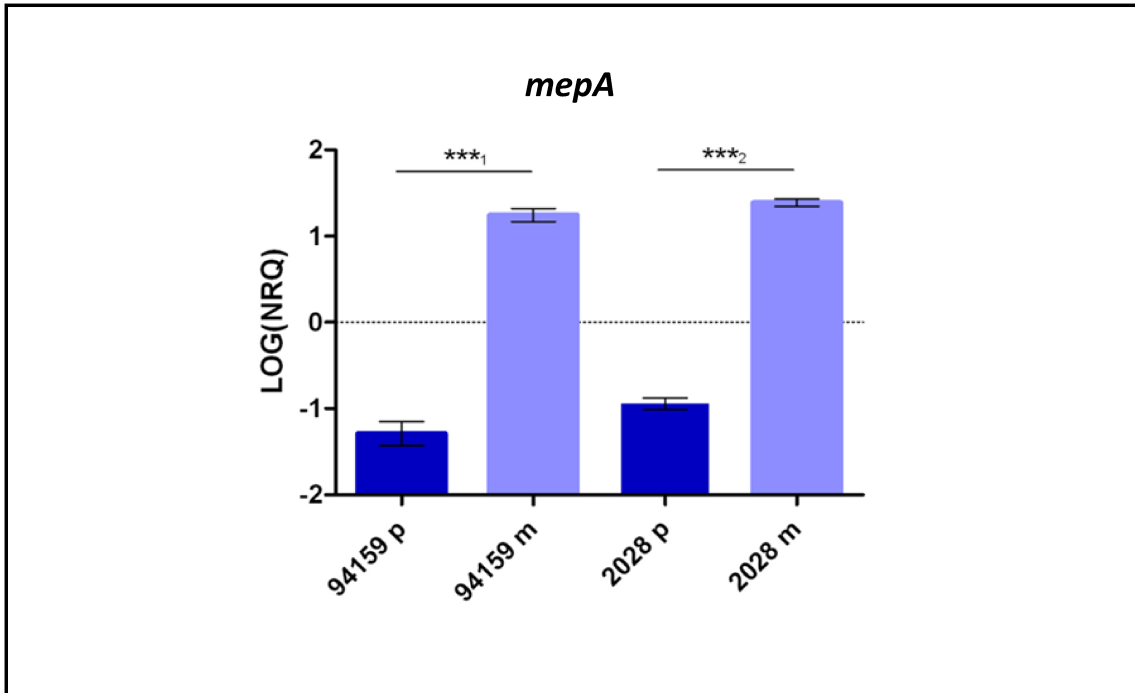


Figura 26. Nivel de expresión del gen *mepA* evaluado por RT-qPCR. NRQ: cantidad relativa normalizada. Las barras representan la media de tres determinaciones. ***1 $p = 0,0009$; ***2 $p < 0,0001$, test de *Student*.

Cuando se evaluó el nivel de expresión del gen *norB* para el mismo par de cepas seleccionado, se observaron niveles de expresión menores en las cepas mutantes. Si bien la cepa 2028m mostró un nivel significativamente menor de expresión del gen *norB* que su correspondiente aislamiento parental ($p = 0,0007$), no se observó diferencia significativa en el nivel de expresión ($p = 0,1093$) para la dupla 94159p - 94159m. En la Tabla 42 se muestran los promedios de NRQ y en la Figura 27 los gráficos obtenidos.

Tabla 42. Promedios de NRQ para el gen *norB*.

Cepas	NRQ <i>norB</i>	
	Promedio	<i>p</i>
94159p	2,48	0,1093
94159m	1,25	
2028p	2,09	0,0007
2028m	0,19	

p: parental, m: mutante

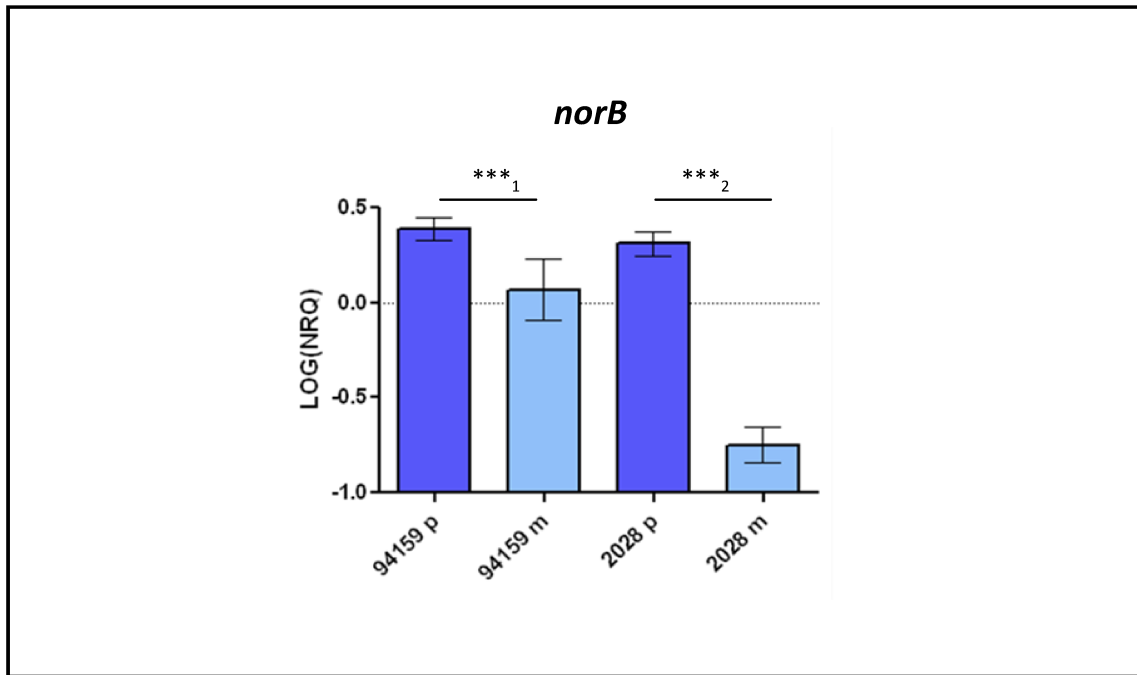


Figura 27. Nivel de expresión del gen *norB* evaluado por RT-qPCR. NRQ: cantidad relativa normalizada. Las barras representan la media de tres determinaciones. ***1 $p = 0,1093$; ***2 $p = 0,0007$, test de *Student*.

4.5- Estudio de posibles mecanismos de resistencia en los SARTm que modificaron su sensibilidad a otros antibióticos

4.5.1- Amplificación y secuenciación del gen *mecA* y el operón *blaZ*

El gen *mecA* completo y el operón *blaZ* de las cepas parentales (94159 y 2028) y sus respectivos mutantes fueron amplificados por PCR y posteriormente secuenciados. Se realizó el análisis *in silico* de las secuencias obtenidas. No se encontraron diferencias en las secuencias de nucleótidos de ninguno de los genes entre los SARTm y sus correspondientes aislamientos parentales.

DISCUSIÓN

La TIG es un antibiótico derivado de las tetraciclinas, que fue desarrollado para superar los dos mecanismos de resistencia a las tetraciclinas clásicas, las bombas de eflujo específicas y protección ribosomal, pero no las bombas de eflujo codificadas cromosómicamente presentes en *Pseudomonas* y la tribu *Proteae*, que otorgan resistencia intrínseca a TIG en estos géneros bacterianos (Stein y Craig, 2006).

La resistencia a TIG adquirida en aislamientos bacterianos de diversos géneros se encuentra asociada generalmente con la sobreexpresión de bombas de eflujo. Esto ha sido documentado en aislamientos inicialmente sensibles de *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella entérica* y *Serratia marcescens* (Barberán y col., 2015).

Con la finalidad de analizar y determinar el mecanismo de resistencia a TIG desarrollado por las cepas de *S. aureus* mutantes resistentes seleccionadas *in vitro*, se realizó como primera medida la evaluación del ARNr que forma parte del sitio diana de TIG. Este antibiótico actúa inhibiendo la síntesis de proteínas, al unirse a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, específicamente en el sitio A del ARNr 16S (Olson y col., 2006). La secuencia del ARNr 16S se analizó buscando posibles mutaciones que alteren la estructura primaria del mismo y que pudieran estar implicadas en la disminución de la sensibilidad a TIG. En este análisis no se encontró ninguna alteración en las secuencias de las cepas mutantes con respecto a los aislamientos parentales. Esto demuestra que el mecanismo de resistencia involucrado en estas cepas no está relacionado con una modificación del ARNr 16S. Concordando con nuestros resultados, el análisis de la secuencia del ARNr 16S se llevó a cabo también en el primer aislamiento reportado de *Enterococcus faecalis* con resistencia a TIG, no encontrándose mutaciones en este sitio (Werner y col., 2008). Por el contrario, mutaciones en el ARNr 16S, entre otras, han sido relacionadas con el desarrollo de resistencia a TIG en mutantes de *Streptococcus pneumoniae* seleccionados *in vitro* (Lupien y col., 2015).

El paso siguiente para continuar con el estudio de los posibles mecanismos de resistencia a TIG, fue evaluar fenotípicamente la actividad eflujo, de manera comparativa entre los aislamientos parentales y las cepas mutantes resistentes. El incremento en la actividad eflujo es uno de los mecanismos involucrados en la resistencia de *S. aureus* a diversos antibióticos, haciendo que se reduzca la concentración intracelular de los mismos, debido a la expulsión a través de proteínas transportadoras que se encuentran en la membrana bacteriana. Este mecanismo permite de esta manera que los aislamientos se vuelvan refractarios a los tratamientos con los antibióticos (Costa y col., 2013).

Es sabido que las bombas de eflujo presentes en *S. aureus* tienen la habilidad de expulsar una variedad de antibióticos además de otros compuestos, como biocidas y colorantes. El BE es un sustrato para una variedad de bombas de eflujo, es por ello que la determinación de su CIM se utiliza comúnmente como un método de *screening* para conocer fenotípicamente si los organismos presentan una mayor actividad eflujo (Huet y col., 2008; Patel y col., 2010).

En un trabajo publicado por Patel y col. (Patel y col., 2010) se concluyó que una CIM de BE ≥ 25 $\mu\text{g/mL}$ se relaciona con una alta posibilidad de que la expresión de uno o más genes de bombas de eflujo esté aumentada, con la consiguiente presencia de un fenotipo de eflujo. Para tener un criterio más estricto en la detección de esta actividad eflujo aumentada en la mutantes resistentes aTIG, en nuestro trabajo se tomó una CIM de BE ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ como indicativo de un incremento en la actividad de bombas de eflujo. Todas las mutantes estudiadas tuvieron una CIM de BE mayor a la observada en sus respectivos aislamientos parentales y su valor cumplió con el criterio tenido en cuenta para considerar la presencia de una mayor actividad eflujo en las cepas mutantes resistentes a TIG.

Además de la determinación de la CIM de BE, es común la utilización de inhibidores de bombas de eflujo para evaluar su actividad (RE y PA β N, en nuestro estudio). Estos inhibidores actúan bloqueando las bombas de eflujo, permitiendo de esta manera que los valores de CIM para determinados sustratos en las cepas que presentan una mayor actividad se reduzcan en presencia del inhibidor (Zechini y Versace, 2009).

En presencia de RE, la mayoría de los SARTm mostraron una disminución mayor o igual a 4 diluciones en la CIM de BE y TIG, lo que pone en evidencia nuevamente, un incremento en la actividad de bombas de eflujo en estas cepas. Por otra parte, el hecho de que se observara también un efecto de RE en las CIMs de BE en los aislamientos parentales, demuestra la existencia de una actividad eflujo basal intrínseca. Esto concuerda con lo hallado por Couto y col., donde se observa un efecto inhibitorio de RE no solo en la cepa expuesta a concentraciones crecientes de BE sino también en la cepa original (Couto y col., 2008).

El efecto inhibitorio de PA β N no fue tan evidente, por lo que parecería ser que las bombas involucradas en la extrusión de TIG serían más sensibles a la presencia de RE.

Los aislamientos VISA como es el caso de la cepa 94159m, presentan sensibilidad intermedia a VAN. La adquisición de este mecanismo ha sido asociada a la presencia de diversas mutaciones que afectan la biosíntesis de la pared celular, llevando al engrosamiento de la misma (Howden y col., 2010).

Con la finalidad de encontrar una explicación a los cambios detectados en la sensibilidad a OXA en las cepas 497m y 94159m se realizó además, la amplificación y secuenciación del gen *mecA* completo y del operón *blaZ*, para detectar alteraciones en sus secuencias. No se encontraron alteraciones en las secuencias de nucleótidos de ninguno de los dos genes. Por lo tanto, los cambios en la sensibilidad a OXA no tendrían que ver con modificaciones en la secuencia de estos genes.

Continuando con la evaluación del posible mecanismo de resistencia a TIG, una vez determinado fenotípicamente que los SARTm presentaban un incremento en la actividad eflujo con respecto a los aislamientos parentales, se procedió a estudiar a nivel molecular algunas bombas de eflujo que podrían estar involucradas, focalizando el estudio en dos proteínas relacionadas con la expulsión de tetraciclinas y gliciliclinas (NorB y MepA, respectivamente).

En un estudio publicado en 2005 por Kaatz y col., se identificó por primera vez en *S. aureus* la participación de la bomba de eflujo MepA, (perteneciente a la familia de bombas MATE), en dos mutantes de *S. aureus* obtenidos *in vitro*, mediante exposición a altas concentraciones de moxifloxacina más BE y a altas concentraciones de norfloxacina respectivamente (Kaatz y col., 2005). Posteriormente, en otro estudio se

demonstró la contribución de MepA, a la reducida sensibilidad a TIG en mutantes de *S. aureus* obtenidos *in vitro* (McAleese y col., 2005). Se ha relacionado esta bomba de eflujo con la disminución de la sensibilidad a fluoroquinolonas, compuestos biocidas y colorantes, además de TIG (Kaatz y col., 2005; McAleese y col., 2005). La proteína MepA está codificada por el gen *mepA*, que forma parte del operón *mepRAB*, el cual comprende además el gen *mepR*, que codifica para un regulador transcripcional (MepR) y el gen *mepB*, cuya función es desconocida. MepR actúa como un represor de la transcripción tanto de *mepR* como de *mepA* (Kaatz y col., 2006). Por ello, para el estudio molecular de las bombas de eflujo, en esta tesis se realizó el análisis de las secuencias nucleotídicas tanto de *mepA* como de *mepR*, con el fin de encontrar alteraciones que pudieran explicar la resistencia a TIG desarrollada en los SARTm.

En las secuencias de *mepA* de todos los SARTm se detectaron diversas alteraciones nucleotídicas, que dieron lugar a cambios en los aminoácidos de la proteína MepA. En todos los casos, las mutaciones en las secuencias de nucleótidos se correspondieron con transiciones o, en menor medida transversiones, no encontrándose deleciones ni adiciones. La mutación detectada con mayor frecuencia fue la transición A x G en la posición 860 de la secuencia de *mepA*. Este cambio estuvo presente en 5/12 SARTm, y como resultado de esta mutación, la proteína MepA presentó el cambio de ácido glutámico por glicina en la posición 287. Otra mutación encontrada con frecuencia fue la transición C x T en la posición 86 de *mepA* (en 4/12 SARTm), dando como resultado la sustitución Thr29Ile en MepA. Además de estos cambios, se detectaron una variedad de otras alteraciones nucleotídicas, que dieron lugar a cambios en la secuencia de aminoácidos de MepA.

En un trabajo realizado por Schindler y col., se determinó la estructura secundaria de MepA. Estos autores además, analizaron las sustituciones aminoacídicas presentes en cepas de *S. aureus* expuestas a distintos sustratos de MepA, como colorantes y biocidas; y encontraron que la mayoría de las sustituciones presentes en los aislamientos que incrementaron la capacidad eflujo se localizaban dentro de la mitad cercana al extremo carboxi terminal y más cerca de la cara citoplasmática de la proteína (Schindler y col., 2013a). Utilizando este esquema de la estructura secundaria de MepA, y posicionando en el mismo las mutaciones halladas en nuestro estudio (Figura 28), se pudo observar una distribución diferente de las sustituciones aminoacídicas a las previamente

reportadas. Las mismas se ubicaron a lo largo de toda la cadena de aminoácidos de una manera más aleatoria, con un ligero predominio en la región intramembrana. Además, el tipo de mutaciones encontradas en nuestro trabajo difiere de las encontradas por Schindler, pudiendo estar esto relacionado con el sustrato al que fueron expuestas las cepas. La única coincidencia fue una sustitución en el aminoácido alanina en la posición 161, pero en nuestro caso cambió por treonina y en el caso del estudio citado cambió por valina. Por lo tanto, se evidencia que pueden existir una variedad de mutaciones en MepA con diversas localizaciones, teniendo de todos modos la capacidad de afectar la funcionalidad de esta proteína. En el trabajo llevado a cabo por McAleese y col., en mutantes de *S. aureus* con disminuida sensibilidad a TIG, obtenidas mediante la exposición a TIG, si bien se reportó un incremento en la expresión de *mepA*, no se estudiaron las posibles mutaciones en este gen (McAleese y col., 2005).

