



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Cátedra de Microbiología



***Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad
de Buenos Aires***

Staphylococcus aureus meticilino resistente adquirido en la
comunidad: Epidemiología molecular y patogenicidad de los
principales clones circulantes en Argentina

Bioq. Silvina Fernandez

Directora: Dra. Marta E. Mollerach

Directora Adjunta: Dra. Marisa I. Gómez

2017

Los resultados de este trabajo de tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones:

- **“Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST30-SCCmecIVc clone as the major cause of Community-Acquired Invasive Infections in Argentina”** S. Fernandez; L. de Vedia, M.J. Lopez Furst; N. Gardella, S. Di Gregorio; M.C. Ganaha; S. Prieto; E. Carbone; N. Lista; F. Rotryng; M. E. Stryjewski, M. Mollerach. *Infection, Genetics and Evolution* 2013, Mar (14), 401-5.
- **“Prospective Multicenter Study of Community-Associated Skin and Skin Structure Infections due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Buenos Aires, Argentina”** María José López Furst; Lautaro de Vedia; Silvina Fernandez; Noella Gardella; María Cristina Ganaha, Sergio Prieto, Edith Carbone, Nicolás Lista, Flavio Rotryng, Graciana I. Morena, Marta Mollerach, Martín E. Stryjewski. *PLoS One*. 2013 Nov 20; 8(11).
- **“Community-acquired necrotizing pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST30-SCCmecIVc-spat019-PVL positive in San Antonio de Areco, Argentina”** Fernandez S, Murzicato S, Sandoval O, Fernández-Canigia L, Mollerach M. *Revista Argentina de Microbiología*, 2015;47(1):50-53.
- **“High Virulence of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* ST30-SCCmecIVc-spat019, the Dominant Community-Associated Clone in Argentina”** Silvina Fernandez, Camila Ledo, Santiago Lattar, Mariángeles Noto Llana, Andrea Mendoza Bertelli, Sabrina Di Gregorio, Daniel O. Sordelli, Marisa I. Gómez, Marta E. Mollerach. *International Journal of Medical Microbiology*. 2017. En prensa. DOI: 10.1016/j.ijmm.2017.05.003.

Agradecimientos

Agradecimientos

Este trabajo de tesis está dedicado a todas aquellas personas que hicieron de este camino una experiencia sumamente enriquecedora en lo laboral y en lo personal. Me llevo muchos y muy lindos recuerdos de todos estos años.

En primer lugar quiero agradecer a mi directora, Marta, por toda la confianza que siempre me manifestó, por su acompañamiento, comprensión y apoyo en todo momento, incluso en los momentos más difíciles. A mi directora adjunta, Marisa, por su entusiasmo y dedicación y por dejarme ser también parte de su equipo.

A mi grupo de trabajo, las más antiguas Noe y Ara que me recibieron con mucho afecto y me enseñaron desde el primer día, a Sabri por ser una gran compañera, por todos los momentos que compartimos y aprendimos juntas y porque siempre me ayudaste en todo, y a las más chiquitas Sol y Lu por su alegría y compañerismo.

A mis queridas “chicas” del fondo, Marian, Meli, Barbi G., Dani, Sabri, Barbi A., Vero, Gaby, Lu, Sol, Gio, Vivi, Andre, Joha, Marilú, Alan, Roque, Flor B, por tantos momentos lindos que compartimos, dentro y fuera del laboratorio, por hacerme reír tanto y por hacer del cepario un lugar hermoso para trabajar. A Gise, la persona que me contagió las ganas de ser parte de la cátedra de Microbiología.

A los integrantes más antiguos del cepario, Gabriel, Marce, Pablo, Magui, José y Laura B. por ayudarme siempre que los necesité, por enseñarme y por su trabajo cotidiano en la formación de nuevos profesionales.

A Mary y a Flor por ayudarme a mi y todos en nuestro trabajo diario.

Al IMPaM, donde realicé parte de mi trabajo de tesis y me recibieron con la mejor predisposición. Al Dr. Daniel Sordelli y el Dr. Santiago Lattar por toda su ayuda y colaboración. Al grupo de trabajo de la Dra. Marisa Gómez porque sin ellas no hubiera podido cumplir los objetivos de la tesis, y especialmente a Cami, mi compañera de mesada con la que compartimos tantas mañanas y tardes, gracias por tu generosidad y compañerismo desde el primer momento.

A los integrantes del grupo de estudio de infecciones por SAMR-AC de SADI, por su colaboración indispensable para el desarrollo de esta tesis.

A todas las personas que forman parte de la cátedra de Microbiología, por compartir estos años y por brindarme su ayuda siempre que la necesité. A la facultad de Farmacia y Bioquímica y a la Universidad de Buenos Aires por hacer posible mi formación y la de tantos otras personas.

A mis amigas de siempre.

A toda mi familia por su apoyo y amor incondicional. A mis padres porque siempre confiaron en mí y me dejaron elegir libremente. Porque me ayudaron, y me ayudan en todo lo que hago y siempre están ahí. Gracias a mis hermanos, Mariana y Pablo por compartir la vida, por ser tan buenos compañeros y por cuidarme. A mi amor, Berni, porque sin vos la vida no sería tan linda. Gracias por tu amor, tu sonrisa, por ayudarme tanto, por toda tu paciencia especialmente en esta última etapa de la tesis y por tantas otras cosas más.

Gracias.

Índice

Índice

Abreviaturas	VII
Introducción	1
<i>Staphylococcus aureus</i> : generalidades	1
Importancia clínica	2
Factores de virulencia	3
Adhesinas	3
Toxinas	5
Formación de biopelículas	7
Expresión de factores de virulencia. El sistema Agr	8
Evolución de la resistencia a antibióticos β -lactámicos.....	9
El elemento SCCmec.....	10
Métodos de tipificación molecular para el estudio de SAMR	13
Epidemiología molecular de las infecciones por SAMR.....	15
<i>S. aureus</i> resistente a meticilina asociado al cuidado de la salud (SAMR-AH).....	16
<i>S. aureus</i> resistente a meticilina asociado a la comunidad (SAMR-AC).....	17
Situación en Argentina	19
Hipótesis y justificación del estudio	21
Objetivos	22
Materiales y Métodos	23
1-Estudios multicéntricos para la caracterización de SAMR-AC en Argentina	23
2- Microorganismos	25
2.1-Cepas utilizadas como control	26
3-Conservación y cultivo de cepas bacterianas.....	27
4-Extracción de ADN	27
5-Pruebas de sensibilidad a antibióticos	28
6-Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	28
7-Electroforesis en gel de agarosa	28
8-Purificación de productos de PCR.....	28
9-Secuenciación y análisis de secuencias de ADN	29
10-Técnicas de genotipificación	29

10.1-Confirmación de la resistencia a meticilina y clasificación de SSC <i>mec</i>	29
10.2-Tipificación del grupo de <i>agr</i>	30
10.3- Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)	30
10.4-Polimorfismo del gen <i>spa</i>	31
10.5-Multilocus sequence typing (MLST)	31
11- Detección de genes codificantes de factores de virulencia	32
12-Formación de biopelículas	32
13-Funcionalidad del locus <i>agr</i>	33
14-Modelos de infección con animales de experimentación	34
14.1-Infección de piel	35
14.2-Infección ósea	35
14.3-Infección respiratoria	36
15-Análisis de la expresión de genes de virulencia.....	37
15.1-Extracción de ARN.....	37
15.2-Retrotranscripción	37
15.3-PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	38
15.4-Validación y genes de referencia	38
16-Tratamiento estadístico.....	39
Resultados	41
1-Epidemiología de las infecciones por SAMR-AC	41
1.1-Characterización de los aislamientos de SAMR-AC de IPER.....	43
1.2-Characterización de los aislamientos de SAMR-AC de infecciones invasivas	48
1.3-Distribución de los clones de SAMR-AC según el tipo de infección	50
1.4-Resistencia acompañante.....	51
2-Estudio comparativo de la virulencia de los clones de SAMR-AC.....	52
2.1-Asociación entre linaje de SAMR-AC y tipo de infección	52
2.3-Factores de virulencia	52
2.4-Producción de biopelículas.....	55
2.5-Funcionalidad del locus <i>agr</i>	56
3-Análisis comparativo de la virulencia de los clones SAMR-AC ST30-IVc y ST5-IVa en modelos de infección experimental.....	58
3.1-Characterísticas de las cepas de SAMR-AC utilizadas.....	58

3.2-Velocidad de crecimiento.....	58
3.3-Infección de piel.....	60
3.4-Infección ósea.....	63
3.5-Infección respiratoria.....	65
4-Análisis de la expresión de genes de virulencia.....	65
Discusión.....	68
Conclusiones.....	78
Anexo metodológico I.....	80
Anexo metodológico II.....	90
Bibliografía.....	100
Resumen.....	112

Abreviaturas

Abreviaturas

ACME	<i>Arginine catabolic mobile element</i> - Elemento móvil para el catabolismo de la arginina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ANOVA	Análisis de la Varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Bbp	<i>Bone sialoprotein binding protein</i> - Proteína de unión a sialoproteína ósea
BHI	<i>Brain Heart infusion</i> - Caldo infusión cerebro corazón
BHIA	<i>Brain Heart infusion agar</i> - Agar infusión cerebro Corazón
CC	Complejo Clonal
Ccr	Casete cromosómico de recombinasas
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> - Centro de control y prevención de Enfermedades
Cif A y B	<i>Clumping factors A and B</i> - Factores de agregación A y B
CLI	Clindamicina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
Cna	<i>Collagen Binding protein</i> - Proteína de unión a colágeno
Col	colaboradores
Cq	Ciclo de cuantificación
c.s.p.	Cantidad suficiente para
dNTPs	Deoxiribonucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
Ebps	<i>Elastin Binding protein</i> - Proteína de unión a elastina
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético
Eno	Proteína de unión a laminina
ERY	Eritromicina
Fg	Fibrinógeno
Fib	<i>Fibrinogen Binding protein</i> - Proteína de unión a fibrinógeno
Fn	Fibronectina
FnBPA	<i>Fibronectin binding protein A</i> - Proteína A de unión a Fibronectina

FnBPB	<i>Fibronectin binding protein B</i> - Proteína B de unión a Fibronectina
G + C	Guanina + citosina
hVISA	<i>Staphylococcus aureus</i> heteroresistente a vancomicina
iMLS_B	Resistencia inducible a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B
IO	Índice osteomielítico
IPER	Infecciones de piel y estructuras relacionadas
kDa	Kilo Daltons
LPV	Leucocidina de Pantón-Valentine
Mbp	Mega pares de bases
ME	Matriz extracelular
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i> - Tipificación por secuenciación de múltiples <i>loci</i>
MSCRAMMs	<i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i> - Componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de matriz
NARSA	<i>Network on antimicrobial resistance in Staphylococcus aureus</i> - Red de resistencia antimicrobiana en <i>Staphylococcus aureus</i>
NRQ	<i>Normalized relative quantities</i> -Cantidad relativa normalizada
NTC	<i>No template control</i> -Control sin templado
OPS	Organización Panamericana de la Salud
pb	Pares de bases
PBP	<i>Penicillin binding protein</i> - Proteína de unión a penicilina
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsado
PSM	<i>Phenol-soluble modulín</i> - Modulina soluble en fenol
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
ReLAVRA	Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos
RQ	<i>Relative quantity</i> - Cantidad relativa
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa
SADI	Sociedad Argentina de Infectología
SAGs	Superantígenos
SAMR-AC	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina asociado a la comunidad
SAMR-AH	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina asociado al cuidado de la salud
SAMS	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a meticilina
SCCmec	Cassete cromosómico estafilococcico <i>mec</i>

SCN	<i>Staphylococcus coagulasa</i> negativo
Sdr	<i>Serine-Aspartate Repeat Protein</i> - Proteína con repeticiones de serina y aspartato
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SE	<i>Staphylococcal enterotoxin</i> -Enterotoxina estafilocócica
SERAM	<i>Secretable Expanded Repertoire Adhesion Molecules</i>
Spa	<i>Staphylococcal protein A</i> - Proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i>
ST	Secuenciotipo
TAE	Buffer Tris-Acetato-EDTA
TBE	Buffer Tris-Borato-EDTA
TE	Buffer Tris-EDTA
TES	Buffer Tris-EDTA-Sacarosa
TMS	Trimetoprima-Sulfametoxazol
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i> - Agar Tripeina Soya
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i> - Caldo Tripteina Soya
TSST-1	Toxina del síndrome de shock tóxico
UFC	Unidad formadora de colonia
UFC/ml	Unidad formadora de colonia por mililitro
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i> - Método de agrupamiento de pares por la media aritmética no ponderada
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> con sensibilidad intermedia a vancomicina
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a vancomicina
vWF	Factor de vonWillebrand

Introducción

Introducción

***Staphylococcus aureus*: generalidades**

Staphylococcus aureus es un coco Gram positivo que pertenece a la familia *Staphylococcaceae*, la cual agrupa a otros géneros como *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus*, *Salinicoccus* y *Nosocomiicoccus*. Las especies del género *Staphylococcus* son anaerobios facultativos, no esporulados, inmóviles, dan positiva la prueba de la catalasa y son capaces de crecer en medios con alta concentración salina entre 18°C y 40°C.

S. aureus produce las enzimas coagulasa, DNAsa y fermenta el manitol, características de gran utilidad para su identificación. Su genoma está compuesto de un único cromosoma de aproximadamente 2,8-2,9 Mpb con un bajo contenido de G + C y plásmidos de distintos tamaños según la cepa. Debido a los planos de división celular generalmente se dispone en forma de racimos (Figura 1).

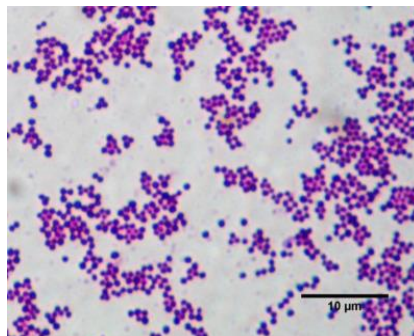


Figura 1- Observación microscópica de *S. aureus* (tinción de Gram)

S. aureus es el patógeno humano más importante dentro del género, seguido por *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* y *Staphylococcus lugdunensis*. No tiene requerimientos nutricionales especiales por lo que se lo recupera fácilmente en medios de cultivo generales, en los cuales forma colonias de color amarillo claro o blancas de 1 a 3 mm de diámetro a las 24hs de incubación a 35°C-37°C [1].

Importancia clínica

El hábitat y reservorio principal de *S. aureus* es la piel y mucosas de los mamíferos. Se estima que el 15-36% de toda la población humana está colonizada, principalmente en el vestíbulo nasal. Se pueden distinguir dos tipos de portadores, persistentes e intermitentes, siendo el primer grupo el que presenta mayor carga bacteriana y un mayor riesgo de adquirir una infección por la misma cepa de *S. aureus* colonizante. El sitio de colonización, además del nasal, puede ser axilar, faríngeo, inguinal, perineal y vaginal [2, 3].

La transmisión ocurre por contacto directo de la piel con personas colonizadas o infectadas o a través de objetos contaminados.

Los principales cuadros clínicos producidos por *S. aureus* son infecciones de la piel y tejidos blandos, como forunculosis, abscesos, impétigo, erisipela, celulitis y piomiositis, entre otros [4]. Además de las infecciones de piel y tejidos relacionados, es un importante agente causal de infecciones invasivas, como osteomielitis, artritis séptica, meningitis, bacteriemia, endocarditis y neumonía en pacientes hospitalizados e incluso en pacientes inmunológicamente competentes. Otras patologías relevantes provocadas por este patógeno son el síndrome del shock tóxico e intoxicaciones alimentarias por ingestión de enterotoxinas preformadas [5].

En Argentina, es el microorganismo más frecuentemente aislado en infecciones de sitio quirúrgico, representando entre el 23% y el 35% de todos los aislamientos [6]. Según un informe del programa nacional de vigilancia de infecciones hospitalarias (VIHDA) de 2012, *S. aureus* representa el tercer microorganismo que se aísla con mayor frecuencia en pacientes adultos hospitalizados [7].

La virulencia y la capacidad de adquirir determinantes de resistencia antimicrobiana convierten a *S. aureus* en un patógeno exitoso que requiere medidas de vigilancia, prevención y control, tanto en el ámbito hospitalario como en la comunidad.

Factores de virulencia

Distintas cepas de *S. aureus* producen una extensa diversidad de factores de virulencia, los cuales facilitan, entre otros, la adhesión bacteriana, la evasión de mecanismos del sistema inmunológico, la producción de daño celular y tisular por medio de toxinas y la formación de biopelículas.

Adhesinas

S. aureus presenta la habilidad de adherirse a muchos componentes de la matriz extracelular (ME) y proteínas séricas del hospedador. Para ello utiliza una gran variedad de moléculas de adhesión, MSCRAMMs (del inglés *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*), también llamadas adhesinas. Estas moléculas se encuentran unidas a la superficie de la bacteria de forma covalente o no covalente y, además de mediar la adhesión a la ME, pueden obstaculizar la acción del sistema inmune innato y promover la internalización de *S. aureus* en células eucariotas [8, 9]. La mayoría de las adhesinas tienen funciones solapadas, ya que distintas proteínas se unen a los mismos elementos de ME o de la sangre. También una misma adhesina puede unirse a múltiples ligandos. La habilidad de unirse a moléculas diana en el hospedador es fundamental para la colonización y la diseminación dentro del mismo.

Dentro de las MSCRAMMs más estudiadas se encuentran las proteínas de unión a fibronectina (FnBPs), de las cuales se conocen dos variantes: FnBPA y FnBPB, expresadas predominantemente en la fase de crecimiento exponencial. A través del dominio C-terminal ambas proteínas se unen a fibronectina (Fn) y por el extremo N-terminal pueden adherirse a elastina. FnBPA contiene además un dominio de unión a fibrinógeno, llamado dominio A, de secuencia y estructura similar al dominio de unión a fibrinógeno de otras MSCRAMMs [10]. Las FnBPs actúan como invasinas, ya que permiten la internalización de *S. aureus* en células fagocíticas no profesionales, como células endoteliales, queratinocitos, osteoblastos, fibroblastos y células epiteliales. La invasión ocurre cuando se forma un puente de Fn entre la FnBP y la integrina $\alpha_5\beta_1$ de las células eucariotas, hecho que desencadena el rearreglo del citoesqueleto de actina y la posterior endocitosis de la bacteria [11, 12]. Se postula que la internalización en células no fagocíticas representa un mecanismo de evasión frente a la respuesta inmune y a la acción de los agentes antimicrobianos [10]. Asimismo podría

permitir la salida y entrada del patógeno al sistema vascular, lo que favorecería la diseminación de la infección [8].

Las FnBPs también promueven la agregación plaquetaria, especialmente durante la fase de crecimiento exponencial [13]. La agregación plaquetaria y la formación de trombos sobre las válvulas cardíacas por la unión bacteria-plaqueta es un paso esencial en la patogénesis de la endocarditis infecciosa, entidad de la cual *S. aureus* es el principal agente causal [14].

Las proteínas de unión a fibrinógeno, factores de agregación o “clumping factors” (Clf) son dos proteínas de superficie (ClfA y ClfB) que comparten aproximadamente un 27% de identidad en su secuencia aminoacídica y se unen a la molécula de fibrinógeno (Fg) a través de distintas cadenas polipeptídicas de la misma [8]. Se demostró que ambas proteínas pueden unirse a las plaquetas e inducir su agregación [15]. ClfA inhibe la fagocitosis de *S. aureus* por macrófagos y leucocitos polimorfonucleares *in vitro* [16, 17] y favorece la inactivación del factor del complemento C3b [18]. ClfB es un factor clave en la colonización nasal [19] siendo su principal ligando la proteína loricrina del estrato córneo del vestíbulo nasal, a la que se une con alta afinidad [20].

Debido a su organización estructural, Las proteínas Clf pertenecen a una familia de proteínas llamada Sdr (contienen un dominio de repeticiones de dipéptidos de serina y ácido aspártico), dentro de la cual se encuentran las proteínas SdrC, SdrD y SdrE [8]. Una variante de SdrE, denominada Bbp, es capaz de unirse a la sialoproteína ósea y al fibrinógeno [21]. SdrE, por su parte, presenta una leve actividad como pro-agregante plaquetario [15] y ambas, SdrE y Bbp, se unen al regulador del sistema de complemento C4BP e inhiben la opsonización bacteriana [22].

S. aureus se une a otros componentes de la ME a través de moléculas específicas como la proteína de unión a colágeno (Cna), la proteína de unión a elastina (EbpS) y la enolasa, o proteína de unión a laminina (Eno). Cna inhibe la activación del sistema de complemento por la vía clásica [23] y su adherencia al colágeno es importante en el desarrollo de osteomielitis en un modelo experimental [24]. Lopes y colaboradores han propuesto que la capacidad de atravesar la vasculatura se correlacionaría con la afinidad por la laminina, ya que dicha afinidad es una característica de las células neoplásicas y otras células que atraviesan la membrana basal [25].

La Proteína A de *S. aureus* (SpA) es una importante molécula de superficie que le otorga a la bacteria la capacidad de unirse a múltiples ligandos y evadir el sistema inmune. La primera función descrita fue la afinidad por la porción Fc de los anticuerpos IgG [26]. Esta unión impide el reconocimiento de *S. aureus* por neutrófilos y la activación del sistema del complemento por la vía clásica. Otros ligandos descritos para SpA son el factor de von Willebrand (vWF) y el receptor gC1qR, expuesto en las plaquetas activadas [27, 28]. Dichas interacciones podrían contribuir a la localización de *S. aureus* en los sitios donde existe daño endotelial y facilitar el desarrollo de trombosis. La proteína A es reconocida por los receptores TNF α (TNFR1) y EGF (EGFR) en células epiteliales, macrófagos, neutrófilos y queratinocitos a través del dominio de unión a IgG, e induce una respuesta inflamatoria que favorece el daño tisular y el desarrollo de neumonía en un modelo experimental [29, 30]. Además de activar TNFR1, induce la pérdida de este receptor de la superficie celular incluso antes de la liberación de su ligando TNF α , lo que modula la respuesta inflamatoria debida a TNF α y favorece el desarrollo de una infección sistémica por *S. aureus* en un modelo murino [31].

Otras adhesinas como la proteína de adherencia extracelular (Eap) y la proteína de unión a fibrinógeno (Fib), a diferencia de las descritas anteriormente, son secretadas al medio extracelular y se las denomina SERAM (del inglés *Secretable Expanded Repertoire Adhesion Molecules*) [32].

Toxinas

Luego de la adhesión a los tejidos del hospedador y la colonización inicial, *S. aureus* produce una serie de toxinas secretadas que son factores fundamentales para el desarrollo de una infección, dentro de las cuales se incluyen toxinas formadoras de poros, superantígenos y enzimas con diversas funciones [33].

La leucocidina de Panton-Valentine (LPV) es una toxina de dos componentes capaz de formar poros en la membranas, especialmente en neutrófilos, luego de la interacción con los receptores del factor C5a del complemento (C5aR y C5L2) [34]. Está codificada en los genes *lukS-PV* y *lukF-PV*, los cuales se encuentran localizados en un profago. La acción de la toxina es dependiente de la concentración, ya que una alta concentración de LPV provoca la necrosis de neutrófilos humanos *in vitro* mientras que bajas concentraciones inducen la

apoptosis de neutrófilos [35] y su activación con la consecuente liberación de citoquinas y enzimas [36]. La mayoría de las cepas de *S. aureus* resistentes metilicina aisladas en infecciones de origen comunitario producen LPV, por lo que, en general, se la considera un marcador molecular de este tipo de cepas [37].

La toxina alfa o hemolisina alfa (Hla) provoca la lisis de muchos tipos celulares como eritrocitos, monocitos, queratinocitos y células endoteliales mediante su capacidad de formar poros en membranas citoplasmáticas [38]. Reconoce a la molécula ADAM10 como receptor, especialmente a bajas concentraciones de la toxina, lo que da lugar a la formación de un poro y la activación de dicho receptor [39]. En un modelo murino de infección de piel, Tkaczyk y col., describieron que la inmunización previa con anticuerpos monoclonales anti-Hla disminuye el tamaño de las lesiones en la piel y la dermonecrosis observada [40], lo que indica que Hla desempeña un papel importante en la severidad este tipo de infecciones. La hemolisina gamma (Hlg) provoca la lisis de eritrocitos humanos al unirse a sus membranas, por lo que se postula que es un factor que ayuda a la supervivencia de *S. aureus* en sangre humana [41].

Otras toxinas de *S. aureus* que son capaces de formar poros en la membrana citoplasmática eucariota son las modulinas solubles en fenol (PSM), péptidos anfipáticos con acción citolítica que actúan sin necesidad de unirse a un receptor. Los genes codificantes de las PSM están localizados en tres sitios distintos del genoma. El grupo más importante en cuanto a su patogenicidad es el operón *psm α* , el cual comprende cuatro péptidos (PSM α 1-PSM α 4). El operón *psm β* incluye a los péptidos PSM β 1 y PSM β 2 y, una tercer PSM, también conocida como toxina δ , está codificada dentro del sistema de regulación global *agr* [42]. Los péptidos PSM α provocan la muerte de eritrocitos y leucocitos, incluso luego de la fagocitosis por neutrófilos, ya que permiten la salida de *S. aureus* del fagosoma y la posterior lisis celular [43]. A bajas concentraciones se unen al receptor FPR2 en la superficie de los neutrófilos humanos e inducen una respuesta inflamatoria [44].

Algunas cepas de *S. aureus* expresan superantígenos (SAGs), los cuales tienen como característica la capacidad de inducir fiebre alta, una respuesta inflamatoria exacerbada y la proliferación inespecífica de linfocitos T. Dentro de esta familia se encuentra la toxina TSST-1, responsable del síndrome del shock tóxico, y las enterotoxinas estafilocócicas (SE), involucradas en infecciones transmitidas por alimentos y con propiedades eméticas. Se

conocen distintas variantes de SEs denominadas según el orden en que fueron descritas (SEA hasta SEJ) y otras llamadas “Staphylococcal enterotoxin-like”, las cuales se clasifican así porque no presentan, o no se conoce su propiedad emética [45].

Otros factores de virulencia producidos y secretados por *S. aureus* tienen actividad enzimática. Algunos ejemplos son las enzimas lipasa, colagenasa, coagulasa, aureolisina (actúa como proteasa), esfingomielinasa y nucleasa [33].

Se ha descrito un elemento móvil denominado ACME (del inglés *Arginine Catabolic Mobile Element*) presente en algunas cepas virulentas de *S. aureus*, que confiere a la bacteria una ventaja para colonizar más eficientemente la piel humana [46].

Algunos de los factores de virulencia como Hla o PSMs se encuentran codificados en el genoma conservado o en islas de patogenicidad presentes en la mayoría de las cepas de *S. aureus*. Otros, como LPV o SEs, se localizan en profagos u otros elementos genéticos móviles.

Formación de biopelículas

La habilidad de *S. aureus* para formar biopelículas, o *biofilms*, favorece el desarrollo de infecciones persistentes, especialmente en pacientes con dispositivos externos como prótesis o catéteres. La biopelícula es una comunidad de bacterias adherida a una superficie inerte o animada embebida en una matriz de material proteico, polisacárido y ADN extracelular [47].

La formación de una biopelícula comienza con la adherencia de *S. aureus* a una superficie mediante las MSCRAMMs, seguida por la replicación y la adhesión entre células bacterianas a través del material que conforma la matriz. El componente de la matriz más estudiado es el polisacárido de adhesión intercelular (PIA) codificado en el operón *icaADBC* [48], aunque también *S. aureus* puede formar biopelículas independientes de PIA [47].

La organización de la biopelícula otorga una gran impermeabilidad a los agentes antimicrobianos y a los componentes del sistema inmunológico del hospedador, lo que dificulta notablemente el tratamiento de la infección. En el caso de estar formada sobre un agente externo el mejor tratamiento es la remoción del mismo. [47].

Expresión de factores de virulencia. El sistema Agr

La expresión de los factores de virulencia de *S. aureus* se encuentra bajo el control de diversos sistemas reguladores, tales como el sistema Agr (*accessory gene regulator*), SarA (*staphylococcal accessory regulator*), ArlRS (*autolysis-related locus*) y otros [49].

El sistema Agr actúa según la densidad de la población bacteriana (*quorum sensing*) y se activa en la transición de la fase de crecimiento exponencial a la fase estacionaria. Regula positivamente la expresión de las toxinas secretadas e inhibe la expresión de las adhesinas, a través una molécula de RNA efectora llamada RNAIII [50]. El sistema se activa cuando se acumula el péptido autoinductor (AIP) producido por la misma cepa en el medio extracelular y éste activa al sistema de dos componentes formado por AgrA/AgrC. AgrA finalmente estimula la transcripción de todos los genes del sistema (Figura 2).

Las proteínas AgrB/AgrD son las encargadas de producir y secretar AIP, y sus genes codificantes (*agrB/agrD*) forman parte de la región variable del locus *agr*. Dicha variabilidad se utiliza para genotipificar cepas de *S. aureus* [51] y también constituye un mecanismo de supervivencia bacteriana, ya que el AIP producido por una cepa estimula su propio sistema pero inhibe el locus *agr* de cepas de otro grupo [52].

El gen de la hemolisina δ (*hld*) se transcribe junto con RNAIII, por lo que se ha propuesto que la detección de la actividad de esta toxina sirve como marcador de la funcionalidad del locus *agr* [53].

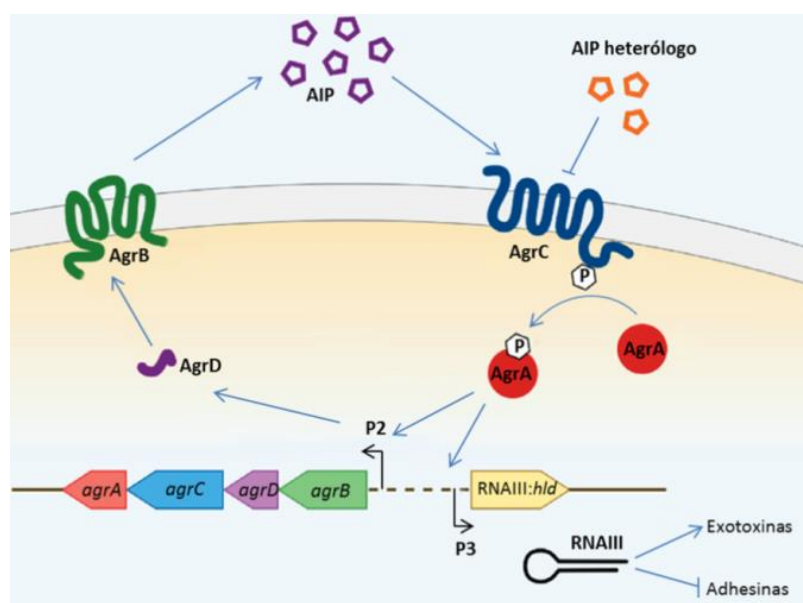


Figura 2- Esquema del sistema Agr. Adaptado de Painter y colaboradores [52]

Evolución de la resistencia a antibióticos β -lactámicos

S. aureus es naturalmente sensible a todos los antibióticos, aunque exhibe una gran habilidad para adquirir mecanismos de resistencia. Antes de la introducción de la penicilina en la práctica clínica la mortalidad de las infecciones por *S. aureus* era alrededor del 80% [54], hecho que se revirtió con el descubrimiento y la aplicación de este antimicrobiano. Sin embargo, pocos años más tarde, se detectaron cepas de *S. aureus* resistentes a penicilina causantes de infecciones nosocomiales, las que luego se convirtieron en un problema de salud también en la comunidad y hacia el final de los años 1950s en un problema global [55]. Actualmente el 90% de las cepas de *S. aureus* son resistentes a penicilina debido a la adquisición de un plásmido que contiene al gen *blaZ*, el cual codifica una enzima con actividad penicilinasas.

En el año 1959 se introdujo el antibiótico metilina, una penicilina semisintética resistente a penicilinasas. Dos años más tarde se comunicó por primera vez la emergencia de cepas de *S. aureus* resistentes a metilina (SAMR) [56]. A partir de ese momento, a lo largo de los años SAMR se convirtió en uno de los principales patógenos recuperados de infecciones nosocomiales y comunitarias [57].

Los antibióticos β -lactámicos, como penicilina y metilina, provocan la pérdida de viabilidad bacteriana al inhibir la síntesis del peptidoglicano luego de unirse de forma covalente a las proteínas de unión a penicilina (PBPs).

