

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**  
**Programa de Doctorado en Salud y Desarrollo en los Trópicos**



**BASES MOLECULARES DE LA RESISTENCIA A DAPTOMICINA  
EN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

TESIS DOCTORAL

Natalia Gómez Casanova  
Salamanca, 2018



Grupo de investigación en Microbiología y Parasitología Clínica y Resistencias a Antimicrobianos (IIMD-16). Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL). (Universidad de Salamanca, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, CSIC).

[nagomezc@usal.es](mailto:nagomezc@usal.es)





VNIVERSIDAD  
D SALAMANCA

DPTO. DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DEL  
DIAGNÓSTICO.

FACULTAD DE MEDICINA.

C/ Alfonso X el Sabio, s/n.

37007 - Salamanca

Tel . +923294400 ext. 3536 Fax . 923 291290

**JUAN LUIS MUÑOZ BELLIDO**

**Catedrático de Microbiología Clínica**

Correo electrónico: jlmubel@usal.es

**JUAN LUIS MUÑOZ BELLIDO, CATEDRÁTICO DE MICROBIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y M<sup>a</sup> NIEVES GUTIÉRREZ ZUFIAURRE, DOCTORA EN MEDICINA Y LICENCIADA ESPECIALISTA DEL SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA DEL COMPLEJO ASISTENCIAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA,**

CERTIFICAN:

Que el estudio titulado *Bases Moleculares de la Resistencia a Daptomicina en Staphylococcus aureus* ha sido realizado por D<sup>a</sup> Natalia Gómez Casanova bajo nuestra dirección y que dicho trabajo reúne, a nuestro juicio, las características necesarias para optar mediante él al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Salamanca, 10 de Mayo de 2018.

*Abreviaturas*

---



---

<b>%</b>	Por ciento
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNasas</b>	Desoxirribunucleasa
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>BH</b>	Brain heart
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> <sup>R</sup>
<b>CFU</b>	Unidad Formadora de Colonia
<b>CIM</b>	Concentración Mínima Inhibitoria
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>DAL</b>	Dalbavancina (E-test)
<b>D-Ala-D-Ala</b>	D-alanina-D-alanina
<b>D-Ala-D-Lac</b>	D-alanina-D-Lactato
<b>DAP</b>	Daptomicina (E-test)
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>et al.,</b>	Y colaboradores
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>Fig.</b>	Figura
<b>GISA</b>	<i>Glycopeptide-intermediate S. aureus</i>
<b>Glu</b>	Glucosa
<b>Gráf.</b>	Gráfica
<b>I</b>	Rango de resistencia intermedia
<b>IgG</b>	Inmunoglobulinas G
<b>L</b>	Litro
<b>LPV</b>	Leucocidina de Panton Valentine
<b>MALDI-TOF</b>	<i>Matrix-Assited Laser Desorption/Ionization-Time of Fligh</i>
<b>Mbps</b>	Megapares de bases
<b>mg</b>	Miligramo

---

<b>MH</b>	Mueller-Hinton
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MMO</b>	Mismas mutaciones que las encontradas en la cepa original que aparece en la Tabla 10.
<b>NC</b>	No hay cambios
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>nm</b>	nanómetros
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>OD</b>	Densidad óptica
<b>OX</b>	Oxacilina (E-test)
<b>Pág.</b>	Página
<b>Pb</b>	Pares de bases del ADN
<b>PBP</b>	Proteínas fijadoras de penicilina ( <i>Penicillin Binding proteins</i> )
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la ADN polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reation</i> )
<b>PGN</b>	Peptidoglicano
<b>PRPE</b>	Penicilinas resistentes a penicilinasas estafilocócicas
<b>QS</b>	<i>Sensor quórum (quorum sensing)</i>
<b>R</b>	Rango de resistencia resistente
<b>Ref.</b>	Referencia
<b>RNAr</b>	RNA ribosómico
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>S</b>	Rango de resistencia sensible
<b>SARM</b>	<i>S. aureus</i> resistentes a meticilina
<b>SARV</b>	<i>S. aureus</i> con alto grado de resistencia a vancomicina
<b>SASM</b>	<i>S. aureus</i> sensibles a meticilina
<b>sRNA</b>	Pequeños RNA no codificantes
<b>St</b>	Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>ST tipo</b>	Cepa silvestre tipo de <i>S. aureus</i> utilizada en éste estudio
<b>STSS-1</b>	Toxina-1 del síndrome del shock tóxico

<b>TE</b>	Toxina Exfoliativa
<b>TLV</b>	Telavancina (E-test)
<b>VISA</b>	<i>Vancomycin-intermediate S. aureus</i>
<b>μl</b>	Microlitro (10 <sup>-6</sup> litros)



*Lista de tablas, figuras y gráficas*

---



## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Introducción</b>	
<b>Tabla 1.</b> Características diferenciales en tres especies del género.....	<b>7</b>
<b>Tabla 2.</b> Mutaciones asociadas a <i>no sensibilidad</i> a DAP en mutantes <i>in vitro</i> obtenidos a partir de cepas tipo de <i>S. aureus</i> y en cepas clínicas, mediante secuenciación de genoma completo.....	<b>35</b>
<b>Material y métodos</b>	
<b>Tabla 3.</b> Criterios para la interpretación de la sensibilidad frente a daptomicina, vancomicina, linezolid, oxacilina, telavancina y dalvabancina según el CLSI (2017).....	<b>54</b>
<b>Tabla 4.</b> Oligonucleótidos y temperatura de hibridación utilizados para amplificar los genes <i>mecA</i> y <i>mecC</i> .....	<b>55</b>
<b>Tabla 5.</b> Oligonucleótidos específicos y temperatura de hibridación.....	<b>57</b>
<b>Resultados</b>	
<b>Tabla 6.</b> CIMs de daptomicina, vancomicina, linezolid, oxacilina, dalbavancina y telavancina en los 9 aislados clínicos originales de <i>S. aureus</i> ....	<b>74</b>
<b>Tabla 7.</b> Sumario de las CIM para daptomicina tras la exposición a dicho fármaco como tras la posterior no exposición en las nuevas cepas obtenidas en el proceso de selección de mutantes. ....	<b>77</b>
<b>Tabla 8.</b> Resistencia de nuestros aislados clínicos y sus respectivos mutantes obtenidos <i>in vitro</i> de <i>S. aureus</i> no sensibles a daptomicina frente dalbavancina y telavancina. ....	<b>79</b>
<b>Tabla 9.</b> Cambios de nucleótidos en el gen <i>mprF</i> .....	<b>88</b>
<b>Tabla 10.</b> Cambios de nucleótidos en los genes <i>cls1</i> y <i>cls2</i> .....	<b>90</b>

<b>Tabla 11.</b> Cambios de nucleótidos en los genes <i>rpoB</i> , <i>rpoC</i> y <i>mw1109</i> .....	<b>92</b>
<b>Tabla 12.</b> Mutaciones de los 10 mutantes obtenidos <i>in vitro</i> a partir de St1....	<b>94</b>
<b>Tabla 14.</b> Confrontación de ST tipo frente a <i>S. aureus</i> no sensible a daptomicina en un estudio <i>fitness cost</i> en competencia.....	<b>99</b>
<b>Tabla 15.</b> Capacidad de producción de biopelícula en <i>S. aureus</i> no sensibles a daptomicina. ....	<b>101</b>

## LISTA DE FIGURAS, GRÁFICAS Y ANEXOS

### *Figuras*

	<b>Pág.</b>
<b>Introducción</b>	
<b>Figura 1.</b> A) Microscopía óptica, agrupación de <i>S. aureus</i> (Tinción de Gram, 10.000x). B) Placa de agar manitol salado: 1) <i>S. epidermidis</i> ; 2) <i>S. aureus</i> .....	<b>3</b>
<b>Figura 2.</b> Sección de la envoltura bacteriana de <i>S. aureus</i> obtenida por microscopía electrónica (figura de la izquierda) (Suganuma et al., 1961) y su representación esquemática (figura de la derecha). En ambas imágenes se puede apreciar la pared celular (W) formada por PGN y la membrana plasmática (M).....	<b>6</b>
<b>Figura 3.</b> Representación de la pared celular bacteriana en Gram positivas (Imagen obtenida de Madigan et al., 2003).....	<b>6</b>
<b>Figura 4.</b> Estructura química de penicilina.....	<b>15</b>
<b>Figura 5.</b> Representación del porcentaje de aislados informados SARM en 2016. Imagen obtenida de EARSS, 2016.....	<b>17</b>
<b>Figura 6.</b> Estructura química de vancomicina.....	<b>19</b>
<b>Figura 7.</b> Representación esquemática del mecanismo de resistencia en cepas VISA. Imagen obtenida de Lowy, 2003.....	<b>21</b>
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática del mecanismo de resistencia en	

cepas SARV. Imagen obtenida de Lowy, 2003.....	23
<b>Figura 9.</b> Estructura química de telavancina (izquierda) y dalbavancina (derecha).....	24
<b>Figura 10.</b> Estructura química de linezolid.....	25
<b>Figura 11.</b> Estructura química de daptomicina.....	28
<b>Figura 12.</b> Mecanismo de acción de daptomicina: 1. Unión a la membrana bacteriana, 2. Polimerización y formación de canales iónicos, 3. Salida masiva al medio extracelular de iones potasio. Imagen obtenida de Gómez-Casanova et al., 2017.....	30

### **Material y métodos**

<b>Figura 13.</b> Fragmento de una secuencia de ADN en el programa <i>Chromas</i> .....	59
<b>Figura 14.</b> Esquema del método de selección de mutantes con alto nivel de resistencia a daptomicina a concentración fija.....	61
<b>Figura 15.</b> Esquema del método de selección de mutantes con alto nivel de resistencia a daptomicina a concentraciones crecientes de antimicrobiano.....	62
<b>Figura 16.</b> Esquema del método utilizado para la obtención de cepas con alto nivel de resistencia a daptomicina.....	63
<b>Figura 17.</b> A) Esquema <i>fitness</i> sin competencia. B) Esquema <i>fitness</i> con competencia.....	66

### **Resultados**

<b>Figura 18.</b> Determinación de CIMs de daptomicina en <i>Staphylococcus</i> spp por E-test®.....	72
<b>Figura 19.</b> Detección de la resistencia a meticilina por inmunocromatografía de membrana. A) Prueba rápida negativa para PBP2 en St 5; B) prueba rápida positiva para PBP2 en St 4.....	73
<b>Figura 20.</b> Placa con la CIM para daptomicina en St 1.6 (en la izquierda) y St	

1.8 (en la derecha) por el método E-test® .....	76
<b>Figura 21.</b> E-test ® de telavancina. Las dos primeras imágenes superiores corresponde a los aislados clínicos St 2 (CMI de 0,047 mg/L) y St 4 (CMI de 0,125 mg/L); por otro lado, las dos inferiores pertenecen a las cepas mutantes seleccionada <i>in vitro</i> St 1.8 (CMI de 0,064 mg/L) y St 6.2 (CMI de 0,094 mg/L) , respectivamente. ....	80
<b>Figura 22.</b> E-test ® de dalbavancina. Las dos primeras imágenes superiores corresponde a los aislados clínicos St 2 (CIM de 0,047 mg/L) y St 9 (CIM de 0,032 mg/L); por otro lado, las dos inferiores pertenecen a las cepas mutantes seleccionada <i>in vitro</i> St 1.4 (CIM de 0,047 mg/L) y St 6.1 (CIM de 0,20 mg/L), respectivamente. ....	81
<b>Figura 23.</b> E-test ® de oxacilina. La imagen de la izquierda corresponde a la cepa mutante St 1.2 (CIM para oxacilina de 16 mg/L) y la figura de la derecha corresponde a St 1.3 (CIM para oxacilina de 4 mg/L).....	82
<b>Figura 24.</b> E-test ® de oxacilina. La imagen de la izquierda corresponde al aislado clínico St 6 (CIM para oxacilina de 4 mg/L) y la figura de la derecha corresponde a la cepa mutante St 6.1 (CIM para oxacilina de 0,19 mg/L).....	83
<b>Figura 25.</b> Placas de agar MH tras 24 h de incubación de cepas St 8 (CIM para daptomicina = 4 mg/L), St 1.10 (CIM para daptomicina = 192 mg/L) y St 6.2 (CIM para daptomicina = 12 mg/L).....	98
<b>Figura 26.</b> Capturas del ensayo sobre la formación de biopelículas. 1) Crecimiento de los aislados en estudio y los dos controles (caldo BH sin inóculo, <i>S. agalactiae</i> como control negativo) transcurridas 24 h de incubación); 2) visualización tras retirar el sobrenadante.....	102

## Gráficas

	Pág.
<b>Resultados</b>	
<b>Gráfica 1.</b> Representación del número de mutaciones en genes con cambios en los aislados clínicos St 1, St 2, St 3 y St 4.....	86
<b>Gráfica 2.</b> Representación del número de mutaciones en genes con cambios en los aislados clínicos St 5, St 6, St 7, St 8 y St 9.....	87
<b>Gráfica 3.</b> Curvas de crecimientos para ST tipo, St 4, St 5, St6, St 8, St 1.10, St 6.1, y St 6.2. ....	97
<b>Gráfica 4.</b> Composición de ácidos grasos de St1 y cuatro de sus mutantes (St 1.5, St 1.6, St 1.8 y St 1.9) .....	104
<b>Gráfica 5.</b> Comparación de la composición de lípido de membrana, tanto fosfolípidos como glicolípidos, en el aislado clínico St1 con respecto a cuatro de sus mutantes obtenidos <i>in vitro</i> (St 1.5, St 1.6, St 1.8 y St 1.9).....	105

## Anexos

	Pág.
<b>Anexo 1.</b> Oligonucleótidos específicos y temperatura de hibridación.....	167
<b>Anexo 2.</b> Oligonucleótidos específicos y temperatura de hibridación.....	168







---

	Pág.
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>I</b>
<b>LISTA DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1. <i>Staphylococcus aureus</i> . Aspectos generales.....	3
2. Factores de virulencia en <i>S. aureus</i> .....	5
2.1. La envoltura celular, una fortaleza biológica para los fármacos.....	5
2.2. Productos extracelulares.....	8
2.2.1. Principales enzimas de <i>S. aureus</i> .....	8
2.2.2. Toxinas de <i>S. aureus</i> .....	9
2.3. Biopelículas o <i>biofilm</i> .....	12
3. Evolución de la resistencia de <i>S. aureus</i> a los antimicrobianos.....	13
3.1. Antimicrobianos $\beta$ -lactámicos.....	13
3.1.1. Resistencia a los $\beta$ -lactámicos.....	14
3.2. Antimicrobianos glucopéptidos.....	18
3.2.1. Mecanismo de resistencia a vancomicina.....	19
3.2.2. Nuevos derivados semisintéticos: los lipoglucopeptidos.....	23
3.3. Oxazolidinonas.....	24
3.3.1. Mecanismos de resistencia a linezolid.....	26
4. Daptomicina, uno de los últimos recursos.....	27
4.1. Perfil del antimicrobiano: estructura química, características y mecanismo de acción.....	27
4.2. Mecanismo de acción de daptomicina.....	29
4.3. Interacción de daptomicina con otros fármacos.....	31

---

5. Emergencia de cepas <i>S. aureus</i> no sensibles a daptomicina en aislados clínicos.....	31
6. Mecanismos de resistencia a daptomicina en <i>S. aureus</i> .....	32
6.1. Características que contribuyen al desarrollo de cepas no susceptibles a daptomicina.....	32
6.2. Bases moleculares de la resistencia a daptomicina en <i>S. aureus</i> .....	34
6.2.1. Principales genes relacionados con la no sensibilidad a daptomicina.....	36
6.2.2. Otros genes relacionados con la no sensibilidad a daptomicina.....	38
<b>II. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>43</b>
<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>47</b>
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
1. Identificación de los microorganismos seleccionados para el estudio y determinación de la sensibilidad antibiótica.....	53
1.1. Selección de los microorganismos utilizados.....	53
1.2. Determinación de la sensibilidad antibiótica.....	53
2. Estudio del perfil genético de los aislados clínicos no susceptibles a daptomicina.....	55
2.1. Extracción del DNA.....	55
2.2. Amplificación de genes asociados a mutaciones que producen resistencia a <i>Staphylococcus</i> spp.....	55
2.3. Visualización de los amplicones, purificación del producto de PCR y secuenciación.....	58
2.3.1. Visualización de los amplificados.....	58

---

2.3.2. Purificación de los amplificados.....	58
2.3.3. Secuenciación y análisis de las secuencias.....	58
3. Selección de mutantes y amplificación de genes cuyas mutaciones se asocian a insensibilidad a daptomicina.....	60
3.1. Proceso de optimización del experimento de selección de <i>S. aureus</i> resistente a daptomicina.....	60
3.2. Selección de <i>S. aureus</i> con alto nivel de resistencia a daptomicina...	62
3.2.1. Método de obtención de cepas mutantes estandarizado para este estudio.....	62
3.2.2. Interpretación de los resultados obtenidos.....	63
3.3. Estudio de genes relacionados con insensibilidad a daptomicina en cepas obtenidas <i>in vitro</i> con alto grado de resistencia.....	64
4. Estabilidad de las cepas seleccionadas <i>in vitro</i> con alta resistencia a daptomicina.....	64
5. <i>Fitness cost</i> con y sin competencia.....	65
5.1. <i>Fitness</i> sin competencia.....	65
5.2. <i>Fitness</i> en competencia.....	65
6. Determinación de la producción de <i>biofilm</i> .....	67
7. Estudio de los componentes de la pared.....	67
7.1. Estudio de la composición lipídica.....	68
7.2. Estudio de la composición de ácidos grasos.....	68
<b>V. RESULTADOS.....</b>	<b>69</b>
1. Sensibilidad antibiótica de los aislados clínicos en estudio.....	71
1.1. Evaluación del grado de resistencia a daptomicina en los aislados	

---

clínicos.....	71
1.2. Evaluación de la sensibilidad a antimicrobianos de uso alternativo en los aislados clínicos.....	71
2. Obtención de cepas de <i>S. aureus</i> con alto nivel de resistencia a daptomicina.....	75
2.1. Proceso de optimización del experimento de selección de <i>S. aureus</i> con alta resistencia a daptomicina.....	75
2.2. Aislamiento de cepas con alto nivel de resistencia a daptomicina de <i>S. aureus</i> a partir de los aislados originales.....	75
2.2.1. Comportamiento de las cepas con alto nivel de resistencia a daptomicina obtenidas <i>in vitro</i> frente a fármacos alternativos.....	78
2.2.2. Estabilidad de las cepas seleccionadas <i>in vitro</i> con alto nivel de resistencia a daptomicina.....	83
3. Búsqueda de genes asociados a mutaciones que se relacionan con resistencia a daptomicina en <i>Staphylococcus</i> spp.....	84
3.1. Perfil de mutaciones asociadas a insensibilidad en los 9 aislados clínicos originales.....	84
3.2. Perfil de mutaciones asociadas a insensibilidad a daptomicina en aislados obtenidos a través de la selección de mutantes.....	93
3.2.1. Estudio genético de cepas mutantes procedentes de la cepa St 1.....	93
3.2.2. Estudio genético de mutantes procedentes del aislado clínico St 6.....	95
4. El precio de adquirir resistencia.....	95
4.1. <i>Fitness cost</i> sin competencia.....	95
4.2. <i>Fitness cost</i> en competencia.....	99

---

5. Determinación de la formación de <i>biofilm</i> en cepas originales y sus correspondientes mutantes.....	100
6. Estudio fenotípico: componentes de la pared bacteriana en cepas no sensibles a daptomicina.....	103
6.1. Composición de ácidos grasos de membrana en cepas de <i>S. aureus</i> con alta resistencia a daptomicina.....	103
6.2. Composición de lípidos de membrana en cepas de <i>S. aureus</i> con alta resistencia a daptomicina.....	104
<b>VI. DISCUSIÓN.....</b>	<b>107</b>
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>131</b>
<b>VIII. REFERENCIAS.....</b>	<b>135</b>
<b>IX. ANEXOS.....</b>	<b>165</b>



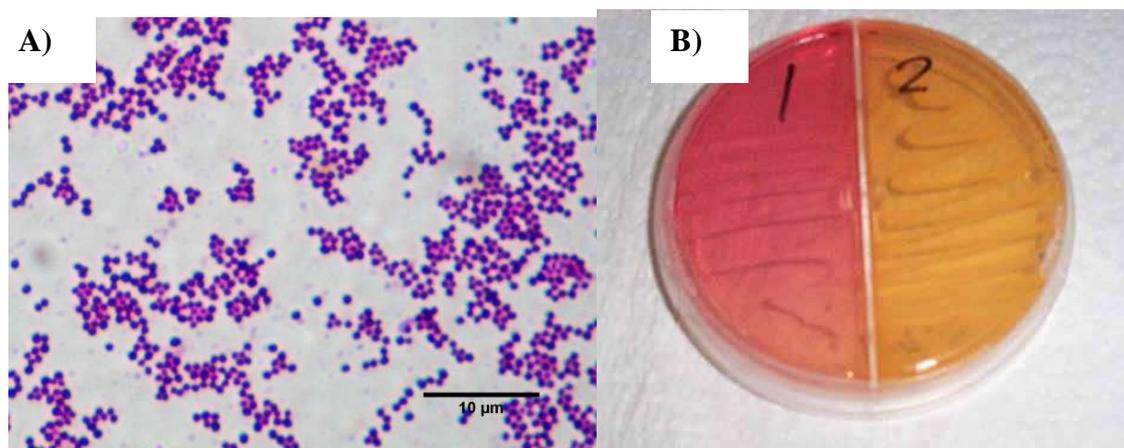
## *I. Introducción*

---



## 1. *Staphylococcus aureus*. Aspectos generales

El género *Staphylococcus* fue descrito en 1880 por Sir Alexander Ogston, y su denominación deriva de las palabras griegas *σταπηψιλε* y *κοκκος*, que significan racimo y bayas, respectivamente (Myles & Datta, 2012). Se trata de bacterias Gram positivas, aerobias y anaerobias facultativas, con bajo contenido en guanina y citosina en su ADN, que pertenecen a la clase *Bacilli*, orden *Bacillales* y a la familia *Staphylococcaceae*. Morfológicamente son cocos de entre 0,5 y 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro que, debido a su capacidad para dividirse en tres planos, pueden presentarse en agrupaciones que recuerdan a racimos de uvas, de ahí su nombre, o aparecer de forma aislada, en parejas, tétradas o cadenas cortas (Fig. 1A). A nivel macroscópico, las colonias de *Staphylococcus aureus* tienen un diámetro de 1-3 mm, son lisas, de márgenes bien definidos y pueden presentar un color amarillo dorado debido a la producción de pigmentos carotenoides (Costa et al., 2013). Esta especie, cuando crece en agar sangre, produce frecuentemente  $\beta$ -hemólisis alrededor de las colonias. En agar manitol salado, debido a las propiedades de cada especie, se puede diferenciar entre especies manitol positivas (*S. aureus*) o negativas (*Staphylococcus epidermidis*), al virar el color del medio de cultivo según el microorganismo fermente o no dicho azúcar (Fig. 1B).



**Figura 1.** A) Microscopía óptica, agrupación de *S. aureus* (Tinción de Gram, 10.000x). B) Placa de agar manitol salado: 1) *S. epidermidis*; 2) *S. aureus*.

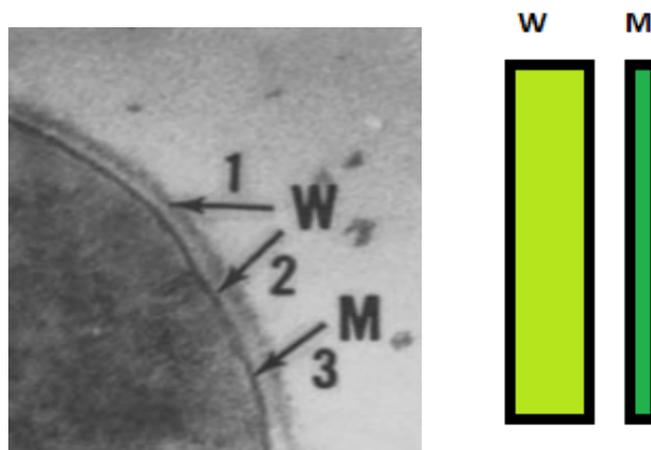
Dentro del género *Staphylococcus*, se considera como agentes potencialmente causantes de infecciones humanas a numerosas especies (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, *S. warneri*, *S. saprophyticus*...), aunque sólo algunas de ellas son patógenas en ausencia de circunstancias favorecedoras. *S. aureus* sigue siendo el patógeno principal del género, y uno de los principales patógenos humanos. Se trata de una bacteria comensal de la mucosa nasal y de la piel humana, con capacidad para colonizar de forma asintomática al ser humano, pero que puede asimismo causar infecciones de piel y tejidos blandos, infecciones osteoarticulares y bacteriemias, entre otras. Su gravedad puede oscilar desde cuadros leves (foliculitis, forúnculos) a cuadros potencialmente mortales, como bacteriemias o neumonías (Cheng et al., 2011; Laabei et al., 2015). Así, se considera que la bacteriemia por *S. aureus* tiene una mortalidad global, a los 14 días, en torno al 15%, y a los 90 días en torno al 30% (Kaasch et al., 2014). Un estudio reciente muestra que la mortalidad a 1 año y a 5 años de los pacientes que han sufrido una bacteriemia por *S. aureus* es del 62% y el 72% respectivamente (Yahav et al., 2016).

*S. aureus* es un microorganismo anaerobio facultativo, mesófilo, con capacidad para fermentar la glucosa y tolerar condiciones ambientales variables. Crece a una temperatura óptima de entre 30°C y 37°C, y tolera altas concentraciones de cloruro sódico. Este microorganismo presenta ciertos rasgos característicos, entre los que destacan su capacidad para unirse a la fracción Fc de las inmunoglobulinas (IgG) o la producción de coagulasa, que permiten distinguirlo de las otras especies del género. Con respecto a su material genético, posee un único cromosoma circular de 2,8 Mbps con bajo contenido en guanina y citosina. Su dotación genética puede incluir información adicional, que puede estar vehiculada tanto por fragmentos integrados en el cromosoma (transposones, secuencias de inserción, bacteriófagos, islotes de patogenicidad...) (Friedman et al., 2006; Crossley et al., 2009) como por plásmidos. Esta información adicional puede afectar a características muy diversas de la biología del microorganismo, incluyendo patogenicidad y resistencia a antimicrobianos.

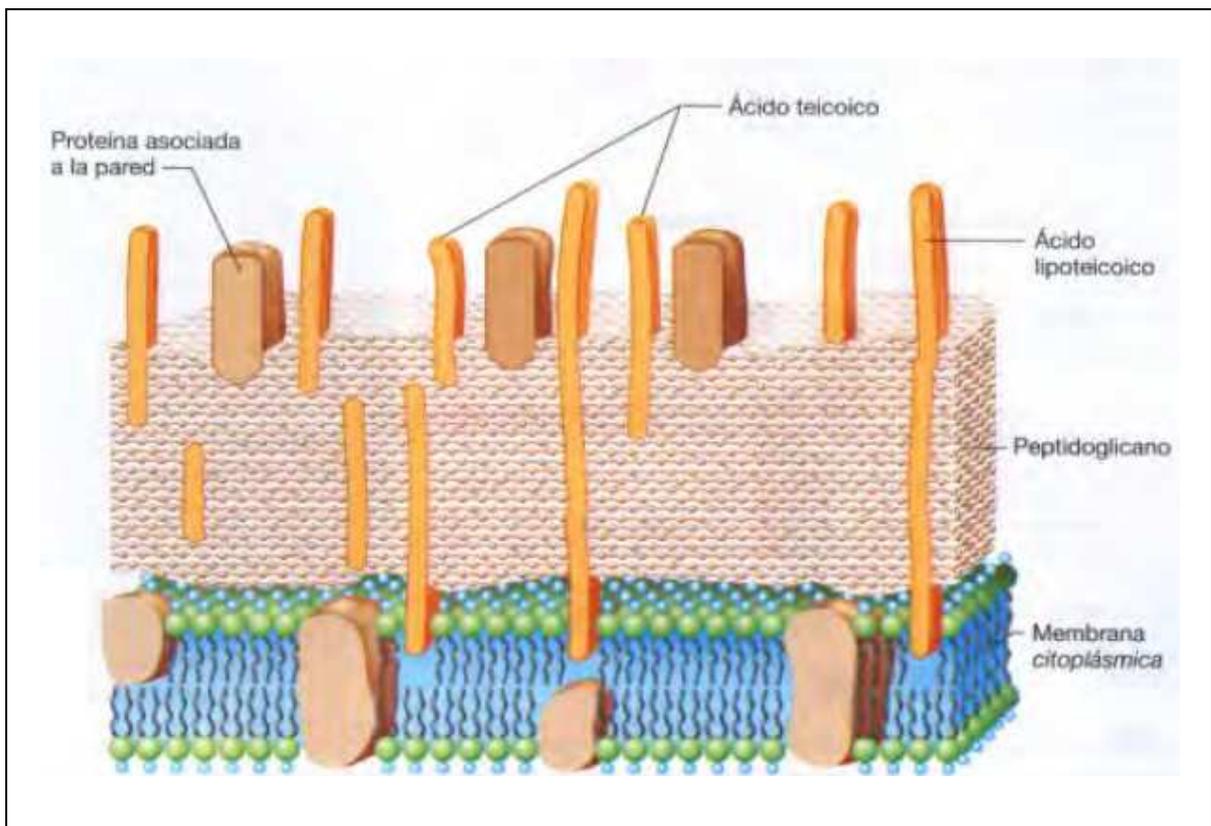
## 2. Factores de virulencia en *S. aureus*

### 2. 1. La envoltura celular, una fortaleza biológica para los fármacos

La pared celular de las bacterias Gram positivas esta formada por una capa gruesa tridimensional, constituida principalmente por peptidoglicano (PGN), polímero polisacárido que contiene subunidades de ácido N-acetil murámico y N-acetil glucosamina (Madigan et al., 2003). Las bacterias Gram negativas también contienen PGN en su pared, pero formando una capa mucho más fina, dentro de una estructura parietal más compleja que la de los Gram positivos (Fig. 2 y Fig. 3). El polisacárido A está compuesto por ácidos teicoicos (Fig. 3), polímeros de ribitol fosfato y azúcares unidos covalentemente al PGN. Son antigénicos, e inducen por tanto la aparición de anticuerpos. Además, su carga negativa contribuye a la carga neta global negativa que presenta la superficie de la bacteria (Madigan et al., 2003). Una diferencia entre los estafilococos no productores de coagulasa y *S. aureus* es que, éste último, contiene sobre todo ácidos teicoicos formados por ribitol fosfato, mientras en el resto de los estafilococos predomina el glicerol fosfato. Otro componente de la pared bacteriana son los ácidos lipoteicoicos, formados por glicerol fosfato, característicos de las bacterias Gram positivas. Tienen, entre otras funciones, la de regular la actividad de enzimas hidrolíticas, conservar ciertas proteínas dentro de la pared y mantener la homeostasis bacteriana, además de estar también involucrados en las interacciones entre bacteria y hospedador (Karatsa-Dodgson et al., 2010).



**Figura 2.** Sección de la envoltura bacteriana de *S. aureus* obtenida por microscopía electrónica (figura de la izquierda) (Suganuma, 1961) y su representación esquemática (figura de la derecha). En ambas imágenes se puede apreciar la pared celular (W) formada por PGN y la membrana plasmática (M).



**Figura 3.** Representación de la pared celular bacteriana en Gram positivas (Imagen obtenida de Madigan et al., 2003).

Asociada a la pared celular se encuentra la proteína A, habitualmente recubriendo al PGN (Tabla 1). Entre otras funciones, la proteína A posee la capacidad de reconocer y unirse a la fracción Fc de las IgG. Es específica de especie y puede liberarse al exterior. Esta proteína A se comporta como una adhesina de superficie que, al igual que otras que posee *S. aureus*, confiere a la bacteria la capacidad de unirse a determinadas proteínas de los mamíferos. La expresión de la proteína A tiene también funciones antifagocíticas, al dificultar la opsonización del microorganismo (Falugi et al., 2013). Además, algunas cepas presentan una cápsula que también dificulta la fagocitosis. Incluso una vez fagocitados, los estafilococos tienen la capacidad de dificultar su destrucción intracelular mediante la producción de catalasa, que descompone el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, bloqueando así uno de los principales sistemas líticos del fagolisosoma (Mandel, 1975; Dezfulian et al., 2010). En otras ocasiones, produce un exopolisacárido similar al de la cápsula pero no individualizado, que da lugar a la formación de un *slime* (matriz polisacárida) fundamental en la patogenia, entre otras, de las infecciones asociadas a dispositivos externos.

**Tabla 1.** Características diferenciales en tres especies del género.

	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Coagulasa	+	-	-
Fermentación manitol	+	-	-
Toxina $\alpha$	+	-	-
ADNasas termoestables	+	-	-
Proteína A	+	-	-
Ácidos teicoicos	Fosfato de ribitol	Fosfato de glicerol	Fosfato de ribitol

\*(+): presencia; (-): ausencia

## 2. 2. Productos extracelulares

### 2. 2. 1. Principales enzimas de *S. aureus*

La producción de coagulasa es característica de *S. aureus*. En la sangre, esta proteína termoestable forma fibrina a partir del fibrinógeno al unirse a la protrombina, creándose una especie de capa de fibrina alrededor de *S. aureus* (McAdow et al., 2012). Como se puede observar en la Tabla 1, es una característica más que permite diferenciarlo dentro del género.

Una enzima también relevante y característica de *S. aureus*, también mencionada en la Tabla 1, es la desoxirribonucleasa (ADNasa) termoestable, que es la encargada de destruir el ADN (Kumar et al., 2009). Otras enzimas como proteasas y fosfatasas, también intervienen en el desarrollo de la infección.

*S. aureus* también puede producir una lipasa, que favorece el curso de la infección al facilitar la diseminación de la infección en los tejidos mediante la hidrólisis de lípidos. Además, se ha observado que esta enzima está relacionada con la formación de biopelículas (Hu et al., 2012). La hialuronidasa desarrolla una función similar, al facilitar la difusión del microorganismo en los tejidos mediante la disgregación del ácido hialurónico, componente principal del tejido conjuntivo.

Las estafiloquinasas también favorecen la difusión del microorganismo en los tejidos, en este caso, disgregando sustancias que puede utilizar el organismo para acotar el área infectada, como la fibrina.

### 2. 2. 2. Toxinas de *S. aureus*

La acción patógena de *S. aureus* también puede venir dada por la producción de diversas toxinas. Esta especie se puede considerar como uno de los patógenos humanos mejor dotados en cuanto a la producción de enzimas, toxinas, etc., capaces tanto de facilitar la invasión y el daño a células y tejidos humanos (agresinas) como de evitar la destrucción del microorganismo por los factores defensivos del huésped (defensinas).

*S. aureus* puede producir toxinas de acción general, con funciones de rotura de la membrana y alteración de la permeabilidad de fagocitos (Costa et al., 2013), y otras de acción más especializada (Costa et al., 2013).

#### **TOXINAS DE ACCIÓN GENERAL**

- Las hemolisinas, pese a su denominación, son capaces de disgregar las membranas celulares no sólo de las células hemáticas, sino de muchos otros tejidos.
  - o **Toxina  $\alpha$** : es una de las hemolisinas más estudiadas en *S. aureus*. Su mecanismo de acción se basa en la destrucción de las membranas celulares produciendo poros transmembrana, que dan lugar a un desequilibrio osmótico y finalmente a la lisis celular (Meesters et al., 2009). Esta exotoxina actúa sobre las membranas de eritrocitos, leucocitos y plaquetas (Haque et al., 2017), lo que se puede apreciar en siembras en medios de cultivo de agar sangre, en los que aparece como un halo de  $\alpha$ -hemólisis alrededor de las colonias debido a una lisis parcial de los eritrocitos.

- **Toxina  $\beta$ :** es una esfingomielinasa sensible al calor. Actúa sobre la membrana de linfocitos T, monocitos y neutrófilos, y presenta una mayor toxicidad si se encuentran en presencia de  $Mg^{2+}$  por tener actividad fosforilasa C (Dinges et al., 2000; Huseby et al., 2007). Su presencia se puede observar también en medio de agar sangre como un doble halo de hemólisis, debido a la lisis completa de los hematíes.
- **Toxina  $\gamma$ :** esta hemolisina es producida por la mayoría de las cepas de *S. aureus*. En este caso, se ven afectadas células como neutrófilos, eritrocitos e incluso macrófagos (Changchien et al., 2016; Dinges et al., 2000; Gillman et al., 2017), pero no da lugar a la aparición de ningún tipo de hemólisis en placas de agar sangre.
- **Toxina  $\delta$ :** exotoxina con capacidad para destruir diferentes tipos de células en mamíferos e incluso otras estructuras como son orgánulos y esferoplastos (Dinges et al., 2000; Huseby et al., 2007). Este péptido es producido por la mayoría de las cepas de *S. aureus* y, aunque no ha sido tan estudiado como los anteriores, se sabe que está regulada por el gen *agr* (Dinges et al., 2000).
- **Leucocidina de Panton Valentine (LPV):** esta exotoxina destruye leucocitos polimorfonucleares, al igual que las hemolisinas anteriores, produciendo poros en la membrana celular (Changchien et al., 2016; Haque et al., 2017; Leistner et al., 2017). Tanto la LPV como la toxina  $\gamma$  están formadas por dos componentes, las subunidades F y S (Alonzo & Torres, 2014). Dado que el componente F de cualquiera de ambas toxinas puede interactuar con la

otra uniéndose al componente S, *S. aureus* puede producir nuevas toxinas cruzadas (O' Callaghan, 2018).

### **TOXINAS DE ACCIÓN ESPECIALIZADA**

- **Exfoliativas (TE):** son serinproteasas que destruyen proteínas de la piel (desmogleina 1) lisando así las uniones intercelulares (Amagai et al., 2002; Bukowski et al., 2010). Existen dos proteínas, la toxina exfoliativa A y la toxina exfoliativa B, relacionadas con la patogénesis del síndrome de la piel escaldada estafilocócica (Changchien et al., 2016) y con el impétigo ampolloso. En este último caso, la infección se encontraría localizada donde se sitúan las lesiones, mientras que en el síndrome de la piel escaldada la toxina pasaría al torrente sanguíneo, extendiéndose a otras zonas del organismo afectado (Bukowski et al., 2010; Pietrocola et al., 2017).
- **Enterotoxinas:** pese a su gran capacidad invasiva, *S. aureus* es capaz asimismo de dar lugar a cuadros estrictamente tóxicos, mediados exclusivamente por la producción de toxina, que puede actuar como toxina preformada. Las enterotoxinas son exotoxinas que se comportan como superantígenos, y que son elaboradas en la fase exponencial del crecimiento bacteriano. Son producidas principalmente por *S. aureus*, y son las causantes de las toxiinfecciones estafilocócicas (Argudín et al., 2010; Hennekinne et al., 2012). Las principales causas de contaminación alimentaria por enterotoxina estafilocócica son la manipulación inadecuada de los alimentos, y la contaminación a partir de secreciones nasales de personas portadoras. La información genética necesaria para producir estas enterotoxinas pueden ir incluidas en plásmidos, islas de patogenicidad, profagos o en cassettes cromosómicos estafilocócicos, lo que facilita su diseminación (Argudín et al., 2010; Hennekinne et al., 2012).

- **Toxina-1 del síndrome del shock tóxico (STSS-1):** es una toxina producida por algunas cepas de *S. aureus*, que se comporta también como superantígeno. Produce el síndrome del shock tóxico estafilocócico, enfermedad multisistémica debida al aumento de citocinas proinflamatorias como consecuencia de la gran activación de linfocitos T que genera (Rukkawattanakul et al., 2017).

### 2. 3. Biopelículas o *biofilm*

La formación de biopelículas es la capacidad que tienen algunos microorganismos para formar agrupaciones de células bacterianas envueltas por una película común, formada por un polisacárido (*slime*) segregado por las propias bacterias, codificado por el operón *ica*, y que les permite la adhesión a diferentes tipos de superficies (Fabres-Klein et al., 2015). Algunas cepas de *S. aureus* presentan también la capacidad de formar este tipo de biopelículas tanto en tejidos como en superficies inertes, lo que incluye diversos dispositivos médicos como sondas, catéteres, prótesis, etc. (Boles & Horswill, 2008; Iyamba et al., 2016). Esta característica permite al microorganismo protegerse de la respuesta inmune. Además, la biopelícula es poco permeable a algunos antimicrobianos, y el estado metabólico atenuado en que se encuentran los microorganismos incluidos en la biopelícula dificulta la actividad de otros, como los  $\beta$ -lactámicos. Se ha observado que *S. aureus* ATCC 29213 y *S. epidermidis* ATCC 35984 presentan una sensibilidad menor a ciertos fármacos, como algunos  $\beta$ -lactámicos (oxacilina, cefataxima) y a vancomicina a causa de la baja penetración que presentan cuando deben traspasar esta estructura bacteriana (Singh et al., 2010).

Para que la formación de biopelículas funcione, requiere de un sistema *quorum sensing* o sensor *quórum* (QS), es decir, de la capacidad de comunicación entre las células. Esta característica se asocia al sistema QS del regulador genético accesorio

(*agr*, *accessory gene regulator*), que regula la expresión de diferentes genes de virulencia en *S. aureus* y, junto a ello, la capacidad de invasión del huésped (Yarwood et al., 2004; Fabres-Klein et al., 2015). En *S. aureus*, una baja actividad del sistema QS y altos niveles de glucosa, que reprime dicho sistema, fomentan la formación de biopelículas. Sin embargo, en presencia de proteasas se produce la disrupción de la biopelícula y la separación de las células (Boles & Horswill, 2008).

### **3. Evolución de la resistencia de *S. aureus* a los antimicrobianos**

A lo largo de la historia, la aparición de nuevos fármacos antimicrobianos ha venido seguida siempre, más temprano o más tarde, de la selección de microorganismos portadores de diferentes mecanismos que les hacían resistentes a los antimicrobianos desarrollados. En ocasiones se trataba de mecanismos de resistencia contemplados previamente en la naturaleza para proteger a los propios microorganismos productores de antimicrobianos, pero incluso cuando se han desarrollado fármacos completamente sintéticos, han acabado emergiendo y seleccionándose mecanismos capaces de conferir resistencia a los mismos.