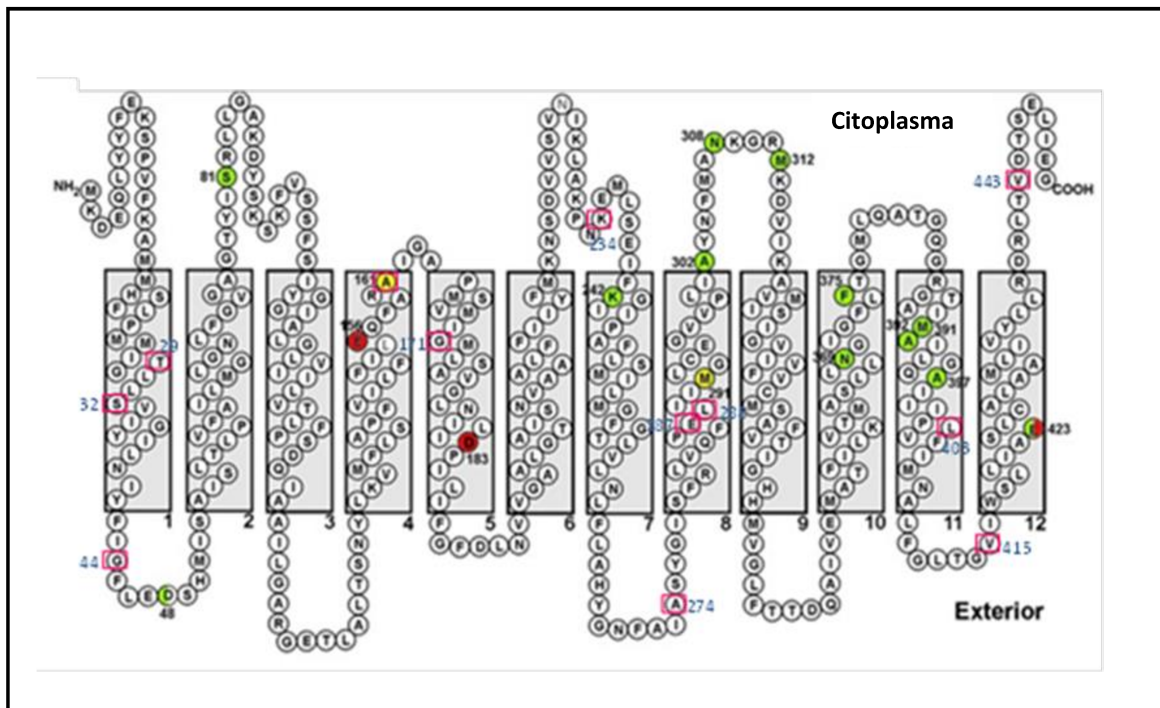


Figura 28. Imagen tomada de Schindler y col., 2013a, donde se muestra la estructura secundaria de MepA con las mutaciones encontradas por dichos autores. Se señalan en color verde (resultaron en un incremento del 50% en la actividad eflujo), amarillo (resultaron en un incremento menor al 50% de la actividad eflujo) y rojo (resultaron en menor actividad eflujo). Con un rectángulo rosado se señalan los aminoácidos que sufrieron sustituciones en nuestro trabajo (Figura modificada de Schindler y col., 2013a).

El análisis comparativo de las secuencias del gen *mepR* entre cepas parentales y mutantes resistentes a TIG, también permitió detectar una variedad de alteraciones nucleotídicas en este gen, incluyendo transiciones, transversiones, deleciones y adiciones. En la mayoría de los SARTm (9/12) se observaron distintas mutaciones en las secuencias de nucleótidos de *mepR*, dando lugar a una variedad de cambios aminoacídicos en la proteína traducida. Por un lado, se detectaron mutaciones con cambio de sentido en la secuencia de la proteína MepR (en 5/9 SARTm) y por otro lado se detectó la aparición de un codón de terminación prematuro (en 4/9 SARTm) que resultaría en la producción de una proteína truncada.

Además, en 2/12 SARTm se observaron deleciones de nucleótidos en la secuencia del gen *mepR*. En uno de ellos, se perdieron 72 pb que resultó en la pérdida de 24 aminoácidos en la proteína MepR, mientras que en otro SARTm, la delección de un solo nucleótido resultó en la aparición de un codón de *stop* en MepR. Por último, en la secuencia de *mepR* de un SARTm se detectó la adición de un fragmento de 12 pb, que produjo la aparición de 4 aminoácidos adicionales en MepR.

Como se puede observar, los cambios nucleotídicos encontrados en *mepR* fueron versátiles, afectando de manera diversa a la proteína MepR, ya sea a través de la presencia de mutaciones de aminoácidos con cambio de sentido o por la aparición de un codón de *stop* que marca la terminación prematura de la traducción a proteína. Además, las deleciones o adiciones de aminoácidos en MepR, también producirían una proteína alterada tanto estructural como funcionalmente.

En el trabajo de McAlesse y col. (McAleese y col., 2005), se analizaron las secuencias de *mepR* en mutantes de *S. aureus* expuestos a TIG, detectando diferentes mutaciones en *mepR* a las encontradas en esta tesis. Esto sugiere, que las alteraciones nucleotídicas ocurridas en el gen *mepR*, como consecuencia de la presión selectiva de TIG, no estarían confinadas a un tipo específico de mutación, sino que este gen puede verse afectado por un espectro diverso de alteraciones.

En dos de los SARTm que mostraron diferentes mutaciones en MepA y MepR, se evaluó la expresión del gen *mepA* con respecto a su aislamiento parental, mediante RT-qPCR. Los SARTm elegidos para esta determinación fueron el par 94159p-94159m, en cuya mutante se detectó una mutación sin sentido en MepR, dada por la presencia de un

codón de *stop* en la posición 25 de la proteína. Además, esta cepa presentó la mutación Thr29Ile en MepA. El otro par evaluado fue el 2028p-2028m, en cuya mutante se observó una mutación por cambio de sentido, dada por la sustitución Arg79His en MepR; mientras que en MepA presentó la mutación Thr29Ile sumada a Glu287Gly. En ambos SARTm, se observó un incremento estadísticamente significativo en el nivel de expresión del gen *mepA* con respecto a los aislamientos parentales.

La sobreexpresión de *mepA* evidenciada en los aislamientos resistentes a TIG estudiados en esta tesis, concuerda con resultados obtenidos por otros autores, que han evaluado la expresión de *mepA* en *S. aureus*, luego de la exposición a diversos sustratos. En el trabajo de McAlesse y col. (McAleese y col., 2005) se detectó un aumento en la expresión del gen *mepA* en mutantes de *S. aureus* resistentes a TIG obtenidos *in vitro*. Por otra parte, Kaatz y col., encontraron un nivel aumentado de expresión de *mepA* en *S. aureus* expuestos a norfloxacin y a moxifloxacin más BE (Kaatz y col., 2005). En ese caso, el análisis de las mutantes de *S. aureus* que sobreexpresaron el gen *mepA*, reveló al igual que nuestros resultados, mutaciones en MepR y la introducción de un codón de *stop* prematuro con la producción consecuente de una proteína truncada.

Se ha demostrado que MepR ejerce su acción represora sobre la bomba de eflujo MepA por su unión específica sobre el gen *mepA*, evitando de esta manera que se lleve a cabo su transcripción, con la consiguiente represión de la producción de la proteína MepA. Se ha visto también, que en presencia de sustratos de MepA se altera la interacción de MepR con su región específica en *mepA*, aumentando por lo tanto la expresión de este gen (Kaatz y col., 2006).

En un estudio llevado a cabo por Kumaraswami y col., se determinó la estructura secundaria de MepR, representada por 6 hélices α y dos láminas β (Kumaraswami y col., 2009). Teniendo en cuenta esta estructura, se pudo observar que la mayoría de las sustituciones de aminoácidos en MepR detectadas en los SARTm (4/6) se encontraron en la región del dominio de unión a *mepA*, integrado por las hélices α_3 , α_4 , β_1 y β_2 . De esta manera, la alteración aminoacídica en el sitio de unión al ADN, podría tener implicancia sobre la alteración de la interacción de MepR con *mepA*, lo que conduce a una desregulación en la expresión de *mepA*, llevando a un incremento en la actividad eflujo.

Por otro lado, el análisis de aislamientos clínicos de *S. aureus*, así como también de cepas seleccionadas *in vitro* que sobreexpresan el gen *mepA*, han mostrado tener una relación con la función defectiva del represor MepR. Sin dudas, esta pérdida de la función se ha relacionado con la producción de una proteína truncada o a la presencia de sustituciones de aminoácidos que afectan la interacción de MepR con *mepA* (Schindler y col., 2013b). A diferencia de lo hallado en esta tesis, estos autores no encontraron mutaciones en el dominio de unión de MepR, sino en el sitio que conecta el dominio de dimerización con el dominio de unión.

Se ha reportado además, que aislamientos clínicos de *S. aureus* expuestos a bajas concentraciones de diversos agentes biocidas y colorantes, ya sea en un simple paso o por incremento gradual de las concentraciones, han sobreexpresado genes codificantes de diversas bombas de eflujo con predominancia de *mepA*. La sobreexpresión de *mepA* en estos casos, fue asociada a mutaciones puntuales en el gen *mepR*, alterando su actividad regulatoria. Las principales alteraciones encontradas en estos casos en el gen *mepR*, fueron la aparición prematura de un codón de terminación (Huet y col., 2008).

Por todo lo expuesto, parecería claro entonces que las diversas alteraciones en MepR podrían dar como resultado una alteración funcional en la proteína, afectando su actividad represora sobre *mepA*, permitiendo de esta manera su transcripción y sobreexpresión en los SARTm, como consecuencia de la exposición a TIG. Por otra parte las mutaciones encontradas en MepA podrían estar contribuyendo con el incremento de actividad eflujo al afectar la interacción entre *mepA* y MepR o alterando la funcionalidad de la bomba de manera directa.

La bomba de eflujo NorB confiere resistencia a tetraciclinas y fluoroquinolonas entre otros agentes antimicrobianos, y se ha observado además, mediante un modelo de absceso subcutáneo en ratones, que desempeña un rol en el *fitness* y la patogénesis de *S. aureus* (Ding y col., 2008). Debido a que TIG es un antibiótico derivado de las tetraciclinas, podría ser también un sustrato para esta bomba, razón por la cual se incluyó para el estudio molecular. Como resultado del análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas del gen *norB*, se observó un 100% de homología entre las secuencias de los SARTm y las correspondientes a los aislamientos parentales. Sumado a esto, en los ensayos de cuantificación por RT-qPCR realizados en dos parejas de aislamientos, no se observó un aumento de la expresión de esta bomba.

El análisis de la expresión del gen *norB* en el par 2028p-2028m mostró una disminución significativa en la expresión de este gen en la cepa mutante con respecto a la parental. En el otro par de cepas estudiado (94159p-94159m), si bien no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa, se puede observar una tendencia a un menor nivel de expresión en la cepa mutante. Se podría postular que esta disminución de la expresión de la bomba de eflujo NorB estaría probablemente compensando el aumento en la expresión de MepA, ya que comparten algunos sustratos.

Es importante resaltar entonces que la exposición a diversos agentes antimicrobianos (TIG, y algunas fluoroquinolonas, entre otros), puede llevar a la selección de mutantes que sobreexpresen la bomba de eflujo MepA en aislamientos clínicos de *S. aureus*. Además, debido a que esta bomba de eflujo tiene como sustratos también a una variedad de agentes biocidas, la resistencia a los mismos le daría la capacidad a estos aislamientos de sobrevivir y persistir en ambientes químicamente más hostiles, como el hospitalario, con el consecuente riesgo en los pacientes de adquirir estos organismos.

CAPÍTULO 5

Evaluación de la movilización de IS256. Secuenciación de genomas completos y análisis de mutaciones

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1- Evaluación de la transposición de la secuencia de inserción IS256

Con la finalidad de evaluar si la presión selectiva ejercida por TIG sobre los aislamientos de *S. aureus* estudiados tiene consecuencias sobre la transposición de la secuencia de inserción IS256, se llevaron a cabo ensayos mediante *Southern blot*, para detectar la presencia y distribución de IS256 a lo largo del cromosoma. Estos ensayos se realizaron en las cepas 94159 y 2028 tanto parentales como mutantes resistentes a TIG. Se utilizó una sonda específica para IS256, y se hibridó sobre el perfil de macrorestricción obtenido por PFGE con la enzima *SmaI* y el perfil de restricción obtenido con *EcoRI*. Además, el nivel de expresión del gen que codifica para la enzima transposasa de IS256 (*tnp*) se determinó mediante RT-qPCR.

5.1.1- Detección de IS256 por PCR

Se amplificó mediante PCR el gen de la transposasa (*tnp*) de IS256, con la finalidad de generar sondas específicas para la realización posterior de *Southern blot*.

Se preparó la siguiente mezcla de reacción para un volumen final de 25 μ L.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (μ L)	Concentración final
H ₂ O milliQ	-	14,25	csp 25 μ L
<i>Buffer</i>	10 X	2,5	1 X
MgCl ₂	25 mM	5	5 mM
dNTP	10 mM	0,5	200 μ M
IS256-1	10 μ M	0,75	0,3 μ M
IS256-2	10 μ M	0,75	0,3 μ M
ADN	50 ng/ μ L	1	2 ng/ μ L
<i>Taq pol</i>	5 U/ μ L	0,25	1,25 U

csp: cantidad suficiente para preparar.

En cada tubo de PCR se adicionó 24 µL de la mezcla de reacción y se agregó 1 µL de ADN. Se utilizaron los oligonucleótidos descritos por Valle y col., (Valle y col., 2007), cuyas secuencias se muestran en la Tabla 43. Se siguió el siguiente protocolo de ciclad.

Protocolo de ciclado

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

} 30 ciclos

Tabla 43. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la detección de IS256.

Oligonucleótidos	Secuencias (5' - 3')	Tamaño de amplicón (pb)
IS256-1	CCGACAAAGTCAACGAAA	922
IS256-2	GGCTGATGTTTGATTGGG	

5.1.2- Southern blot sobre el perfil de restricción obtenido con SmaI

5.1.2.1- Transferencia del ADN

Posteriormente a la realización de PFGE (descrito en Capítulo 2), el gel de agarosa obtenido se cortó de manera de eliminar las áreas no deseadas y se llevó a cabo la depurinización de los fragmentos de ADN. Para esto, se trató el gel con HCl 0,2 N durante 15 min, con agitación constante. Luego, se lavó con agua destilada y se realizaron dos lavados de 15 min cada uno en una solución de NaCl 3 M y NaOH 0,4 N, para lograr la desnaturalización del ADN. Posteriormente, se transfirió el ADN contenido en el gel de agarosa, a una membrana de nitrocelulosa Hybond TM-N+. Previo a esto, se procedió a cortar la membrana del tamaño adecuado según el gel y se equilibró en *buffer* de transferencia (NaOH 8 mM, NaCl 3 M) y se armó un sistema para lograr la transferencia (equipo *blotting*). Este consistió en colocar en un recipiente con

buffer de transferencia, un puente de papel secante, el gel y por encima la membrana. Se cubrió con dos papeles *blot* saturados en *buffer* de transferencia (*Extra Thick Blot Bio-Rad*), y por encima se colocaron aproximadamente 80 hojas de papel de filtro del mismo tamaño que el gel. Por encima se colocó un vidrio, y sobre éste, un peso para ejercer presión. Se cubrió todo el sistema con papel aluminio para evitar evaporación, y se dejó toda la noche a temperatura ambiente para lograr la transferencia. La composición de los *buffers* utilizados en todo el proceso se encuentran descriptos en la sección de Anexos.

Como control de la transferencia, el gel de agarosa se tiñó nuevamente con BE 0,5 µg/mL, para ver ausencia de las bandas inicialmente presentes. Posteriormente, se lavó la membrana con *buffer* fosfato 0,25 M pH = 7,00. Se secó la membrana en estufa a 80°C, durante 10 min, para lograr la fijación del ADN transferido (Green y Sambrook, 2012).

5.1.2.2- Preparación de sondas

Para obtener la sonda específica, los productos de amplificación *tnp* de IS256 obtenidos por PCR, se marcaron al azar con digoxigenina, siguiendo las recomendaciones del kit comercial *DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche Applied Science, Germany)*. Para ello, se desnaturalizaron 16 µL de ADN a marcar a una concentración de entre 10 ng y 3 µg, mediante calentamiento en baño de agua a 100°C durante 10 min y se enfrió en hielo rápidamente por 2 min. Se homogeneizó el vial 1 *Dig-High Prime* y se agregaron 4 µL del ADN desnaturalizado. Se mezcló y se incubó toda la noche a 37°C. Se terminó la reacción de marcación por calentamiento a 65°C durante 10 min.

5.1.2.3- Hibridación

Se calculó la temperatura de hibridación mediante la siguiente fórmula.

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

$$T^\circ \text{ óptima} = T_m - (20 \text{ a } 25^\circ\text{C})$$

Se precalentó un volumen apropiado de *DiG Easy Hyb* (10 mL cada 100 cm² de membrana) y se llevó a cabo una pre-hibridación, durante 30 min en agitación. Se utilizaron 25 ng de sonda por cada mL de *DiG Easy Hyb*. Se desnaturalizó la sonda marcada, calentando 5 min a ebullición y enfriando rápidamente sobre hielo. Se agregó la sonda desnaturalizada a *DiG Easy Hyb* (3,5 mL por cada 100 cm² de membrana) y se mezcló completamente. Se descartó la solución de pre-hibridación y se agregó la sonda. Se realizó la hibridación, con agitación en horno de hibridación, durante 4 h a la temperatura óptima calculada. Posteriormente, se realizaron diferentes lavados, que consistieron en lavar 3 veces durante 5 min en SSC 2 X, SDS 0,1% a 15-25°C en agitación y 3 veces durante 15 min en agitación constante con SSC 0,5 X, SDS 0,1%, previamente precalentado a 65°C.