S. aureus posee al menos cuatro tipos de PBPs, PBP2 con actividad transglicosilasa y transpeptidasa, PBP1 y PBP3 con actividad transpeptidasa y PBP4 con actividad carboxipeptidasa. Las cepas SAMR presentan una PBP extranumeraria denominada PBP2a o PBP2' adquirida por transferencia horizontal y codificada en el elemento *SCCmec* (*Staphylococcal Chromosomal Cassette mec*)

La presencia de PBP2a implica resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes) excepto ceftarolina. Esta cefalosporina de "quinta generación" posee un amplio espectro de acción y es activa frente a SAMR. Los antibióticos β -lactámicos suelen ser la primera elección para el tratamiento de infecciones por *S. aureus*, por su alta eficacia y seguridad, por lo cual la resistencia a esta familia constituye un problema de salud pública altamente relevante.

El elemento SCCmec

La resistencia a meticilina se debe a la adquisición del elemento genético *SCCmec*, que contiene varios genes y entre ellos al gen *mecA*, el cual codifica una proteína denominada PBP2a que presenta una afinidad disminuida por los antibióticos β -lactámicos. El *SCCmec* se incorpora al cromosoma bacteriano en una región específica, en el extremo 3' de un marco abierto de lectura con función desconocida (*orfX*) [58].

En la organización genética del *SCCmec* se distinguen dos complejos de genes principales, el complejo *mec* y el complejo *ccr*, unidos a través de regiones denominadas "J" (*Junkyard*). La región J1 se extiende desde el *ccr* hasta el final del *SCCmec*, la región J2 entre los complejos *mec* y *ccr* y la región J3 entre el complejo *mec* y el *orfX* [59].

El complejo *mec* está formado por el gen *mecA*, dos genes que codifican proteínas reguladoras llamadas MecR1 y MecI y secuencias de inserción asociadas. La proteína MecR1 al detectar la presencia de antibióticos β -lactámicos en el ambiente extracelular, sufre un clivaje autocatalítico y mediante su dominio citoplasmático cliva a la proteína MecI (inhibidora de la transcripción de *mecA*). La producción de PBP2a, por su baja afinidad a dichos antibióticos, permite a las cepas SAMR seguir sintetizando peptidoglicano y sobrevivir en presencia de estas drogas [60].

Se han reconocido distintas clases de complejo *mec* según su organización genética. El complejo *mec* de clase A tiene los genes *mecA/mecR1/mecl* completos y se encuentra en los *SCCmec* II, III y VIII. Otros complejos presentan el gen *mecA* completo y los genes *mecR1/mecl* parcial o totalmente truncados, debido a inserciones de elementos móviles como las secuencias de inserción IS431 o IS1272 [59].

En todos los tipos de *SCCmec* se encuentran genes codificantes de recombinasas, esenciales para la integración/escisión del casete en el cromosoma bacteriano. Las recombinasas están codificadas en el complejo *ccr* (*cassette chromosome recombinase*) por la combinación de los genes *ccrA* y *ccrB* (*ccrAB*) de los cuales existen distintos alotipos, o por el gen *ccrC* [59].

En base a la clase de complejo *mec* y al tipo de recombinasa se han definido diferentes tipos de *SCCmec* (Figura 3 y Tabla 1). Hasta el momento se conocen XII tipos de *SCCmec* e incluso variantes dentro de un mismo tipo basadas en polimorfismos de las

regiones J. Los SCCmec de mayor tamaño, por ejemplo II y III, en general contienen genes accesorios en las regiones J, como genes de resistencia a otras familias de antibióticos o a metales pesados. Los SCCmec de menor tamaño, como el IV y el V, representan un menor costo energético para las bacterias [61, 62].

El SCCmec tipo XI fue descrito en el año 2011 en una cepa de SAMR llamada LGA251, aislada de ganado bovino [63]. El SCCmec XI posee un gen *mec* con un 69% de identidad con el gen *mecA* denominado *mecA_{LGA251}*, posteriormente renombrado como *mecC* [64]. Este gen no es detectado por las reacciones de PCR convencionales para amplificar *mecA*, aunque otorga un fenotipo de resistencia similar.

El último casete identificado fue el SCCmec tipo XII, el cual tiene como particularidad que presenta en el complejo *ccr* un nuevo alotipo del gen *ccrC* (*ccrC2*). Además posee un complejo *mec* de estructura similar al complejo *mec* clase C2, aunque carece de una de las IS431 [62].

SCCmec	Complejo <i>ccr</i>	Complejo <i>mec</i>
I	1 (A1B1)	clase B (IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS1272)
II	2 (A2B2)	clase A (IS431- <i>mecA</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecI</i>)
III	3 (A3B3)	clase A (IS431- <i>mecA</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecI</i>)
IV	2 (A2B2)	clase B (IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS1272)
V	5 (C1)	clase C2 (IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS431)*
VI	4 (A4B4)	clase B (IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS1272)
VII	5 (C1)	clase C1 (IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS431)**
VIII	4 (A4B4)	clase A (IS431- <i>mecA</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecI</i>)
IX	1 (A1B1)	clase C2 (IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS431)*
X	7 (A1B6)	clase C1 (IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS431)**
XI	8 (A1B3)	clase E (<i>blaZ</i> - <i>mecA_{LGA251}</i> - <i>mecR1_{LGA251}</i> - <i>mecI_{LGA251}</i>)
XII	9 (C2)***	clase C2-like (Δ IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS431)***

Tabla 1- Clasificación de los tipos de SCCmec según los complejos *mec* y *ccr* de acuerdo a las recomendaciones del grupo internacional de trabajo para la clasificación de elementos SCCmec (IWG-SCC, <http://www.sccmec.org>). Los complejos *ccr* se identifican con un número del 1 al 8 según la combinación de alelos de los genes *ccrA* y *ccrB* o el alotipo de *ccrC*. Las clases de complejos *mec* se definen según la organización y presencia o ausencia de los genes *mecA*/*mecR1*/*mecI*, secuencias de inserción y otros genes como *blaZ*. *Las secuencias de inserción IS431 están orientadas en sentidos opuestos, ** Las secuencias de inserción IS431 están orientadas en el mismo sentido, *** El nombre de los complejos corresponde al asignado por los autores [62].

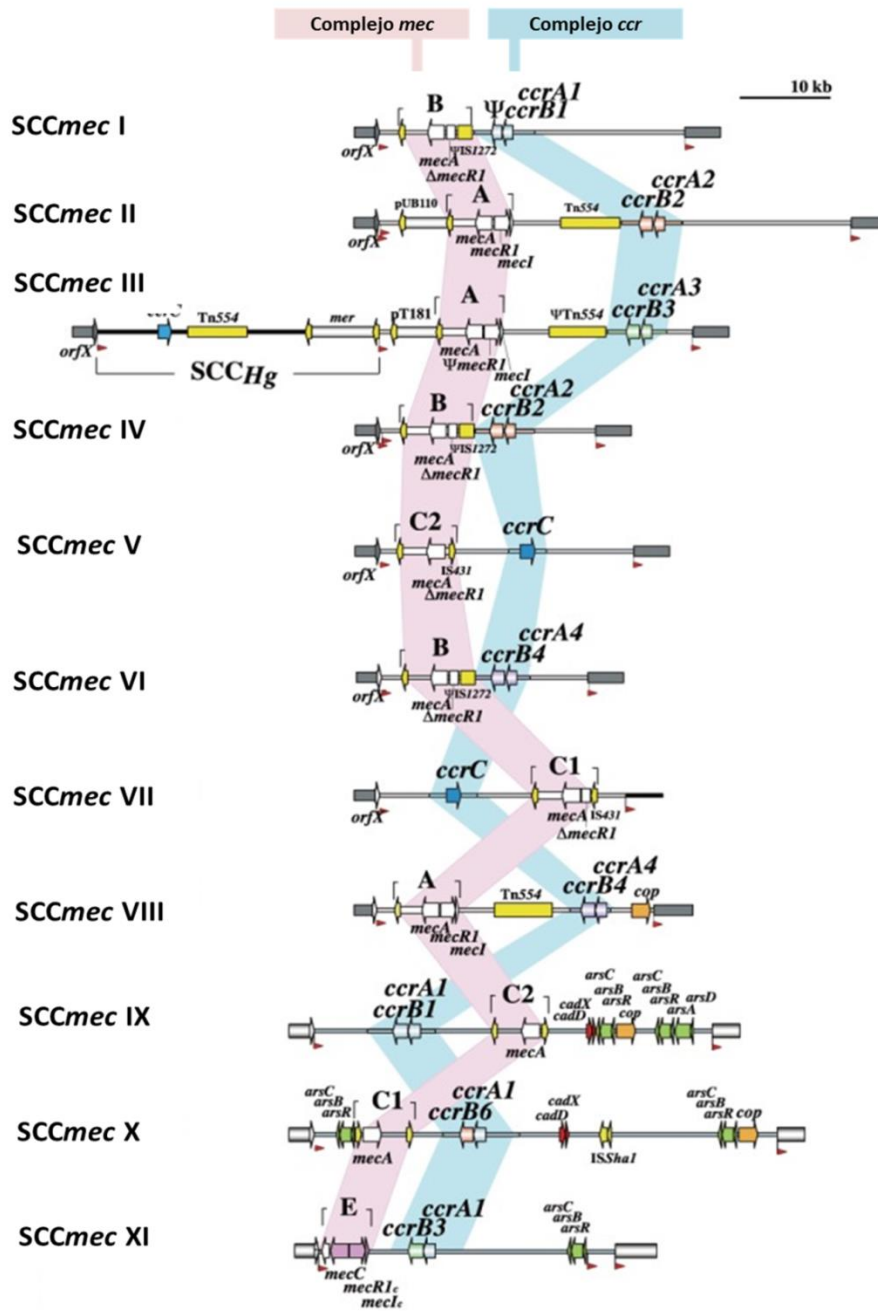


Figura 3- Estructura de los SCCmec I a XI. Adaptado de Hiramatsu y colaboradores, 2013 [61]

Métodos de tipificación molecular para el estudio de SAMR

Durante las últimas décadas se desarrollaron distintos métodos para tipificar cepas de SAMR y estudiar su diseminación. Existen métodos basados en la obtención de perfiles de bandas y otros basados en la secuenciación del ADN. Ambos tipos de métodos son ampliamente utilizados y su aplicación depende del objetivo buscado.

Las técnicas más utilizadas actualmente son la electroforesis de campo pulsado (PFGE, *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), la tipificación por secuenciación de múltiples *loci* (MLST, *Multilocus sequence typing*), el estudio del polimorfismo del gen *spa* (*spa typing*) y la tipificación del casete SCC*mec*. También existen métodos basados en la obtención de perfiles de bandas en geles de agarosa mediante la amplificación de fragmentos de ADN al azar por PCR con cebadores inespecíficos (RAPD, Random Amplification of Polymorphic DNA). Cabe aclarar que las mismas técnicas se utilizan para el estudio de SAMS.

La tipificación de cepas de SAMR tiene como objetivo estudiar la relación clonal entre distintos aislamientos de la misma especie, ya sea para estudios de epidemiología local como global. En el primer caso el objetivo puede ser la detección de un brote o la identificación de la fuente de una infección y en el segundo la comparación de aislamientos recuperados con diferencias geográficas y/o temporales para trazar de manera precisa la diseminación de líneas clonales. Para cada objetivo se pueden utilizar distintas técnicas, habitualmente combinadas entre sí para obtener mayor información.

La electroforesis de campo pulsado (PFGE) se basa en la separación de fragmentos de ADN a partir de la digestión del genoma bacteriano completo con enzimas de restricción de corte poco frecuente. Al haber pocos sitios de restricción se generan escasos fragmentos de tamaños entre 50-2000 kb que son separados en un gel de agarosa a través de la aplicación de campos eléctricos en diferentes direcciones. A lo largo de la corrida electroforética aumenta la duración de los pulsos eléctricos. Los fragmentos de ADN se separan en base a la facilidad para reorientarse en las distintas direcciones del campo eléctrico, característica que depende de su tamaño. Como resultado se generan perfiles de bandas llamados “pulsotipos” [65]. El PFGE es considerado la técnica de referencia por su alto índice discriminatorio y reproducibilidad, especialmente para la investigación de brotes, aunque las desventajas son la laboriosidad, el tiempo que consume y el costo.

Los métodos basados en secuenciación de genes poseen la ventaja de que la información puede ser compartida fácilmente por distintos laboratorios en cualquier lugar del mundo y se han generado bases de datos para disponer de información globalizada y accesible a diferentes usuarios. Entre ellos, la secuenciación de múltiples *loci* (MLST) se basa en el estudio de los polimorfismos de fragmentos internos de siete genes con funciones metabólicas conservadas o *housekeeping*. Se amplifica un fragmento de 450-500pb de cada gen y en base a las secuencias de ADN se establece un perfil alélico que será la combinación de los siete alelos asignados por comparación con una base de datos disponible (<http://www.mlst.net>). Cada perfil alélico generado representa un secuenciotipo (ST). La información que brinda MLST refleja el genoma conservado en donde los cambios se acumulan lentamente, por lo que es una técnica que permite establecer la evolución de las líneas clonales a través del tiempo y su diseminación geográfica. Los resultados son reproducibles y fácilmente intercambiables entre laboratorios [66, 67]. Los aislamientos que poseen un mínimo de cinco alelos idénticos pertenecen al mismo complejo clonal (CC). Se ha combinado el MLST con un algoritmo llamado BURST (Based Upon Related Sequence Types) para establecer los complejos clonales y conocer el genotipo fundador de cada CC.

Otra técnica basada en secuenciación de ADN es la tipificación del polimorfismo del gen *spa* o "*spa typing*", con un poder discriminatorio intermedio entre PFGE y MLST. El gen codificante de la proteína A de *S. aureus* (*spa*) contiene una región polimórfica (región X) que consiste en repeticiones en tándem de secuencias de alrededor de 24 pb. El tipo de secuencias, el orden y el número de esas repeticiones son utilizados para establecer un "*spa* tipo", mediante la comparación con una base de datos (<http://www.spaserver.ridom.de>). La región polimórfica está flanqueada por secuencias conservadas que permiten utilizar cebadores para amplificar la región X y posteriormente conocer la secuencia de ADN [68]. Los cambios que se acumulan en esta región pueden ser por mutaciones puntuales, deleciones o duplicaciones de las repeticiones, y ocurren con mayor velocidad que en el caso de un gen conservado como los utilizados en el esquema de MLST. Esto permite que el *spa* typing se utilice para estudiar eventos de epidemiología local o global [69] con la ventaja de presentar menor laboriosidad y costo y una buena correlación con la información aportada por MLST [70].

La tipificación del casete *SCCmec* se realiza mediante reacciones de PCR para establecer las clases de complejos *mec* y *ccr*. El conocimiento del tipo de *SCCmec* es fundamental para describir un clon de SAMR, pero no suficiente, por lo que debe acompañarse por otras técnicas de tipificación como las descritas anteriormente.

Epidemiología molecular de las infecciones por SAMR

Con el advenimiento de las técnicas de tipificación molecular se pudo conocer la dinámica y la estructura poblacional de SAMR, la evolución y dispersión de clones epidémicos [71, 72] y la diferenciación de clones típicamente “hospitalarios” de aquellos “comunitarios” [73]. Asimismo Enright y colaboradores propusieron una nomenclatura de los clones de SAMR en base a la información suministrada por distintas técnicas, que incluye mínimamente al secuenciotipo y al tipo de *SCCmec* (ej. ST5-IV) y adicionalmente al tipo de *spa* (ej. ST5-IV-t311) [74].

S. aureus posee una estructura poblacional de tipo clonal, es decir, a diferencia de otras especies de cocos gram positivos, evoluciona con mayor probabilidad a través de mutaciones puntuales que por procesos de recombinación [75]. Los clones epidémicos de SAMR más prevalentes se agrupan en relativamente pocos complejos clonales (CC1, CC5, CC8, CC22, CC30, CC45, CC59, y CC80) [76].

Luego de la primera descripción de SAMR en el año 1961, la resistencia a meticilina en esta especie se limitó inicialmente al ámbito hospitalario. Pero alrededor del año 1993, SAMR emergió como un patógeno de la comunidad cuando se describió un brote por SAMR en una comunidad remota de Australia, sin ningún contacto con el sistema de salud, en pacientes previamente sanos [77]. Esto dio lugar al concepto de SAMR adquirido en la comunidad (SAMR-AC). A partir de esa primera descripción ocurrieron muchas más en diferentes lugares del mundo, e incluso se encontraron cepas típicamente comunitarias como causa de infecciones intrahospitalarias [76].

En el año 2003 se describió una nueva clasificación de SAMR, al conocerse infecciones en humanos por cepas que habitualmente provocan infecciones en animales, poniendo en evidencia la capacidad de transmisión zoonótica. A estas cepas se las denominó SAMR-LA, por *livestock-associated methicillin resistant S. aureus* [78].

S. aureus resistente a meticilina asociado al cuidado de la salud (SAMR-AH)

Se define a una infección como asociada al hospital, o asociada al cuidado de la salud (*healthcare-associated*) a la producida por SAMR en pacientes con factores de riesgo tradicionales que se relacionan con el sistema de salud, como la admisión a una unidad de cuidados intensivos o residencias en establecimientos de cuidado de la salud, antecedentes de cirugías, diálisis, tratamiento inmunosupresor, uso de catéteres o dispositivos que atraviesen la piel al momento de la consulta o en el año previo a la infección. En algunos estudios, las infecciones por SAMR-AH se distinguen además según su lugar de inicio. Si la infección ocurre después de las 48hs de admisión al hospital se considera una infección de inicio nosocomial, por el contrario, si es previa a las 48hs de admisión la infección es de inicio en la comunidad [79].

En un estudio de vigilancia realizado entre los años 1997 y 1999 se detectaron distintos porcentajes de prevalencia de SAMR en los hospitales, 23% en Australia, 67% en Japón, 40% en Sudamérica, 32% en Estados Unidos y 26% en Europa. Dentro de cada región los porcentajes variaron según el país estudiado [80]. En los últimos años, SAMR fue reportado como el patógeno nosocomial más frecuente en muchos lugares del mundo [57].

Las infecciones hospitalarias por SAMR, comparadas con las producidas por *S. aureus* sensible a meticilina (SAMS) se asocian a una mayor estadía en el hospital, mayor mortalidad y altos costos para el sistema de salud [81, 82].

Las cepas de SAMR que tradicionalmente se encontraban en infecciones asociadas al cuidado de la salud (SAMR-AH) presentan tipos de casete *SCCmec* I, II y III y multiresistencia, es decir, resistencia a múltiples familias de antimicrobianos además de la resistencia a antibióticos β -lactámicos. No obstante, cada vez con mayor frecuencia se observan infecciones intrahospitalarias provocadas por cepas de SAMR que no presentan resistencia acompañante y portan casetes *SCCmec* de menor tamaño, las cuales se asocian generalmente a infecciones de inicio en la comunidad [83, 84].

Los clones de SAMR-AH epidémicos pertenecen en su mayoría a los complejos clonales 1, 5, 8, 30, 22 y 45. Dentro del CC8, varios clones SAMR-AH han sido descritos como prevalentes en distintas regiones del mundo, como por ejemplo el primer SAMR descrito (Clon "Arcaico") se clasifica como ST250-*SCCmec*I, el ST247-I (clon "Ibérico") o el

ST239-III (clon “Brasileño/Sudamericano”), importante en la epidemiología de SAMR-AH en nuestro país y Sudamérica.

Dentro del CC5 se destaca el clon ST5-II (“Nueva York/Japón”), a partir del cual surgieron los primeros aislamientos con sensibilidad disminuida a vancomicina (VISA), uno de los antibióticos de elección en los casos de infecciones complicadas por SAMR. Este CC también agrupa al clon ST5-I (“Cordobés/ Chileno”), de frecuente recuperación en hospitales de Argentina. Dentro del complejo CC30 se destaca el ST36-II (UK-ERMISA-16) [73, 85].

S. aureus resistente a meticilina asociado a la comunidad (SAMR-AC)

La ocurrencia de infecciones por SAMR en pacientes sin factores de riesgo tradicionales para SAMR-AH y sin contacto previo con el sistema de salud dio la alarma para un nuevo fenómeno, el SAMR adquirido en la comunidad. Estos aislamientos se diferenciaron fenotípicamente y genotípicamente de los SAMR-AH, por ser sensibles a la mayoría de los antibióticos, excepto β -lactámicos, y presentar perfiles de PFGE diferentes [77]. Se cree que estas cepas se originaron a partir de la adquisición del elemento SCCmec en cepas SAMS de la comunidad.

Según el centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) se considera una infección por SAMR adquirida en la comunidad a aquella ocurrida fuera del ámbito hospitalario, en individuos sin factores de riesgo tradicionales para SAMR antes de transcurridas las 48hs de admisión al hospital.

A diferencia de las cepas SAMR-AH, la caracterización genética de los aislamientos de SAMR-AC indica que en general poseen un casete SCCmec de menor tamaño como IV, V y VI, carecen de resistencia acompañante y codifican para la leucotoxina LPV. El SCCmec IV y la LPV se consideran marcadores moleculares de las cepas SAMR-AC, aunque no todas presentan estas características [37].

Si bien las presentaciones clínicas más frecuentes por SAMR-AC son infecciones de piel y estructuras relacionadas (IPER), también puede causar infecciones invasivas con alta morbilidad y mortalidad como bacteriemias, osteomielitis, piomiositis, artritis séptica, neumonía necrotizante y meningitis [86, 87]. Un estudio de vigilancia en 9 centros de salud de Estados Unidos en el año 2007 mostró que el 14% de las infecciones invasivas por SAMR fueron debidas a SAMR-AC [79].

Dentro de las IPER por SAMR-AC más comunes se encuentran los abscesos, la forunculosis y celulitis, especialmente en niños y adultos jóvenes. La cirugía y el correcto drenaje de los abscesos suele ser suficiente para la curación, incluso sin necesidad de una terapia antimicrobiana. No obstante, es fundamental conocer la prevalencia de SAMR-AC en cada región para indicar una terapia empírica adecuada en los casos de IPER en donde sí es necesario aplicarla, ya que las lesiones de piel producidas por SAMR y SAMS son muy similares y la terapia incorrecta puede favorecer la complicación de las IPER con la posibilidad de desencadenar una infección invasiva [88].

Los factores de riesgo para SAMR-AC no están establecidos de manera clara pero se estima que la colonización nasal con SAMR implica un riesgo de infección posterior. Otros factores como la falta de higiene, la convivencia con personas infectadas, la práctica de deportes de contacto, el hacinamiento y el contacto con trabajadores de la salud han sido asociados con la ocurrencia de infección por SAMR-AC. En general, son los mismos factores de riesgo que para una infección por SAMS [88, 89].

El hecho de que las cepas de SAMR-AC ocasionen infecciones severas, muchas veces de mala evolución en personas sanas, muestra que poseen un mayor potencial patogénico que las cepas SAMR-AH. En un estudio realizado por Voyich y colaboradores, encontraron que las cepas MW2 y USA300 (representantes de SAMR-AC), son más virulentas en modelos animales y también tienen una mayor resistencia a la lisis por neutrófilos humanos, comparadas con cepas SAMR-AH [90]. Las cepas SAMR-AC producen mayores cantidades de factores de virulencia como hemolisina α y PSM α [91] y se replican con mayor velocidad [92].

Los clones predominantes de SAMR-AC pertenecen a los complejos clonales 1, 8, 22, 30, 59 y 80, dentro de los cuales se destacan el ST8-IV (conocido como "USA300"), ST30-IV (clon "South West Pacific", SWP), ST59-V (clon "Taiwan"), ST80-IV (clon "Europeo") y ST1-IV (WA-1 o USA400). Los clones ST8-IV y ST30-IV se consideran pandémicos ya que han sido recuperados de manera repetida en todos los continentes [93].

El clon ST30-IV fue originalmente descrito en Australia, pero en la actualidad se ha diseminado a Europa, Asia, Medio Oriente y Sudamérica [93]. El clon ST8-IV, o USA300, mayoritario en Estados Unidos, es uno de los clones más estudiados por su elevada virulencia y capacidad de diseminación. Ha causado numerosos brotes en ese país, y cada

vez con mayor frecuencia es reportado en otras partes del mundo como Europa, Canadá, Japón y Australia. En Colombia en el año 2006 se describió al clon que más tarde se renombró como variante latinoamericana de USA300 (USA300-LV), el cual se diferencia de USA300 porque posee un tipo de SCC*mecIV* distinto (IVc) y no codifica el elemento genético ACME, característico de USA300 [94, 95].

Recientemente se han detectado clones de SAMR-AC como causa de infecciones intrahospitalarias, lo que evidencia un cambio en la epidemiología de SAMR y desdibuja la división clásica entre SAMR-AH y SAMR-AC [84]. A través de un modelo matemático, D'Agata y colaboradores estiman que SAMR-AC se va a transformar en el SAMR predominante en los hospitales y centros de salud [96].

La virulencia y la alta capacidad de diseminación de SAMR-AC hacen que sea necesario fortalecer la vigilancia y el cumplimiento de medidas de control.

Situación en Argentina

La epidemiología molecular de SAMR en Argentina fue cambiando a lo largo de los años. A través de distintos estudios realizados en el país se evidenciaron una variedad de clones circulantes tanto en el ámbito hospitalario como en la comunidad.

El clon SAMR-AH detectado inicialmente en hospitales del país entre los años 1992 y 1997 fue el clon multiresistente ST239-III, o clon Sudamericano, únicamente sensible a glicopéptidos [97, 98]. En el año 2002 se describió la emergencia de un nuevo clon, el ST5-I, llamado clon "Cordobés/Chileno" como causa de infecciones intrahospitalarias de igual prevalencia que el ST239-III en un estudio llevado a cabo en 6 hospitales de Córdoba [99]. En el año 2005 nuestro grupo de trabajo documentó el reemplazo del clon ST239-III por el clon ST5-I en dos hospitales de Buenos Aires [100], convirtiéndose en el SAMR-AH más importante a nivel hospitalario [101]. A diferencia del primero, el clon ST5-I es sensible a los antibióticos minociclina, rifampicina y trimetoprima-sulfametoxazol.

En la comunidad, en un estudio realizado por Gardella y col. en el año 2008, que incluyó 69 aislamientos provenientes de infecciones de piel y partes blandas y de infecciones invasivas por SAMR en pacientes sin factores de riesgo para SAMR-AH, se detectó al clon SAMR-AC ST5-IV en un 48% de los casos. Los aislamientos provenían de distintos hospitales de Buenos Aires, Entre Ríos y Misiones [102]. En la provincia de Córdoba, Sola y col.,

detectaron que el 89% de las cepas SAMR-AC estudiadas correspondieron también al clon ST5-IV [103]. Asimismo se lo encontró como responsable de dos casos de meningitis adquirida en la comunidad en niños de Misiones [86] y representó el 2,5% de los aislamientos recuperados en un estudio de portación realizado en niños y sus familiares en San Antonio de Areco, Buenos Aires, en el año 2008 [104].

La mayor cantidad de información correspondiente a la prevalencia de las infecciones adquiridas en la comunidad por SAMR en nuestro país, hasta antes del inicio de este trabajo de tesis, provenía de pacientes pediátricos. En un estudio prospectivo multicéntrico realizado entre 2006-2007 en hospitales pediátricos se detectó una prevalencia del 62% de SAMR-AC, y aproximadamente un 25% de infecciones invasivas [105].

En la población adulta cada vez con mayor frecuencia se comunican casos de infecciones por SAMR adquiridas en la comunidad, pero no se conoce una prevalencia real, lo que dificulta el establecimiento de una terapia empírica apropiada a la epidemiología de la región [4].

Hipótesis y justificación del estudio

El comportamiento dinámico de los clones de SAMR observado en el mundo y en nuestro país permite sospechar rápidos cambios en la epidemiología molecular de este patógeno. Se han descrito numerosos reemplazos clonales a nivel comunitario en el mundo, con la emergencia de clones exitosos de rápida diseminación. A su vez, ya ha sido bien documentado que las cepas asociadas a la comunidad pueden causar una amplia gama de infecciones, desde leves hasta muy complicadas y mortales, en pacientes sin factores de riesgo. El aumento de infecciones por SAMR comunicado en personas no vinculadas al ámbito hospitalario en nuestro país, podría indicar la emergencia de nuevos clones en la comunidad.

El presente trabajo de tesis se basa en la hipótesis de que luego del año 2008 ha ocurrido un cambio en la epidemiología molecular de SAMR de la comunidad en Argentina y el clon ST5-IV ha sido reemplazado. Dicho reemplazo podría deberse a una mayor capacidad patogénica de el o los nuevos clones de SAMR-AC prevalentes. Asimismo, puede existir una correlación entre la recuperación de un determinado clon de SAMR-AC y la severidad de la infección producida por él, asociada a determinantes de virulencia específicos.

La motivación es contribuir a la vigilancia epidemiológica, al control de la diseminación de clones resistentes en la comunidad, advertir sobre su comportamiento en distintos tipos de infecciones y conocer en mayor profundidad a este patógeno de gran relevancia e impacto para la salud pública.

Objetivos

Objetivos

El objetivo general de este trabajo es contribuir al conocimiento de la epidemiología molecular y la virulencia de los clones de SAMR que circulan en nuestro país en la comunidad, capaces de causar infecciones invasivas y no invasivas en pacientes adultos sin factores de riesgo.

Los objetivos específicos son los siguientes:

- 1- Genotipificar aislamientos de *S. aureus* resistentes a meticilina de diferentes regiones del país recolectados durante el año 2010-2011 en dos estudios multicéntricos nacionales a fin de caracterizar el/los clones prevalentes asociados a infecciones de piel y estructuras relacionadas e infecciones invasivas adquiridas en la comunidad y analizar los datos clínico-epidemiológicos.
- 2- Evaluar la asociación de clones de SAMR-AC con el tipo de infección que causan.
- 3- Analizar la sensibilidad de los clones de SAMR-AC frente a antimicrobianos de uso clínico.
- 4- Comparar la virulencia de los principales clones de SAMR-AC circulantes en Argentina utilizando modelos experimentales de infección *in vivo*.
- 5- Caracterizar el perfil y la expresión de factores de virulencia de los distintos clones de SAMR-AC.
- 6- Evaluar si determinados factores de virulencia de SAMR-AC se asocian con infecciones invasivas o no invasivas

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

1-Estudios multicéntricos para la caracterización de SAMR-AC en Argentina

Entre marzo de 2010 y octubre de 2011 se llevaron a cabo dos estudios epidemiológicos multicéntricos organizados por la Sociedad Argentina de Infectología (SADI) con la colaboración de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, para la investigación de SAMR asociado a la comunidad en la población adulta de Argentina. En el marco de ambos estudios se recolectaron aislamientos para su análisis en el presente trabajo de tesis.

A continuación se detallan las características de cada estudio:

- *“Estudio multicéntrico de infecciones de piel y estructuras relacionadas (IPER) por Staphylococcus aureus resistente a meticilina originario de la comunidad en adolescentes y adultos: características clínicas, epidemiológicas y moleculares”*

Objetivo principal: Determinar la prevalencia de SAMR-AC en casos de infección clínica de la piel y estructuras relacionadas (complicadas y no complicadas) adquiridas en la comunidad en adolescentes y adultos.

Objetivos secundarios: Conocer las características clínicas y epidemiológicas de las IPER por SAMR-AC, los probables factores de riesgo asociados, las características genéticas de las cepas de SAMR-AC predominantes en nuestro país y el patrón de sensibilidad de las mismas como fundamento para eventuales cambios en las recomendaciones del tratamiento empírico en adultos.

Diseño: Prospectivo, descriptivo, observacional, no intervencional, multicéntrico, con análisis molecular.

Criterios de inclusión: Pacientes de edad ≥ 14 años que consultaron a los centros afectados al estudio con una infección de piel y estructuras relacionadas caracterizadas por al menos uno de los siguientes síntomas y signos: dolor local, sensación de quemazón o urente local, tumefacción, rubor, calor local, impotencia funcional y/o supuración, y de la cual se hubiera obtenido un cultivo. Las muestras aceptables para cultivo fueron sólo las tomadas por punción aspiración con aguja, biopsia cutánea o muestra obtenida por el cirujano durante el drenaje.

Criterios de exclusión: Hospitalización, diálisis, cirugía, admisión en unidades de cuidados crónicos, catéteres o elementos médicos que atraviesen la piel durante los últimos 12 meses.

Metodología: Se incluyeron 311 pacientes que concurrieron a los hospitales participantes que cumplieron con los criterios de inclusión y no presentaron criterios de exclusión. Los datos de los pacientes permanecieron anónimos y fueron encriptados. De cada paciente se obtuvieron los datos clínico-epidemiológicos y el cultivo correspondiente de la IPER. La identificación bioquímica y el análisis de sensibilidad a antibióticos de los aislamientos se realizaron en cada centro de salud, y posteriormente una proporción de esos aislamientos fue enviada al laboratorio de Resistencia Bacteriana, Cátedra de Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA) para realizar la tipificación molecular de las cepas. De cada paciente enrolado se realizó una evaluación basal y una evaluación de fin de tratamiento.