#### **3. 1. Antimicrobianos $\beta$ -lactámicos**

Durante décadas, los antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos han constituido el tratamiento de elección frente a las infecciones estafilocócicas. Se trata de antibióticos bactericidas con actividad tiempo-dependiente. Como se puede observar en la Fig. 4, presentan un anillo  $\beta$ -lactámico unido, en casi todos los casos, a otra estructura cíclica, que varía según se trate de penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, etc. Se pueden clasificar

en penicilinas, inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, cefalosporinas, divididas a su vez en cinco generaciones, carbapenemas y monobactamas.

### **3. 1. 1. Resistencia a los $\beta$ -lactámicos**

Inicialmente, el tratamiento de elección de las infecciones estafilocócicas fueron las penicilinas. La rápida aparición y difusión de la producción de penicilinasas plasmídicas en las principales especies clínicas, como *S. aureus* (Chambers & DeLeo, 2009; DeLeo & Chambers, 2009), fue reduciendo progresivamente su utilidad. Hacia finales de la década de 1950, la difusión de la producción de penicilinasas en los aislamientos clínicos de *S. aureus* se había convertido en un problema clínico de gran trascendencia. Las investigaciones dirigidas a controlar este problema desembocan, a finales de los cincuenta y principios de los 60, en la aparición de dos nuevos grupos de antimicrobianos teóricamente capaces de controlar este problema: la primera generación de cefalosporinas, y el grupo conocido en conjunto como penicilinas resistentes a penicilinasas estafilocócicas (PRPE), integrado fundamentalmente por las isoxazolil penicilinas (oxaciclina, cloxacilina, dicloxacilina, nafcilina entre otros) y meticilina. Posteriormente, la aparición de las diferentes combinaciones  $\beta$ -lactámico/inhibidor de  $\beta$ -lactamasas vino a incidir también en la mejora del comportamiento de los  $\beta$ -lactámicos frente a estafilococos productores de penicilinasas. Casi simultáneamente con la introducción de las primeras PRPE, se describen los primeros *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) (Munita et al., 2015) (DeLeo & Chambers, 2009), que por primera vez condicionan la actividad de todos los  $\beta$ -lactámicos. A medida que van aumentando su prevalencia, van obligando a recurrir con mayor frecuencia a otros grupos de antimicrobianos, fundamentalmente glicopéptidos.

La progresiva multirresistencia de estos estafilococos, en especial desde que, a lo largo de los años 90, se describen las primeras cepas con resistencia intermedia a vancomicina, obliga a intensificar la investigación en nuevos fármacos.

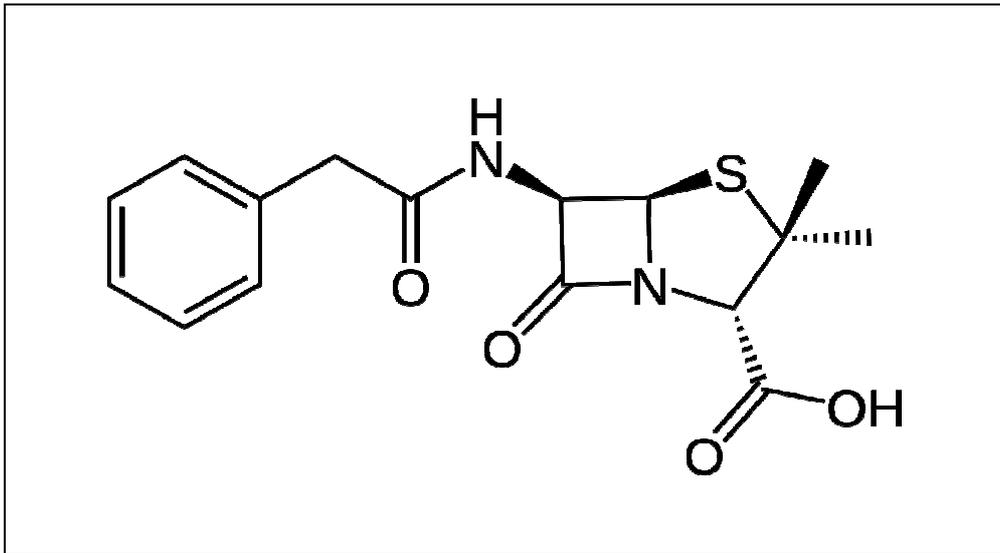


Figura 4. Estructura química de penicilina.

Los SARM incorporan un fragmento de ADN exógeno denominado *SCCmec*, el cual incluye un gen *mec* (por lo general *mecA*, y ocasionalmente *mecC*), que es el que determina la resistencia a todos los  $\beta$ -lactámicos (Paterson et al., 2014), con excepción de algunas cefalosporinas de muy reciente aparición, con actividad específica frente a SARM (Jacqueline et al., 2007; Saleh-Mghir et al., 2012). Dichos genes, codifican la síntesis de una proteína fijadora de penicilina adicional, denominada PBP2a (Penicillin-Binding Protein 2a), también conocida como PBP2', con una afinidad por los  $\beta$ -lactámicos muy reducida con respecto a la del resto de PBPs (Mendes et al., 2012). Ello hace que se requieran, para inhibir la actividad metabólica de esta PBP2', cantidades de antibiótico muy superiores a las necesarias para inhibir a otras PBPs (en la mayor parte de los casos, cientos de veces superiores). A efectos prácticos, esto se traduce en

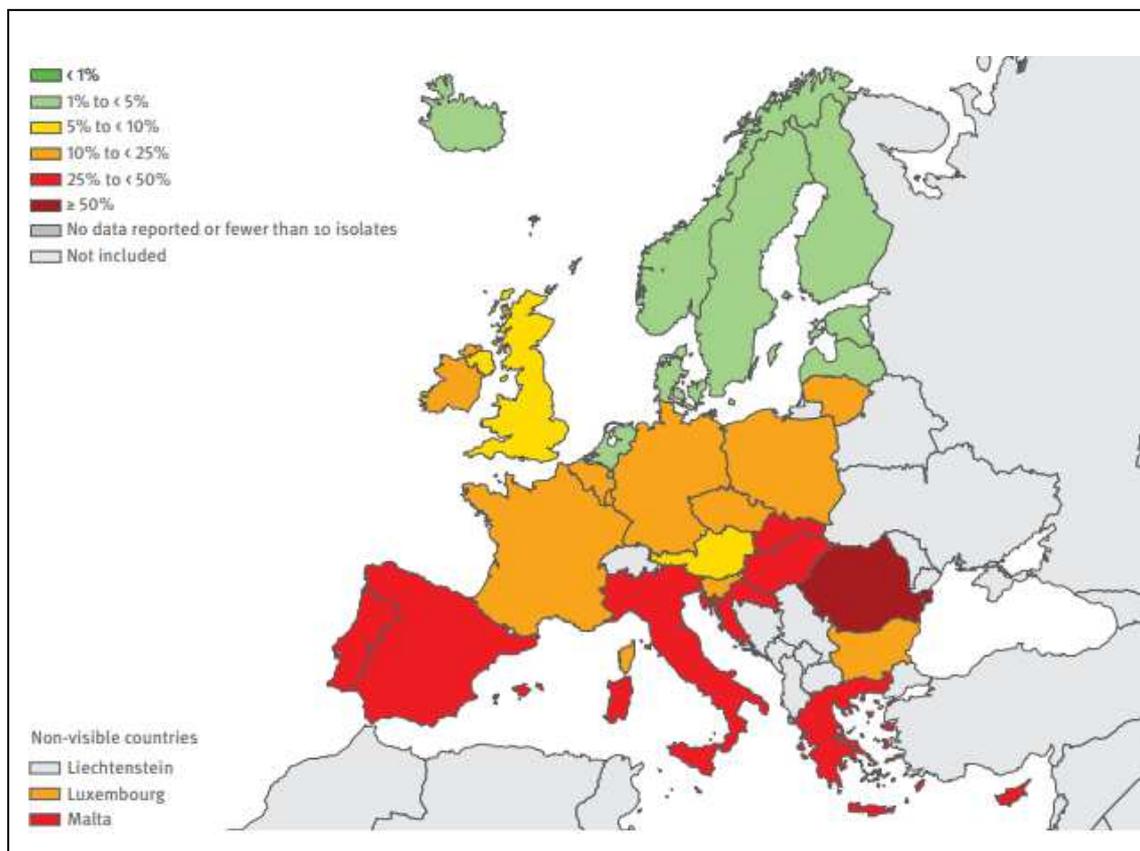
que, a concentraciones clínicas, no es posible inhibir la actividad metabólica de esta PBP2' con ningún  $\beta$ -lactámico, con excepción de las nuevas cefalosporinas de 5ª generación, lo que convierte a los *S. aureus* capaces de producir esta PBP2' en resistentes a todos los  $\beta$ -lactámicos, con la excepción apuntada más arriba de algunas nuevas cefalosporinas como ceftobiprol (Saleh-Mghir et al., 2012) o ceftarolina (Jacqueline et al., 2007).

Los genes *mec* se considera que proceden, probablemente, de especies de estafilococos fundamentalmente saprofitas, como *S. sciuri*, desde las que eventualmente han sido capaces de saltar a otras especies más patógenas (Wu et al., 2001). No se trata, no obstante, de una transferencia sencilla. Se considera que, a lo largo de la historia, sólo se han dado las circunstancias necesarias para que se produjera esta circunstancia en un número muy limitado de ocasiones. En cada una de estas circunstancias se habría generado uno de los linajes de SARM actualmente circulantes.

Tras años de constituir un hallazgo clínico infrecuente, a partir de los años 70 y 80 la frecuencia de aislamiento de SARM empieza a aumentar, convirtiéndose en el paradigma de patógeno nosocomial y en un problema clínico de primer orden a nivel mundial. En 2016 se estimó, a partir de los datos procedentes de los laboratorios que informaron sistemáticamente (2013-2016), que el porcentaje promedio de SARM en la población de la Unión Europea era del 13,7%. Se ha incluido la Fig. 5, donde queda representada, en porcentajes, la diferencia entre los diferentes países europeos con respecto a la prevalencia de aislados de SARM.

En un estudio realizado en España en 2016, sobre 1.945 aislados de *S. aureus*, el 25,8% fueron SARM (EARSS, 2016). En otros países como Portugal y Rumania el porcentaje fue mayor, del 43,6% y 50,5 % respectivamente (Fig. 5). En conjunto, como viene ocurriendo ya desde hace años, las prevalencias más bajas se describen en los países nórdicos y Holanda, con cifras inferiores al 5%, a los que se incorporan en esta

estadística algunas de las repúblicas bálticas. Las prevalencias más altas se observan en Rumanía, con cifras superiores al 50%, y se mantienen en cifras altas entre el 25 y el 50% en los países mediterráneos, que son los que clásicamente han venido manteniendo prevalencias más elevadas desde hace años (EARSS, 2016) Fig. 5. En conjunto, la prevalencia global en Europa en 2017 mantiene la paulatina tendencia a la baja que se viene observando desde hace ya algunos años.



**Figura 5.** Representación del porcentaje de aislados informados SARM en 2016. Imagen obtenida de EARSS, 2016.

### 3. 2. Antimicrobianos glucopéptidos

Durante años, la alternativa terapéutica principal frente a SARM, sobre todo en infecciones graves, fueron los glucopéptidos, tales como vancomicina (Fig. 6) o teicoplanina (Gardete & Tomasz, 2014). Vancomicina es un antibiótico glicopéptido tricíclico de espectro reducido, activo casi exclusivamente frente a bacterias Gram positivas.

Pese a ser un antibiótico más antiguo que meticilina y el resto de PRPE, su toxicidad inicial, más asociada a una insuficiente pureza del antimicrobiano que al antimicrobiano en sí, y la rápida aparición de antimicrobianos más cómodos y seguros de utilizar frente a *S. aureus* productores de penicilinas, como cefalosporinas de primera generación y PRPE, redujeron mucho su uso, y por tanto la presión selectiva sobre eventuales aislamientos resistentes.

En cuanto a su mecanismo de acción, vancomicina actúa sobre la pared celular bacteriana. La síntesis de la misma se ve afectada al unirse vancomicina, dentro del PGN, mediante enlaces de hidrógeno, al dipéptido terminal D-alanil-D-alanina (D-Ala-D-Ala), dentro del pentapéptido disacárido unido al lípido II y a la cadena en formación de PGN. De este modo, se impide la transglicosilación y transpeptidación, obstaculizando así la síntesis adecuada de la pared (Reynolds et al., 1989; Pereira et al., 2007). Además vancomicina tiene otras acciones secundarias, probablemente menos trascendentes en la lisis del microorganismo, como la inhibición de la síntesis del RNA y la alteración de la permeabilidad de la pared.

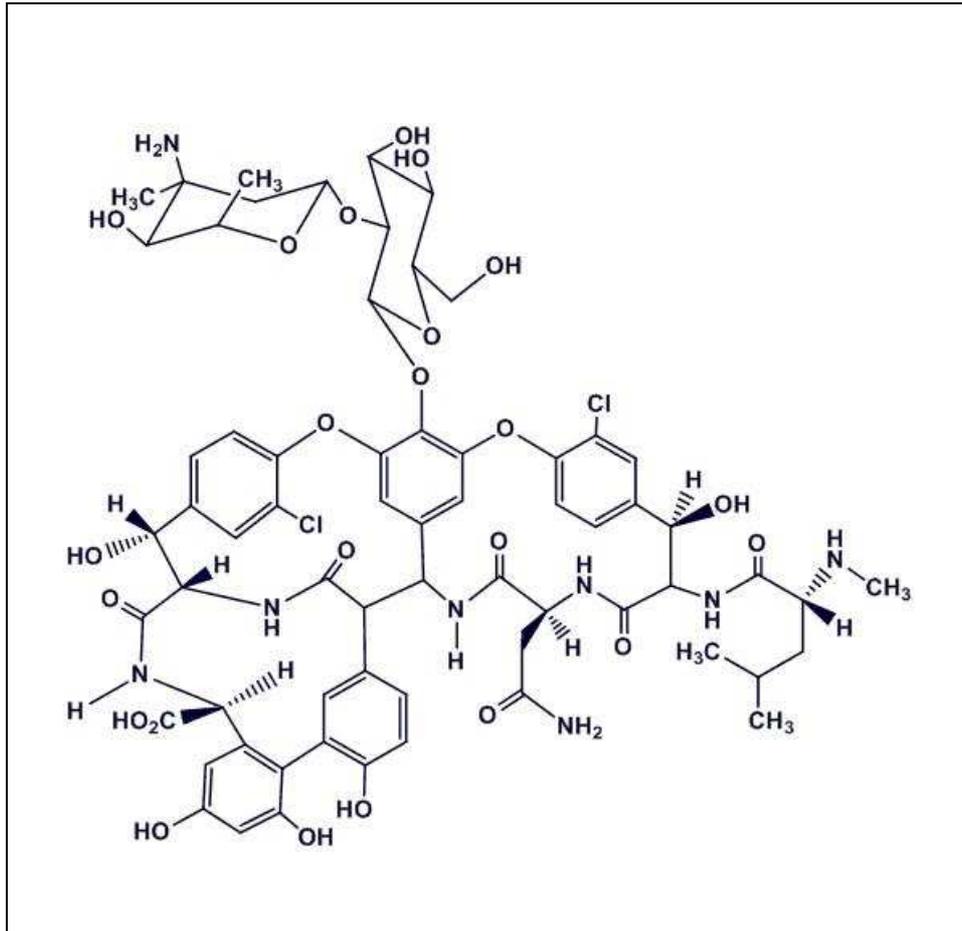


Figura 6. Estructura química de vancomicina.

### 3. 2. 1. Mecanismo de resistencia a vancomicina

La difusión de SARM, a partir sobre todo de los años 80, llevó a un incremento de su uso tanto en protocolos de tratamiento empírico como en tratamientos dirigidos, y ello, inevitablemente, a la aparición, primero, de aislamientos con sensibilidad reducida, y finalmente de aislamientos abiertamente resistentes (O'Driscoll et al., 2015; Stefani et al., 2015). La primera cepa aislada, comúnmente conocida como Mu50 (Conly & Johnston, 2002) que mostró sensibilidad disminuida a vancomicina (VISA:

*vancomycin-intermediate S. aureus*, GISA: *glycopeptide-intermediate S. aureus*) apareció en Japón en el año 1997 (Hiramatsu, 1997; Aksoy & Unal, 2008).

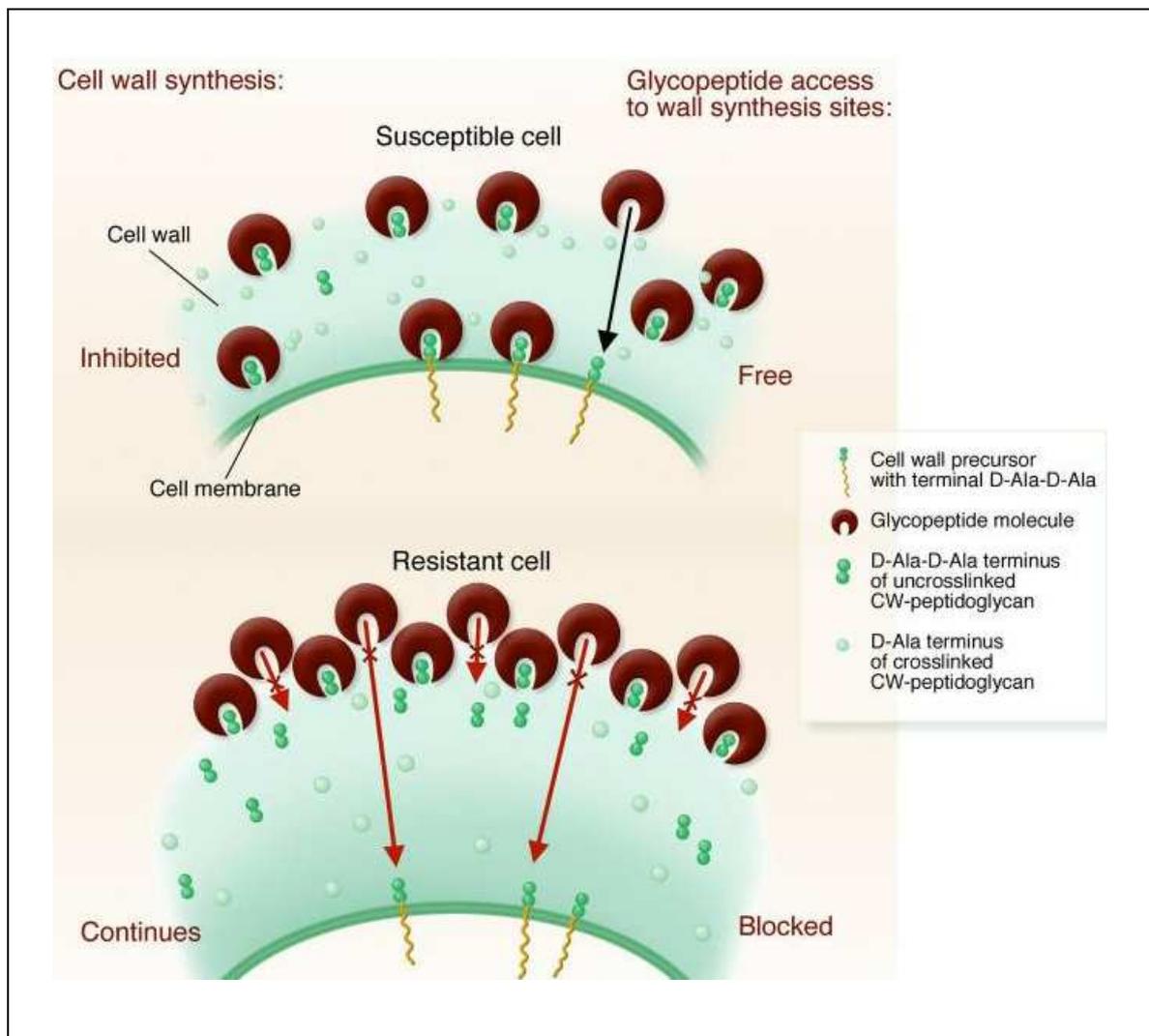
Aunque vancomicina sigue siendo un antimicrobiano de primera línea en el tratamiento de infecciones por estafilococos (Rubinstein & Keynan, 2014), se ha observado que el problema no sólo lo constituyen los aislamientos netamente resistentes; aislamientos que presenten una concentración inhibitoria mínima (CIM) de vancomicina  $\geq 1,5$  mg / L, aunque entran en el intervalo de cepas sensibles *in vitro*, tienen un riesgo de fracaso terapéutico mayor y una mayor mortalidad si son tratadas con vancomicina (Lodise et al., 2008).

### ***Resistencia intermedia a los glicopeptidos***

Se considera que tienen resistencia intermedia aquellos aislados que presentan una CIM de vancomicina entre 4 y 8 mg/L. Presentan un fenotipo heterogéneo (hetero-VISA), de modo que aparecen subpoblaciones (frecuencia  $<1/10^6$ ) de crecimiento más lento, que pueden crecer en presencia de vancomicina a las concentraciones anteriormente mencionadas. La heterogeneidad acabaría desapareciendo, formándose una población con un mismo fenotipo VISA de crecimiento uniforme. Dicha resistencia aparece por mutaciones cromosómicas que producen un engrosamiento de la pared bacteriana (Hiramatsu, 2001), produciéndose un aumento de residuos D-Ala-D-Ala. La propia vancomicina actuaría de muralla al unirse a los residuos D-Ala-D-Ala impidiendo que el resto de moléculas del medio logren atravesarla. El mecanismo de acción que presentan estas cepas aparece resumido en la Fig. 7.

Por otro lado, se han observado algunos genes afectados, estando algunos de ellos también relacionados con la sensibilidad reducida a daptomicina, tales como *mprF*,

una lisil-fosfatidil glicerol sintetasa, *rpoB* (RNA polimerasa), *walk* (sensor/regulador), además de otros genes también relacionados con la pared como *sceD* (transglicosilasa), *atl* (autolisina), *lytM* (peptidoglicano hidrolasa)... (Samanta & Elasri, 2014).

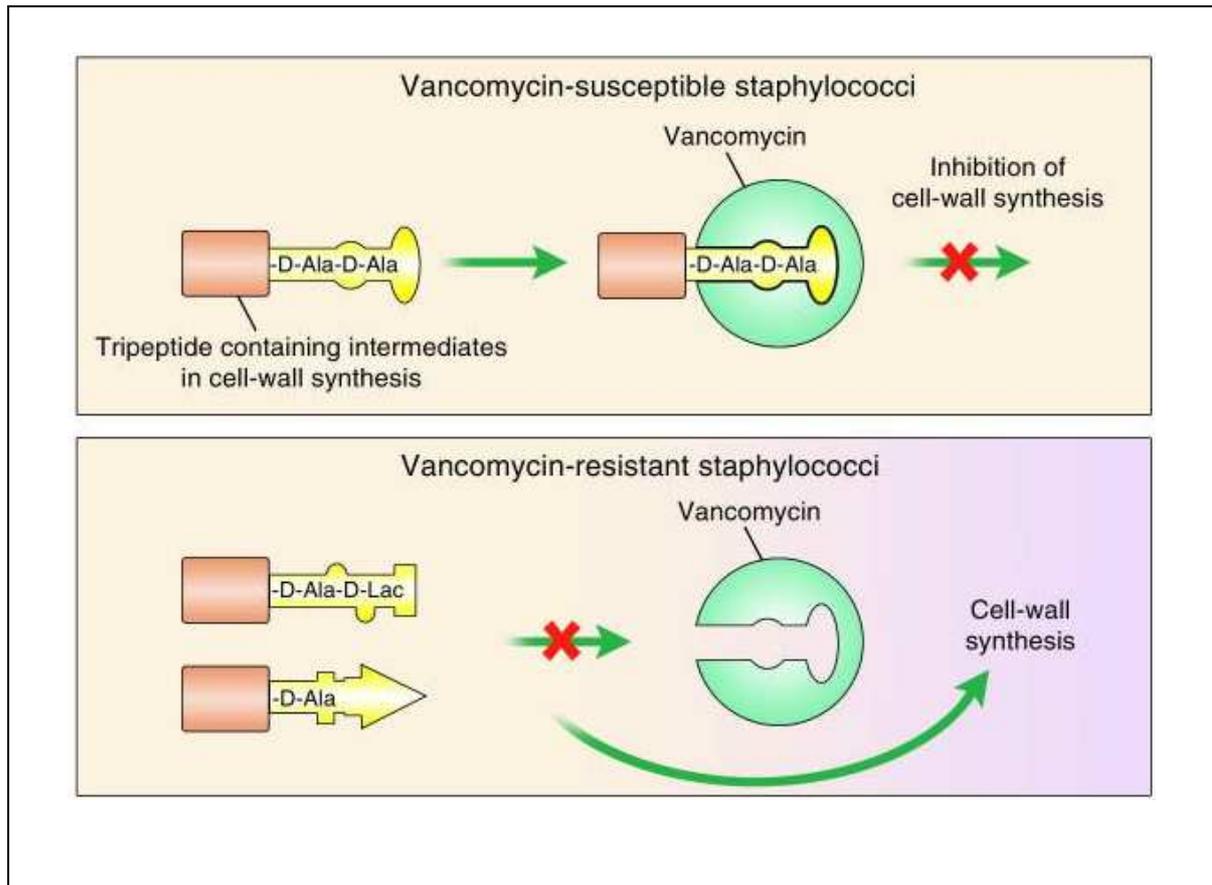


**Figura 7.** Representación esquemática del mecanismo de resistencia en cepas VISA. Imagen obtenida de Lowy, 2003.

### ***Alto grado de resistencia a los glicopeptidos***

Se consideran *S. aureus* con alto grado de resistencia a vancomicina (SARV) aquellos que presentan una CIM de vancomicina superior a 16 mg/L. Mientras que en enterococos se publicó resistencia de alto grado a glicopéptidos por primera vez ya en 1988, no fue hasta 2002 cuando se documentó en Estados Unidos la existencia de aislados clínicos de SARV (Conly & Johnston, 2002; Périchon & Courvalin, 2009), con una CIM de vancomicina >32 mg/L.

En este caso, la resistencia se debe a la transferencia del transposón Tn1546, que es portador del gen *vanA*. Este gen fue descrito originalmente en enterococos, y se considera que los estafilococos lo han adquirido a partir de éstos (Arthur et al., 1993; Périchon & Courvalin, 2009). El gen *vanA* confiere resistencia de alto nivel a vancomicina y teicoplanina. VanA es una ligasa, que sustituye el residuo D-ala-D-ala que forma la parte final del pentapéptido que se encuentra anclado al ácido N-acetil-murámico de la pared por D-alanina-D-Lactato (D-Ala-D-Lac) (Moubarec et al., 2009). Uno de los últimos pasos de la síntesis de la pared es la eliminación de la última alanina del pentapéptido, que de este modo queda convertido en un tetrapéptido (Ala-Glu-Lys-Ala) que se unirá a otro tetrapéptido igual, anclado a otra molécula de N-acetil-murámico, dando lugar de este modo a una unión cruzada entre las cadenas primarias de N-acetil-murámico y N-acetil-glucosamina. Sin embargo, el bloqueo que los glicopéptidos son capaces de establecer sobre este dipéptido final alanilalanina, impidiendo su conversión en tetrapéptido y por tanto el establecimiento de la unión cruzada entre las cadenas primarias, no se produce en el caso del dipéptido alanil lactato, de modo que la síntesis de la pared sigue adelante con normalidad (Fig. 8). Para que se exprese este tipo de resistencia se requiere de la presencia del antibiótico en el medio. Tanto vancomicina como teicoplanina actuarían así como inductores de este mecanismo de resistencia.

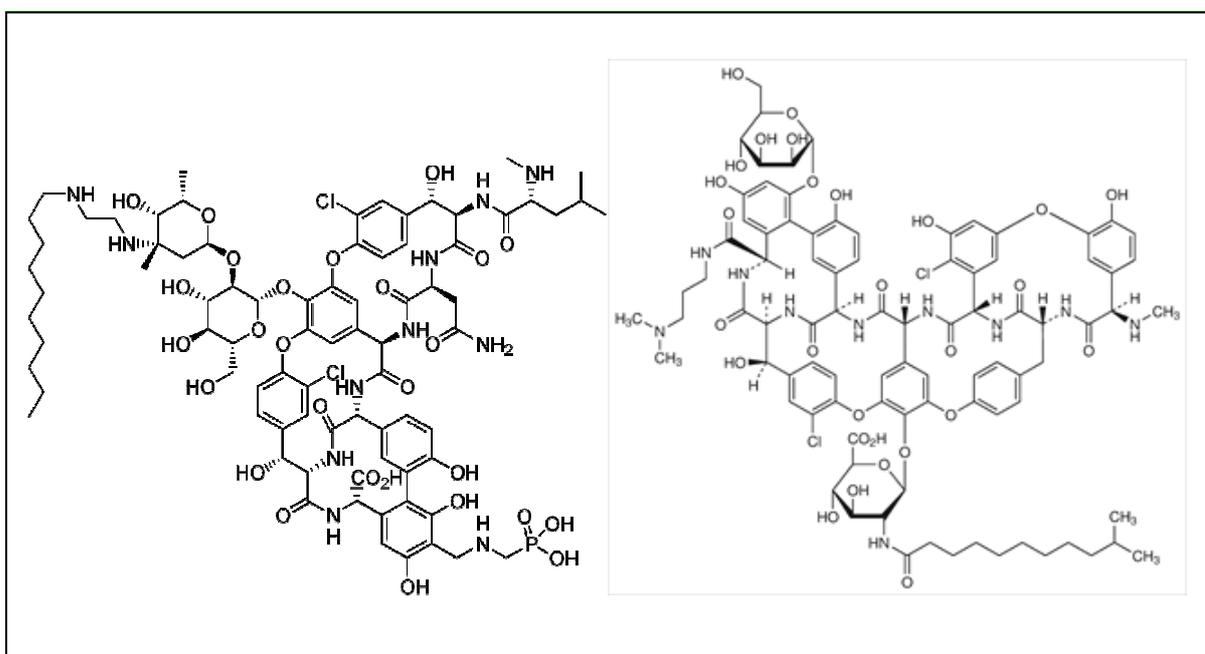


**Figura 8.** Representación esquemática del mecanismo de resistencia en cepas SARV. Imagen obtenida de Lowy, 2003.

### 3. 2. 2. Nuevos derivados semisintéticos: los lipogluco péptidos

La emergencia de aislados clínicos VISA y SARV, junto con la descripción de fracasos terapéuticos en aislados sensibles a vancomicina con una CIM en torno a 2 mg/L (Sakoulas et al., 2004; Soriano et al., 2008; Lodise et al., 2008), han hecho que la investigación sobre nuevos antimicrobianos que puedan actuar sobre cepas SARM se mantenga activa. De esta forma, se han ido desarrollando e introduciendo en clínica nuevas moléculas como telavancina, oritavancina y dalbavancina Fig. 9. Son

lipoglucopeptidos que muestran mayor actividad que vancomicina (Citron et al., 2005; Streit et al., 2005; Pfaller et al., 2007; Kmeid & Kanafani, 2015). Son antimicrobianos bactericidas y su mecanismo de acción también está focalizado en la interrupción de la síntesis de la membrana bacteriana. A pesar de presentar un espectro de actividad bastante similar, en el caso de dalbavancina no lo es frente a enterococcos VanA (Streit et al., 2005).

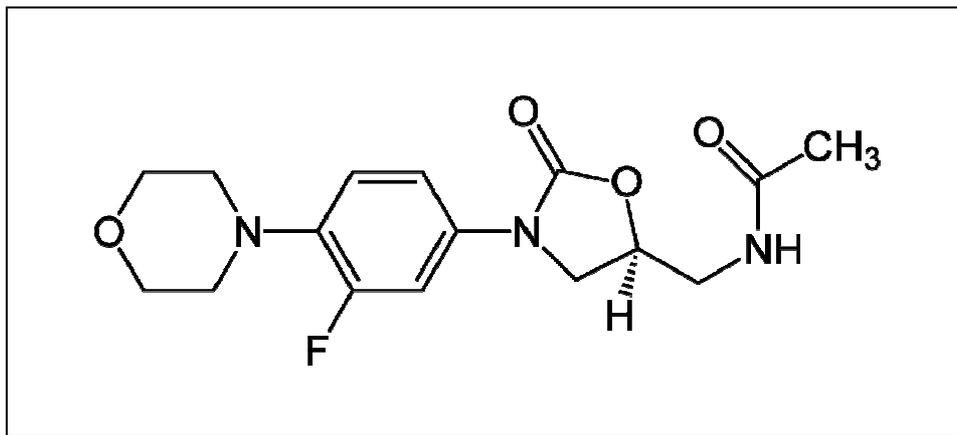


**Figura 9.** Estructura química de telavancina (izquierda) y dalbavancina (derecha).

### 3. 3. Oxazolidinonas

Las oxazolidinonas fueron desarrolladas como inhibidores de la monoaminoxidasa (MAO). La primera oxazolidinona introducida en uso clínico y con actividad frente a SARM fue linezolid (Fig. 10). Este oxazolidinona fluorada se aprobó para uso clínico por la FDA en Estados Unidos en el 2000 y en Europa un año después. Es también

activo frente a infecciones por SARM y VISA, y presenta características favorables como su excelente biodisponibilidad por vía oral y su excelente difusión a tejido óseo (Joel et la., 2014).



**Figura 10.** Estructura química de linezolid.

El mecanismo de acción de linezolid se basa en la inhibición de la síntesis de proteínas. Para ello, se requiere su fijación al dominio V, sitio A del centro peptidil transferasa, del ARN ribosómico (ARNr) 23S de la subunidad 50S, impidiendo la formación del complejo de iniciación (Livermore, 2003; Wilson et al., 2008; Joel et al., 2014). No obstante, estudios posteriores demuestran que su actuación sobre la síntesis proteica bacteriana se produce en más puntos (alteración del *locus* de fijación del ARNt, génesis de proteínas mutadas y de extensión errónea, etc.). Como ocurre con la mayor parte de los antimicrobianos que actúan sobre la síntesis proteica bacteriana, se trata de un antimicrobiano bacteriostático.

### 3. 3. 1. Mecanismo de resistencia a linezolid

Actualmente la frecuencia de resistencia a linezolid en *S. aureus* es baja, aunque existe la posibilidad de brotes epidémicos (Endimiani et al., 2011). Uno de los mecanismos de resistencia a linezolid es la modificación de la diana. En este caso, se ha observado tanto en cepas seleccionadas *in vitro* como en aislados clínicos de *S. aureus* que la insensibilidad se relaciona con la presencia de una mutación G2576T en el dominio V de la subunidad 23S del ARNr (Livermore, 2003). Otras mutaciones como T2500A, y la pérdida de una copia del gen *rrna*, que codifica el RNAr 23S se han relacionado con dicha resistencia en aislados clínicos de SARM (Meka et al., 2004). Otro mecanismo observado recientemente en *S. aureus* es la aparición de una mutación en una RNA metiltransferasa conservada (*rlmN*), que metila la posición A2503 del ARNr 23S. Según Gao et al. (2010), la inserción de un codon CAA en el extremo C-terminal de la enzima, tiene como resultado la obtención de cepas con menor sensibilidad a linezolid.

Puede deberse también a mutaciones en las proteínas ribosómicas L3 y L4 del centro de translocación peptídica, asociadas a los genes *rplC* y *rplD* respectivamente (Mendes et al., 2010; Deshpande et al., 2015).

Finalmente, en 2007 se describió la metilación en el RNAr 23S como una nueva forma de adquirir resistencia en SARM, debido al gen *cfr*, que cataliza la metilación de la adenosina en la posición 2503 (Toh et al., 2007; Morales et al., 2010). Aunque su prevalencia no es alta, los brotes epidémicos producidos, en su mayor parte, han estado asociados a este mecanismo de resistencia (Sierra et al., 2013). Esta metiltransferasa se adquiere bien por diseminación de transposones o por plásmidos (Mendes et al., 2013), de tal forma que, por ejemplo, en un aislado clínico de SARM (cepa CM05) se encontró el gen *cfr* incluido en el cromosoma de la bacteria, a pesar de presentar plásmido, y localizado precisamente aguas debajo de un gen *erm* (B) (Smith & Mankin, 2008). Estos genes se encuentran codificados por el operón *mlr*, y se expresan de forma constitutiva (Locke et al., 2012). Cfr forma parte de la familia de

enzimas con radicales S-adenosilmetionina, que metila los átomos del C8, para formar 8-metiladenosina, en A2503 y en menor medida, tiene la capacidad de metilar los átomos de carbono C2, para formar 2,8-dimetiladenosina (Challand et al., 2013; Stojković et al., 2016). Este mecanismo daría a su vez resistencia cruzada sobre otros antimicrobianos que actúan en el ribosoma bacteriano, tales como macrólidos, fenicoles, lincosamidas y estreptogramina A (Long et al., 2006). Este gen se ha encontrado en otros géneros como *Escherichia coli* (Kaminska et al., 2010), *Bacillus* (Dai et al., 2010) y *Enterococcus* (Deshpande et al., 2015).

#### **4. Daptomicina, uno de los últimos recursos**

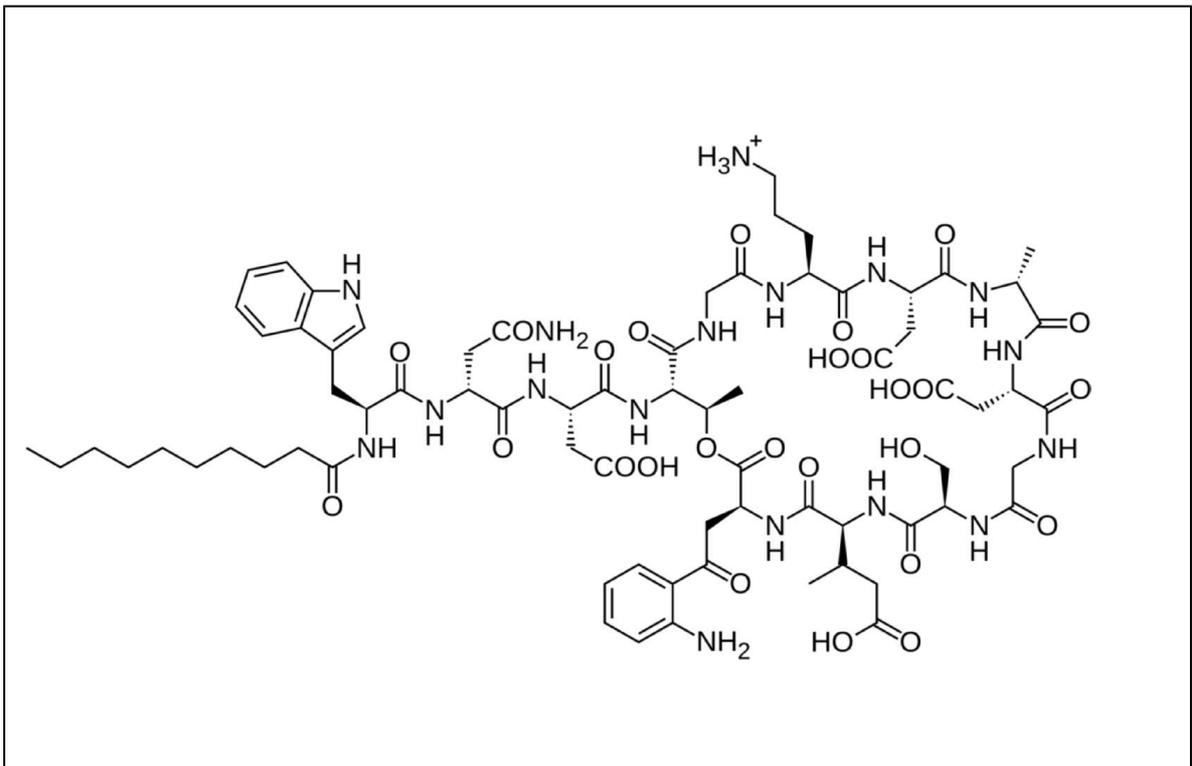
##### **4. 1. Perfil del antimicrobiano: estructura química, características y mecanismo de acción**

El primer lipopéptido descubierto fue amfomicina en 1953 (Millar et al., 2016), pero debido a su alta toxicidad y complejidad, no fue hasta 1985 cuando la compañía Eli Lilly aisló un nuevo fármaco viable, daptomicina (Rybak, 2006; Eisenstein et al., 2010). Se trata de un antimicrobiano producto de la fermentación de *Streptomyces roseosporus* (Eisenstein et al., 2010), y es una de las alternativas antimicrobianas disponibles en la actualidad para tratar infecciones causadas por patógenos Gram positivos multiresistentes, incluyendo SARM y VISA (Rybak et al., 2000; Munita et al., 2015; Beiras-Fernandez et al., 2010).

Desde el punto de vista de su estructura química, como se puede apreciar en la Fig. 11, se trata de un depsipéptido de 13 aminoácidos (Eisenstein et al., 2010) que alberga un núcleo deca péptido cíclico hidrofílico, con tres aminoácidos extracíclicos unidos a una cola hidrofóbica de ácido graso aminoterminal (Beiras-Fernandez et al., 2010). Es el

primer lipopéptido cíclico aprobado por la FDA para uso clínico, y está disponible para su uso desde 2003 (Chan-Tompkins & Harnicar, 2008; Eisenstein et al., 2010; D'Costa et al., 2012) en USA y desde 2006 en Europa (Beiras-Fernandez et al., 2010).

Algunos estudios han demostrado que, en bacteriemias por *S. aureus* con CIM de vancomicina >1 mg/L, la administración temprana de daptomicina permite obtener resultados clínicos significativamente mejores que vancomicina (Moore et al., 2012; Murray et al., 2013), aunque otros estudios no avalan dichas diferencias (Kalil et al., 2014).