5.1.2.4- Detección inmunológica

Se humedeció la membrana en *buffer* de lavado durante 1 a 5 min y se incubó durante 30 min en solución de bloqueo, luego se incubó durante 30 min en 20 mL de solución de anticuerpo (diluido 1:10 000 en solución de bloqueo). Se lavó dos veces durante 15 min en *buffer* de lavado y se equilibró por 2 a 5 min en *buffer* de detección. Posteriormente, se colocó la membrana sobre film y se dejó durante 5 min a 15-25°C. Se incubó luego a 37°C durante 10 min para aumentar la reacción luminiscente. Se reveló mediante exposición en película fotográfica.

5.1.3- Southern blot a partir del perfil de restricción obtenido con *EcoRI*

5.1.3.1- Digestión con *EcoRI*

La digestión del ADN bacteriano se realizó con la enzima de restricción *EcoRI*. Se llevó a cabo en un volumen total de 20 µL, conteniendo 2 µL de *buffer EcoRI* 10 X (*Thermo Fisher Scientific*), 1 µL de *EcoRI* (*Thermo Fisher Scientific*), 5 µL de ADN y 12 µL de H₂O milliQ. Se incubó a 37°C *overnight*. Los fragmentos de ADN obtenidos fueron resueltos realizando una corrida electroforética en gel de agarosa al 0,7% en *buffer* TBE 0,5 X durante 5 h.

5.1.3.2- Transferencia del ADN

La transferencia de los fragmentos de ADN obtenidos luego de la digestión con *EcoRI* se realizó en un equipo *Transblot SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad). Para el ensamblado de la unidad de transferencia se saturaron dos papeles de *blot* (*Extra Thick Blot*, provistos por el equipo comercial) en *buffer* TBE 0,5 X. Se cortó la membrana de transferencia (*Zeta-Probe*) y se equilibró durante al menos 10 min. El gel, la membrana de transferencia y los papeles *blot* deben tener el mismo tamaño. Se eliminó el exceso de *buffer* del papel *blot* y se apoyó en la superficie del ánodo de platino. Con una pipeta limpia se eliminaron las burbujas que pudieran quedar atrapadas en el papel. Por encima del papel se colocó la membrana de transferencia equilibrada, asegurándose que todos los bordes estuvieran alineados.

Posteriormente, se colocó el gel sobre la membrana. Se tomó el segundo papel, se eliminó el resto de *buffer* y se colocó sobre el gel. Se agregaron 15 mL de *buffer* de transferencia (TBE 0,5 X). Se colocó el soporte de la estructura sobre toda la pila de gel/membrana/papel *blot* y se conectó el cátodo y toda la unidad a una fuente de poder. Debido a que se utilizó un gel de 85 cm², la transferencia se realizó durante 10 min a 300 mA.

Luego de transcurrido el tiempo de transferencia, se desarmó toda la unidad y se descartó el papel *blot*, recuperando la membrana. Se lavó la membrana con *buffer* SSC 2 X.

Para lograr la fijación del ADN, se saturó un papel *blot* con NaOH 0,4 N y se colocó la membrana sobre la almohadilla saturada durante 5 min. Se volvió a lavar la membrana con *buffer* SCC 2 X. Posteriormente, se secó la membrana en estufa a 80°C durante 30 min. Luego se fijó el ADN a la membrana mediante exposición a la luz UV durante 10 seg.

Se llevó a cabo la hibridación con la sonda de *tnp* de IS256 de la misma manera como se mencionó en el punto 5.1.2.3.

5.2- Evaluación del nivel de expresión del gen codificante de la transposasa (*tnp*) de IS256

Se llevó a cabo RT-qPCR para evaluar la expresión del gen codificante de la transposasa de IS256 en las cepas en estudio (94159 y 2028) y detectar diferencias entre la cepa parental y su mutante resistente a TIG.

La extracción del ARN, y la RT-qPCR se realizó de la misma manera que se describió en materiales y métodos del Capítulo 4. La amplificación por q-PCR del gen *tnp* se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos descritos por Valle y col., (Valle y col., 2007), cuyas secuencias se muestran en la Tabla 44.

Tabla 44. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de *tnp* por qPCR.

Oligonucleótidos	Secuencias (5' - 3')	Tamaño de amplicón (pb)
<i>tnp</i> Fw	GGATTCGAAGACGCCTTTCAA	85
<i>tnp</i> Rv	GATTCAGTCGTTCAATTAGATTGGTACTC	

5.3- Secuenciación de genomas completos

Las cepas 94159 y 2028, tanto parentales como mutantes resistentes a TIG fueron seleccionadas para realizar la secuenciación completa de sus genomas, utilizando la metodología de *Whole Genome Sequencing* (WGS) con la plataforma de *Illumina MiSeq*, en el servicio de secuenciación de *Genome Quebec* en Montreal, Canadá. El análisis *in silico* de las secuencias obtenidas se realizó mediante herramientas bioinformáticas, focalizando el análisis en el estudio de alteraciones en la movilización de secuencias de inserción y en la búsqueda de mutaciones en diversos genes de interés.

La plataforma de *Illumina MiSeq* utiliza un método de secuenciación por síntesis con terminadores reversibles. En este caso, se requiere la extracción de ADN genómico para posteriormente dividirlo en fragmentos y construir una biblioteca genómica. Estos

fragmentos se unen a una superficie sólida conocida como *flow cell*, donde se adicionan secuencias adaptadoras, que permitirán realizar la amplificación de estas regiones por PCR en fase sólida. Posteriormente, se produce la amplificación clonal de estos fragmentos, generando lo que se denomina *clusters*. Luego de la amplificación se obtendrán más de 40 millones de *clusters* que contienen cada uno aproximadamente 1000 copias clonales de la molécula usada como templado. Se lleva a cabo luego la secuenciación masiva en paralelo de estas moléculas, empleando un método de secuenciación de ADN por síntesis, que emplea terminadores reversibles con marcadores fluorescentes removibles y en presencia de una ADN polimerasa especial que permite incorporar estos terminadores a la cadena de oligonucleótidos en crecimiento. Las secuencias terminadoras son unidas a marcadores fluorescentes de cuatro colores distintos para poder distinguir entre las diferentes bases nitrogenadas y las posiciones que éstas ocupan. La secuencia del templado de cada *cluster* se deduce mediante la lectura del color en cada etapa de adición sucesiva de nucleótidos (Morozova y Marra, 2008; Bennett, 2004). Como resultado del proceso de secuenciación se obtiene un gran número de secuencias cortas (250 pb en promedio) de los distintos fragmentos clonados de ADN denominadas *reads*. Cuanto mayor es el número de *reads* obtenidos, mayor será la probabilidad de que se haya secuenciado la totalidad del genoma. Una vez obtenidas las distintas secuencias se realizó el control de calidad de los *reads* mediante el programa FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>).

5.3.1- Ensamblaje de los fragmentos de ADN

El proceso por el cual se ordenan todos los fragmentos obtenidos en una secuencia mas larga (*contigs*) se denomina ensamblaje. Para ensamblar los *reads* obtenidos durante la secuenciación y obtener los distintos *contigs* se realizó un ensamblaje *de novo*, utilizando el programa SPAdes (<http://bioinf.spbau.ru/spades>) (Bankevich y col., 2012).

5.3.2- Anotación de secuencias

Una vez realizado el ensamblaje de las secuencias se llevó a cabo la anotación del genoma. Este proceso comprende dos etapas, por un lado la anotación estructural, que incluye la predicción de regiones codificantes y por otro lado, la anotación funcional, donde se asigna una información biológica a los genes previamente identificados. La anotación del genoma se llevó a cabo mediante el programa PROKKA (Seemann, 2014) y a través del servidor RAST v.4.0 (*Rapid annotation using subsystem technology*, <http://rast.nmpdr.org/www>) (Aziz y col., 2008).

5.3.3- Análisis de secuencias de inserción

La exploración del genoma con la finalidad de detectar diferencias en el contenido de IS, entre las cepas parentales y mutantes resistentes a TIG se llevó a cabo mediante el *software* ISseeker (<http://github.com/JCVI-VIRIFX/ISseeker>) (Adams y col., 2016). También se identificaron las regiones flanqueantes a las IS en los genomas de las cepas evaluadas.

5.3.4- Análisis comparativo de las secuencias

Se realizó el análisis comparativo de las secuencias de los genomas de las cepas parentales y mutantes resistentes a TIG, buscando mutaciones o cualquier tipo de alteraciones nucleotídicas que resalten una diferencia en los SARTm con respecto a las cepas parentales. La búsqueda de mutaciones se hizo mediante el programa SnpEff (*Genetic variant annotation and effect prediction tool box*, snpeff.sourceforge.net) (Cingolani y col., 2012).

RESULTADOS

5.1- Evaluación de la transposición de la secuencia de inserción IS256

El perfil de hibridación obtenido por *Southern blot* a partir de la macrorestricción con *SmaI*, en los dos SARTm analizados (94159m y 2028m) resultó ser idéntico al de sus correspondientes aislamientos parentales. Por el contrario, al analizar el perfil de hibridación obtenido a partir de la restricción con *EcoRI*, se pudo observar un aumento en el número de bandas de IS256 en la cepa 2028m con respecto a su cepa parental (Figura 29).

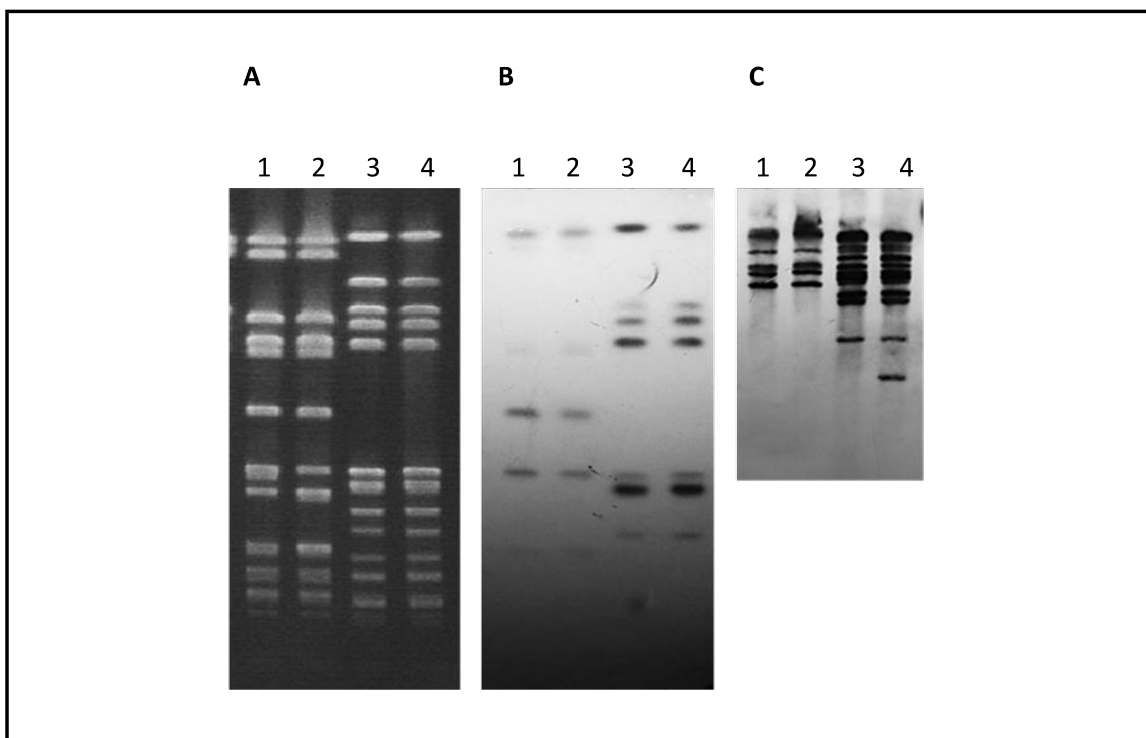


Figura 29. A) PFGE, digestión realizada con *SmaI*. B) *Southern blot* a partir de PFGE con sonda específica para IS256. C) *Southern blot* a partir de restricción con *EcoRI* con sonda específica para IS256. 1: 94159p, 2: 94159m, 3: 2028p, 4: 2028m.

5.2- Evaluación del nivel de expresión del gen codificante de la transposasa (*tnp*) de IS256

Se realizó RT-qPCR para analizar el nivel de expresión del gen *tnp* en las cepas 2028 y 94159 parentales y mutantes resistentes a TIG. Se observó un aumento significativo en la expresión del gen *tnp* en la cepa 2028m con respecto a su cepa parental ($p = 0,0082$; test de *Student*). En la cepa 94159m también se ve un aumento en la expresión del gen *tnp*, si bien el análisis estadístico no arrojó una diferencia significativa entre parental y mutante ($p = 0,2616$; test de *Student*). Los resultados obtenidos por RT-qPCR concuerdan con los observados en el *Southern blot* luego de la restricción con *EcoRI* (Figura 30). En la Tabla 45 se muestran los valores promedios de NRQ.

Tabla 45. Promedios de NRQ para el gen *mepA*.

Cepas	NRQ <i>mepA</i>	
	Promedio	<i>p</i>
94159p	0,54	0,2616
94159m	0,70	
2028p	1,20	0,0082
2028m	2,01	

p: parental, m: mutante.

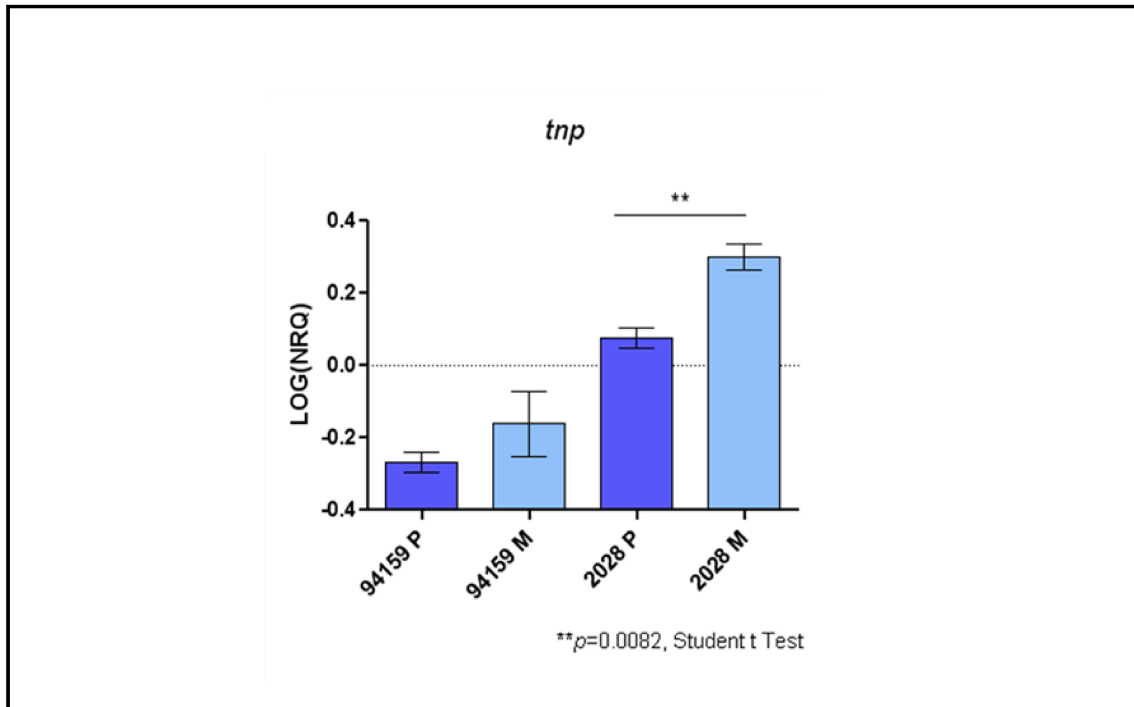


Figura 30. Nivel de expresión del gen *tnp* por RTqPCR. NRQ: Cantidad relativa normalizada. Las barras representan la media de 3 determinaciones. ** $p = 0,0082$. P: parental, M: mutante.

5.3- Secuenciación de genomas

5.3.1- Características generales del genoma

La secuenciación completa del genoma de las cepas 94159 y 2028 parentales y mutantes resistentes a TIG se realizó mediante la plataforma de *Illumina MiSeq*. En la Tabla 46 se muestran los resultados de los parámetros métricos obtenidos luego del ensamblaje del genoma. El N50 es una medida de la calidad del ensamblaje y representa la longitud del *contig* más pequeño dentro de los de mayor tamaño, que es necesario para cubrir el 50% del genoma. Para calcularlo se ordenan los *contigs* de mayor a menor, se suman en ese orden hasta alcanzar el 50% del tamaño del genoma, la longitud del último *contig* añadido es el valor N50. Los valores obtenidos de todos los parámetros se correlacionan con una buena calidad del ensamblaje del genoma.

Tabla 46. Métrica del ensamblaje de genomas completos.

	94159p	94159m	2028p	2028m
Longitud del genoma (pb)	2 942 067	2 785 222	2 929 530	2 964 920
Contigs > 1000 pb	59	38	69	77
N50 (pb)	199 998	138 537	95 394	92 411
Nº de contigs en N50	4	5	10	11
Contenido de GC (%)	32,89	32,78	32,82	32,80
CDS	2 609	2 547	2 671	2 671

CDS: secuencias de ADN codificantes.