Centros de Salud participantes: Participaron un total de 19 centros de salud, 18 de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y de la Provincia de Buenos Aires y 1 de Santa Fe.

Consideraciones éticas: El protocolo fue aprobado en el Comité de ética y/o Comité de Docencia e Investigación de cada Institución participante de acuerdo a sus propias normativas.

- *“Estudio multicéntrico, prospectivo, descriptivo sobre las características epidemiológicas y clínicas de las infecciones invasivas causadas por Staphylococcus aureus resistente a meticilina adquirido en la comunidad en adultos y adolescentes de Argentina”*

Objetivo principal: Conocer las características clínicas y epidemiológicas de las infecciones invasivas por SAMR-AC en pacientes adolescentes y adultos de Argentina.

Objetivos secundarios: Explorar los probables factores de riesgo asociados a las infecciones invasivas, las características genéticas de las cepas de SAMR-AC predominantes en nuestro país y el patrón de sensibilidad de las mismas.

Diseño: Prospectivo, descriptivo, observacional, no intervencional, multicéntrico, con análisis molecular.

Criterios de inclusión: Pacientes de edad ≥ 14 años con infección invasiva por SAMR, definiendo “infección invasiva” como el aislamiento de SAMR de un sitio normalmente estéril.

Criterios de exclusión: Hospitalización, diálisis, cirugía, admisión en unidades de cuidados crónicos, catéteres o elementos médicos que atravesen la piel durante los últimos 12 meses.

Metodología: Se incluyeron 55 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión y no presentaron criterios de exclusión. Los datos de los pacientes permanecieron anónimos y fueron encriptados. Se registraron los datos clínico-epidemiológicos. La identificación bioquímica y el análisis de sensibilidad a antibióticos de los aislamientos se realizaron en cada centro de salud, y posteriormente una proporción de esos aislamientos fue enviada al laboratorio de Resistencia Bacteriana, Cátedra de Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA) para realizar la tipificación molecular de las cepas. De cada paciente se realizó una evaluación basal, una evaluación de fin de tratamiento y un seguimiento hasta 90 días luego del final del tratamiento (disponible sólo en 31 pacientes).

Centros de Salud participantes: Participaron 11 centros de salud, 10 de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y de la Provincia de Buenos Aires y 1 de Santa Fe.

Consideraciones éticas: El protocolo fue aprobado en el Comité de ética y/o Comité de Docencia e Investigación de cada Institución participante de acuerdo a sus propias normativas.

2- Microorganismos

Los aislamientos de SAMR-AC disponibles para realizar la tipificación molecular en este trabajo de tesis fueron 146 aislados de IPER provenientes de 17 centros de salud y 28 aislados de infecciones invasivas provenientes de 11 centros de salud. Posteriormente se seleccionaron representantes de los tipos clonales más importantes encontrados para comparar su virulencia en ensayos *in vivo* e *in vitro*.

2.1-Cepas utilizadas como control

Se utilizaron cepas de *S. aureus* de colecciones de cultivo microbianas (ATCC y NARSA) y otras de origen clínico cedido por investigadores del país como control de los ensayos realizados. Las características genotípicas y/o fenotípicas de las cepas control se describen en la tabla 2.

Cepa	Características relevantes	Origen
ATCC 25923	SAMS, <i>mecA</i> (-)	ATCC
ATCC 43300	SAMR, <i>mecA</i> (+)	ATCC
5	<i>luk-PV</i> , <i>hlg</i> (+)	[86]
Clon Cordobés (A1C)	SCC <i>mec</i> I	Dra. Sola
Clon Brasileiro (A3)	SCC <i>mec</i> III	Dra. Predari
SAMR-AC "Pulsotipo A" (6)	SCC <i>mec</i> IVa, ST5	[102]
SAMR-AC "Pulsotipo C"	SCC <i>mec</i> IVc, ST30	[102]
SAMR-AC "Pulsotipo D"	SCC <i>mec</i> IV, ST282	[102]
454	SCC <i>mec</i> V	[106]
NRS384 (USA 300)	<i>agr</i> I; SCC <i>mec</i> IVa; <i>fnbA</i> , <i>fnbB</i> , <i>fib</i> , <i>clfA</i> , <i>clfB</i> , <i>arca</i> (+);	NARSA
NRS 110	<i>sea</i> , <i>sed</i> , <i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>sej</i> , <i>icaA</i> (+)	NARSA
NRS 174	<i>bbp</i> , <i>cna</i> , <i>eno</i> , <i>ebpS</i> (+)	NARSA
NRS158	<i>seb</i> (+); <i>agr</i> I	NARSA
NRS 113	<i>sec</i> , <i>seg</i> , <i>seh</i> , <i>sei</i> (+)	NARSA
172	<i>sdrE</i> (+)	[102]
NRS 111	<i>sea</i> , <i>see</i> , <i>tst</i> (+)	NARSA
NRS70 (N315)	<i>agr</i> II; SCC <i>mec</i> II	NARSA
NRS 123	<i>agr</i> III	NARSA
NRS 153	<i>agr</i> IV	NARSA
NRS 144 (RN 4220)	Productor de β -hemolisina	NARSA
<i>S. epidermidis</i> NRS 101	Productor prototipo de biopelícula	NARSA
Newman Δ <i>ica</i>	No productor de biopelícula <i>ica</i> -dependiente	Dra. Gómez

Tabla 2: Características de las cepas control utilizadas. NARSA: Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (Actualmente BEI). ATCC: American Type Culture Collection.

3-Conservación y cultivo de cepas bacterianas

Las cepas recibidas fueron conservadas en medio de cultivo TSB (Caldo Tripteína Soja, Britania) suplementado con glicerol 20% en criotubos a -70°C y -20°C.

El cultivo de rutina se realizó en Agar Tripteína Soja (TSA, Britania) o Agar Infusión Cerebro Corazón (BHIA, Difco Laboratories) a 37°C 24hs, y cuando la técnica lo requirió en medios de cultivo líquidos (TSB o BHI) a 37°C 24hs con agitación (180 rpm) o Agar Sangre Ovina (ASO, Laboratorio Argentino).

4-Extracción de ADN

Se obtuvo el ADN bacteriano de todas las cepas de la colección para utilizar como templado de reacciones de PCR utilizando el protocolo descrito por Harris-Warrick y colaboradores con modificaciones [107].

A partir de 2 ml de cultivo crecido durante 24hs a 37°C en agitación (180 rpm) en caldo TSB se obtuvo un sedimento bacteriano por centrifugación (9000 x *g*). Se resuspendió el sedimento en 1 ml de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH = 8,00) y luego de una nueva centrifugación se resuspendió en 100 µl de TES (TE + sacarosa 50%) suplementado con lisozima (2 mg/ml) (Sigma-Aldrich) y lisostafina (0,3 mg/ml) (Sigma-Aldrich). Se incubó a 37°C durante 1 hora para permitir la ruptura de la pared celular bacteriana. Luego se adicionó 40 µl de TE suplementado con dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10% y 20 µl de EDTA 0,5M pH 8.0 y se mezcló por inversión. Se añadió RNAsa (0,02mg/ml) (Fermentas) y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se agregó proteinasa K (Fermentas) (0,4mg/ml) y se incubó a la misma temperatura hasta observar clarificación, aproximadamente 40 minutos.

El ADN bacteriano se obtuvo a partir de la fase acuosa luego de dos extracciones secuenciales con fenol (Invitrogen) y cloroformo (Anedra), utilizando 320 µl de mezcla de solventes (1:1) y una extracción final con 240 µl de cloroformo. La fase acuosa se mezcló con 1 ml de etanol 100% (Anedra) frío para la precipitación del ADN.

Luego de una centrifugación y evaporación del etanol remanente, se resuspendió el ADN en 200 µl de agua milli Q estéril.

5-Pruebas de sensibilidad a antibióticos

La resistencia a antibióticos fue analizada en cada centro de salud participante según las técnicas utilizadas habitualmente. Se corroboró la resistencia a metilina mediante el uso de discos de oxacilina y cefoxitina [108]. En los aislamientos de SAMR que fueron remitidos al laboratorio indicados como resistentes a eritromicina (ERY) se evaluó el fenotipo de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B mediante el test de difusión de doble disco (D-Test) según recomendaciones del CLSI [108].

6-Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Todas las reacciones de PCR de punto final se realizaron en termocicladores T-Personal o T-Gradient (Biometra). Se utilizó la polimerasa *Taq* y sus reactivos (Buffer de PCR 10X y Cloruro de Magnesio 50 mM) (Invitrogen™). Las secuencias de los cebadores y las condiciones de reacción se describen en anexo metodológico I.

7-Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de amplificación por PCR se visualizaron en geles de agarosa de distinta concentración (0,8% o 1,5%) según el tamaño del amplicón. El gel se preparó con agarosa (BioRad) disuelta en buffer TAE 1X (Tris 40 mM, Ácido Acético 20 mM, EDTA 1 mM, pH = 8,00) en la concentración requerida. Se agregó Bromuro de Etidio (0,5-1ug/ml) para su observación mediante la exposición a luz ultravioleta en un transiluminador (Molecular Imager GelDoc XR Sistem, Life Science Research, Bio-Rad).

8-Purificación de productos de PCR

La purificación de productos de PCR se realizó antes de la secuenciación de ADN cuando el servicio de secuenciación lo requirió. Se utilizaron kits comerciales (Accuprep® PCR purification kit de Bioneer y ADN Puriprep-GP Inbio Highway®) para la purificación siguiendo las recomendaciones del fabricante.

9-Secuenciación y análisis de secuencias de ADN

La secuenciación de fragmentos de ADN obtenidos por reacciones de PCR se realizó en el servicio MacroGen Inc. (Seúl, Corea) o en el servicio de secuenciación de INTA Castelar. En el segundo caso fue requerida la purificación de los productos de PCR antes del envío.

Las secuencias se analizaron utilizando el programa Vector NTI 9.0 y el programa BLAST disponible en National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov).

10-Técnicas de genotipificación

10.1-Confirmación de la resistencia a meticilina y clasificación de SSCmec

10.1.1- Detección del gen *mecA*

La detección por PCR del gen codificante de la proteína PBP2a (*mecA*) se realizó con los cebadores descritos por Murakami y colaboradores [109]. Las condiciones de reacción y cebadores se detallan en el anexo I.

10.1.2-Tipificación y subtipificación de SCCmec

La tipificación del elemento SCCmec se realizó en base a la combinación de la clase de complejo *mec* y el tipo de recombinasa, para lo cual se realizaron distintas reacciones de PCR, todas ellas detalladas en el anexo I.

La clase de complejo *mec* se estudió mediante tres reacciones de PCR separadas descritas anteriormente: complejo *mec* de clase A [110], complejo *mec* clase C2 [111] y complejo *mec* clase B, diseñada en nuestro laboratorio (Tesis doctoral Dra. Gardella).

El tipo de recombinasa se estudió mediante una PCR múltiple descrita por Ito y colaboradores [112] la cual identifica tres tipos de *ccrAB*: *ccr* tipo 1, *ccr* tipo 2 y *ccr* tipo 3. En los aislamientos en donde no se identificó ninguno de los anteriores se analizó la presencia de *ccr* tipo 5 según lo descrito por Milheirico y colaboradores [113].

En los aislamientos en donde se identificó el SCCmec tipo IV se subtipificó el mismo mediante la PCR múltiple diseñada por Milheirico y colaboradores [114], la cual es capaz de clasificar 7 tipos de SCCmecIV en base a la diferencia en la región J1. La reacción incluye un

control interno que es la amplificación de un fragmento del complejo *ccrA2B2*. Los cebadores y condiciones de reacción se detallan en el anexo I.

10.2-Tipificación del grupo de *agr*

El grupo de *agr* se define en base a la secuencia de la región polimórfica del locus *agr* que incluye a *agrD*, una porción del segmento N-terminal de *agrC* y dos tercios de la región C-terminal de *agrB*. La reacción de PCR múltiple para determinar el grupo fue descrita por Gilot y colaboradores [51] y se detalla en el anexo I.

10.3- Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)

Se realizó la técnica de PFGE siguiendo el protocolo descrito por Chung y colaboradores [115] para estudiar la relación clonal de los aislamientos de SAMR-AC recuperados de IPER e infecciones invasivas. La técnica consistió en la electroforesis del genoma completo previa digestión con la enzima *SmaI* (Fermentas) en el sistema CHEF-DR[®] III (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

A partir de 2 ml de un cultivo crecido durante 24 hs en TSB con agitación se obtuvo un sedimento bacteriano que se lavó con 1 ml de buffer PIV (Tris 10 mM pH = 8,00, NaCl 1M) y se resuspendió en 200 µl de buffer PIV, ajustando la densidad óptica (DO_{620nm}) entre 0.05 y 0.015. La suspensión de bacterias se mezcló con 200 µl de agarosa de bajo punto de fusión (Bio-Rad) 1,5% preparada en el mismo buffer y termostatzada a 42°C. Se dejó solidificar en moldes de bloques de agarosa (Bio-Rad). Luego los bloques se incubaron a -20°C por 5 minutos y se colocaron en 1 ml de buffer EC (Tris 6 mM pH = 8,00, NaCl 1 M, EDTA 100 mM pH = 8,00, deoxicolato-Na 0,2%, laurilsarcosina-Na 0,5%, Brij-58 0,5%) suplementado con RNAsa A (Fermentas) 50 µg/ml, lisozima (Sigma-Aldrich) 100 µg/ml y lisostafina (Sigma-Aldrich) 50 µg/ml a 37°C por 24hs. El paso siguiente fue cambiar el buffer EC por buffer ES (EDTA 0,25 M pH = 9,00, laurilsarcosina-Na 0,5%) al que se le agregó proteinasa K (Fermentas) (1 mg/ml) y se incubó a 50°C por 24 hs. Posteriormente se realizaron 6 lavados en 20-30 ml de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH = 8,00), cada lavado por 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Cuando los bloques no fueron digeridos en el momento se conservaron a 4°C en buffer TE.

Previo a la corrida electroforética se realizó la digestión del ADN bacteriano contenido en los bloques de agarosa. Primero se incubó cada bloque con 500 µl de buffer pre-*Sma* (Tris 6mM pH= 8,00, KCl 20 mM, MgCl₂.6H₂O 6 mM y β-mercaptoetanol 6 mM agregado en el momento de uso) durante 1 hora a 25°C, y luego se incubaron con 15 U/bloque de la enzima de restricción *Sma*I (Fermentas) por 24 hs a 25°C en 45 µl de buffer pre-*Sma* con β-mercaptoetanol.

La electroforesis se llevó a cabo durante 22hs en buffer TBE 0,5X (Tris 44,5 mM, Ácido Borico 44,5 mM, EDTA 1 mM, pH=8,30) en un gel de agarosa calidad PFGE (Bio-Rad) 1% a 11,3°C, con pulsos de 5 segundos a 35 segundos a un voltaje de 6V/cm.

10.3.1-Construcción de dendrogramas

Los patrones de bandas en la electroforesis en gel de campo pulsado fueron analizados por inspección visual seguida de la construcción de dendrogramas aplicando el programa Treecon 1.3b.

El algoritmo utilizado fue el método de agrupamiento de pares con la media aritmética no ponderada (UPGMA, Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), el cual se basa en la identificación de las parejas más similares y en el cálculo de la media de las distancias entre ellas y el resto de los perfiles para construir el dendrograma. La relación entre los patrones de bandas fue realizada empleando el coeficiente de Dice.

10.4-Polimorfismo del gen *spa*

La tipificación de la región polimórfica del gen que codifica la Proteína A (*spa*) se realizó siguiendo el protocolo descrito anteriormente [70, 116] el cual se detalla en el anexo I. Los productos de amplificación se purificaron y secuenciaron. Las secuencias de ADN se analizaron y se obtuvo el tipo de *spa* utilizando la base de datos <http://www.ridom.de/spaserver>.

10.5-Multilocus sequence typing (MLST)

Se llevaron a cabo las siguientes reacciones de PCR para amplificar fragmentos de los genes conservados codificantes de carbamato quinasa (*arcC*), shikimato deshidrogenasa (*aroE*), glicerol quinasa (*glpF*), guanilato quinasa (*gmk*), fosfoacetil transferasa (*pta*),

triosafosfato isomerasa (*tpi*) y acetil coenzima A-acetil transferasa (*yqiL*) utilizando las reacciones descritas en por Enright y colaboradores [66] (Anexo I).

Los productos de amplificación se purificaron y secuenciaron. Las secuencias de ADN se compararon con las depositadas en la base de datos de MLST (<http://www.mlst.net>) y se obtuvo el perfil alélico o secuenciotipo.

11- Detección de genes codificantes de factores de virulencia

Para la búsqueda de genes codificantes de adhesinas se aplicaron dos reacciones de PCR múltiples descritas por Tristan y colaboradores [117]. La presencia de los genes *bbp*, *cna*, *eno* y *ebpS* se estudió en una misma reacción y la de los genes *fib*, *clfA* y *clfB* en la otra. La detección de los genes *fnbA* y *fnbB* se realizó en reacciones de PCR individuales con los cebadores descritos por Nashev y colaboradores [118]. Para la amplificación de un fragmento del gen *sdrE* se utilizaron los cebadores propuestos por Kumar y colaboradores [119].

La amplificación de genes codificantes de toxinas se realizó con reacciones de PCR individuales utilizando cebadores disponibles en bibliografía para *sea*, *seb*, *sec*, *sei*, *seh*, *sej* y *tst* [118], genes codificantes de la leucocidina de Pantón-Valentine (*lukS/F-PV*) [120] y hemolisina gamma (*hlg*) [119].

La presencia del elemento móvil ACME (*Arginine catabolic mobile element*) se evaluó mediante la detección del gen *arcA* como marcador de este elemento, utilizando los cebadores descritos por Diep y colaboradores [121].

El gen *icaA*, parte del operón *icaADBC*, involucrado en la formación de biopelículas se detectó por PCR con los cebadores descritos por Kumar y colaboradores [119].

Los cebadores, controles y condiciones de reacción de todas las reacciones de PCR se detallan en el anexo I.

12-Formación de biopelículas

La capacidad de formar biopelículas se estudió en placas de poliestireno. A partir de un cultivo de 24 horas en medio TSB suplementado con glucosa (0,25%) se realizó una

dilución 1/40 en TSB-glucosa y se agregaron 200 µl de la dilución por pocillo en una placa estéril de 96 pocillos de fondo plano (Deltalab). Luego de 48 h de incubación a 37°C se midió la densidad óptica (DO) de cada pocillo (595 nm) como estimación del crecimiento bacteriano. A este valor se lo llamó DO₁.

Se lavó la placa con solución fisiológica estéril dos veces para eliminar el líquido de los pocillos y se dejó secar por 2 horas. La masa bacteriana adherida a la placa se fijó con 200 µl de metanol 99% (Anedra) por pocillo durante 15 minutos. Luego se descartó el metanol y se dejó secar la placa a temperatura ambiente.

Posteriormente se tiñeron las bacterias adheridas con cristal violeta 0.5% durante 20 minutos, por agregado de 200 µl de colorante a cada pocillo. Luego se retiró el colorante, se lavó la placa con agua y se secó a temperatura ambiente. El colorante se solubilizó en ácido acético 33% (200 µl por pocillo) y se midió la DO (595 nm). A este valor se lo llamó DO₂.

Se calculó la relación DO₂/DO₁ para estimar la cantidad de bacteria adherida a la superficie de poliestireno (biopelícula) con respecto al crecimiento total en el pocillo. Se eligieron aislamientos representativos de la colección para hacer el ensayo y para cada uno se hicieron 8 réplicas.

Las cepas *S. aureus* Newman Δ *ica* (no produce biopelícula dependiente de *ica*) y *Staphylococcus epidermidis* NRS 101 (productora de biopelícula prototipo) se incluyeron como controles negativo y positivo respectivamente.

13-Funcionalidad del locus *agr*

El ensayo consiste en evaluar la actividad hemolítica de la δ -hemolisina producida por *S. aureus* como marcador de la actividad del locus *agr*, más precisamente de la transcripción de RNAlII, ya que la δ -hemolisina se transcribe junto con RNAlII por la activación del mismo promotor. La actividad de la δ -hemolisina se mide a través de la interacción con la β -hemolisina producida por la cepa *S. aureus* RN4220 en agar sangre de carnero [53].

A partir de cultivos de 24 h en agar TSA se realizó una suspensión equivalente a la 0,5 de la escala de Mc Farland en solución fisiológica estéril de cada microorganismo. En el centro de una placa de agar sangre de carnero se realizó una estría de la suspensión de *S.*

aureus RN4220, y perpendicularmente a ella se sembraron estrías de las suspensiones de los microorganismos a analizar y se dejaron incubando 24 h a 37°C.

Luego de la incubación se observó el tipo de hemólisis de cada aislamiento en estudio teniendo en cuenta que la producción de β -hemolisina por la cepa RN4220 aumenta la producción de δ -hemolisina y se da un efecto parecido a una “cabeza de fósforo” en la unión de las estrías de RN4220 y el aislamiento productor δ -hemolisina. La intensidad de este efecto indica cualitativamente la actividad del locus *agr*. Además la β -hemolisina inhibe la lisis producida por α -hemolisina. Se usó como control negativo la cepa N315, que no produce hemólisis.

14-Modelos de infección con animales de experimentación

Todos los animales se alojaron en el bioterio del Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPam-UBA-CONICET) de acuerdo con el reglamento para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Universidad de Buenos Aires y recomendaciones internacionales. Los protocolos fueron evaluados y aprobados por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires (Infección subcutánea, aprobado en 2017; Infección ósea res. CD 2361; Infección respiratoria res. CD 1069). Los protocolos mencionados se llevaron a cabo en las instalaciones del IMPam.

El objetivo de los modelos de infección *in vivo* fue estudiar comparativamente la virulencia y la capacidad de provocar infecciones en distintos sitios anatómicos de los clones de SAMR-AC encontrados como prevalentes en Argentina. Se seleccionaron dos aislamientos representativos (un representante de cada clon) para realizar los protocolos.

Previo a los ensayos *in vivo* se comparó la velocidad de crecimiento de las cepas mediante curvas de crecimiento. A partir de un cultivo de 24 horas a 37°C en 10 ml de TSB se tomaron 50 μ l del mismo y se inocularon en 50 ml de TSB. Se realizó el seguimiento de la densidad óptica (620nm) del cultivo a 37°C en agitación (180rpm) durante 8 horas. La velocidad de crecimiento se evaluó durante la fase de crecimiento exponencial.

14.1-Infeción de piel

Se utilizó un modelo murino de infección de cutánea por *S. aureus* adaptado a partir del protocolo descrito por Malachowa y colaboradores [122].

Se inocularon grupos de ratones hembra BALB/c de 8-9 semanas de edad por vía subcutánea con 100 µl de una suspensión bacteriana conteniendo 1×10^7 unidades formadoras de colonias (UFC) en PBS bajo anestesia general con ketamina (40 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg) (Richmond™). Cuarenta y ocho horas previas a la inoculación se removió el pelo del flanco derecho de los ratones para permitir la visualización y la medición de la lesión cutánea. El inóculo se preparó a partir de un cultivo en fase de crecimiento exponencial (DO_{620nm} 0,8) el cual se centrifugó y resuspendió en PBS para obtener una concentración de 1×10^8 UFC/ml.

Durante seis días posteriores a la inoculación se midió el largo (L) y ancho (W) de la lesión cutánea y se calculó el área utilizando la fórmula $A = \pi(L/2) \times (W/2)$ [122]. El sexto día posterior a la inoculación se sacrificaron los animales por inhalación de CO₂, se extrajeron los abscesos cutáneos y se disgregaron con un homogeneizador de rotor y estator. Se hicieron diluciones seriadas de los homogenatos en PBS y se sembraron en agar TSA suplementado con ERY (5 µg/ml) para determinar las UFC en cada lesión.

Adicionalmente, se extrajeron y homogeneizaron los bazos y se cuantificaron las UFC en placas de Agar Manitol Salado (Britania) para evaluar la capacidad bacteriana de invadir otros órganos a partir de un absceso cutáneo.

14.2-Infeción ósea

El modelo experimental de osteomielitis explora la capacidad bacteriana de colonizar, replicarse y causar daño en el tejido óseo. El estudio se realizó siguiendo el protocolo descrito por Lattar y colaboradores [123, 124] y se utilizaron ratas Wistar hembras de 8-9 semanas de edad.

Bajo anestesia general con ketamina (40 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg) se realizó una incisión para descubrir la tibia izquierda de cada animal y un orificio de aproximadamente 0,4 mm de diámetro con un taladro de alta velocidad en la zona central del hueso (punto de inoculación).

Se preparó una suspensión bacteriana en PBS estéril a partir de un cultivo de 24 h para obtener una concentración de 6×10^8 UFC/ml. Paralelamente, se mantuvo a 37°C una mezcla de trombina + cloruro de calcio (mezcla 1), Tissucol + aprotionina (mezcla 2) (Tissucol kit; Baxter Argentina-AG, Vienna, Austria) y la suspensión bacteriana preparada anteriormente. Inmediatamente antes de la inoculación se mezclaron 5 μ l de la suspensión con la mezcla 2 y luego se agregaron 5 μ l de la mezcla 1 (volumen final de 15 μ l). De la mezcla final se tomaron 5 μ l (1×10^6 UFC) y se depositaron con jeringa en el punto de inoculación. Rápidamente se cerraron las incisiones con pegamento en gel.

A las 96 h luego de la inoculación, los animales se sacrificaron a por inhalación de CO₂ y se les extrajeron ambas tibias. Con un calibre se realizaron las siguientes mediciones: la distancia entre el punto de inoculación y el extremo distal de la tibia izquierda (DT), el ancho del hueso en el punto de inoculación (di), el ancho de la cara lateral del hueso en el punto de inoculación (dp). Se realizaron las mismas mediciones en la tibia derecha no infectada (control) de cada animal en un punto marcado que coincidió con la DT medida en la tibia izquierda del mismo animal. Se calculó el índice osteomielítico (IO) definido como: $IO = (dp + di)_{\text{tibia izquierda}} - (dp + di)_{\text{control}}$. El IO es un estimador del daño producido en el hueso por la colonización bacteriana [123].

Finalmente se seccionó un segmento de la tibia izquierda de aproximadamente 1 centímetro conteniendo al punto de inoculación y se homogeneizó con un mortero. Se realizaron diluciones seriadas en PBS del homogenato y se sembraron en placas de TSA para obtener los recuentos de UFC por tibia.

14.3-Infeción respiratoria

En este modelo se comparó la capacidad de los clones de SAMR-AC de interés de producir bacteriemia y/o colonizar el pulmón a partir de una inoculación por vía intranasal en ratones hembra BALB/c de 8 semanas de edad.

Se anestesió a los animales con ketamina (40 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg) y se inoculó por vía intranasal con 1×10^8 UFC suspendidas en 10 μ l de PBS. Cuatro horas después de la inoculación se extrajo sangre y 20 μ l de la misma se sembraron en 1 ml de BHI para evaluar la ocurrencia de bacteriemia luego de 24 h de incubación a 37°C.

Los animales fueron sacrificados a las 24 h luego de la inoculación mediante inhalación de CO₂. Se extrajeron y homogeneizaron los pulmones y se realizó el recuento de UFC a través de diluciones y siembra en Agar Manitol Salado.

15-Análisis de la expresión de genes de virulencia

15.1-Extracción de ARN

Se realizó la extracción de ARN de aislamientos seleccionados en dos fases de crecimiento, mediante la utilización del reactivo TRIZOL® (Invitrogen) combinado con columnas de purificación (kit Pure Link® RNA Mini Kit, AMBION) siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Se realizaron extracciones por triplicado de cada cepa estudiada.

Se eliminó la contaminación con ADN utilizando la enzima DNAsa I (RQ1 RNase free DNase, Promega) y se inactivó con RQ1 DNAsa Stop Solution (Promega) de acuerdo al protocolo que recomienda al fabricante.

Se midió la concentración de ARN y la absorbancia de la muestra a 230, 260 y 280 nm (A_{230} , A_{260} , A_{280}) por espectrofotometría (NanoDrop™ 1000 EspectroPhotometer, Thermo Scientific). La relación de absorbancias A_{260}/A_{280} indicó el grado de pureza, y un valor entre 1,8–2,1 fue indicativa de buena pureza (baja contaminación con proteínas). La relación $A_{260}/A_{230} > 1$ fue indicativa de buena pureza (baja contaminación con isotiocianato de guanidina, contenido en el reactivo TRIZOL).

La integridad se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% en buffer TAE 1X durante 15 minutos a 100V.

Las muestras de ARN fueron conservadas a -70°C hasta su utilización.

15.2-Retrotranscripción

Se convirtió el ARN en ADNc mediante el uso de la enzima transcriptasa reversa M-MLV™ (Invitrogen, USA) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se preparó una mezcla de reacción conteniendo 1 µl de random primers 50 µM (Invitrogen, USA), 1 µl de dNTP Mix 10 mM (Invitrogen, USA), 10 µl de ARN (0,5 µg). Se mezcló y calentó a 65°C por 5 minutos y se enfrió rápidamente en hielo. Luego se agregaron 7 µl de la segunda mezcla de

reactivos (4 µl de First-Strand Buffer 5 X (Invitrogen, USA), 2 µl de DTT 0.1 M (Invitrogen, USA), 1 µl (40 U/µl) de RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor (Invitrogen, USA)). Se incubó a 37°C por 2 minutos y se agregó 1 µl (200 U) de transcriptasa reversa M-MLV™ (Invitrogen, USA).

Las condiciones de la reacción de retrotranscripción fueron las siguientes: 25°C por 10 min, 37°C por 50 min y 70°C por 15 min.

15.3-PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Se realizó la amplificación por qPCR de los genes de interés (*clfB* y *fnbA*) a partir de una dilución 1/100 del ADNc utilizando para ello la mezcla de reacción comercial SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems, USA) y un equipo 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Se utilizaron placas de 96 pocillos (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems) y cobertores adhesivos (MicroAmp® Optical 96-384 Well Optical Adhesive films, Applied Biosystems). El ensayo fue realizado por duplicado para cada muestra y condición.

Los cebadores para amplificar los genes de interés (*clfB* y *fnbA*) fueron diseñados en esta tesis (Anexo II).

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

Para cada gen analizado se realizó una curva estándar que permitió conocer la eficiencia de la reacción de amplificación, necesaria para calcular las cantidades relativas normalizadas (NRQ) del gen de interés para cada muestra. Se realizó la normalización utilizando los genes de referencia *gyrB* y *pta* para el análisis de las muestras de fase exponencial media y *gyrB/gap* para la fase exponencial tardía [125-127].

15.4-Validación y genes de referencia

Se incluyeron controles negativos (*No template control*, “NTC”) en todas las corridas, para cada gen amplificado. El NTC para ser aceptable no debió presentar señal en la qPCR o una señal con un Cq > 37. Las reacciones de qPCR se realizaron por duplicado y la desviación estándar de los duplicados debió ser menor a 0.5.

Para descartar la contaminación de las muestras con ADN se realizó una reacción control sin transcriptasa reversa. Se aceptaron como libres de contaminación con ADN a aquellas muestras de ARN que no daban una señal detectable por qPCR o con una diferencia mayor a 10 Cq entre ARN y ADNc.

La especificidad de los productos de amplificación en la qPCR se verificó mediante curvas de disociación.

Los genes de referencia utilizados fueron descritos por Valihrach y colaboradores [126] y se eligieron según su comportamiento en cada fase de crecimiento bacteriana. Se eligió la combinación de dos genes de referencia como más estables siguiendo el parámetro M y el CV%. Se verificó que los 2 genes de referencia cumplieran con un valor M menor a 0,5 y un CV menor a 25% cuando se los comparó entre sí. La normalización de los genes de interés se realizó por la media geométrica de las cantidades relativas (RQ) de los genes de referencia [127].

En el anexo II se encuentra detallada la “Mínima información para la publicación de experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real (MIQE)”, que incluye protocolos detallados y secuencias de cebadores utilizados. La misma fue desarrollada y es recomendada por algunos autores como necesaria para evaluar la calidad de los resultados de experimentos de RT-qPCR [126, 128].