**Figura 11.** Estructura química de daptomicina.

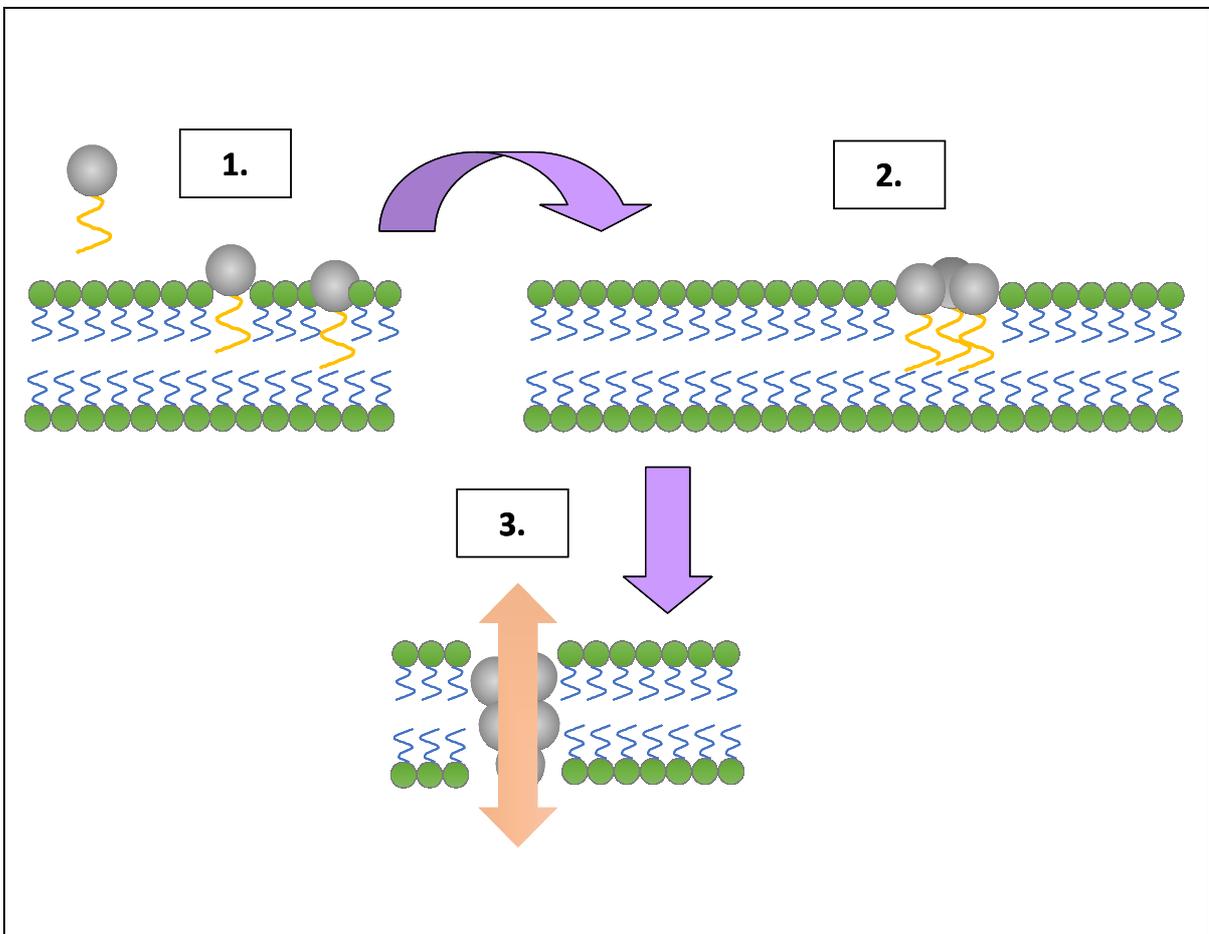
Con respecto a sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, se trata de un antimicrobiano con actividad bactericida dependiente de la concentración (Beiras-Fernandez et al., 2010), de efecto más rápido que vancomicina, nafcilina y linezolid (Mortin et al., 2007; Carugati et al., 2013). Se ha demostrado que daptomicina es de 4 a 8 veces más activa que vancomicina, y 30 veces más activa que linezolid frente a MSSA y MRSA (Tally & DeBruin, 2000). Daptomicina presenta una farmacocinética lineal, con una hemivida de 8-9 horas, y una alta capacidad de unión a proteínas plasmáticas, similar a la de teicoplanina (Rybak et al., 2000). Su absorción a través de la mucosa digestiva es prácticamente nula (Beiras-Fernandez et al., 2010), por lo que su administración ha de ser siempre parenteral.

La dosificación recomendada para daptomicina, en adultos, es de 4 mg/kg/24 h en infecciones de piel y partes blandas sin bacteriemia y de 6 mg/kg/24 h si se trata de una bacteriemia, incluyendo endocarditis, pudiendo alcanzarse dosificaciones de hasta 8-10 mg/kg/24 h en caso de necesidad (Chan-Tompkins & Harnicar, 2008). La administración a dosis inferiores a éstas, se ha asociado a fracaso terapéutico (Moore et al., 2012; Jones et al., 2008).

#### **4. 2. Mecanismo de acción de daptomicina**

El mecanismo de acción de daptomicina no está completamente dilucidado, y es probablemente más complejo y multifactorial que el de otros antimicrobianos. La acción de daptomicina, (Fig. 12) se basa en la unión a la membrana celular bacteriana, a través de su extremo hidrofóbico, en presencia de iones de calcio (Alborn et al., 1991; D'Costa et al., 2012; Munita et al., 2015). Esta unión se produce tanto en fase de crecimiento exponencial como en fase estacionaria, causando una despolarización de la membrana debido a la pérdida de iones potasio del citoplasma (Silverman et al., 2003). Dicho proceso lleva a la interrupción de múltiples funciones de la membrana

celular bacteriana, sin necesidad de que el antimicrobiano penetre en el citoplasma, funciones entre las que se incluye la interrupción de la síntesis de macromoléculas como proteínas, ADN y ARN (Chan-Tompkins & Harnicar, 2008). A diferencia de otros antimicrobianos, el mecanismo de acción no implica la lisis de las células bacterianas (Cotroneo et al., 2008) sino que éstas mueren debido a las alteraciones de la homeostasis celular (Alborn et al., 1991; Mishra et al., 2012; Zhang et al., 2013).



**Figura 12.** Mecanismo de acción de DAP: 1. Unión a la membrana bacteriana, 2. Polimerización y formación de canales iónicos, 3. Salida masiva al medio extracelular de iones potasio. Imagen obtenida de Gómez-Casanova et al., 2017.

### 4. 3. Interacción de daptomicina con otros fármacos

Ya en 1988, Silva et al. describen la existencia de sinergismo entre DAP y diferentes antimicrobianos, como aztreonam, ceftriaxona y tobramicina frente a *Staphylococcus* spp. Se ha demostrado asimismo sinergismo de daptomicina con otros aminoglucósidos como gentamicina frente a estafilococos, incluyendo *S. aureus* con resistencia intermedia a glucopéptidos, y se ha observado que la actividad bactericida de daptomicina es más rápida si se combina con gentamicina que si se administra aislada (La Plante & Rybak, 2004).

En 2009, Steenbergen et al. describieron la existencia de sinergismo entre daptomicina y algunos  $\beta$ -lactámicos en aislados de SARM, y la ausencia de antagonismos *in vitro*. Además, observaron que su presencia no perjudica la actividad de otros antimicrobianos administrados. En este mismo estudio *in vivo* se demostró que, en infecciones por osteomielitis e implantes, la combinación de daptomicina con rifampicina aumenta la eficacia y disminuye la aparición de resistencias; sin embargo, en los experimentos de monoterapia con daptomicina el tratamiento fue ineficaz y, a diferencia de las infecciones asociadas a implantes, en las producidas por osteomielitis sí se aislaron mutantes no sensibles a daptomicina con CIMs de hasta 4 mg / L.

### 5. Emergencia de cepas *S. aureus* no sensibles a daptomicina en aislados clínicos

La utilización del término *no sensibilidad* en lugar del de resistencia en relación con daptomicina deriva de que no se ha establecido por el momento un punto de corte universalmente aceptado. El criterio del CLSI (2017) es considerar sensibles a los microorganismos con CIM  $\leq 1$  mg/L, y *no sensibles* a los microorganismos con una CIM  $> 1$  mg/L. Aunque el aislamiento de microorganismos Gram positivos no sensibles

a daptomicina es infrecuente, se han descrito tanto en pacientes que habían recibido daptomicina como en pacientes que habían recibido otros antimicrobianos, e incluso en pacientes que no habían recibido antimicrobiano alguno (Jones et al., 2006; Marty et al., 2006; Pfaller et al., 2007; Howden et al., 2011). A pesar de ello, en el ámbito clínico es, al menos hasta el momento, inusual encontrar aislados no sensibles a daptomicina.

Siguen dándose numerosas controversias en lo relacionado a la aparición de resistencias. Algunos estudios sugieren que la exposición previa a otros antimicrobianos como vancomicina no repercutiría en los niveles de sensibilidad a daptomicina (Culshaw et al., 2015), mientras en otros estudios se observa cómo cepas no sensibles a vancomicina por mutaciones seleccionadas durante la terapia con este antimicrobiano, también veían disminuida su sensibilidad a daptomicina, aunque ésta última no haya formado parte de la terapia (Mwangi et al., 2007).

## **6. Mecanismos de resistencia a daptomicina en *S. aureus***

### **6. 1 Características que contribuyen al desarrollo de cepas no susceptibles a daptomicina**

Se han propuesto diferentes mecanismos de resistencia para explicar el fenómeno de no sensibilidad a daptomicina. Es probable que en muchas ocasiones se combinen varios de estos mecanismos para dar como resultado fenotípico dicha insensibilidad:

- Modificación de la superficie externa de la membrana celular, por aumento superficial de la carga positiva de la membrana bacteriana por el incremento de fosfolípidos en esta capa (Jones et al., 2008).

- Mayor fluidez de la membrana por cambios en la composición de ácidos grasos de la misma capa (Jones et al., 2008).
- La pared celular bacteriana presenta un aumento de la síntesis de ácidos teicoicos, lo que contribuye al engrosamiento de la pared de las cepas no sensibles a daptomicina (Bertsche et al., 2011).
- Aumento de la biosíntesis de carotenoides, modificando las propiedades de fluidez de la membrana, interfiriendo en las interacciones entre ésta y los antimicrobianos del grupo de los péptidos catiónicos, y evitando la muerte celular por mecanismos oxidativos (Mishra et al., 2011 Mishra & Bayer, 2013).

En relación a los mecanismos enumerados, existen diferentes estudios publicados, como el de Jones et al., 2008, donde se demuestra que los aislados no sensibles a daptomicina tienen una membrana citoplásmica más fluida, con una mayor translocación de lisilfosfatidil glicerol hacia la cara externa de la membrana citoplasmática y un mayor potencial transmembrana, en comparación con los aislados sensibles a daptomicina. En las cepas no sensibles se han observado cambios en el potencial de membrana de la membrana citoplásmica y en la capacidad de daptomicina para despolarizarla (Song et al., 2013). Se sabe que el tipo y cantidad de fosfolípidos de membrana influye en la actividad de daptomicina, ya que su mecanismo de acción se basa en su enclavamiento en la bicapa fosfolipídica y en la pérdida de iones potasio, con la alteración consiguiente del potencial de membrana (Silverman et al., 2003).

Song et al. (2013) desarrollaron un estudio de autólisis, genómico, transcriptómico, ultraestructural y de pared sobre dos aislados de *S. aureus* no sensibles a daptomicina obtenidos *in vitro* (Tabla 2). La emergencia de mutaciones espontáneas que condicionan no sensibilidad a daptomicina es muy infrecuente ( $< 1 \times 10^{-10}$ ), pero se ha

demostrado una emergencia más frecuente de este tipo de mutantes a partir de pases en concentraciones crecientes de daptomicina (Silverman et al., 2001). De igual forma, se ha observado que la insensibilidad a daptomicina parece estar relacionada con mutaciones múltiples en determinados genes (Silverman et al., 2001; Ernst et al., 2009). Además, la cinética de aparición de mutaciones asociadas a la insensibilidad a daptomicina parece ser diferente en aislados clínicos y en aislados seleccionados *in vitro* (Tabla 2).

## **6. 2. Bases moleculares de la resistencia a daptomicina en *S. aureus***

La mayor parte de los estudios sobre bases moleculares de la resistencia a daptomicina se han realizado sobre cepas resistentes obtenidas *in vitro*, por lo que es de gran interés corroborar si los aislamientos clínicos no sensibles a daptomicina muestran alteraciones similares a éstas. En este aspecto puede resultar esclarecedor el estudio de Friedman (Friedman et al., 2006), que compara aislados clínicos no sensibles obtenidos tras tratamientos con daptomicina (CIM 4 mg/L) con los aislados sensibles obtenidos previamente de los mismos pacientes (CIM 0,2-0,5 mg/L), al tiempo que obtiene *in vitro* mutantes no sensibles a daptomicina a partir de una cepa tipo de *S. aureus* (*S. aureus* TS) y realiza una secuenciación de genoma completo comparada de todas las cepas originales y de los mutantes obtenidos (Tabla 2). Este estudio permitió conocer, como se recoge en la Tabla 2, que los perfiles de mutaciones pueden ser muy heterogéneos entre los mutantes obtenidos *in vitro*, entre los mutantes obtenidos *in vivo* y entre ambos grupos. Pese a esto, dentro de la mencionada heterogeneidad, en la mayoría de los casos, los genes afectados están relacionados con la homeostasis de la membrana celular (Song et al., 2013; Cameron et al., 2015). Este comportamiento se ha demostrado a partir de estudios de secuenciación donde demuestran que los mutantes obtenidos a partir de *S. aureus* MW2 presentan mutaciones en genes

implicados en la homeostasis de la pared bacteriana (Silverman et al., 2001; Mishra et al., 2009).

**Tabla 2.** Mutaciones asociadas a *no sensibilidad* a DAP en mutantes *in vitro* obtenidos a partir de cepas tipo de *S. aureus* y en cepas clínicas, mediante secuenciación de genoma completo.

Genes	Origen de los aislados no sensibles a DAP				
	<i>In vitro</i> TS*	Aislados clínicos	<i>In vitro</i> TS*	<i>In vitro</i> TS*	Aislados clínico
<i>mprF</i>	P314L	S295L		L826F	G61V
	T345I	L826F			S295L
	T345A				S337L
					I420N
					T345I
					L826F
<i>ycyG</i> ( <i>walk</i> )	S221P	Cambio marco	L9F		I471T
	R263C	lectura por inserción A en 26121			
<i>rpoB</i>	I953S				L468Q
	A1086V				A477D
<i>rpoC</i>	F632S				
	Q961K				
<i>clpP</i>			G94D		
<i>cls2</i>				T33N	A23V
					L52F
					F60S
<i>pgsA</i>				V59N	
				A64V	
				K65R	
				S177F	
<i>agrA</i>			Y100Stop	Cambio marco lectura por delección A en 712	
<i>prs</i>			A234V		
<i>pnpA</i>			L346P		
<b>Referencia</b>	Friedman et al., 2006	Friedman et al., 2006	Song et al., 2013	Peleg et al., 2012	Peleg et al., 2012

\*TS: Cepa tipo mutada.

### **6. 2. 1. Principales genes relacionados con la no sensibilidad a daptomicina**

Algunos estudios han relacionado la presencia de mutaciones específicas en algunos genes con la resistencia a daptomicina. Se trata, en la mayor parte de los casos, de genes que codifican enzimas implicadas en el metabolismo de fosfolípidos, como *mprF*, genes que codifican sistemas regulatorios que participan en la permeabilidad de la envoltura celular, como *yycG*, y de genes que codifican la subunidades  $\beta$  y  $\beta'$  de la ARN polimerasa, como *rpoB* y *rpoC* (Friedman et al., 2006; Mishra et al., 2012).

Uno de los genes más relacionados con el desarrollo de insensibilidad a DAP es el gen *mprF*, el cual, como ya se ha mencionado anteriormente, codifica una lisil-fosfatidil glicerol sintetasa, y está implicado en el metabolismo de los fosfolípidos, añadiendo específicamente moléculas de lisina cargadas positivamente al fosfatidil glicerol de la membrana para formar lisil-fosfatidil glicerol (Ernst et al., 2009; Ernst & Peschel, 2011; Bæk et al., 2015). Es probablemente el único gen respecto al que se ha demostrado fehacientemente su relación con una sensibilidad disminuida a daptomicina mediante estudios moleculares de delección y complementación del gen. En teoría, la disminución de la sensibilidad a daptomicina se asocia, en este caso, a una mayor síntesis de lisil fosfatidil glicerol y un mayor paso de la misma al exterior de la membrana, que genera una repulsión eléctrica que dificulta el anclaje de daptomicina de los péptidos antimicrobianos catiónicos a la bicapa fosfolipídica (Friedman et al., 2006; Yang et al., 2010). Tanto en aislados clínicos como en aquellos obtenidos *in vitro* se han asociado la insensibilidad a daptomicina y la presencia de mutaciones en esta región del genoma (Friedman et al., 2006).

Las mutaciones en *mprF* surgen en momentos relativamente tempranos dentro del proceso de selección, y de hecho suelen ser las primeras en aparecer (Friedman et al., 2006). Se ha argumentado que aquellas mutaciones situadas en el extremo amino terminal afectarían a los dominios transmembrana de la proteína, mientras que los

cambios que surgen en el extremo carboxi terminal darían lugar a un aumento en la lisinilación de proteínas y en su translocación hacia la capa externa de la membrana (Peleg et al., 2012), originando una alteración de la carga eléctrica de la membrana que desembocaría en una mayor dificultad para la unión del fármaco a la membrana. Algunos autores han comprobado que la supresión del gen *mprF* en cepas de *S. aureus*, da lugar a una disminución en la translocación de lisil fosfatidil glicerol, evitando el aumento de carga positiva en la cara externa de la membrana bacteriana, dado como resultado una disminución de la CIM para daptomicina de hasta 4 veces (Cameron et al., 2015). No obstante, aunque los cambios en este gen son los más frecuentes y más estudiados, pueden surgir aislados no sensibles a daptomicina que carecen de mutaciones en este gen, por lo que tiene que haber otras vías de adquisición de insensibilidad (Pillai et al., 2007) (Tabla 2).

Se ha mencionado también la asociación de la no sensibilidad a daptomicina con mutaciones en el gen *yycG*, también conocido como *walk*, en presencia de cambios en el *mprF* (Howden et al., 2011). Además, la aparición de mutaciones en el gen *walk* también se ha asociado a la resistencia a vancomicina (Dubrac et al., 2008; Howden et al., 2011), entre otros fármacos. En éste caso, *walk* codifica la síntesis de un sensor de histidina quinasa, y forma parte del regulador de respuesta *yycF/yycG* (*walkR*), que se ha demostrado que regula numerosas proteínas en Gram positivos (Dubrac & Msadek, 2004), incluyendo proteínas relacionadas con el metabolismo de la pared (Dubrac & Msadek, 2004; Friedman et al., 2006; Dubrac et al., 2008; Mishra et al., 2012) y algunos factores de virulencia tanto en *S. aureus*, como *B. subtilis* y *S. pneumoniae* (Koprivnjak et al., 2011; Song et al., 2013).

Finalmente, los dos últimos genes entre los relacionados más frecuentemente con insensibilidad a daptomicina son *rpoB* y *rpoC*, que codifican las subunidades  $\beta$  y  $\beta'$  de la ARN polimerasa (Friedman et al., 2006; Mishra et al., 2012). En este caso, a diferencia de las mutaciones en el gen *mprF*, las que parecen en *rpoB* y *rpoC* surgen de forma más tardía (Friedman et al., 2006). La presencia de tales mutaciones tienen como

efecto el engrosamiento de la pared celular y, de nuevo, la reducción de la carga negativa de la capa externa de la membrana en *S. aureus* (Cui et al., 2010). Las mutaciones descritas en estos dos genes en asociación con insensibilidad a daptomicina son diferentes de las que afectan a otros antimicrobianos, como la rifampicina (Cui et al., 2010). Por otra parte, también se ha demostrado que una sola mutación en *rpoB* en *S. aureus*, como son A477D o A621E, puede afectar simultáneamente a la sensibilidad tanto a daptomicina como a vancomicina (Cui et al., 2010; Bæk et al., 2015).

### **6. 2. 2. Otros genes relacionados con la no sensibilidad a daptomicina**

El gen *agrA* codifica un sistema de *quorum-sensing* en *S. aureus*, que controla la expresión de varios genes, incluyendo genes relacionados con la virulencia, a través de un sistema de dos componentes (Novick, 2003; Novick & Geisinger, 2008). Se trata de un regulador de respuesta que regula positivamente su propio promotor, P2, en el locus *agr* y el promotor RNAlII, que es el efector del sistema *agr* y codifica el gen estructural de la toxina  $\delta$  (Dunman et al., 2001). El locus *agr* está relacionado con la regulación de numerosos genes, y se ha demostrado que su alteración se asocia con reducción de la sensibilidad a vancomicina y de la autólisis (Fujimoto & Bayles 1998; Tsuji et al., 2007). Así mismo, se ha observado que se produce una disminución de la autólisis en cepas que presentan mutaciones en este gen (Fujimoto & Bayles 1998; Sakoulas et al., 2005). Se han descrito mutaciones en este gen en cepas con insensibilidad a daptomicina, como se puede observar en la Tabla 2.

*pnpA* codifica una exo RNAasa fosforolítica, que se ha demostrado que interviene en la expresión de factores de virulencia en Gram negativos (De Lay & Gottesman, 2011; Guillet et al., 2013), pero no se ha demostrado que tenga función alguna conocida relacionada con la membrana citoplásmica y el nivel de sensibilidad a daptomicina. Sin embargo, se han encontrado mutaciones en esta polinucleótido fosforilasa en cepas no sensibles a daptomicina (Tabla2) (Song et al., 2013).

*prs* codifica una fosforribosil pirofosfato sintetasa (Song et al., 2013), de modo que una mutación en este enzima puede condicionar el requerimiento de un aporte exógeno de purinas y pirimidinas, pero tampoco se había demostrado hasta ahora relación directa alguna con el nivel de sensibilidad a daptomicina.

Los productos del operón *dltABCD* están implicados en la D-alaninación de los ácidos teicoicos de la pared celular en muchas bacterias Gram positivas (Weidenmaier et al., 2005; Ernst et al., 2009; Munita et al., 2015). Las mutaciones en este operón conducirían a un aumento de la carga positiva de la membrana celular, como ocurre con las mutaciones *mprF* (Yang et al., 2010). Este hallazgo es congruente con el hecho de que las mutaciones más precoces y más frecuentes descritas, tanto en mutantes *in vitro* como en cepas clínicas, sean las mutaciones en el gen *mprF*, que es responsable de transformar el fosfatidil glicerol, con carga neutra, en lisil fosfatidil glicerol, cargado positivamente (Mishra et al., 2009). En cepas no sensibles a daptomicina se ha observado una mayor expresión y desregulación tanto de *dltABCD* como de *mprF* (Bayer et al., 2016).

Estudios transcriptómicos han demostrado que la presencia de daptomicina induce la expresión de más de 400 genes, y reduce la expresión de más de 100 en *S. aureus*, muchos de ellos relacionados con la respuesta al estrés de la pared celular. En concreto, el regulador transcripcional *vraSR*, en presencia de antimicrobianos que como daptomicina afectan a la pared, provoca una inducción del estímulo de estrés de la pared celular bacteriana impidiendo la inhibición de la síntesis de PGN en Gram

positivos (Muthaiyan et al., 2008). Según algunos autores (Mehta et al., 2012), la inactivación de *vraSR* aumenta la sensibilidad a daptomicina y su restauración revierte dicha sensibilidad.

*clpP* codifica una proteasa relacionada con el control de calidad de la síntesis de proteínas en condiciones de estrés, autólisis y reparación del ADN, y tiene un papel regulador sobre diferentes operones (Michel et al., 2006). La chaperona ClpX se asocia con la peptidasa ClpP (McGillivray et al., 2012) para la degradación de proteínas, y facilita el plegamiento e interacción de proteínas. La supresión del gen *clpX* conlleva una reducción de la sensibilidad a daptomicina y su inactivación consigue disminuir la virulencia de *S. aureus* (Bæk et al., 2015). Además, recientemente se ha demostrado que un inhibidor farmacológico de ClpX sensibiliza a *S. aureus* a varios antimicrobianos activos sobre la pared, incluyendo daptomicina (McGillivray et al., 2012).

En un estudio realizado por Peleg et al., (2012) se observa la aparición de mutaciones en otro gen en el que no se habían descrito previamente mutaciones asociadas a insensibilidad a DAP, *cls2* (Tabla 2), por lo que podría estar implicado en la misma (Munita et al., 2015). Este gen codifica una cardiolipina sintetasa (Cameron et al., 2015). La cardiolipina es un fosfolípido aniónico de membrana que, en determinadas condiciones de crecimiento, puede suponer hasta un 20-30% del total de fosfolípidos de membrana (Koprivnjak et al., 2011), y se ha sugerido también su asociación con la reducción de sensibilidad a daptomicina en enterococos (Palmer et al., 2011). Este estudio detecta asimismo mutaciones en *pgsA*, un gen que codifica una fosfatidil transferasa implicada en la síntesis de fosfatidil glicerol (Cameron et al., 2015), el fosfolípido aniónico más importante en la membrana citoplásmica. Las mutaciones en este gen se han asociado a la insensibilidad a la daptomicina en *B. subtilis* (Hachmann et al., 2009), pero aún no en *S. aureus*. Las mutaciones en *pgsA* asociadas a insensibilidad a daptomicina solo se han obtenido *in vitro* (Peleg et al., 2012) (Tabla 2), por lo que su trascendencia en aislados clínicos aún no se ha dilucidado.

Todos estos datos sugieren que, a diferencia de lo que es habitual en la mayor parte de los antimicrobianos, los microorganismos en general, y *S. aureus* en particular, son capaces de desarrollar insensibilidad a daptomicina a través de mecanismos diversos, y frecuentemente combinados. Así, en la investigación realizada por Friedman et al., (2006), los aislamientos clínicos estudiados no sensibles a daptomicina presentan, con respecto a los aislamientos sensibles iniciales, mutaciones en *mprF*, aunque en localizaciones distintas a las observadas en los mutantes obtenidos *in vitro*. Además, uno de los mutantes presenta también un cambio en el gen *walk* también distinto a los observados en los mutantes obtenidos *in vitro*, pero ninguno de ellos presentaba alteraciones en *rpoB* y *rpoC* (Tabla 2).

Por otra parte, mutaciones en *rpoB* que se han detectado en cepas no sensibles a daptomicina (Cui et al., 2010), y que se ha demostrado que generan un fenotipo de insensibilidad si se introducen en cepas sensibles, aparecen sin embargo sólo en algunos microorganismos insensibles generados *in vitro*, por lo que hay que pensar que más de una mutación o combinación de mutaciones pueden llevar a este fenotipo.

Este dato se ve corroborado por el estudio reciente de Song et al., (2013) sobre dos cepas de *S. aureus* no sensibles a daptomicina (CIM: 4-8 mg/L) obtenidas *in vitro* a partir de *S. aureus* TS (Tabla 2). En este caso, no aparecen mutaciones en *mprF* ni en *rpoB*, y por el contrario aparecen cambios en otros genes ya conocidos y también relacionados en algún momento con la no sensibilidad a DAP como es el gen *walk*, (Friedman et al., 2006), como en genes no relacionados tan fehacientemente como son *pnpA*, *agrA*, *prs*, *clpP*. En los aislados clínicos estudiados por Peleg et al., 2012 también se detectaron mutaciones en los últimos tres genes citados anteriormente. El *locus agr* está relacionado con la regulación de numerosos genes, y se ha demostrado que su alteración se asocia con reducción de la sensibilidad a vancomicina y de la autólisis (Fujimoto & Bayles 1998; Tsuji et al., 2007).

Otro estudio reciente con un diseño similar (Peleg et al., 2012) muestra cómo las cepas no sensibles seleccionadas *in vitro* presentan un menor número de mutaciones (media: 2; intervalo: 1-4) que los aislamientos clínicos (media: 6; intervalo: 2-13) con respecto a las cepas sensibles originales. Todos los aislados no sensibles mostraban mutaciones que afectaban a genes implicados en la síntesis o en la estabilidad de los fosfolípidos de membrana, lo que avala la importancia de la fisiología de la membrana citoplásmica en la sensibilidad a daptomicina. Sin embargo, mientras todas las cepas clínicas mostraban mutaciones en *mprF*, sólo aparecían en una de las obtenidas *in vitro*. No obstante, Peleg et al., (2012) detectan mutaciones en una amplia variedad de genes además de los citados, con funciones diversas, cuya relación con la resistencia a daptomicina no está dilucidada.

Todos estos datos indican que el proceso de adquisición de resistencia a daptomicina es enormemente complejo, ya que se puede llegar a ella por diversas vías en las que pueden estar implicadas mutaciones en diferentes genes, o incluso diferentes combinaciones de genes mutados. La búsqueda e identificación de las mutaciones que confieren resistencia a daptomicina es esencial para comprender su mecanismo genético, así como el estudio del impacto en el fenotipo y su biología en presencia de dichos cambios genómicos.

## *II. Justificación*

---



La adquisición de resistencias bacterianas es actualmente un problema que preocupa a las autoridades sanitarias a nivel mundial. La amenaza que suponen queda reflejada tanto en el informe publicado por la Organización Mundial de la Salud (Organización Mundial de la Salud, 2014), como en el Plan de acción Mundial para Luchar contra la Resistencia a los Antimicrobianos aprobada por la Asamblea General de las Naciones Unidas en 2015 (68ª Asamblea Mundial de la Salud, 2015; Organización Mundial de la Salud, 2016)

Para poder actuar frente a esta situación, es imprescindible conocer y comprender los mecanismos intrínsecos por los que un microorganismo logra hacerse resistente, cual es la probabilidad de que emerjan estas resistencias, qué factores influyen en ellas y cómo se pueden controlar.

Este estudio se enfoca en la resistencia a daptomicina en *Staphylococcus aureus*. Pese a que la detección de aislados clínicos no sensibles al fármaco es por el momento poco frecuente, la importancia como patógeno de *S. aureus* y la multirresistencia de algunos aislados, especialmente entre los resistentes a metilina, convierte a la resistencia a daptomicina en una causa de preocupación. Conocer esta resistencia y tener capacidad para manejarla es esencial, ya que la resistencia aparece sobre todo en pacientes en los que las alternativas terapéuticas son muy limitadas. Es importante saber también si estos mecanismos de resistencia fuerzan la capacidad de adaptación del microorganismo hasta hacerles difícil competir con otros microorganismos en condiciones de ausencia del antimicrobiano, en cuyo caso la simple restricción del uso condicionaría la caída de la resistencia, o si se trata de características con menor coste

biológico, que conferirían mayor persistencia a los aislados resistentes incluso en ausencia de presión selectiva. También es importante conocer si esta resistencia, al menos *in vitro*, emerge con mayor facilidad en cepas sensibles o resistentes a meticilina, y cómo evoluciona en ambos tipos de aislados ante una presión selectiva mantenida. En definitiva, los datos obtenidos deben ser útiles a la hora de elaborar o modificar protocolos de tratamiento de pacientes con infecciones por estafilococos multirresistentes.

### *III. Objetivos*

---



Los principales objetivos del presente estudio fueron los siguientes:

1. Estudiar las bases moleculares de la insensibilidad a daptomicina en aislamientos clínicos de SASM y SARM, mediante la amplificación y secuenciación de todos aquellos genes que se han descrito asociados a dicha insensibilidad.
2. Desarrollar un método viable para seleccionar *in vitro* cepas altamente resistentes a daptomicina a partir de los aislados clínicos originales, previamente insensibles al fármaco, y comprobar si las eventuales mutaciones asociadas a este incremento de resistencia afectan o no a los mismo genes y con las mismas características que en los aislados clínicos.
3. Estudiar la capacidad de adaptación al medio y supervivencia (*fitness*) en aislados clínicos insensibles a daptomicina y sus mutantes, tanto de forma basal como en competencia, utilizando para ello la presencia de una cepa tipo de *S. aureus*.
4. Analizar la capacidad de formación de *biofilm* en las cepas mutantes con respecto a su cepa parental.
5. Determinar y comparar la composición lipídica (fosfolípidos y glicolípidos) de nuestros aislados de *S. aureus* y de sus mutantes de laboratorio.



## ***IV. Material y métodos***

---



## **1. Identificación de los microorganismos seleccionados para el estudio y determinación de la sensibilidad antibiótica**

### **1. 1. Selección de los microorganismos utilizados**

Se incluyeron en el estudio 9 aislamientos clínicos de *S. aureus* obtenidos en los hospitales General Universitario de Badajoz (6), Hospital General de Llerena (Badajoz) (1) y Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (2), e identificados inicialmente como *S. aureus* no sensibles a daptomicina (CIM >1 mg/L) según los criterios del CLSI (CLSI, 2017).

La identificación de los microorganismos se corroboró mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Microflex™, Bruker Daltonics, Alemania). Todas las cepas utilizadas se almacenaron a una temperatura de -80 °C en caldo glicerol con leche desnatada al 10 % para su adecuada preservación.

### **1. 2. Determinación de la sensibilidad antibiótica**

Se comprobó la sensibilidad de los microorganismos a penicilina, cefoxitina (metilina), vancomicina y daptomicina, mediante técnicas automatizadas de microdilución (MicroScan WalkAway, Beckman Coulter, USA; Vitek, bioMérieux, Francia).

Adicionalmente, y puesto que el intervalo de CIMs probadas en los sistemas automatizados es en ocasiones insuficiente, se realizaron pruebas de epsilometría, E-test, a cada una de las cepas de *S. aureus* seleccionadas para obtener CIMs específicas a ciertos fármacos.

Los antimicrobianos evaluados, cuyos puntos de corte quedan referidos en la Tabla 3, fueron:

- Daptomicina E-test® (bioMérieux, Francia).
- Vancomicina E-test® (bioMérieux, Francia).
- Oxacilina E-test® (bioMérieux, Francia).
- Linezolid E-test® (bioMérieux, Francia).
- Dalbavancina (DAL) E-test® (Liofilchem, Italia).
- Telavancina (TLV) E-test® (Liofilchem, Italia).

**Tabla 3.** Criterios para la interpretación de la sensibilidad frente a daptomicina, vancomicina, linezolid, oxacilina, telavancina y dalvabancina según el CLSI (2017).

	Daptomicina	Vancomicina	Linezolid	Oxacilina	Telavancina	Dalvabancina
Interpretación de los valores de las CMI (mg/L)	S ≤ 1	S ≤ 2 I: 4-8 R: ≥ 16	S ≤ 4 R ≥ 8	S ≤ 2 R ≥ 4	S ≤ 0,12	S ≤ 0,12

\*R: resistente; I: resistencia intermedia; S: sensible.

En todos los microorganismos se comprobó la presencia de proteína PBP2a mediante inmunocromatografía de membrana (BinaxNow PBP2a, Alere, USA). En todos los aislados en los que este test fue negativo, se comprobó mediante PCR la presencia de los genes *mecA* y *mecC*, siguiendo el método descrito en el Apartado 2 de Material y Métodos. Los *primers* utilizados y el protocolo de amplificación aparecen en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Oligonucleótidos y temperatura de hibridación utilizados para amplificar los genes *mecA* y *mecC*.

Genes	Primer	Secuencia del primer 5' → 3'	Tª de hibridación	Referencias
<i>mecA</i>	mecA-D	TGAAAAATGATTATGGCTCAGGTACT	53 °C	Diseñados en nuestro laboratorio
	mecA-R	CATATGAAGGTGTGCTTACAAGTGC		
<i>mecC</i>	mecC-D	ATCTCGCCTTGCCATATCCTGAA	58 °C	Seidel et al., 2017
	mecC-R	TGCCCCGATTGCATTAGCATTAGG		

## 2. Estudio del perfil genético de los aislados clínicos no susceptibles a daptomicina

### 2. 1. Extracción del DNA

A partir de colonias crecidas en agar sangre, se realizó una suspensión con una turbidez aproximada de un 1 de McFarland. 500 µL de dicha suspensión fueron transferidos al sistema automatizado de extracción de ácidos nucleicos NucliSENS® easyMAG (bioMérieux, Francia). Los eluidos obtenidos fueron almacenados a -80 °C hasta su uso.

### 2. 2. Amplificación de genes asociados a mutaciones que producen resistencia a *Staphylococcus* spp

Para la determinación de las mutaciones potencialmente asociadas a resistencia a daptomicina, se amplificaron y secuenciaron una serie de genes que han sido previamente relacionados con esta circunstancia por otros autores (Friedman et al.,

2006; Fujimura et al., 2014). La amplificación se llevó a cabo utilizando los *primers* y protocolos de amplificación que aparecen reflejados en la Tabla 5, en un termociclador Eppendorf Master Cycler® (Eppendorf, Alemania). Las secuencias de los *primers* fueron obtenidas en algunos casos de las publicaciones de Song et al. (Song et al., 2013) y Fujimura et al. (Fujimura et al., 2014), y en otros casos fueron diseñadas específicamente para el presente estudio utilizando la aplicación de acceso libre *Primer-Blast*<sup>R</sup>, integrada en el paquete *Basic Local Alignment Search Tool*<sup>R</sup> (BLAST) desarrollado por el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), perteneciente a los *National Institutes of Health* de Estados Unidos (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Los *primers* fueron fabricados por Sigma-Genosys (USA), y para la reacción de PCR se utilizó la mezcla de amplificación PCR MasterMix® (Promega, USA), excepto en algunos casos que fue necesario utilizar una DNA polimerasa con menor índice de errores, en cuyo caso se usó Fidelity<sup>R</sup> DNA Polymerase (USB, USA).

En el transcurso del estudio se diseñaron nuevos *primer* que aparecen en el Apartado Anexos.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

- 5 minutos a 95 °C (desnaturalización).
- 35 ciclos de:
  - 30'' a 95 °C.
  - 1' a la temperatura consignada en la Tabla 5 para cada pareja de *primers* (hibridación).
  - 1' a 72 °C (elongación).
- 5' a 72 °C (elongación).

**Tabla 5.** Oligonucleótidos específicos y temperatura de hibridación.

Genes	Primer	Secuencia del primer 5' → 3'	Tª de hibridación	Referencias
<i>walk</i>	walk-D walk-R	ACTTTGGCGATGTACGTACG AGCCCGATAATTTGCATACC	48 °C	Song et al., 2013
<i>agrA</i>	agrA-D agrA-R	ACTGATAATCCTTATGAGGTGC AAATAAAAATCCATCGCTGCAA	48 °C	Song et al., 2013
<i>cls1</i>	cls1.1-D	GTACAGCGAGTTCAACTTGGG	53 °C	Diseñados en nuestro laboratorio
	cls1.1-R	GGGCCACTTGCGACTATTTGA		
	cls1.2-D	GTTAGGTGGAGAAGTTGAAGCA	53 °C	Diseñados en nuestro laboratorio
	cls1.2-R	TGGCGAACTAATTTTGCTAACGA		
<i>cls2</i>	cls2.1-D	AGATTTTCGATGGGAGGTTTCA	48 °C	Diseñados en nuestro laboratorio
	cls2.1-R	TTCCTGCATCCCCGACAAT		
	cls2.2-D	ACGCCCGTTTCGCAATAAAG	53 °C	Diseñados en nuestro laboratorio
	cls2.2-R	GCAGCACTAATGACGTCTGAT		
<i>mw1109</i>	mw1109-D	GGATTTTGTAAAAATATTGAAAGTGAA	48 °C	Song et al., 2013
	mw1109-R	CCTTTACCGCCACTATCAACA		
	mw1109-1-D	ACAAGGTGTACGTGTGA	41 °C	Diseñados en nuestro laboratorio
	mw1109-1-R	TACCTGGGTATTCGGTA		
	mw1109-2-D	CAGGCAAGATATGAGTCA	42 °C	Diseñados en nuestro laboratorio
	mw1109-2-R	CATTGTTAGCAACTCGA		
<i>pnpA</i>	pnpA-D pnpA-R	AAGAAATCGTCAATGAATTTATCGA CAATTCACGACGACCTGG	49 °C	Song et al., 2013
<i>clpP</i>	clpP-D clpP-R	CAAGCGCAAGACTCAGAGAA TGCAGCAATTTTCGATTCAG	49 °C	Song et al., 2013
<i>prs</i>	prs-D prs-R	TAAACGTCGTCCTAGACCAAATG TGCTTGTGCAGCTAAAGTGA	51 °C	Song et al., 2013
<i>mprF</i>	mprF-1-D	ATCGGGAGTTATCTGGTA	43 °C	Diseñados en nuestro laboratorio
	mprF-1-R	GTGCTCTACGGAAAGCTA		
	mprF-2-D	GTAGCTTTCCGTAGAGCA	44 °C	Diseñados en nuestro laboratorio
	mprF-2-R	TACCTCTTAGCACTTGGA		
<i>rpoB</i>	rpoB-1-D	AGCTAAAAGCGGATCACA	47 °C	Diseñados en nuestro laboratorio
	rpoB-1-R	TGAGGTGTGATAGACTCA		
	rpoB-2-D	GGAAAGAGTTGTACGTGA	47 °C	Diseñados en nuestro laboratorio
	rpoB-2-R	GCCGTGAGGTACACGTA		
	rpoB-3-D	AGCACGTGAAGTTAGAGA	47 °C	Diseñados en nuestro laboratorio
	rpoB-3-R	TTTGTGTTTCAGGAGCA		
<i>rpoC</i>	rpoC-1-D	CTTTAGGTGAAGGTGG	43 °C	Fujimura et al., 2014
	rpoC-1-R	AGTACCACAGTCTTCTTCACGAAC		
	rpoC-2-D	GTTTCGTGAAGAAGACTGTGGTACT	46 °C	Fujimura et al., 2014
	rpoC-2-R	GAACCTTCAGTTAATACTTCACCAC		

## **2. 3. Visualización de los amplicones, purificación del producto de PCR y secuenciación**

### **2. 3. 1. Visualización de los amplificados**

Los amplificados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% junto con un control de peso (DNA Ladder 100 bp, Promega, USA). Como tampón de carga se usó Blue/Orange 6x Loading Dye (Promega, USA), y como colorante fluorescente para la detección del ADN se utilizó RedSafe® Nucleic Acid Staining Solution (Invitrogen, USA).