5.3.2- Análisis de secuencias de inserción

El análisis de las IS llevado a cabo mediante el programa ISseeker reveló un aumento en el número de copias de la IS256 en ambas cepas mutantes en comparación con los aislamientos parentales. El resto de las IS encontradas no mostraron cambios en el número de copias entre cepas mutantes y parentales (Tabla 47). ISseeker identifica los extremos de IS (> 97% de identidad) en los bordes de los *contigs* y anota las regiones flanqueantes basado en alineamiento de estas regiones con un genoma de referencia. Además se analizaron las localizaciones de las IS, encontrándose en algunos casos en regiones intergénicas, mientras que en otros casos se localizan dentro de un gen (Tabla 48 y 49).

En la cepa 94159m, un nuevo sitio de inserción de IS256 se localizó en la región *upstream* del gen *walR*, mientras que en la cepa 2028m se ubicó en la región *downstream* del gen codificante de una hemoperoxidasa putativa.

Tabla 47. Número de copias de IS presentes en los genomas analizados.

IS de <i>Staphylococcus</i> sp.	94159p	94159m	2028p	2028m
IS256	12	14	29	31
IS1181	6+1*	6+1*	2+3*	2+3*
IS1182	0	0	6+2*	6+2*
IS1272	2*	2*	2*	2*
IS431	1	1	2	2
ISSau1	0	0	0	0
ISSau2	3*	3*	2*	2*
ISSau3	10*	10*	21*	21*
ISSau4	0	0	0	0
ISSau5	1*	1*	3*	3*
ISSau6	1	1	0	0
ISSau8	2*	2*	4*	4*
ISSau9	0	0	0	0
ISSep1	1*	1*	1*	1*
ISSep2	1*	1*	1*	1*
ISSep3	0	0	0	0
ISSha1	0	0	0	0

*Secuencia parcial de IS dentro de un *contig* (> 97% de identidad). En color rojo se destaca el número de copias de IS256 presente en la cepa mutante.

Tabla 48. Localizaciones de IS256 en la cepa 94159 parental y mutante resistente a TIG.

94159 p y m (sitios compartidos entre parental y mutante)	94159 m (nuevos sitios de inserción)
<i>mecR1</i>	<i>tRNAasp - walR</i>
Familia DASS de anión divalente (simporter Na+) – proteína hipotética	proteína hipotética - proteína hipotética
<i>clpB</i> (proteasa ATP dependiente) – O acetil transferasa	
ABC <i>superfamily ATP binding cassette transpoter binding protein</i> – proteína hipotética	
proteína de unión al ADN putativa – proteína hipotética	
<i>glcT</i> (antiterminador transcripcional) – proteína portadora de aminoácidos	
Dehalogenasa haloacida tipo hidrolasa – proteína de membrana	
Proteína hipotética – <i>opp2B</i> (proteína de membrana)	
Proteína hipotética – <i>phoH</i>	
Proteína hipotética – proteína hipotética (2 copias)	
Proteína hipotética	

p: parental, m: mutante. Sitios de inserción intergénicos y genes interrumpidos en color rojo.

Tabla 49. Localizaciones de IS256 en la cepa 2028 parental y mutante resistente a TIG.

2028 p y m (sitios compartidos entre parental y mutante)	2028 m (nuevos sitios de inserción)
<i>xilR – mecI</i>	Hemoperoxidasa putativa- proteína hipotética
<i>tetR</i> familia de proteínas reguladoras – N hidroxiarilamina O acetil transferasa	Proteína hipotética
<i>azoR</i> (NADH azoreductasa dependiente de FMN) – gamma-glutamyltranspeptidasa	
<i>set13</i> (exotoxina 13) – <i>set12</i> (proteína tipo superantígeno)	
Lipoproteína tandem <i>Staphylococcal</i> - tandem lipoproteína	
<i>sdrD – sdrC</i>	
Proteína integral de membrana – <i>araC</i>	
Familia G3E GTPasa putativa – <i>mgrA</i> (regulador transcripcional familia <i>mar</i>)	
<i>nuc</i> (termonucleasa precursora de <i>Staphylococcus</i>)	
<i>leuA</i> (proteína relacionada a isopropilamato sintasa)	
Sensor histidina kinasa hipotético	
<i>tktA</i> (transketolasa) – proteína hipotética	
Cadena ramificada de permeasa de aminoácido BrnQ1 – transposasa	
<i>yyhQ</i> (proteína de membrana) – proteína hipotética	
zinc metalopeptidasa neutral putativa – <i>mazG</i>	
Proteína hipotética – <i>aroC</i>	
<i>Upstream rot</i> (represor de toxinas)	
<i>arsR</i> (represor del operón de resistencia a arsénico) – piridina nucleótido disulfido oxido-reductasa	
Subunidad pequeña de terminasa de bacteriófago – proteína hipotética	
<i>sprT</i> – ARNt Leu	
<i>hlgC – hlgA</i>	

gtaB – *sarH1*

Proteína hipotética (2)

Proteína de membrana (3)

Proteína hipotética – proteína hipotética
(2)

p: parental, m: mutante. Sitios de inserción intergénicos y genes interrumpidos en color rojo.

5.3.3- Análisis comparativo de las secuencias de los genomas

Se analizaron los genomas en busca de alteraciones nucleotídicas producidas como consecuencia de la presión selectiva de TIG. En las Tablas 50 y 51 se describen las mutaciones encontradas en las cepas mutantes. Para la cepa 94159 se tomó como referencia la cepa *S. aureus* N315 (N° de acceso en *GenBank*, BA000018.3), mientras que para la cepa 2028 se usó la cepa *S. aureus* TW20 (N° de acceso en *GenBank*, NC_017331).

Se confirmó la presencia de las mutaciones halladas en *mepA* y *mepR* que habían sido detectadas mediante la secuenciación de dichos genes (ver Capítulo 4). Además, se pudo observar la presencia de una mutación en el gen *rpsJ* en la cepa 94159m. Este gen codifica para una proteína ribosomal S10 en la subunidad 30S del ribosoma y se ha asociado a resistencia a TIG en *S. pneumoniae* (Lupien y col., 2015). En total se encontraron 7 mutaciones puntuales en el genoma de la cepa 94159m y 6 en el de la cepa 2028m.

Tabla 50. Mutaciones detectadas con SnpEff en la cepa 94159m.

Posición en el genoma*	Cepa <i>S. aureus</i> N315	94159p	94159m	Gen alterado/ Mutación
380 047	G	G	T	Gen <i>mepR</i> / codón de <i>stop</i> en la posición 25 de MepR
380 586	C	C	T	Gen <i>mepA</i> / mutación Thr29Ile en MepA
544 239	C	C	A	Región intergénica entre el gen de una chaperonina molecular Hsp33 y <i>cysK</i>
1 516 684	C	C	T	Gen <i>AnsA</i> / mutación Ser121Phe en $\alpha\beta$ -hidrolasa
2 005 331	C	C	T	Gen <i>hlb</i> / mutación Asn61Asn en una β - hemolisina truncada
2 005 335	A	A	G	Gen <i>hlb</i> / mutación Asn63Gly en una β - hemolisina truncada
2 308 472	T	T	A	Gen <i>rpsJ</i> / mutación Lys57Met en una proteína ribosomal S10

*Posición en el genoma de la cepa de referencia. En negrita: gen *rpsJ* asociado a resistencia a TIG.

Tabla 51. Mutaciones detectadas con SnpEff en la cepa 2028m.

Posición en el genoma*	Cepa <i>S. aureus</i> TW20	2028p	2028m	Gen alterado/ Mutación
140 595	C	C	T	Gen <i>sbnB</i> / mutación Pro52Ser
432 569	G	G	A	Gen <i>mepR</i> / mutación Arg79His en MepR
432 945	C	C	T	Gen <i>mepA</i> / Thr29Ile en MepA
433 719	A	A	G	Gen <i>mepA</i> / Glu287Gly en MepA
129 6710	G	G	A	STW20-12 200 / mutación Gly130Asp en una dihidroacetona kinasa
2 078 045	C	A	C	Región intergénica entre <i>purB</i> y <i>scpA</i>

*Posición en el genoma de la cepa de referencia.

DISCUSIÓN

En este estudio, la selección de mutantes *in vitro* de *S. aureus* resistentes a TIG fue lograda mediante la exposición a concentraciones crecientes del antibiótico, a partir de concentraciones sub-inhibitorias del mismo.

Se ha demostrado una relación entre la exposición a diversos antibióticos y la movilización de secuencias de inserción. La IS256 es una secuencia de inserción descrita en una variedad de aislamientos clínicos de *S. aureus*, que se encuentra presente en múltiples copias dentro del genoma (Dyke y col., 1992), pudiendo estar flanqueando los extremos de transposones, como en el caso del Tn4001, que lleva los determinantes de resistencia a aminoglucósidos (Lyon y col., 1987).

El *stress* provocado por la presión de los antibióticos puede desencadenar la activación o autoactivación de la transposición de la IS256, teniendo implicancia en la adquisición de resistencia a diferentes antibióticos (Nagel y col., 2011; Schreiber y col., 2013).

En este estudio se realizó el análisis de la movilización de la secuencia de inserción IS256 en dos cepas SARTm, observándose un aumento en el número de copias en una de ellas. El perfil de hibridación de *Southern blot*, luego de la digestión con *EcoRI* mostró un aumento en el número de bandas detectadas con la sonda de IS256, en la cepa 2028m con respecto a su aislamiento parental. Estos resultados concuerdan con la evaluación de la expresión del gen *tnp*, que codifica para la transposasa de IS256. El nivel de expresión de este gen fue significativamente mayor en la cepa 2028m que en el correspondiente aislamiento parental. Por otro lado, en la cepa 94159m si bien el análisis estadístico no arrojó una diferencia significativa, se pudo observar una tendencia a una mayor expresión de *tnp* en esta cepa con respecto a la parental.

Continuando con el análisis de la movilización de IS256, se evaluó además el número de copias y los sitios de inserción mediante el análisis de las secuencias de los

genomas completos de las dos cepas estudiadas. En este caso, se detectó un aumento en el número de copias de IS256 en las dos cepas mutantes (2028m y 94159m), presentando cada una de ellas, dos copias extras de IS256 en comparación con el aislamiento parental.

Coincidiendo con nuestros resultados, varios autores han observado un incremento en la frecuencia de la transposición de IS256 en *S. aureus*, luego de la exposición a antibióticos, ya sea *in vitro* o *in vivo*. En Argentina, Di Gregorio y col., describió un aumento en el número de copias de IS256 en cepas h-VISA, recuperadas de pacientes, durante el tratamiento con VAN, y en dos cepas VISA obtenidas por pasajes seriados en presencia de VAN (Di Gregorio y col., 2016). Por otra parte, Schreiber y col., también demostró un aumento de la transposición *in vitro* de IS256, luego del tratamiento con concentraciones sub-inhedoras de cloranfenicol, linezolid y spectinomicina (Schreiber y col., 2013).

En función de los resultados obtenidos en esta tesis y sumado a lo hallado por otros autores que estudiaron el efecto de otros antibióticos, se podría decir que la presión selectiva ejercida por TIG, también estaría asociada a un incremento en la frecuencia de transposición de IS256. Este resultado tiene relevancia en el hecho de que la presencia de múltiples copias de IS256 contribuye a la variabilidad genética existente en *S. aureus*, lo que permite acelerar el desarrollo de resistencia en esta especie bacteriana (Schreiber y col., 2013).

Al realizar el análisis de los nuevos sitios de inserción de las copias extras de IS256 en las cepas mutantes, se pudo determinar que en la cepa 94159m la IS256 se localizó en la región *upstream* del gen *walR*. Es importante recordar que esta cepa mutante disminuyó su sensibilidad a VAN adquiriendo un fenotipo VISA, luego de la exposición a TIG.

Las cepas VISA han emergido en diversas partes del mundo causando gran preocupación a nivel mundial. Se ha propuesto que el mecanismo de resistencia involucrado se relaciona con la presencia de una variedad de mutaciones en genes involucrados en la biosíntesis de la pared celular, llevando a un engrosamiento de la misma. La mayoría de estas alteraciones genéticas han sido descritas en genes

reguladores como *vraSR*, *graSR*, *walKR*, *rpoB*, *cmk* (Galbusera y col., 2011; Howden y col., 2008; Shoji y col., 2011; Watanabe y col., 2011; Matsuo y col., 2013).

La transposición de IS256 ha sido asociada con rearrreglos genéticos que producen cambios fenotípicos. Dentro de estos rearrreglos se pueden producir, inactivaciones de genes, rearrreglos o reordenamientos en el ADN, deleciones cromosomales que afectan la expresión de genes de virulencia y resistencia asociada a los genes alterados por la inserción de la IS (Loessner y col., 2002).

El gen *walR* es parte del sistema regulatorio de dos componentes *walKR*, el cual está involucrado en la regulación de genes asociados al metabolismo de la pared celular (Delaune y col., 2011). La inserción de IS256 en la región promotora de *walR* fue reportado previamente, en cepas inicialmente sensibles a VAN que luego de la exposición al antibiótico adquirieron el fenotipo VISA. Además, por pérdida de la IS256, el fenotipo VISA fue revertido nuevamente a sensible. De esta manera, se demostró que la inserción de IS256 en la región promotora de *walR* conduce a la disminución de la sensibilidad a VAN (Jansen y col., 2007; McEvoy y col., 2013). Esta podría ser la causa por la que la cepa 94159m disminuyó la sensibilidad a VAN, pero a diferencia de los trabajos mencionados, en nuestro caso la movilización de la IS256 fue provocada por la exposición a TIG y no a VAN. Este hecho pone en evidencia que la presión selectiva ejercida por un determinado antibiótico no sólo aumenta la probabilidad de que se adquiera resistencia al mismo antibiótico al que está siendo expuesto, sino que también se podría ver afectada la sensibilidad a una variedad de otros antibióticos.

Por último, se analizó la presencia de mutaciones en el genoma de las dos cepas mutantes estudiadas. El número de mutaciones encontradas concuerda con lo hallado al evaluar la frecuencia mutacional, ya que este parámetro permaneció bajo, tanto en la cepa parental como en la mutante. Estos resultados coinciden con el trabajo publicado por Di Gregorio y col., donde la frecuencia mutacional de cepas VISA seleccionadas *in vitro* fue muy parecida a la de los aislamientos parentales (Di Gregorio y col., 2016).

En la cepa 94159m se detectaron 7 mutaciones puntuales con respecto al aislamiento parental, de las cuales, dos de ellas habían sido previamente descritas en este trabajo para los genes *mepA* y *mepR*.

Del resto de las mutaciones encontradas en la cepa 94159m, la más llamativa es una detectada en la posición 170 del gen *rpsJ*, que produjo un cambio Lys57Met en la proteína traducida. El gen *rpsJ* codifica para una proteína ribosómica S10. Mutaciones en la posición 178 de éste gen han sido reportadas en dos mutantes de *S. pneumoniae* resistentes a TIG. En dichos aislamientos no se encontraron alteraciones que indiquen la presencia de un mecanismo de eflujo por lo que la resistencia adquirida a TIG fue asociada a la mutación en el gen *rpsJ* entre otras halladas en el ARNr 16S (Lupien y col., 2015).

Además, en dos mutantes de *Enterococcus faecium* con sensibilidad disminuida a TIG seleccionadas *in vitro*, se encontró también una mutación en el gen *rpsJ*, que dio lugar al cambio Asp60Tyr en la proteína S10 (Cattoir y col., 2015). Por otra parte, en aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* también se detectó una mutación en el aminoácido 57 (valina en *K. pneumoniae*) de la proteína ribosomal S10, que en este caso cambió a leucina y fue asociada con resistencia a TIG en dichos aislamientos. Se ha sugerido en estos casos que la mutación en la proteína ribosomal S10 podría alterar la estructura del ribosoma, cercano al sitio de unión de TIG en la subunidad 30S, o afectar la interacción con iones Mg^{+2} , necesarios para la unión del antibiótico, llevando a una unión más débil de TIG al ARNr 16S, con la consecuente disminución de la sensibilidad (Villa y col., 2014).

En la cepa 2028m se detectaron 6 mutaciones puntuales con respecto al aislamiento parental y también se encontraron las mismas mutaciones en el gen *mepA* y *mepR* que ya habían sido detectadas previamente en este trabajo por secuenciación de los genes. Además de estas mutaciones se encontraron alteraciones en otros genes, pero no fueron asociadas con la reducción en la sensibilidad a TIG.