16-Tratamiento estadístico

Los datos se analizaron con el software GraphPad Prism versión 5.03 (La Jolla, CA, USA) y el software Infostat (Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Para el análisis de datos categóricos se utilizó el test de Chi cuadrado (χ^2) con corrección de Yates y el test exacto de Fisher. Para variables numéricas se realizó la comparación de medias o medianas mediante los test de la *t* de Student o Mann-Whitney respectivamente (cuando se compararon dos grupos) o ANOVA/Kruskal Wallis y pruebas a posteriori (para la comparación de más de dos grupos). Se eligieron pruebas no paramétricas (Mann-Whitney/Kruskal-Wallis) cuando las variables numéricas no presentaron una

distribución normal en base al resultado de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks y las varianzas de los grupos a comparar no fueron homogéneas. Para comparar velocidades de crecimiento se utilizó la prueba de comparación de pendientes (GraphPad Prism). Un valor $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

Resultados

1-Epidemiología de las infecciones por SAMR-AC

“Estudio multicéntrico de infecciones de piel y estructuras relacionadas (IPER) por Staphylococcus aureus resistente a meticilina originario de la comunidad en adolescentes y adultos: características clínicas, epidemiológicas y moleculares”

Durante el período del estudio fueron enrolados 311 pacientes de edad ≥ 14 años, con IPER de la cual se obtuvo una muestra para cultivo, sin antecedentes de hospitalización en el último año, ni contacto mayor con el sistema de salud, en 19 centros de salud (18 de Buenos Aires y Ciudad Autónoma de Buenos Aires y 1 de Santa Fe). Los resultados completos del estudio fueron publicados en el año 2013 [129].

La mayoría de los pacientes fueron de sexo masculino (69%) y la edad promedio fue de 38,8 años (± 18 años). Las lesiones más frecuentes fueron forúnculos (36%), abscesos (34%) y celulitis (25%).

Se obtuvo un cultivo microbiológico positivo en 271/311 casos y de esos casos 218 fueron SAMR-AC.

Los pacientes con IPER por SAMR-AC se presentaron más comúnmente con abscesos y forúnculos, fueron más jóvenes, tuvieron menor índice de masa corporal, mayor historia de forunculosis, convivientes con lesiones similares y tratamiento antibiótico en los últimos 12 meses, comparados con los pacientes con IPER por otros gérmenes (SAMS, SCN, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*) o cultivos negativos, en un análisis univariado (Tabla 3).

En un análisis multivariado, los factores de riesgo independientemente asociados a IPER por SAMR-AC fueron la edad menor a 50 años y la presencia de lesiones purulentas.

	SAMR-AC N=218 n/N (%)	No SAMR N=93 n/N (%)	P
Factores predisponentes			
Edad (media ± DS)	36,1 (±16,7)	45,3 (±19,7)	<0,001
Edad <50 años	172 (80,0%)	53 (57%)	<0,001
Forunculosis (historia)	93 (42,7%)	20 (21,5%)	<0,001
Trauma	29 (13,3%)	15 (16,1%)	≥0,05
Diabetes	23 (10,6%)	14 (15,1%)	≥0,05
HIV	20 (9,2%)	4 (4,3%)	≥0,05
Antibióticos <12 meses	117 (53,7%)	35 (37,6%)	<0,05
Deportes de contacto	37 (17%)	12 (12,9%)	≥0,05
Conviviente con lesiones similares	64 (29,4%)	14 (15,1%)	<0,01
IMC (media ± DS)	25,8 (±5,1)	28,2 (±6,6)	<0,01
Tipo de lesión			
Forúnculos	88 (40%)	23 (24,7%)	<0,01
Abscesos	91 (42%)	16 (17%)	< 0,0001
Celulitis	33 (15%)	44 (47%)	< 0,0001
Ulcera	5 (2,3%)	4 (4,3%)	≥0,05
Fascitis	0	4 (4,3%)	<0,01
Erisipela	0	2 (2,1%)	≥0,05
Quemadura	1	0	≥0,05
Características clínicas			
Fiebre	70 (32,1%)	32 (34,4%)	≥0,05
Lesión purulenta	184 (84,4%)	52 (55,9%)	<0,0001
Lesión necrótica	13 (6%)	13 (13,4%)	<0,05
Lesión múltiple	77 (35,3%)	16 (17,2%)	<0,01

Tabla 3: Características clínico-demográficas de los pacientes con IPER según etiología
IMC: Índice de masa corporal
DS: Desvío standard

SAMR-AC se estableció como la causa más frecuente de IPER en pacientes adultos de la comunidad, con una prevalencia del 70%. Los resultados de este estudio motivaron un cambio en las recomendaciones para el tratamiento empírico de las IPER en adultos y adolescentes por parte de la Sociedad Argentina de Infectología. A partir del 2011 se recomienda el uso de TMS, clindamicina, minociclina o doxiciclina en pacientes adultos con IPER sin evidencia de compromiso sistémico [130].

1.1- Caracterización de los aislamientos de SAMR-AC de IPER

Del total de los 218 SAMR-AC encontrados en el estudio, 146 aislamientos provenientes de IPER estuvieron disponibles para el análisis genotípico.

Todos los aislamientos fueron positivos para el gen *mecA*. El casete *SCCmec* IV se encontró en 137/146 aislamientos (93,8%), 1 aislamiento se clasificó como *SCCmec* V y en 8 de los aislamientos no se alcanzó a determinar el tipo de casete.

Los genes codificantes para LPV (*lukS/F-PV*) se detectaron en 139/146 (95,2%) aislamientos de IPER.

La genotipificación se realizó en primera instancia por electroforesis de campo pulsado (PFGE). Se incluyeron en el análisis cepas de SAMR-AC utilizadas como controles, descritas como circulantes en Argentina por la Dra. Gardella y col., en el año 2008 [102]. Las mismas habían sido clasificadas, según el perfil de PFGE, como Pulsotipos A (“CAA” ST5-IVa), C (ST30-IVc) y D (ST282-IV) (Tabla 2).

En la colección de aislamientos de IPER se encontró un pulsotipo mayoritario, el pulsotipo C, en donde fueron clasificados 94 aislamientos (64,4%). Treinta y cinco aislamientos (24%) se clasificaron como pulsotipo A y 17 (11,6%) como “otros pulsotipos”, sin asignación de nombre. La figura 4 es un ejemplo que muestra los perfiles de bandas obtenidos en PFGE incluyendo los controles. La figura 5 muestra el dendrograma construido a partir de los perfiles obtenidos por PFGE de los aislamientos de IPER.

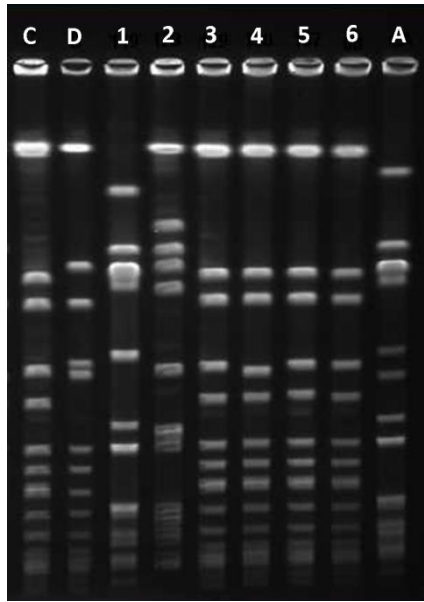


Figura 4: Perfiles de restricción con *SmaI* obtenidos en una electroforesis de campo pulsado. Se indican las cepas controles como C (Pulsotipo C), D (Pulsotipo D) y A (Pulsotipo A). La calle 1 corresponde a un aislamiento de la colección clasificado como pulsotipo A, las calles 3 a 6 a aislamientos clasificados como pulsotipo C y la calle 2 como “otros pulsotipos”

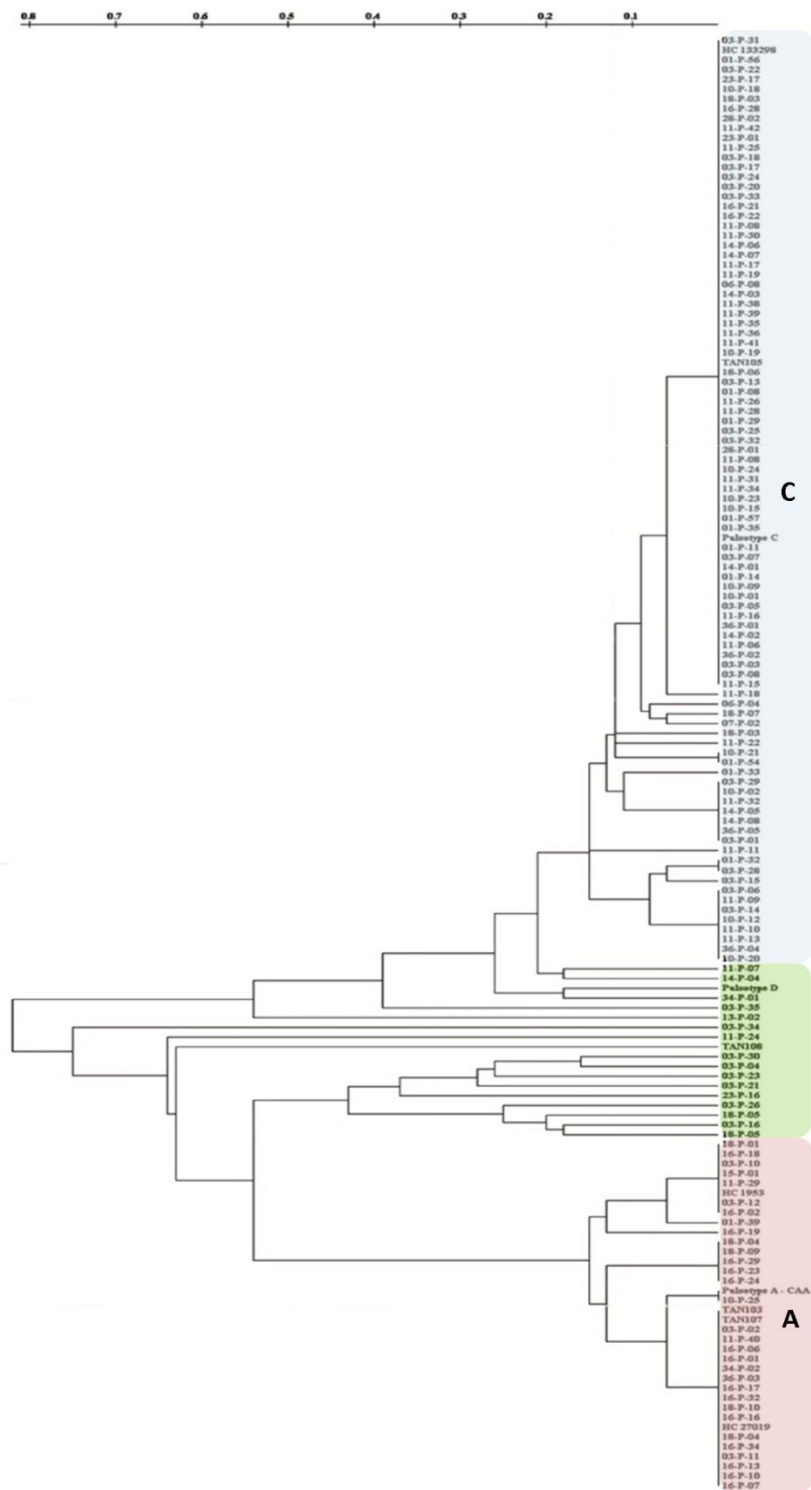


Figura 5: Dendrograma obtenido a partir de los perfiles de restricción con *SmaI* en PFGE de los aislamientos de IPER utilizando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Dice. Se indican los pulsotipos asignados con colores distintos. Cada pulsotipo se definió con un 80% de similitud entre aislamientos (0,2 o 20% de diferencia indicado en el eje superior).

Posteriormente se seleccionaron cepas representativas de los pulsotipos encontrados y se realizaron las técnicas MLST y *spa typing* para complementar la tipificación. En el caso de los aislamientos clasificados como pulsotipos A y C se realizó la subtipificación del casete SCCmecIV y la detección del grupo de *agr*.

La sensibilidad antibiótica se determinó en los laboratorios de cada centro de salud por las técnicas recomendadas y en algunos casos fue confirmada en nuestro laboratorio utilizando la técnica de antibiograma por difusión en medio sólido según Kirby-Bauer. Los 146 aislamientos presentaron sensibilidad a vancomicina, teicoplanina, linezolid, doxiciclina, minociclina y rifampicina. Un porcentaje de aislamientos presentó resistencia acompañante, es decir, resistencia a otras familias de antibióticos además de los β -lactámicos. En la tabla 4 se resumen los resultados de la tipificación molecular y el antibiotipo.

Pulsotipo	Aislamientos (n)	ST	SCCmec (n)	<i>spa</i> tipo (n)	grupo de <i>agr</i>	N° de aislamientos con resistencia acompañante (distribución según antibiotipo)
A	35	5	IVa (35)	t311 (14), ND (21)	II	13 (5 ^a , 1 ^{a*} , 5 ^b , 1 ^{a,b} , 1 ^d)
C	94	30	IVc (94)	t019 (42), t342(1), t975(2), t021(1), ND (48)	III	13 (8 ^a , 1 ^b , 2 ^c , 1 ^{ci} , 1 ^e)
Otros	17	ND	IV (7), V (1), NT (9)	t019 (6), t311 (1), ND (10)	ND	3 (1 ^{a,b} , 1 ^{a,b,ci} , 1 ^c)

Tabla 4: Tipificación por PFGE, MLST, *spa typing* y tipo de SCCmec y antibiotipo de los aislamientos provenientes de infecciones de piel y estructuras relacionadas. ND: no determinado. NT: no tipificable por los métodos utilizados.

^aResistencia a ERY/CLI por MLS_B inducible, ^{a*} Resistencia a ERY con fenotipo M.

^bResistencia a gentamicina

^cResistencia a quinolonas. ^{ci} Sensibilidad intermedia a quinolonas

^dResistencia a tetraciclina

^eResistencia a TMS

“Estudio multicéntrico, prospectivo, descriptivo sobre las características epidemiológicas y clínicas de las infecciones invasivas causadas por Staphylococcus aureus resistente a meticilina adquirido en la comunidad en adultos y adolescentes de Argentina”

Se incluyeron 55 pacientes con infección invasiva por SAMR-AC de ≥ 14 años de edad, sin historia de hospitalización ni contacto mayor con el sistema de salud en el año previo, que concurrieron a 11 centros de salud del país (10 de Buenos Aires y Ciudad Autónoma de Buenos Aires y 1 de Santa Fe). Los resultados completos del estudio fueron publicados en el año 2013 [131].

La mayoría de los pacientes fueron de sexo masculino (78%) y la edad (mediana) fue de 29 años (rango 16-73 años). Se registraron las condiciones clínicas subyacentes de los pacientes, las cuales se detallan en la tabla 5. Un 36% de los pacientes no presentó ninguna comorbilidad o factor predisponente.

Condición clínica subyacente	N (%)
ATB en los 6 meses previos	20 (36,4)
Deportes de contacto	12 (21,8)
Diabetes	9 (16,4)
Convivientes con IPER	7 (12,7)
Infección por HIV	5 (9,1)
Conviviente trabajador de la salud	2 (3,6)
Sin comorbilidades	20 (36)

Tabla 5: Condiciones clínicas subyacentes de los 55 pacientes con infecciones invasivas por SAMR-AC

Todos los pacientes requirieron hospitalización, el 56% tuvo criterios de sepsis, un 16% ingresó directamente a la unidad de terapia intensiva y un 3% se presentó con shock.

Se registraron distintas formas de presentación clínica en los pacientes con infecciones invasivas. Las más frecuentes fueron bacteriemia (60%), infección pulmonar (51%) e IPER (47%) (Figura 6).

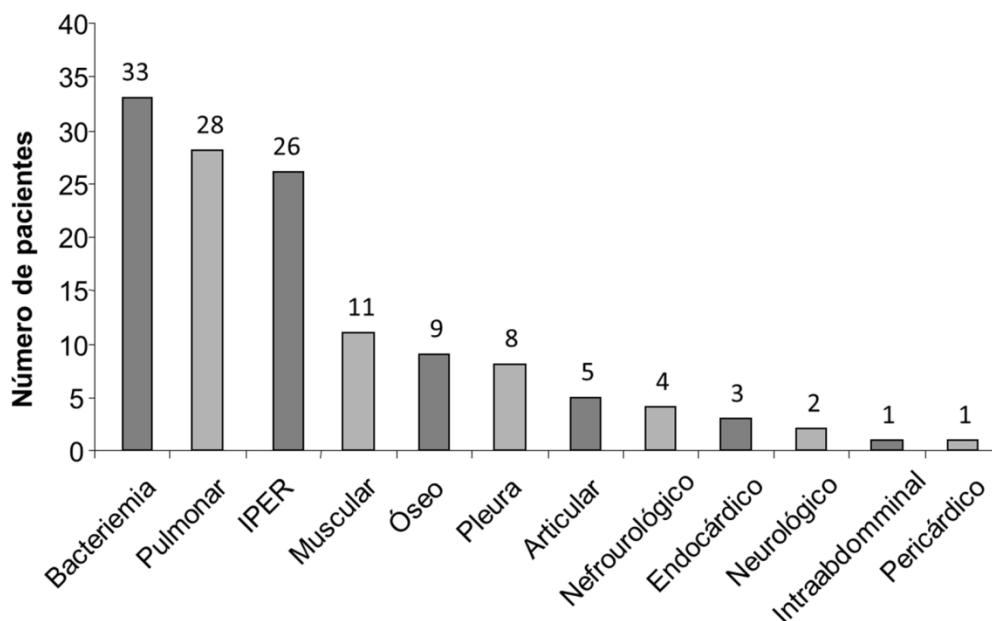


Figura 6: Formas de presentación clínica en pacientes con infección invasiva por SAMR-AC

El foco primario principal de las infecciones invasivas fue el cutáneo (47,2%). Un 16,4% de las infecciones tuvieron foco primario pulmonar y en el resto de los casos no pudo ser determinado el foco inicial.

En la evaluación de fin de tratamiento hubo un 54,4% de pacientes con curación clínica. La tasa de mortalidad fue del 16%.

1.2- Caracterización de los aislamientos de SAMR-AC de infecciones invasivas

Un total de 28 aislamientos provenientes de infecciones invasivas fueron remitidos al laboratorio para realizar la tipificación molecular.

En todos los aislamientos se confirmó la resistencia a meticilina por la detección del gen *mecA*. El casete *SCCmecIV* y los genes codificantes de LPV se encontraron en 27 aislamientos. El aislamiento restante presentó un casete *SCCmecIV* variante (contiene al gen *tnp20* integrado en el complejo *mec* clase B) y fue negativo para LPV.

Mediante la tipificación por PFGE los aislamientos provenientes de infecciones invasivas se clasificaron en pulsotipos. Al igual que en los aislamientos provenientes de IPER, el pulsotipo C fue el mayoritario, representado por 23/28 aislamientos (82%). Dos aislamientos fueron clasificados como pulsotipo A y tres como “otros pulsotipos”, en donde

se diferenciaron los pulsotipos E y F. En la figura 7 se observa el dendrograma correspondiente.

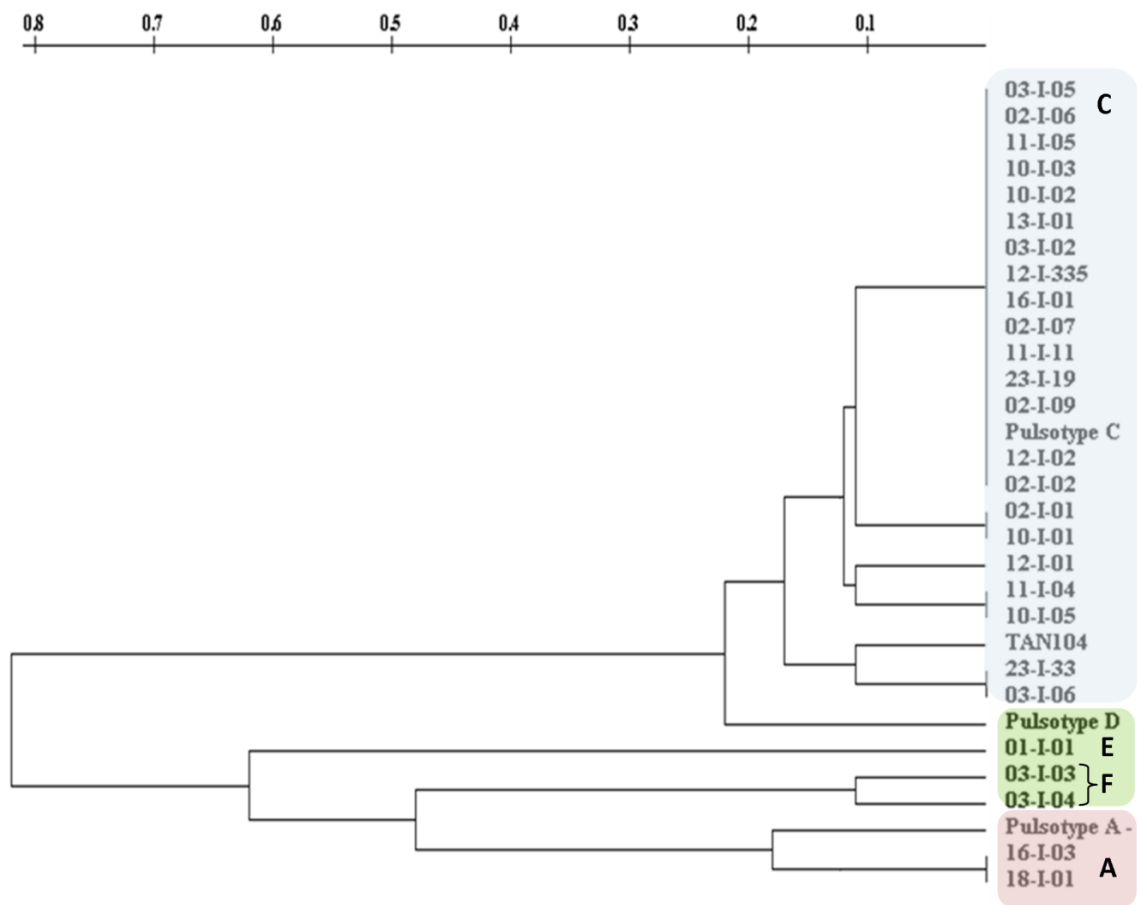


Figura 7: Dendrograma construido con el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Dice a partir de los perfiles de restricción con *Smal* en una electroforesis de campo pulsado. Los aislamientos pertenecientes a un mismo pulsotipo comparten un 80% de similitud en el patrón de bandas (Corresponde al valor 0,2 (20%) de diferencia en el eje superior).

Posteriormente se tipificaron las cepas mediante *spa* typing y se seleccionaron aislamientos representativos para realizar MLST. Se realizó adicionalmente la subtipificación del casete *SCCmecIV* en los pulsotipos A y C y la tipificación del locus *agr*.

Los 28 aislamientos presentaron sensibilidad a vancomicina, teicoplanina, linezolid, doxiciclina, minociclina, TMS y rifampicina. Un porcentaje de aislamientos presentó resistencia acompañante, es decir, resistencia a otras familias de antibióticos además de los β -lactámicos. La resistencia acompañante más frecuente fue la resistencia a ERY/CLI con fenotipo MLS_B inducible. En la tabla 6 se resumen los resultados de la tipificación molecular y el antibiotipo.

Tabla 6: Características genotípicas y antibiograma de los 28 aislamientos provenientes de infecciones invasivas. ND: No determinado. ST: Secuenciotipo. IVvar: SCCmec IV variante, con *tnp20* integrado en el complejo *mec* clase B. *El *spa* tipo corresponde a la cepa con SCCmecIV variante.

^aResistencia a ERY y CLI (Fenotipo iMLS_B)

Pulsotipo	Aislamientos (n)	ST	SCCmec	<i>spa</i> tipo	grupo de agr	N° de aislamientos con resistencia acompañante (distribución según antibiograma)
C	23	30	IVc	t019	III	10 (4 ^a , 4 ^b , 1 ^c , 1 ^{a,d})
A	2	5	IVa	t311, t2724	II	1 ^(b)
F	2	72	IV, IVvar	t1364, t148*	I	0
E	1	ND	IV	t002	II	0

^bResistencia a gentamicina

^cResistencia a quinolonas

^dResistencia a tetraciclina

1.3-Distribución de los clones de SAMR-AC según el tipo de infección

Los resultados de la genotipificación de los aislamientos provenientes de IPER y de infecciones invasivas indicaron que el clon de SAMR-AC mayoritario fue el ST30-IVc, representando el 80% del total de los aislamientos estudiados. El tipo de *spa* mayoritario es t019 y *spa* tipos relacionados.

El clon ST5-IVa-t311, detectado como el más frecuente hasta el año 2008 [102, 103] se ubicó en el segundo lugar en las IPER y en tercer lugar en las infecciones invasivas (Figura 8), lo que mostró su desplazamiento por el clon ST30-IVc en las infecciones invasivas y no invasivas en adultos de la comunidad de Argentina.

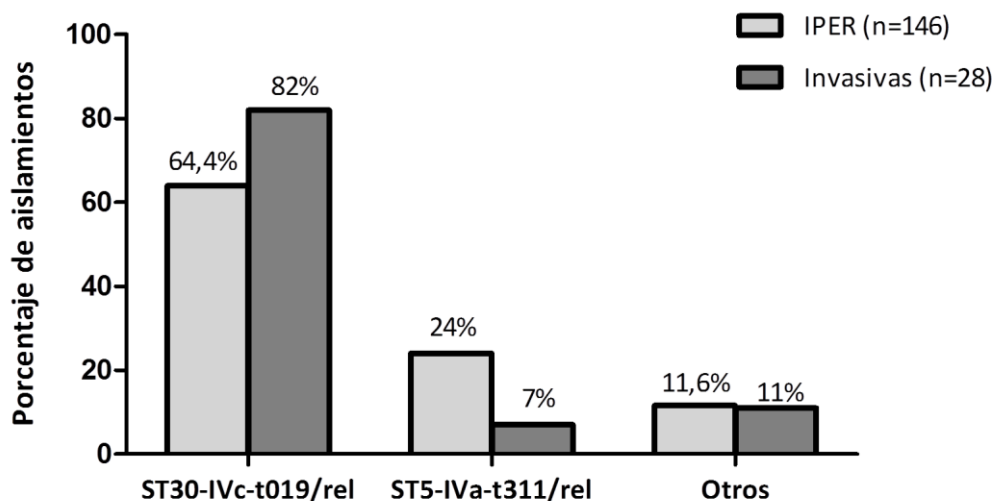


Figura 8: Distribución de los clones de SAMR-AC según el tipo de infección. Rel: *spa* tipos relacionados a t019 o t311 según corresponda.

1.4-Resistencia acompañante

Al estudiar la distribución de los aislamientos con resistencia acompañante en los casos de IPER y de infecciones invasivas se detectó que los aislamientos con resistencia a otras familias de antibióticos se encontraron con mayor frecuencia en las infecciones invasivas que en IPER (29/146 vs 11/28. $P: 0,046$. Prueba exacta de Fisher).

La resistencia acompañante más frecuente en toda la colección fue a ERY y CLI, con fenotipo MLS_B inducible y se encontró en un 11% de las cepas del pulsotipo C, 16% de las cepas del pulsotipo A y 10 % de las cepas restantes.

La resistencia a quinolonas y TMS se observó únicamente en aislamientos pertenecientes al pulsotipo C y la resistencia a tetraciclina en un aislamiento del pulsotipo A. En “otros pulsotipos” se encontró también resistencia a quinolonas.

La resistencia acompañante fue menor en el caso de ST30-IVc que en ST5-IVa (19,7% vs 37,8% respectivamente). La resistencia a antibióticos no β -lactámicos más frecuente en ST30-IVc es a la familia MLS_B con fenotipo inducible y en ST5-IVa a gentamicina.

2-Estudio comparativo de la virulencia de los clones de SAMR-AC

A partir de los datos obtenidos en la genotipificación de los aislamientos recuperados de IPER e infecciones invasivas se conoció el cambio en la distribución de clones de SAMR-AC en distintos tipos de infecciones en adultos. Se decidió comparar la virulencia entre los clones ST30-IVc y ST5-IVa porque representan el clon de SAMR-AC predominante y el desplazado respectivamente.

2.1-Asociación entre linaje de SAMR-AC y tipo de infección

El clon ST30-IVc se encontró como mayoritario, tanto en los casos de IPER como en los de infecciones invasivas. Se comparó mediante la prueba exacta de Fisher la asociación entre tipo de infección y clon de SAMR-AC encontrado, teniendo en cuenta sólo los casos producidos por estos dos clones principales. Se observó una asociación significativa entre la presencia del clon ST30-IVc y la ocurrencia de infección invasiva (Figura 9), hecho que indicó que el clon predominante podría tener una mayor capacidad patogénica.

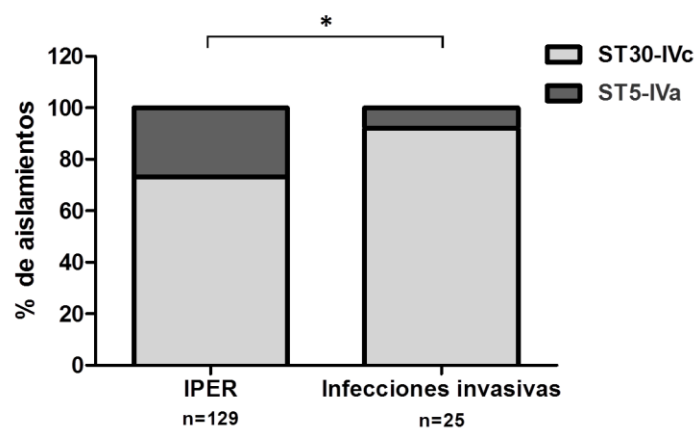


Figura 9- Asociación entre sitio de infección y clon de SAMR-AC encontrado. Prueba exacta de Fisher ($P: 0,0426$).

2.3-Factores de virulencia

La búsqueda de genes codificantes de factores de virulencia se realizó en todos los aislamientos de la colección tipificados como ST30-IVc y ST5-IVa.

2.3.1-Toxinas

Todos los aislamientos estudiados presentaron los genes *seg*, *sei*, y el gen *icaA*, involucrado en la producción de biopelículas y dieron negativas las PCRs para la amplificación de los genes de toxinas *sec*, *seb*, *sej*, *seh*, *tst*, y el gen *arcA*, componente del elemento ACME. Los genes *sea* y *hlg* fueron encontrados de forma variable. En la tabla 7 se describe el número de aislamientos que dieron positivas las reacciones de amplificación de *sea* y *hlg* según el tipo de infección. Los resultados de los aislamientos provenientes de IPER se resumen en la tabla 7A y los de infecciones invasivas en la tabla 7B.

A) IPER		
Gen	ST30-IVc N° de aislamientos positivos (%)	ST5-IVa N° de aislamientos positivos (%)
<i>sea</i>	11 (11,7)	35 (100)
<i>hlg</i>	22 (20,7)	16 (45,7)
	n=94	n=35

B) Infecciones Invasivas		
Gen	ST30-IVc N° de aislamientos positivos (%)	ST5-IVa N° de aislamientos positivos
<i>sea</i>	4 (17,4)	2
<i>hlg</i>	14 (60,7)	0
	n=23	n=2

Tabla 7 A y B: Detección de genes codificantes de las toxinas *sea* y *hlg*.

2.3.2-Adhesinas

Se hallaron diferencias en el perfil de genes de adhesinas entre los dos clones. Ambos codifican los genes *fnbA*, *fib*, *clfA*, *clfB*, *eno* y *ebpS*. Los genes *cna*, *bbp* y *fnbB* se encontraron únicamente en el clon ST30-IVc, mientras que el gen *sdrE* sólo en el ST5-IVa. Los genes codificantes de las adhesinas *fib*, *fnbA* y *fnbB* presentan un comportamiento variable dentro

de los aislamientos pertenecientes a un mismo linaje. Los resultados de los aislamientos provenientes de IPER se resumen en la tabla 8A y los de infecciones invasivas en la tabla 8B.