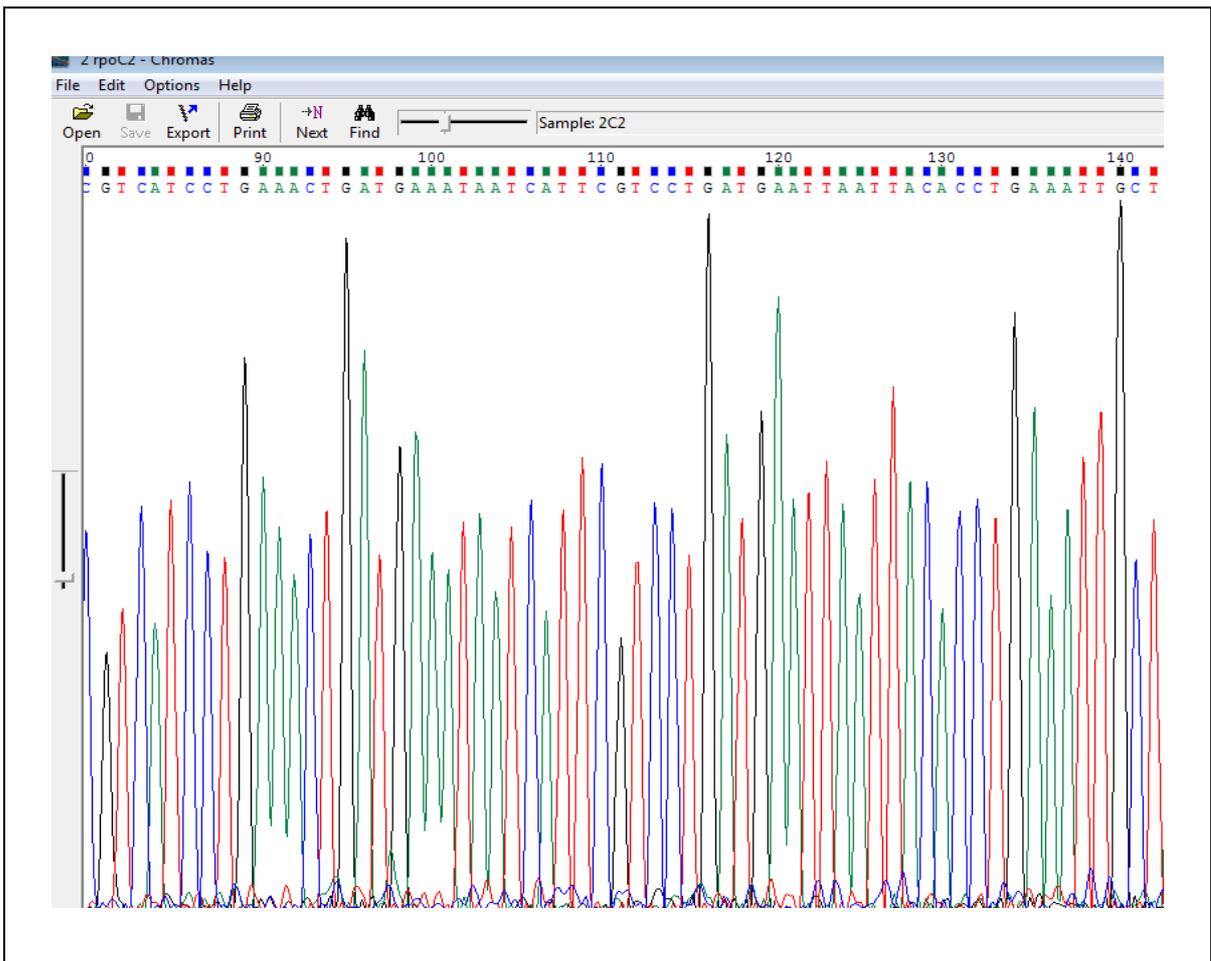
### **2. 3. 2. Purificación de los amplificados**

Todos los amplicones fueron sometidos a una limpieza enzimática del ADN, que permitió la eliminación de los dNTPs y oligonucleótidos sobrantes de los amplificados, para su posterior secuenciación utilizando el reactivo Exo-SAP It<sup>R</sup> (Chang Biosciences, China), salvo en los casos en los que hubo que purificar a partir del gel de agarosa, en cuyo caso se empleó el equipo MEGAquick-Spin Total Fragment DNA Purification Kit (Intron Biotechnology, Corea del Sur).

### **2. 3. 3. Secuenciación y análisis de las secuencias**

Los amplificados obtenidos se secuenciaron por el método de Sanger, en un secuenciador 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). La información fue analizada mediante el software de acceso libre Chromas 2.5.1.0 (Technelysium Pty Ltd, Australia) (Fig. 13).

Por último, las secuencias fueron comparadas con el genoma completo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 depositado en GenBank (gi: 685631213). La comparación y el análisis se llevó a cabo mediante el software de acceso libre BLAST2Seq<sup>R</sup>, perteneciente también al paquete *Basic Local Alignment Search Tool*<sup>R</sup> (BLAST) desarrollado por el NCBI.



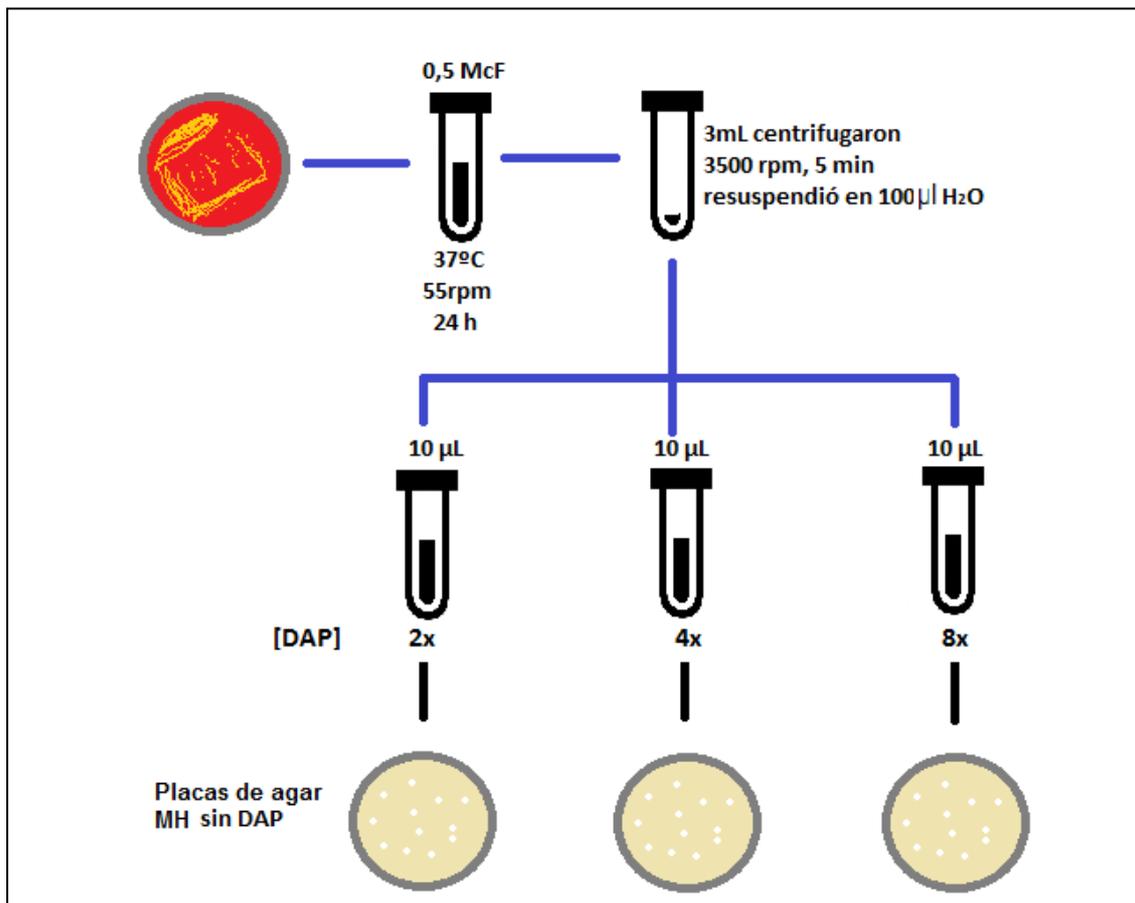
**Figura 13.** Fragmento de una secuencia de ADN en el programa *Chromas*.

### **3. Selección de mutantes y amplificación de genes cuyas mutaciones se asocian a insensibilidad a daptomicina**

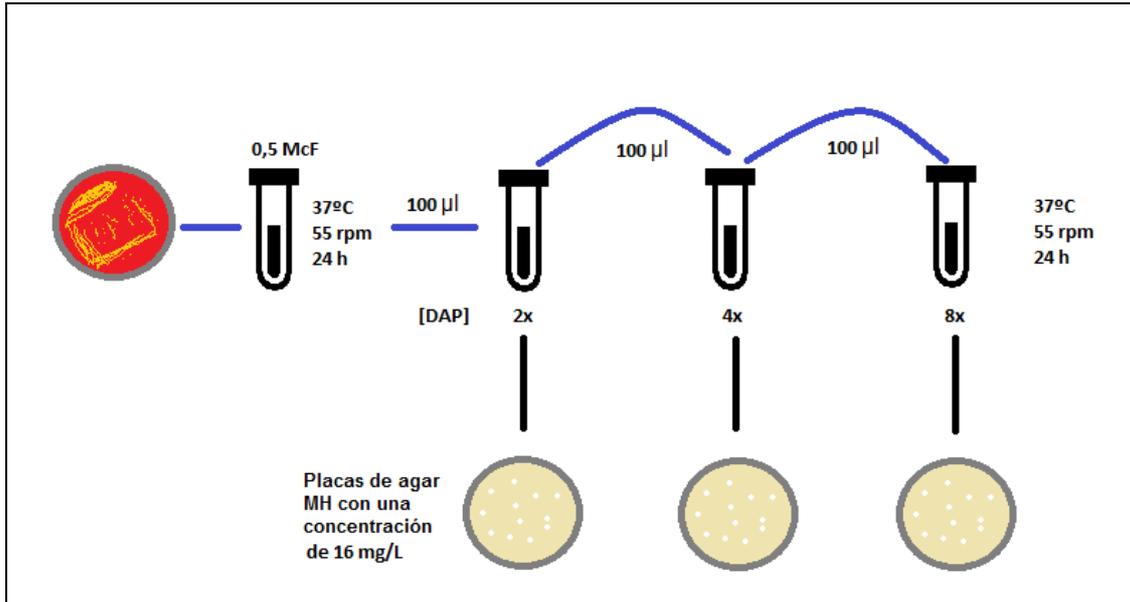
#### **3. 1. Proceso de optimización del experimento de selección de *S. aureus* resistente a daptomicina**

- 1. Selección de mutantes a concentración fija.** A partir de colonias crecidas en agar sangre, se realizó un inóculo del microorganismo, con una turbidez de 0,5, en la escala de McFarland, en 5 mL de caldo Mueller Hinton (MH), que fue incubado a 37°C, a 55 revoluciones por minuto (rpm) durante 24 horas. 3 ml de este inóculo se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 minutos, eliminándose el sobrenadante. El sedimento fue resuspendido en 100 µl de agua estéril. 10 µl de esta suspensión se inocularon, por duplicado, en tubos con 5 mL de caldo MH y una concentración de daptomicina equivalente a 2x, 4x y 8x la CIM de la cepa inoculada, y se incubaron durante 24 horas, en agitación, en ambiente aerobio a 37°C. Dos ml de este inóculo se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 minutos, eliminándose el sobrenadante. El sedimento fue resuspendido en 100 µl de agua estéril, que se sembraron en recuento de placas de agar MH (Fig. 14).
- 2. Selección de mutantes a concentraciones crecientes de antimicrobiano.** A partir de colonias crecidas en agar sangre, se realizó un inóculo del microorganismo, con una turbidez de 0,5, en la escala de McFarland, en 5 mL de caldo Mueller Hinton (MH), que fue incubado a 37°C, a 55 revoluciones por minuto (rpm) durante 24 horas. 100 µl de este inóculo se traspasaron a un tubo de 5 ml de caldo MH con una concentración de daptomicina equivalente a 2x la CIM de la cepa original. Este inóculo se incubó durante 24 horas a 37°C, en condiciones aerobias y en agitación. Siguiendo el mismo procedimiento, 100 µl del inóculo fueron resuspendidos en 5 ml de caldo MH con una concentración de daptomicina equivalente a 4x la CIM de la cepa original e incubados en las mismas condiciones, y 24 horas después 100 µl del inóculo fueron

resuspendidos en 5 ml de caldo MH con una concentración de daptomicina equivalente a 8x la CIM de la cepa original e incubados del mismo modo. Dos ml de cada uno de los inóculos se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 minutos. El sedimento fue resuspendido en 100 µl de agua estéril, que se sembraron en recuento en placas de agar MH con 16 mg/l de daptomicina (Fig. 15).



**Figura 14.** Esquema del método de selección de mutantes con alto nivel de resistencia a daptomicina a concentración fija.



**Figura 15.** Esquema del método de selección de mutantes con alto nivel de resistencia a daptomicina a concentraciones crecientes de antimicrobiano.

### **3. 2. Selección de *S. aureus* con alto nivel de resistencia a daptomicina**

#### ***3. 2. 1. Método de obtención de cepas mutantes estandarizado para este estudio***

Finalmente, se estableció como protocolo para la selección de cepas mutantes de *S. aureus* con alto nivel de resistencia a daptomicina el especificado en el punto 2 del apartado anterior, con algunas modificaciones

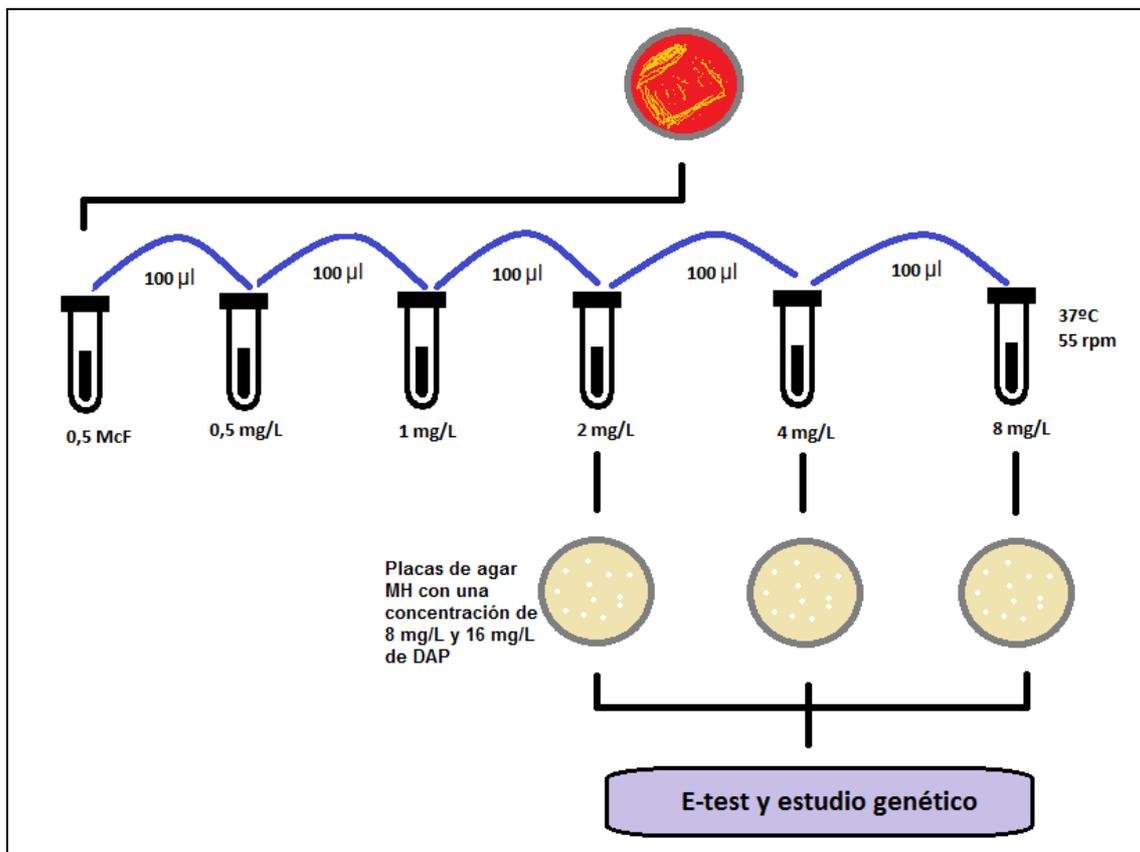
1. Transcurridas 24 horas de incubación en 5 mL de caldo MH, los aislados pasaron por un gradiente de concentraciones dobles fijas entre 0,5 mg/L y 8 mg/L de daptomicina, en lugar de pasar por concentraciones variables de 2x, 4x y 8x la CIM de la cepa original.

- Solo se sembraron en placas con daptomicina los cultivos provenientes de los medios con concentraciones de daptomicina de 2 mg/L, 4 mg/L y 8 mg/L. Este procedimiento queda resumido en la Fig 16.

Los medios de cultivo con daptomicina fueron suplementados en todos los casos con 50 mg/L de CaCl<sub>2</sub>.

### 3. 2. 2. Interpretación de los resultados obtenidos

En el proceso de selección de mutantes, se estudiaron aquellos aislados que crecían en una concentración de daptomicina, como mínimo, 4 veces la del microorganismo predecesor.



**Figura 16.** Esquema del método utilizado para la obtención de cepas con alto nivel de resistencia a daptomicina.

### **3. 3. Estudio de genes relacionados con insensibilidad a daptomicina en cepas obtenidas *in vitro* con alto grado de resistencia**

En los casos en los que se logró seleccionar cepas con incremento de la resistencia a daptomicina, se realizó una resiembra en agar sangre, se preparó un inóculo equivalente al 0,5 de la escala de McFarland y se realizó un E-test de daptomicina. En los casos en que se confirmó el incremento de la CIM de daptomicina, se procedió a comprobar asimismo la CIM de vancomicina, oxacilina, linezolid, telavancina y dalbavancina, y al estudio genético descrito en el punto 2 del Apartado material y métodos. Los mutantes obtenidos se conservaron, igual que sus aislados clínicos parentales, a -80°C en caldo glicerol con leche desnatada al 10 %.

### **4. Estabilidad de las cepas seleccionadas *in vitro* con alta resistencia a daptomicina**

Para comprobar la estabilidad de la insensibilidad adquirida a daptomicina, las cepas obtenidas *in vitro* con incremento de la CIM de daptomicina fueron incubadas durante una semana en 5 mL de caldo MH libre de antimicrobianos. Cada dos días, 100 µL del cultivo se resuspendieron en 5 mL de caldo MH fresco. En todos los casos, la incubación se llevó a cabo en agitación a 55 rpm, en atmósfera aerobia y a una temperatura de 37°C.

Transcurrido dicho tiempo, se realizó una siembra en aislamiento en agar sangre, y 24 horas después se realizaron E-test de daptomicina y oxacilina.

## **5. *Fitness cost* con y sin competencia**

### **5.1. *Fitness* sin competencia**

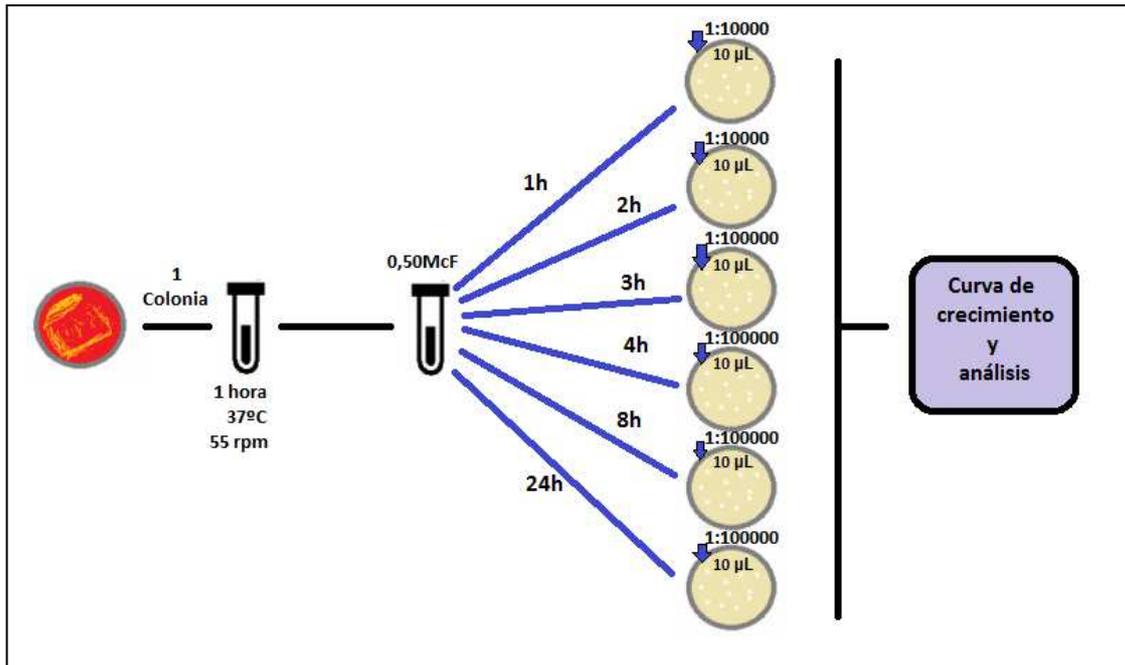
Utilizando como referencia los estudios de Horváth et. al., 2012, todas las cepas, incluyendo una cepa tipo silvestre (ST tipo), fueron cultivadas a partir de una sola colonia, en caldo MH durante 1 hora a 37 °C en agitación (55 rpm). Transcurrido este tiempo, el inóculo se ajustó a una turbidez de 0,5 de McFarland para cada cultivo, y se mantuvo en incubación en las mismas condiciones. Tras 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 8 horas y 24 horas de incubación, se realizaron diluciones del cultivo a 1:10.000 y 1:100.000 y de las mismas se sembraron 10 µL en placas de agar MH Fig. 17A. Dichas placas se incubaron durante 48 h, y se procedió al recuento de colonias.

### **5.2. *Fitness* en competencia**

Se utilizó como base para la realización de este experimento el método de Rozen et al., 2007. Este estudio permite evaluar el comportamiento de nuestras cepas en competencia con una cepa ST tipo, estando ambas presentes en un mismo medio de cultivo. Para ello, partiendo de una colonia de cada cepa, incluyendo la cepa silvestre, se realizaron inóculos independientes en 3 mL de caldo MH y se dejaron crecer durante aproximadamente 2 horas a una temperatura de 37°C, en atmósfera aerobia, en agitación a 55 rpm. Posteriormente se ajustaron los inóculos a una turbidez de 1 en la escala de McFarland, se realizaron diluciones 1:100, y se incubaron bajo las mismas condiciones durante 2-3 horas. Pasado este tiempo, se reajustaron los cultivos a una turbidez de 0,5 de McFarland, y se realizó una mezcla 1:1 de cada una de las cepas no sensibles a daptomicina con la cepa ST tipo. A partir de éste inóculo, se realizó una dilución 1:1.000 y se dejó crecer durante 5 horas (Fig. 17B).

Por último, se llevaron a cabo siembras de diluciones 1:10.000 en placas libres de antimicrobiano y en placas con 1 mg/L de daptomicina, que fueron incubadas en las condiciones habituales. Transcurridas 24 h, se procedió al recuento de colonias, asumiendo que la diferencia entre el número de colonias crecidas en placas con y sin daptomicina son el número de colonias ST tipo.

A)



B)

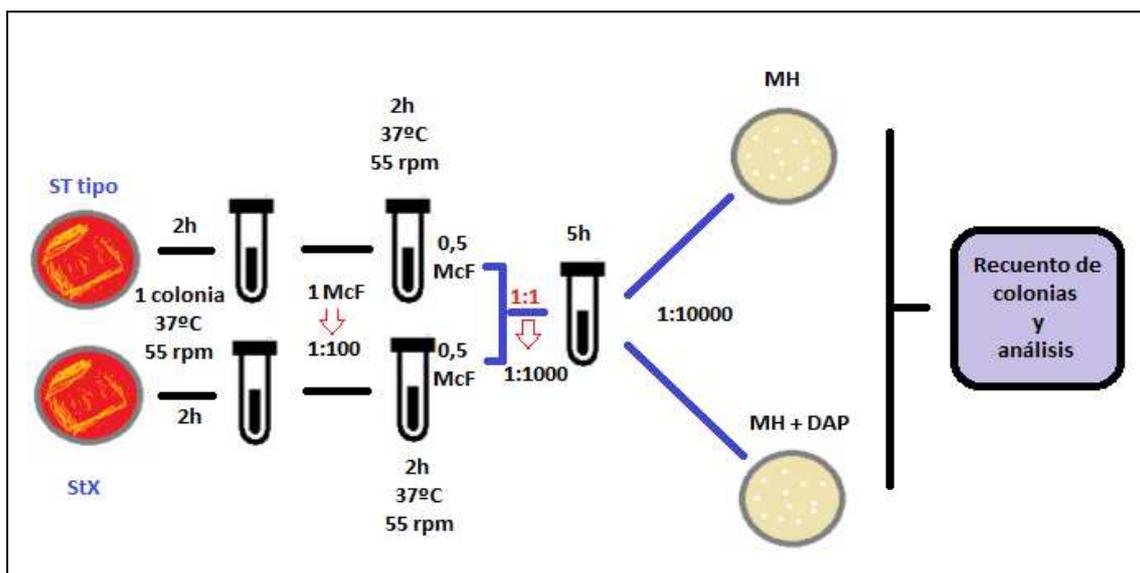


Figura 17. A) Esquema *fitness* sin competencia. B) Esquema *fitness* con competencia.

## 6. Determinación de la producción de *biofilm*

Se evaluó la formación de biopelículas en aquellos aislados clínicos a partir de los cuales se seleccionaron mutantes con alto nivel de resistencia a daptomicina, y en algunos de los mutantes obtenidos *in vitro*. Para ello, se utilizó como método base el descrito por Fabres-Klein et. al., 2015. Inicialmente se dejaron crecer en 3 mL de caldo Brain-hearth (BH) a 37 °C y 55 rpm y, transcurridas 24 horas, se ajustó la densidad óptica (OD) a 0,1, a una longitud de onda de 600 nm. Se realizó una dilución 1:40 de cada inóculo ajustado en medio BH con 0,25% de glucosa (BH+Glu), y se inocularon tres pocillos de una microplaca de 96 pocillos de poliestireno de fondo en U con 200 µL de dicha dilución. Las microplacas se incubaron durante 24 horas a 37 °C en atmósfera aerobia, sin agitación. Transcurridas las 24 horas, se eliminó el contenido de los pocillos, se lavaron tres veces con 200 µL de PBS estéril y se dejaron secar durante 20 minutos a 45 °C. Los pocillos secos se tiñeron con 50 µL de cristal violeta al 0,4% durante 15 minutos. Para retirar el exceso de colorante, se lavaron los pocillos con 200 µL de agua destilada estéril y se dejó de nuevo secar a 45 °C durante 30 minutos. Una vez secas, se dispensaron 200 µL de etanol al 100% en cada pocillo, y se transfirieron 150 µL a un nuevo pocillo para medir la absorbancia. La medida se llevó a cabo en un analizador Virclia (Vircell, España) a una OD<sub>630</sub>. Se utilizó como blanco el medio BH+Glu y como control negativo una cepa de *Streptococcus agalactiae* que se procesó por el mismo procedimiento que las muestras. La obtención de valores de OD<sub>630</sub> < 0,1 se interpretó como ausencia de formación de *biofilm*.

## 7. Estudio de los componentes de la pared

Algunas de los aislados clínicos y sus mutantes pasaron a formar parte de un ensayo más detallado basado en el estudio de los componentes de la pared. El propósito de este estudio es estudiar y analizar el papel de varios genes implicados en la síntesis de lípidos de membrana y en la regulación de la homeostasis de la envoltura celular.

### **7. 1. Estudio de la composición lipídica**

La extracción de lípidos se realizó en mezclas de cloroformo/metanol en proporción 1:2, 1:1 y 2:1 (v/v). Posteriormente, se realizó un análisis general por cromatografía de capa fina, y un análisis específico de fosfolípidos y glicolípidos por espectrometría de masas con ionización de tipo electrospray y determinación por tiempo de vuelo (ESI-TOF-MS) (modo negativo y masa exacta). Además, se acopó el analizador de trampa iónica (ESI-TRAP-MS) a la ionización por electrospray para estudiar los patrones de sustitución de grupos acilo.

### **7. 2. Estudio de la composición de los ácidos grasos**

La determinación de la composición general de ácidos grasos se realizó mediante cromatografía de gases espectrometría de masas, tras liberación mediante hidrólisis ácida. Todas las variantes de espectrometría de masas se realizaron en el Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia. Para el estudio de las variaciones relativas en fosfolípidos y glicolípidos se utilizó como control la composición del aislado clínico, empleando el llamado 'total ion current' (suma de las intensidades de todos los iones en el rango  $m/z$  100-2000) y las intensidades correspondientes a cada uno de los iones monoisotópicos de cada lípido por separado.

## *V. Resultados*

---



## **1. Sensibilidad antibiótica de los aislados clínicos en estudio**

### **1. 1. Evaluación del grado de resistencia a daptomicina en los aislados clínicos**

Los aislados clínicos utilizados para el desarrollo de este estudio, previamente identificados como no sensibles a daptomicina, procedían del Hospital general Universitario de Badajoz y del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca. Los E-test confirmaron, en 8 casos, la no sensibilidad a daptomicina según criterios del CLSI (CLSI, 2017) (CIM > 1mg/L) tras 24 horas de incubación (Fig. 18). La cepa St 2 mostró una CIM de 1 mg/L, pese a lo cual se decidió incluirla en el estudio, al encontrarse en el límite alto del intervalo de sensibilidad a daptomicina. Las CIMs del resto de las cepas oscilaron entre 2 y 4 mg/L, resultado que se ajusta a lo publicado, ya que la CIM de daptomicina más alta publicada, en aislados clínicos, ha sido de 8 mg/L (Humphries et al., 2013).

### **1. 2. Evaluación de la sensibilidad a antimicrobianos de uso alternativo en los aislados clínicos**

La sensibilidad a vancomicina, linezolid, oxacilina, telavancina y dalbavancina se determinó asumiendo los puntos de corte para *S. aureus* establecidos por el CLSI, que aparecen reflejados en la Tabla 3 del punto 1. 2. del Apartado material y métodos.

Tres de los nueve aislados clínicos (33,3%) fueron fenotípicamente SARM (CIM >4 mg/L). De los seis aislados fenotípicamente sensibles a meticilina, dos mostraban CIMs de oxacilina en el límite de sensibilidad (1,5-2 mg/L). La sensibilidad a oxacilina presentando *mecA* o *mecC* es un hecho que ya ha sido reportado en cepas clínicas

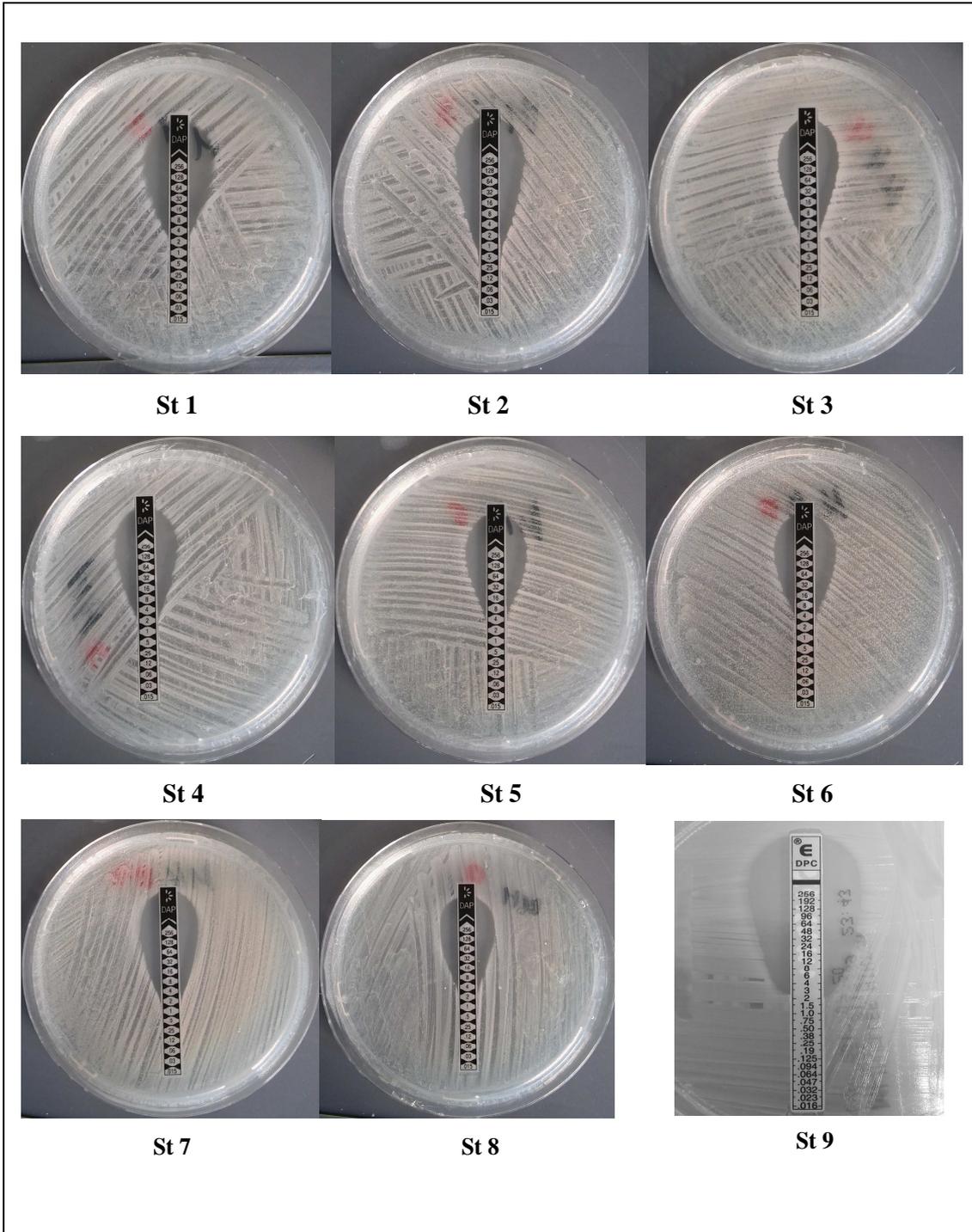
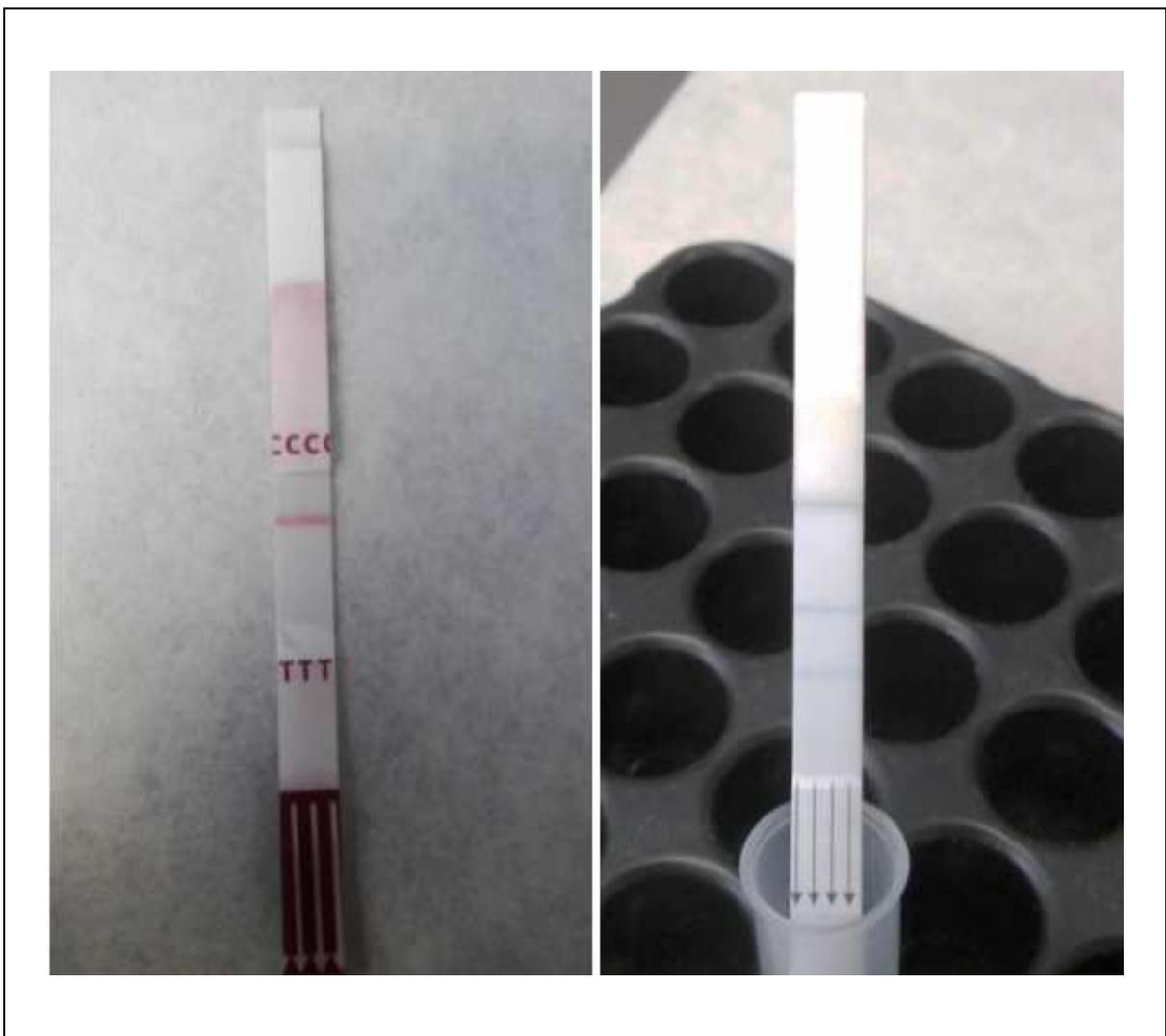


Figura 18. Determinación de CIMs de daptomicina en *Staphylococcus* spp por E-test®.

(Hososaka et al., 2007; Sabat et al., 2015). La búsqueda, mediante inmunocromatografía de membrana, de la PBP2a, permitió confirmar la resistencia a meticilina de los tres aislados fenotípicamente resistentes, y clasificar también como SARM a los dos aislados con CIMs entre 1 y 2 mg/L (Fig. 19).

El estudio adicional de los genes *mecA* y *mecC* en los aislados negativos para PBP2a, confirmó su sensibilidad a meticilina.



**Figura 19.** Detección de la resistencia a meticilina por inmunocromatografía de membrana.

A) Prueba rápida negativa para PBP2 en St 5; B) prueba rápida positiva para PBP2 en St 4.

El 100% de los aislados clínicos fueron sensibles a vancomicina y linezolid.

Todos los aislados fueron sensibles a dalbavancina. Solamente el aislado St 3, con una CIM de 0,12 mg/L, se encontraba en el límite alto del intervalo de sensibilidad. En el caso de telavancina, aunque todos los aislados fueron asimismo sensibles, seis de los nueve aislados se encontraban en el límite superior del intervalo de sensibilidad (CIM: 0,12 mg/L).

Como se observa en la Tabla 6, la CIM de todos los antimicrobianos, excepto oxacilina, fue muy homogénea para todos los aislados clínicos y, dentro de los estrechos intervalos, no parece haber correlación entre las CIMs de los diferentes antimicrobianos peptídicos entre sí, no entre las de éstos y la de oxacilina. Aparentemente se puede decir que no existe, para estos aislados en estudio, una relación entre la no sensibilidad a daptomicina y la resistencia o ausencia de ella al resto de los fármacos aquí enfrentados.

**Tabla 6.** CIMs de daptomicina, vancomicina, linezolid, oxacilina, dalbavancina y telavancina en los 9 aislados clínicos originales de *S. aureus*.

Cepa	CMI (mg/L) daptomicina	CMI (mg/L) vancomicina	CMI (mg/L) oxacilina	CMI (mg/L) linezolid	CMI (mg/L) dalbavancina	CMI (mg/L) telavancina
St 1	4,0	1,0	16*	2,0	0,064	0,125
St 2	1,0	1,0	256*	2,0	0,047	0,047
<b>St 3</b>	4,0	1,5	<b>0,125</b>	1,5	0,100	0,125
St 4	2,0	1,5	1,5*	2,0	0,064	0,125
<b>St 5</b>	4,0	1,0	<b>0,064</b>	1,5	0,047	0,125
St 6	4,0	1,0	4,0*	1,5	0,032	0,125
St 7	2,0	1,0	2,0*	2,0	0,064	0,094
<b>St 8</b>	4,0	1,0	<b>0,125</b>	2,0	0,047	0,125
<b>St 9</b>	2,0	0,750	<b>0,500</b>	2,0	0,032	0,094

\*SARM genéticamente

## **2. Obtención de cepas de *S. aureus* con alto nivel de resistencia a daptomicina**

### **2. 1. Proceso de optimización del experimento de selección de *S. aureus* con alta resistencia a daptomicina**

Mediante el método de exponer cultivos del microorganismo a concentraciones más altas de daptomicina en placa, a fin de seleccionar potenciales mutantes resistentes que hayan emergido de manera espontánea dentro del cultivo, no se obtuvo aislado resistente alguno (Apartado 3.1 de material y métodos).

### **2. 2. Aislamiento de cepas con alto nivel de resistencia a daptomicina de *S. aureus* a partir de los aislados originales**

La exposición seriada a daptomicina a lo largo del tiempo, a diferentes concentraciones, ha permitido hallar cepas con CIMs superiores a la cepa parental, siendo en algunos casos extremadamente elevadas. Algunas de las cepas llegaron a ser absolutamente insensibles a la presencia de daptomicina como se puede observar en algunas de las pruebas de E-test<sup>®</sup> que se realizaron para la detección que recoge la Fig. 20.



**Figura 20.** Placa con la CIM para daptomicina en St 1.6 (en la izquierda) y St 1.8 (en la derecha) por el método E-test®.