Al observar los resultados obtenidos en esta tesis se podría postular que el mecanismo de resistencia a TIG en los aislamientos de *S. aureus* estudiados, está relacionado en primer lugar con un incremento en la actividad de la bomba de eflujo MepA, desencadenado por la presencia de mutaciones en los genes *mepA* y en su regulador de expresión *mepR*. La mutación en el gen *rpsJ* encontrada en una de las cepas podría estar contribuyendo también a la resistencia adquirida a TIG.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Se lograron obtener 12 mutantes de *S. aureus* resistentes a TIG, seleccionados *in vitro*, mediante pasajes seriados con concentraciones crecientes del antibiótico. Estas mutantes aumentaron entre 16 y 128 veces la CIM de TIG y mantuvieron estable el fenotipo de resistencia, luego de la realización de pasajes seriados en medio de cultivo libre del antibiótico.
- El método de eficiencia de plaqueo para seleccionar mutantes resistentes, por exposición a concentraciones puntuales del antibiótico, no dio resultados para la selección de mutantes resistentes a TIG.
- La capacidad de seleccionar resistencia, debido a la presión selectiva ejercida por TIG, puede ocurrir tanto en aislamientos de SARM como en SASM, ya que 5/12 mutantes se originaron a partir de aislamientos de SARM y 7/12 correspondieron a aislamientos de SASM.
- La presión selectiva ejercida por TIG puede provocar cambios en la sensibilidad a otros antibióticos, además de TIG. En una cepa mutante (497m) se produjo un aumento en la sensibilidad a OXA, categorizándose como sensible a este antibiótico, a pesar de ser portadora aún del gen *mecA* (al igual que su correspondiente cepa parental). En otra cepa mutante (94159m), se observó un cambio en el perfil de sensibilidad a OXA, FOX y VAN. Esta cepa aumentó la CIM de OXA y FOX. Lo más destacado fue el cambio evidenciado en la sensibilidad a VAN, pasando de ser sensible, a desarrollar un fenotipo VISA.
- Mediante el estudio de la cinética de muerte en los aislamientos parentales, se confirmó el poder bacteriostático de la TIG, mostrando muy buena actividad *in vitro* a la concentración correspondiente al doble de la CIM, a las 24 h de exposición, donde ejerció una disminución del 99% (-1 y -2 log) en el recuento de células viables en 19/20 aislamientos de *S. aureus* estudiados. De acuerdo a

nuestros resultados, TIG podría ser una opción útil en las infecciones causadas por SARM, donde no se requiera actividad bactericida, teniendo en cuenta el sitio de infección, para poder lograr una buena penetración en los tejidos y alcanzar las concentraciones necesarias.

- Las cepas mutantes resistentes a TIG mostraron algunas diferencias significativas en la cinética de muerte de TIG, respecto a los aislamientos parentales. Se detectaron mayores diferencias en la velocidad de muerte a las menores concentraciones ensayadas, en las cuales las cepas mutantes se muestran más refractarias a la acción antibacteriana. En general, las diferencias entre parentales y mutantes estuvieron dadas por una menor magnitud de la velocidad de muerte de la cepa mutante a las 24 h de incubación.
- Los aislamientos de *S. aureus* parentales presentaron características genotípicas diferentes y pertenecieron a 7 diferentes linajes genotípicos. Por lo tanto, la selección de mutantes resistentes a TIG no está limitada a un solo tipo de fondo genético. En el caso de los aislamientos de SARM, predominó el CC5 (4/5), el cual está asociado a una gran plasticidad genómica, que le permite sobrevivir en diversos ambientes, diseminarse y adquirir determinantes de resistencia con mayor facilidad que otros CC.
- En una única cepa mutante se evidenció la pérdida de la funcionalidad de locus *agr*, con respecto a su aislamiento parental. Este hallazgo ocurrió en la misma mutante que modificó su fenotipo a VISA (94159m, *agr* tipo II). La asociación de la pérdida de la funcionalidad del locus *agr* con la adquisición de fenotipo VISA fue documentado previamente.
- La eficiencia metabólica en las cepas mutantes resistentes a TIG, en general no se vio afectada en gran medida. Sólo dos cepas mutantes mostraron una velocidad de crecimiento significativamente menor que los aislamientos parentales.
No se observaron cambios en la frecuencia mutacional, ni en el perfil de autólisis, en ninguna de las cepas mutantes con respecto a los aislamientos parentales. Las cepas VISA han sido asociadas a una reducida actividad

autolítica, sin embargo la cepa 94159m que adquirió fenotipo VISA, no mostró cambios en la capacidad autolítica con respecto a su aislamiento parental.

Por lo tanto, la adquisición de resistencia a TIG no se asoció a un costo significativo en el *fitness* bacteriano.

- El mecanismo de resistencia a TIG, adquirido en las cepas mutantes seleccionadas, no está asociado a modificaciones nucleotídicas en el ARNr 16S, el cual forma parte del sitio donde interacciona la TIG.
- Mediante la evaluación fenotípica de la actividad eflujo y el uso de inhibidores de bombas de eflujo, se determinó que las cepas mutantes resistentes a TIG tienen incrementada su actividad eflujo con respecto a los aislamientos parentales, lo que permite postular una mayor expulsión de TIG del interior de la célula bacteriana, con el consecuente incremento del valor de CIM.
- El análisis molecular permitió detectar la presencia de mutaciones en el gen *mepA*, que codifica para la bomba de eflujo MepA. Estas mutaciones nucleotídicas produjeron alteraciones en las secuencias de aminoácidos de la proteína traducida. Las mutaciones encontradas fueron diversas, y con diferentes localizaciones, teniendo en todos los casos, la capacidad de afectar la funcionalidad de la proteína.

También se encontraron mutaciones de diversas características (transiciones, transversiones, deleciones y adiciones) en las secuencias nucleotídicas del gen *mepR*, que actúa como un regulador transcripcional de *mepA*. Estas mutaciones originan un abanico de alteraciones en la proteína traducida, MepR. La presencia de alteraciones de diversas características demuestra que, la presión ejercida por TIG no estaría asociada a un tipo específico de mutación en este gen.

- Las dos cepas mutantes resistentes a TIG, seleccionadas para la realización de RT-qPCR, mostraron un aumento significativamente mayor en el nivel de expresión del gen *mepA*, con respecto a sus respectivos aislamientos parentales.
- La bomba de eflujo NorB no estaría involucrada en la disminución de la sensibilidad a TIG, ya que no se encontraron diferencias nucleotídicas en las

secuencias del gen *norB* entre cepas mutantes y parentales. Además, no se observó un aumento en la expresión de esta bomba en los aislamientos analizados. Por el contrario, en las mismas cepas mutantes con incremento de la expresión de *mepA* se evidenció una expresión menor del gen *norB*. De esta manera, es posible que el incremento en la expresión de *mepA* estuviera compensando la disminución de la expresión del gen *norB*.

- La presión ejercida por TIG produjo un aumento en el número de copias de IS256, en las dos mutantes seleccionadas para el estudio de la movilización de IS256, confirmándose dos copias extras en cada una de ellas. Además, en las cepas mutantes se detectó un incremento en el nivel de expresión del gen que codifica para la transposasa de IS256 (*tnp*).
- Mediante el análisis bioinformático de los genomas completos, no se encontraron cambios en el número de copias de otras secuencias de inserción.
- En la cepa 94159m, la cual adquirió fenotipo VISA se detectó un nuevo sitio de inserción de IS256 en la región *upstream* del gen *walR*. La inserción de IS256 en la región promotora de este gen ha sido asociado a la adquisición del fenotipo VISA. Por lo tanto, la movilización de la IS256 como consecuencia de la exposición a la presión selectiva con TIG, puede provocar rearrreglos genéticos, que llevarían a la modificación de la sensibilidad a otras familias de antimicrobianos.
- El análisis comparativo de los genomas completos permitió la detección de un número relativamente bajo de mutaciones puntuales (sustituciones) en las dos cepas estudiadas. Algunas de las mutaciones encontradas mediante este análisis se correspondieron con las halladas en los genes *mepA* y *mepR*.
- En la cepa 94159m se detectó una sustitución en la posición 170 del gen *rpsJ*, que dio como resultado un cambio Lys57Met en la proteína traducida, la cual corresponde a la proteína ribosómica S10. Otros trabajos han asociado alteraciones en esta proteína con disminución de la sensibilidad a TIG, en otras especies bacterianas.

ANEXOS

ANEXOS

Buffers utilizados para PFGE

✓ **Buffer PIV (10 mM Tris pH 8,0-0,1 M NaCl)**

5 mL de solución stock 1 M Tris, pH = 8,0 + 29,2 g de Cloruro de Sodio. Agregar agua destilada hasta completar un volumen de 500 mL. Autoclavar.

✓ **Buffer EC**

Tris 6 mM, pH = 8,0: 3 mL de solución de stock 1 M Tris pH = 8,0

NaCl 1 M: 29,2 g

EDTA 100 mM, pH = 8,0: 100 mL de solución de stock 0,5 M EDTA, pH = 8,0

Deoxicolato-Na 0,2%: 1 g de deoxicolato-Na

Laurilsarcosina-Na 0,5%: 25 g de laurilsarcosina-Na

Brij-58 0,5%: 2,5 g de Brij-58

Agregar agua destilada hasta completar un volumen de 500 mL. Autoclavar.

✓ **Buffer EC-lisis (Buffer EC + RNAsa + Liozima + Lisostafina)**

Stock	1 plug	10 plugs	15 plugs	20 plugs	Conc. final
Buffer EC	1 mL	10 mL	15 mL	20 mL	1 X Buffer EC
10 mg/mL RNAsa A	5 µL	50 µL	75 µL	100 µL	50 µg/mL RNAsa A
20 mg/mL liozima	5 µL	50 µL	75 µL	100 µL	100 µg/mL liozima
10 mg/mL lisostafina	5 µL	50 µL	75 µL	100 µL	50 µg/mL lisostafina

✓ **Buffer ES (0,25 M EDTA, pH = 9,0-Laurilsarcosina-Na)**

Pesar 93,1 g de EDTA y disolver en 400 mL de agua destilada. Ajustar el pH = 9,0 por el agregado de aproximadamente 10 g de grageas de NaOH. Agregar 5 g de laurilsarcosina-Na. Ajustar el volumen a 500 mL con agua destilada. Autoclavar.

✓ **Buffer ES-P (Buffer ES + Proteinasa K)**

Stock	1 plug	10 plugs	15 plugs	20 plugs	Conc. final
Buffer ES	1 mL	10 mL	15 mL	20 mL	1 X Buffer ES
Proteinasa K	1 mg	10 mg	15 mg	20 mg	1 mg/mL proteinasa K

✓ **Buffer Pre-SmaI**

Tris 6 mM: 3 mL de solución de stock 1 M pH = 8,0

MgCl₂.6H₂O 6 mM: 0,60993 g

KCl 20 mM: 0,7456 g

Agregar agua destilada hasta completar un volumen de 500 mL. Autoclavar.

✓ **Buffer TBE (Tris-Borato-EDTA) 10 X**

Pesar 108 g de triazima base, 55 g de ácido bórico y adicionar 40 mL de EDTA 0,5 M pH = 8,0. Agregar agua destilada hasta completar un volumen de 1 L. Autoclavar.

✓ **Buffer TBE 0,5 X**

Tomar 100 mL de la solución de stock de TBE 10 X y agregar agua destilada hasta completar un volumen de 2 L.

Buffers utilizados para la extracción de ADN

✓ **TE (Tris-EDTA 10:1)**

Tris 10 mM pH = 7,5 + EDTA 1 mM pH = 8,0 (10 mL de stock Tris 1M, pH = 7,5 y 2 mL de stock 0,5 M EDTA, pH = 8,0). Agregar agua destilada hasta 1 L y autoclavar.

- Stock Tris 1 M, pH = 8: pesar 121,1 g de triazima base y agregar 800 mL de agua destilada. Ajustar a pH = 8 por el agregado de aproximadamente 42 mL de HCl concentrado. Ajustar el volumen a 1 L con agua destilada. Autoclavar.
- Stock Tris 1 M, pH = 7,5: pesar 121,1g de triazima base y agregar 800 mL de agua destilada. Ajustar a pH = 7,5 por el agregado de HCl concentrado. Ajustar el volumen a 1 L con agua destilada. Autoclavar.
- Stock EDTA 0,5 M, pH = 8,0: pesar 186,1g de EDTA (sal disódica, PM = 372,2 g/mol), agregar 800 mL de agua destilada. Mezclar y ajustar el pH = 8,0 con aproximadamente 20 g de grageas de NaOH. Ajustar el volumen a 1 L con agua destilada. Autoclavar.

✓ **TES (Tris-EDTA-Sacarosa)**

Buffer TE + 50% de sacarosa (50 g en 100 mL).

Buffers utilizados para la electroforesis en gel de agarosa

✓ **TAE (Tris-Acetato-EDTA)**

Se prepara una solución 50 X y se usa 1 X (40 mL de la solución madre en 2 L de agua destilada).

- TAE 50 X: 242 g de Tris base + 37,2 g EDTA-Na₂·2H₂O. Disolver en 57,1 mL de ácido acético glacial y 800 mL de agua destilada. Llevar a pH = 8,5 con NaOH. Llevar a 1 L y autoclavar.

Buffers utilizados para los ensayos de autólysis

✓ **Buffer Glicina 50 mM-Triton X-100 0,01%**

A 50 mL de la solución de stock de glicina 1M se le agregó 100 µL de Tritón X-100. Se agregó agua destilada hasta 1 L. Autoclavar.

- **Stock Glicina 1 M:** pesar 75,07 g de glicina. Agregar 800 mL de agua destilada. Llevar a pH = 8,0. Ajustar el volumen a 1 L con agua destilada. Autoclavar.

Buffers utilizados para la transferencia de geles

✓ **Buffer de desnaturalización 0,4 N NaOH, 3M NaCl**

Pesar 35,064 g de NaCl y 3,2 g de NaOH. Disolver en 200 mL de agua destilada.

✓ **Buffer de transferencia 8 mM NaOH, 3 M NaCl**

Pesar 70,128g de NaCl y 0,128 g de NaOH. Disolver en 400 mL de agua destilada.

✓ **Buffer fosfato 0,25 M pH = 7,00**

Mezclar 19,6 mL de solución de fosfato A y 60,8 mL de solución de fosfato B. Llevar a un volumen de 100 mL con agua destilada.

Buffers utilizados en hibridación para Southern Blot

✓ **SSC 20 X:** NaCl 3 M - Citrato de Sodio 300 mM pH = 7,00.

✓ **Washing Buffer:** Ácido Maleico 0,1 M - NaCl 0,15 M - pH = 7,50 - Tween 20 0,3% v/v.

- ✓ **Maleic Acid Buffer:** Ácido Maleico 0,1 M - NaCl 0,15 M - pH = 7,50. Ajustar pH con NaOH.

- ✓ **Detection Buffer:** Tris-HCl 0,1 M - NaCl 0,1 M - pH = 9,50.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Aanensen, D.M.; Feil, E.J.; Holden, M.T.; Dordel, J.; Yeats, C.A.; Fedosejev, A.; Goater, R.; Castillo-Ramírez, S.; Corander, J.; Colijn, C.; Chlebowicz, M.A.; Schouls, L.; Heck, M.; Pluister, G.; Ruimy, R.; Kahlmeter, G.; Åhman, J.; Matuschek, E.; Friedrich, A.W.; Parkhill, J.; Bentley, S.D.; Spratt, B.G. y Grundmann, H. European SRL Working Group. (2016) *Whole-Genome Sequencing for Routine Pathogen Surveillance in Public Health: a Population Snapshot of Invasive Staphylococcus aureus in Europe*. MBio.7: pii: e00444-16.

Adams, M.D.; Bishop, B. y Wright, M.S. (2016) *Quantitative assessment of insertion sequence impact on bacterial genome architecture*. Microb. Genom. 2: e000062.

Alekshun, M.N. y Levy, S.B. (2007) *Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance*. Cell. 128: 1037-1050.

Alibayov, B.; Baba-Moussa, L.; Sina, H.; Zdenkova, K. y Demnerova, K. (2014) *Staphylococcus aureus mobile genetic elements*. Mol. Biol. Rep. 41: 5005-5018.

Andersson, D.I. y Hughes, D. (2010) *Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?* Nat. Rev. Microbiol. 8: 260-271.

Andersson, D.I. y Hughes, D. (2014) *Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics*. Nat. Rev. Microbiol. 12: 465-478.

Andersson, D.I. y Levin, B.R. (1999) *The biological cost of antibiotic resistance*. Curr. Opin. Microbiol. 2: 489-493.

Aubry-Damon, H.; Soussy, C.J. y Courvalin, P. (1998) *Characterization of mutations in the rpoB gene that confer rifampin resistance in Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents. Chemother. 42: 2590-2594.

Aziz, R.K.; Bartels, D.; Best, A.A.; DeJongh, M.; Disz, T.; Edwards, R.A.; Formsma, K.; Gerdes, S.; Glass, E.M.; Kubal, M.; Meyer, F.; Olsen, G.J.; Olson, R.; Osterman, A.L.; Overbeek, R.A.; McNeil, L.K.; Paarmann, D.; Paczian, T.; Parrello, B.; Pusch,

- G.D.; Reich, C.; Stevens, R.; Vassieva, O.; Vonstein, V.; Wilke, A. y Zagnitko, O. (2008) *The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology*. BMC Genomics. 9: 75-90.
- Babinchak, T.; Ellis-Grosse, E.; Dartois, N.; Rose, G.M. y Loh, E.; Tigecycline 301 Study Group; Tigecycline 306 Study Group. (2005) *The efficacy and safety of tigecycline for the treatment of complicated intra-abdominal infections: analysis of pooled clinical trial data*. Clin. Infect. Dis. 41: 354-367.
- Banerjee, R.; Gretes, M.; Basuino, L.; Strynadka, N. y Chambers, H.F. (2008) *In vitro selection and characterization of ceftobiprole-resistant methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents. Chemother. 52: 2089-2096.
- Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A.A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A.S.; Lesin, V.M.; Nikolenko, S.I.; Pham, S.; Prjibelski, A.D.; Pyshkin, A.V.; Sirotkin, A.V.; Vyahhi, N.; Tesler, G.; Alekseyev, M.A. y Pevzner, P.A. (2012) *SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single cell sequencing*. J. Comput. Biol. 19: 455-477
- Bannerman, T.L. y Peacock, S.J. (2007) *Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive Cocci*. En: *Manual of Clinical Microbiology 9th ed* (Eds.: Murray, P.R.; Baron, E.J.; Jorgensen, J.H.; Landry, M.L. y Tenover, M.A.). ASM Press M, Washington D.C., p. 390-411.
- Bantar, C.; Di Chiara, M.; Nicola, F.; Relloso, S. y Smayevsky, J. (2000) *Comparative in vitro bactericidal activity between cefepime and ceftazidime, alone and associated with amikacin, against carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa strains*. Diag. Microbiol. Infect. Dis. 37: 41-44.
- Barberán, J.; Salso, S. y Alhambra, A. (2015) *Tigecycline: 10 years of history and still in full force*. Rev. Esp. Quimioter. 28: 61-78.
- Bassetti, M.; McGovern, P.C.; Wenisch, C.; Meyer, R.D.; Yan, J.L.; Wible, M.; Rottinghaus, S.T. y Quintana, A. (2015) *Clinical response and mortality in tigecycline complicated intra-abdominal infection and complicated skin and soft-tissue infection trials*. Int. J. Antimicrob. Agents. 46: 346-350.