A) IPER

Gen	ST30-IVc N° de aislamientos positivos (%)	ST5-IVa N° de aislamientos positivos (%)
<i>fnbA</i>	80 (85)	33 (94,3)
<i>fnbB</i>	61 (64,9)	0 (0)
<i>fib</i>	12 (12,8)	35 (100)
<i>clfA</i>	94 (100)	35 (100)
<i>clfB</i>	94 (100)	35 (100)
<i>cna</i>	94 (100)	0 (0)
<i>bbp</i>	94 (100)	0 (0)
<i>eno</i>	94 (100)	35 (100)
<i>ebpS</i>	94 (100)	35 (100)
<i>sdrE</i>	0 (0)	35 (100)
	n=94	n=35

B) Infecciones Invasivas

Gen	ST30-IVc N° de aislamientos positivos (%)	ST5-IVa N° de aislamientos positivos
<i>fnbA</i>	22 (95,6)	2
<i>fnbB</i>	20 (87)	0
<i>fib</i>	2 (8,7)	2
<i>clfA</i>	23 (100)	2
<i>clfB</i>	23 (100)	2
<i>cna</i>	23 (100)	0
<i>bbp</i>	23 (100)	0
<i>eno</i>	23 (100)	2
<i>ebpS</i>	23 (100)	2
<i>sdrE</i>	0 (0)	2
	n=23	n=2

Tablas 8 A y B: Número y porcentaje de aislamientos de los clones principales que dieron positivas las reacciones de PCR para la detección de genes codificantes de adhesinas.

2.3.3-Asociación de factores de virulencia y tipo de infección

La distribución de los genes *fnbA*, *fnbB*, *fib*, *hlg* y *sea* no resultó homogénea en los aislamientos del mismo linaje y tampoco en aislamientos provenientes del mismo tipo de infección. Para saber si la distribución de los genes se relacionó con el tipo de infección se

aplicó la prueba exacta de Fisher. Se observó que la presencia de los genes *fnbB* y *hlg* se asocian significativamente con infección invasiva (Tabla 9).

	IPER (n=129)	Infecciones invasivas (n=25)	
Gen	N° de aislamientos positivos (%)	N° de aislamientos positivos (%)	P
<i>fnbA</i>	113 (87,6)	24 (96)	0,310
<i>fnbB</i>	61 (47,3)	20 (80)	0,004
<i>fib</i>	47 (36,4)	4 (16)	0,062
<i>hlg</i>	38 (29,5)	14 (56)	0,019
<i>sea</i>	46 (35,7)	6 (24)	0,356

Tabla 9: Asociación entre presencia de genes y tipo de infección

En el caso particular del clon predominante ST30-IVc La presencia de los genes *fnbB* y *hlg* también se asoció significativamente a la ocurrencia de infección invasiva, no así los genes *fnbA* y *fib* (Tabla 10). Esto indica que las infecciones invasivas por ST30-IVc fueron producidas con mayor frecuencia por cepas ST30-IVc-*fnbB*(+)-*hlg*(+).

	IPER (n=94)	Infecciones invasivas (n=23)	
Gen	ST30-IVc N° de aislamientos positivos (%)	ST30-IVc N° de aislamientos positivos (%)	P
<i>fnbA</i>	80 (85)	22 (95,6)	0,297
<i>fnbB</i>	61 (64,9)	20 (87)	0,045
<i>fib</i>	12 (12,8)	2 (8,7)	0,734
<i>hlg</i>	22 (23,4)	14 (60,9)	< 0,001
<i>sea</i>	11 (11,7)	4 (17,4)	0,4908

Tabla 10: Asociación entre presencia de genes y tipo de infección en ST30-IV.

2.4-Producción de biopelículas

La adherencia a soportes plásticos se estudió con el fin de estimar la capacidad de las bacterias de formar biopelículas. Se realizó el ensayo en placas de poliestireno y se evidenció

la masa bacteriana adherida mediante la coloración con cristal violeta y la medición de la densidad óptica.

Se seleccionaron 10 aislamientos representativos de cada clon y se realizó el ensayo con 8 réplicas para cada aislamiento. La producción de biopelículas de cada clon correspondió a la mediana de $DO_{2\ 595nm}/DO_{1\ 595nm}$ de los 10 aislamientos correspondientes (Figura 10).

Los clones de SAMR-AC ST30-IVc y ST5-IVa y la cepa NRS101 presentaron mayor adherencia que la cepa Newman Δica (no produce biopelículas dependiente del operón *ica*) utilizada como control negativo. No se detectó diferencia significativa en la producción de biopelículas por parte de los clones SAMR-AC en estudio.

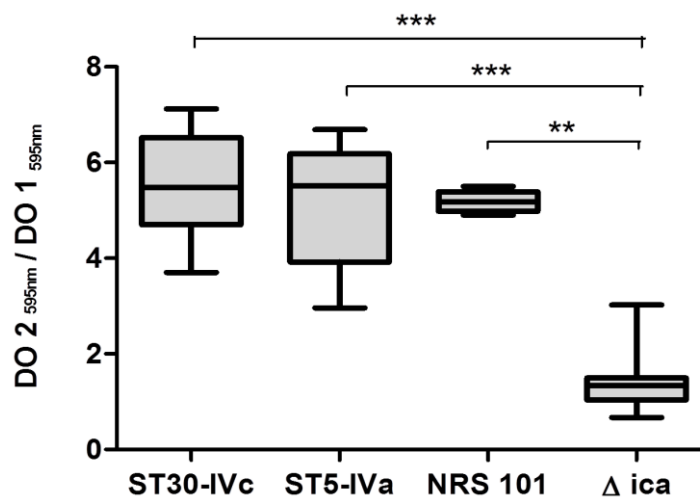


Figura 10- Producción de biopelículas en placas de poliestireno de los clones ST30-IVc y ST5-IVa comparada con la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0.0001$) seguida de la prueba de Dunn ($P < 0,05$).

2.5-Funcionalidad del locus agr

El ensayo propuesto por Traber y colaboradores [53] tiene como objetivo analizar cualitativamente la expresión de RNAlII (efector del sistema regulador global Agr), a través de la intensidad de hemólisis en agar sangre de carnero producida por la δ -hemolisina. El sistema regula positivamente la expresión de muchas toxinas y negativamente la expresión

de adhesinas, aunque no es el único sistema involucrado en la regulación de factores de virulencia.

Se realizó el ensayo con 10 aislamientos representativos del clon ST30-IVc y 10 del clon ST5-IVa, incluyendo cepas provenientes de IPER y de infecciones invasivas. Se observó una mayor actividad de la δ -hemolisina en los aislamientos de ST5-IVa, indicando una mayor activación del sistema Agr *in vitro*. Por el contrario, los aislamientos de ST30-IVc presentaron una débil actividad de la δ -hemolisina, lo que indicaría que, en este clon, la actividad del sistema Agr estaría beneficiando la expresión de las adhesinas controladas por éste.

En la figura 11 se presenta un ejemplo de la actividad hemolítica observada. Se incluyó a la cepa *S. aureus* N315 como control negativo.

El ensayo también permitió detectar que ambos clones expresan las toxinas α -hemolisina y δ -hemolisina.

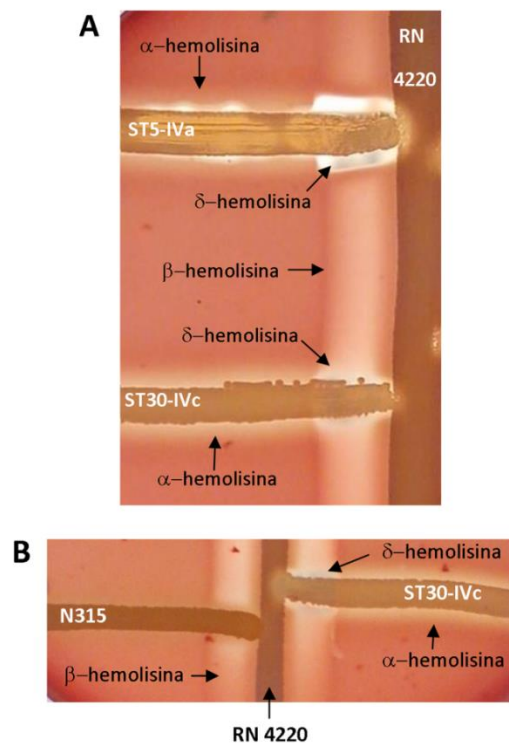


Figura 11: Ensayo de funcionalidad del sistema Agr. (A) Hemólisis producida por ST30-IVc y ST5-IVa en agar sangre de carnero por la interacción de la β -hemolisina secretada por *S. aureus* RN4220. (B) Ensayo incluyendo a la cepa *S. aureus* N315, que no produce hemólisis

3-Análisis comparativo de la virulencia de los clones SAMR-AC ST30-IVc y ST5-IVa en modelos de infección experimental

3.1- Características de las cepas de SAMR-AC utilizadas

Para llevar a cabo los modelos de infección con animales de laboratorio se eligieron dos aislamientos de la colección, representativos de cada clon de interés y fueron renombrados como Sa30 y Sa5. En la tabla 11 se detallan las características genotípicas y fenotípicas de los mismos.

Características de las cepas SAMR-AC		
Nombre de la cepa	Sa5	Sa30
Infección de origen	IPER	IPER
Complejo clonal	CC5	CC30
Secuenciotipo	ST5	ST30
<i>Spa</i> tipo	t311	t019
grupo de <i>agr</i>	II	III
SCC <i>mec</i>	IVa	IVc
Sensibilidad a eritromicina	R	R
Factores de virulencia	LPV, <i>fnbA</i> , <i>fib</i> , <i>clfA</i> , <i>clfB</i> , <i>eno</i> , <i>ebpS</i> , <i>sdrE</i> , <i>sea</i> , <i>hlg</i> , <i>sei</i> , <i>seg</i> , <i>icaA</i> , hemolisina α , hemolisina δ (+)	LPV, <i>fnbA</i> , <i>fnbB</i> , <i>clfA</i> , <i>clfB</i> , <i>bbp</i> , <i>cna</i> , <i>eno</i> , <i>ebpS</i> , <i>hlg</i> , <i>sei</i> , <i>seg</i> , <i>icaA</i> , hemolisina α , hemolisina δ (+)

Tabla 11: Características de los aislamientos de SAMR-AC utilizados en los modelos de infección experimental. R: resistente.

3.2-Velocidad de crecimiento

Antes de la realización de los ensayos de virulencia en modelos animales se efectuó la comparación de la velocidad de crecimiento de las cepas Sa30 y Sa5 a fin de descartar que alguna tuviese mayor velocidad de crecimiento lo cual le conferiría una ventaja sobre la otra. Se compararon las pendientes de las curvas en la fase exponencial de crecimiento como estimación de las velocidades de crecimiento. No se encontraron diferencias significativas en las pendientes de la fase exponencial de crecimiento de Sa30 y Sa5 (Figura 12B).

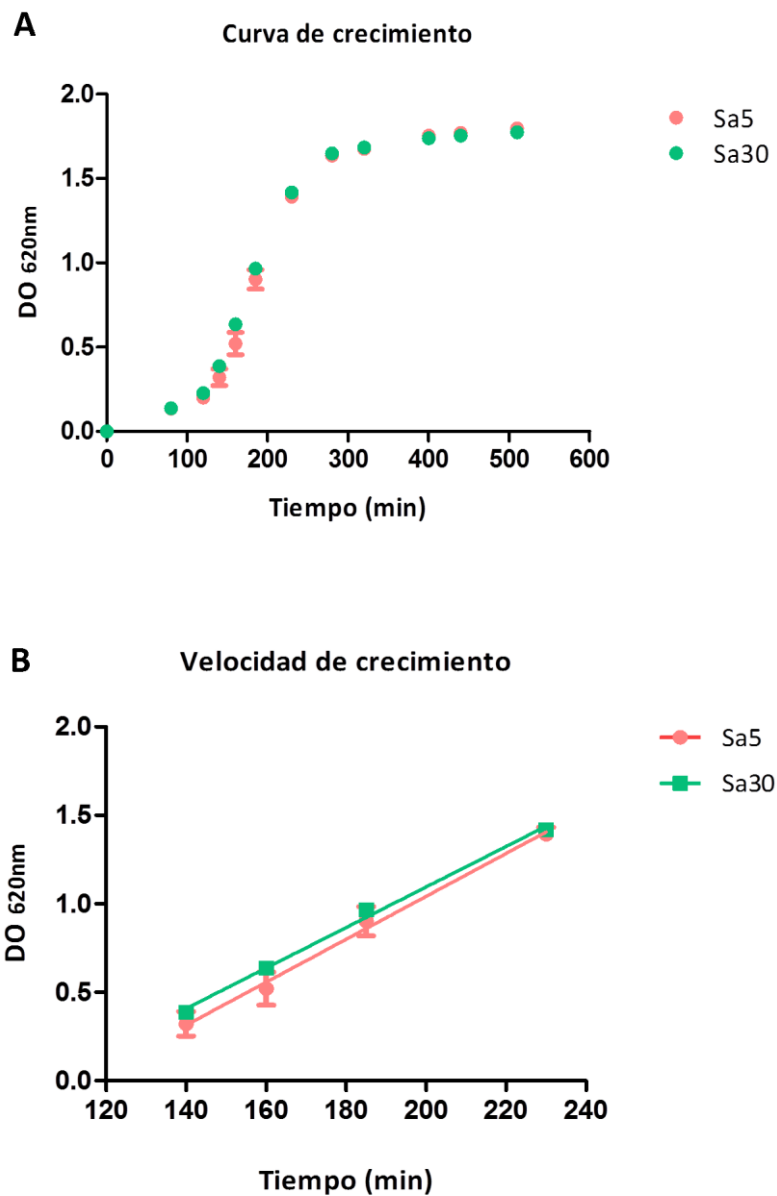


Figura 12: (A) Curvas de crecimiento de las cepas Sa30 y Sa5 en TSB a 37°C en agitación. Cada curva fue realizada por duplicado y se indica el valor medio de DO_{620nm} y el desvío estándar. (B) Fase exponencial de la curva de crecimiento. Se compararon las pendientes de las curvas mediante la prueba de comparación de pendientes y no se registró diferencia significativa entre las mismas ($P: 0,414$).

El tiempo de generación media, definido como el tiempo en que la DO de los cultivos varió durante la fase exponencial de 0,4 a 0,8 fue de 36,4 minutos para Sa30 y 33,3 minutos para Sa5.

3.3-Infección de piel

El modelo de infección de piel por inoculación subcutánea se eligió porque se aproxima a las infecciones más comúnmente producidas por *S. aureus*.

Los ratones inoculados por vía subcutánea con 1×10^7 UFC (Sa5 o Sa30) desarrollaron lesiones visibles el día posterior a la inoculación (Figura 13A).

Las áreas de las lesiones cutáneas fueron medidas diariamente durante los 6 días posteriores a la inoculación. Las lesiones producidas por Sa30 fueron de mayor tamaño que las producidas por Sa5, aunque sólo se diferenciaron estadísticamente los días 1, 2 y 5 (Figura 13B).

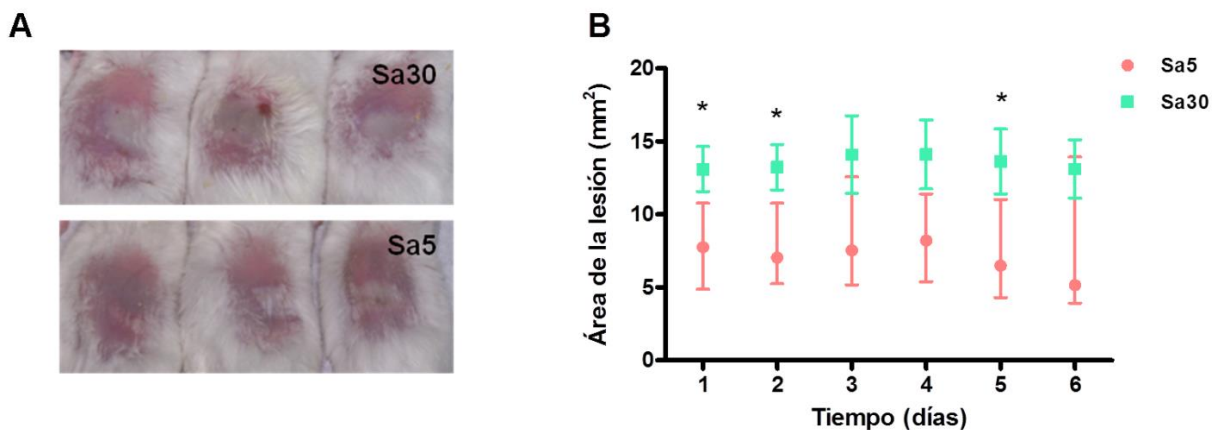


Figura 13: (A) Fotografías de lesiones cutáneas producidas por Sa30 y Sa5 en el modelo de infección de piel por inoculación subcutánea. (B) Área de las lesiones representadas como mediana y rango intercuartil, comparadas día por día con la prueba de Mann-Whitney. Los días 1, 2 y 5 ($P: 0.041$, $P: 0.027$ y $P: 0.046$ respectivamente) se observaron diferencias significativas.

En ambos casos se observó una disminución de peso del animal el día posterior a la inoculación, que en los días susiguientes fue recuperado (Figura 14).

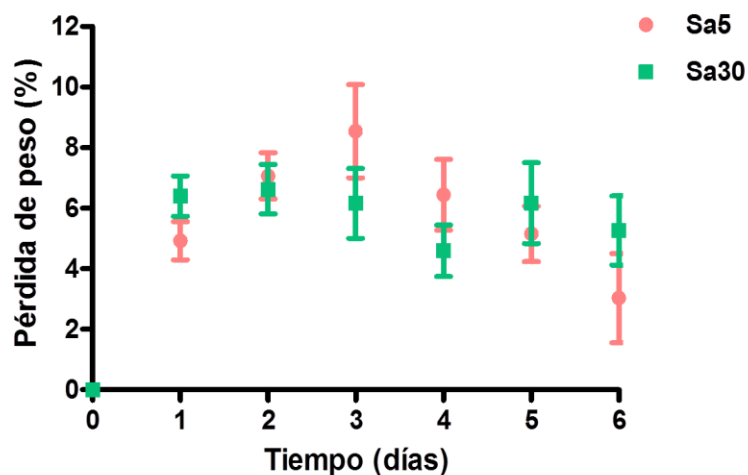


Figura 14: Porcentaje de pérdida de peso con respecto al peso inicial (día 0)

El número de UFC recuperado de las lesiones producidas por Sa30 el día 6 posterior a la inoculación fue mayor que en las lesiones producidas por Sa5 (Figura 15). Más aún, en el caso de Sa30 los recuentos de la lesión fueron mayores a la carga inoculada, con una mediana de 1.7×10^8 CFU (Rango 1.2×10^8 - 3.1×10^8), lo que indica que el nicho subcutáneo fue favorable para la replicación de este clon. En los abscesos producidos por Sa5 se recuperó una mediana de 8.5×10^6 (Rango 2.8×10^6 - 8.3×10^7) UFC bajo idénticas condiciones experimentales.

Adicionalmente un grupo de ratones fue inoculado con una carga bacteriana menor de Sa30 (1×10^6 UFC) y en este caso, el día 6 posterior a la inoculación, también se recuperó un número de UFC mayor al inoculado (Mediana 4.5×10^7 UFC, rango intercuartilo 5.8×10^6 - 1.8×10^8).

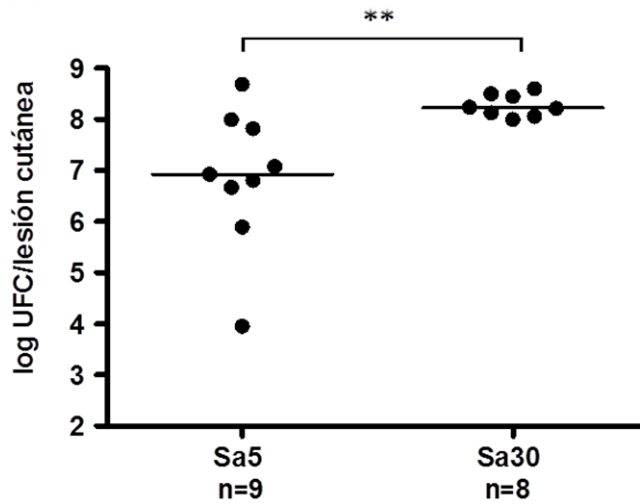


Figura 15: UFC recuperadas de las lesiones cutáneas en el día 6 posterior a la inoculación. Cada punto indica el recuento hecho en un animal y se indica la mediana de cada grupo. Las UFC recuperadas de los ratones inoculados con Sa30 fueron significativamente mayores que en el caso de Sa5, comparadas con la prueba de Mann-Whitney (P : 0.005).

Se estudió la colonización en el bazo con el objetivo de evaluar la capacidad de los clones de interés de diseminarse a partir del sitio de infección primaria y colonizar órganos distales. La colonización de bazo resultó mayor en los animales inoculados con Sa30 aunque la diferencia respecto de los animales inoculados con Sa5 no fue estadísticamente significativa (Figura 16A). Sin embargo, el número de UFC recuperadas de los bazos colonizados con Sa30 fue significativamente mayor al correspondiente en los bazos colonizados con Sa5 (Figura 16B).

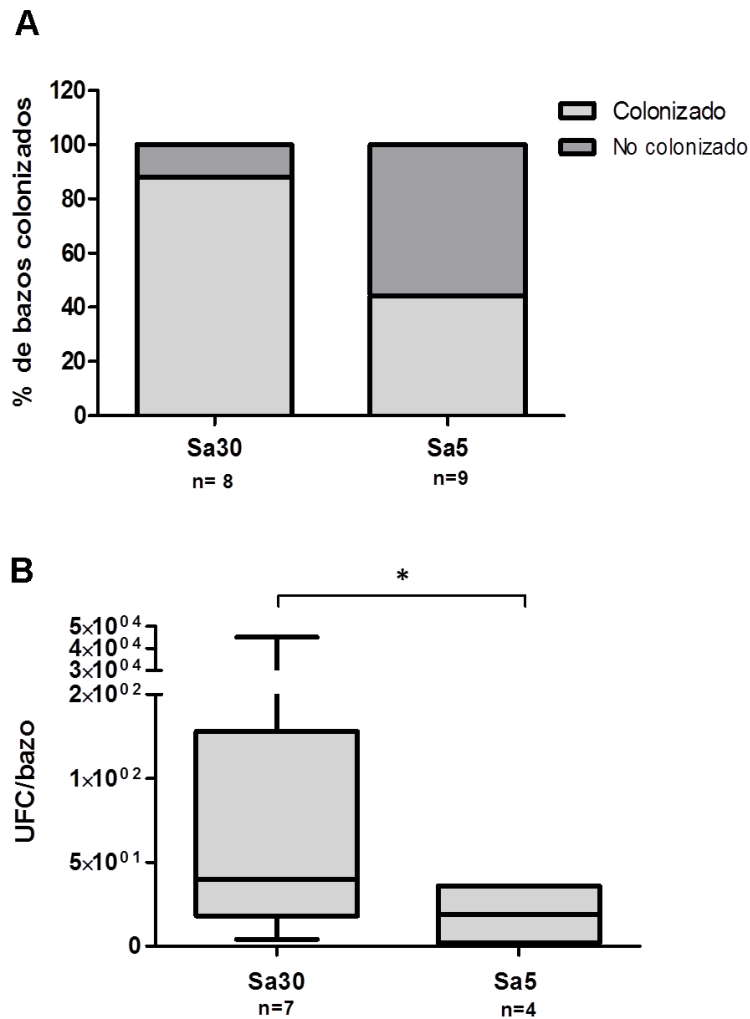


Figura 16: (A) Porcentaje de ratones inoculados con Sa30 o Sa5 que presentaron colonización bacteriana en el bazo ($P=0.131$, Prueba exacta de Fisher). **(B)** Comparación de UFC/bazo de los bazos colonizados ($P=0.023$, prueba de Mann-Whitney).

3.4-Infección ósea

S. aureus es el agente causal más frecuente de osteomielitis, en niños y adultos [132]. El modelo de osteomielitis estudia la capacidad bacteriana de colonizar el tejido óseo y causar daño en el mismo.

Sa30 demostró una mayor virulencia en este modelo. En primer lugar, el análisis macroscópico del daño del tejido óseo, medido como índice osteomielítico, fue significativamente mayor en las tibias infectadas con Sa30, comparado con las tibias inoculadas con Sa5 (Figura 17A). En segundo lugar, se recuperó un número más grande de

UFC de las tibias infectadas con Sa30, demostrando una mejor habilidad para colonizar y persistir en el tejido (Figura 17B).

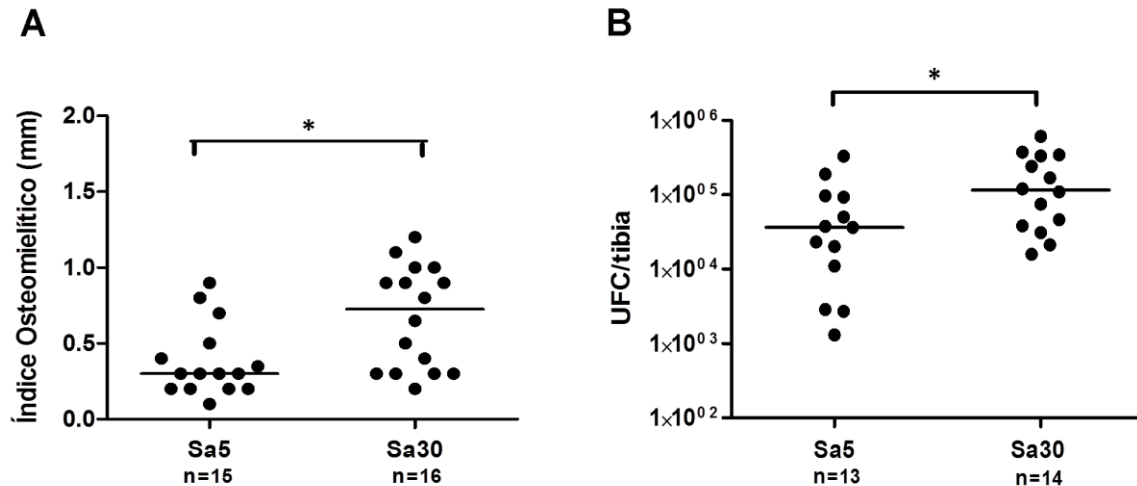


Figura 17: (A) Índices osteomielíticos medidos en las tibias infectadas por Sa30 o Sa5, comparados con la prueba de Mann-Whitney. Cada punto indica la medición realizada en un animal y la barra indica la mediana del grupo. Las tibias inoculadas con Sa30 presentaron un mayor índice osteomielítico ($P: 0,0139$). (B) Se recuperó una mayor carga bacteriana de las tibias inoculadas con Sa30, con respecto a las tibias inoculadas con Sa5 ($P: 0,0273$, prueba de Mann-Whitney).

En experimentos previos se inocularon ratones con la cepa NRS384 (representante del clon USA300) bajo condiciones experimentales idénticas, y se recuperó un recuento de UFC de 1.4×10^5 (Rango intercuartilo 3.6×10^4 - 3.5×10^5) y una mediana de IO de 0.3 (Rango intercuartilo 0.2-0.5). Estos resultados no difieren significativamente de los obtenidos con la cepa Sa30, lo que indica una habilidad similar de ambas cepas de sobrevivir en el nicho óseo en este modelo. Al comparar los IO, Sa30 produce mayor daño en el tejido óseo que NRS384.

Cabe aclarar que para este modelo inicialmente se realizó una comparación de la virulencia entre dos cepas clasificadas como ST30-IVc y dos ST5-IVa. Al no encontrar diferencias significativas en el comportamiento de las cepas del mismo linaje, se decidió utilizar sólo una de cada ST (Sa30 y Sa5) para los siguientes experimentos.

3.5-Infección respiratoria

En este modelo se evaluó la capacidad de ambos clones de producir bacteriemia y/o infección pulmonar a partir de la inoculación intranasal.

Cuatro horas posteriores a la inoculación por vía intranasal, se evaluó la ocurrencia de bacteriemia. Un mayor número de ratones inoculados con Sa30 presentó bacteriemia (12/18 vs. 8/18), aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 18A).

El recuento de UFC en pulmón de los ratones inoculados con 1×10^8 UFC de Sa30 o Sa5 se realizó a las 24hs posteriores a la inoculación. Los recuentos de ambos grupos de ratones no presentaron diferencias significativas (Figura 18B).

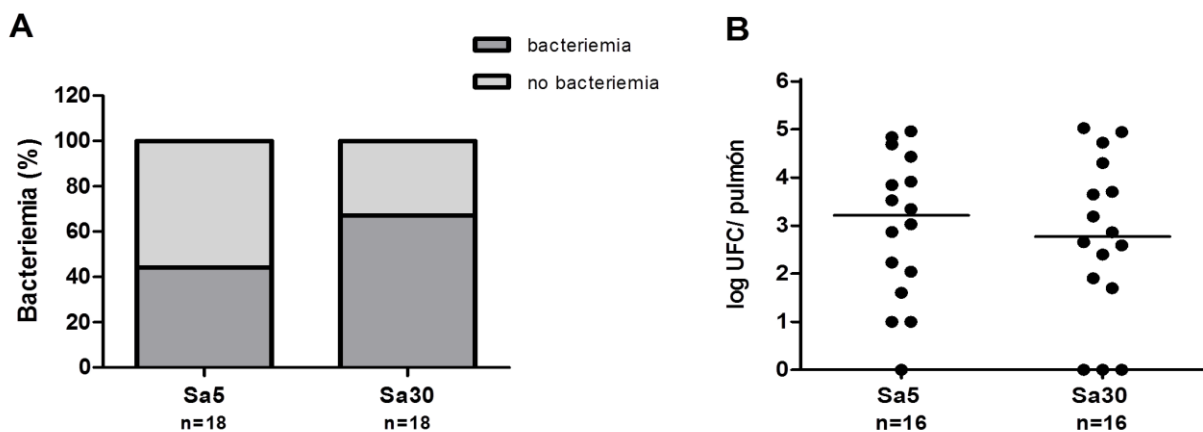


Figura 18: (A) Porcentaje de ratones con bacteriemia 4 h posteriores a la inoculación. Los ratones inoculados con Sa30 presentaron un mayor porcentaje de bacteriemia, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ($P: 0,315$; Prueba exacta de Fisher). (B) Logaritmo de las UFC recuperadas de los pulmones de los ratones inoculados con Sa30 y Sa5 a las 24 h ($P: 0,734$). Prueba de Mann-Whitney). Cada punto indica la determinación realizada en un animal y se indica la mediana de cada grupo.

4-Análisis de la expresión de genes de virulencia

Los clones de SAMR-AC ST30-IVc y ST5-IVa presentaron perfiles diferentes de genes codificantes de factores de virulencia en la búsqueda por PCR. A partir de esa información se seleccionaron dos genes codificantes de adhesinas para realizar la cuantificación relativa de su expresión por RT-qPCR.

El gen codificante de la proteína de unión a fibronectina A (*fnbA*) se seleccionó porque esta proteína, además de mediar la adhesión de *S. aureus* a la matriz extracelular del hospedador, permite la invasión bacteriana a células no fagocíticas mediante la interacción con la integrina $\alpha_5\beta_1$ [12]. El gen *clfB* se eligió también porque la proteína ClfB promueve la colonización nasal tanto en ratones [133] como en seres humanos [19].

La expresión de ambos genes se comparó en las cepas Sa30 y Sa5 en dos fases de crecimiento distintas, la fase de crecimiento exponencial media ($DO_{620nm}=0,5-0,7$) y fase exponencial tardía ($DO_{620nm}=1,2$). Se incluyó a la cepa SAMR USA300, de conocida patogenicidad.

La expresión del gen *clfB* no presentó diferencias significativas en Sa30, Sa5 y USA300 en la fase exponencial media (Figura 19 A) ni en la fase exponencial tardía (Figuras 19 B).

En la fase exponencial media no se detectó expresión del gen *fnbA* en la cepa Sa5. La expresión del gen en la cepa USA300 fue significativamente mayor que la cepa Sa5 (Figura 19 C). En la fase exponencial tardía la expresión del gen *fnbA* fue significativamente mayor en la cepa Sa30 y USA300 con respecto a la cepa Sa5 (Figura 19 D).

Los valores se expresaron como logaritmo de las cantidades relativas normalizadas (NRQ) con respecto a la expresión de los genes de referencia *gyrB* y *pta* en la fase exponencial media y los genes *gyrB* y *gap* en la fase exponencial tardía. En el anexo I se detalla la información de las condiciones y la validación del ensayo (MIQE).