En siete de los nueve aislados no se obtuvieron mutantes con CIMs de daptomicina superiores al aislado original. A partir de 2 de los aislados clínicos (St 1 y St 6) se obtuvieron *in vitro* 12 mutantes con CIMs de daptomicina superiores a las del aislado original, que aparecen registradas en la Tabla 7, algunos de ellos con CIMs extremadamente altas, por encima de las CIMs máximas descritas hasta ahora en la literatura para *S. aureus*.

En el caso del aislado St 1, se consiguió una alta frecuencia de selección de mutantes, mientras en el caso de St 6 sólo se consiguieron dos (St 6.1 y St 6.2). Ante el alto número de colonias de presuntos mutantes seleccionadas a partir de St1, se optó por seleccionar para su análisis un grupo de 10 cepas (St 1.1, St 1.2, St 1.3, St 1.4, St 1.5, St 1.6, St 1.7, St 1.8, St 1.9 y St 1.10), que incluyera toda la variedad de CIMs obtenidas, desde CIMs extremadamente altas (St 1.8 CMI = 256 mg/L) hasta CIMs más próximas a las de los aislados clínicos (St 1.2 CIM = 8 mg/L y St 1.4 CIM = 12 mg/L).

Llama la atención que los dos únicos aislados a partir de los que se consiguió obtener mutantes con altos niveles de resistencia a daptomicina fueron aquellos aislados clínicos de SARM con una CIM de daptomicina de 4 mg/L (Tabla 6, Apartado 1.2 de Resultados). Sin embargo, SARM con CIMs de daptomicina <4 mg/L y SASM no seleccionaron mutantes con mayores niveles de resistencia a daptomicina que su cepa parental.

**Tabla 7.** Sumario de las CIM para daptomicina tras la exposición a dicho fármaco como tras la posterior no exposición en las nuevas cepas obtenidas en el proceso de selección de mutantes.

Cepa parental	Cepas <i>in vitro</i>	Último medio líquido en el que estuvieron en crecimiento	CIM (mg/L) para daptomicina
St 1	St 1 .1	2 mg/L	16
	St 1. 2	2 mg/L	8
	St 1. 3	2 mg/L	32
	St 1. 4	2 mg/L	12
	St 1. 5	4 mg/L	128
	St 1. 6	4 mg/L	128
	St 1.7	2 mg/L	64
	St 1.8	4 mg/L	>256
	St 1.9	8 mg/L	128
	St 1.10	8 mg/L	192
St 6	St 6.1	4 mg/L	12
	St 6.2	8 mg/L	12

### **2. 2. 1. Comportamiento de las cepas con alto nivel de resistencia a daptomicina obtenidas *in vitro* frente a fármacos alternativos**

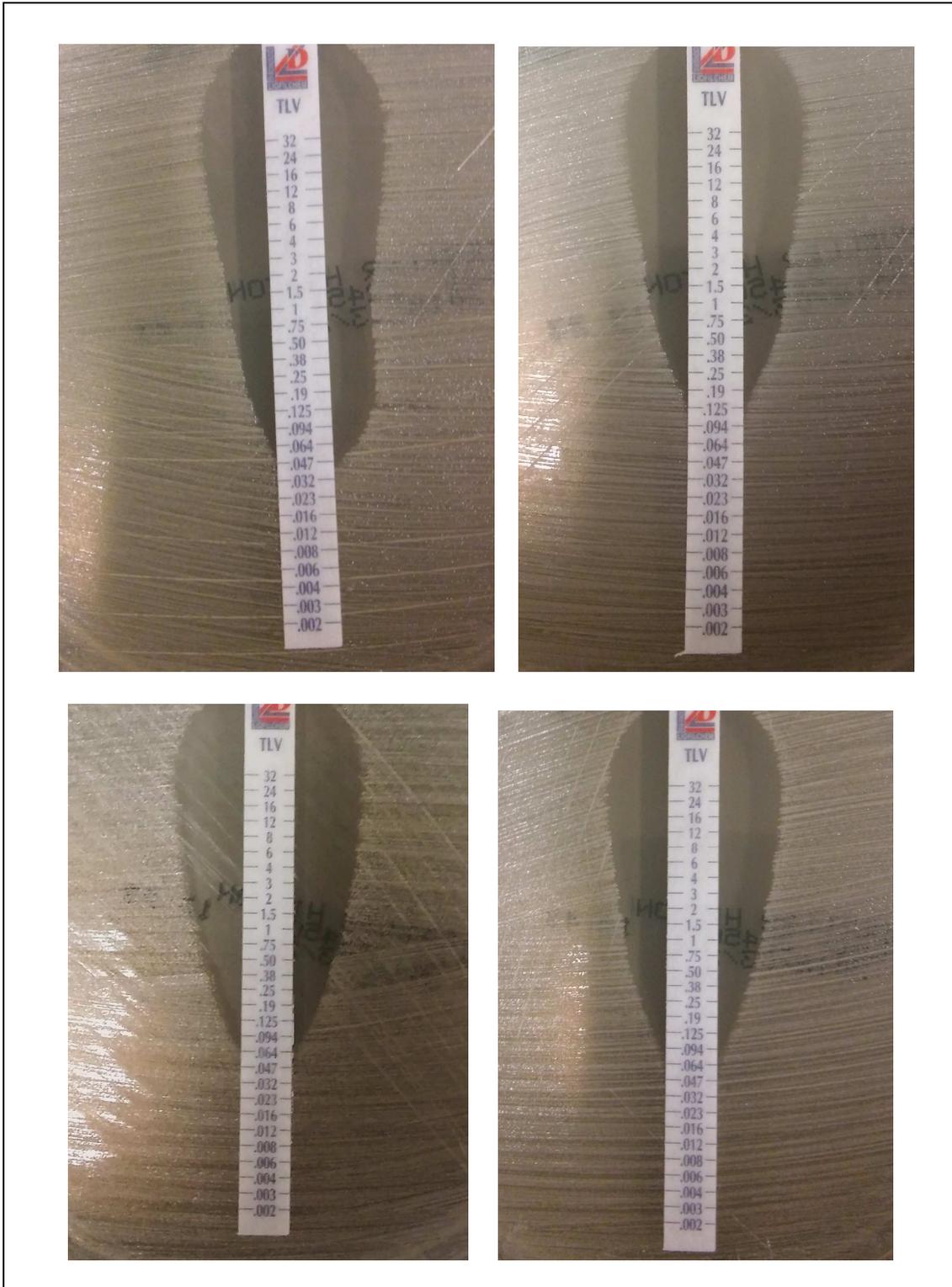
El estudio de los mutantes obtenidos *in vitro* frente a otros antimicrobianos distintos de daptomicina y utilizados frente a Gram positivos (vancomicina, oxacilina, linezolid, dalbavancina, telavancina) mostró que no se registraron cambios en los valores de las CIMs de vancomicina y linezolid. En el caso de telavancina (Tabla 8) se produjeron sólo desviaciones menores, de una sola concentración y sólo en algunos aislados (de 0,064 mg/L a 0,125 en los aislados St 1 y St 1.8), que no supusieron modificación alguna desde el punto de vista cualitativo (S/R) (Fig. 21).

En relación con dalbavancina, aunque el comportamiento general fue similar, uno de los aislados (6.1) se convirtió en insensible a dalbavancina, al adquirir una CIM de 0,2 mg/L (Fig. 22). El aislado parental de éste (St 6) tenía una CIM de dalbavancina de 0,032 mg/L. Es no obstante dudoso que exista una relación causa efecto entre el incremento de CIMs de daptomicina y de dalbavancina, ya que el otro mutante obtenido a partir de la misma cepa parental alcanza las mismas CIMs de daptomicina sin que se modifiquen las CIMs de dalbavancina (Tabla 8).

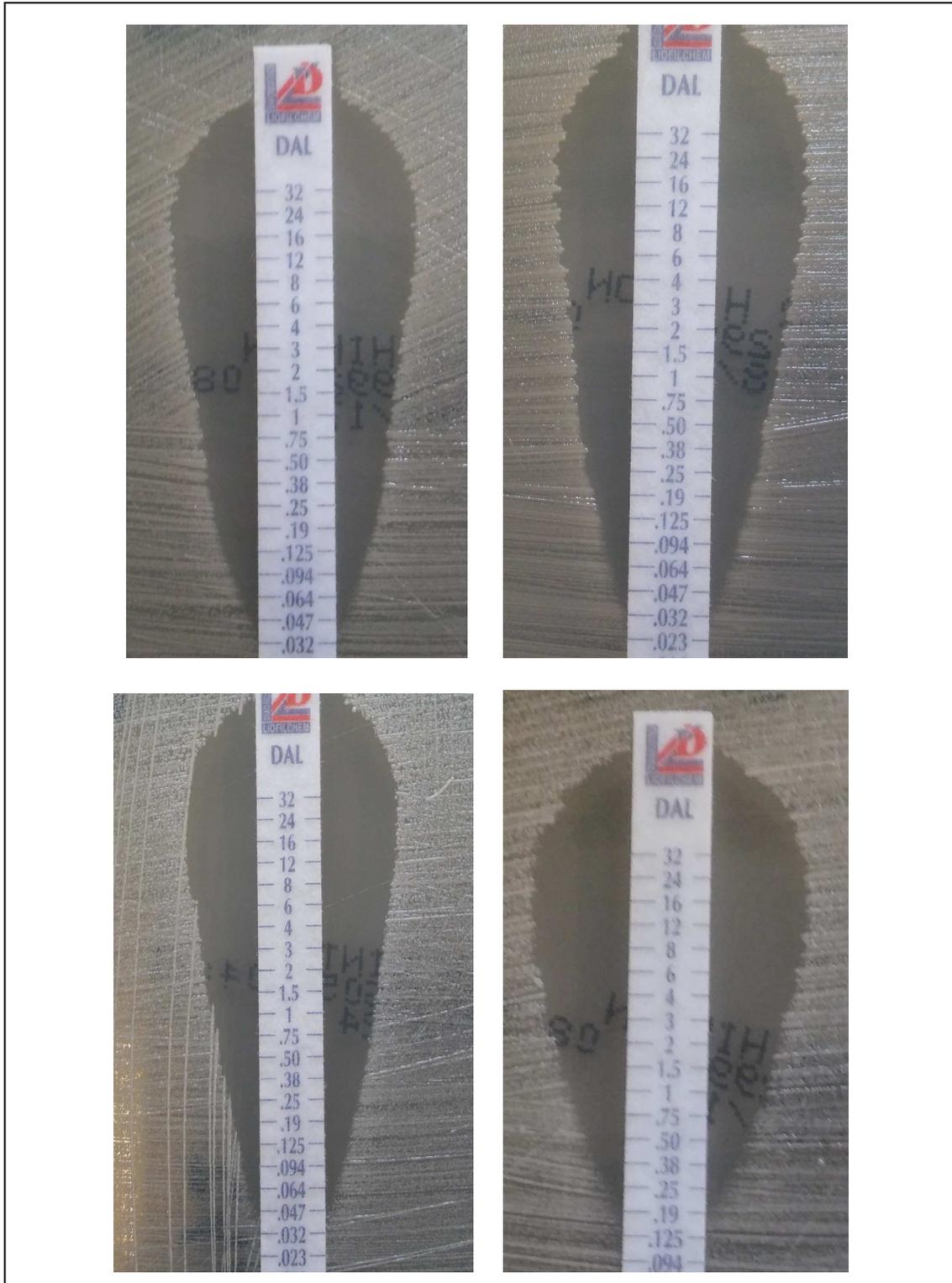
**Tabla 8.** Resistencia de nuestros aislados clínicos y sus respectivos mutantes obtenidos *in vitro* de *S. aureus* no sensibles a daptomicina frente dalbavancina y telavancina.

Cepa original		CMI (mg/L) daptomicina		CMI (mg/L) dalbavancina		CMI (mg/L) telavancina	
-	<i>Cepas in vitro</i>	-	<i>Cepas in vitro</i>	-	<i>Cepas in vitro</i>	-	<i>Cepas in vitro</i>
St 1		4,0		0,064		0,125	
-	St 1.1	-	16	-	0,047	-	0,064
-	St 1.2	-	8,0	-	0,047	-	0,094
-	St 1.3	-	32	-	0,064	-	0,125
-	St 1.4	-	12	-	0,047	-	0,094
-	St 1.5	-	128	-	0,047	-	0,125
-	St 1.6	-	128	-	0,064	-	0,125
-	St 1.7	-	64	-	0,047	-	0,125
-	St 1.8	-	>256	-	<b>0,100</b>	-	0,064
-	St 1.9	-	128	-	0,064	-	0,125
-	St 1.10	-	192	-	0,047	-	0,094
St 2		1,0		0,047		0,047	
St 3*		4,0		<b>0,100</b>		0,125	
St 4*		4,0		0,064		0,125	
St 5*		4,0		0,047		0,125	
St 6		4,0		0,032		0,125	
-	St 6.1	-	12	-	<b>0,200**</b>	-	0,125
-	St 6.2	-	12	-	0,032	-	0,094
St 7*		2,0		0,064		0,094	
St 8*		4,0		0,047		0,125	
St 9*		2,0		0,032		0,094	

\*SASM; \*\* insensible a dalbavancina



**Figura 21.** E-test<sup>®</sup> de telavancina. Las dos primeras imágenes superiores corresponde a los aislados clínicos St 2 (CMI de 0,047 mg/L) y St 4 (CMI de 0, 125 mg/L); por otro lado, las dos inferiores pertenecen a las cepas mutantes seleccionada *in vitro* St 1.8 (CMI de 0, 064 mg/L) y St 6.2 (CMI de 0,094 mg/L) , respectivamente.

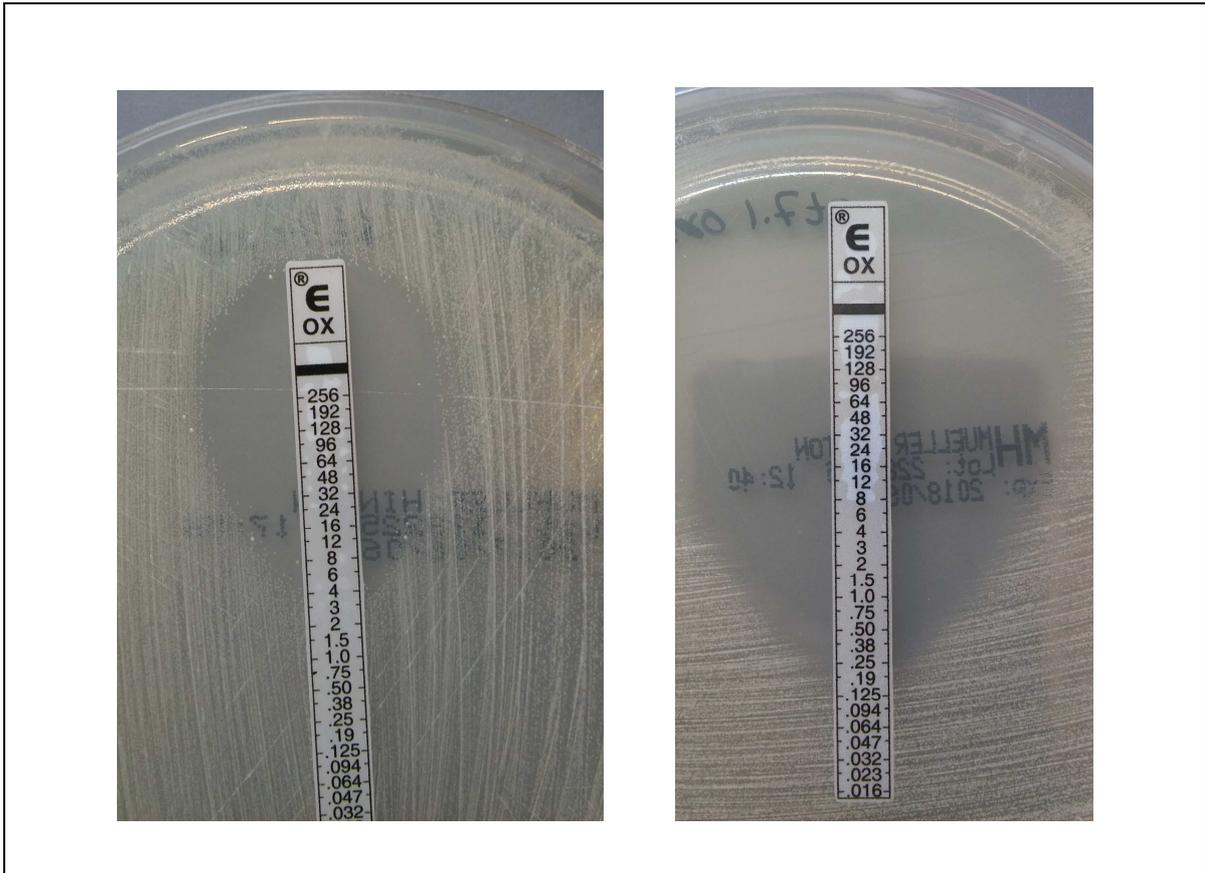


**Figura 22.** E-test<sup>®</sup> de dalbavancina. Las dos primeras imágenes superiores corresponde a los aislados clínicos St 2 (CIM de 0,047 mg/L) y St 9 (CIM de 0,032 mg/L); por otro lado, las dos inferiores pertenecen a las cepas mutantes seleccionada *in vitro* St 1.4 (CIM de 0,047 mg/L) y St 6.1 (CIM de 0,20 mg/L), respectivamente.

No se pudo comprobar el fenómeno *seesaw* que se ha descrito previamente, por el cual el incremento de CIM de daptomicina se correlaciona con frecuencia con una disminución de CIM de oxacilina, en los aislados clínicos no sensibles a daptomicina, al no disponerse del aislado original sensible. Entre los mutantes seleccionados *in vitro*, una cepa mutante del aislado clínico St 1, St 1.3, redujo su sensibilidad a oxacilina revertiendo su CIM de 12 mg/L a 4 mg/L (Fig. 23), mientras el resto de mutantes presentó valores similares a su cepa parental. Por el contrario, las dos mutantes procedentes de St 6 revertieron su sensibilidad a oxacilina pasando de 4 mg/L a 0,19 mg/L y 0,25 mg/L (Fig. 24).



**Figura 23.** E-test<sup>®</sup> de oxacilina. La imagen de la izquierda corresponde a la cepa mutante St 1.2 (CIM para oxacilina de 16 mg/L) y la figura de la derecha corresponde a St 1.3 (CIM para oxacilina de 4 mg/L).



**Figura 24.** E-test<sup>®</sup> de oxacilina. La imagen de la izquierda corresponde al aislado clínico St 6 (CIM para oxacilina de 4 mg/L) y la figura de la derecha corresponde a la cepa mutante St 6.1 (CIM para oxacilina de 0,19 mg/L).

### ***2. 2. 2. Estabilidad de las cepas seleccionadas in vitro con alto nivel de resistencia a daptomicina***

Los mutantes resistentes a daptomicina obtenidos a partir de los aislados clínicos iniciales, fueron incubados, una vez obtenidos, en ausencia de daptomicina, con objeto de comprobar la estabilidad del fenotipo resistente a daptomicina. No se encontraron diferencias entre las CIMs de daptomicina obtenidas inmediatamente después de la selección, y las obtenidas tras siete días de incubación en ausencia del fármaco.

Aquellos mutantes que mostraron el fenómeno *seesaw*, también mantuvieron los niveles de CIM de oxacilina adquiridos, no observándose remisión a los valores originales en ningún caso.

### **3. Búsqueda de genes asociados a mutaciones que se relacionan con resistencia a daptomicina en *Staphylococcus spp***

#### **3. 1. Perfil de mutaciones asociadas a insensibilidad en los 9 aislados clínicos originales**

Todos los aislados presentaron mutaciones significativas en los genes *rpoB* y *mprF*, y la mayor parte de ellos también en *rpoC*, *cls1*, *cls2*, y *mw1109* (Gráf. 1 y 2). Se observaron dos perfiles claramente diferenciados: todos los aislados excepto St 5 presentaron mutaciones en los seis genes mencionados, con un alto número de mutaciones tanto en *mprF* (entre 31 y 35 cambios de aminoácido) como en *cls1* (entre 6 y 16 cambios de aminoácido). Por el contrario, St 5 mostró solamente un cambio de aminoácido en *mprF* y otro en *rpoB*. El cambio encontrado en el aislado St 5 en *rpoB* (F737Y), se detectó también en todos los demás aislados clínicos, mientras el hallado en *mprF* (P314T) se detectó solamente en el aislado St 1.

Con respecto al resto de genes estudiados (*walk*, *agrA*, *pnpA*, *clpP* y *prS*) no localizamos en ninguno de los 9 aislados clínicos cambios en su secuencia. Todas las mutaciones quedan recogidas en las Tablas 9, 10 y 11.

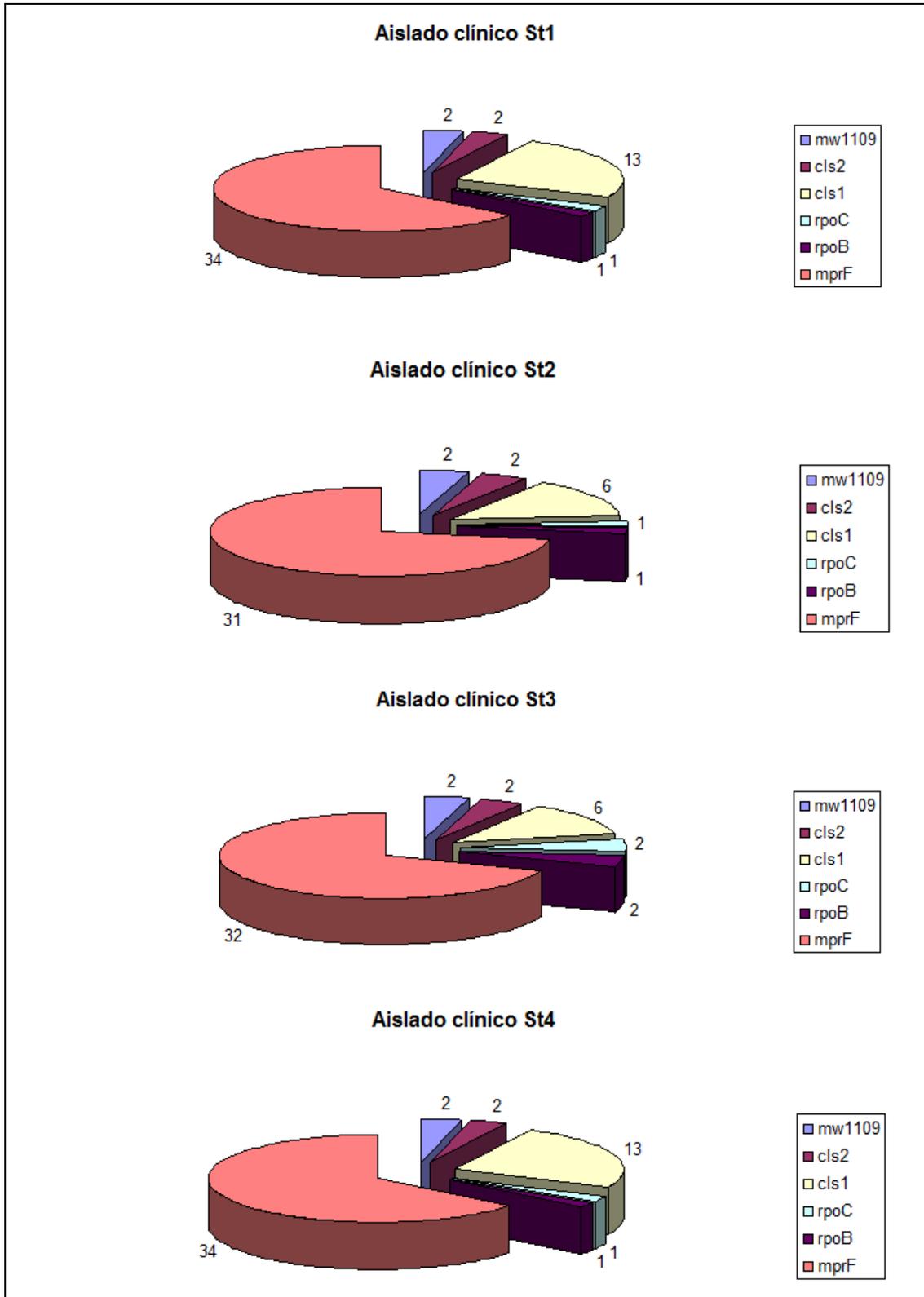
En cuanto a las mutaciones localizadas en el gen *mprF*, llama la atención en primer lugar el alto número de mutaciones (Tabla 9) detectado en todos los aislados clínicos, excepto en St 5, tal como se menciona más arriba, pese a que St 5 mostraba una de las CIMs de daptomicina más elevadas (4 mg/L) de entre los aislados clínicos estudiados.

La mutación observada en St 5 (P314T) solamente se observó en otro aislado clínico, St 1. Un cambio de aminoácido distinto, aunque en la misma posición, se observó también en St 6 (P314L).

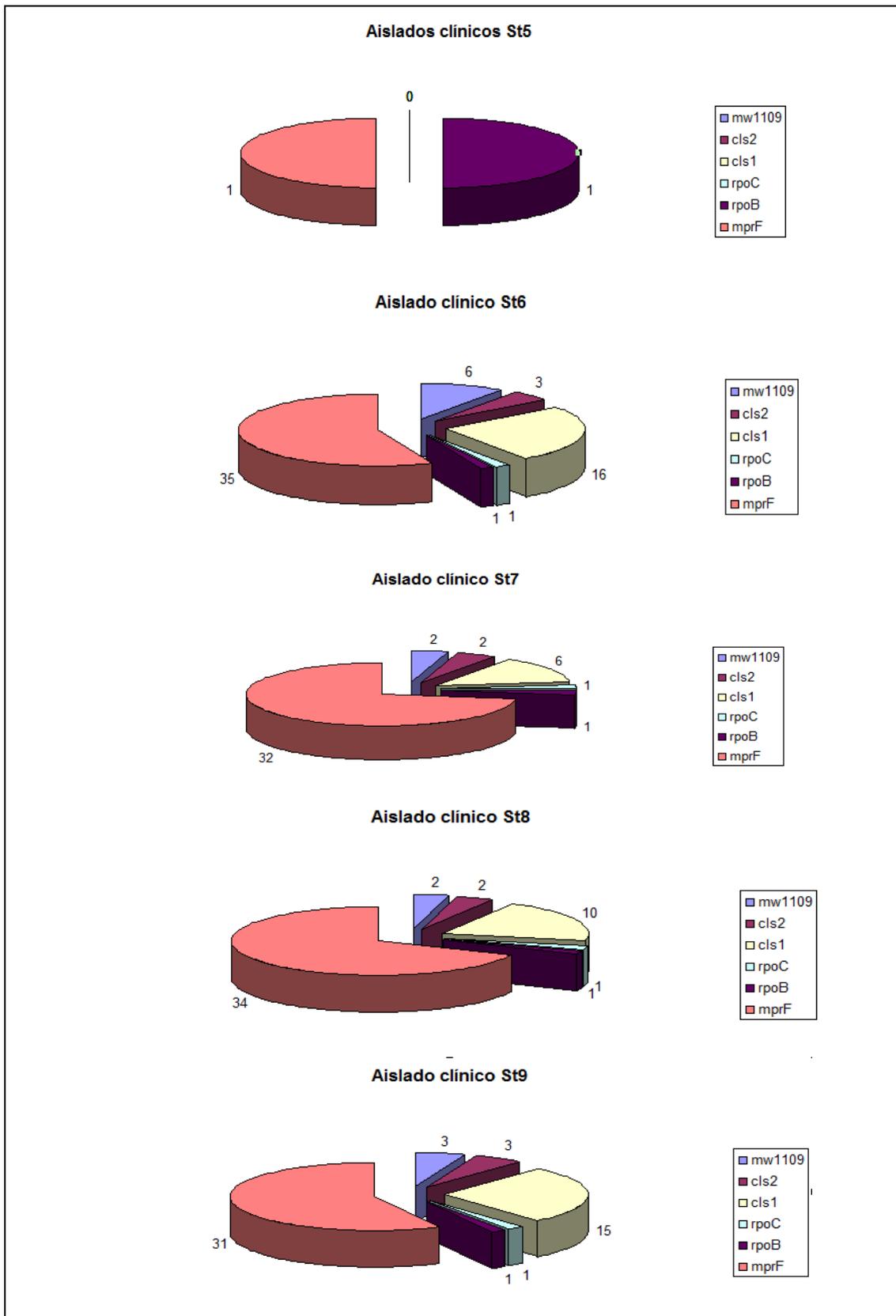
De las 43 mutaciones identificadas en total en los 9 aislados clínicos analizados, todos, excepto St 5 como se ha comentado anteriormente, compartían 31 mutaciones (72,1 %) (Gráf. 1 y 2). De los 8 aislados clínicos con mayor número de cambios, sólo 2 (St 2 y St 9) no tuvieron más cambios que los que comparten con el resto de aislados. La mayor parte de los cambios aparecen en la zona central del gen, lo que hizo complicado obtener la secuencia completa y obligó a rediseñar *primers* (Anexos 1 y 2).

El aislado clínico que mayor número de mutaciones presentó en *mprF* fue St 6 (35), seguido de St 1, St 4 y St 8 con 34 cambios.

**Gráfica 1.** Representación del número de mutaciones en genes con cambios en los aislados clínicos St 1, St 2, St 3 y St 4.



**Gráfica 2.** Representación del número de mutaciones en genes con cambios en los aislados clínicos St 5, St 6, St 7, St 8 y St 9.



**Tabla 9.** Cambios de nucleótidos en el gen *mprF*.

Nº de cepa (Stx)	Posición mutación	Cambio de aminoácido
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9	T1353395C; A1353696G ; C1353730T- T1353731A ; G1353740T; A1353799T; T1353886C-C1353887T; C1354329A; A1354417T; A1354434T-C1354436A ; T1354444C- T1354445A; A1354457C; T1354495C; C1354507T; A1354554G- T1354556A; C1354569A; A1354593T; A1354608G-C1354610T; T1354637A; G1354650A; A1354683C-A1354684G- A1354685C; A1354698C; G1354725A- T1354727A; G1354731A-C1354732T- A1354733G; T1354784A; G1354793T; G1354809A; G1354878A; A1354885C- T1354886A; A1354941T-C1354943A; A1355305G-C1355304A; A1355346G- T1355348A	V26A; N160D; A171V; L174F; Y194F; V223A; L371I; Y400F; I406L; I409T; L413F; V426A; A430V; I446V; L451I; I459L; I464V; F473L; V478I; K489R; I494L; V503I; A505M; N522K; E525D; D531N; D554N; N556T; I575L; T696E; N710E
1, 4	A1354343G; T1354600C-A1354601T	I375M; I461T
1, 5	C1354158A-G1354160T	P314T
6	A1353243G; G1353532C; C1354159T- G1354160T; 1355379	I9V; G105A ; P314L; P721T
3	T1354089A	L291I
4, 7	C1354252T	T345I
8	G1354077A-G1354079A; T1354101C; G1354716T-A1354718T	V287I; S295P; A500S

El gen *cls1*, que como se ha mencionado en la revisión codifica una cardiolipina sintetasa, mostró también un alto número de cambios en casi todos los aislados, aunque sin llegar al número de cambios observados en *mprF*. Con excepción del aislado St 5, que no mostró cambios en este gen, el resto mostraron entre 6 y 16 cambios, detectándose en total 24 mutaciones diferentes, que aparecen recogidas en la Tabla 10. Los aislados que presentaron cambios, sólo tuvieron en común en todos los casos la mutación I238V.

El aislado con mayor número de mutaciones en este gen fue St 6, que era portador de 16 cambios de aminoácido con respecto a la secuencia silvestre, seguida de St 9 con 15 cambios (Gráf. 2 y Tabla 10).

En el caso del gen *cls2*, la variabilidad y el número de mutaciones fue muy inferior, pero se detectaron en todos los aislados excepto St 5. El resto presentaron entre una y dos cambios de aminoácido en este gen. Se detectaron 4 mutaciones diferentes, de las cuales dos (V135I; H205) aparecieron en los ocho aislados clínicos que presentaron mutaciones en este gen, mientras el resto aparecieron en un solo aislado cada una (Tabla 10).

MW1109 es una proteína hipotética, en cuyo gen Song et al. (2013) encuentran cambios asociados a insensibilidad a daptomicina en cepas seleccionadas *in vitro*. En nuestro estudio también aparecen cambios en este gen en todos los aislados clínicos con excepción de St 5. La distribución de mutaciones fue mucho más homogénea. Dos cambios de aminoácidos (L214I; D497E) se detectaron en los 8 aislados que presentaron cambios (Tabla 11). Adicionalmente, el aislado St 9 presentó una mutación significativa, y el aislado St 6 presentó 4.

El gen *rpoB* mostró mutaciones significativas en los 9 aislados clínicos (Tabla 11). En todos los aislados se registró un solo cambio de aminoácido, que en 8 de los 9 aislados fue F737Y. Sólo el aislado St3 presentó un cambio de aminoácido distinto (M513I).

Tabla 10. Cambios de nucleótidos en los genes *cls1* y *cls2*.

Genes	Nº de cepa (Stx)	Posición mutación	Cambio de aminoácido
<i>cls1</i>	1, 4, 6, 8, 9	A1306452C; A1306521C; C1306533A-T1306535A; T1306604A	K147Q; K170Q; H174K; N197K
	1, 4, 9	T1307179A; C1307276G; T1307357G	F389Y; I421M; N448K
	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9	A1306725G-T1306727A	I238V
	1, 2, 3, 4, 7, 8	G1307418A	E469K
	1, 2, 3, 4, 7, 8	A1306018G; T1306021A; T1306023A	Q2R; F3Y; S4T
	1, 2, 3, 4, 6*, 7, 8, 9*	T1306166C T1306166C-C1306167A*	V18A
	6, 9	G1306273C-A1306274G; G1306407A; C1306537T- T1306538G	G87A; V132I; A175V
	9	T1306140G; C1306144A- T1306145A	S43A; T44K
	6, 9	G1306072C-A1306073C	G20A
	6	T1306912A-T1306913A; G1306935A-G1306936A; C1306938T; G1306943C; T1306950G-A1306952G; T1307377C	V300E; G308K; P309S; L310F; S313A; V455A
5	NC	NC	
<i>cls2</i>	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9	G2125012A; A2125223G	V135I; H205R
	6	C2126021A	A471E
	9	A2125984T	I459L
	5	NC	NC

\*NC: no hay cambios en la secuencia.

El gen *rpoC* mostró cambios significativos en todos los aislados excepto St 5. Al igual que en el caso anterior, todos los aislados portadores de cambios significativos mostraron el mismo cambio (V864I), con excepción de St 3 que muestra un cambio diferente y en una localización muy distante (P100L) (Tabla 11).

En resumen, desde el punto de vista cualitativo, se pueden distinguir 2 perfiles mutacionales diferentes en los 9 aislados clínicos estudiados:

- *mprF + rpoB + rpoC + cls1 + cls2 + mw1109* (8 aislados).
- *mprF + rpoB* (1 aislado).

Dentro de ellos hay, además una cierta variabilidad en cuanto al número de mutaciones que aparecen en cada gen y en la localización de las mismas. Sin embargo, a pesar de los diferentes perfiles, no se ha observado que la presencia de mutaciones en dos o en seis genes genere diferencias importantes en las CIMs de daptomicina, como tampoco parecen hacerlo el diferente número y localización de las mutaciones, dentro del grupo de aislados que presentan el mismo perfil cualitativo.

**Tabla 11.** Cambios de nucleótidos en los genes *rpoB*, *rpoC* y *mw1109*.

Genes	Nº de cepa (Stx)	Posición mutación	Cambio de aminoácido
<i>rpoB</i>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9	T545943A	F737Y
	3	G545272A	M513I
<i>rpoC</i>	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9	G550011A-T550013A	V864I
	3	C547720T	P100L
	5	NC	NC
<i>mw1109</i>	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9	C1191817A; T1192668A	L214I; D497E
	9	A1192470C	E431D
	6	A1191607G; G1192006A; T1192036C; C1192715A	I144V; E277K; Y287H; A513E
	5	NC	NC

\*NC: no hay cambios en la secuencia.

### **3. 2. Perfil de mutaciones asociadas a insensibilidad a daptomicina en aislados obtenidos a través de la selección de mutantes**

Pese a que las condiciones de selección fueron comunes, y como ya se ha comentado anteriormente, sólo se obtuvieron mutantes con un aumento significativo de resistencia a daptomicina a partir de los aislados clínicos St1 y St6. En ningún caso se obtuvieron mutantes con incremento de la CIM de daptomicina a partir de aislados sensibles a meticilina.

#### **3. 2. 1. Estudio genético de cepas mutantes procedentes de la cepa St 1**

Como aparece reflejado en la Tabla 7 anteriormente mencionada en el Apartado 3.2. de Resultados, se obtuvieron 10 mutantes con un incremento significativo de la CIM de daptomicina a partir del aislado clínico St 1. Utilizando la misma metodología que en los aislados clínicos originales, se elaboró un estudio genético centrado en el análisis de los genes que se han relacionado en la literatura con resistencia a daptomicina.

Por motivos que desconocemos, las PCR de diversos genes, fundamentalmente *mprF*, *rpoB* y *cls1*, realizadas con los mismos *primers* y en las mismas condiciones que en los aislados clínicos originales, no ofrecieron resultados alguno. Ante la sospecha de que esto se debiera a la existencia de mutaciones en las áreas de hibridación de los *primers*, que hicieran que los *primers* diseñados sobre la base de la secuencia silvestre no hibridaran adecuadamente, se procedió al rediseño de los *primers* (Anexo 2), utilizando como base partes de la secuencia del gen a medida que iban siendo obtenidas. Sin embargo, cuando se consiguió amplificar y secuenciar los genes mencionados, no se encontraron cambios significativos adicionales a las ya detectadas en su aislado clínico parental St 1, a excepción del gen *cls2*. Las mutaciones

encontradas en este gen aparecen en la Tabla 12. En relación con este gen, no todas las cepas adquirieron las mismas mutaciones a lo largo del proceso de selección, de modo que se establecieron 3 tipos de perfiles genéticos para este gen:

- Secuencia idéntica a su cepa parental: 1 aislados.
- Cambio de aminoácidos T33N: 1 aislado.
- Cambio de aminoácidos F60S: 8 aislados.

**Tabla 12.** Mutaciones de los 10 mutantes obtenidos *in vitro* a partir de St 1.

Genes	Nº de cepa (Stx)	Posición mutación	Cambio de aminoácido
<i>cls2</i>	1.1	C2124707A	MMO; T33N
	1.2, 1.4, 1.5, 1.7, 1.6, 1.8, 1.9, 1.10	T2124788C	MMO; F60S
	1.3	NC	MMO

\*NC: no hay cambios

\*MMO: mismas mutaciones que las encontradas en la cepa original que aparece en la Tabla 10.

### **3. 2. 2. Estudio genético de mutantes procedentes del aislado clínico St 6**

Como en el caso anterior, fue necesario rediseñar algunos *primers*, ya que la amplificación de los genes *mprF* y *cls1* con los *primers* originales era dificultosa, a pesar de no existir modificaciones en esos genes. A diferencia de la mayor parte de las mutantes procedentes de St 1, que presentaron al menos un cambio en un gen, en este caso no se detectaron cambios adicionales con respecto a la cepa parental en ninguna de las dos cepas mutantes obtenidas a partir del aislado clínico St 6.

## **4. El precio de adquirir resistencia**

### **4. 1. *Fitness cost* sin competencia**

Para el estudio de *fitness* sin competencia se optó por evaluar tanto el comportamiento de los aislados clínicos SARM como SASM. Con este objetivo, se seleccionaron cuatro de los 9 aislados clínicos:

- 1) St 4: PBP2' (+), aunque con una CIM dentro del intervalo de sensibilidad (CIM de oxacilina = 1,5 mg/L). Presenta mutaciones similares al resto de aislados, excepto St 5.
- 2) St 5: SASM con un perfil genético completamente diferente al resto.
- 3) St 7: SARM con un perfil genético similar a la mayoría de los aislados clínicos, excepto St 5.
- 4) St 8: SASM con mutaciones similares a la mayoría de los aislados, excepto St 5.

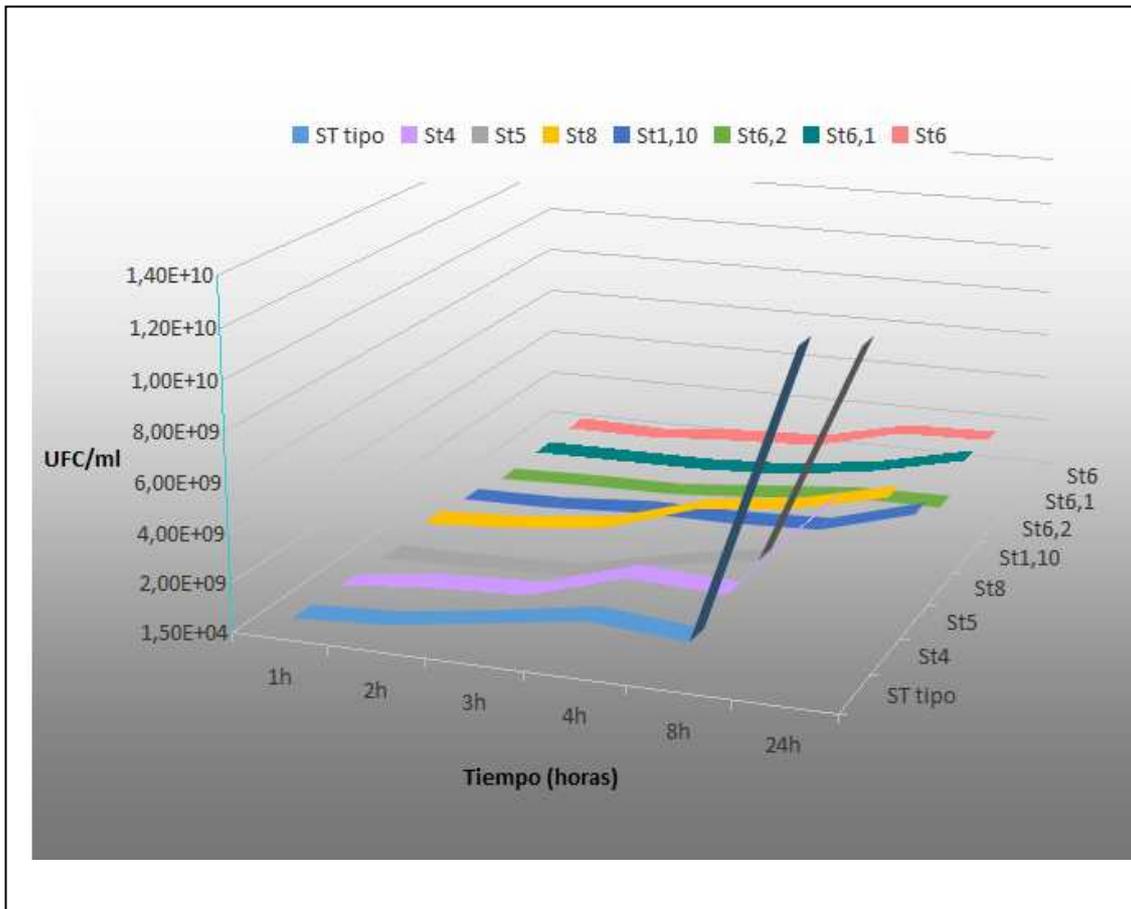
Además, también se incluyeron en este experimento tres cepas seleccionadas *in vitro* con alto grado de resistencia a daptomicina. En este caso, se escogió un mutante perteneciente a cada aislado clínico, de tal forma que se trabajó con las cepas:

- 1) St 1.10: SARM procedente de St 1. Presenta una CIM para daptomicina de 192 mg/L. Sensible a dalbavancina.
- 2) St 6.1: SARM procedente de St 6 con una CIM para daptomicina de 12 mg/L y no sensible a dalbavancina (CIM=0,2 mg/L).
- 3) St 6.2: SARM procedente de St 6 con una CIM para daptomicina de 12 mg/L. Sensible a dalbavancina.