- Ben-David, D.; Novikov, I. y Mermel, L.A. (2009) *Are there differences in hospital cost between patients with nosocomial methicillin-resistant Staphylococcus aureus bloodstream infection and those with methicillin-susceptible S. aureus bloodstream infections?* Infect. Control. Epidemiol. 30: 453-460.
- Bennett, S. (2004) *Solexa Ltd.* Pharmacogenomics. 5: 433-438.
- Bergeron, J.; Ammirati, M.; Danley, D.; James, L.; Norcia, M.; Retsema, J.; Strick, C.A.; Su, W.G.; Sutcliffe, J. y Wondrack, L. (1996) *Glycylcyclines bind to the high-affinity tetracycline ribosomal binding site and evade Tet(M)- and Tet(O)-mediated ribosomal protection.* Antimicrob. Agents. Chemother. 40: 2226-2228.
- Berube, B. y Bubeck Wardenburg, J. (2013) *Staphylococcus aureus α -toxin: nearly a century of intrigue.* Toxins (Basel). 5: 1140-1166.
- Bobin-Dubreux, S.; Reverdy, M.E.; Nervi, C.; Rougier, M.; Bolmström, A.; Vandenesch, F. y Etienne, J. (2001) *Clinical isolate of vancomycin heterointermediate Staphylococcus aureus susceptible to methicillin and in vitro selection of a vancomycin-resistant derivative.* Antimicrob. Agents. Chemother. 45: 349-352.
- Boles, B.R.; Horswill, A.R. (2008) *Agr-mediated dispersal of Staphylococcus aureus biofilm.* PLoS. Pathog. 4: e1000052.
- Boundy, S.; Safo, M.K.; Wang, L.; Musayev, F.N.; O'Farrell, H.C.; Rife, J.P. y Archer, G.L. (2013) *Characterization of the Staphylococcus aureus rRNA methyltransferase encoded by orfX, the gene containing the staphylococcal chromosome cassette mec (SCCmec) insertion site.* J. Biol. Chem. 288: 132-140.
- Bradford, P.A.; Weaver-Sands, D.T. y Petersen, P.J. (2005) *In vitro activity of tigecycline against isolates from patients enrolled in phase 3 clinical trials of treatment for complicated skin and skin-structure infections and complicated intra-abdominal infections.* Clin. Infect. Dis. 41: 315-332.
- Bukowski, M.; Wladyka, B. y Dubin, G. (2010) *Exfoliative toxins of Staphylococcus aureus.* Toxins. 2: 1148-1165.

Byrne, M.E.; Rouch, D.A. y Skurray RA. (1989) *Nucleotide sequence analysis of IS256 from the Staphylococcus aureus gentamicin-tobramycin-kanamycin-resistance transposon Tn4001*. Gene. 81: 361-367.

Cattoir, V.; Isnard, C.; Cosquer, T.; Odhiambo, A.; Bucquet, F.; Guérin, F. y Giard, J.C. (2015) *Genomic analysis of reduced susceptibility to tigecycline in Enterococcus faecium*. Antimicrob. Agents. Chemother. 59: 239-244.

Centers for Disease Control and Prevention. (2002) *Staphylococcus aureus resistant to vancomycin-United States, 2002*. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 51: 565-567.

Chambers, H.F. y DeLeo, F.R. (2009) *Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era*. Nat. Rev. Microbiol. 7: 629-641.

Chan, K.E.; Warren, H.S.; Thadhani, R.I.; Steele, D.J.; Hymes, J.L.; Maddux, F.W. y Hakim, R.M. (2012) *Prevalence and outcomes of antimicrobial treatment for Staphylococcus aureus bacteremia in outpatients with ESRD*. J. Am. Soc. Nephrol. 23: 1551-1559.

Chopra, I.; O'Neill, A.J. y Miller, K. (2003) *The role of mutators in the emergence of antibiotic resistant bacteria*. Drug. Resist. Updat. 6: 137-145.

Chung, M.; de Lencastre, H.; Matthews, P.; Tomasz, A. y Adamsson, M.C.I. (2000) *Molecular typing of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains*. Microbial. Drug. Resistance. 6: 189-198.

Cingolani, P.; Platts, A.; Wang le, L.; Coon, M.; Nguyen, T.; Wang, L.; Land, S.J.; Lu, X. y Ruden, D.M. (2012) *A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of Drosophila melanogaster strain w¹¹¹⁸; iso-2; iso-3*. Fly. (Austin). 6: 80-92.

Citron, D.M.; Tyrrell, K.L. y Goldstein, E.J. (2014) *Comparative in vitro activities of dalbavancin and seven comparator agents against 41 Staphylococcus species cultured from osteomyelitis infections and 18 VISA and hVISA strains*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 79: 438-440.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2007) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement*. CLSI document M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2009) *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard Eighth Edition*. CLSI document M07-A08. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012) *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard Ninth Edition*. CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2013) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement*. CLSI document M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2016) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Six Edition*. CLSI supplement M100S. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Corso, A.; Santos Sanches, I.; Aires de Sousa, M.; Rossi, A. y de Lencastre, H. (1998) *Spread of a methicillin-resistant and multiresistant epidemic clone of Staphylococcus aureus in Argentina*. Microb. Drug. Resist. 4: 277-288.

Costa, S.S.; Viveiros, M.; Amaral, L. y Couto, I. (2013) *Multidrug efflux pumps in Staphylococcus aureus: an update*. Open. Microbiol. J. 7: 59-71.

Couto, I.; Costa, S.S.; Viveiros, M.; Martins, M. y Amaral, L. (2008) *Efflux mediated response of Staphylococcus aureus exposed to ethidium bromide*. J. Antimicrob. Chemother. 62: 504-513.

Cui, L.; Tominaga, E.; Neoh, H.M. y Hiramatsu, K. (2006) *Correlation between reduced Daptomycin susceptibility and Vancomycin resistance in Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents. Chemother. 50: 1079-1082.

- D'Agata, E.M.; Webb, G.F.; Horn, M.A.; Moellering, R.C.Jr. y Ruan, S. (2009) *Modeling the invasion of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus into hospitals*. Clin. Infect. Dis. 48: 274-284.
- Da Silva Coimbra, M.V.; Teixeira, L.A.; Ramos, R.L.; Predari, S.C.; Castello, L.; Famiglietti, A.; Vay, C.; Klan, L. y Figueiredo, A.M. (2000) *Spread of the brazilian epidemic clone of a multiresistant MRSA in two cities in Argentina*. J. Med. Microbiol. 49: 187-192.
- Dean, C.R.; Visalli, M.A.; Projan, S.J.; Sum, P.E. y Bradford, P.A. (2003) *Efflux-mediated resistance to tigecycline (GAR-936) in Pseudomonas aeruginosa PAO*. Antimicrob. Agents. Chemother. 47: 972-978.
- Delaune, A.; Poupel, O.; Mallet, A.; Coic, Y.M.; Msadek, T. y Dubrac, S. (2011) *Peptidoglycan crosslinking relaxation plays an important role in Staphylococcus aureus WalKR dependent cell viability*. PLoS. One. 6: e17054.
- DeLeo, F.R.; Otto, M.; Kreiswirth, B.N. y Chambers, H.F. (2010) *Community-associated methicillin resistant Staphylococcus aureus*. Lancet. 375: 1557-1568.
- DeLeo, F.R. y Chambers, H.F. (2009) *Reemergence of antibiotic-resistant Staphylococcus aureus in the genomics era*. J. Clin. Invest. 119: 2464-2474.
- DeMarco, C.E.; Cushing, L.A.; Frempong-Manso, E.; Seo, S.M.; Jaravaza, T.A. y Kaatz, G.W. (2007) *Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes and biocides in bloodstream isolates of Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents. Chemother. 51: 3235-3239.
- Denamur, E.; Bonacorsi, S.; Giraud, A.; Duriez, P.; Hilali, F.; Amorin, C.; Bingen, E.; Andremont, A.; Picard, B.; Taddei, F. y Matic, I. (2002) *High frequency of mutator strains among human uropathogenic Escherichia coli isolates*. J. Bacteriol. 184: 605-609.
- Di Gregorio, S.; Fernandez, S.; Perazzi, B.; Bello, N.; Famiglietti, A. y Mollerach, M. (2016) *Increase in IS256 transposition in invasive vancomycin heteroresistant Staphylococcus aureus isolate belonging to ST100 and its derived VISA mutants*. Infect. Genet. Evol. 43: 197-202.

Di Gregorio, S.; Perazzi, B.; Ordoñez, A.M.; De Gregorio, S.; Foccoli, M.; Lasala, M.B.; García, S.; Vay, C.; Famiglietti, A. y Mollerach, M. (2015) *Clinical, microbiological and genetics characteristics of heteroresistant vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus bacteremia in a teaching hospital*. Microb. Drug. Resist. 21: 25-34.

Ding, Y.; Onodera, Y.; Lee, J.C. y Hooper, D.C. (2008) *NorB, an efflux pump in Staphylococcus aureus strain MW2, contributes to bacterial fitness in abscesses*. J. Bacteriol. 190: 7123-7129.

Dinges, M.M.; Orwin, P.M. y Schlievert, P.M. (2000) *Exotoxins of Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Rev. 13: 16-34.

Donlan, R.M. (2001) *Biofilms and device-associated infections*. Emerg. Infect. Dis. 7: 277-281.

Dyke, K.G.; Aubert, S. y el Solh, N. (1992) *Multiple copies of IS256 in Staphylococci*. Plasmid. 28: 235-246.

Ellis-Grosse, E.J.; Babinchak, T.; Dartois, N.; Rose, G. y Loh, E.; Tigecycline 300 cSSSI Study Group; Tigecycline 305 cSSSI Study Group. (2005) *The efficacy and safety of tigecycline in the treatment of skin and skin-structure infections: results of 2 double-blind phase 3 comparison studies with vancomycin-aztreonam*. Clin. Infect. Dis. 41: 341-353.

Enright, M.C.; Day, N.P.; Davies, C.E.; Peacock, S.J. y Spratt, B.G. (2000) *Multilocus sequence typing for characterization of methicillin resistant and methicillin susceptible clones of Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 38: 1008-1015.

Enright, M.C.; Robinson, D.A.; Randle, G.; Feil, E.J.; Grundmann, H. y Spratt, B.G. (2002) *The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 7687-7692.

Errecalde, L.; Ceriana, P.; Gagetti, P.; Erbín, M.; Duarte, A.; Rolón, M.J.; Cuatz, D.; Corso, A. y Kaufman, S. (2013) *Primer aislamiento en Argentina de Staphylococcus aureus resistente a la meticilina adquirido en la comunidad con sensibilidad intermedia a la vancomicina y no sensibilidad a la daptomicina*. Rev. Argent. Microbiol. 45: 99-103.

Falugi, F.; Kim, H.K.; Missiakas, D.M. y Schneewind, O. (2013) *Role of protein A in the evasion of host adaptive immune responses by Staphylococcus aureus*. MBio. 4: e00575-13.

Fernandez, S.; de Vedia, L.; Lopez Furst, M.J.; Gardella, N.; Di Gregorio, S.; Ganaha, M.C.; Prieto, S.; Carbone, E.; Lista, N.; Rotrying, F.; Stryjewski, M.E. y Mollerach, M. (2013) *Methicillin resistant-Staphylococcus aureus ST30-SCCmecIV clone as the major cause of community-acquired invasive infections in Argentina*. Infect. Genet. Evol. 14: 401-105.

Figueiredo, A.M.S. (2017) *What is behind the epidemiological difference between community-acquired and health-care associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus?* Virulence. On line. <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2017.1335847>.

Florescu, I.; Beuran, M.; Dimov, R.; Razbadauskas, A.; Bochan, M.; Fichev, G.; Dukart, G.; Babinchak, T.; Cooper, C.A.; Ellis-Grosse, E.J.; Dartois, N. y Gandjini, H. 307 Study Group. (2008) *Efficacy and safety of tigecycline compared with vancomycin or linezolid for treatment of serious infections with methicillin resistant Staphylococcus aureus or vancomycin-resistant enterococci: a phase 3, multicenter, double-blind, randomized study*. J. Antimicrob. Chemother. 62: 17-28.

Foster, T.J. y Hook, M. (1998) *Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus*. Trends. Microbiol. 6: 484-488.

Fowler, V.G.Jr.; Sakoulas, G.; McIntyre, L.M.; Meka, V.G.; Arbeit, R.D.; Cabell, C.H.; Stryjewski, M.E.; Eliopoulos, G.M.; Reller, L.B.; Corey, G.R.; Jones, T.; Lucindo, N.; Yeaman, M.R. y Bayer, A.S. (2004) *Persistent bacteremia due to methicillin resistant Staphylococcus aureus infection is associated with agr dysfunction and low-level in vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein*. J. Infect. Dis. 190: 1140-1149.

Friedman, L.; Alder, J.D. y Silverman, J.A. (2006) *Genetic changes that correlate with reduced susceptibility to daptomycin in Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents. Chemother. 50: 2137-2145.

Fuda, C.; Suvorov, M.; Vakulenko, S. y Mobashery, S. (2004) *The basis for resistance to beta-lactam antibiotics by penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. J. Biol. Chem. 279: 40802-40806.

Galbusera, E.; Renzoni, A.; Andrey, D.O.; Monod, A.; Barras, C.; Tortora, P.; Polissi, A. y Kelley, W.L. (2011) *Site-specific mutation of Staphylococcus aureus VraS reveals a crucial role for the VraR-VraS sensor in the emergence of glycopeptide resistance*. Antimicrob. Agents. Chemother. 55: 1008-1020.

Gardella, N.; Fernandez, S.; Di Gregorio, S.; Cuirolo, A.; Gutkind, G. y Mollerach, M. (2011) *Comparative study of clones from isolates methicillin-resistant Staphylococcus aureus prevalent in Argentina*. Rev. Panam. Salud. Publica. 30: 665-666.

Gardella, N.; von Specht, M.; Cuirolo, A.; Rosato, A.; Gutkind, G. y Mollerach, M. (2008) *Community associated methicillin resistant Staphylococcus aureus, eastern Argentina*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 62: 343-347.

Garza-González, E. y Dowzicky, M.J. (2013) *Changes in Staphylococcus aureus susceptibility across Latin America between 2004 and 2010*. Braz. J. Infect. Dis. 17: 13-19.

Gilot, P.; Lina, G.; Cochard, T. y Poutrel, B. (2002) *Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA-III activating components Agr and TRAP in a population of Staphylococcus aureus strains isolated from cows with mastitis*. J. Clin. Microbiol. 40: 4060-4067.

Gilot, P. y van Leeuwen, W. (2004) *Comparative analysis of agr locus diversification and overall genetic variability among bovine and human Staphylococcus aureus isolates*. J. Clin. Microbiol. 42: 1265-1269.

Gordon, R.J. y Lowy, F.D. (2008) *Pathogenesis of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus infection*. Clin. Infect. Dis. 46: 350-359.

Green, M.R. y Sambrook, J. (2012) *Southern Blotting*. En: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 4th Ed* (Eds.: Inglis, J.; Boyle, A. y Gann, A). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, p. 133-149.