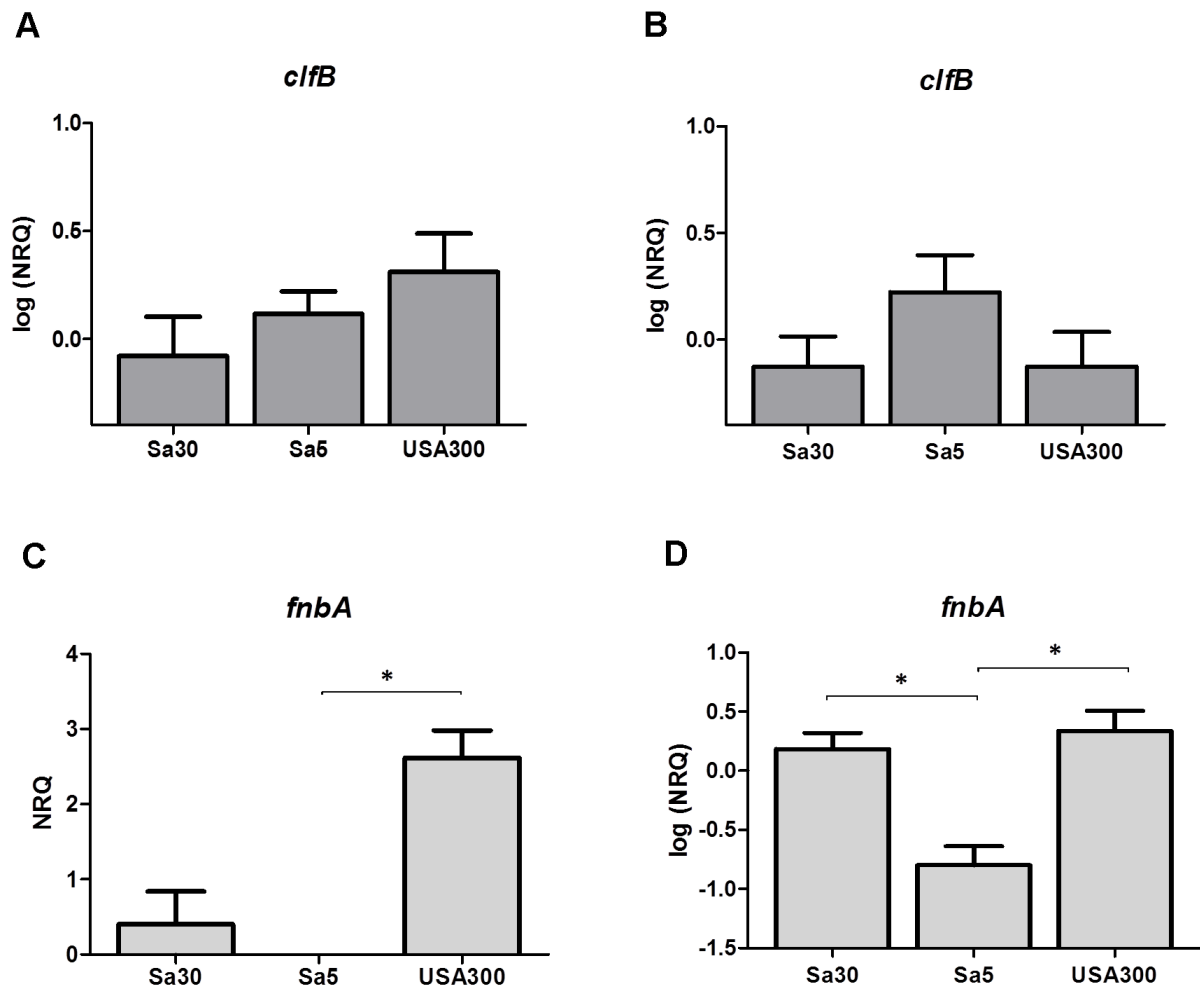


Figura 19: Logaritmo de NRQ de los genes de interés. Cada barra representa la media y el error estándar de la media. No se detectaron diferencias entre los tres grupos en la expresión de *clfB* en la fase exponencial media (P : 0,333, ANOVA) **(A)** ni en la fase exponencial tardía (P : 0,282, ANOVA) **(B)**. **(C)** Expresión de *fnbA* en la fase exponencial media representado como la mediana de NRQ y rango intercuartilo (P : 0,032, Kruskal-Wallis seguido por prueba de Dunn). **(D)** Expresión de *fnbA* en la fase exponencial tardía representado como log NRQ. Cada barra indica la media y el error estándar de la media. En la cepa Sa30 se detectó la misma cantidad relativa de *fnbA* que USA300, y en ambas fue significativamente mayor que en Sa5 (P : 0,011, ANOVA seguido de la prueba de Bonferroni).

Discusión

Discusión

En el presente trabajo se describió la epidemiología molecular de SAMR-AC y se comparó la virulencia de los principales clones circulantes en el país, mediante el análisis de aislamientos recolectados en el marco de dos estudios multicéntricos, en los cuales se estudiaron infecciones por SAMR adquiridas en la comunidad en pacientes adultos sin factores de riesgo tradicionales para SAMR.

A partir de dichos estudios se corroboró que SAMR-AC es el principal agente causal de infecciones de piel y estructuras relacionadas en adultos y adolescentes de la comunidad de la región estudiada y provoca infecciones invasivas graves. En ambos casos los pacientes susceptibles fueron en su mayoría jóvenes sin enfermedades de base u otras comorbilidades [129, 131].

La alta prevalencia de SAMR-AC como agente etiológico de IPER detectada provocó el cambio en las recomendaciones del tratamiento empírico de estas infecciones en Argentina [130]. En la publicación mencionada se introdujo, además, la recomendación de practicar un cultivo de la lesión cutánea, especialmente en áreas donde no se conoce la prevalencia de éste patógeno. Este cambio destaca la gran importancia de conocer la prevalencia local de los distintos agentes etiológicos de infecciones, para utilizar los antibióticos de manera correcta y eficaz evitando además tratamientos innecesarios. El análisis multivariado indicó que debe sospecharse SAMR-AC especialmente en todo paciente menor de 50 años con una lesión purulenta.

S. aureus tradicionalmente ha sido la causa más frecuente de IPER a nivel mundial, pero la emergencia de SAMR-AC como patógeno no sólo provocó el reemplazo de las cepas endémicas, sino que también aumentó la incidencia de dichas infecciones [5]. Por ejemplo, en Estados Unidos, diferentes estudios documentaron aumentos en el número de casos de IPER entre los años 1993 y 2006 y se lo relacionó con la aparición de SAMR-AC [134, 135].

Las IPER por SAMR-AC difieren de las causadas por SAMR-AH en distintos aspectos. En primer lugar porque afectan principalmente a niños y adultos jóvenes y en su mayoría a pacientes de sexo masculino. Los pacientes afectados en general se encuentran previamente sanos o sin ningún factor predisponente [88]. La alta prevalencia de SAMR-AC en IPER y las

características de los pacientes de nuestro país que fueron incluidos en el estudio coinciden con lo descrito en otros lugares del mundo.

Una de las características más preocupantes de *S. aureus*, y en particular de SAMR, es su capacidad de producir infecciones invasivas graves, potencialmente mortales, con diferentes localizaciones. El CDC, en Estados Unidos en el año 2005 estimó en 19.000 el número de muertes por enfermedad invasiva por SAMR en ese país, comparable al número de muertes atribuidas a HIV/SIDA [79]. En el caso particular de las infecciones por SAMR de inicio en la comunidad, los pacientes se presentan principalmente con bacteriemia [136], infecciones osteoarticulares [137], endocarditis [138] y también, aunque con menor frecuencia, con meningitis [86] o neumonía necrotizante [139].

Nuestro estudio pone de manifiesto las características clínicas y epidemiológicas de las infecciones invasivas por SAMR adquiridas en la comunidad en la población adulta de Argentina [131], dado que no se contaba hasta el momento de su realización con un estudio multicéntrico de estas particularidades. Dichas infecciones se presentaron mayoritariamente en pacientes jóvenes de sexo masculino, de los cuales más de un tercio de ellos no refirió tener ningún factor predisponente y todos requirieron hospitalización. La severidad de los casos se reflejó en la alta proporción de pacientes admitidos a unidad de cuidados intensivos y en una mortalidad del 16%.

La presentación clínica más importante fue la bacteriemia. Esta entidad es una de las infecciones invasivas más frecuentes desde donde se aísla SAMR [140]. En Argentina, Paganini y colaboradores documentaron un aumento de la incidencia de bacteriemias por SAMR de inicio en la comunidad en niños a partir del año 2004 [141]. La evolución de las bacteriemias por SAMR puede ser no complicada, con cultivos negativos días después de instaurado el tratamiento antibiótico, o complicada, con focos metastásicos principalmente en válvulas cardíacas, pulmones, articulaciones o huesos, requiriendo tratamiento antibiótico prolongado y otras intervenciones.

En nuestro estudio, el foco primario principal de las infecciones invasivas, en los casos en donde pudo ser establecido, fue el cutáneo. Este hecho concuerda con lo observado en un estudio retrospectivo de nuestro país en donde se analizaron casos de neumonía adquirida en la comunidad por SAMR, en el cual el foco primario fue una IPER en un 81% de los casos [142]. El hecho de que SAMR-AC sea el patógeno de mayor prevalencia

en IPER de la comunidad actualmente, acarrea una mayor probabilidad de ocurrencia de infecciones invasivas por SAMR-AC, lo que supone un alerta para el sistema de salud y realza la importancia de contar con tratamientos empíricos que prevean una posible infección invasiva por SAMR.

Si bien en el presente estudio no se estableció la prevalencia de infecciones invasivas por SAMR-AC en la población adulta, datos nacionales indican que la misma es significativa, tanto en adultos como en población pediátrica. Por ejemplo, en pacientes pediátricos que fueron incluidos en un estudio multicéntrico publicado en 2008, se detectó una prevalencia del 62% de SAMR-AC, y aproximadamente un 25% de infecciones invasivas [105]. Gardella y colaboradores detectaron un 33% de infecciones invasivas adquiridas en la comunidad producidas por SAMR-AC entre 69 cepas estudiadas recuperadas en 6 hospitales del país en 2008 [102]. En otro estudio realizado en 66 hospitales que incluyó pacientes de todo el país con infecciones por *S. aureus* durante noviembre de 2009 [143] se detectó una prevalencia de 55% de SAMR y 39% del total fueron clasificados como SAMR-AC por sus características genéticas. Un 19,4 % de los pacientes con SAMR-AC presentaron sepsis severa o shock séptico.

La tipificación por distintas técnicas moleculares de los aislamientos estudiados en este trabajo de tesis permitió detectar un cambio en la epidemiología de SAMR-AC. Se comprobó que el clon ST30-IVc se estableció como predominante en las infecciones adquiridas en la comunidad, desplazando al clon anteriormente descrito, el ST5-IVa, con predominio en la comunidad hasta el año 2008.

El clon ST30-IVc provocó la mayoría de las infecciones de piel y estructuras relacionadas, y también la mayor parte de las infecciones invasivas en el periodo analizado. El tipo de *spa* más frecuente fue el t019 aunque no pudo ser determinado en la totalidad de los aislamientos ST30. Más aún, se observó una asociación significativa entre la recuperación de ST30-IVc y la ocurrencia de infección invasiva, comparado con el tipo de infección provocada con mayor frecuencia por ST5-IVa.

SAMR-AC ST30-IVc pertenece al complejo clonal 30 (CC30). Este complejo agrupa diferentes clones diseminados internacionalmente, tanto SAMS como SAMR-AH y SAMR-AC, y su presencia se ha asociado con un riesgo aumentado de endocarditis infecciosa [144], complicaciones hematógenas (endocarditis e infecciones osteoarticulares) [145] y

bacteriemia persistente [146]. En un estudio reciente CC30 se estableció como un predictor independiente de mortalidad en bacteriemias por *S. aureus* [147].

DeLeo y colaboradores analizaron la evolución dentro de CC30 por estudios filogenéticos, y llegaron a la conclusión que ST30-IV, clon “comunitario”, evolucionó a partir de un ancestro común junto con el clon pandémico resistente a penicilina, *S. aureus* fagotipo 80/81 [148], un clon muy virulento que, a partir de su emergencia en los años 1950s predominó como el principal agente causal de numerosas infecciones de piel, sepsis, neumonía en adultos y niños hospitalizados y de la comunidad. Del mismo ancestro surgieron los clones SAMR asociados al ámbito hospitalario pertenecientes a CC30 (por ejemplo ST36-II, ERMSA 16), los cuales además mostraron una menor virulencia en modelos de sepsis y mutaciones en *agrC* y *hla* que impiden la expresión de esta toxina. Estas mutaciones no están presentes en las cepas CC30 comunitarias, como ST30-IV ni en las clasificadas como fagotipo 80/81 [148, 149].

ST30-IV es considerado un clon pandémico, ya que ha sido aislado en muchos países en todos los continentes [93, 150]. En Sudamérica, SAMR ST30-IV fue hallado previamente en países vecinos, lo que podría indicar el origen del ingreso al nuestro. Por ejemplo, una de las primeras descripciones de una infección por SAMR adquirida en la comunidad en Sudamérica fue por ST30-IV en Brasil en el año 2002 [151]. En publicaciones posteriores lo describieron como el clon mayoritario en infecciones de la comunidad y también en infecciones hospitalarias en Porto Alegre, Brasil [152]. En Uruguay, entre 2002 y 2003, ST30-IVc fue responsable de un gran brote de infecciones adquiridas en la comunidad, en donde se registraron al menos 12 muertes y más de 1000 infectados [153] y posteriormente se comprobó su permanencia en la comunidad en ese país como causa de infecciones de piel y partes blandas [154].

En Argentina, hasta el año 2008, SAMR ST30-IV representaba un clon minoritario en la comunidad [102] pero, en el momento de la realización de este trabajo de tesis se puso en evidencia el cambio en la epidemiología de SAMR-AC y la mayor prevalencia de ST30-IVc [129, 131]. Otros autores, en el 2014, confirmaron los mismos hallazgos, al observar que ST30-IVc se aisló en el 60% de las infecciones inicio en la comunidad en Argentina y se lo encontró principalmente en pacientes adultos sin factores de riesgo [143].

En los últimos años también fueron comunicados casos clínicos de infección invasiva severa, en pacientes previamente sanos, provocada por el clon ST30-IV-t019-LPV+. Por ejemplo, en Malasia, se notificó un caso de osteomielitis, piomiositis y artritis séptica por diseminación hematógena en un paciente masculino joven y sin factores de riesgo, el cual evolucionó favorablemente luego de seis semanas de tratamiento [155].

En el año 2015 nuestro grupo de trabajo comunicó un caso de neumonía necrotizante por SAMR ST30-IV-t019-LPV+ en un paciente masculino inmunocompetente de 50 años que falleció a los 3 días de presentación de la enfermedad [139]. El caso ocurrió en febrero de 2013 en un hospital de la provincia de Buenos Aires. Brevemente, el paciente ingresó a la guardia por cefalea intensa, broncoespasmo y malestar general, con antecedentes de hipertensión arterial en tratamiento y sobrepeso. Se internó en clínica médica al día siguiente con broncoespasmo severo y fiebre. Por las manifestaciones clínicas, datos radiológicos y de laboratorio se interpretó el cuadro como sepsis respiratoria y se indicó ceftriaxona y claritromicina. Horas más tarde, se realizó una nueva radiografía la cual indicó infiltraciones y deterioro de la función pulmonar, con agravamiento de la clínica, motivo por el cual ingresó a la unidad de terapia intensiva. El paciente refirió que desde hacía 3 días presentaba una inflamación escrotal bilateral que no se evidenció en el momento de la revisión. Horas más tarde se observaron imágenes radiológicas de neumonía necrotizante en ambos pulmones, compatible con estafilococcia, por lo que se inició tratamiento con vancomicina, piperacilina/tazobactam y claritromicina.

Al día siguiente el paciente continuó febril, con hipoxia e hipoventilación generalizada y falleció a las pocas horas. En los hemocultivos desarrolló SAMR, sensible a ERY, CLI, rifampicina, minociclina, TMS, gentamicina, ciprofloxacina y vancomicina, que luego fue tipificado como ST30-IV-t019-LPV+.

En los casos publicados de neumonía necrotizante por SAMR-AC se han descrito diferentes clones, como el ST59-IV-t437-PVL+, ST910-IV-t318, ST398-V-t034, ST1409-IV-t653 [156], por lo que no parece haber una asociación de esta patología con un determinado clon. De cualquier manera, la genotipificación de la cepa recuperada nos permitió demostrar que el clon ST30-IV-t019 puede ser encontrado como agente etiológico de esta enfermedad. La rápida evolución y el fatal desenlace del caso podrían indicar la invasividad y potencial virulento de este clon. Si bien es poco frecuente, se debe sospechar SAMR como agente

etiológico de neumonía adquirida en la comunidad en pacientes con infiltrados cavitados o necrosis en las radiografías, con derrame pleural rápidamente progresivo, hemoptisis, síntomas gripales previos, neutropenia, en pacientes jóvenes o con IPER concomitantes e instaurar un tratamiento con cobertura para SAMR ya que es un cuadro muy grave de progresión rápida [142].

En el ámbito hospitalario cada vez con más frecuencia se aíslan cepas de genotipo típicamente comunitario, SAMR-AC, reemplazando a las cepas SAMR-AH. En un estudio prospectivo en donde se analizaron bacteriemias por *S. aureus* en pacientes hospitalizados en un hospital universitario de Buenos Aires, el 47,8% de los aislamientos fueron SAMR, y un 20% de los mismos se clasificaron como ST30-IVc [157].

El clon ST5-IVa, SAMR mayoritario en la comunidad hasta el año 2008, en este estudio se ubicó en segundo lugar en las IPER y en tercer lugar en las infecciones invasivas de la comunidad en adultos. Pertenece al complejo clonal 5 (CC5), ampliamente diseminado en Argentina y en el mundo, ya que agrupa clones epidémicos comunitarios y hospitalarios. Además se considera un complejo con alta plasticidad genómica, capaz de adquirir mecanismos de resistencia con facilidad. El hecho más destacado es que los aislamientos resistentes a vancomicina (VRSA) descritos en el mundo pertenecen al ST5 [158] y también una amplia proporción de aislamientos hVISA se agrupan dentro de CC5 [159]. En nuestro país, Di Gregorio y colaboradores describieron dos aislamientos hVISA pertenecientes al CC5 [157] y, Egea y colaboradores observaron la introducción de SAMR-AC ST5-IVa en los hospitales, reemplazando a los clones SAMR-AH tradicionales y su prevalencia en infecciones pediátricas en niños con y sin factores de riesgo [143].

Un bajo porcentaje de las cepas de SAMR-AC analizadas en el total de la colección presentaron resistencia a otras familias de antibióticos, además de β -lactámicos. Esta característica es típica de las cepas SAMR que circulan en la comunidad, las cuales generalmente no presentan resistencia a más de dos familias de antibióticos. Llamativamente, las cepas con resistencia acompañante se recuperaron con mayor frecuencia a partir de infecciones invasivas.

Si se tiene en cuenta solamente el tipo de resistencia acompañante que presenta el clon ST30-IVc con respecto al ST5-IVa, el reemplazo clonal no tendría un impacto desfavorable, ya que un menor porcentaje de las cepas ST30 son resistentes a CLI (11% vs

16%), una de las opciones terapéuticas actuales para el tratamiento de SAMR. De todas maneras, la resistencia a ERY/CLI con fenotipo MLS_B inducible fue la resistencia acompañante más frecuente en todos los SAMR-AC estudiados, por lo que se requiere una correcta vigilancia de los niveles de resistencia a estos antibióticos, ya que podrían perder su eficacia frente a SAMR-AC en algunos años.

La resistencia a TMS se encontró en sólo un aislamiento de toda la colección (clasificado como ST30-IVc). Esta observación permitió incluir a este antimicrobiano como una de las drogas de elección recomendada para el tratamiento empírico de las IPER de la comunidad.

Se comparó la virulencia de los clones SAMR ST30-IVc y ST5-IVa con el objetivo de corroborar la hipótesis de que el clon ST30-IVc presenta un mayor grado de virulencia lo que le habría permitido ocasionar con mayor frecuencia infecciones invasivas en pacientes adultos sin factores de riesgo. Se comparó a los clones desde distintos aspectos, según el perfil de genes codificantes de factores de virulencia, la formación de biopelículas, la expresión de ciertos factores de adhesión y el comportamiento en modelos experimentales de infección en animales de laboratorio.

Una de las principales estrategias que exhibe *S. aureus* durante una infección es la habilidad de adherirse a las proteínas u otras moléculas de la matriz extracelular y el plasma, un evento crucial para la colonización y diseminación del patógeno en el hospedador [9].

Según lo observado por Tristan y colaboradores, los genes que codifican la proteína de unión a sialoproteína ósea (*bbp*) y la proteína B de unión a fibronectina (*fnbB*) se asocian significativamente con osteomielitis, artritis y endocarditis de origen hematógeno [117]. La presencia de los genes codificantes de las dos proteínas de unión a fibronectina (FnBP A y B) se asocia con infección invasiva (endocarditis o artritis séptica u osteomielitis) en comparación con cepas de portación nasal [160]. La expresión de FnBPA y FnBPB ha sido descrita como el factor más importante de invasión bacteriana a células no fagocíticas profesionales como osteoblastos, queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales y en un modelo de sepsis murina, Shinji y col., demostraron que la cooperación entre las dos FnBPs es indispensable para la inducción de una infección severa que provoca la muerte en ese modelo [161]. Las diferencias aquí observadas entre ambos clones se restringen a algunos factores de adhesión, pero llamativamente los genes *fnbB*, *cna* y *bbp* se encontraron sólo en

ST30-IVc, el cual se asoció a la ocurrencia de infecciones invasivas, y presentó mayor virulencia en dos de los modelos animales realizados.

Esta diferencia en el perfil de genes de adhesinas no se reflejó, sin embargo, en la adherencia a la superficie de poliestireno en el ensayo de producción de biopelículas, pero debe tenerse en cuenta que dicha adherencia puede no reflejar la verdadera unión a moléculas biológicas que ocurre durante una infección.

El uso de modelos de infección en animales de laboratorio ha permitido a lo largo de los años generar conocimiento de los distintos determinantes de virulencia de muchos patógenos. En este trabajo de tesis se utilizaron tres modelos previamente validados para comparar la virulencia de SAMR-AC ST30-IVc y ST5-IVa.

Como se ha dicho anteriormente, la piel y el tejido subcutáneo son los principales sitios de infección por SAMR-AC y en nuestro estudio se los reconoció como el foco inicial más importante de infecciones invasivas. El clon ST30-IVc mostró una mayor virulencia en el modelo de infección subcutánea, que exploró la capacidad de ambos clones de sobrevivir y replicarse en el nicho subcutáneo e invadir otros tejidos.

En primer lugar, se recuperó una mayor carga bacteriana a partir de las lesiones cutáneas, y además el recuento de UFC de ST30-IVc fue cerca de veinte veces mayor al número de UFC inoculado, lo que indica una mejor capacidad de replicación en el microambiente subcutáneo. En segundo lugar, exhibió una mayor tendencia a escapar del foco primario y migrar hacia otros sitios, y una ventaja para replicarse en otros órganos como el bazo. Esta capacidad de invasión es concordante con la observación previa de la asociación significativa entre la recuperación de ST30-IVc y la ocurrencia de infección invasiva descrita en la figura 9.

Otros autores han estudiado la virulencia de clones comunitarios del linaje ST30 en modelos animales. Por ejemplo, Chua y colaboradores, en Australia, observaron que la cepa SAMR-AC JKD6177 (ST30-IV-LPV+) produce lesiones similares en un modelo murino de infección subcutánea e iguales niveles de LPV y hemolisina alfa que un aislamiento del clon USA300, conocido por su alta virulencia y capacidad de diseminación [162, 163]. Por el contrario, Li y colaboradores encontraron que un aislamiento del clon USA 1100 (ST30-IVa) produjo lesiones cutáneas de considerable menor tamaño e indujo menor respuesta

inflamatoria comparado con otros SAMR-AC como USA300 en un modelo de infección de piel en conejos [91]. En este último caso hay que considerar que no siempre el área de la lesión cutánea se correlaciona con la cantidad de bacterias en la misma [164]. Más aún se ha propuesto que la cantidad de UFC recuperada de la lesión es un mejor predictor de virulencia que el tamaño del absceso [165]. También es importante tener en cuenta que, incluso siendo clasificados como pertenecientes al mismo secuenciotipo, los aislamientos utilizados en los distintos trabajos pueden tener diferencias a nivel genómico, por ejemplo, el clon conocido en Estados Unidos como USA1100 posee un SCC*mec* tipo IVa [166], a diferencia del clon ST30 descrito en nuestro país y en Uruguay (ST30-IVc). De cualquier manera, los resultados obtenidos en este trabajo, sumado a la asociación con infecciones invasivas enfatizan que la circulación del linaje ST30 en nuestro país es un hecho preocupante.

Las MSCRAMMs juegan un importante rol en la formación de abscesos y particularmente se vio que la presencia de ambas FnBPs favorecen la formación de abscesos en un modelo murino de infección subcutánea [165]. La combinación de ambas FnBPs, entre otros factores, podría darle una ventaja a ST30-IVc en este sentido.

En una revisión de la literatura, Vardakas y col., observaron que las infecciones osteoarticulares representan entre un 8% y un 43% de las infecciones invasivas por SAMR-AC, con una clara predilección por niños y jóvenes [137]. Se realizó un modelo de osteomielitis aguda con el fin de analizar la capacidad de ambos clones de colonizar, sobrevivir y causar daño en el tejido óseo, y en este caso, el clon ST30-IVc también exhibió una mayor virulencia. Se observó una mayor carga bacteriana en el sitio de infección a las 96 hs en los animales inoculados con el clon ST30-IVc y más aún éstos presentaron un mayor daño óseo, evidenciado como índice osteomielítico. Esta diferencia podría deberse a la expresión de algunos genes presentes en ST30-IVc, ya que por ejemplo, la proteína de unión a colágeno (codificada por el gen *cna*) por su afinidad al colágeno es un factor de virulencia en modelos de artritis séptica [167] y osteomielitis [24], la unión a fibronectina favorece el desarrollo de osteomielitis en un modelo murino [168] y la invasión de osteoblastos, mediada por FnBPs puede favorecer la persistencia bacteriana al evadir el sistema inmunológico [169].

Se estima que un 15-36% de la población mundial está colonizada con *S. aureus* y la portación nasal es considerada un factor de riesgo importante para el desarrollo de una infección [2]. El modelo de infección respiratoria evaluó la capacidad de los clones de desarrollar una infección pulmonar, a partir de la ruta de ingreso intranasal. En este contexto, ST5-IVa y ST30-IVc no mostraron diferencias para establecerse en el nicho pulmonar a las 48 horas posteriores a la inoculación, ya que se recuperó el mismo número de UFC en ambos casos. Esta observación, a diferencia de lo concluido en los otros modelos, podría proporcionar una idea de los factores de virulencia que cumplen funciones específicas en el establecimiento de distintos tipos de infección a partir de distintas vías de ingreso. Posiblemente el mismo nivel de expresión del gen *clfB*, codificante de la proteína que favorece la adhesión al epitelio nasal, concede a ambos clones una habilidad similar de persistir y desarrollar una infección por vía intranasal.

En el análisis cuantitativo de la transcripción de genes, observamos que ST30-IVc expresa una mayor cantidad del gen *fnbA*, codificante de la proteína FnBPA. Una mayor expresión de este gen fue observada en el pasaje entre la colonización nasal a una infección sistémica en un modelo murino, indicando su importancia en el establecimiento de una infección [170]. La mayor capacidad invasiva de ST30-IVc podría deberse a la presencia de los dos FnBPs (A y B) y una posible mayor producción de FnBA, demostrada por una expresión más alta de su gen codificante. Asimismo, una combinación específica de factores de virulencia, en el contexto de un fondo genético con grandes ventajas adaptativas y características pandémicas podría explicar el predominio de ST30-IVc en la comunidad y su mayor virulencia, aunque estas aseveraciones deberían ser exploradas más profundamente en futuras investigaciones.

Conclusiones

Conclusiones

Este trabajo de tesis ha contribuido al conocimiento de la epidemiología molecular y la virulencia de los clones de SAMR que circulan en nuestro país en la comunidad. Del desarrollo y análisis de los resultados se desprenden las siguientes conclusiones:

- Un 70% de las IPER de inicio en la comunidad en pacientes con edad mayor o igual a 14 años sin factores de riesgo están causadas por SAMR-AC. Es necesario que el tratamiento empírico de estas infecciones incluya antibióticos eficaces frente a SAMR.
- La recuperación de SAMR-AC a partir de una IPER en un paciente de la comunidad se asocia con la presencia de una lesión purulenta y con edad menor a 50 años.
- Las infecciones invasivas por SAMR-AC en adultos se observan principalmente en individuos jóvenes, sin patología predisponente grave y con un alto nivel de severidad.
- La mayor parte de las IPER y de las infecciones invasivas por SAMR-AC en la población estudiada se deben a la presencia de un clon predominante, identificado como ST30-SCC*mecIVc*.
- El clon ST30-SCC*mecIVc* reemplazó al clon ST5-SCC*mecIVa*. Este último había sido descrito como mayoritario en infecciones por SAMR adquiridas en la comunidad hasta el año 2008.
- Comparado con el clon ST5-SCC*mecIVa*, el nuevo clon prevalente tiene menor nivel de resistencia a antibióticos no β -lactámicos.
- El clon ST30-SCC*mecIVc* se asocia a una mayor ocurrencia de infección invasiva.
- Comparado con el clon ST5-SCC*mecIVa*, el clon ST30-SCC*mecIVc* es más virulento en un modelo de infección subcutánea, ya que presenta una mejor replicación y mayor capacidad de invasión a partir del foco primario.
- El clon predominante, en un modelo experimental, causa mayor daño en el tejido óseo acompañado de una mayor replicación en el mismo.
- El clon ST30-SCC*mecIVc* fue responsable de un caso fatal de neumonía necrotizante en nuestro país, demostrando una gran agresividad. Sin embargo, en un modelo

experimental de infección respiratoria no presenta una mayor virulencia que el clon ST5-SCC*mecIVa*.

- La presencia de los genes *hlg* y *fnbB* en SAMR-AC se asocia con enfermedad invasiva.
- El perfil de genes de virulencia específico que posee ST30-SCC*mecIVc*, dado por genes codificantes de proteínas que unen fibronectina, colágeno y sialoproteína ósea, sumado a una probable mayor producción de la proteína FnbA podría explicar la mayor virulencia en los dos modelos de infección experimental y la asociación con una mayor ocurrencia de infección invasiva.
- Se destaca la importancia de la vigilancia epidemiológica de las infecciones por SAMR-AC en la comunidad, ya que pueden darse con alta prevalencia, afectar a individuos sanos sin factores de riesgo y ser un reservorio para el desplazamiento de este patógeno al ámbito hospitalario.
- La epidemiología molecular de SAMR-AC en nuestro país es dinámica y se detecta la circulación de clones pandémicos. Se requiere de un continuo análisis para comprender la situación epidemiológica y este dinamismo constituye una alarma para tomar medidas de control efectivas.

Anexo metodológico

Anexo metodológico I

Reacciones de PCR

Confirmación de la resistencia a meticilina y clasificación de SSCmec

- **Amplificación del gen *mecA***

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón	Control positivo
3' <i>mecA</i>	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	550	ATCC 43300
5' <i>mecA</i>	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC		

La reacción se llevó a cabo con cebadores descritos en la literatura [109] en un volumen final de 50 µl. La mezcla de reacción se preparó con buffer de PCR (1X), ClMg₂ (2,5 mM), dNTPs (500 µM), cebadores (0,8 µM cada uno), ADN (50 ng), *Taq* polimerasa (1U) y agua milliQ c.s.p 50 µl. Las condiciones de ciclado utilizadas fueron: una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación (60 segundos a 94°C, 60 segundos a 52°C y 60 segundos a 72°C) y una fase de elongación final de 5 minutos a 72°C.

- **Tipificación y subtipificación de SCCmec**

Complejo *mec* clase A

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)	Control positivo
ml-1	AATGGCGAAAAAGCACAACA	480	A3
ml-2	GACTTGATTGTTTCCTCTGTT		
mcR-2	CGCTCAGAAATTTGTTGTGC	1597	
mcR-3	ATCTCCACGTTAATCCATT		

Se utilizaron los cebadores descritos anteriormente [110]. Los cebadores ml-1 y ml-2 amplifican el gen *mecI*, mientras que mcR-2 y mcR-3 amplifican *mecR1*. El complejo *mec* de clase A contiene ambos genes completos. Las reacciones se llevaron a cabo con buffer de

PCR (1X), ClMg_2 (1,5 mM), dNTPs (500 μM), cebadores (0,4 μM cada uno), *Taq* polimerasa (1U), ADN (50 ng), agua milliQ csp 50 μl .

Las reacciones comenzaron con una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, seguida por 30 ciclos de amplificación (30 segundos a 94°C, 60 segundos a 52°C y 60 segundos a 72°C) y 10 minutos de elongación final a 72°C.