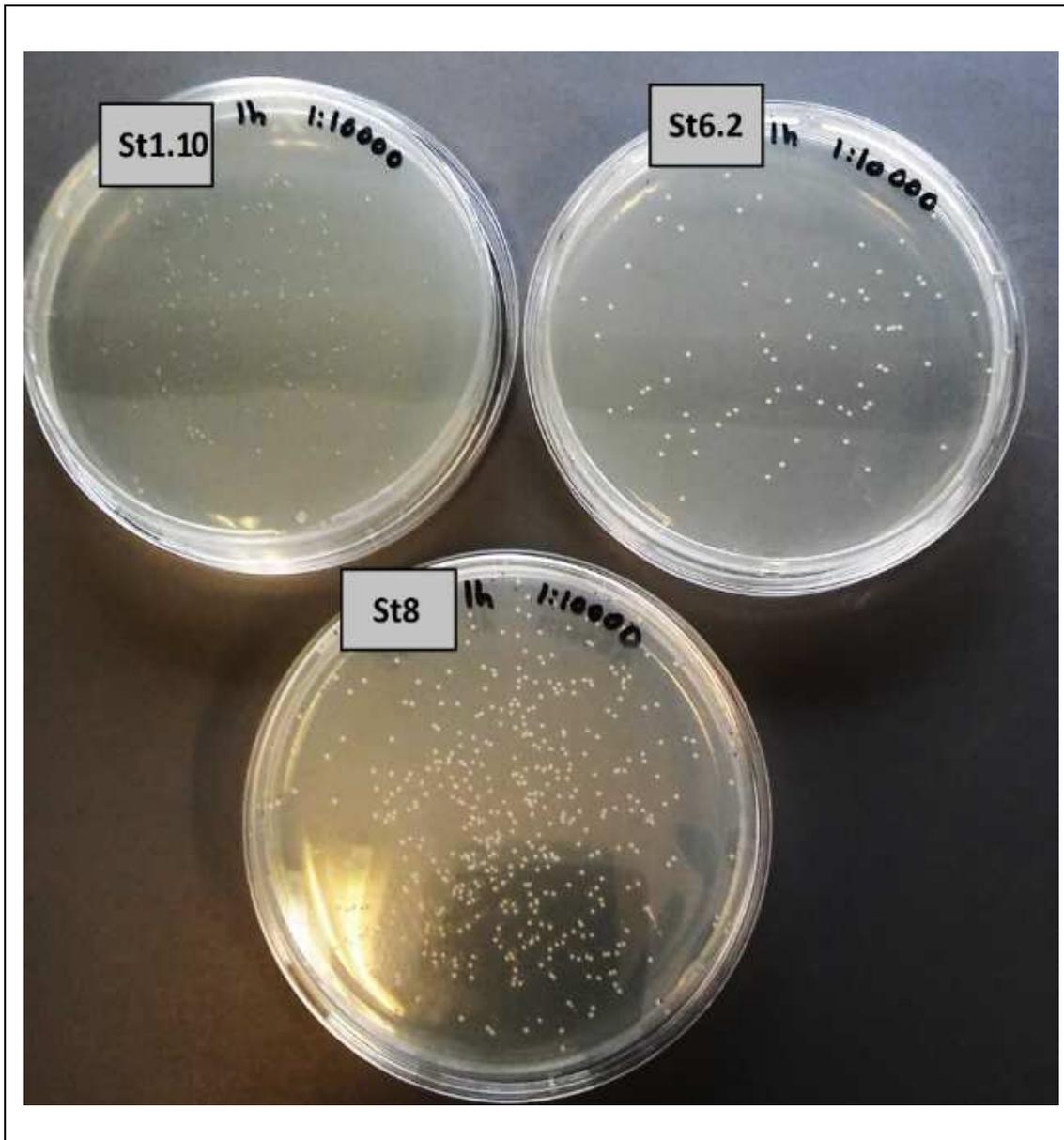
Como se representa en la Gráf. 3, tanto los aislados clínicos, excepto St 5, como los aislados resistentes obtenidos *in vitro*, mostraron un deficiente *fitness* en comparación con la cepa tipo de *S. aureus*. Transcurridas 24 horas de incubación, las cepas con alto grado de resistencia a daptomicina no llegaron a su fase exponencial. El crecimiento de mutantes con alto grado de resistencia a daptomicina fue aproximadamente 10 veces menor que el de la cepa tipo de *S. aureus* ( $9,4 \times 10^8 - 1,9 \times 10^9$  CFU / ml vs  $1,3 \times 10^{10}$  CFU / mL).

Pese a ser el mutante St 6.1 resistente no sólo a daptomicina, sino también insensible a dalbavancian, no se encontraron diferencias en su *fitness* individual con respecto a su cepa parental. St 6.2 mostró un crecimiento discretamente menor que el aislado clínico St 6 ( $9,4 \times 10^8$  CFU / ml vs  $1,63 \times 10^9$  CFU / ml).

Otro dato relevante que se puede observar en la Gráf. 3 fue la similar curva de crecimiento que presento el aislado clínico St 5 al compararse con la cepa tipo de *S. aureus* tipo. De los tres aislados con perfil genotípico similar, St 4 fue la que mostró un mejor *fitness*. Además, pese a que St 8 presenta un inicio de fase exponencial más precoz que la cepa tipo, esto no parece influir positivamente en su supervivencia a más largo plazo.

**Gráfica 3.** Curvas de crecimientos para ST tipo, St 4, St 5, St6, St 8, St 1.10, St 6.1, y St 6.2.

Otra característica observada en algunos casos fue que, incluso en comparación con aislados con un *fitness* similar (St 6.2) o discretamente superior (St 8) en el experimento anterior, algunos aislados, como fue el caso del St 1.10, mostraban una velocidad de crecimiento claramente más lenta en medios con agar, con una clara diferencia en la rapidez de formación de colonias y en el tamaño de las mismas, como se puede apreciar en la figura Fig. 25.

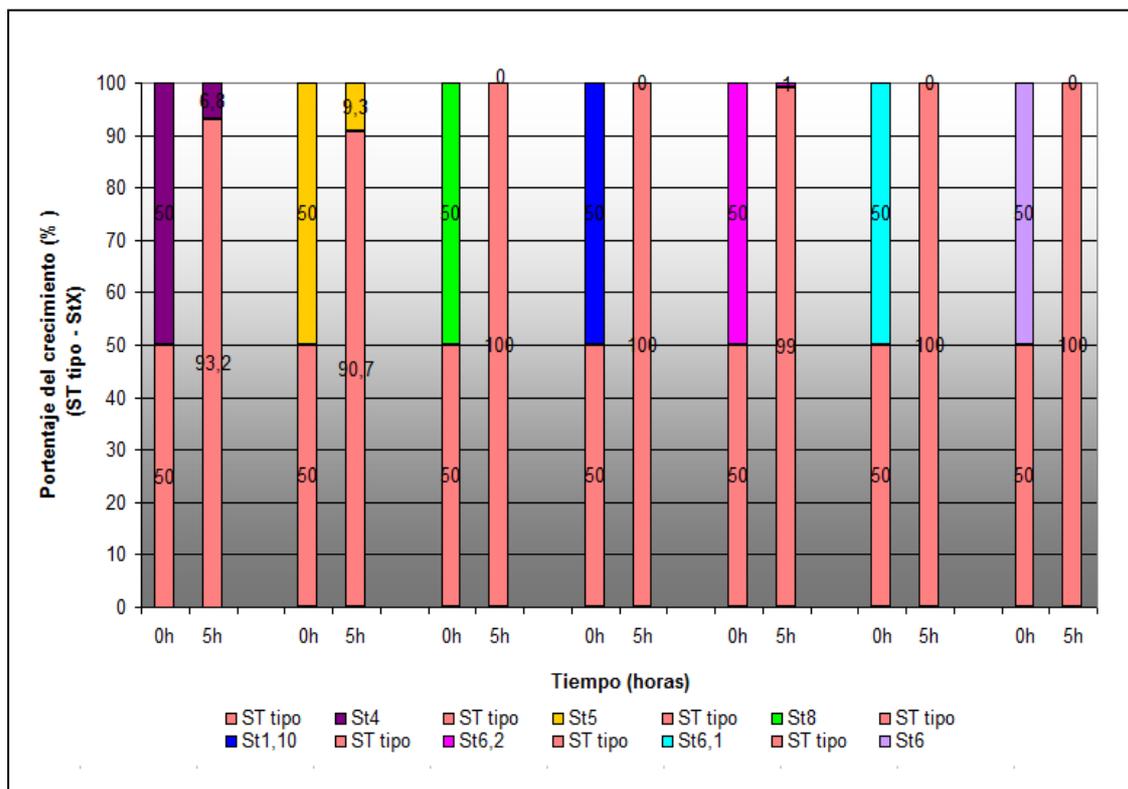


**Figura 25.** Placas de agar MH tras 24 h de incubación de cepas St 8 (CIM para daptomicina = 4 mg/L), St 1.10 (CIM para daptomicina = 192 mg/L) y St 6.2 (CIM para daptomicina = 12 mg/L).

#### 4. 2. Fitness cost en competencia

Una vez comprobado que, como norma general, los aislados insensibles a daptomicina crecían de forma claramente más lenta que aislados sensibles de *S. aureus*, se planteó estudiar su capacidad para competir con dichos aislados sensibles. Para ello, se realizó un estudio de crecimiento en el mismo caldo de cultivo, y a partir de las mismas concentraciones bacterianas, de cada uno de los aislados clínicos y de los mutantes obtenidos *in vitro*, con una cepa de referencia de *S. aureus* sensible a daptomicina. En este estudio, como se puede observar en la Tabla 14, después de 5 horas de incubación, la proporción cepa de referencia: aislado insensible a daptomicina pasó de ser 1:1 a tiempo 0, a ser 10:1 en el caso de St 5 y 14:1 en el de St 4. En el resto de los casos, el aislado resistente a daptomicina no se pudo recuperar al cabo de dichas 5 horas, permaneciendo viable únicamente la cepa tipo.

**Tabla 14.** Confrontación de ST tipo frente a *S. aureus* no sensible a daptomicina en un estudio *fitness cost* en competencia.



Este estudio demostró que, pese a mostrar St 5 y la cepa patrón utilizada un comportamiento similar en el ensayo de *fitness* individual, la cepa patrón es claramente más eficiente en situación de competición, pasando de suponer el 50% de la población a suponer más del 90% tras 5 horas de incubación.

Los datos obtenidos en este estudio sugieren que el *fitness* de los aislados insensibles a daptomicina, en competición con una cepa silvestre de *S. aureus*, es en todo caso muy bajo, ya que la relación entre su población y la de la cepa silvestre pasa de ser 1:1 a ser, en el mejor de los casos, entre 1:10 y 1:20 tras 5 horas sometidas a las mismas condiciones de cultivo. De todos modos, los datos sugieren que además, este *fitness* es incluso peor a medida que las CIMs de daptomicina son más altas.

## **5. Determinación de la formación de *biofilm* en cepas originales y sus correspondientes mutantes**

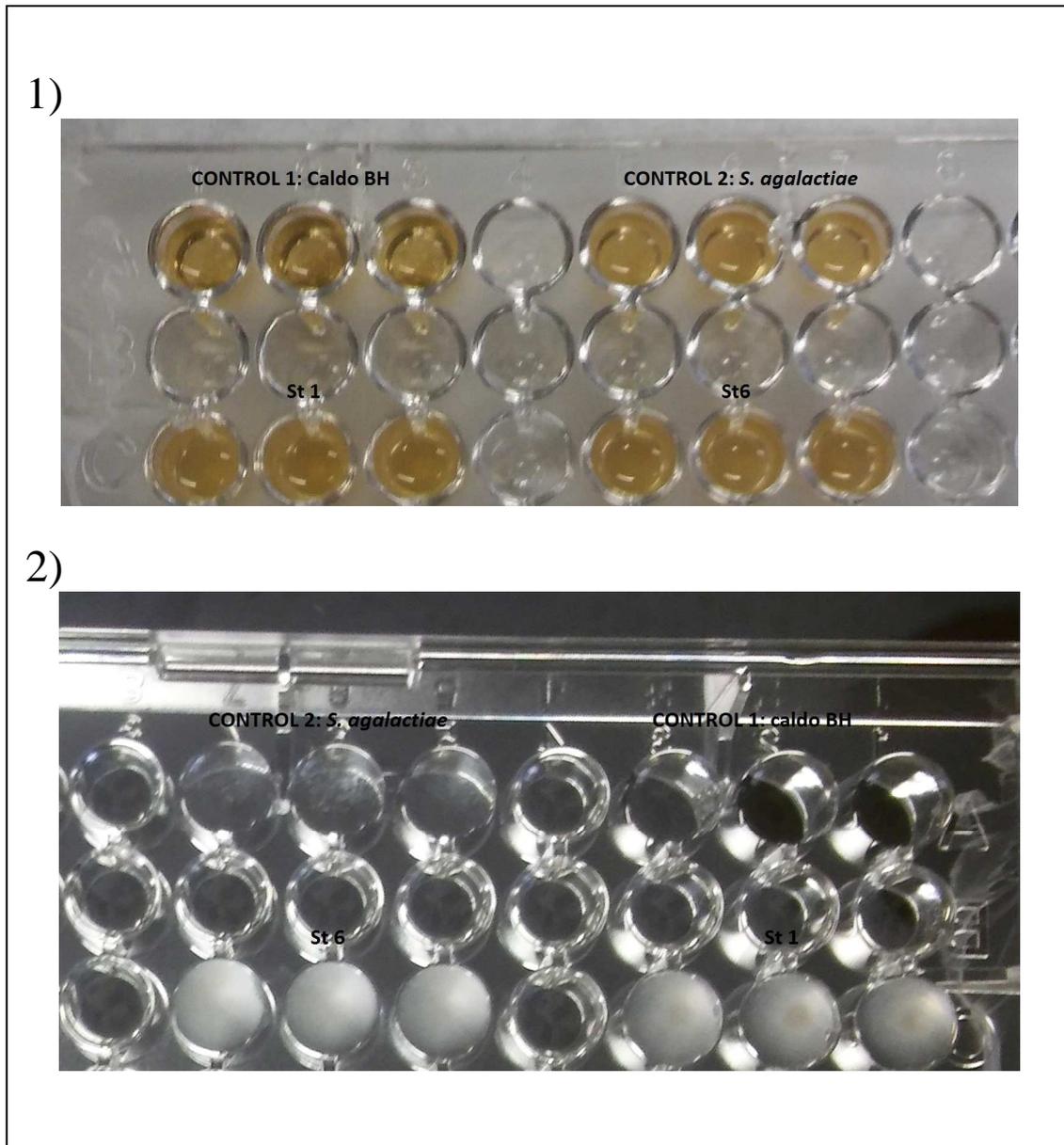
Se ha descrito en numerosos microorganismos que la adquisición de mecanismos de resistencia puede interferir en sus mecanismos de patogenicidad, por lo general disminuyendo su eficacia. No existen estudios sobre cómo repercute la adquisición de resistencia de alto nivel a daptomicina en los diferentes mecanismos de patogenicidad de *S. aureus*. Por ese motivo, se decidió estudiar el comportamiento tanto de algunos de los aislados clínicos resistentes a daptomicina como de mutantes resistentes seleccionados a partir de ellos, en relación con la producción de *biofilm*. En el caso de St 1, se seleccionaron los mutantes St 1.1, St 1.7 y St 1.8, y para St 6 se seleccionaron los dos mutantes obtenidos a partir de este aislado clínico.

Ambos aislados clínicos fueron claramente productores de biopelículas (Fig. 26), mostrando una absorbancia mucho mayor que el control negativo. Entre los mutantes obtenidos *in vitro*, ninguno perdió capacidad de producción de *biofilm* de forma

significativa con respecto a su aislado clínico parental, y en algunos casos dicha capacidad incluso aumentó. Como se puede observar en la Tabla 15, dos de los mutantes obtenidos a partir de St 1 incrementaron su producción de *biofilm* entre un 40 y un 70%, y sólo la cepa St 1.8, que tiene mayor grado de resistencia a daptomicina, mostró una producción de *biofilm* muy discretamente disminuida, con una repercusión clínica improbable. Algo similar ocurrió con las mutantes obtenidas a partir de St 6. St 6.1, insensible tanto a daptomicina como a dalbavancina, aumentó su capacidad de producción de *biofilm* en cerca de un 75%, mientras que St 6.2 mostró una reducción de absorbancia en torno al 5%.

**Tabla 15.** Capacidad de producción de biopelícula en *S. aureus* no sensibles a daptomicina.

Aislados clínicos - <i>In vitro</i>	Absorbancia respecto al control negativo	Absorbancia respecto a la cepa clínica de origen
St1	3213 %	-
- St 1.1	-	172,40%
- St 1.7	-	141,90%
- St 1.8	-	90,10%
St6	2615 %	-
- St 6.1	-	174,70%
- St 6.2	-	94,50%



**Figura 26.** Capturas del ensayo sobre la formación de biopelículas. 1) Crecimiento de los aislados en estudio y los dos controles (caldo BH sin inóculo, *S. agalactiae* como control negativo) transcurridas 24 h de incubación); 2) visualización tras retirar el sobrenadante.

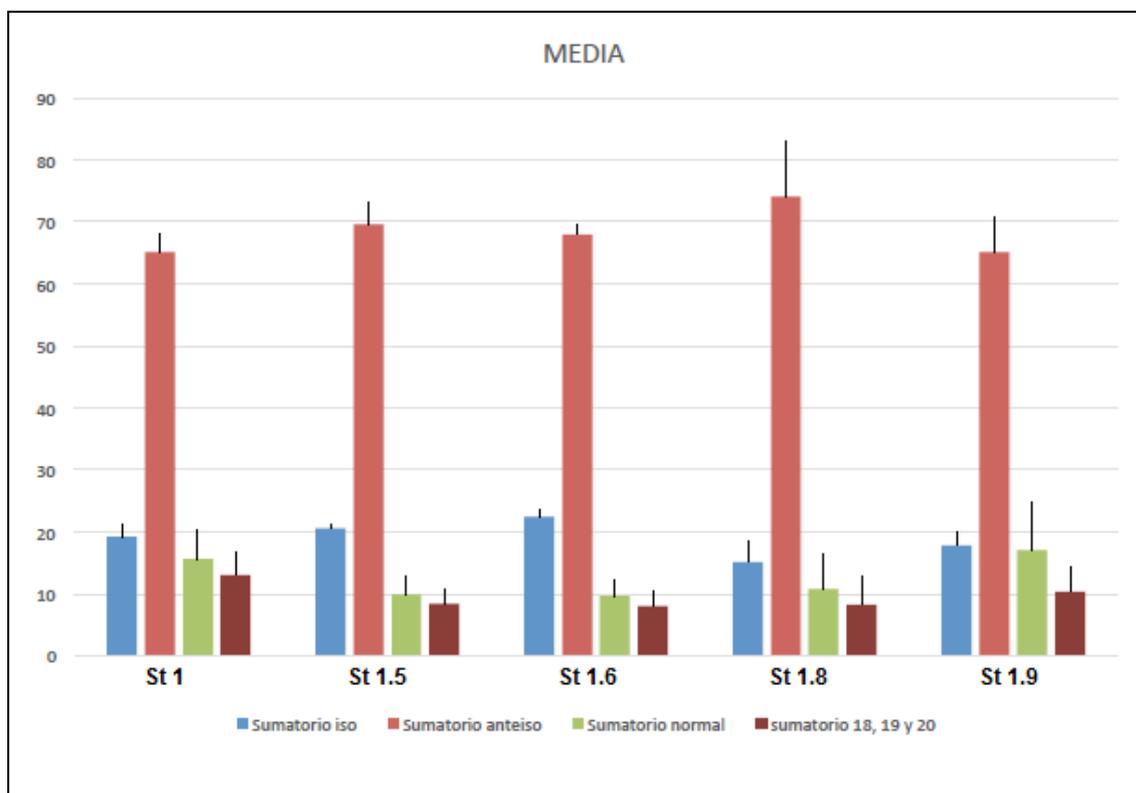
## **6. Estudio fenotípico: componentes de la pared bacteriana en cepas no sensibles a daptomicina**

La realización de un análisis de la pared permitió la elaboración de minuciosas comparaciones sobre la composición de la pared bacteriana. Puesto que las mayores CIMs las obtuvimos a partir del aislado clínico St1, el estudio de los componentes de la pared se realizó sobre esta cepa y cuatro de sus mutantes con mayor grado de resistencia a daptomicina, en los que era previsible encontrar las mayores diferencias.

### **6. 1. Composición de ácidos grasos de membrana en cepas de *S. aureus* con alta resistencia a daptomicina**

Los ácidos grasos con terminales “iso” parecen ser similar en las 4 mutantes evaluadas, siendo la cepa con mayor CIM quien mayor disminución presentó, y además la que más aumentó los ácidos grasos con terminales “anteiso” (Gráf. 4). Todas las cepas disminuyeron los normales, excepto St 1.9 en baja medida, y los ácidos grasos formados por 18, 19 y 20 carbonos, por lo que existe una cierta tendencia a disminuir la longitud de sus cadenas, aunque no se encontraron diferencias significativas ( $p>0,05$ ).

**Gráfica 4.** Composición de ácidos grasos de St1 y cuatro de sus mutantes (St 1.5, St 1.6, St 1.8 y St 1.9)



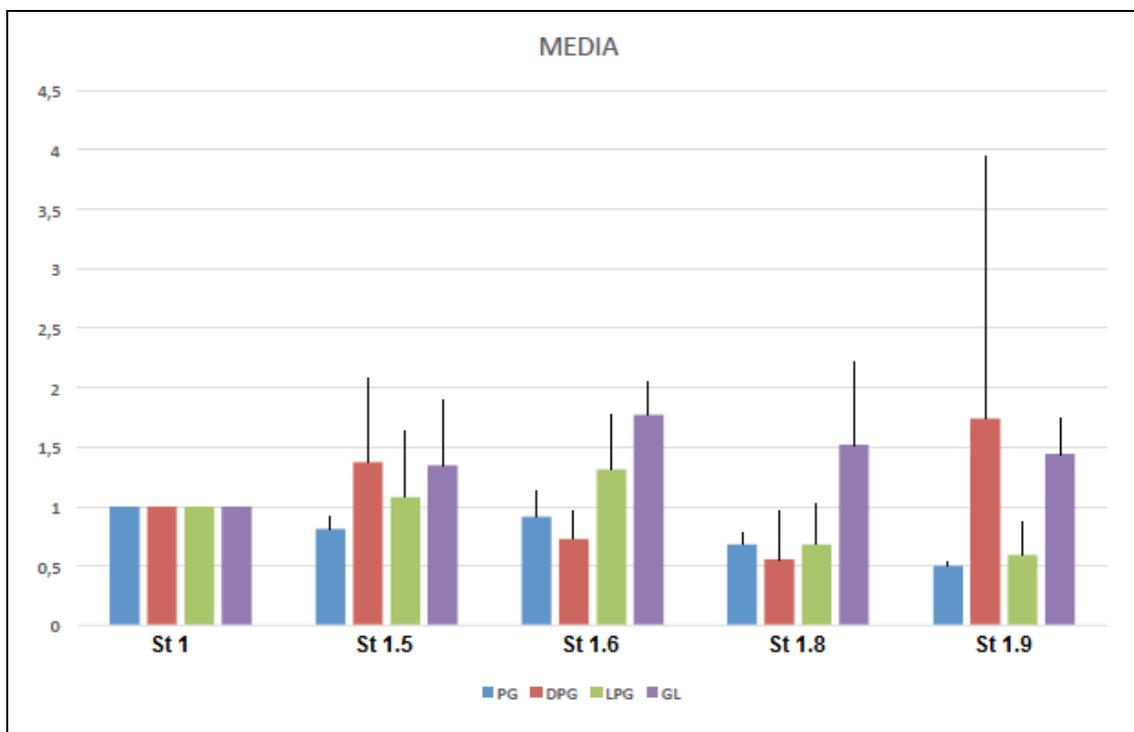
## 6. 2. Composición de lípidos de membrana en cepas de *S. aureus* con alta resistencia a daptomicina

Los resultados obtenidos en el estudio de la composición de lípidos nos permitió comprobar una diferencia en la cantidad de PG, DPG, LPG y GL de las cepas mutantes con respecto a su aislado clínico parental. Sin embargo, en comparación con St 1, no se encontraron patrones homogéneos entre los mutantes seleccionados; existe una tendencia a la disminución del PG y al aumento del GL, pero tanto DPG como LPG se comportan de forma muy diferente en cada aislado, sin poder vincularse con su grado de resistencia a daptomicina, por lo que aparentemente no parecen estar relacionados (Gráf. 5).

A pesar de ello, en los resultados obtenidos entre los mutantes *in vitro* (Gráf. 5) y sin encontrar una relación con sus niveles de CIMs, se aprecia un comportamiento común en los 4 mutantes, de tal forma que en los casos en los que aumentan los DPG siempre disminuyen los LPG en mayor o menor medida, y viceversa, ocurriendo de la siguiente forma y, por lo tanto, diferenciándose dos tipos de perfiles diferentes:

- St 1.5 y St 1.9 (CIMs: ambas 128 mg/L): aumentan los DPG disminuye los LPG.
- St 1.6 y St 1.8 (CIMs: 128 mg/L y >256 mg/L): disminuyen los DPG y aumentan los LPG con respecto a St 1.5 y St 1.9.

**Gráfica 5.** Comparación de la composición de lípido de membrana, tanto fosfolípidos como glicolípidos, en el aislado clínico St1 con respecto a cuatro de sus mutantes obtenidos *in vitro* (St 1.5, St 1.6, St 1.8 y St 1.9).





## ***VI. Discusión***

---



Las infecciones graves producidas por microorganismos Gram positivos continúan siendo un problema sanitario trascendente, que lleva asociada una alta mortalidad. El uso masivo de antimicrobianos, unido a la gran capacidad de algunas especies importantes como patógenos humanos, como *S. aureus*, para desarrollar o adquirir mecanismos de resistencia que afecten a diferentes familias de antimicrobianos, ha desembocado en un preocupante incremento de aislados clínicos multirresistentes, frente a los cuales, en ocasiones, las alternativas terapéuticas son muy limitadas. Una de las últimas alternativas frente a cocos Gram positivos, en especial frente a aislados multirresistentes, es daptomicina. Se trata de un fármaco frente al cual, además, se han descrito muy pocos casos de resistencia en aislados clínicos.

Daptomicina es un antimicrobiano bactericida con actividad frente a Gram positivos, incluyendo aislados multirresistentes. Este fármaco tiene ciertas cualidades que le diferencian del resto de antimicrobianos habitualmente utilizados en clínica. Se trata del primer lipopéptido cíclico aceptado para su uso en la práctica hospitalaria, y presenta un mecanismo de acción muy diferente al resto de fármacos que se encuentran en el mercado, dado que actúa sobre la membrana celular bacteriana. Se trata de una diana ya descrita en otras familias de fármacos, como las polimixinas (Schindler & Teuber, 1975; David & Rastogi, 1985; Gupta et al., 2009; Yu et al., 2015), pero tanto el espectro de actividad como el mecanismo de acción de daptomicina son completamente distintos.

La insensibilidad a daptomicina parece basarse en mecanismos complejos, y se ha asociado a la presencia de mutaciones en diferentes genes, normalmente relacionados con el metabolismo y la homeostasis de la membrana celular, pero también en algunos casos de la pared bacteriana (Friedman et al., 2006; Humphries et al., 2013; Fujimura et al., 2014). Pese a ello, apenas se ha descrito una relación causa efecto, en sentido estricto, entre mutaciones concretas o cambios en genes concretos y un incremento específico de las CIMs de daptomicina. Lo más próximo a esto es algún estudio de complementación en el que se demuestra que la sustitución de un gen *mprF* mutado por uno silvestre, revierte, al menos parcialmente, la CIM de daptomicina (Cameron et al., 2015; Gómez-Casanova et al., 2017)

El presente estudio se ha basado en 9 aislados clínicos de *S. aureus* insensibles a daptomicina. Todos los aislados clínicos excepto uno (St 9), tenían antecedentes de haber sido tratados con daptomicina. El intervalo de CIM de daptomicina osciló entre 2 y 4 mg/L en todos los casos excepto en la cepa St 2, que presentó una CIM de daptomicina de 1 mg/L. Pese a tratarse de una CIM que, en sentido estricto, entra todavía en el intervalo de sensibilidad, se incluyó de todos modos en el estudio ya que podía ofrecer información sobre la presencia o no de mutaciones en aislados considerados todavía como sensibles, y cómo podían influir, de existir, en el comportamiento y evolución de esos aislados. 4 de los 9 aislados clínicos fueron SASM y 5 SARM. Dos de estos SARM eran portadores del gen *mecA*, pero mostraban CIMs todavía en el intervalo de sensibilidad (1,5 mg / L y 2 mg / L respectivamente). Este comportamiento ya ha sido descrito en otros estudios con anterioridad como por Tenover et al., 1999 en estafilococos no productores de coagulasa. Este fenómeno podría deberse a alteraciones en las PBPs y / o PBP2a impidiendo una adecuada función, una baja producción o incluso, podría tratarse de un efecto secundario de adquirir una pared bacteriana muy modificada alterando su estructura y fluidez impidiendo que estas proteínas logren anclarse ademas a la membrana.

Es un hecho plenamente aceptado que la exposición repetida a un fármaco, máxime si es a concentraciones bajas, es un factor decisivo para la selección de resistencias a dicho fármaco. En realidad, el fármaco no suele comportarse como generador de resistencias, al menos de forma directa. Sí se ha descrito que los fármacos que dañan el ADN bacteriano, entre ellos algunos antimicrobianos, generan una repuesta SOS en la bacteria que incrementa la heterogeneidad genética en las poblaciones, probablemente en un intento de diversificar dichas poblaciones y generar subpoblaciones capaces de sobrevivir al agente agresor.

No obstante, como norma general, el antimicrobiano actúa fundamentalmente como selector de subpoblaciones portadoras de mutaciones que confieren resistencia al fármaco. Se trata habitualmente de mutaciones aleatorias, que habrían emergido igualmente en ausencia del fármaco, pero que no se hubieran hecho predominantes de no haber existido el fármaco como factor selector.

Era ya un hecho descrito que la generación espontánea de mutantes no sensibles a daptomicina, a partir de cepas sensibles, es extremadamente baja, en torno a  $1 \times 10^{-11}$ . Eso hace, en la práctica, extremadamente improbable la emergencia de resistencia en condiciones clínicas, siempre que la dosificación del fármaco sea la adecuada.

Existían muchos menos datos sobre el comportamiento a partir de cepas clínicas ya insensibles a daptomicina, o al menos con CIMs próximas al punto de corte. Los datos obtenidos en nuestro estudio corroboran este comportamiento también a partir de aislados ya insensibles a daptomicina o con CIMs limítrofes. El cultivo de estos aislados en condiciones basales, sin presión selectiva, y el enfrentamiento posterior de una muestra de estos cultivos a concentraciones de antimicrobianos netamente superiores a la CIM del aislado no reportó aislamiento de aislado resistente alguno. Esto sugiere que la generación de mutantes con alto nivel de resistencia, en condiciones basales, es muy reducida, o bien se trata de mutantes con una capacidad de competición con las cepas progenitoras muy baja, de modo que podrían generarse pero sin llegar a formar

una población estable, susceptible de ser detectada mediante la siembra en concentraciones significativamente mayores que la CIM del aislado original

No ocurrió lo mismo en la selección seriada, en la que se mantuvo de manera constante la presión selectiva del antimicrobiano. Si bien en algunos aislados no se obtuvieron mutantes resistentes tampoco bajo estas condiciones, en algunos se obtuvieron mutantes con un incremento significativo de la CIM de daptomicina, hasta alcanzar CIMs no descritas hasta el momento en aislados de *S. aureus*. Así, en el estudio de Friedman et al., 2006, que utiliza una estrategia de selección de mutantes por exposición seriada a daptomicina, similar a la utilizada en nuestro estudio, la CIM de daptomicina más alta alcanzada fue de 10 mg /L, mientras que alguno de los aislados obtenidos en este estudio alcanzan hasta los 256 mg/L. El comportamiento fue, no obstante, bastante heterogéneo entre unos aislados clínicos y otros a la hora de generar mutantes resistentes, sin que esté clara la causa. Este comportamiento tiene interés no sólo desde el punto de vista del estudio de los mutantes obtenidos, sino también en cuanto que, aun con limitaciones, se aproxima más a lo que podría ser una posible selección a lo largo de un tratamiento en condiciones reales, en el cual el microorganismo está sometido de manera continua al contacto con el antimicrobiano, y eventualmente, por mala dosificación o por localización de la infección en una zona con mala difusión, puede estar en contacto con concentraciones selectivas, que se sitúen en la ventana de selección de mutantes.

En este trabajo se seleccionaron 12 mutantes, todos ellos procedentes de dos aislados clínicos. Diez de los mutantes se obtuvieron a partir del aislado clínico St 1 (intervalo de CIMs de daptomicina: 8-256 mg/L) y 2 del aislado St 6 (CIM de daptomicina: 12 mg/L). En ambos casos se trataba de aislados de SARM con una CIM de daptomicina de 4 mg/L. Se desconoce la causa de la diferencia de selección o generación de mutantes entre unos y otros aislados. Aunque es cierto que los únicos aislados que generaron mutantes con alto nivel de CIM a daptomicina fueron SARM, y ningún SASM fue capaz de generar este tipo de mutantes, no todos los SARM mantuvieron este

comportamiento, por lo que debe haber alguna otra circunstancia más allá de la resistencia a metilicina que favorezca esta mayor frecuencia de selección. La baja frecuencia de aislamientos clínicos con estas características dificulta el estudio de poblaciones mayores que permite obtener conclusiones más terminantes, y probablemente el estudio del genoma completo de estos aislados ayude a comprender estas diferencias de comportamiento.

Esta diferencia de comportamiento entre los diferentes aislados clínicos afectó no sólo a su capacidad de generar o no mutantes resistentes, sino a los niveles de resistencia y al momento de selección. Así St 1 no sólo seleccionó un mayor número de mutantes *in vitro*, sino que logró alcanzar niveles de resistencia mucho más elevados y, como se puede observar en la Tabla 7 del apartado 2.2 de Resultados, ya a una concentración de daptomicina de 2 mg/L en el medio de crecimiento generó mutantes con alto nivel de resistencia. Por el contrario St 6, pese a generar mutantes con CIMs de daptomicina más bajas, éstos sólo se detectaron a partir de concentraciones en el medio de cultivo de 4 mg/L de daptomicina. El hecho de la existencia de cepas, dentro de la misma especie, con mayor y menor capacidad para generar mutantes resistentes a diferentes antimicrobianos es un hecho conocido en relación con otros microorganismos, como los beta-lactámicos, pero no había sido descrita en el caso de daptomicina.

Tanto el mecanismo de acción como los de resistencia de daptomicina parecen ser diferentes a los de otros antimicrobianos, incluyendo los más próximos estructuralmente como los glicopéptidos. De hecho, las únicas interacciones descritas, como las se dan con MRSA (*seesaw effect*) no repercuten en un aumento, sino en una reducción de la resistencia. Por otra parte, no se han descrito mecanismos de resistencia plasmídicos que pudieran cotransmitirse con mecanismos de resistencia a otros antimicrobianos. En consecuencia, a priori, no era esperable encontrar una asociación significativa entre la resistencia a daptomicina y la resistencia a otros antimicrobianos. En efecto, en nuestro estudio, el desarrollo de mayores niveles de

resistencia a daptomicina no implicó una reducción de sensibilidad al resto de fármacos probados frente a los aislados clínicos.

Solamente en circunstancias muy concretas se ha descrito algún tipo de asociación entre el comportamiento frente a vancomicina y a daptomicina. Se trata además de circunstancias en las que se desconoce exactamente la relación causa efecto entre ambas circunstancias. Así Cui et al., en 2006, observan que algunos aislados con alto nivel de resistencia a vancomicina, presentaban una menor sensibilidad a daptomicina. Además, se ha observado que en infecciones por SARM causadas por cepas con resistencia intermedia a vancomicina, y que previamente han recibido tratamiento con vancomicina, existe una mayor probabilidad de fracaso clínico cuando son tratados con daptomicina (Mwangi et al., 2007; Howden et al., 2010).

En nuestro caso no fue posible disponer de los aislados previos sensibles a vancomicina, por lo que es difícil valorar esta circunstancia, pero sí es cierto que las CIMs de vancomicina apenas se modifican en los mutantes obtenidos *in vitro*, a pesar de los incrementos de las CIM de daptomicina, en ocasiones muy llamativos. Sin embargo, sí se produjeron cambios en las CIMs de otros glicopéptidos de más reciente desarrollo. Inesperadamente, los resultados obtenidos para DAL fueron muy diferente al resto de antibióticos puestos a prueba donde apenas había diferencias entre los aislados clínicos y sus mutantes obtenidos *in vitro*. Sólomente un aislado clínico, St 3, tuvo una CIM de dalbavancina en el límite del intervalo de sensibilidad, (0,1 mg/L), mientras el resto fueron todos sensibles. Sin embargo, en dos de los mutantes obtenidos *in vitro* se detectó un incremento significativo del grado de insensibilidad a dalbavancian en comparación con su aislado parental. Así ST 1.8 (CIM de daptomicina >256 mg/L) pasó a tener una CIM de dalbavancina de 0,1 mg/L, frente a 0,064 mg/L de su aislado parental St 1, aunque se mantiene todavía dentro del rango de sensibilidad, y St 6.1 (CIM de daptomicina 12 mg/L) alcanzó una CIM de dalbavancina de 0,2 mg/L, frente a la CIM de 0,032 mg/L de su aislado parental St 6.

Hay que recordar que el mecanismo de acción de dalbavancina es similar al de vancomicina, actuando sobre la síntesis de la pared bacteriana, y en concreto sobre el dipéptido D-Ala-D-Ala (Leuthner et al., 2016). Los mecanismos de resistencia que pueden afectar a este antimicrobiano son, en teoría, mecanismos mucho más próximos a los que afectan a vancomicina, como son los genes del grupo *van*, de codificación plasmídica en la mayor parte de los casos, y que alteran su diana en la pared celular (Xydalba, 2015; Smith et al., 2015; Tatarkiewicz et al., 2016), o el engrosamiento del péptidoglicano que se asocia habitualmente a la resistencia intermedia a glicopéptidos. Sin embargo, al igual que ocurre en el estudio de Peleg et al., 2012, ninguno de los mutantes obtenidos *in vitro* aumentó su CIM de vancomicina al adquirir alto grado de resistencia a daptomicina, por lo que es altamente improbable que la reducción de la sensibilidad a dalbavancina esté relacionada con estos mecanismos. Es más probable que alteraciones en la composición, en la fluidez y en la carga de la pared, que sí se relacionan con las mutaciones detectadas en este microorganismo y asociadas a resistencia a daptomicina, pudieran estar en el origen de esta insensibilidad, por lo que es importante un estudio más detallado de este aislado que pudiera explicar su comportamiento.

Por el contrario, los mecanismos descritos anteriormente sí podrían estar en el origen del comportamiento del mutante St 6.1, al combinar su insensibilidad a dabavancina con la resistencia intemedia a vancomicina. En este caso es mucho más plausible la posibilidad de un engrosamiento de la pared celular que pudiera afectar tanto a vancomicina como a dalbavancina, aunque no necesariamente a daptomicina, que seguramente debería adquirir resistencia a través de otros mecanismos, presentes de hecho en este aislado. Obviamente, siempre queda la posibilidad de un mecanismo de resistencia diferente a los descritos, que pudiera afectar simultáneamente, o no, tanto a los glicopéptidos clásicos como a los de nuevo desarrollo y a daptomicina, y que también deberá ser estudiado.

Por otra parte, la baja frecuencia en el momento actual de aislados clínicos resistentes a uno y otro antimicrobiano, y más aún a ambos, supone una dificultad adicional para el estudio de potenciales mecanismos de resistencia asociados, ya que han de estudiarse casi exclusivamente en mutantes obtenidos *in vitro* que, como se ha demostrado en el caso de daptomicina, no necesariamente son idénticos a los presentes en aislados clínicos.

En lo que se refiere a la sensibilidad a otros antimicrobianos, la presencia del fenómeno *seesaw* fue también heterogénea en función de los aislados clínicos de origen. Mientras las dos mutantes de St 6 reversionaron su CIM de oxacilina, tan sólo en una de las 10 mutantes de St 1 (St 1.3) se observó dicho efecto. St 6.1 y St 6.2 pasaron de ser resistentes a oxacilina, con una CIM de 4 mg/L, a un fenotipo sensible con unas CIMs de 0,19 y 0,25 mg/L respectivamente. En el caso de St 1.3, revirtió parcialmente su grado de sensibilidad, pasando de ser resistente a oxacilina con una CIM de 12 mg/L a una CIM de 4 mg/L que, si bien está todavía dentro del intervalo de resistencia, es netamente inferior a la original.