- Hallin, M.; Deplano, A.; Denis, O.; De Mendonça, R.; De Ryck, R. y Struelens, M.J. (2007) *Validation of pulsed-field gel electrophoresis and spa typing for long-term, nationwide epidemiological surveillance studies of Staphylococcus aureus infections*. J. Clin. Microbiol. 45: 127-133.
- Harmsen, D.; Claus, H.; Witte, W.; Rothganger, J.; Claus, H.; Turnwald, D. y Vogel, U. (2003) *Typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management*. J. Clin. Microbiol. 41: 5442-5448.
- Harris, L.G.; Foster, S.J. y Richard, R.G. (2002) *An introduction to Staphylococcus aureus, and techniques for identifying and quantifying S. aureus adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review*. Eur. Cells. Mater. 4: 39-60.
- Harris-Warrick, R.; Elkana, Y.; Ehrlich, S. y Lederberg, J. (1975) *Electrophoretic separation of Bacillus subtilis genes*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 72: 2207-2211.
- Hassan, K.A.; Skurray, R.A. y Brown, M.H. (2007) *Active export proteins mediating drug resistance in Staphylococci*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 12: 180-96.
- Heizmann, W.R.; Löschmann, P.A.; Eckmann, C.; von Eiff, C.; Bodmann, K.F. y Petrik, C. (2015) *Clinical efficacy of tigecycline used as monotherapy or in combination regimens for complicated infections with documented involvement of multiresistant bacteria*. Infection. 43: 37-43.
- Herrera, M.; Mobilia, L.; Posse, G.; Limansky, A.; Ballerini, V. y Bantar C. (2013) *Comparative time-kill study of doxycycline, tigecycline, cefazolin and vancomycin against several clones of Staphylococcus aureus*. Curr. Clin. Pharmacol. 8: 332-339.
- Hiramatsu, K.; Asada, K.; Suzuki, E.; Okonogi, K. y Yokota, T. (1992) *Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of mecA gene in methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. FEBS. Lett. 24: 133-136.
- Hiramatsu, K.; Hanaki, H.; Ino, T.; Yabuta, K.; Oguri, T. y Tenover, F.C. (1997) *Methicillin resistant Staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin susceptibility*. J. Antimicrob. Chemother. 40: 135-136.
- Hiramatsu, K.; Ito, T.; Tsubakishita, S.; Sasaki, T.; Takeuchi, F.; Morimoto, Y.; Katayama, Y.; Matsuo, M.; Kuwahara-Arai, K.; Hishinuma, T. y Baba, T. (2013)

- Genomic basis for methicillin resistance in Staphylococcus aureus*. Infect. Chemother. 45: 117-136.
- Hiramatsu, K.; Katayama, Y.; Matsuo, M.; Sasaki, T.; Morimoto, Y.; Sekiguchi, A. y Baba, T. (2014) *Multidrug resistant Staphylococcus aureus and future chemotherapy*. J. Infect. Chemother. 20: 593-601.
- Hoban, D.J.; Reinert, R.R.; Bouchillon, S.K. y Dowzicky, M.J. (2015) *Global in vitro activity of tigecycline and comparator agents: Tigecycline evaluation and surveillance trial 2004-2013*. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 14: 27-43.
- Hooper, D.C. (2002) *Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci*. Lancet. Infect. Dis. 2: 530-538.
- Hososaka, Y.; Hanaki, H.; Endo, H.; Suzuki, Y.; Nagasawa, Z.; Otsuka, Y.; Nakae, T. y Sunakawa, K. (2007) *Characterization of oxacillin susceptible mecA positive Staphylococcus aureus: a new type of MRSA*. J. Infect. Chemother. 13: 79-86.
- Howden, B.P.; Davies, J.K.; Johnson, P.D.; Stinear, T.P. y Grayson, M.L. (2010) *Reduced vancomycin susceptibility in Staphylococcus aureus, including vancomycin intermediate and heterogenous vancomycin intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection and clinical implications*. Clin. Microbiol. Rev. 23: 99-139.
- Howden, B.P.; Stinear, T.P.; Allen, D.L.; Johnson, P.D.; Ward, P.B. y Davies, J.K. (2008) *Genomic analysis reveals a point mutation in the two-component sensor gene graS that leads to intermediate vancomycin resistance in clinical Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents. Chemother. 52: 3755-3762.
- Howe, R.A.; Monk, A.; Wootton, M.; Walsh, T.R. y Enright, M.C. (2004) *Vancomycin susceptibility within methicillin resistant Staphylococcus aureus lineages*. Emerg. Infect. Dis. 10: 855-857.
- Hu, M.; Nandi, S.; Davies, C. y Nicholas, R.A. (2005) *High-level chromosomally mediated tetracycline resistance in Neisseria gonorrhoeae results from a point mutation in the rpsJ gene encoding ribosomal protein S10 in combination with the mtrR and penB resistance determinants*. Antimicrob. Agents. Chemother. 49: 4327-4334.

Huet, A.A.; Raygada, J.L.; Mendiratta, K.; Seo, S.M. y Kaatz, G.W. (2008) *Multidrug efflux pump overexpression in Staphylococcus aureus after single and multiple in vitro exposures to biocides and dyes*. Microbiology. 154: 3144-3153.

International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). (2009) *Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): Guidelines for reporting novel SCCmec elements*. Antimicrob. Agents. Chemother. 53: 4961-4967.

Ito, T.; Hiramatsu, K.; Tomasz, A.; de Lencastre, H.; Perreten, V.; Holden, M.T.; Coleman, D.C.; Goering, R.; Giffard, P.M.; Skov, R.L.; Zhang, K.; Westh, H.; O'Brien, F.; Tenover, F.C.; Oliveira, D.C.; Boyle-Vavra, S.; Laurent, F.; Kearns, A.M.; Kreiswirth, B.; Ko, K.S.; Grundmann, H.; Sollid, J.E.; John, J.F. Jr.; Daum, R.; Soderquist, B. y Buist, G. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). (2012) *Guidelines for reporting novel mecA gene homologues*. Antimicrob. Agents. Chemother. 56: 4997-4999.

Ito, T.; Katayama, Y.; Asada, K.; Mori, N.; Tsutsumimoto, K.; Tiensasitorn, C. y Hiramatsu, K. (2001) *Structural comparison of three types of Staphylococcal Cassette Chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents. Chemother. 45: 1323-1336.

Jansen, A.; Türck, M.; Szekat, C.; Nagel, M.; Clever, I. y Bierbaum, G. (2007) *Role of insertions elements and yycFG in the development of decreased susceptibility to vancomycin in Staphylococcus aureus*. Int. J. Med. Microbiol. 297: 205-215.

Jevons, M.P. (1961) *Celbenin-resistant staphylococci*. Br. Med. J. 1:124-125.

Juhas, M.; van der Meer, J.R.; Gaillard, M.; Harding, R.M.; Hood, D.W. y Crook, D.W. (2009) *Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution*. FEMS. Microbiol. Rev. 33: 376-393.

Kaatz, G.W.; DeMarco, C.E. y Seo, S.M. (2006) *MepR, a repressor of Staphylococcus aureus MATE family multidrug efflux pump MepA, is a substrate responsive regulatory protein*. Antimicrob. Agents. Chemother. 50: 1276-1281.

- Kaatz, G.W.; McAleese, F. y Seo, S.M. (2005) *Multidrug resistance in Staphylococcus aureus due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 49: 1857-1864.
- Katayama, Y.; Ito, T. y Hiramatsu, K. (2000) *A new class of genetic element, Staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44: 1549-1555.
- Katayama, Y.; Ito, T. y Hiramatsu, K. (2001) *Genetic organization of the chromosome region surrounding mecA in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated mecI deletion in expression of resistance in mecA-carrying, low-level methicillin resistant Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 45: 1955-1963.
- Kelley, P.G.; Gao, W.; Ward, P.B. y Howden, B.P. (2011) *Daptomycin non-susceptibility in vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus (VISA) and heterogeneous-VISA (hVISA): implications for therapy after vancomycin treatment failure*. *J. Antimicrob. Chemother.* 66: 1057-1060.
- Kondo, Y.; Ito, T.; Ma, X.X.; Watanabe, S.; Kreiswirth, B.N.; Etienne, J. y Hiramatsu, K. (2007) *Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 51: 264-274.
- Kos, V.N.; Desjardins, C.A.; Griggs, A.; Cerqueira, G.; Van Tonder, A.; Holden, M.T.; Godfrey, P.; Palmer, K.L.; Bodi, K.; Mongodin, E.F.; Wortman, J.; Feldgarden, M.; Lawley, T.; Gill, S.R.; Haas, B.J.; Birren, B. y Gilmore, M.S. (2012) *Comparative genomics of vancomycin resistant Staphylococcus aureus strains and their positions within the clade most commonly associated with methicillin resistant S. aureus hospital-acquired infection in the United States*. *MBio.* 3: e00112-12.
- Kumaraswami, M.; Schuman, J.T.; Seo, S.M.; Kaatz, G.W. y Brennan, R.G. (2009) *Structural and biochemical characterization of MepR, a multidrug binding transcription regulator or the Staphylococcus aureus multidrug efflux pump MepA*. *Nucleic. Acids. Res.* 37: 1211-1224.

Kuroda, M.; Ohta, T.; Uchiyama, I.; Baba, T.; Yuzawa, H.; Kobayashi, I.; Cui, L.; Oguchi, A.; Aoki, K.; Nagai, Y.; Lian, J.; 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.; Shiba, T.; Hattori, M.; Ogasawara, N.; Hayashi, H. y Hiramatsu, K. (2001) *Whole genome sequencing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Lancet. 357: 1225-1240.

Lane, D.J. (1991) *16S/23S rRNA sequencing*. En: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (Eds.: Stackebrandt, E. y Goodfellow, M.), New York, USA, p. 115-148.

Leach, K.L.; Brickner, S.J.; Noe, M.C. y Miller, P.F. (2011) *Linezolid, the first oxazolidinone antibacterial agent*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1222: 49-54.

Lina, G.; Piémont, Y.; Godail-Gamot, F.; Bes, M.; Peter, M.O.; Gauduchon, V.; Vandenesch, F. y Etienne, J. (1999) *Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing Staphylococcus aureus in primary skin infections and pneumonia*. Clin. Infect. Dis. 29: 1128-1132.

Linkevicius, M.; Sandegren, L. y Andersson, D.I. (2013) *Mechanisms and fitness cost of tigeicycline resistance in Escherichia coli*. J. Antimicrob. Chemother. 68: 2809-2819.

Liu, C.; Bayer, A.; Cosgrove, S.E.; Daum, R.S.; Fridkin, S.K.; Gorwitz, R.J.; Kaplan, S.L.; Karchmer, A.W.; Levine, D.P.; Murray, B.E.; J Rybak, M.; Talan, D.A. y Chambers, H.F. (2011) *Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in adults and children: executive summary*. Clin. Infect. Dis. 52: 285-292.

Liu, C. y Chambers, H.F. (2003) *Staphylococcus aureus with heterogeneous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods*. Antimicrob. Agents. Chemother. 47: 3040-3045.

Loessner, I.; Dietrich, K.; Dittrich, D.; Hacker, J. y Ziebuhr, W. (2002) *Transposase-dependent formation of circular IS256 derivatives in Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 184: 4709-4714.

Long, S.W.; Olsen, R.J.; Mehta, S.C.; Palzkill, T.; Cernoch, P.L.; Perez, K.K.; Musick, W.L.; Rosato, A.E. y Musser, J.M. (2014) *PBP2a mutations causing high-level Ceftaroline resistance in clinical methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates*. Antimicrob. Agents. Chemother. 58: 6668-6674.

López Furst, M.J.; de Vedia, L.; Fernández, S.; Gardella, N.; Ganaha, M.C.; Prieto, S.; Carbone, E.; Lista, N.; Rotryng, F.; Morera, G.I.; Mollerach, M. y Stryjewski, M.E. Grupo de Estudio de Infecciones de Piel y Estructuras Relacionadas por *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente de la Comunidad, Sociedad Argentina de Infectología. (2013) *Prospective multicenter study of community-associated skin and skin structure infections due methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Buenos Aires, Argentina*. PLoS. One. 8: e78303.

Lowy, F.D. (1998) *Staphylococcus aureus infections*. N. Engl. J. Med. 339: 520-532.

Lowy, F.D. (2003) *Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus*. J. Clin. Invest. 111: 1265-1273.

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.

Lupien, A.; Gingras, H.; Leprohon, P. y Ouellette, M. (2015) *Induced tigecycline resistance in Streptococcus pneumoniae mutants reveals mutations in ribosomal proteins and rRNA*. J. Antimicrob. Chemother. 70: 2973-2980.

Lyon, B.R.; Gillespie, M.T. y Skurray, R.A. (1987) *Detection and characterization of IS256, an insertion sequence in Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol. 133: 3031-3038.

Maiden, M.C.; Bygraves, J.A.; Feil, E.; Morelli, G.; Russell, J.E.; Urwin, R.; Zhang, Q.; Zhou, J.; Zurth, K.; Caugant, D.A.; Feavers, I.M.; Achtman, M. y Spratt, B.G. (1998) *Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms*. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 3140-3145.

Malachowa, N. y DeLeo, F.R. (2010) *Mobile genetic elements of Staphylococcus aureus*. Cell. Mol. Life. Sci. 67: 3057-3071.

- Matsuo, M.; Cui, L.; Kim, J. y Hiramatsu, K. (2013) *Comprehensive identifications of mutations responsible for heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus (hVISA) to VISA conversion in laboratory generated VISA strains derived from hVISA clinical strain Mu3*. Antimicrob. Agents. Chemother. 57: 5843-5853.
- McAleese, F.; Petersen, P.; Ruzin, A.; Dunman, P.M.; Murphy, E.; Projan, S.J. y Bradford, P.A. (2005) *A novel MATE family efflux pump contributes to the reduced susceptibility of laboratory-derived Staphylococcus aureus mutants to tigecycline*. Antimicrob. Agents. Chemother. 49: 1865-1871.
- McEvoy, C.R.; Tsuji, B.; Gao, W.; Seemann, T.; Porter, J.L.; Doig, K.; Ngo, D.; Howden, B.P. y Stinear, T.P. (2013) *Decreased vancomycin susceptibility in Staphylococcus aureus caused by IS256 tempering of WalKR expression*. Antimicrob. Agents. Chemother. 57: 3240-3249.
- McGovern, P.C.; Wible, M.; El-Tahtawy, A.; Biswas, P. y Meyer, R.D. (2013) *All-cause mortality imbalance in the tigecycline phase 3 and 4 clinical trials*. Int. J. Antimicrob. Agents. 41: 463-467.
- Milheiriço, C.; Oliveira, D.C. y de Lencastre, H. (2007) *Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents. Chemother. 51: 3374-3377.
- Miller, J.H. (1996) *Spontaneous mutators in bacteria: insights into pathways of mutagenesis and repair*. Annu. Rev. Microbiol. 50: 625-643.
- Morozova, O. y Marra, M.A. (2008) *Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics*. Genomics. 92: 255-264.
- Murakami, K.; Minamide, W.; Wada, K.; Nakamura, E.; Teraoka, H. y Watanabe, S. (1991) *Identification of methicillin-resistant strains of Staphylococci by polymerase chain reaction*. J. Clin. Microbiol. 29: 2240-2244
- Nagel, M.; Reuter, T.; Jansen, A.; Szekat, C. y Bierbaum, G. (2011) *Influence of ciprofloxacin and vancomycin on mutation rate and transposition of IS256 in Staphylococcus aureus*. Int. J. Med. Microbiol. 301: 229-236.

- Naimi, T.S.; Anderson, D.; O'Boyle, C.; Boxrud, D.J.; Johnson, S.K.; Tenover, F.C. y Lynfield, R. (2003a) *Vancomycin intermediate Staphylococcus aureus with phenotypic susceptibility to methicillin in a patient with recurrent bacteremia*. Clin. Infect. Dis. 36: 1609-1612.
- Naimi, T.S.; LeDell, K.H.; Como-Sabetti, K.; Borchardt, S.M.; Boxrud, D.J.; Etienne, J.; Johnson, S.K.; Vandenesch, F.; Fridkin, S.; O'Boyle, C.; Danila, R.N. y Lynfield, R. (2003b) *Comparison of community and health care associated methicillin resistant Staphylococcus aureus infections*. JAMA. 290: 2976-2984.
- Nicolau, D.P. (2009) *Management of complicated infections in the era of antimicrobial resistance: the role of tigecycline*. Expert. Opin. Pharmacother. 10: 1213-1222.
- Noto, M.J.; Kreiswirth, B.N.; Monk, A.B. y Archer, G.L. (2008) *Gene acquisition at the insertion site for SCCmec, the genomic island conferring methicillin resistance in Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 190: 1276-1283.
- Novick, P.R. y Geinsinger, E. (2008) *Quorum sensing in Staphylococci*. Annu. Rev. Genet. 42: 541-564.
- Noviello, S.; Ianniello, F.; Leone, S.; Fiore, M. y Esposito, S. (2008) *In vitro activity of tigecycline: MICs, MBCs, time kill curves and post antibiotic effect*. J. Chemother. 20: 577-580.
- Oliver, A.; Cantón, R.; Campo, P.; Baquero, F. y Blázquez, J. (2000) *High frequency of hypermutable Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis lung infection*. Science. 288: 1251-1254.
- Olson, M.W.; Ruzin, A.; Feyfant, E.; Rush, T.S.; O'Connell, J. y Bradford, P.A. (2006) *Functional, biophysical and structural bases for antibacterial activity of tigecycline*. Antimicrob. Agents. Chemother. 50: 2156-2166.
- O'Neill, A.J.; Cove, J.H. y Chopra, I. (2001) *Mutation frequencies for resistance to fusidic acid and rifampicin in Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. 47: 647-650.