Complejo *mec* clase B:

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)	Control positivo
<i>IS1272</i> <i>mecR1</i>	ATTTTGGGTTTCACTCGGAT CAAATATTAAGAACGTGTT	565	6 (Pulsotipo A)

Condiciones de reacción: Desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C seguida por 15 minutos a la temperatura de unión de los cebadores (52°C). Pasados 5 minutos se agregó la *Taq* polimerasa. Siguió 30 ciclos de amplificación (94°C por 60 segundos, 52°C por 60 segundos, 72°C por 60 segundos) y una fase de amplificación final a 72°C por 10 minutos. La mezcla de reacción se preparó con las mismas concentraciones de reactivos que la reacción de amplificación del gen *mecA*.

Complejo *mec* clase C2

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)	Control positivo
mA7 IS2	ATATACCAAACCCGACA ACTACA TGAGGTTATTCAGATATTTTCGATGT	804	454

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 μl . La mezcla de reacción se preparó con buffer de PCR (1X), ClMg_2 (1,5 mM), dNTPs (400 μM), cebadores (0,8 μM cada uno), ADN (50 ng), *Taq* polimerasa (1U) y agua milliQ c.s.p 50 μl . Los cebadores fueron descritos por Kondo y colaboradores [111].

Las condiciones de ciclado utilizadas fueron: una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación (60 segundos a 94°C, 60 segundos a 50°C y 60 segundos a 72°C) y una fase de elongación final de 5 minutos a 72°C.

Complejos *ccr* 1, 2 y 3 (*ccrAB*):

La determinación del complejo *ccrAB* se realizó a través de una PCR múltiple descrita por Ito y colaboradores [112], en donde la combinación de cuatro cebadores permite la identificación de tres complejos *ccr*, *ccr* tipo 1 (A1B1), *ccr* tipo 2 (A2B2) y *ccr* tipo 3 (A3B3).

Tipo de complejo	Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)	Control positivo
A1B1	<i>ccr</i> -β2 <i>ccr</i> -α2	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT AACCTATATCATCAATCAGTACGT	700	A1C
A2B2	<i>ccr</i> -β2 <i>ccr</i> -α3	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	1000	6
A3B3	<i>ccr</i> -β2 <i>ccr</i> -α4	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT GCTCAAAGCAAGCAATAGAAT	1600	A3

El volumen final de la reacción fue de 50 µl, compuesto por buffer de PCR (1X), ClMg_2 (2,5 mM), dNTPs (500 µM), cebadores (0,8 µM cada uno), *Taq* polimerasa (1U), ADN (50 ng), agua milliQ csp 50 µl. La reacción comenzó con una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, seguida por 30 ciclos de amplificación (30 segundos a 94°C, 60 segundos a 50°C y 60 segundos a 72°C) y 10 minutos de elongación final a 72°C.

Complejo *ccr* 5 (*ccrC1*):

El volumen final de la reacción fue de 50 µl, compuesto por buffer de PCR (1X), ClMg_2 (2,5 mM), dNTPs (500 µM), cebadores (0,8 µM cada uno), *Taq* polimerasa (1U), ADN (50 ng), agua milliQ csp 50 µl. La reacción comenzó con una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, seguida por 30 ciclos de amplificación (60 segundos a 94°C, 60 segundos a 50°C y 60 segundos a 72°C) y 10 minutos de elongación final a 72°C. Se utilizaron los cebadores descritos por Milheirico y colaboradores [113].

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)	Control positivo
<i>ccrC</i> F2 <i>ccrC</i> R2	GTACTCGTTACAATGTTTGG ATAATGGCTTCATGCTTACC	449	454

Subtipificación del casete SCC*mec*IV [114]:

Cebador	Secuencia (5'-3')	Especificidad	Tamaño del amplicón (pb)
ccrB2 F ccrB2 R	CGAACGTAATAACATTGTCTG TTGGCWATTTTACGATAGCC	<i>ccrB2</i> (control interno)	203
J IVa F J IVa R	ATAAGAGATCGAACAGAAGC TGAAGAAATCATGCCTATCG	Tipo IVa	278
J IVb F J IVb R	TTGCTCATTTTCAGTCTTACC TACTTCAGCTGCATTAAGC	Tipo IVb	336
J IVc F J IVc R	CCATTGCAAATTTCTCTTCC ATAGATTCTACTGCAAGTCC	Tipo IVc y IVe	483
J IVd F J IVd R	TCTCGACTGTTTGCAATAGG CAATCATCTAGTTGGATACG	Tipo IVd	575
J IVg F J IVg R	TGATAGTCAAAGTATGGTGG GAATAATGCAAAGTGGAAACG	Tipo IVg	792
J IVh F J IVh R	TTCCTCGTTTTTTCTGAACG CAAACACTGATATTGTGTCTG	Tipo IVh	663

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ l. La mezcla de reacción se preparó con buffer de PCR (1X), ClMg_2 (1,5 mM), dNTPs (500 μ M), cebadores (J IVa F, J IVa R, J IVb F y J IVb R 0,2 μ M; J IVc F, J IVc R y *ccrB2* F 0,4 μ M; *ccrB2* R, J IVd F y J IVd R 0,8 μ M; J IVg F y J IVg R 0,9 μ M; J IVh F y J IVh R 1,8 μ M), ADN (5 ng), *Taq* polimerasa (1U) y agua milliQ c.s.p 50 μ l.

Las condiciones de ciclado utilizadas fueron: una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación (30 segundos a 94°C, 30 segundos a 48°C y 2 minutos a 72°C) y una fase de elongación final de 4 minutos a 72°C.

Tipificación del grupo de agr [51]

Grupo	Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)	Control positivo
I	<i>Pan agr1</i>	ATGCACATGGTGCACATGC GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT	441	NRS 384
II	<i>Pan agr2</i>	ATGCACATGGTGCACATGC TATTACTAATTGAAAAGTGGCCATAGC	575	NRS 156
III	<i>Pan agr3</i>	ATGCACATGGTGCACATGC GTAATGTAATAGCTTGTATAATAATACCCA G	323	NRS 123
IV	<i>pan agr4</i>	ATGCACATGGTGCACATGC CGATAATGCCGTAATACCCG	659	NRS 153

La mezcla de reacción se preparó con un volumen final de 25 µl conteniendo buffer de PCR (1X) CIMg₂ (5 mM), dNTPs (200 µM), cebadores (0,3 µM cada uno), *Taq* polimerasa (1,25 U), ADN (50 ng), agua milliQ csp 25 µl. Las condiciones de ciclado utilizadas fueron: una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 26 ciclos de amplificación (30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 60 segundos a 72°C) y una fase de elongación final de 4 minutos a 72°C.

Spa typing- Polimorfismo del gen spa [70, 116]

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)
<i>spa-1113f</i> <i>spa-1514r</i>	TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT	Variable

La reacción se realizó en un volumen final de 50 µl y se preparó con buffer de PCR 1X, MgCl₂ (2,5 mM), dNTPs (400 µM), cebadores (1 µM cada uno), ADN (50 ng) y *Taq* polimerasa (1U).

Las condiciones de ciclado utilizadas fueron: una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación (45 segundos a 95°C, 45 segundos a 58°C y 90 segundos a 72°C) y una fase de elongación final de 10 minutos a 72°C.

Multilocus sequence typing (MLST) [66]

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)	
E	<i>arcC up</i> <i>arcC dn</i>	TTGATTCACCAGCGGTATTGTC AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	456
	<i>aroE up</i> <i>aroE dn</i>	ATCGGAAATCCTATTTACATTC GGTGTGTATTAATAACGATATC	456
	<i>glpF up</i> <i>glpF dn</i>	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	465
	<i>gmk up</i> <i>gmk dn</i>	ATCGTTTTATCGGGACCATC TCATTAECTACAACGTAATCGTA	429
	<i>pta up</i> <i>pta dn</i>	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA	474
	<i>tpi up</i> <i>tpi dn</i>	TCGTTTCATTCTGAACGTCGTGAA TTTGACCTTCTAACAATTGTAC	402
	<i>yqiL up</i> <i>yqiL dn</i>	CAGCATAACAGGACACCTATTGGC CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	516

El volumen final de cada reacción fue 25 µl y se preparó con buffer de PCR (1X), MgCl₂ (2,5 mM), dNTPs (500 µM), cebadores (1 µM cada uno), ADN (50 ng) y *Taq* polimerasa (1U).

Las condiciones de ciclado utilizadas fueron: una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos seguido de 30 ciclos de amplificación (60 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C y 30 segundos a 72°C) para los genes *arcC* y *tpi* y 30 ciclos de amplificación (60 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C) para los genes *pta*, *glpF*, *aroE*, *gmk* y *yqiL* y una fase de elongación final de 10 minutos a 72°C.

Detección de genes codificantes de factores de virulencia

- **Adhesinas**

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)	Control positivo	Gen detectado
BBP-1	AACTACATCTAGTACTCAACAACAG	575	NRS 174	<i>bbp</i>
BBP-2	ATGTGCTTGAATAACACCATCATCT			
CNA-1	GTCAAGCAGTTATTAACACCAGAC	423	NRS 174	<i>cna</i>
CNA-2	AATCAGTAATTGCACTTTGTCCACTG			
ENO-1	ACGTGCAGCAGCTGACT	302	NRS 174	<i>eno</i>
ENO-2	CAACAGCATYCTTCAGTACCTTC			
EBP-1	CATCCAGAACCAATCGAAGAC	186	NRS 174	<i>ebpS</i>
EBP-2	CTTAACAGTTACATCATCATGTTTATCTTTG			
FNBA-F	GCGGAGATCAAAGACAA	1279	NRS 384	<i>fnbA</i>
FNBA-R	CCATCTATAGCTGTGTGG			
FNBB-F	GGAGAAGGAATTAAGGCG	812	NRS 384	<i>fnbB</i>
FNBB-R	GCCGTCGCCTTGAGCGT			
FIB-1	CTACAACACTACAATTGCCGTCAACAG	404	NRS 384	<i>fib</i>
FIB-2	GCTCTTGTAAGACCATTTTCTTCAC			
CLFA-1	ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT	292	NRS 384	<i>clfA</i>
CLFA-2	CGTTTCTCCGTAGTTGCATTTG			
CLFB-1	ACATCAGTAATAGTAGGGGGCAAC	205	NRS 384	<i>clfB</i>
CLFB-2	TTCGCACTGTTTGTGTTTGCAC			
sdrE-F	AGTAAAATGTGTCAAAGA	767	172	<i>sdrE</i>
sdrE-R	TTGACTACCAGGCTATATC			

La presencia de los genes codificantes de adhesinas *bbp*, *cna*, *eno* y *ebpS* se estudió en una PCR múltiple y la de los genes *fib*, *clfA* y *clfB* en otra reacción múltiple con los cebadores descritos por Tristan y colaboradores [117]. En ambos casos la mezcla de reacción se preparó con buffer 1X, MgCl₂ (2,5 mM), dNTPs (200 μM), cebadores (0,25 μM cada uno), ADN (50 ng), *Taq* polimerasa (1U) y agua milliQ csp 20 μl. Las condiciones de ciclado utilizadas fueron: una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos de amplificación (60 segundos a 95°C, 60 segundos a 55°C y 60 segundos a 72°C) y una fase de elongación final de 10 minutos a 72°C.

La detección de los genes *fnbA* y *fnbB* se realizó en reacciones de PCR individuales con cebadores descritos [118]. Cada reacción se preparó en un volumen final de 20 µl conteniendo buffer de PCR 1X, MgCl₂ (2,5 mM), dNTPs (200 µM), cebadores (0,25 µM cada uno), ADN (50 ng), *Taq* polimerasa (1U) y agua milliQ csp 20 µl. Las reacciones consistieron en una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de amplificación (60 segundos a 95°C, 60 segundos a 52°C y 60 segundos a 72°C) y por último 10 minutos a 72°C.

Para la amplificación de un fragmento del gen *sdrE* la mezcla de reacción consistió en buffer de PCR 1X, MgCl₂ (3 mM), dNTPs (200 µM), cebadores (1 µM cada uno) [119], ADN (50 ng), *Taq* polimerasa (1U) y agua milliQ csp 25 µl. Las condiciones de reacción fueron las mismas que las reacciones *fnbA/B* excepto la temperatura de hibridación de los cebadores que fue 45°C.

- **Toxinas**

Las amplificaciones de los genes *sea*, *seb*, *sec*, *sei*, *seh*, *sej* y *tst* se realizaron individualmente en un volumen final de 20 µl conteniendo: 1x del buffer de la enzima, dNTPs (200 µM), MgCl₂ (3 mM), cebadores (0,7 µM de cada uno) [118], *Taq* polimerasa (0.5 U), templado (50 ng) y agua milliQ csp 20 µl. Las condiciones de ciclado utilizadas fueron: 5 minutos para la desnaturalización inicial a 94°C, seguida de 30 ciclos de amplificación (2 minutos a 94°C, 2 minutos a 52°C y 1 minuto a 72°C) y una última fase de elongación de 10 minutos a 72°C.

Para amplificar los genes *lukS/F-PV* se utilizaron cebadores descritos por Lina y colaboradores [120] en un volumen final de 50 µl. La mezcla de reacción se preparó con buffer de PCR (1X), ClMg₂ (2,5 mM), dNTPs (500 µM), cebadores (0,8 µM cada uno), ADN (50 ng), *Taq* polimerasa (1U) y agua milliQ c.s.p 50 µl. Las condiciones de ciclado utilizadas fueron las mismas que para la amplificación del complejo *mec* de clase B.

La amplificación de *hlg* se realizó con cebadores previamente descritos [119] en un volumen final de 50 µl. La mezcla de reacción se preparó con buffer de PCR (1X), ClMg₂ (2,5 mM), dNTPs (500 µM), cebadores (0,8 µM cada uno), ADN (50 ng), *Taq* polimerasa (1U) y agua milliQ c.s.p 50 µl. Las condiciones de ciclado utilizadas fueron las mismas que para la amplificación del complejo *mec* de clase B.

La reacción de PCR para la amplificación del gen *arcA* se realizó en un volumen final de 25 μ l utilizando los cebadores descritos por Diep y colaboradores [121]. La mezcla de reacción se preparó con buffer de PCR (1X), dNTPs (500 μ M), $MgCl_2$ (2,5 mM), cebadores (0,8 μ M de cada uno), *Taq* polimerasa (1 U), templado (50 ng) y agua milliQ csp 25 μ l. La reacción comenzó con 5 minutos a 95°C, seguidos por 30 ciclos de amplificación (90 segundos a 95°C, 60 segundos a 52°C y 3 minutos a 72°C) finalizando con 10 minutos de elongación final a 72°C.

La amplificación del gen *icaA* [119] se realizó en una reacción de PCR en un volumen final de 25 μ l conteniendo buffer de PCR (1X), dNTPs (200 μ M), $MgCl_2$ (3 mM), cebadores (1 μ M de cada uno), *Taq* polimerasa (1 U), templado (50 ng) y agua milliQ csp 25 μ l. Las condiciones de reacción fueron las mismas que para la amplificación del gen *sdrE*.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)	Control positivo	Gen detectado
<i>sea</i> -F <i>sea</i> -R	AAAGTCCCGATCAATTTATGGCTA GTAATTAACCGAAGGTTCTGTAGA	216	NRS 110	<i>sea</i>
<i>seb</i> -F <i>seb</i> -R	TCGCATCAAACGACAAACG GCAGGTAAGTCTATAAGTGCC	478	NRS 158	<i>seb</i>
<i>sec</i> -F <i>sec</i> -R	GACATAAAAGCTAGGAATTT AAATCGGATTAACATTATCC	257	NRS 113	<i>sec</i>
<i>seg</i> -F <i>seg</i> -R	AATTATGTGAATGCTCAACCCGATC AAACTTATATGGAACAAAAGGTAAGTTC	642	NRS 110	<i>seg</i>
<i>seh</i> -F <i>seh</i> -R	CAATCACATCATATGCGAAAGCAG CATCTACCCAAACATTAGCACC	375	NRS 113	<i>seh</i>
<i>sei</i> -F <i>sei</i> -R	CTCAAGGTGATATTGGTGTAGG AAAAAACTTACAGGCAGTCCATCTC	576	NRS 110	<i>sei</i>
<i>sej</i> -F <i>sej</i> -R	CATCAGAAGTGTGTTCCGCTAG CTGAATTTTACCATCAAAGGTAC	142	NRS 110	<i>sej</i>
<i>ica</i> -F <i>ica</i> -R	GATTATGTAATGTGCTTGGA ACTACTGCTGCGTTAATAAT	770	NRS 110	<i>icaA</i>
hlg-1 hlg-2	GCCAATCCGTTATTAGAAAATGC CCATAGACGTAGCAACGGAT	937	5	<i>hlg</i>
luk-PV-1 luk-PV-2	ATCATTAGGTAATAATGTCTGGACATGATCCA GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC	433	5	<i>luk-PV</i>
TSST-1 TSST-2	ATGGCAGCATCAGCTTGATA TTTCCAATAACCCCGTTT	350	NRS 111	<i>tst</i>
AIPS.27 AIPS.28	CTAACACTGAACCCCAATG GAGCCAGAAGTACGCGAG	1946	NRS 384	<i>arcA</i>

Anexo metodológico II

MIQE- “Mínima Información para la publicación de Experimentos de PCR Cuantitativa en tiempo real”

Se presenta toda la información diseñada de acuerdo a las guías MIQE como esencial (E) [128]. La información deseada (D) fue agregada cuando estuvo disponible.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Definición de los grupos experimentales y controles (E)

- Las cepas de *S. aureus* fueron cultivadas en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI, DIFCO) a 37°C con agitación (180 rpm).

- Todos los cultivos se realizaron inoculando 50 µl de un cultivo de 16 hs (incubado en 10 ml de BHI a 37°C, 180 rpm) en 50 ml de caldo BHI que posteriormente fue incubado a 37°C con agitación (180 rpm) hasta llegar a fase exponencial temprana ($DO_{620\text{ nm}} = 0,5-0,7$) o fase exponencial tardía ($DO_{620\text{ nm}} = 1.2$).

Microorganismos: Dos cepas de SAMR-AC (nombradas como Sa30 y Sa5) recuperados de pacientes con IPER que fueron incluidos en un estudio epidemiológico prospectivo y multicéntrico llevado a cabo en 19 hospitales y centros de salud de Argentina entre Marzo de 2010 y Octubre de 2011. Se incluyó la cepa SAMR-AC NRS384, representante del clon USA300, por su conocida virulencia.

Número dentro de cada grupo (E).

- Se realizaron 3 cultivos de cada una de las cepas en fase exponencial temprana y tres cultivos de cada cepa en fase exponencial tardía.

Ensayo llevado a cabo por un servicio o en el laboratorio del investigador (D)

- Fue llevado a cabo en el laboratorio del investigador.

Muestra

Descripción (E)

- Se tomaron las muestras en fase de crecimiento exponencial temprana o tardía, todos los cultivos se realizaron inoculando 50 µl de un precultivo de 16 hs (incubado en 10 ml de BHI a 37°C, 180 rpm) en 50 ml de caldo BHI que posteriormente fue incubado a 37°C con agitación (180 rpm) hasta llegar a fase exponencial temprana ($DO_{620\text{ nm}} = 0,5-0,7$) o tardía ($DO_{620\text{ nm}} = 1.2$).

Volumen/masa de muestra procesada (D)

- 2 ml en cada fase

Micro disección o macro disección (E)

- No corresponde.

Procedimiento de procesado (E)

- Las células (2 ml de cultivo) fueron colectadas por centrifugación durante 3 min a 13.000 x g, descartando el sobrenadante.

Si se congeló - ¿cómo y cuán rápidamente? (E)

- No corresponde.

Si se fijó - ¿cómo y cuán rápidamente? (E)

- No corresponde.

Condiciones de almacenamiento de la muestra y duración (E)

- Se realizó la extracción de ARN inmediatamente después de recolectar las muestras.

EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Procedimiento y/o instrumentos (E)

- Los pellets bacterianos fueron resuspendidos en 100 µl de Lisozima 15 mg/ml (SIGMA), incubados 1 hora a 37°C y centrifugados 1 min at 13.000 x g, el sobrenadante fue descartado.

- El ARN fue extraído utilizando TRIZOL® Reagent (Invitrogen) junto con el kit Pure Link® RNA Mini Kit (AMBION, USA) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Nombre del kit y detalles de alguna modificación (E)

- TRIZOL® Reagent (Invitrogen) junto con el kit Pure Link® RNA Mini Kit (AMBION, USA).

Detalle del tratamiento con DNAsa o RNAsa (E)

- DNAsa I (RQ1 RNase free DNase, Promega) fue utilizada de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

- Las muestras fueron tratadas con 3 U DNAsa I/1 µg ARN/37°C/60 min.

Evaluación de la contaminación (ADN o ARN) (E)

- La ausencia de ADN luego del tratamiento con DNAsa fue corroborada cualitativamente en primera instancia mediante una PCR de punto final. La misma consistió en la reacción de amplificación del gen *gyrB* utilizando buffer de PCR (1X), MgCl₂ (5 mM), dNTPs (200 µM), cebadores (*gyrB*-F y *gyrB*-R 0,3µM cada uno), 1 µl de muestra de ARN diluida 1/200, Taq polimerasa (1U) y agua miliQ csp 25 µl. Las condiciones de ciclado utilizadas fueron: 5 minutos para la desnaturalización inicial a 94°C, seguida de 40 ciclos de amplificación (30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C y 30 segundos a 72°C) y una última fase de elongación de 4 minutos a 72°C.

-En segundo lugar se evaluó la presencia de ADN realizando una reacción de qPCR para el gen de referencia *pta* a las muestras de ARN y comparando con las muestras de ADNc (luego de la retrotranscripción).

- Las muestras de ARN fueron diluidas de la misma forma que las muestras de ADNc y los Cq resultantes fueron comparados.

- Se aceptaron como libres de contaminación con ADN a aquellas muestras de ARN que no dieron una señal detectable por qPCR o con una diferencia mayor a 10 Cq entre ARN y ADNc.

Cuantificación de ácidos nucleicos (E)

- La concentración de ARN fue cuantificada midiendo la absorbancia a 230, 260 and 280 nm (A_{230} , A_{260} , A_{280}) usando NanoDrop™ 1000 EspectroPhotometer (Thermo Scientific).

Instrumento y método (E)

- Se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 EspectroPhotometer (Thermo Scientific) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Pureza (A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230}) (D)

- Una relación $A_{260}/A_{280} = 1,8-2,1$ fue indicativa de buena pureza (baja contaminación con proteínas).

- Una relación $A_{260}/A_{230} > 1$ fue indicativa de buena pureza (baja contaminación con isotiocianato de guanidina).

Rendimiento (D)

- El rendimiento de la extracción de ARN fue de 8 µg a 20 µg.

Integridad del ARN: método/instrumento (E)

- La integridad del ARN fue verificada electroforéticamente en un gel de agarosa 1,5% teñido con bromuro de etidio. Se trató previamente la cuba de electroforesis con una solución hidróxido de sodio 0,5M durante 1 hora y se lavó con agua estéril libre de RNAsa.

RIN/RQI o Cq de transcritos 3' y 5' (E)

- No corresponde.

Ensayo de inhibición (E)

- No corresponde.

TRANSCRIPCIÓN REVERSA

Condiciones completas de reacción (E)

- M-MLV™ Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) fue utilizada de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

- 1 µl de random primers 50 µM (Invitrogen, USA), 1 µl de dNTP Mix 10 mM (Invitrogen, USA), 4 µl de First-Strand Buffer 5 X (Invitrogen, USA), 2 µl de DTT 0.1 M (Invitrogen, USA), 1 µl (40 U) de RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor (Invitrogen, USA), 1 µl (200 U) de M-MLV™ Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA), 10 µl de ARN (0,5 µg).

- Perfil térmico de la retrotranscripción: 65°C durante 5 min (mix de primers, dNTPs y ARN), enfriamiento rápido en hielo, 37°C por 2 min, 25°C por 10 min, 37°C por 50 min y 70°C por 15 min.

Cantidad de ARN y volumen de reacción (E)

- 10 µl de ARN (0,5 µg de ARN), volumen de reacción: 20 µl.

Priming oligonucleótidos (si son específicos de genes) y concentración (E)

- Random primers 50 µM (Invitrogen, USA).

Transcriptasa reversa y concentración (E)

- M-MLV™ Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA), 200 U.

Temperatura y tiempo (E)

- 65°C durante 5 min (mix de primers, dNTPs y ARN), enfriamiento rápido en hielo, 37°C por 2 min, 25°C por 10 min, 37°C por 50 min y 70°C por 15 min.

Cqs con o sin transcripción reversa (D)

- Cq con transcripción reversa < 40; Cq sin transcripción reversa: no detectado o con diferencia mayor a 10 Cq respecto de las muestras con transcripción reversa.

Condiciones de almacenamiento de ADNc (D)

- En freezer (-20°C).

GENES ANALIZADOS POR qPCR

Nombre del gen (E)

gyrB, *pta*, *gap*, *clfB*, *fnbA*.

Número de acceso de la secuencia (E)

gyrB YP_498613.1, *pta* YP_499142.1, *gap* YP_001441359, *clfB* HQ424321.1, *fnbA* CP012119.1

Tamaño del amplicón (E)

gyrB 121 bp, *pta* 121 bp, *gap* 121 bp, *clfB* 120 bp, *fnbA* 200 bp

Búsqueda in silico de especificidad (BLAST, etc) (E)

- No corresponde

Localización de cada primer por exón o intrón (si corresponde) (E)

- No corresponde, procariota.

¿Qué variantes de splicing son detectadas? (E)

- No corresponde, procariota.

OLIGONUCLEOTIDOS PARA qPCR

Secuencias de oligonucleótidos (E)

<i>gyrB</i> F	CCAGGTAAATTAGCCGATTGC	[126]
<i>gyrB</i> R	CCAGGTAAATTAGCCGATTGC	[126]
<i>pta</i> F	AAAGCGCCAGGTGCTAAATTAC	[126]
<i>pta</i> R	CTGGACCAACTGCATCATATCC	[126]
<i>gap</i> F	AGTGAACCAGATGCAAGCAAATTAC	[126]
<i>gap</i> R	TTTTAGCGCCTGCTTCAATATG	[126]
<i>clfB</i> F	CCACATCAGTAATAGTAGGGGC	Este trabajo
<i>clfB</i> R	CGGAATCTGCACTTGCATTAT	Este trabajo
<i>fnbA</i> F	GTGGATAGCGAAGCAGGTCA	Este trabajo
<i>fnbA</i> R	CCACCACCTGGGTTTGTATC	Este trabajo

Localización e identidad de alguna modificación (E)

- No corresponde

PROTOCOLO DE qPCR

Condiciones completas de reacción (E)

- La mezcla de reacción consistió en 10 µl de SYBR[®] Select Master Mix 2 X (Applied Biosystems, USA), 0,3 µl de cada primer 10 µM (150 nM final), 4,4 µl de agua milliQ libre de nucleasas y 5 µl de ADNc (dilución 1:100) – volumen final = 20 µl.
- El protocolo de ciclado consistió en un hold a 50°C durante 2 min, 95°C durante 2 min, seguido de 40 ciclos de 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C.
- Se realizó el análisis por curvas de disociación luego de cada corrida.

Volumen de reacción y cantidad de ADNc/ADN (E)

- Volumen total de reacción: 20 µl, volumen de ADNc: 5 µl del diluido 100 veces luego de RT-PCR.

Concentración de oligonucleótidos, Mg²⁺ y dNTP (E)

- 150 nM de cada primer, Mg²⁺ y dNTPs fueron componentes de la mezcla comercial SYBR[®] Select Master Mix (Applied Biosystems, USA), cuya concentración es desconocida.

Identidad de la polimerasa y concentración (E)

- AmpliTaq[®] DNA Polimerasa - componente de la mezcla comercial SYBR[®] Select Master Mix (Applied Biosystems, USA), cuya concentración es desconocida.

Fabricante e identidad del buffer/kit (E)

- SYBR[®] Select Master Mix (Applied Biosystems, USA).

Aditivos (SYBR Green I, DMSO, etc.) (E)

- No corresponde.

Fabricante de las placas/tubos y número de catálogo (D)

- MicroAmp[®] Optical 96-Well Reaction Plate (número de catálogo 4306737, Applied Biosystems, USA).
- MicroAmp[®] Optical 96-384 Well Optical Adhesive films (número de catálogo 4360954, Applied Biosystems, USA).

Parámetros de termo ciclado completos (E)

- El programa de termo ciclado consistió en un hold a 50°C durante 2 min, 95°C durante 2 min, seguido de 40 ciclos por 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C. Curva de melting de 60°C a 95°C.

Setup de la reacción (manual/robótica) (D)

- Manual.

Fabricante del equipo de qPCR (E)

- 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA).

VALIDACION DE LA qPCR

Especificidad (gel, secuencia, fusión, o digestión) (E)

- Se realizó un análisis de la curva de disociación.

Para SYBR Green I, Cq del NTC (E)

- No hubo señal en el NTC o Cq > 37.

Eficiencia de la PCR calculada con la pendiente (E)

Fase exponencial temprana:

- *gyrB* (E =100.906)

- *pta* (E =106.548)

- *clfB* (E =111.913)

- *fnbA* (E =112.163)

Fase exponencial tardía:

- *gyrB* (E = 102.153)

- *gap* (E =102.651)

- *clfB* (E =112.11)

- *fnbA* (E =102.761)

r² de la curva de calibración (E)

Fase exponencial temprana:

- *gyrB* (R² = 0.996)

- *pta* ($R^2 = 0.992$)

- *clfB* ($R^2 = 0.980$)

- *fnbA* ($R^2 = 0.995$)

Fase exponencial tardía:

- *gyrB* ($R^2 = 0.991$)

- *gap* ($R^2 = 0.997$)

- *clfB* ($R^2 = 0.997$)

- *fnbA* ($R^2 = 0.995$)

Rango dinámico lineal (E)

- Se realizaron 5 puntos de una curva de diluciones seriadas al décimo (10^0 - 10^{-5} , el número de copias reales es desconocido) con ADNc.

- Las reacciones fueron lineales en el rango 10^0 - 10^{-4} para los genes *pta* y *gyrB*, 10^0 - 10^{-5} para *gap* y 10^{-1} - 10^{-4} para *clfB* y *fnbA*

- Todas las reacciones cubren a gran rango de valores de Cq.

- Los valores de Cq obtenidos durante los experimentos estuvieron en este rango.

Variación de Cq en límite de detección (E)

- No determinado.

Evidencia de límite de detección (E)

- No determinado.

Para multiplex, eficiencia y límite de detección de cada ensayo (E)

- No corresponde.

ANALISIS DE DATOS

Programa para analizar qPCR (fuente, versión) (E)

7500 Software (Applied Biosystems, USA, version 2.0.6)

Método de determinación de Cq (E)

- 2^{da} máxima derivada.

Identificación de outlier y disposición (E)

- No determinado.

Resultados para NTCs (E)

- Sin señal en NTC o Cq > 37.

Justificación del número y elección de genes de referencia (E)

- Identificación de genes de referencia: se utilizaron genes de referencia previamente descritos (*gyrB* y *pta* para la fase exponencial temprana y *gyrB* y *gap* para la fase exponencial tardía) [126].

- Se eligió la combinación de dos genes de referencia como más estables siguiendo el parámetro M y el CV%. Los 2 genes de referencia tuvieron que cumplir que el valor M sea menor a 0,5 y tener CV menor a 25% cuando se los comparó entre sí [127].

Descripción del método de normalización (E)

- Se realizó el cálculo de las cantidades relativas (RQ) de cada gen y de los genes de referencia teniendo en cuenta la eficiencia de la reacción de qPCR calculada a partir de la curva estándar. Con estos datos, posteriormente se calcularon las cantidades relativas normalizadas (NRQ) de cada gen de interés. Se realizó normalización a la media geométrica de los RQ de los genes de referencia [125, 127].

Número de réplicas técnicas (RT o qPCR) (E)

- Dos replicas técnicas en la qPCR.

Variación intra ensayo (E)

-La desviación estándar de los duplicados fue menor a 0.5.

Métodos estadísticos para significancia de los resultados (E)

- Prueba de Kruskal-Wallis seguido por prueba de Dunn o ANOVA de un factor seguido de prueba de Bonferroni.

Software (fuente, versión) (E)

GraphPad Prism 5 for Windows (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA.)