Como se ha indicado anteriormente, dos de los aislados clínicos con los que se trabajó (St 4 y St 7) partían de una CIM de oxacilina dentro del intervalo de sensibilidad, (1,5 - 2 mg/L) pero se comprobó genotípicamente que se trataba de aislados portadores de PBP2'. Este comportamiento hace pensar que, probablemente, estos aislados hayan revertido de manera previa su grado de sensibilidad a oxacilina, al adquirir las mutaciones que condicionan su insensibilidad a daptomicina, y se trate por tanto de un efecto *seesaw* en el que no disponemos del aislado inicial.

Un extremo de interés sería averiguar si el efecto *seesaw* se trata de un fenómeno aislado, o si es un fenómeno cuantitativo que se agudiza a medida que aumentan las CIMs de daptomicina y su repercusión terapéutica, es decir, en qué medida esta reducción de las CIMs de oxacilina y su salto al intervalo de "sensible" es simplemente

un hallazgo *in vitro*, o tiene repercusión e la sensibilidad real, de modo que estos aislados volverían a ser susceptibles de tratamiento con beta-lactámicos.

En lo que al perfil genético respecta, los resultados relacionados con los genes *rpoB* y *mprF* eran previsibles, al menos desde el punto de vista cualitativo, ya que en la mayoría de los casos, en especial en cepas clínicas, el aumento de las CIMs de daptomicina se ha correlacionado con la presencia de mutaciones en estos genes (Friedman et al., 2006; Peleg et al. 2012, Song et al., 2013). Este comportamiento guarda, además, una correlación lógica con la función de las proteínas codificadas por dichos genes. Uno de los datos más llamativos en lo que respecta al gen *mprF*, es el alto número de cambios detectados en la mayor parte de los aislados, muy superior a los descritos en otros estudios.

Por otra parte, las mutaciones en S295 y en T345, que se encuentran entre las más frecuentemente descritas (Friedman et al., 2006; Cameron et al., 2015; Peleg et al., 2012), aparecen sólo en, respectivamente, uno (St 8) y dos (St 4 y St 7) de los aislados en estudio, mientras otras mutaciones que no habían sido descritas previamente (N160D, A171V, L174F, Y194F, V223A...) aparecen en todos ellos, excepto St 5. La única mutación, P314T, que presentó St 5 y que también se detectó en St 1 había sido descrita previamente por Friedman et al., 2006. En el caso de *mprF*, la asociación entre las mutaciones en este gen y la resistencia a daptomicina no es sólo una asociación estadística explicada por la función de la proteína codificada, ya que se ha demostrado que la inactivación de este gen mutado es capaz de revertir, al menos parcialmente, dicha resistencia (Kristian et al., 2003).

El otro gen más altamente relacionado con la insensibilidad a daptomicina es *rpoB*, en el que también aparecían cambios en las cepas estudiadas. En todos los aislados se detecta la misma mutación, a excepción de St 3, que posee una mutación adicional. Las mutaciones encontradas en este gen son, no obstante, distintas a las descritas previamente tanto en aislados clínicos como en cepas insensibles obtenidas *in vitro*.

Estos datos contradicen datos previos publicados por otros autores (Friedman et al., 2006; Peleg et al. 2012; Song et al., 2013). Friedman et al. (2006) detectaron mutaciones en *rpoB* sólo en cepas seleccionadas *in vitro*, pero no en aislados clínicos, mientras Song (Song et al., 2013) y Peleg (Peleg et al., 2012) no los encontraron en cepas seleccionadas *in vitro*, y los detectaron en cepas clínicas sólo de manera esporádica. Además, aunque normalmente se han situado en un segundo plano, en este estudio también se detectaron cambios en el gen *rpoC* en todos los aislados, con la única excepción de St 5.

Los datos obtenidos en este estudio fortalecen la hipótesis de que, en condiciones de uso clínico, la emergencia de insensibilidad a daptomicina se asocia, sobre todo, a modificaciones en genes relacionados con la homeostasis de la membrana citoplásmica y con la actividad de la RNA polimerasa. En el caso del gen *mprF* esto estaría relacionado con el cambio de composición de fosfolípidos y de la carga positiva de la membrana en cepas de *S. aureus* resistentes a daptomicina (Yang et al., 2010), que condiciona resistencia tanto a este antimicrobiano como a otros péptidos catiónicos. Además, Peleg (Peleg et al., 2012) profundizó en ello y argumentó que, las mutaciones en el extremo amino-terminal, afectarían a los dominios transmembrana de la proteína, mientras los cambios en el extremo carboxi terminal de *mprF* darían lugar a un incremento en la lisinilación de la proteína y en su translocación hacia la parte exterior de la membrana, condicionando así un aumento de la carga positiva que supondría un rechazo eléctrico hacia la molécula de daptomicina, que tendría así más dificultades para enclavarse en la membrana. Las mutaciones descritas en este estudio afectan tanto a los dominios de translocación como a los de lisinilación (Peleg et al., 2012), y por tanto es previsible que afecten a las dos funciones del enzima.

Se ha observado que en el gen *walkR*, un regulador del metabolismo de la pared celular y de la virulencia en *S. aureus*, *B. subtilis* y *S. pneumoniae* (Dubrac et al., 2008), la adquisición de mutaciones en su secuencia interviene en la capacidad de adquirir resistencias, por ejemplo, a vancomicina (Howden et al., 2011). Sin embargo, pese a

que también se ha relacionado la reducción de sensibilidad a daptomicina con la presencia de mutaciones en este gen, asociadas o no a mutaciones en *mprF* y en *agrA* (Howden et al., 2011; Song et al., 2013), en nuestro estudio no hemos identificado cambios en *walkR* en ninguno de los 9 aislados clínicos. En éste estudio, también se examinaron otros genes como *agrA*, *clpP*, *pnpA* y *prs*, en los que no se detectó ningún cambio en su secuencia, pese a haberse relacionado en algún momento con la insensibilidad a daptomicina.

Por el contrario, la proteína hipotética MW1109, en cuyo gen solamente Song et al. (2013) había descrito hasta ahora mutaciones asociadas a insensibilidad a daptomicina, en cepas seleccionadas *in vitro*, mostró cambios en 8 de los 9 aislados clínicos objeto de estudio, siendo St 6 el aislado con mayor número de cambios. A diferencia de St 6, la otra cepa que también logró seleccionar mutantes con alto grado de resistencia St 1, tan sólo mostró 2 cambios dentro de éste gen. Como en los casos anteriores, las mutaciones que se encontraron fueron diferentes a las descritas. Sin embargo, debido a que se desconoce la función de esta proteína, no se puede conocer cual es realmente el papel que puedan jugar en la sensibilidad a daptomicina, e incluso si realmente existe una relación causa/efecto.

A diferencia de los resultados obtenidos con los anteriores genes sobre todo *mprF* y la familia *rpo*, los datos obtenidos de la secuenciación de los genes *cls*, que codifican una cardiolipina sintasa, fueron menos esperados, en especial en lo que se refiere al gen *cls1*. El gen más mencionado en la literatura, aunque en menor medida que *mprF* y *rpoB*, es *cls2* (Peleg et al., 2012), en el que tan sólo se detectaron 4 mutaciones, no descritas previamente, en 8 de los 9 aislados clínicos siendo dos de ellas comunes para todas las cepas. Sin embargo, en el gen *cls1*, no considerado en otros estudios como asociado a insensibilidad a daptomicina, encontramos una gran cantidad de mutaciones, sólo comparables, al menos cuantitativamente, a lo hallado en relación con *mprF*. Tanto *cls1* como *cls2* pueden estar asociados a la insensibilidad a daptomicina observada en los aislados estudiados; casi el 90% de ellos mostraban

mutaciones en al menos uno de estos genes. Se trata además de genes relacionados con la biosíntesis de fosfolípidos, dado que la cardiolipina sintetasa que codifican produce una cardiolipina y una molécula de glicerol a partir de dos moléculas de PGN (Short & White et al., 1972). Estos datos indican que la importancia de esta molécula es bastante evidente, tanto que se ha observado que en fase estacionaria la prevalencia de cardiolipina en *S. aureus* es mayor que la propia molécula que la constituye, el PGN (Koprivnjak et al., 2011). Las mutaciones en estas zonas podrían producir un efecto sumatorio con las alteraciones observadas en *mprF*, debido a que se reduciría o incluso se suprimiría la carga negativa aportada por la cardiolipina, disminuyendo la atracción entre daptomicina y la membrana bacteriana (Camargo et al., 2008). No obstante, como es el caso de las mutaciones observadas en otros genes, no hay correlación clara entre las mutaciones aparecidas y el nivel de resistencia adquirido. Existen aislados que con el mismo perfil de mutaciones adquieren CIMs de daptomicina muy diferentes, del mismo modo que se pueden adquirir altos niveles de insensibilidad sin apenas mutaciones en los genes principales asociados hasta ahora a resistencia. Los datos obtenidos sugieren que la insensibilidad a daptomicina se puede adquirir por diversas vías, a través de mutaciones en diversos genes, de modo que numerosas combinaciones de mutaciones en diferentes genes pueden acabar dando lugar al mismo resultado.

Estudios genómicos sobre estafilococos no sensibles a daptomicina (Friedman et al., 2006; Peleg et al., 2012), han detectado grandes diferencias entre aislados clínicos no sensibles y mutantes no sensibles obtenidos *in vitro*. Sin embargo, en relación a los mutantes obtenidos *in vitro* con alto grado de resistencia a daptomicina en este estudio, es sorprendente que, a pesar de los notables incrementos de CIM encontrados en algunas ocasiones, no se encontraron diferencias con los aislados clínicos de los que proceden, a excepción del gen *cls2*. La adquisición de resistencia a daptomicina, especialmente en aquellas cepas que consiguieron alcanzar niveles de CIM desconocidos hasta el momento, podía sugerir la presencia de un mayor número de cambios. Sin embargo, de nuevo se observa una gran heterogeneidad. El 90% de los

mutantes obtenidos a partir de St1 presentaron algún cambio adicional en los genes estudiados, pero los procedentes de St6 mostraron una secuencia idéntica a su predecesora. Las mutaciones obtenidas fue, en 8 de los 10 mutantes, F60S, y en un solo caso T33N. En ningún caso una cepa presento ambas mutaciones y no se encontró relación entre la adquisición de estos cambios y la nueva CIM de daptomicina que adquirieron. Estos datos evidencian que la presencia de una u otra mutación no implica la facilitación de la capacidad de adquisición de mayores niveles de CIM. Ambas mutaciones habían sido ya descritas previamente. Peleg et al., 2012 detectaron sólo la mutación T33N en 2/9 mutantes obtenidas *in vitro*, resultado similar a nuestras cepas; la mayoría no adquirió ninguna mutación, mientras en nuestros mutantes sólo uno no adquirió ningún cambio; además, Peleg et al. registran la mutación F60S tan sólo en un aislado clínico, a diferencia de nuestros resultados, donde hallamos dicho cambio en la mayoría de mutantes obtenido *in vitro*, y en ningún caso en los aislados clínicos estudiados.

Sin embargo, se determinó un comportamiento diferente en los tres mutantes que no adquirieron ningún cambio en *cls2*. Aparentemente, la presencia de mutaciones en F60 o T33 podría asociarse a la no reducción de sensibilidad a oxacilina, dado que sólo las cepas que no adquirieron cambios en dicho gen, reversionaron su CIM para dicho antimicrobiano.

En el caso de la cepa St 5, no se detectaron tampoco cambios en los genes *cls1* y *cls2*, por lo que la no sensibilidad a daptomicina, salvo implicación de mecanismos hasta ahora desconocidos, debe estar asociada a las únicas mutaciones halladas en *mprF* y *rpoB*. Algunos de los primeros estudios ya encuentran alguna cepa con estas características (Pillai et al., 2007), y más recientemente Song (Song et al., 2013) describe una cepa no sensible a daptomicina seleccionada *in vitro*, que no presenta mutaciones en *mprF*, aunque sí en *walk* y en *clpP*. Uno de los datos llamativos entre los resultados obtenidos en este estudio es el hecho de que, basándonos sólo en estos resultados, parecería que lo excepcional es el comportamiento de la cepa St 5. Sin

embargo, si se observan los estudios publicados hasta el momento, este comportamiento, la presencia de un pequeño número de mutaciones en unos cuantos genes específicos, parece el comportamiento más habitual (Friedman et al., 2006; Peleg et al., 2012), en especial en cepas clínicas, mientras lo excepcional sería el gran número de mutaciones combinadas que se observan tanto en nuestros aislados clínicos como en los mutantes seleccionados *in vitro*.

La única cepa de las incluidas en este estudio que podemos considerar sensible a daptomicina, ya que presenta una CIM = 1 mg/L, St 2, no presentó un perfil genético diferente al resto con respecto a los genes analizados. Ello abre otro punto de discusión importante, ya que este hallazgo implica que cepas incluidas en el intervalo de sensibilidad presentan todas las alteraciones genéticas hipotéticamente requeridas para convertirse en resistente, por lo que esta resistencia podría emerger en cualquier momento, de modo que sería muy útil estudiar en qué circunstancias estos aislados pueden desarrollar resistencia clínica, y qué condiciona este paso, ya que los datos obtenidos podrían eventualmente obligar a modificar los puntos de corte.

Por otra parte, esto reafirma la heterogeneidad que se observa de forma general en relación con la resistencia a daptomicina, y refuerza la idea de que todas estas mutaciones posiblemente sean condición necesaria, pero no suficiente, para desarrollar resistencia, y que deben existir otros factores hasta ahora desconocidos, que confluyan con estas mutaciones para acabar llevando a CIMs de daptomicina por encima del punto de corte.

El perfil de mutaciones múltiples en *mprF* avala que probablemente se trate de cepas con una cierta relación filogenética; sin embargo, no existen dos cepas con el mismo perfil de mutaciones, lo que avala que, incluso en el caso de las cepas procedentes de Badajoz, no exista clonalidad entre los aislados. La gran variedad de mutaciones obtenidas y sus diferencias con las descritas avalan que patrones muy distintos de

mutación, al menos en algunos de estos genes, pueden tener una consecuencia final muy similar, al menos en lo que a la actividad de daptomicina se refiere.

Los datos obtenidos en este estudio permiten asumir que, hasta el momento, no se puede aceptar ningún patrón como asociado de forma inequívoca a la resistencia a daptomicina, al menos si nos centramos en los genes más relacionados en la literatura. En cambio, de acuerdo a los presentes resultados, se puede afirmar que es muy probable que el acúmulo de cambios en ciertos genes relacionados con la membrana, y que seguramente implican cambios en la permeabilidad de la membrana y en la polaridad de la misma, dan como resultado la no sensibilidad a daptomicina. Posiblemente ello puede ocurrir mediante la acumulación de un pequeño número de cambios con una alta repercusión en la fisiología de la membrana, como sería el caso de St 5, o acumulando un alto número de cambios con menor repercusión individual, pero que acaben teniendo un resultado final similar. La secuenciación completa de estos microorganismo probablemente aportará información adicional valiosa, y dará una idea de conjunto más ajustada de los cambios globales en estos microorganismos, aunque estudios previos realizados por otros autores apenas encuentran cambios en genes distintos a los estudiados por nosotros (Song et al. 2013).

Con frecuencia, la adquisición de factores que suponen un incremento de la patogenicidad de un microorganismo o un aumento de su resistencia a los antimicrobianos, supone una alteración en la fisiología del microorganismo que repercute en una reducción de la capacidad del microorganismo para competir con otros de la misma especie en condiciones no selectivas (*fitness*) (Nielsen et al., 2012; Schroeder et al., 2017), y que reduce la capacidad de supervivencia del microorganismo en circunstancias en que la capacidad adquirida no suponga una ventaja frente a otros microorganismos (Beceiro et al., 2013).

Con el fin de evaluar el coste en *fitness* que tiene para estos microorganismos la adquisición de las alteraciones fisiológicas que condicionan su insensibilidad a daptomicina, se evaluaron sus curvas de crecimiento. Para obtener esta información

hubo que estudiar tanto sus ritmos de crecimiento de forma individualizada, lo que se ha denominado como *fitness* sin competencia, como en presencia de un competidor de la misma especie pero sensible a daptomicina (*fitness* en competencia). Aunque los resultados más esclarecedores se observan en el segundo de los experimentos mencionados, en el primero ya se pudo apreciar la repercusión de las alteraciones fisiológicas condicionadas por las mutaciones de que son portadores en la velocidad de replicación de los microorganismos insensibles a daptomicina. El aislado clínico St 5, portador de un número de mutaciones mucho menor que el resto, presentó un *fitness* bastante similar a la cepa control, probablemente asociado a una menor alteración de su fisiología, que hace que su curva de crecimiento sea similar a la de la cepa control. Sin embargo, los otros 3 aislados clínicos (St 4, St 6, St 8) mostraron resultados más variables, reduciendo su tasa de crecimiento como se ha descrito previamente (Li et al., 2017). El mayor número de cambios significativos en el genoma (St 6, con un total de 62 cambios), se asoció al peor *fitness* entre las cepas estudiadas. St 4 y St 8 presentaron un número de mutaciones muy similar (53 y 50 cambios respectivamente), pese a lo cual St 4 presentó un *fitness* discretamente superior. No obstante, en comparación con St 6, los otros dos aislados clínicos presentaron una mejor curva de crecimiento transcurridas 24 h de incubación, en especial St 4. Probablemente no todas las mutaciones tengan la misma repercusión en el *fitness*, lo que justifica estas diferencias. Por otra parte, al no haberse estudiado el genoma completo, no se puede descartar la existencia de otras mutaciones en *loci* no estudiados que puedan tener también repercusión sobre el *fitness* de los microorganismos. No obstante, la asociación entre insensibilidad a daptomicina y deterioro del *fitness* viene avalada por el hecho de que las cepas mutantes obtenidas *in vitro* en este trabajo, muestran un pésimo *fitness* en comparación no sólo con la cepa control, sino también de los aislados clínicos utilizados en este estudio.

Un hallazgo interesante en relación con los mutantes obtenidos *in vitro* a partir de St 6, fue que St 6.1, insensible a dalbavancina, presentó un *fitness* prácticamente igual al de su cepa parental, mientras St 6.2, sensible a dalbavancina, presentó un pésimo *fitness*.

Por otra parte, esta lentitud de crecimiento se observa fenotípicamente incluso en su velocidad de crecimiento de colonias en placa. En el punto 4.1 del apartado de Resultados se puede observar cómo incluso en el caso de algunos de los aislamientos con un *fitness* menos deteriorado, como St 1.10, la formación de colonias en agar es significativamente más lenta que la de sus predecesoras.

Sin embargo, las diferencias más significativas se observaron cuando el estudio de *fitness* se llevó a cabo en competencia con una cepa tipo sensible a daptomicina. El crecimiento de los aislados clínicos y de los mutantes obtenidos *in vitro* junto con una cepa control sensible, en proporción 1:1, llevó a una drástica reducción, cuando no a la total desaparición de la cepa insensible a daptomicina en un corto periodo de tiempo. Ello indica que los cambios seleccionados en los microorganismos y aparentemente vinculados a su insensibilidad a daptomicina, implican toda una serie de cambios fisiológicos que dificultan enormemente al microorganismo sobrevivir sin el factor selectivo que supone la presencia del antimicrobiano.

Algunos de los aislados consiguieron subsistir, aunque su proporción con la población silvestre se redujo drásticamente (13:1 en St 4 y 10:1 en St 5). Como era previsible, estos microorganismos coincidieron con los que presentaron un mejor *fitness* individual.

De nuevo la cepa clínica St 5 mostró un comportamiento peculiar, al presentar un *fitness* individual prácticamente idéntico al de la cepa tipo sensible, en ausencia de competencia. Sin embargo, en competencia con una cepa tipo sensible, la relación de poblaciones pasó en poco tiempo de 1:1 a 1:10 lo que supone que, aunque los cambios no parecen afectar significativamente a su velocidad de crecimiento de forma aislada, sí repercuten a la hora de competir con otros microorganismos que no presenten esos cambios.

En conjunto, los datos obtenidos sugieren que, de forma general, los cambios registraos en estos microorganismos, probablemente por las alteraciones fisiológicas de su membrana celular, reducen notablemente la velocidad de crecimiento y multiplicación de estos microorganismos respecto a un estafilococo sensible. Esto se acentúa cuando los microorganismos tienen que competir, incluso en el caso de mutantes que presentan una velocidad de crecimiento relativamente normal de manera aislada. En principio, este comportamiento hay que juzgarlo como un factor favorable de cara a la posible difusión de la resistencia a daptomicina, ya que todo sugiere que las poblaciones insensibles a daptomicina son poblaciones claramente recesivas, que tienden a reducirse y a desaparecer tan pronto desaparece el factor de selección positivo. De este modo, en condiciones clínicas, es probable que la aparición de mutantes insensibles a daptomicina esté habitualmente vinculada a un uso intensivo de fármaco, y que una racionalización de su uso debería repercutir rápidamente en su reducción o desaparición.

Otra conclusión importante que se obtiene de nuestros resultados es que la reducción del *fitness* es un hecho básicamente cualitativo, de modo que presentar valores de CIM de daptomicina de 4 mg/L o mucho más elevados, no repercute significativamente en el *fitness*, que es malo en todos los casos.

Un factor de patogenicidad fundamental en estafilococos es la capacidad para formar biopelículas que les permitan adherirse a diferentes superficies. La evidencia surgida del estudio anterior, junto con los datos ya existentes en otros microorganismos, como *S. pneumoniae*, de que la adquisición de resistencia a antimicrobianos reduce su patogenicidad (en el caso de *S. pneumoniae*, se ha demostrado que la adquisición de resistencia a determinados antimicrobianos reduce significativamente la capacidad del microorganismo para producir bacteriemia) condujo al análisis de la formación de biopelículas en las cepas que dieron lugar mutantes con alto grado de resistencia a daptomicina con respecto a su cepa parental. Como ya se mencionó en el apartado 2.3 de la Introducción, esta formación se basa en una estructura organizada producida por

la propia especie que le proporciona la capacidad de adherirse a diferentes superficies (Siala et al., 2014) otorgándoles resistencias frente algunos antimicrobianos, al actuar como una barrera que impide al antimicrobiano interactuar con los microorganismos (Mah & O`Toole, 2001; Spoering & Lewis, 2001; Reffuveille et al., 2017), e incluso actuando como defensa frente al estrés ambiental (Kim et al., 2018).

Los resultados de este estudio no muestran la composición de la matriz que conforman las biopelículas, pero sí muestran cómo para nuestros mutantes, la adquisición de resistencia a daptomicina no lleva a una disminución en su capacidad para la formación de biopelículas, sino que presentan una proporción bastante similar a la cepa parental de la que proceden los mutantes e incluso, en algunos casos, claramente superior.

Se han relacionado varios genes con la formación de biopelículas. Sin embargo, en este estudio sólo se ha estudiado, en relación a esta capacidad, el gen *agrA*, el cual no se ha visto afectado en ninguna de las cepas estudiadas. Se sabe, que una represión de este gen es necesaria para la formación de biopelículas (Archer et al., 2011; Reffuveille et al., 2017); no obstante, existen más genes relacionados con la regulación de su producción como *ica*, *sarA*, *sigB*... (Archer et al., 2011), por lo que el estudio detallado de la formación de biopelículas es mucho más complejo. Sin embargo, nuestro datos sugieren, desde el punto de vista fenotípico, que las alteraciones de la membrana celular asociadas a la resistencia a daptomicina no afectan a la baja a este factor de patogenicidad en concreto, que puede quedar inalterado o incluso potenciarse en algunos casos.

Llegados a éste punto, realizar un estudio fenotípico se ve claramente necesario. Debido a que la zona más relacionada con la no sensibilidad a daptomicina en *S. aureus* es la membrana plasmática bacteriana, la parte del estudio en la que se centró el análisis fue en la composición lipídica y de ácidos grasos en esta zona. Los resultados permitieron comprobar desde el punto de vista fenotípico lo que se podía intuir desde

el punto de vista fenotípico. Dado que la cepa que logró seleccionar mutantes con mayor grado de resistencia a daptomicina fue St 1, la evaluación de los cambios a nivel de membrana que podrían aparecer en *S. aureus* se realizó sobre ella y algunas de sus mutantes.

*S. aureus* presenta en su membrana fosfolípidos, fosfatidilglicerol y cardiolipina (Li et al., 2017), lugar donde daptomicina se une y tiene su actividad antimicrobiana. Por tanto, tiene sentido que los principales genes afectados sean precisamente aquellos que están vinculados a la formación de dichas moléculas. El cambio de composición de la membrana en cepas no sensibles a daptomicina ya ha sido estudiado por autores como Berti et al., 2012, que observaron un mayor engrosamiento, fluidez y una disminución de la carga negativa. Como se pudo observar en el apartado 6.2 de Resultados, en todos los caso hay una disminución del PG de la mutante obtenida *in vitro* con respecto a la cepa parental, extremo ya planteado como uno de los mecanismos posibles de resistencia a daptomicina (Miller et al., 2016). Este comportamiento es lógico dado que la primera interacción que presenta daptomicina es con el calcio y posteriormente con PG (Muraih etl a., 2011), por lo que si éste disminuye, también lo hará su interacción con daptomicina. Sin embargo, encontramos comportamiento muy diferentes para los DPG y LPG, ya que cuando aumenta uno, disminuye el otro y viceversa. En las que aumentan los lípidos con respecto a la cepa parental, explicaría una posible mayor síntesis con aumento de la carga positiva en la carga externa de la membrana, dado que los genes principalmente relacionados con este comportamiento, *mprF* y *cls*, muestran numerosas mutaciones. Sin embargo, no explican cómo cepas con CIMs tan elevadas como St 1.8, reducen todos los lípidos que estudiamos con respecto a su cepa original, a excepción de los GL, componente que aumentó en todas ellas.

A pesar de ello, claramente se ve una alteración tanto de lípidos como de ácidos grasos, ambos determinantes del grado de fluidez de la membrana. Se ha relacionado una mayor fluidez en las membranas de aislados clínicos no sensibles a daptomicina con

dicha insensibilidad (Mishra et al., 2009). En este caso, uno de los genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos es el gen *walk*, en el que ninguna de nuestras cepas presentó cambios.

Apenas se encuentran diferencias entre St 1 y sus mutantes con respecto a los ácidos grasos estudiados, que mantienen siempre la misma proporción, excepto St 1.9, que muestra una proporción similar de los ácidos grasos *iso* y los normales. St 1.9 precisamente fue el mutante que más redujo su cantidad de PG y LPG y más aumento sus DPG. Estos datos sugieren que la capacidad para adquirir mayor fluidez de membrana, carga positiva y engrosamiento de la pared celular bacteriana puede adquirirse de forma diferente, incluso afectando a las mismas zonas; sin embargo, se ha comentado que no siempre existe una relación entre la no sensibilidad a daptomicina y los cambios en los índices de insaturación de ácidos grasos, longitudes de las cadenas más largas o cambios en cadenas ramificadas (Jones et al., 2008; Mishra & Bayer, 2013). Por lo tanto, principalmente, son las moléculas lipídicas quienes estarían afectando en mayor medida y por lo tanto, condicionarían fundamentalmente la no sensibilidad a daptomicina.

Para concluir, este trabajo deja un gran número de líneas de estudio abiertas, aún por resolver, dado que la resistencia a daptomicina es mucho más compleja que otros fármacos. Es la primera vez que se consigue aislar cepas mutantes con tan elevado grado de resistencia a daptomicina, por lo que se trabajó con un aislados con un gran potencial y que proporcionarán muchas respuestas importantes, especialmente para el entorno hospitalario. Un estudio de secuenciación completa ofrecería mucha más información que enriquecería los datos aportados en ésta memoria y lograrían entender mejor ciertos comportamientos del *fitness* e incluso de la formación de biopelículas. Además, como ya se ha comentado, un estudio *in vivo* con las cepas obtenidas *in vitro* nos darían más información de cual sería el comportamiento real de ellas en la práctica, ya que como ocurre en muchas ocasiones, los experimentos *in vivo* difieren de los resultados obtenidos posteriormente *in vitro*. Los resultados indican

que los principales genes relacionados claramente están afectando a la estructura de la bacteria. Sin embargo, los datos obtenidos de los mutantes indican que deben de existir otros cambios aún no relacionados que proporcionan dicho comportamiento.

## *VII. Conclusiones*

---



1. La resistencia a daptomicina, en los aislamientos clínicos estudiados, se asocia fundamentalmente a mutaciones en tres genes:
  - a) *mprF*, que codifica una lisil fosfatidil glicerol sintetasa relacionada con la cantidad y situación en la membrana de moléculas de lisil fosfatidil glicerol y, en consecuencia, con la carga de dicha membrana.
  - b) *rpoB*, que codifica una RNA polimerasa.
  - c) *cls1* y *cls2*, que codifican una cardiolipina sintasa, relacionada con el metabolismo de fosfolípidos de membrana.
  
2. En nuestro caso, el gen *mprF*, *cls1* y *cls2* muestra una cantidad de mutaciones muy superior a las referidas en otros estudios; muchas de las mutaciones halladas no habían sido descritas previamente.
  
3. Se detectan mutaciones en el gen *mw1109*, que codifica una proteína hipotética donde previamente se habían descritos mutaciones asociadas a la reducción de sensibilidad a daptomicina. No obstante, al desconocerse el papel de la proteína a la que dan lugar, no es posible evaluar su grado de implicación real en la resistencia a daptomicina.
  
4. La capacidad de obtener *in vitro* aislados con alto nivel de insensibilidad a daptomicina, siguiendo el método establecido en este estudio, quedó reducido a la presencia de dos características: ser SARM con previa insensibilidad al antimicrobiano con una CIM de 4 mg/L.

5. El aumento del grado de resistencia a daptomicina no está vinculado a un mayor número de mutaciones en los genes estudiados. Es probable que otros genes no estudiados hasta el momento se encuentren implicados en el alto nivel de insensibilidad.
6. La adquisición de ciertas mutaciones en *cls2* podrían interferir en la pérdida de sensibilidad a meticilina.
7. La adquisición de mayor grado de resistencia a daptomicina no implica una reducción de la formación de *biofilm*, que en algunos casos podría ser incluso mayor que en su cepa parental.
8. Los estudios de *fitness* demuestran que la mayor parte de los aislados insensibles a daptomicina tienen una velocidad de multiplicación muy inferior a las cepas progenitoras, con una capacidad de competencia con cepas silvestres muy reducida.
9. No encontramos diferencias significativas en la composición de ácidos grasos entre mutantes de alto grado de resistencia a daptomicina y su aislado clínico parental; sin embargo, observamos mayor variabilidad y heterogeneidad en la composición de lípidos de la pared entre los mutantes.

## *VIII. Referencias*

---



- 
- **68.ª Asamblea Mundial de la Salud.** 18–26 de mayo de 2015. Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. Organización Mundial de la Salud. Recuperado de: [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA68/A68\\_ACONF1Rev1-sp.pdf?ua=1&ua=1](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA68/A68_ACONF1Rev1-sp.pdf?ua=1&ua=1)
  - **Aksoy D. Y. & Unal S.** 2008. New Antimicrobial Agents for the Treatment of Gram Positive Bacterial Infections. *Clinical Microbiology and Infection.* 14 (5): 411–420.
  - **Alborn W. E., Allen N. E. & Preston D. A.** 1991. Daptomycin Disrupts Membrane Potential in Growing *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 35 (11): 2282–2287.
  - **Alonzo F. & Torres V. J.** 2014. The Bicomponent Pore - Forming Leucocidins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR. 78 (2): 199-230.
  - **Amagai M., Yamaguchi T., Hanakawa Y., Nishifuji K., Sugai M. & Stanley J. R.** 2002. Staphylococcal Exfoliative Toxin B Specifically Cleaves Desmoglein 1. *Journal of Investigative Dermatology.* 118 (5): 845 – 85.
  - **Archer N. K., Mazaitis M. J., Costerton J. W., Leid J. G., Powers M. E. & Shirliff M. E.** 2011. *Staphylococcus aureus* Biofilms: Properties, Regulation and Roles in Human Disease. *Virulence.* 2 (5): 445–459.
  - **Argudín M. Á., Mendoza M. C., & Rodicio M. R.** 2010. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins.* 2 (7): 1751–1773.
  - **Arthur M., Molinas C., Depardieu F. & Courvalin P.** 1993. Characterization of Tn1546, a Tn3-related Transposon Conferring Glycopeptide Resistance by Synthesis of Depsipeptide Peptidoglycan Precursors in *Enterococcus faecium* BM4147.

- Journal of Bacteriology. 175 (1): 117–127.
- **Bæk K. T., Thøgersen L., Mogensen R. G., Møllgaard M., Thomsen L. E., Petersen A., Skov S., Cameron D. R., Peleg A. Y. & Frees D.** 2015. Stepwise Decrease in Daptomycin Susceptibility in Clinical *S. aureus* Isolates Associated with an Initial Mutation in *rpoB* and a Compensatory Inactivation of the *clpX* Gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 59 (11): 6983–91. 25.
  - **Bayer A. S., Mishra N. N., Cheung A. L., Rubio A. & Yang S.-J.** 2016. Dysregulation of *mprF* and *dltABCD* Expression Among Daptomycin - non - susceptible MRSA clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 71 (8): 2100–2104.
  - **Beceiro A., Tomás M. & Bou G.** 2013. Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World?. *Clinical Microbiology Reviews*. 26 (2): 185–230.
  - **Beiras-Fernandez A., Vogt F., Sodian R. & Weis F.** 2010. Daptomycin: a Novel Lipopeptide Antibiotic Against Gram-positive Pathogens. *Infection and Drug Resistance*. 3: 95–101.
  - **Berti A. D., Wergin J. E., Girdaukas G. G., Hetzel S. J., Sakoulas G. & Rose W. E.** 2012. Altering the Proclivity towards Daptomycin Resistance in Methicillin - Resistant *Staphylococcus aureus* Using Combinations with Other Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 56 (10): 5046–5053.
  - **Bertsche U., Weidenmaier C., Kuehner D., Yang S. J., Baur S., Wanner S., Francois P., Schrenzel J., Yeaman M. R. & Bayer A. S.** 2011. Correlation of Daptomycin Resistance in a Clinical *Staphylococcus aureus* Strain with Increased Cell Wall Teichoic Acid Production and d-Alanylation.

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 55 (8): 3922–3928.
- **Boles B. R. & Horswill A. R.** 2008. agr - Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms. PLoS Pathogens. 4 (4): e1000052.
  - **Bukowski M., Wladyka B. & Dubin G.** 2010. Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. Toxins. 2 (5): 1148–1165.
  - **Camargo I. L. B. da C., Neoh H.-M., Cui L. & Hiramatsu K.** 2008. Serial Daptomycin Selection Generates Daptomycin - Nonsusceptible *Staphylococcus aureus* Strains with a Heterogeneous Vancomycin - Intermediate Phenotype. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 52 (12): 4289–4299.
  - **Cameron D. R., Mortin L. I., Rubio A., Mylonakis E., Moellering R. C., Eliopoulos G. M. & Peleg A. Y.** 2015. Impact of Daptomycin Resistance on *Staphylococcus aureus* Virulence. Virulence 6 (2): 127–131.
  - **Carugati M., Bayer A. S., Miró J. M., Park L. P., Guimarães A. C., Skoutelis A., Fortes C. Q., Durante-Mangoni E., Hannan M. M., Nacinovich F., Fernández-Hidalgo N., Grossi P., Tan R-S., Holland T., Fowler V. G., Corey R. G. & Chu, V. H.** 2013. High-Dose Daptomycin Therapy for Left-Sided Infective Endocarditis: a Prospective Study from the International Collaboration on Endocarditis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 57 (12): 6213–6222.
  - **Challand M. R., Salvadori E., Driesener R. C., Kay C. W. M., Roach P. L. & Spencer J.** 2013. Cysteine Methylation Controls Radical Generation in the Cfr Radical AdoMet rRNA Methyltransferase. PLoS ONE. 8 (7): e67979.
  - **Chambers H. F. & Deleo F.** 2009. Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the Antibiotic Era. Nature Reviews Microbiology. 7 (9): 629–641.

- 
- **Changchien C-H., Chen S.-W., Chen Y-Y. & Chu, C.** 2016. Antibiotic Susceptibility and Genomic Variations in *Staphylococcus aureus* Associated with Skin and Soft Tissue Infection (SSTI) Disease Groups. *BMC Infectious Diseases*. 16: 276.
  - **Chan-Tompkins N. H. & Harnicar S. J.** 2008. Prescribing Trends with Daptomycin (Cubicin) For the Treatment of Gram-Positive Infections. *Pharmacy and Therapeutics*. 33 (5): 282–288.
  - **Cheng A. G., Dedent A. C., Schneewind O. & Missiakas D.** 2011. A Play in Four Acts: *Staphylococcus aureus* Abscess Formation. *Trends in Microbiology*. 19 (5): 225–232.
  - **Citron D. M., Kwok Y. Y. & Appleman M. D.** *In vitro* Activity of Oritavancin (LY333328), Vancomycin, Clindamycin, and Metronidazole Against *Clostridium perfringens*, *Propionibacterium acnes*, and anaerobic Gram - positive cocci. *Anaerobe*. 2005. 11 (1–2): 93-95.
  - **CLSI.** 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 27th Ed. CLSI Supplement M100S. Wayne, Philadelphia (USA), Clinical Laboratory Standards Institute.
  - **Conly J. M. & Johnston B. L.** 2002. VISA, Hetero-VISA and VRSA: The End of the Vancomycin Era?. *The Canadian Journal of Infectious Diseases*. 13 (5): 282–284.
  - **Costa A. R., Batistão, D. W. F., Ribas R. M., Sousa A. M., Pereira O. & Botelho C. M.** 2013. *Staphylococcus aureus* Virulence Factors and Disease. En: *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*. A. Méndez-Vilas, Ed. Badajoz: Formatex Research Center. pp 702–710.

- 
- **Cotroneo N., Harris R., Perlmutter N., Beveridge T. & Silverman J. A.** 2008. Daptomycin Exerts Bactericidal Activity without Lysis of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52 (6): 2223–2225.
  - **Crossley K. B., Jefferson K. K., Archer G. & Fouler V. G.** 2009. *Staphylococci* in Human Disease. 2<sup>a</sup> Edition. Wiley-Blackwell, Philadelphia, USA.
  - **Cui L., Isii T., Fukuda M., Ochiai T., Neoh H., Camargo I. L. B. da C., Watanabe Y., Shoji M., Hishinuma T. & Hiramatsu K.** 2010. An RpoB Mutation Confers Dual Heteroresistance to Daptomycin and Vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54 (12): 5222–5233.
  - **Culshaw D., Lamp K. C., Yoon M.J. & Lodise T. P.** 2015. Duration of prior Vancomycin Therapy and Subsequent Daptomycin Treatment Outcomes in Methicillin - Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 83 (2): 193-197.
  - **D’Costa V. M., Mukhtar T. A., Patel T., Koteva K., Waglechner N., Hughes D. W., Wright G. D. & De Pascale G.** 2012. Inactivation of the Lipopeptide Antibiotic Daptomycin by Hydrolytic Mechanisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 56 (2): 757–764.
  - **Dai L., Wu C. M., Wang M. G., Wang Y., Wang Y., Huang S. Y., Xia L. N., Li B. B. & Shen J. Z.** 2010. First Report of the Multidrug Resistance Gene *cfr* and the Phenicol Resistance Gene *fexA* in a *Bacillus* Strain from Swine Feces. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54 (9): 3953–3955.
  - **David H. L. & Rastogi N.** 1985. Antibacterial Action of Colistin (Polymyxin E) Against *Mycobacterium aurum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 27(5): 701–707.

- 
- **De Lay N. & Gottesman S.** 2011. Role of Polynucleotide Phosphorylase in sRNA Function in *Escherichia coli*. *RNA Journal*. 17 (6): 1172-1189.
  - **DeLeo F. R., & Chambers H. F.** 2009. Reemergence of Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Genomics Era. *The Journal of Clinical Investigation*. 119 (9): 2464–2474.
  - **Deshpande L. M., Ashcraft D. S., Kahn H. P., Pankey G., Jones R. N., Farrell D. J., & Mendes R. E.** 2015. Detection of a New *cfr*-Like Gene, *cfr*(B), in *Enterococcus faecium* Isolates Recovered from Human Specimens in the United States as Part of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 59 (10): 6256–6261.
  - **Dezfulian A., Salehian M., Amini V., Dabiri H., Azimirad, M., Aslani M., Zali M. R. & Fazel I.** 2010. Catalase -negative *Staphylococcus aureus* Isolated from a Diabetic Foot Ulcer. *Iranian Journal of Microbiology*. 2 (3): 165–167.
  - **Dinges M. M., Orwin P. M. & Schlievert P. M.** 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*. 13 (1): 16–34.
  - **Dubrac S. & Msadek T.** 2004. Identification of Genes Controlled by the Essential *YycG/YycF* Two -Component System of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 186 (4):1175–1181.
  - **Dubrac S., Bisicchia P., Devine K. M. & Msadek T.** 2008. A Matter of Life and Death: Cell Wall Homeostasis and the WalkR (YycGF) Essential Signal Transduction Pathway. *Molecular Microbiology*. 70 (6): 1307-1322.
  - **Dunman P. M., Murphy E., Haney S., Palacios D., Tucker-Kellogg G., Wu S., Brown E. L. Zagursky R. J., Shlaes D. & Projan S. J.** 2001. Transcription Profiling - Based Identification of *Staphylococcus aureus* Genes Regulated by

- the agr and / or sarA Loci. Journal of Bacteriology. 183 (24): 7341–7353.
- **EARSS.** Surveillance of Antimicrobial Resistance in Europe. Revised edition. [Archivo PDF]. 2016. Recuperado en: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AMR-surveillance-Europe-2016.pdf>
  - **Eisenstein B. I., Oleson F. B. & Baltz R. H.** 2010. Daptomycin: from the Mountain to the Clinic, with Essential Help from Francis Tally, MD. Clinical Infectious Diseases. 50 (Suppl 1): S10–5.
  - **Endimiani A., Blackford M., Dasenbrook E. C., Reed M. D., Bajaksouszian S., Hujer A. M., Rudin S. D., Hujer K. M., Perreten V., Rice L. B., Jacobs M. R., Konstan M. W. & Bonomo R. A.** 2011. Emergence of Linezolid - resistant *Staphylococcus aureus* after Prolonged Treatment of Cystic Fibrosis Patients in Cleveland, Ohio. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 55 (4): 1684-1692.
  - **Ernst C. M. & Peschel A.** 2011. Broad-spectrum Antimicrobial Peptide Resistance by MprF-mediated Aminoacylation and Flipping of Phospholipids. Molecular Microbiology. 80 (2): 290–299.
  - **Ernst C. M., Staubitz P., Mishra N. N., Yang S. J., Hornig G., Kalbacher H., Bayer A. S., Kraus D. & Peschel A.** 2009. The Bacterial Defensin Resistance Protein MprF Consists of Separable Domains for Lipid Lysinylation and Antimicrobial Peptide Repulsion. PLoS Pathogens. 5 (11): e1000660.
  - **Fabres-Klein M. H., Caizer Santos M. J., Contelli Klein R., Nunes de Souza G. & de Oliveira Barros Ribon A.** 2015. An Association between Milk and Slime Increases Biofilm Production by Bovine *Staphylococcus aureus*. BMC Veterinary Research. 11: 3.