- O'Neill, A.J. y Chopra, I. (2002) *Insertional inactivation of mutS in Staphylococcus aureus reveals potential for elevated mutation frequencies, although the prevalence of mutators in clinical isolates is low*. J. Antimicrob. Chemother. 50: 161-169.
- O'Neill, A.J. y Chopra, I. (2003) *Lack of evidence for involvement of hypermutability in emergence of vancomycin intermediate Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents. Chemother. 47: 1484-1485.
- OPS. Organización Panamericana de la Salud. (2015) *Informe de Resistencia 2015*. Argentina. Organización Panamericana de la Salud. <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2016/12/Informe-Resistencia-ARGENTINA-2015.pdf>
- Otto, M. (2013) *Community-associated MRSA: what makes them special?* Int. J. Med. Microbiol. 303: 324-330.
- Otto, M. (2014a) *Staphylococcus aureus toxins*. Curr. Opin. Microbiol. 17: 32-37.
- Otto, M. (2014b) *Phenol-soluble modulins*. Int. J. Med. Microbiol. 304: 164-169.
- Pankey, G.A. y Ashcraft, D.S. (2009) *In vitro antibacterial activity of tigecycline against resistant Gram negative bacilli and enterococci by time kill assay*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 64: 300-304.
- Patel, D.; Kosmidis, C.; Seo, S.M. y Kaatz, G.W. (2010) *Ethidium bromide MIC screening for enhanced efflux pump gene expression or efflux activity in Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents. Chemother. 54: 5070-5073.
- Perazzi, B.; Bello, N.; Mollerach, M.; Vay, C.; Lasala, M.B. y Famiglietti, A. (2011) *Endocarditis caused by methicillin-susceptible Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to vancomycin: a case report*. J. Med. Case. Rep. 5: 292-297.
- Perazzi, B.; Camacho, M.; Bombicino, K.; Flores, Z.; Vay, C. y Famiglietti, A. (2010) *Staphylococcus aureus: new and old antimicrobial agents*. Rev. Argent. Microbiol. 42: 199-202.
- Periasamy, S.; Joo, H.S.; Duong, A.C.; Bach, T.H.; Tan, V.Y.; Chatterjee, S.S.; Cheung, G.Y. y Otto, M. (2012) *How Staphylococcus aureus biofilms develop their characteristic structure*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 109: 1281-1286.

Petersen, P.J.; Jones, C.H. y Bradford, P.A. (2007) *In vitro antibacterial activities of tigecycline and comparative agents by time-kill kinetic studies in fresh Mueller-Hinton broth*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 59: 347-349.

Pfizer Inc (Wyeth Pharmaceuticals). (2010) *Tygacil® Product Insert*. Philadelphia, PA, USA, <http://www.pfizerpro.com/hcp/tygacil>.

Pinchuk, I.V.; Beswick, E.J. y Reyes, V.E. (2010) *Staphylococcus enterotoxins*. *Toxins*. 2: 2177-2197.

Poole, K. (2005) *Efflux mediated antimicrobial resistance*. *J. Antimicrob. Chemother.* 56: 20-51.

Prunier, A.L.; Malbruny, B.; Laurans, M.; Brouard, J.; Duhamel, J.F. y Leclercq, R. (2003) *High rate of macrolide resistance in Staphylococcus aureus strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable strains*. *J. Infect. Dis.* 187: 1709-1716.

Prunier, A.L y Leclercq, R. (2005) *Role of mutS and mutL genes in hypermutability and recombination in Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 187: 3455-3464.

Rasmussen, B.A.; Gluzman, Y. y Tally, F.P. (1994) *Inhibition of protein synthesis occurring on tetracycline-resistant, TetM-protected ribosomes by a novel class of tetracyclines, the glycylcyclines*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 38: 1658-1660.

Richter, S.S.; Heilmann, K.P.; Dohrn, C.L.; Riahi, F.; Costello, A.J.; Kroeger, J.S.; Biek, D.; Critchley, I.A.; Diekema, D.J. y Doern, G.V. (2011) *Activity of ceftaroline and epidemiologic trends in Staphylococcus aureus isolates collected from 43 medical centers in the United States in 2009*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 55: 4154-4160.

Rodríguez-Noriega, E.; Seas, C.; Guzmán-Blanco, M.; Mejía, C.; Alvarez, C.; Bavestrello, L.; Zurita, J.; Labarca, J.; Luna, C.M.; Salles, M.J. y Gotuzzo, E. (2010) *Evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones in Latin America*. *Int. J. Infect. Dis.* 14: e560-6.

Rolo, J.; Worning, P.; Nielsen, J.B.; Bowden, R.; Bouchami, O.; Damborg, P.; Guardabassi, L.; Perreten, V.; Tomasz, A.; Westh, H.; de Lencastre, H. y Miragaia, M.

(2017) *Evolutionary origin of the Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec)*. Antimicrob. Agents. Chemother. 61: pii: e02302-16.

Rosco Diagnostica, A/S. (2010) *Neo-Sensitabs .User's Guide. Susceptibility testing EUCAST and CLSI potency Neo-Sensitabs. Prediffusion Method*. Document 1.5.0.

Rouch, D.A.; Byrne, M.E.; Kong, Y.C. y Skurray, R.A. (1987) *The aacA-aphD gentamicin and kanamycin resistance determinant of Tn4001 from Staphylococcus aureus: expression and nucleotide sequence analysis*. J. Gen. Microbiol. 133: 3039-3052.

Ruzin, A.; Keeney, D. y Bradford, P.A. (2005) *AcrAB efflux pump plays a role in decreased susceptibility to tigecycline in Morganella morganii*. Antimicrob. Agents. Chemother. 49: 791-793.

Sader, H.S.; Castanheira, M.; Farrell, D.J.; Flamm, R.K.; Mendes, R.E. y Jones, R.N. (2016) *Tigecycline antimicrobial activity tested against clinical bacteria from Latin American medical centres: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2011-2014)*. Int. J. Antimicrob. Agents. 48: 144-150.

Sakoulas, G.; Eliopoulos, G.M.; Moellering, R.C. Jr.; Wennersten, C.; Venkataraman, L.; Novick, R.P. y Gold, H.S. (2002) *Accessory gene regulator (agr) locus in geographically diverse Staphylococcus aureus isolates with reduced susceptibility to vancomycin*. Antimicrob. Agents. Chemother. 46: 1492-1502.

Schaaff, F.; Reipert, A. y Bierbaum, G. (2002) *An elevated mutation frequency favors development of vancomycin resistance in Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents. Chemother. 46: 3540-3548.

Schindler, B.D.; Patel, D.; Seo, S.M. y Kaatz, G.W. (2013a) *Mutagenesis and modeling to predict structural and functional characteristics of the Staphylococcus aureus MepA multidrug efflux pump*. J. Bacteriol. 195: 523-533.

Schindler, B.D.; Seo, S.M.; Jacinto, P.L.; Kumaraswami, M.; Birukou, I.; Brennan, R.G. y Kaatz, G.W. (2013b) *Functional consequences of substitution mutations in MepR, a repressor of the Staphylococcus aureus mepA multidrug efflux pump gene*. J. Bacteriol. 195: 3651-3662.

Schindler, B.D. y Kaatz, G.W. (2016) *Multidrug efflux pumps of gram positive bacteria*. Drug. Resist. Updat. 27: 1-13.

Schreiber, F.; Szekat, C.; Josten, M.; Sahl, H.G. y Bierbaum, G. (2013) *Antibiotic-induced autoactivation of IS256 in Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents. Chemother. 57: 6381-6384.

Seemann, T. (2014) *Prokka: rapid prokaryotic genome annotation*. Bioinformatics. 30: 2068-2069.

Sharff, K.A.; Monecke, S.; Slaughter, S.; Forrest, G.; Pfeiffer, C.; Ehricht, R. y Oethinger, M. (2012) *Genotypic resistance testing creates new treatment challenges: two cases of oxacillin susceptible methicillin resistant Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 50: 4151-4163.

Shen, F.; Han, Q.; Xie, D.; Fang, M.; Zeng, H. y Deng, Y. (2015) *Efficacy and safety of tigecycline for treatment of severe infectious diseases: an update meta-analysis of RCTs*. Int. J. Infect. Dis. 39: 25-33.

Sherris, J.C. y Minshew, B.H. (1996) *Mutational Antibiotic Resistance*. En: *Antibiotics in laboratory medicine 4th ed.* (Eds.: Lorian, V) Lippincott, W. y Wilkins, Baltimore, Maryland, USA, p. 418-431.

Shoji, M.; Cui, L.; Iizuka, R.; Komoto, A.; Neoh, H.M.; Watanabe, Y.; Hishinuma, T. y Hiramatsu, K. (2011) *walk and clpP mutations confer reduced vancomycin susceptibility in Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents. Chemother. 55: 3870-3881.

Shopsin, B.; Eaton, C.; Wasserman, G.A.; Mathema, B.; Adhikari, R.P.; Agolory, S.; Altman, D.R.; Holzman, R.S.; Kreiswirth, B.N. y Novick, R.P. (2010) *Mutations in agr do not persist in natural populations of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. J. Infect. Dis. 202: 1593-1599.

Shore, A.C.; Deasy, E.C.; Slickers, P.; Brennan, G.; O'Connell, B.; Monecke, S.; Ehricht, R. y Coleman, D.C. (2011) *Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent mecA, mecI, mecR1, blaZ, and ccr genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents. Chemother. 55: 3765-3773.

- Sieradzki, K.; Leski, T.; Dick, J.; Borio, L. y Tomasz, A. (2003a) *Evolution of vancomycin intermediate Staphylococcus aureus strain in vivo: multiple changes in the antibiotic resistance phenotypes of a single lineage of methicillin resistant S. aureus under the impact of antibiotics administered for chemotherapy*. J. Clin. Microbiol. 41: 1687-1693.
- Sieradzki, K. y Tomasz, A. (2003b) *Alterations of cell wall structure and metabolism accompany reduced susceptibility to vancomycin in an isogenic series of clinical isolates of Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 185: 7103-7110.
- 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 Cordoba, Argentina*. J. Clin. Microbiol. 44: 192-200.
- Sola, C.; Gribaudo, G.; Vindel, A.; Patrito, L. y Bocco, J.L. Córdoba MRSA Collaborative Study Group. (2002) *Identification of a novel methicillin-resistant Staphylococcus aureus epidemic clone in Córdoba, Argentina, involved in nosocomial infections*. J. Clin. Microbiol. 40: 1427-1435.
- Sola, C.; Lamberghini, R.O.; Ciarlantini, M.; Egea, A.L; Gonzalez, P.; Diaz, E.G.; Huerta, V.; Gonzalez, J.; Corso, A.; Vilaro, M.; Petiti, J.P.; Torres, A.; Vindel, A. y Bocco, J.L. (2011) *Heterogeneous vancomycin intermediate susceptibility in a community associated methicillin resistant Staphylococcus aureus epidemic clone, in a case of infective endocarditis in Argentina*. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 10: 15-20.
- Steenbergen, J.N.; Alder, J.; Thorne, G.M. y Tally, F.P. (2005) *Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections*. J. Antimicrob. Chemother. 55: 283-288.
- Stein, G.E. y Craig, W.A. (2006) *Tigecycline: a critical analysis*. Clin. Infect. Dis. 43: 518-524.
- Sum, P.E. y Petersen, P. (1999) *Synthesis and structure-activity relationship of novel glycylicycline derivatives leading to the discovery of GAR-936*. Bioorg. Med. Chem. Lett. 9: 1459-1462.

Tanaseanu, C.; Milutinovic, S.; Calistru, P.I.; Strausz, J.; Zolubas, M.; Chernyak, V.; Dartois, N.; Castaing, N.; Gandjini, H. y Cooper, C.A.; 313 Study Group. (2009) *Efficacy and safety of tigecycline versus levofloxacin for community-acquired pneumonia*. BMC. Pulm Med. 9: 44-55.

Tatarkiewicz, J.; Staniszewska, A. y Bujalska-Zadrozny, M. (2016) *New agents approved for treatment of acute staphylococcal skin infections*. Arch. Med. Sci. 12: 1327-1336.

Tenover, F.C.; Arbeit, R.D.; Goering, R.V.; Mickelsen, P.A.; Murray, B.E.; Persing, D.H. y Swaminathan, B. (1995) *Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing*. J. Clin. Microbiol. 33: 2233-2239.

Tong, S.Y.; Davis, J.S.; Eichenberger, E.; Holland, T.L. y Fowler, V.G. Jr. (2015) *Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management*. Clin. Microbiol. Rev. 28: 603-661.

Traber, K.E.; Lee, E.; Benson, S.; Corrigan, R.; Cantera, M.; Shopsis, B. y Novick, R.P. (2008) *agr function in clinical Staphylococcus aureus isolates*. Microbiology. 154: 2265-2274.

Traber, K.E. y Novick, R. (2006) *A slipped-mispairing mutation in AgrA of laboratory strains and clinical isolates results in delayed activation of agr and failure to translate δ and α -haemolysins*. Mol. Microbiol. 59: 1519-1530.

Trong, H.N.; Prunier, A.L. y Leclercq, R. (2005) *Hypermutable and fluoroquinolone resistant clinical isolates of Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents. Chemother. 49: 2098-2101.

Tsiodras, S.; Gold, H.S.; Sakoulas, G.; Eliopoulos, G.M.; Wennersten, C.; Venkataraman, L.; Moellering, R.C. y Ferraro, M.J. (2001) *Linezolid resistance in a clinical isolate of Staphylococcus aureus*. Lancet. 358: 207-208.

Tsubakishita, S.; Kuwahara-Arai, K.; Sasaki, T. y Hiramatsu, K. (2010) *Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci*. Antimicrob. Agents. Chemother. 54: 4352-4359.

US FDA. (2010) *FDA drug safety communication: increased risk of death with Tygacil (Tigecycline) compared to other antibiotics used to treat similar infections.* <https://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm224370.htm>.

Valihrach, L. y Demnerova, K. (2012). *Impact of normalization method on experimental outcome using RT-qPCR in Staphylococcus aureus.* J. Microbiol. Methods. 90: 214-216.

Valle, J.; Vergara-Irigaray, M.; Merino, N.; Penadés, J.R. y Lasa, I. (2007) *Sigma B regulates IS256 mediated Staphylococcus aureus biofilm phenotypic variation.* J. Bacteriol. 189: 2886-2896.

van Hal, S.J. y Fowler, V.G. Jr. (2013) *Is it time to replace vancomycin in the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections?* Clin. Infect. Dis. 56: 1779-1788.

Vega, S.; Dowzicky, M.J. (2017) *Antimicrobial susceptibility among Gram positive and Gram negative organisms collected from the Latin American region between 2004 and 2015 as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial.* Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. On line. <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0222-0>.

Vidaillac, C.; Gardete, S.; Tewhey, R.; Sakoulas, G.; Kaatz, G.W.; Rose, W.E.; Tomasz, A. y Rybak, M.J. (2013) *Alternative mutational pathways to intermediate resistance to vancomycin in methicillin resistant Staphylococcus aureus.* J. Infect. Dis. 208: 67-74.

Villa, L.; Feudi, C.; Fortini, D.; García-Fernández, A. y Carattoli, A. (2014) *Genomics KPC-producing Klebsiella pneumoniae sequence type 512 clone highlights the role of RamR and ribosomal S10 protein mutations in conferring tigecycline resistance.* Antimicrob. Agents. Chemother. 58: 1707-1712.

Visalli, M.A.; Murphy E.; Projan, S.J. y Bradford P.A. (2003) *AcrAB multidrug efflux pump is associated with reduced levels of susceptibility to tigecycline (GAR-936) in Proteus mirabilis.* Antimicrob. Agents. Chemother. 47: 665-669.

Voladri, R.K.R. y Kernodle, D.S. (1998) *Characterization of a chromosomal gene encoding type B β -lactamase in phage group II isolates of Staphylococcus aureus.* Antimicrob. Agents. Chemother. 42: 3163-3168.

- von Eiff, C.; Taylor, K.L.; Mellmann, A.; Fattom, A.I.; Friedrich, A.W.; Peters, G. y Becker, K. (2007) *Distribution of capsular and surface polysaccharide serotypes of Staphylococcus aureus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 58: 297-302.
- Wang, L. y Archer, G.L. (2010) *Roles of CcrA and CcrB in excision and integration of staphylococcal cassette chromosome mec, a Staphylococcus aureus genomic island*. *J. Bacteriol.* 192: 3204-3212.
- Watanabe, Y.; Cui, L.; Katayama, Y.; Kozue, K. y Hiramatsu, K. (2011) *Impact of rpoB mutations on reduced vancomycin susceptibility in Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 49: 2680-2684.
- Werner, G.; Gfrörer, S.; Fleige, C.; Witte, W. y Klare, I. (2008) *Tigecycline resistant Enterococcus faecalis strain isolated from a German intensive care unit patient*. *J. Antimicrob. Chemother.* 61: 1182-1183.
- Wertheim, H.F.; Melles, D.C.; Vos, M.C.; van Leeuwen, W.; van Belkum, A.; Verbrugh, H.A. y Nouwen, J.L. (2005) *The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections*. *Lancet. Infect. Dis.* 5: 751-762.
- WHO. World Health Organization. (2014). *Antimicrobial resistance. Global report on surveillance. Annex 2. Reported or published resistance rates in common bacterial pathogens, by WHO region*. Tabla A2.26, p. 111.
- Wu, Z.; Li, F.; Liu, D.; Xue, H. y Zhao X. (2015) *Novel Type XII Staphylococcal Cassette Chromosome mec Harboring a New Cassette Chromosome Recombinase, CcrC2*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 59: 7597-7601.
- Yamaguchi, T.; Nishifuji, K.; Sasaki, M.; Fudaba, Y.; Aepfelbacher, M.; Takata, T.; Ohara, M.; Komatsuzawa, H.; Amagai, M. y Sugai, M. (2002) *Identification of the Staphylococcus aureus etd pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B*. *Infect. Immun.* 70: 5835-5845.
- Zechini, B. y Versace, I. (2009) *Inhibitors of multidrug resistant efflux systems in bacteria*. *Recent. Pat. Antiinfect. Drug. Discov.* 4: 37-50.

Zhang, H.Z.; Hackbarth, C.J.; Chansky, K.M. y Chambers, H.F. (2001) *A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci*. Science. 291: 1962-1965.

zur Wiesch, P.S.; Engelstädter, J. y Bonhoeffer, S. (2010) *Compensation of fitness costs and reversibility of antibiotic resistance mutations*. Antimicrob. Agents. Chemother. 54: 2085-2095.