- 
- **Falugi F., Kim H. K., Missiakas D. M. & Schneewind O.** 2013. Role of Protein A in the Evasion of Host Adaptive Immune Responses by *Staphylococcus aureus*. *MBio*. 4: e00575–e13.
  - **Friedman L., Alder J. D. & Silverman J. A.** 2006. Genetic Changes That Correlate with Reduced Susceptibility to Daptomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 50 (6): 2137–2145.
  - **Fujimoto D. F. & Bayles K. W.** 1998. Opposing Roles of the *Staphylococcus aureus* Virulence Regulators, Agr and Sar, in Triton X -100- and Penicillin - Induced Autolysis. *Journal of Bacteriology*. 180 (14): 3724–3726.
  - **Fujimura S., Nakano Y. & Watanabe A.** 2014. A correlation between reduced susceptibilities to vancomycin and daptomycin among the MRSA isolates selected in mutant selection window of both vancomycin and daptomycin. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 20 (12): 752-756.
  - **Gao W., Chua K., Davies J. K., Newton H. J., Seemann T., Harrison P. F., Holmes N. E., Rhee H, Hong J., Harland E. L., Stinear T. P. & Howden B. P.** 2010. Two Novel Point Mutations in Clinical *Staphylococcus aureus* Reduce Linezolid Susceptibility and Switch on the Stringent Response to Promote Persistent Infection. *PLoS Pathogens*. 6 (6): e1000944.
  - **Gardete S. & Tomasz A.** 2014. Mechanisms of Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation*. 124 (7): 2836–2840.
  - **Gillman A. N., Breshears L. M., Kistler C. K., Finnegan P. M., Torres V. J., Schlievert P. M. & Peterson M. L.** 2017. Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Enhances the Proinflammatory Effects of *Staphylococcus aureus* Gamma-

- Toxin on the Mucosa. *Toxins*. 9 (7): 202.
- **Gómez-Casanova N., Siller M. & Muñoz J. L.** 2017. Mechanisms of Resistance to Daptomycin in *Staphylococcus aureus*. *Revista Española de Quimioterapia*. 30 (6): 391-396.
  - **Guillet J., Hallier M. & Felden B.** 2013. Emerging Functions for the *Staphylococcus aureus* RNome. *PLoS Pathogens*. 9 (12): e1003767.
  - **Gupta S., Govil D., Kakar P. N., Prakash O., Arora D., Das S., Govil P. & Malhotra A.** 2009. Colistin and Polymyxin B: A Re-emergence. *Indian Journal of Critical Care Medicine : Peer-Reviewed, Official Publication of Indian Society of Critical Care Medicine*. 13 (2): 49–53.
  - **Hachmann A. B., Sevim E., Gaballa A., Popham D. L., Antelmann H. & Helmann D.** 2009. Reduction in Membrane Phosphatidylglycerol Content Leads to Daptomycin Resistance in *Bacillus subtilis*. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 55 (9): 4326–4337.
  - **Haque A., Haque A., Saeed M., Azhar A., Rasool S., Shan S., Ehsan B. & Nisar Z.** 2017. Rapid Screening of Pyogenic *Staphylococcus aureus* for Confirmation of Genus and Species, Methicillin Resistance and Virulence Factors by Using Two Novel Multiplex PCR. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 33 (5): 1095–1100.
  - **Hennekinne J. A., De Buyser M-L. & Dragacci S.** 2012. *Staphylococcus aureus* and its Food Poisoning Toxins: Characterization and Outbreak Investigation. *FEMS Microbiology Reviews*. 6 (4): 815-36.
  - **Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, YAbuta K, Orguri T & Tenover FC.** 1997. Methicillin - Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Strain with Reduced Vancomycin Susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 40 (1): 135-6.

- 
- **Hiramatsu K.** 2001. Vancomycin - Resistant *Staphylococcus aureus*: a New Model of Antibiotic Resistance. *The Lancet Infectious Diseases*. 1 (3): 147–55.
  - **Horváth A., Dobay O., Kardos S., Ghidán Á., Tóth Á., Pászti J., Ungvári E., Horváth P., Nagy K., Zissman S. & Füzi M.** 2012. Varying fitness cost associated with resistance to fluoroquinolones governs clonal dynamic of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 31: 2029-2036.
  - **Hososaka Y., Hanaki H., Endo H., Suzuki Y., Nagasawa Z., Otsuka Y., Nakae T. & Sunakawa K.** 2007. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA* - positive *Staphylococcus aureus*: A new type of MRSA. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 13 (2): 79-86.
  - **Howden B. P., Davies J. K., Johnson P. D. R., Stinear T. P. & Grayson M. L.** 2010. Reduced Vancomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus*, Including Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Strains: Resistance Mechanisms, Laboratory Detection, and Clinical Implications. *Clinical Microbiology Reviews*. 23 (1): 99–139.
  - **Howden B. P., Mcevoy C. R. E., Allen D. L., Chua K., Gao, W., Harrison P. F., Bell J., Coombs G., Bennett-Wood V., Porter J. L., Robins-Browne R., Davies J. K., Seemann T. & Stinear T. P.** 2011. Evolution of Multidrug Resistance during *Staphylococcus aureus* Infection Involves Mutation of the Essential Two Component Regulator WalkR. *PLoS Pathogens*. 7 (11): e1002359.
  - **Hu C., Xiong N., Zhang Y., Rayner S. & Chen S.** 2012. Functional Characterization of Lipase in the Pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 419 (4): 617–620.

- 
- **Humphries R. M., Pollett S. & Sakoulas G.** 2013. A Current Perspective on Daptomycin for the Clinical Microbiologist. *Clinical Microbiology Reviews*. 26 (4): 759–780.
  - **Huseby M., Shi K., Brown C. K., Digre J., Mengistu, F., Seo K. S., Bohach G. A., Schlievert P. M., Ohlendorf D. H. & Earhart C. A.** 2007. Structure and Biological Activities of Beta Toxin from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 189 (23): 8719–8726.
  - **Iyamba J. M. L., Okombe D. T., Zakanda F. N., Malongo T. K., Unya J. W., Lukukula C. M. & Kikuni N. za B. T.** 2016. Adherence of *Staphylococcus aureus* to Catheter Tubing Inhibition by Quaternary Ammonium Compounds. *The Pan African Medical Journal*. 25: 50.
  - **Jacqueline C., Caillon J., Le Mabecque V., Miègeville A.-F., Hamel A., Bugnon D., Ge J. Y. & Potel G.** 2007. *In Vivo* Efficacy of Ceftaroline (PPI-0903), a New Broad Spectrum Cephalosporin, Compared with Linezolid and Vancomycin against Methicillin - Resistant and Vancomycin - Intermediate *Staphylococcus aureus* in a Rabbit Endocarditis Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51 (9): 3397-3400.
  - **Joel J., Graham S. M., Peckham-Cooper A., Korres N., Tsouchnica H., & Tsiridis E.** 2014. Clinical Results of Linezolid in Arthroplasty and Trauma MRSA Related Infections. *World Journal of Orthopedics*. 5(2): 151–157.
  - **Jones T., Yeaman M. R., Sakoulas G., Yang, S. J., Proctor A. R., Sahl, H. G., Schrenzel J., Xiong Y. P. & Bayer A. S.** 2008. Failures in Clinical Treatment of *Staphylococcus aureus* Infection with Daptomycin are Associated with Alterations in Surface Charge, Membrane Phospholipid Asymmetry, and Drug Binding. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 52 (1): 269-278.

- 
- **Jones, R. N., Stilwell, M. G., Sader, H. S., Fritsche, T. R. & Goldstein, B. P.** 2006. Spectrum and Potency of Dalbavancin Tested Against 3322 Gram - positive Cocci Isolated in the United States Surveillance Program (2004). *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*. 54 (2): 149–153.
  - **Kaasch A. J., Barlow G., Edgeworth J. D., Fowler V. G. JR, Hellmich M., Hopkins S., Kern W. V., Llewelyn, M. J., Rieg S., Rodriguez-Baño J., Scarborough M., Seifert H., Soriano, A., Tilley R., Tórk M. E., Weiß V., Wilson A. P., Thwaites G. E.; ISAC, INSTINCT, SABG, UKCIRG & COLLEAGUES.** 2014. *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infection: a Pooled Analysis of Five Prospective, Observational Studies. *Journal of Infection* 68 (3): 242-251.
  - **Kalil A. C., Van Schooneveld T. C., Fey P. D. & Rupp M. E.** 2014. Association Between Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration and Mortality among Patients with *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections: a Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*. 312 (15): 1552–64.
  - **Kaminska K. H., Purta E., Hansen L. H., Bujnicki J. M., Vester B. & Long K. S.** 2010. Insights into the Structure, Function and Evolution of the Radical-SAM 23S rRNA Methyltransferase Cfr that confers Antibiotic Resistance in Bacteria. *Nucleic Acids Research*. 38 (5): 1652–1663.
  - **Karatsa-Dodgson M., Wörmann M. E. & Gründling A.** 2010. *In vitro* Analysis of the *Staphylococcus aureus* Lipoteichoic Acid Synthase Enzyme uUsing Fluorescently Labeled Lipids. *Journal of Bacterial*. 192 (20): 5341–5349.
  - **Kim D. J., Park J. H. & Chang M.** Species - specific characteristics of the biofilm generated in silicone tube: an *in vitro* study. *BMC Ophthalmol*. 2018. 18 (1): 85.
  - **Kmeid J. & Kanafani Z. A.** 2015. Oritavancin for the Treatment of Acute Bacterial Skin and Skin

- Structure Infections: an Evidence-based Review. *Core Evidence*. 10: 39–47.
- **Koprivnjak T., Zhang D., Ernst C. M., Peschel A., Nauseef, W. M. & Weiss, J. P.** 2011. Characterization of *Staphylococcus aureus* Cardiolipin Synthases 1 and 2 and Their Contribution to Accumulation of Cardiolipin in Stationary Phase and within Phagocytes. *Journal of Bacteriology*. 193 (16): 4134–4142.
  - **Koprivnjak T., Zhang D., Ernst C. M., Peschel A., Nauseef W. M. & Weiss J. P.** 2011. Characterization of *Staphylococcus aureus* Cardiolipin Synthases 1 and 2 and Their Contribution to Accumulation of Cardiolipin in Stationary Phase and within Phagocytes. *Journal of Bacteriology*. 193 (16): 4134–4142.
  - **Kristian S. A., Dürr M., Van Strijp J. A. G., Neumeister B. & Peschel A.** 2003. MprF - Mediated Lysinylation of Phospholipids in *Staphylococcus aureus* Leads to Protection against Oxygen -Independent Neutrophil Killing . *Infection and Immunity*. 71 (1): 546–549.
  - **Kumar J. D., Negi Y. K., Gaur A. & Khanna D.** 2009. Detection of Virulence Genes in *Staphylococcus aureus* Isolate from Paper Currency. *International Journal of Infectious Diseases*. 13 (6): e450-e455.
  - **La Plante K. L. & Rybak M. J.** 2004. Impact of High - Inoculum *Staphylococcus aureus* on the Activities of Nafcillin, Vancomycin, Linezolid, and Daptomycin, Alone and in Combination with Gentamicin, in an *In Vitro* Pharmacodynamic Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48 (12): 4665–4672.
  - **Laabei M., Uhlemann A.-C., Lowy F. D., Austin E. D., Yokoyama M., Ouali K., Feil E., Thorpe H. A., Williams B., Perkins M., Peacock S. J., Clarke S. R., Dordel J., Holden M., Votintseva A. A., Bowden R., Crook D. W., Young B. C., Wilson D. J., Recker M. & Massey R. C.** 2015. Evolutionary Trade-Offs Underlie

- the Multi-faceted Virulence of *Staphylococcus aureus*. PLoS Biology. 13 (9): e1002229.
- **Leistner R., Kola A., Gastmeier P., Krüger R., Hoppe P-A., Schneider-Burrus S., Zuschneid I., Wischnewski N., Bender J., Layer F., Niebank M., Scheibenbogen C. & Hanitsch L. G .** 2017. Pyoderma Outbreak Among Kindergarten Families: Association with a Pantone-Valentine Leukocidin (PVL)-producing *Staphylococcus aureus* strain. PLoS ONE. 12 (12): e0189961.
  - **Leuthner K. D., Buechler K. A., Kogan D., Saguros A. & Lee, H. S.** 2016. Clinical efficacy of dalbavancin for the treatment of acute bacterial skin and skin structure infections (ABSSSI). Therapeutics and Clinical Risk Management. 12: 931–940.
  - **Li S., Yin Y., Chen H., Wang Q., Wang X. & Wang H.** 2017. Fitness Cost of Daptomycin - Resistant *Staphylococcus aureus* Obtained from *in Vitro* Daptomycin Selection Pressure. Frontiers in Microbiology. 8: 2199.
  - **Livermore D. M.** 2003. Linezolid *in vitro*: Mechanism and Antibacterial Spectrum. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 51 (Suppl 2): 9–16.
  - **Locke J. B., Rahawi S., LaMarre J., Mankin A. S. & Shaw K. J.** 2012. Genetic Environment and Stability of *cf* in Methicillin - Resistant *Staphylococcus aureus* CM05. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 56 (1): 332–340.
  - **Lodise T. P., Graves J., Evans A., Graffunder E., Helmecke M., Lomaestro B. M. & Stellrecht K.** 2008. Relationship between Vancomycin MIC and Failure Among Patients with Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia Treated with Vancomycin. Antimicrobial Agents & Chemotherapy. 52 (9): 3315–3320.
  - **Long K. S., Poehlsgaard J., Kehrenberg C., Schwarz S., &**

- Vester B.** 2006. The Cfr rRNA Methyltransferase Confers Resistance to Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50 (7): 2500–2505.
- **Lowy F. D.** 2003. Antimicrobial Resistance: the Example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*. 111 (9): 1265–1273.
- **Madigan M. T., Martinko J. M. & Parker J.** 2003. Brock Biología de los Microorganismos. Pearson Educación . 10ª Edición. pp 77.
- **Mah T. C. & O'Toole G. A.** 2001. Mechanisms of Biofilm Resistance to Antimicrobial Agents. *Trends in Microbiology*. 9 (1): 34 – 39.
- **Mandell G. L.** 1975. Catalase, Superoxide Dismutase, and Virulence of *Staphylococcus aureus*. *In vitro* and *in vivo* Studies with Emphasis on Staphylococcal--leukocyte Interaction. *Journal of Clinical Investigation*. 55 (3): 561–566.
- **Marty F. M., Yeh W. W., Wennersten C. B., Venkataraman L., Albano E., Alyea E. P., Gold H. S., Baden L. R. & Pillai S. K.** 2006. Emergence of a Clinical Daptomycin - Resistant *Staphylococcus aureus* Isolate during Treatment of Methicillin - Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia and Osteomyelitis. *Journal of Clinical Microbiology*. 44 (2): 595–597.
- **McAdow M., Missiakas D. M. & Schneewind O.** 2012. *Staphylococcus aureus* Secretes Coagulase and von Willebrand Factor Binding Protein to Modify the Coagulation Cascade and Establish Host Infections. *Journal of Innate Immunity*. 4 (2): 141–148.
- **Mcgillivray S. M., Tran D. N., Ramadoss N. S., Alumasa J. N., Okumura C. Y., Sakoulas G.,**

- Vaughn M. M., Zhang D. X., Keiler K. C. & Nizet V.** 2012. Pharmacological Inhibition of the ClpXP Protease Increases Bacterial Susceptibility to Host Cathelicidin Antimicrobial Peptides and Cell Envelope - Active Antibiotics. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 56 (4): 1854–1861.
- **Meesters C, Brack A., Hellmann N. & Decker H.** 2009. Structural Characterization of the Alpha-Hemolysin Monomer from *Staphylococcus aureus* Proteins. 75 (1): 118-126.
- **Mehta S., Cuirolo A. X., Plata K. B., Riosa S., Silverman J. A., Rubio A., Rosato R. R. & Rosato A. E.** 2012. VraSR Two - Component Regulatory System Contributes to mprF - Mediated Decreased Susceptibility to Daptomycin in *In Vivo* - Selected Clinical Strains of Methicillin - Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 56 (1): 92–102.
- **Meka V.G., Pillai S. K., Sakoulas G., Wennersten C., Venkataraman L., DeGirolami P. C. Eliopoulos G. M., Moellering R. C. Jr & Gold H. S.** 2004. Linezolid Resistance in Sequential *Staphylococcus aureus* Isolates Associated with a T2500A Mutation in the 23S rRNA Gene and Loss of a Single Copy of rRNA. *The Journal of Infectious Diseases*. 190 (2): 311-317.
- **Mendes R. E., Deshpande L. M., Bonilla H. F., Schwarz S., Huband M. D., Jones R. N. & Quinn J. P.** 2013. Dissemination of a pSCFS3-Like *cfr*-Carrying Plasmid in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Clinical Isolates Recovered from Hospitals in Ohio. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 57 (7): 2923–2928.
- **Mendes R. E., Deshpande L. M., Farrell D. J., Spanu T., Fadda G. & Jones R. N.** 2010. Assessment of Linezolid Resistance Mechanisms among *Staphylococcus epidermidis* Causing Bacteraemia in Rome, Italy.

- Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 65 (11): 2329–2335.
- **Mendes R. E., Tsakris A., Sader H. S., Jones R. N., Biek D., McGhee P., Appelbaum P. C. & Kosowska-Shick K.** 2012. Characterization of Methicillin - Resistant *Staphylococcus aureus* Displaying Increased MICs of Ceftaroline. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 67 (6): 1321-1324.
  - **Michel A., Agerer F., Hauck C. R., Herrmann M., Ullrich J., Hacker J., & Ohlsen K.** 2006. Global Regulatory Impact of ClpP Protease of *Staphylococcus aureus* on Regulons Involved in Virulence, Oxidative Stress Response, Autolysis, and DNA Repair . Journal of Bacteriology. 188 (16): 5783–5796.
  - **Millar W. R., Bayer A. S. & Arias C. A.** 2016. Mechanism of Action and Resistance to Daptomycin in *Staphylococcus aureus* and Enterococci. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 6 (11): a026997.
  - **Miller W. R., Bayer A. S. & Arias C. A.** 2016. Mechanism of Action and Resistance to Daptomycin in *Staphylococcus aureus* and Enterococci. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 6 (11): a026997.
  - **Mishra N. N. & Bayer A. S.** 2013. Correlation of Cell Membrane Lipid Profiles with Daptomycin Resistance in Methicillin - Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 57(2): 1082–1085.
  - **Mishra N. N., Liu G. Y., Yeaman M. R., Nast C. C., Proctor R. A., McKinnell J. & Bayer A. S.** 2011. Carotenoid-Related Alteration of Cell Membrane Fluidity Impacts *Staphylococcus aureus* Susceptibility to Host Defense Peptides. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 55 (2): 526–531.

- 
- **Mishra N. N., Rubio A., Nast C. A. & Bayer A. S.** 2012. Differential Adaptations of Methicillin - Resistant *Staphylococcus aureus* to Serial *in vitro* Passage in Daptomycin: Evolution of Daptomycin Resistance and Role of Membrane Carotenoid Content and Fluidity. *International Journal of Microbiology*. doi: 10.1155 / 2012 / 683450.
  - **Mishra N. N., Yang S. J., Sawa A., Rubio A., Nast C. C., Yeaman M. R. & Bayer A.S.** 2009. Analysis of Cell Membrane Characteristics of *In Vitro* -Selected Daptomycin - Resistant Strains of Methicillin - Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 53 (6): 2312–2318.
  - **Moore C. L., Osaki-Kiyon P., Haque N. Z., Perri M. B., Donabedian S. & Zervos M. J.** 2012. Daptomycin versus Vancomycin for Bloodstream Infections due to Methicillin - Resistant *Staphylococcus aureus* with a High Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration: a Casecontrol Study. *Clinical Infectious Diseases*. 54 (1): 51–58.
  - **Morales G., Picazo J. J., Baos E., Candel F. J., Arribi A., Peláez B., Andrade R., de la Torre M. A., Fereres J. & Sánchez-García M.** 2010. Resistance to Linezolid is Mediated by the *cfr* Gene in the First Report of an Outbreak of Linezolid - resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Disease*. 50 (6): 821-825.
  - **Mortin L. I., Li T., Van Praagh A. D. G., Zhang S., Zhang X.-X. & Alder J. D.** 2007. Rapid Bactericidal Activity of Daptomycin against Methicillin - Resistant and Methicillin - Susceptible *Staphylococcus aureus* Peritonitis in Mice as Measured with Bioluminescent Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51 (5): 1787–1794.
  - **Moubareck C., Meziane-Cherif D., Courvalin P. & Périchon B.** 2009. VanA - Type *Staphylococcus aureus* Strain VRSA-7 Is Partially Dependent on Vancomycin for Growth.

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 53 (9): 3657–3663.
- **Munita J. M., Bayer A. S. & Arias C. A.** 2015. Evolving Resistance Among Gram-positive Pathogens. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 61 (Suppl 2): S48–S57.
  - **Muraih J. K., Pearson A., Silverman J. & Palmer M.** 2011. Oligomerization of Daptomycin on Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1808 (4): 1154–1160.
  - **Murray K. P., Zhao J. J., Davis S. L., Kullar R., Kaye K. S., Lephart P. & Rybak M. J.** 2013. Early Use of Daptomycin Versus Vancomycin for Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia With Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration >1 mg/L: A Matched Cohort Study. *Clinical Infectious Diseases*. 56 (11): 1562-1569.
  - **Muthaiyan A., Silverman J. A., Jayaswal R. K. & Wilkinson B.J.** 2008. Transcriptional Profiling Reveals that Daptomycin Induces the *Staphylococcus aureus* Cell Wall Stress Stimulon and Genes Responsive to Membrane Depolarization. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 52 (7): 980–990.
  - **Mwangi M. M., Wu S. W., Zhou Y., Sieradzki K., de Lencastre H., Richardson P., Bruce D., Rubin E., Myers E., Siggia E. D. & Tomasz A.** 2007. Tracking the *In Vivo* Evolution of Multidrug Resistance in *Staphylococcus aureus* by Whole-Genome Sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104 (22): 9451–9456.
  - **Myles I. A. & Datta S. K.** 2012. *Staphylococcus aureus*: an introduction. *Seminars Immunopathology*. 34 (2): 181-184.
  - **Nielsen K. L., Pedersen T. M., Udekwu K. I., Petersen A., Skov R.**

- L., Hansen L. H., Hughes D. & Frimodt-Møller N. 2012. Fitness Cost: a Bacteriological Explanation for the Demise of the First International Methicillin - Resistant *Staphylococcus aureus* Epidemic. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 67 (6): 1325–1332.
- Novick R. P. & Geisinger E. 2008. Quorum Sensing in Staphylococci. Annual Review of Genetics. 42: 541–64.
- Novick R. P. 2003. Autoinduction and Signal Transduction in the Regulation of Staphylococcal Virulence. Molecular Microbiology. 48 (6): 1429–1449.
- O`Driscoll T. & Crank C. W. 2015. Vancomycin-resistant Enterococcal Infections: Epidemiology, Clinical Manifestations and Optimal Management. Infection and Drug Resistance. 8: 217-230.
- O` Callaghan R. J. 2018. The Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Eyes Infections. Pathogens. 7 (1): 9.
- Organización Mundial de la Salud. 2016. Plan de Acción Mundial sobre la Resistencia a los Antimicrobianos. Recuperado de: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255204/9789243509761-spa.pdf;jsessionid=51D2D4AB78A9BDA4E0A36226166C5771?sequence=1>
- Organización Mundial de la Salud. 30 de Abril de 2014. El primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos pone de manifiesto una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>
- Palmer K. L., Daniel A., Hardy C., Silverman J. & Gilmore M. S. 2011. Genetic Basis for Daptomycin Resistance in Enterococci. Antimicrobial Agents & Chemotherapy 55 (7): 3345–3356.

- 
- **Paterson G. K., Harrison E. M. & Holmes M. A.** 2014. The Emergence of *mecC* Methicillin - Resistant *Staphylococcus aureus*. Trends in Microbiology. 22 (1): 42-47.
  - **Peleg A. Y., Miyakis S., Ward D. V., Earl A. M., Rubio A., Cameron, D. R., Pillai S., Moellering R. C. JR. & Eliopoulos G. M.** 2012. Whole Genome Characterization of the Mechanisms of Daptomycin Resistance in Clinical and Laboratory Derived Isolates of *Staphylococcus aureus*. PLoS ONE. 7 (1): e28316.
  - **Pereira P. M., Filipe S. R., Tomasz A. & Pinho M. G.** 2007. Fluorescence Ratio Imaging Microscopy Shows Decreased Access of Vancomycin to Cell Wall Synthetic Sites in Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 51 (10): 3627–3633.
  - **Périchon B. & Courvalin P.** 2009. VanA - Type Vancomycin - Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 53 (11): 4580–4587.
  - **Pfaller M. A., Sader H. S. & Jones R. N.** 2007. Evaluation of the *in vitro* Activity of Daptomycin Against 19,615 Clinical Isolates of Gram - positive cocci Collected in North American Hospitals (2002–2005). Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases. 57 (4): 459–465.
  - **Pietrocola G., Nobile G., Rindi S. & Speziale P.** 2017. *Staphylococcus aureus* Manipulates Innate Immunity through Own and Host-Expressed Proteases. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 7: 166.
  - **Pillai S. K., Gold, H. S., Sakoulas, G., Wennersten C., Moellering R. C. & Eliopoulos G. M.** 2007. Daptomycin Nonsusceptibility in *Staphylococcus aureus* with Reduced Vancomycin Susceptibility Is Independent of Alterations in MprF. Antimicrobial Agents & Chemotherapy. 51 (6): 2223–2225.

- 
- **Reffuveille F., Josse J., Vallé Q., Mongaret C. & Gangloff S. C.** 2017. *Staphylococcus aureus* Biofilms and their Impact on the Medical Field. The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. Capítulo 11. DOI: 10.5772/66380.
  - **Reynolds P. E.** 1989. Structure, Biochemistry and Mechanism of Action of Glycopeptide Antibiotics. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 8 (11): 943-950.
  - **Rozen D. E., McGee L., Levin B. R. & Klugman K. P.** 2007. Fitness Costs of Fluoroquinolone Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51 (2): 412-416.
  - **Rubinstein E. & Keynan Y.** 2014. *Vancomycin Revisited - 60 Years Later*. *Frontiers in Public Health*. 2: 217.
  - **Rukkawattanakul T., Sookrung N., Seesuay W., Onlamoon N., Diraphat P., Chaicumpa W. & Indrawattana, N.** 2017. Human scFvs That Counteract Bioactivities of *Staphylococcus aureus* TSST-1. *Toxins*. 9 (2): 50.
  - **Rybak M. J.** 2006. The Efficacy and Safety of Daptomycin: First in a New Class of Antibiotics for Gram-positive Bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*. 12 (1): 24-32.
  - **Rybak M. J., Hershberger E., Moldovan T. & Grucz R. G.** 2000. *In vitro* Activities of Daptomycin, Vancomycin, linezolid, and Quinupristin - Dalfopristin against *Staphylococci* and *Enterococci*, Including Vancomycin - Intermediate and - Resistant Strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44 (4): 1062-1066.
  - **Sabat A. J., Pournaras S., Akkerboom V., Tsakris A., Grundmann H. & Friedrich A. W.** 2015. Whole-genome analysis of an oxacillin-susceptible CC80 *mecA* - positive *Staphylococcus aureus* Clinical Isolate: Insights Into the

- Mechanisms of Cryptic Methicillin Resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 70 (11): 2956–2964.
- **Sakoulas G., Eliopoulos G. M., Fowler V. G., Moellering R. C., Novick R. P., Lucindo N., Yeaman M. R. & Bayer A. S.** 2005. Reduced Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to Vancomycin and Platelet Microbicidal Protein Correlates with Defective Autolysis and Loss of Accessory Gene Regulator (*agr*) Function. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49 (7): 2687–2692.
  - **Sakoulas G., Moise-Broder P. A., Schentag J., Forrest A., Moellering R. C., & Eliopoulos G. M.** 2004. Relationship of MIC and Bactericidal Activity to Efficacy of Vancomycin for Treatment of Methicillin - Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*. 42 (6): 2398–2402.
  - **Saleh-Mghir A., Dumitrescu O., Dinh A., Boutrad Y., Massias L., Martin É., Vandenesch F., Etienne J., Lina G. & Crémieux A. C.** 2012. Ceftobiprole Efficacy *In Vitro* against Panton - Valentine Leukocidin Production and *In Vivo* against Community - Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis in Rabbits. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 56 (12): 6291–6297.
  - **Samanta D. & Elasri M. O.** 2014. The *msaABCR* Operon Regulates Resistance in Vancomycin - Intermediate *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 58 (11): 6685–6695.
  - **Schindler P. R. G. & Teuber M.** 1975. Action of Polymyxin B on Bacterial Membranes: Morphological Changes in the Cytoplasm and in the Outer Membrane of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 8 (1): 95–104.
  - **Schroeder M., Brooks B. D. & Brooks A. E.** 2017. The Complex Relationship between Virulence and

- Antibiotic Resistance. *Genes*. 8 (1): 39.
- **Seidel C., Peters S., Eschbach E., Feßler A. T., Oberheitmann B. & Schwarz S.** 2017. Development of a Nucleic acid Lateral Flow Immunoassay (NALFIA) for Reliable, Simple and Rapid Detection of the Methicillin Resistance Genes *mecA* and *mecC*. *Veterinary Microbiology*. 200: 101-106.
  - **Short S. A. & White D. C.** 1972. Biosynthesis of Cardiolipin from Phosphatidylglycerol in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 109 (2): 820–826.
  - **Siala W., Mingeot-Leclercq M.-P., Tulkens P. M., Hallin M., Denis O. & Van Bambeke F.** 2014. Comparison of the Antibiotic Activities of Daptomycin, Vancomycin, and the Investigational Fluoroquinolone Delafloxacin against Biofilms from *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 58(11): 6385–6397.
  - **Sierra J. M., Camoez M., Tubau F., Gasch O., Pujol M., Martín R. & Domínguez M. A.** 2013. Low Prevalence of *Cfr* - Mediated Linezolid Resistance among Methicillin -Resistant *Staphylococcus aureus* in a Spanish Hospital: Case Report on Linezolid Resistance Acquired during Linezolid Therapy. *PloS ONE*. 8 (3): e59215.
  - **Silva M., Jacobus N. V. & Gorbach S. L.** 1988. *In vitro* Activity of LY146032 Against Gram - positive Bacteria. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 9 (2): 79-85.
  - **Silverman J. A., Oliver N., Andrew T. & Li T.** 2001. Resistance Studies with Daptomycin. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 45 (6): 1799–1802.
  - **Silverman J. A., Perlmutter N. G. & Shapiro H. M.** 2003. Correlation of Daptomycin Bactericidal Activity and Membrane Depolarization in *Staphylococcus*

- aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 47 (8): 2538–2544.
- **Singh R, Ray P, Das A & Sharma M.** 2010. Penetration of Antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 65 (9): 1955–1958.
  - **Smith J. R., Roberts K. D. & Rybak M. J.** 2015. Dalbavancin: A Novel Lipoglycopeptide Antibiotic with Extended Activity Against Gram-Positive Infections. Infectious Diseases and Therapy. 4 (3): 245–258.
  - **Smith L. K. & Mankin A. S.** 2008. Transcriptional and Translational Control of the *mlr* Operon, Which Confers Resistance to Seven Classes of Protein Synthesis Inhibitors. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 52 (5): 1703–1712.
  - **Song Y., Rubio A., Jayaswal R. K., Silverman J. A. & Wilkinson B. J.** 2013. Additional Routes to *Staphylococcus aureus* Daptomycin Resistance as Revealed by Comparative Genome Sequencing, Transcriptional Profiling, and Phenotypic Studies. PLoS ONE. 8 (3): e58469.
  - **Soriano A., Marco F., Martínez J. A., Pisos E., Almela M., Dimova V. P., Alamo D., Ortega M., Lopez J. & Mensa J.** 2008. Influence of Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration on the Treatment of Methicillin - Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. Clinical Infectious Diseases. 46 (2): 193–200.
  - **Spoering A. L. & Lewis K.** 2001. Biofilms and Planktonic Cells of *Pseudomonas aeruginosa* Have Similar Resistance to Killing by Antimicrobials. Journal of Bacteriology. 183 (23): 6746–6751.
  - **Steenbergen J. N., Mohr J. F. & Thorne G. M.** 2009. Effects of Daptomycin in Combination with other Antimicrobial Agents: a Review of *In Vitro* and Animal Model Studies. Journal of

- Antimicrobial Chemotherapy. 64 (6): 1130-1138.
- **Stefani S., Campanile F., Santagati M., Mezzatesta M. L., Cafiso V. & Pacini G.** 2015. Insights and Clinical Perspectives of Daptomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*: A review of the Available Evidence. International Journal of Antimicrobial Agents. 46 (3): 278 – 289.
  - **Stojković V., Noda-Garcia L., Tawfik D. S. & Fujimori D. G.** 2016. Antibiotic Resistance Evolved Via Inactivation of a Ribosomal RNA Methylating Enzyme. Nucleic Acids Research. 44 (18): 8897–8907.
  - **Streit J. M., Sader H. S., Fritsche T. & Jones R. N.** Dalbavancin Activity Against Selected Populations of Antimicrobial - resistant Gram - positive Pathogens. Diagnostic Microbiology & Infectious Disease. 2005. 53: 307-310.
  - **Suganuma, A.** 1961. The Plasma Membrane of *Staphylococcus aureus*. The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology. 10 (2): 292–298.
  - **Tally F. P. & De Bruin M. F.** 2000. Development of Daptomycin for Grampositive Infections. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 46 (4): 523-526.
  - **Tatarkiewicz J., Staniszewska A. & Bujalska-Zadrozny M.** 2016. New Agents Approved for Treatment of Acute Staphylococcal Skin Infections. Archives of Medical Science : AMS. 12 (6) : 1327–1336.
  - **Tenover F. C., Jones R. N., Swenson J. M., Zimmer B., McAllister S. & Jorgenson J. H.** 1999. Methods for Improved Detection of Oxacillin Resistance in Coagulase - Negative Staphylococci: Results of a multicenter study. Journal Clinical Microbiology. 37 (12): 4051-4058.
  - **Toh S.-M., Xiong L., Arias C. A., Villegas M. V., Lolans K., Quinn J. & Mankin, A. S.** 2007. Acquisition of a Natural Resistance Gene Renders a

- Clinical Strain of Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* Resistant to the Synthetic Antibiotic Linezolid. *Molecular Microbiology*. 64 (6): 1506–1514.
- **Tsuji B.T., Rybak M. J., Lau K. L. & Sakoulas G.** 2007. Evaluation of Accessory gene Regulator (*agr*) Group and Function in the Proclivity towards Vancomycin Intermediate Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 51 (3): 1089–1091.
  - **Weidenmaier C., Peschel A., Kempf V. A. J., Lucindo N., Yeaman M. R. & Bayer A. S.** 2005. DltABCD- and MprF - Mediated Cell Envelope Modifications of *Staphylococcus aureus* Confer Resistance to Platelet Microbicidal Proteins and Contribute to Virulence in a Rabbit Endocarditis Model. *Infection and Immunity*. 73 (12): 8033–8038.
  - **Wilson D. N., Schlutzen F., Harms J. M., Starosta A. L., Connell S. R. & Fucini P.** 2008. The Oxazolidinone Antibiotics Perturb the Ribosomal Peptidyl-transferase Center and Effect tRNA Positioning. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 105 (36): 13339–13344.
  - **Wu S. W., de Lencastre H. & Tomasz A.** 2001. Recruitment of the *mecA* Gene Homologue of *Staphylococcus sciuri* into a Resistance Determinant and Expression of the Resistant Phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 183 (8): 2417–2424.
  - **Xydalba.** Annex I. Summary of Product Characteristics. [Author(s) not stated]. Community register 2015. Document available online at Recuperado de: [http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2015/20150219130765/annex\\_130765\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2015/20150219130765/annex_130765_en.pdf).
  - **Yahav D., Yassin S., Shaked H., Goldberg E., Bishara J., Paul M. & Leibovici L.** 2016. Risk Factors for

- 
- long-term Mortality of *Staphylococcus aureus* Bacteremia. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 35 (5): 785-790.
- **Yang S. J., Nast C. C., Mishra N. N., Yeaman M. R., Fey P. D. & Bayer A. S.** 2010. Cell Wall Thickening Is Not a Universal Accompaniment of the Daptomycin Nonsusceptibility Phenotype in *Staphylococcus aureus*: Evidence for Multiple Resistance Mechanisms. Antimicrobial Agents & Chemotherapy. 54 (8): 3079-3085.
  - **Yarwood J. M., Bartels D. J., Volper E. M. & Greenberg, E. P.** 2004. Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus* Biofilms. Journal of Bacteriology. 186 (6): 1838–1850.
  - **Yu Z., Cai Y., Qin W., Lin J. & Qiu J.** 2015. Polymyxin e Induces Rapid *Paenibacillus Polymyxa* Death by Damaging Cell Membrane While Ca<sup>2+</sup> Can Protect Cells from Damage. PLoS ONE. 10: 8.
  - **Zhang T., Muraih J. K., Mintzer E., Tishbi N., Desert C., Silverman J., Taylor S. & Palmer M.** 2013. Mutual Inhibition through Hybrid Oligomer Formation of Daptomycin and the Semisynthetic Lipopeptide Antibiotic CB-182,462. Biochimica et Biophysica Acta. 828 (2): 302–308.





*Primers* rediseñados utilizados en las cepas que no amplificaron con los *primers* iniciales. Todos los *primers* fueron diseñados en nuestro laboratorio utilizando el genoma completo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 depositado en GenBank (gi: 685631213).

**Anexo 1.** Oligonucleótidos específicos y temperatura de hibridación.

Genes	Primer	Secuencia del primer 5' → 3'	Tª de hibridación
<i>cls</i>	cls1.1N-D	ATGACGTGAAAGGTGCAAATG	53°C
	cls1.1N-R	GCTTCAACTTCTCCACCTAACG	
	cls2.2N-D	TGCGTATGAACAATCGAAACCAA	52°C
	cls2.2N-R	cls2.2-R de la Tabla 5	
<i>mprF</i>	mprF-1N-D	AACCATATTGTTCTGTTTGAGAT	49°C
	mprF-1N-R	ACTAAGTCGAAGGCACCAAA	54°C
	mprF-2N-D	AATGGTTAGCCGCTGCAGTT	
	mprF-2N-R	TAACCACGCAATTGCACCAA	
	mprF-3N-D	TCGCAATGCTTTTGTTCAGCA	54°C
	mprF-3N-R	AGTCGCTCTAAATCCACGGC	54°C
	mprF-4N-D	TTGGCGATCCAATCGGTGAT	
	mprF-4N-R	AGCGCTTCAGGCATAACTGT	
<i>rpoC</i>	rpoC-1N-D	AATGCAAATCAATCAAATAGCACAG	52°C
	rpoC-1N-R	TGTTGCAAATCGTCCACCATC	
	rpoC-2N-D	CTGGTCAAAGACTTACTCGTGC	52°C
	rpoC-2N-R	TGCTAAATCTGTTGAATACTTCTGC	
	rpoC-3N-D	TACAACCTTAGGTGAAGGTGGAT	52°C
	rpoC-3N-R	TCACCGATAGATTGGGCTGC	
	rpoC-4N-D	ACAGATGCTGGTATTGAACAAATG	53°C
	rpoC-4N-R	TCAACTTCTGCAACTGGTTTAGC	

*Primers* rediseñados utilizados en las cepas que no amplificaron con los *primers* iniciales. Todos los *primers* fueron diseñados en nuestro laboratorio utilizando como cepa base la secuencia del aislado clínico St2, salvo para la realización de los *primers* *cls1.1x* y *mprF-7*, que se utilizó la secuencia de St6.

**Anexo 2.** Oligonucleótidos específicos y temperatura de hibridación.

Genes	Primer	Secuencia del primer 5' → 3'	Tª de hibridación
<i>mprF</i>	mprF-ZC-D mprF-ZC-R	TGTCGCGACGTTATTCACTT mprF-3N-R del Anexo 1	53°C
	mprF-ZC2-D mprF-ZC2-R	AGTCAGCTTTATTCCTGGTGGT TGCTGAACAAAAGCATTGCGA	54°C
	mprF-SO-D mprF-SO-R	TGAAGCGAGTATTTGTGACT CCCCACCACCAATAAATAGT	50°C
	mprF-7-D mprF-7-R	GTAGGCTTTGGTGCCTTTAT TTTTTCCTCAGGGACACCTA	51°C
<i>cls</i>	<i>cls1.1x</i> -D <i>cls1.1x</i> -R	GTTCTGAAGAAGCTGCAAAT TCTGTAAACACGTTCCATT	50°C
<i>rpoB</i>	<i>rpoB1.2</i> -D <i>rpoB1.2</i> -R	TCGAACGGTGAACCTATTTGT ACCTTCTCTTAGGAACCACT	50°C

VNIVERSITAS  
STVDII  
SALAMANTINI