Bibliografía

Bibliografía

1. Becker K, Skov R, Von Eiff C: **Staphylococcus, Micrococcus and other Catalase-Positive cocci.** In: *Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, Funke G, Landry M, Richter S, Warnock D (ed), Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition.* Washington D.C.: ASM press; 2015: 354-382.
2. Verhoeven PO, Gagnaire J, Botelho-Nevers E, Grattard F, Carricajo A, Lucht F, Pozzetto B, Berthelot P: **Detection and clinical relevance of Staphylococcus aureus nasal carriage: an update.** *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014, **12**(1):75-89.
3. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL: **The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections.** *Lancet Infect Dis* 2005, **5**(12):751-762.
4. Bermejo A, Clara L, D'Atri GM, Desse J, Vedia Ld, Garelli G, Goldstein CE, Jaled MM, Klein M, Larrea RM *et al*: **Consenso SADI-SAM-SAD-CACCVE. Guía para el manejo racional de las infecciones de piel y partes blandas-Parte II.** *Rev Panam Infectol* 2009, **11**(3):47-62.
5. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG, Jr.: **Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management.** *Clin Microbiol Rev* 2015, **28**(3):603-661.
6. ANLIS, INE, SADI: **Documento final de consenso interinstitucional "Actualización sobre medidas de prevención de infecciones de sitio quirúrgico".** In.; 2015.
7. ANLIS, INE: **Programa nacional de vigilancia de infecciones hospitalarias en Argentina. Reporte semestral Julio 2012-Diciembre 2012.** In.; 2013.
8. Clarke SR, Foster SJ: **Surface adhesins of Staphylococcus aureus.** *Adv Microb Physiol* 2006, **51**:187-224.
9. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Hook M: **Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus.** *Nature reviews Microbiology* 2014, **12**(1):49-62.
10. Speziale P, Pietrocola G, Rindi S, Provenzano M, Provenza G, Di Poto A, Visai L, Arciola CR: **Structural and functional role of Staphylococcus aureus surface components recognizing adhesive matrix molecules of the host.** *Future microbiology* 2009, **4**(10):1337-1352.
11. Alva-Murillo N, Lopez-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A: **Nonprofessional phagocytic cell receptors involved in Staphylococcus aureus internalization.** *BioMed research international* 2014, **2014**:538546.
12. Fraunholz M, Sinha B: **Intracellular Staphylococcus aureus: live-in and let die.** *Front Cell Infect Microbiol* 2012, **2**:43.
13. Fitzgerald JR, Loughman A, Keane F, Brennan M, Knobel M, Higgins J, Visai L, Speziale P, Cox D, Foster TJ: **Fibronectin-binding proteins of Staphylococcus aureus mediate activation of human platelets via fibrinogen and fibronectin bridges to integrin GPIIb/IIIa and IgG binding to the FcγRIIIa receptor.** *Molecular microbiology* 2006, **59**(1):212-230.
14. Fowler VG, Jr., Miro JM, Hoen B, Cabell CH, Abrutyn E, Rubinstein E, Corey GR, Spelman D, Bradley SF, Barsic B *et al*: **Staphylococcus aureus endocarditis: a consequence of medical progress.** *JAMA* 2005, **293**(24):3012-3021.

15. O'Brien L, Kerrigan SW, Kaw G, Hogan M, Penades J, Litt D, Fitzgerald DJ, Foster TJ, Cox D: **Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by *Staphylococcus aureus*: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A.** *Molecular microbiology* 2002, **44**(4):1033-1044.
16. Higgins J, Loughman A, van Kessel KP, van Strijp JA, Foster TJ: **Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes.** *FEMS microbiology letters* 2006, **258**(2):290-296.
17. Palmqvist N, Patti JM, Tarkowski A, Josefsson E: **Expression of staphylococcal clumping factor A impedes macrophage phagocytosis.** *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2004, **6**(2):188-195.
18. Hair PS, Echague CG, Sholl AM, Watkins JA, Geoghegan JA, Foster TJ, Cunnion KM: **Clumping factor A interaction with complement factor I increases C3b cleavage on the bacterial surface of *Staphylococcus aureus* and decreases complement-mediated phagocytosis.** *Infect Immun* 2010, **78**(4):1717-1727.
19. Wertheim HF, Walsh E, Choudhury R, Melles DC, Boelens HA, Miajlovic H, Verbrugh HA, Foster T, van Belkum A: **Key role for clumping factor B in *Staphylococcus aureus* nasal colonization of humans.** *PLoS Med* 2008, **5**(1):e17.
20. Mulcahy ME, Geoghegan JA, Monk IR, O'Keeffe KM, Walsh EJ, Foster TJ, McLoughlin RM: **Nasal colonisation by *Staphylococcus aureus* depends upon clumping factor B binding to the squamous epithelial cell envelope protein loricrin.** *PLoS pathogens* 2012, **8**(12):e1003092.
21. Vazquez V, Liang X, Horndahl JK, Ganesh VK, Smeds E, Foster TJ, Hook M: **Fibrinogen is a ligand for the *Staphylococcus aureus* microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) bone sialoprotein-binding protein (Bbp).** *The Journal of biological chemistry* 2011, **286**(34):29797-29805.
22. Hair PS, Foley CK, Krishna NK, Nyalwidhe JO, Geoghegan JA, Foster TJ, Cunnion KM: **Complement regulator C4BP binds to *Staphylococcus aureus* surface proteins SdrE and Bbp inhibiting bacterial opsonization and killing.** *Results in immunology* 2013, **3**:114-121.
23. Kang M, Ko YP, Liang X, Ross CL, Liu Q, Murray BE, Hook M: **Collagen-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule (MSCRAMM) of Gram-positive bacteria inhibit complement activation via the classical pathway.** *The Journal of biological chemistry* 2013, **288**(28):20520-20531.
24. Elasri MO, Thomas JR, Skinner RA, Blevins JS, Beenken KE, Nelson CL, Smeltzer MS: ***Staphylococcus aureus* collagen adhesin contributes to the pathogenesis of osteomyelitis.** *Bone* 2002, **30**(1):275-280.
25. Lopes JD, dos Reis M, Brentani RR: **Presence of laminin receptors in *Staphylococcus aureus*.** *Science* 1985, **229**(4710):275-277.
26. Forsgren A, Sjoquist J: **"Protein A" from *S. aureus*. I. Pseudo-immune reaction with human gamma-globulin.** *J Immunol* 1966, **97**(6):822-827.
27. Hartleib J, Kohler N, Dickinson RB, Chhatwal GS, Sixma JJ, Hartford OM, Foster TJ, Peters G, Kehrel BE, Herrmann M: **Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*.** *Blood* 2000, **96**(6):2149-2156.
28. Nguyen T, Ghebrehiwet B, Peerschke EI: ***Staphylococcus aureus* protein A recognizes platelet gC1qR/p33: a novel mechanism for staphylococcal interactions with platelets.** *Infect Immun* 2000, **68**(4):2061-2068.

29. Gomez MI, Lee A, Reddy B, Muir A, Soong G, Pitt A, Cheung A, Prince A: ***Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1.** *Nature medicine* 2004, **10**(8):842-848.
30. Gomez MI, O'Seaghdha M, Magargee M, Foster TJ, Prince AS: ***Staphylococcus aureus* protein A activates TNFR1 signaling through conserved IgG binding domains.** *The Journal of biological chemistry* 2006, **281**(29):20190-20196.
31. Giai C, Gonzalez C, Ledo C, Garofalo A, Di Genaro MS, Sordelli DO, Gomez MI: **Shedding of tumor necrosis factor receptor 1 induced by protein A decreases tumor necrosis factor alpha availability and inflammation during systemic *Staphylococcus aureus* infection.** *Infect Immun* 2013, **81**(11):4200-4207.
32. Chavakis T, Wiechmann K, Preissner KT, Herrmann M: ***Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems.** *Thrombosis and haemostasis* 2005, **94**(2):278-285.
33. Otto M: ***Staphylococcus aureus* toxins.** *Curr Opin Microbiol* 2014, **17**:32-37.
34. Spaan AN, Henry T, van Rooijen WJ, Perret M, Badiou C, Aerts PC, Kemmink J, de Haas CJ, van Kessel KP, Vandenesch F *et al*: **The staphylococcal toxin Panton-Valentine Leukocidin targets human C5a receptors.** *Cell host & microbe* 2013, **13**(5):584-594.
35. Genestier AL, Michallet MC, Prevost G, Bellot G, Chalabreysse L, Peyrol S, Thivolet F, Etienne J, Lina G, Vallette FM *et al*: ***Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils.** *The Journal of clinical investigation* 2005, **115**(11):3117-3127.
36. Konig B, Prevost G, Piemont Y, Konig W: **Effects of *Staphylococcus aureus* leukocidins on inflammatory mediator release from human granulocytes.** *J Infect Dis* 1995, **171**(3):607-613.
37. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T, Reverdy ME *et al*: **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence.** *Emerg Infect Dis* 2003, **9**(8):978-984.
38. Berube BJ, Bubeck Wardenburg J: ***Staphylococcus aureus* alpha-toxin: nearly a century of intrigue.** *Toxins* 2013, **5**(6):1140-1166.
39. Wilke GA, Bubeck Wardenburg J: **Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin-mediated cellular injury.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(30):13473-13478.
40. Tkaczyk C, Hua L, Varkey R, Shi Y, Dettinger L, Woods R, Barnes A, MacGill RS, Wilson S, Chowdhury P *et al*: **Identification of anti-alpha toxin monoclonal antibodies that reduce the severity of *Staphylococcus aureus* dermonecrosis and exhibit a correlation between affinity and potency.** *Clinical and vaccine immunology : CVI* 2012, **19**(3):377-385.
41. Malachowa N, DeLeo FR: ***Staphylococcus aureus* survival in human blood.** *Virulence* 2011, **2**(6):567-569.
42. Peschel A, Otto M: **Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection.** *Nature reviews Microbiology* 2013, **11**(10):667-673.
43. Surewaard BG, de Haas CJ, Vervoort F, Rigby KM, DeLeo FR, Otto M, van Strijp JA, Nijland R: **Staphylococcal alpha-phenol soluble modulins contribute to neutrophil lysis after phagocytosis.** *Cellular microbiology* 2013, **15**(8):1427-1437.

44. Kretschmer D, Gleske AK, Rautenberg M, Wang R, Koberle M, Bohn E, Schoneberg T, Rabiet MJ, Boulay F, Klebanoff SJ *et al*: **Human formyl peptide receptor 2 senses highly pathogenic *Staphylococcus aureus***. *Cell host & microbe* 2010, **7**(6):463-473.
45. Thomas D, Chou S, Dauwalder O, Lina G: **Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins**. *Chemical immunology and allergy* 2007, **93**:24-41.
46. Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, Davidson MG, Lin F, Lin J, Carleton HA, Mongodin EF *et al*: **Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. *Lancet* 2006, **367**(9512):731-739.
47. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME: ***Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease**. *Virulence* 2011, **2**(5):445-459.
48. Arciola CR, Campoccia D, Ravaioli S, Montanaro L: **Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects**. *Front Cell Infect Microbiol* 2015, **5**:7.
49. Bronner S, Monteil H, Prevost G: **Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications**. *FEMS microbiology reviews* 2004, **28**(2):183-200.
50. Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh S: **Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule**. *EMBO J* 1993, **12**(10):3967-3975.
51. Gilot P, Lina G, Cochard T, Poutrel B: **Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis**. *J Clin Microbiol* 2002, **40**(11):4060-4067.
52. Painter KL, Krishna A, Wigneshweraraj S, Edwards AM: **What role does the quorum-sensing accessory gene regulator system play during *Staphylococcus aureus* bacteremia?** *Trends in microbiology* 2014, **22**(12):676-685.
53. Traber KE, Lee E, Benson S, Corrigan R, Cantera M, Shopsin B, Novick RP: **agr function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates**. *Microbiology* 2008, **154**(Pt 8):2265-2274.
54. Skinner D, Keefer CS: **Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus***. *Arch intern med* 1941, **68**: 851-75.
55. Deurenberg RH, Stobberingh EE: **The evolution of *Staphylococcus aureus***. *Infect Genet Evol* 2008, **8**(6):747-763.
56. Jevons M: **"Celbenin"- resistant Staphylococci**. *British Medical Journal* 1961, **1**:124-125.
57. Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E: **Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat**. *Lancet* 2006, **368**(9538):874-885.
58. Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K: **Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315**. *Antimicrob Agents Chemother* 1999, **43**(6):1449-1458.
59. IWG-SCC: **Classification of Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements**. *Antimicrob Agents Chemother* 2009, **53**(12):4961-4967.
60. Berger-Bachi B, Rohrer S: **Factors influencing methicillin resistance in staphylococci**. *Arch Microbiol* 2002, **178**(3):165-171.

61. Hiramatsu K, Ito T, Tsubakishita S, Sasaki T, Takeuchi F, Morimoto Y, Katayama Y, Matsuo M, Kuwahara-Arai K, Hishinuma T *et al*: **Genomic Basis for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus***. *Infection & chemotherapy* 2013, **45**(2):117-136.
62. Wu Z, Li F, Liu D, Xue H, Zhao X: **A novel type XII staphylococcal cassette chromosome *mec* harboring a new cassette chromosome recombinase, CcrC2**. *Antimicrob Agents Chemother* 2015.
63. Garcia-Alvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, Walpole E, Brooks K, Pickard DJ, Teale C *et al*: **Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study**. *Lancet Infect Dis* 2011, **11**(8):595-603.
64. Ito T, Hiramatsu K, Tomasz A, de Lencastre H, Perreten V, Holden MT, Coleman DC, Goering R, Giffard PM, Skov RL *et al*: **Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues**. *Antimicrob Agents Chemother* 2012, **56**(10):4997-4999.
65. Goering RV: **Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease**. *Infect Genet Evol* 2010, **10**(7):866-875.
66. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG: **Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus***. *J Clin Microbiol* 2000, **38**(3):1008-1015.
67. Vazquez JA, Berron S: **Multilocus sequence typing: the molecular marker of the Internet era**. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica* 2004, **22**(2):113-120.
68. Frenay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, Mooi FR: **Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism**. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996, **15**(1):60-64.
69. Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN: ***spa* typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation**. *J Clin Microbiol* 2004, **42**(2):792-799.
70. Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, Bost DA, Riehman M, Naidich S, Kreiswirth BN: **Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains**. *J Clin Microbiol* 1999, **37**(11):3556-3563.
71. Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H: **Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. *Lancet Infect Dis* 2002, **2**(3):180-189.
72. Trindade PA, McCulloch JA, Oliveira GA, Mamizuka EM: **Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives**. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* 2003, **7**(1):32-43.
73. Deurenberg RH, Stobberingh EE: **The molecular evolution of hospital- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. *Curr Mol Med* 2009, **9**(2):100-115.
74. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG: **The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(11):7687-7692.
75. Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, Robinson DA, Enright MC, Berendt T, Peacock SJ, Smith JM, Murphy M, Spratt BG *et al*: **How clonal is *Staphylococcus aureus*?** *J Bacteriol* 2003, **185**(11):3307-3316.

76. Chatterjee SS, Otto M: **Improved understanding of factors driving methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic waves.** *Clinical epidemiology* 2013, **5**:205-217.
77. Udo EE, Pearman JW, Grubb WB: **Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia.** *The Journal of hospital infection* 1993, **25**(2):97-108.
78. Fluit AC: **Livestock-associated *Staphylococcus aureus*.** *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2012, **18**(8):735-744.
79. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM *et al*: **Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States.** *JAMA* 2007, **298**(15):1763-1771.
80. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M: **Survey of infections due to *Staphylococcus species*: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999.** *Clin Infect Dis* 2001, **32** Suppl 2:S114-132.
81. Cosgrove SE, Qi Y, Kaye KS, Harbarth S, Karchmer AW, Carmeli Y: **The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges.** *Infection control and hospital epidemiology* 2005, **26**(2):166-174.
82. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y: **Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis.** *Clin Infect Dis* 2003, **36**(1):53-59.
83. Bal AM, Coombs GW, Holden MT, Lindsay JA, Nimmo GR, Tattavin P, Skov RL: **Genomic insights into the emergence and spread of international clones of healthcare-, community- and livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Blurring of the traditional definitions.** *Journal of global antimicrobial resistance* 2016, **6**:95-101.
84. Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, Mackenzie FM: **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods.** *Int J Antimicrob Agents* 2012, **39**(4):273-282.
85. Chambers HF, Deleo FR: **Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era.** *Nature reviews Microbiology* 2009, **7**(9):629-641.
86. von Specht M, Gardella N, Tagliaferri P, Gutkind G, Mollerach M: **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community-acquired meningitis.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006, **25**(4):267-269.
87. Zetola N, Francis JS, Nuermberger EL, Bishai WR: **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat.** *Lancet Infect Dis* 2005, **5**(5):275-286.
88. Stryjewski ME, Chambers HF: **Skin and soft-tissue infections caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Clin Infect Dis* 2008, **46** Suppl 5:S368-377.
89. David MZ, Daum RS: **Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic.** *Clin Microbiol Rev* 2010, **23**(3):616-687.
90. Voyich JM, Braughton KR, Sturdevant DE, Whitney AR, Said-Salim B, Porcella SF, Long RD, Dorward DW, Gardner DJ, Kreiswirth BN *et al*: **Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils.** *J Immunol* 2005, **175**(6):3907-3919.

91. Li M, Cheung GY, Hu J, Wang D, Joo HS, Deleo FR, Otto M: **Comparative analysis of virulence and toxin expression of global community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains.** *J Infect Dis* 2010, **202**(12):1866-1876.
92. Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, Grubb WB, Bell JM, O'Brien FG, Coombs GW, Pearman JW, Tenover FC, Kapi M *et al*: **Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community.** *J Clin Microbiol* 2002, **40**(11):4289-4294.
93. Mediavilla JR, Chen L, Mathema B, Kreiswirth BN: **Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA).** *Curr Opin Microbiol* 2012, **15**(5):588-595.
94. Nimmo GR: **USA300 abroad: global spread of a virulent strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2012, **18**(8):725-734.
95. Reyes J, Rincon S, Diaz L, Panesso D, Contreras GA, Zurita J, Carrillo C, Rizzi A, Guzman M, Adachi J *et al*: **Dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 sequence type 8 lineage in Latin America.** *Clin Infect Dis* 2009, **49**(12):1861-1867.
96. D'Agata EM, Webb GF, Horn MA, Moellering RC, Jr., Ruan S: **Modeling the invasion of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* into hospitals.** *Clin Infect Dis* 2009, **48**(3):274-284.
97. Corso A, Santos Sanches I, Aires de Sousa M, Rossi A, de Lencastre H: **Spread of a methicillin-resistant and multiresistant epidemic clone of *Staphylococcus aureus* in Argentina.** *Microb Drug Resist* 1998, **4**(4):277-288.
98. Da Silva Coimbra MV, Teixeira LA, Ramos RL, Predari SC, Castello L, Famiglietti A, Vay C, Klan L, Figueiredo AM: **Spread of the Brazilian epidemic clone of a multiresistant MRSA in two cities in Argentina.** *Journal of medical microbiology* 2000, **49**(2):187-192.
99. Sola C, Gribaudo G, Vindel A, Patrino L, Bocco JL: **Identification of a novel methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic clone in Cordoba, Argentina, involved in nosocomial infections.** *J Clin Microbiol* 2002, **40**(4):1427-1435.
100. Gardella N, Picasso R, Predari SC, Lasala M, Foccoli M, Benchetrit G, Famiglietti A, Catalano M, Mollerach M, Gutkind G: **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Buenos Aires teaching hospitals: replacement of the multidrug resistant South American clone by another susceptible to rifampin, minocycline and trimethoprim-sulfamethoxazole.** *Rev Argent Microbiol* 2005, **37**(3):156-160.
101. Sola C, Cortes P, Saka HA, Vindel A, Bocco JL: **Evolution and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic and sporadic clones in Cordoba, Argentina.** *J Clin Microbiol* 2006, **44**(1):192-200.
102. Gardella N, von Specht M, Cuirolo A, Rosato A, Gutkind G, Mollerach M: **Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, eastern Argentina.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008, **62**(3):343-347.
103. Sola C, Saka HA, Vindel A, Bocco JL: **Emergence and dissemination of a community-associated methicillin-resistant Pantone-Valentine leucocidin-positive *Staphylococcus aureus* clone sharing the sequence type 5 lineage with the most prevalent nosocomial clone in the same region of Argentina.** *J Clin Microbiol* 2008, **46**(5):1826-1831.

104. Gardella N, Murzicato S, Di Gregorio S, Cuirolo A, Desse J, Crudo F, Gutkind G, Mollerach M: **Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among healthy children in a city of Argentina.** *Infect Genet Evol* 2011.
105. Paganini H, Della Latta MP, Muller Opet B, Ezcurra G, Uranga M, Aguirre C, Ensinck G, Kamiya de Macarrein M, Miranda MR, Ciriaci C *et al*: **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children: multicenter trial.** *Arch Argent Pediatr* 2008, **106**(5):397-403.
106. Cuirolo A, Canigia LF, Gardella N, Fernandez S, Gutkind G, Rosato A, Mollerach M: **Oxacillin- and ceftoxitin-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).** *Int J Antimicrob Agents* 2011, **37**(2):178-179.
107. Harris-Warrick RM, Elkana Y, Ehrlich SD, Lederberg J: **Electrophoretic separation of *Bacillus subtilis* genes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975, **72**(6):2207-2211.
108. CLSI.: **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A7.** Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2012.
109. Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S: **Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction.** *J Clin Microbiol* 1991, **29**(10):2240-2244.
110. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K: **Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of *IS431*-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2001, **45**(7):1955-1963.
111. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, Hiramatsu K: **Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**(1):264-274.
112. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, Hiramatsu K: **Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2001, **45**(5):1323-1336.
113. Milheirico C, Oliveira DC, de Lencastre H: **Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**(9):3374-3377.
114. Milheirico C, Oliveira DC, de Lencastre H: **Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome *mec* type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: 'SCC*mec* IV multiplex'.** *J Antimicrob Chemother* 2007, **60**(1):42-48.
115. Chung M, de Lencastre H, Matthews P, Tomasz A, Adamsson I, Aires de Sousa M, Camou T, Cocuzza C, Corso A, Couto I *et al*: **Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains.** *Microb Drug Resist* 2000, **6**(3):189-198.
116. Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothganger J, Turnwald D, Vogel U: **Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management.** *J Clin Microbiol* 2003, **41**(12):5442-5448.

117. Tristan A, Ying L, Bes M, Etienne J, Vandenesch F, Lina G: **Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections.** *J Clin Microbiol* 2003, **41**(9):4465-4467.
118. Nashev D, Toshkova K, Salasia SI, Hassan AA, Lammler C, Zschock M: **Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers.** *FEMS microbiology letters* 2004, **233**(1):45-52.
119. Kumar JD, Negi YK, Gaur A, Khanna D: **Detection of virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from paper currency.** *Int J Infect Dis* 2009, **13**(6):e450-455.
120. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J: **Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia.** *Clin Infect Dis* 1999, **29**(5):1128-1132.
121. Diep BA, Stone GG, Basuino L, Graber CJ, Miller A, des Etages SA, Jones A, Palazzolo-Ballance AM, Perdreau-Remington F, Sensabaugh GF *et al*: **The arginine catabolic mobile element and staphylococcal chromosomal cassette *mec* linkage: convergence of virulence and resistance in the USA300 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *J Infect Dis* 2008, **197**(11):1523-1530.
122. Malachowa N, Kobayashi SD, Braughton KR, DeLeo FR: **Mouse model of *Staphylococcus aureus* skin infection.** *Methods Mol Biol* 2013, **1031**:109-116.
123. Lattar SM, Noto Llana M, Denoel P, Germain S, Buzzola FR, Lee JC, Sordelli DO: **Protein antigens increase the protective efficacy of a capsule-based vaccine against *Staphylococcus aureus* in a rat model of osteomyelitis.** *Infect Immun* 2014, **82**(1):83-91.
124. Spagnolo N, Greco F, Rossi A, Ciolli L, Teti A, Posteraro P: **Chronic staphylococcal osteomyelitis: a new experimental rat model.** *Infect Immun* 1993, **61**(12):5225-5230.
125. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J: **qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data.** *Genome Biol* 2007, **8**(2):R19.
126. Valihrach L, Demnerova K: **Impact of normalization method on experimental outcome using RT-qPCR in *Staphylococcus aureus*.** *J Microbiol Methods* 2012, **90**(3):214-216.
127. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F: **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome Biol* 2002, **3**(7):RESEARCH0034.
128. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL *et al*: **The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.** *Clinical chemistry* 2009, **55**(4):611-622.
129. Lopez Furst MJ, de Vedia L, Fernandez S, Gardella N, Ganaha MC, Prieto S, Carbone E, Lista N, Rotrying F, Morera GI *et al*: **Prospective multicenter study of community-associated skin and skin structure infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Buenos Aires, Argentina.** *PLoS One* 2013, **8**(11):e78303.
130. Lopez Furst MJ: **[Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the emergency of a pathogen].** *Medicina* 2011, **71**(6):585-586.
131. Fernandez S, de Vedia L, Lopez Furst MJ, Gardella N, Di Gregorio S, Ganaha MC, Prieto S, Carbone E, Lista N, Rotrying F *et al*: **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST30-SCC*mec* IVc clone as the major cause of community-acquired invasive infections in Argentina.** *Infect Genet Evol* 2013, **14**:401-405.

132. Reyes R H, Navarro R P, Jiménez L E, Reyes B H: **Osteomielitis: Revisión y actualización.** *Revista de la facultad de medicina* 2001, **24**(1).
133. Schaffer AC, Solinga RM, Cocchiario J, Portoles M, Kiser KB, Risley A, Randall SM, Valtulina V, Speziale P, Walsh E *et al*: **Immunization with *Staphylococcus aureus* clumping factor B, a major determinant in nasal carriage, reduces nasal colonization in a murine model.** *Infect Immun* 2006, **74**(4):2145-2153.
134. Hersh AL, Chambers HF, Maselli JH, Gonzales R: **National trends in ambulatory visits and antibiotic prescribing for skin and soft-tissue infections.** *Arch intern med* 2008, **168**(14):1585-1591.
135. Olaniyi R, Pozzi C, Grimaldi L, Bagnoli F: ***Staphylococcus aureus*-Associated Skin and Soft Tissue Infections: Anatomical Localization, Epidemiology, Therapy and Potential Prophylaxis.** *Current topics in microbiology and immunology* 2016.
136. Castaldo ET, Yang EY: **Severe sepsis attributable to community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging fatal problem.** *The American surgeon* 2007, **73**(7):684-687; discussion 687-688.
137. Vardakas KZ, Kontopidis I, Gkegkes ID, Rafailidis PI, Falagas ME: **Incidence, characteristics, and outcomes of patients with bone and joint infections due to community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a systematic review.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013, **32**(6):711-721.
138. Townell NJ, Munckhof WJ, Nimmo G, Bannan A, Holley A, Daniel A, Bennett C, Coulter C, Looke DF: **Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis 'down under': case series and literature review.** *Scandinavian journal of infectious diseases* 2012, **44**(7):536-540.
139. Fernandez S, Murzicato S, Sandoval O, Fernandez-Canigia L, Mollerach M: **Community-acquired necrotizing pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST30-SCCmecIVc-spat019-PVL positive in San Antonio de Areco, Argentina.** *Rev Argent Microbiol* 2015, **47**(1):50-53.
140. Cosgrove SE, Fowler VG, Jr.: **Management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia.** *Clin Infect Dis* 2008, **46** Suppl 5:S386-393.
141. Paganini HR, Della Latta P, Soto A, Casimir L, Monaco A, Verdaguer V, Berberian G, Rosanova MT, Gonzalez F, Sarkis C: **Community-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia: 17 years of experience in Argentine children.** *Arch Argent Pediatr* 2010, **108**(4):311-317.
142. de Vedia L, Lista N, Piovano G: ***Staphylococcus aureus* metilino resistente adquirido en la comunidad: una nueva amenaza.** *Rev Am Med Resp* 2012, **4**:131-139.
143. Egea AL, Gagetti P, Lamberghini R, Faccione D, Lucero C, Vindel A, Tosoroni D, Garnerio A, Saka HA, Galas M *et al*: **New patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones, community-associated MRSA genotypes behave like healthcare-associated MRSA genotypes within hospitals, Argentina.** *Int J Med Microbiol* 2014, **304**(8):1086-1099.
144. Nienaber JJ, Sharma Kuinkel BK, Clarke-Pearson M, Lamlertthon S, Park L, Rude TH, Barriere S, Woods CW, Chu VH, Marin M *et al*: **Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* endocarditis isolates are associated with clonal complex 30 genotype and a distinct repertoire of enterotoxins and adhesins.** *J Infect Dis* 2011, **204**(5):704-713.
145. Fowler VG, Jr., Nelson CL, McIntyre LM, Kreiswirth BN, Monk A, Archer GL, Federspiel J, Naidich S, Remortel B, Rude T *et al*: **Potential associations between hematogenous**

- complications and bacterial genotype in *Staphylococcus aureus* infection. *J Infect Dis* 2007, **196**(5):738-747.
146. Xiong YQ, Fowler VG, Yeaman MR, Perdreau-Remington F, Kreiswirth BN, Bayer AS: **Phenotypic and genotypic characteristics of persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in vitro and in an experimental endocarditis model.** *J Infect Dis* 2009, **199**(2):201-208.
147. Blomfeldt A, Eskesen AN, Aamot HV, Leegaard TM, Bjornholt JV: **Population-based epidemiology of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: clonal complex 30 genotype is associated with mortality.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016, **35**(5):803-813.
148. DeLeo FR, Kennedy AD, Chen L, Bubeck Wardenburg J, Kobayashi SD, Mathema B, Braughton KR, Whitney AR, Villaruz AE, Martens CA *et al*: **Molecular differentiation of historic phage-type 80/81 and contemporary epidemic *Staphylococcus aureus*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**(44):18091-18096.
149. McAdam PR, Templeton KE, Edwards GF, Holden MT, Feil EJ, Aanensen DM, Bargawi HJ, Spratt BG, Bentley SD, Parkhill J *et al*: **Molecular tracing of the emergence, adaptation, and transmission of hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**(23):9107-9112.
150. Sowash MG, Uhlemann AC: **Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* case studies.** *Methods Mol Biol* 2014, **1085**:25-69.
151. Ribeiro A, Dias C, Silva-Carvalho MC, Berquo L, Ferreira FA, Santos RN, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AM: **First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**(4):1985-1988.
152. Scribel LV, Silva-Carvalho MC, Souza RR, Superti SV, Kvitko CH, Figueiredo AM, Zavascki AP: **Clinical and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmecIV in a university hospital in Porto Alegre, Brazil.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009, **65**(4):457-461.
153. Ma XX, Galiana A, Pedreira W, Mowszowicz M, Christophersen I, Machiavello S, Lope L, Benaderet S, Buella F, Vincentino W *et al*: **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Uruguay.** *Emerg Infect Dis* 2005, **11**(6):973-976.
154. Pardo L, Machado V, Mollerach M, Mota MI, Tuchscher LP, Gadea P, Gardella N, Sordelli DO, Vola M, Schelotto F *et al*: **Characteristics of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) Strains Isolated from Skin and Soft-Tissue Infections in Uruguay.** *International journal of microbiology* 2009, **2009**:472126.
155. Dhanoa A, Singh VA, Mansor A, Yusof MY, Lim KT, Thong KL: **Acute haematogenous community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in an adult: case report and review of literature.** *BMC Infect Dis* 2012, **12**:270.
156. Chen J, Luo Y, Zhang S, Liang Z, Wang Y, Zhang Y, Zhou G, Jia Y, Chen L, She D: **Community-acquired necrotizing pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin in a Chinese teenager: case report and literature review.** *Int J Infect Dis* 2014.
157. Di Gregorio S, Perazzi B, Ordonez AM, De Gregorio S, Foccoli M, Lasala MB, Garcia S, Vay C, Famiglietti A, Mollerach M: **Clinical, microbiological, and genetic characteristics of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* bacteremia in a teaching hospital.** *Microb Drug Resist* 2015, **21**(1):25-34.

158. Kobayashi SD, Musser JM, DeLeo FR: **Genomic analysis of the emergence of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus***. *mBio* 2012, **3**(4).
159. Howden BP, Peleg AY, Stinear TP: **The evolution of vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogenous-VISA**. *Infect Genet Evol* 2014, **21**:575-582.
160. Peacock SJ, Day NP, Thomas MG, Berendt AR, Foster TJ: **Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibit diversity in *fnb* genes and adhesion to human fibronectin**. *J Infect* 2000, **41**(1):23-31.
161. Shinji H, Yosizawa Y, Tajima A, Iwase T, Sugimoto S, Seki K, Mizunoe Y: **Role of fibronectin-binding proteins A and B in in vitro cellular infections and in vivo septic infections by *Staphylococcus aureus***. *Infect Immun* 2011, **79**(6):2215-2223.
162. Chua KY, Monk IR, Lin YH, Seemann T, Tuck KL, Porter JL, Stepnell J, Coombs GW, Davies JK, Stinear TP *et al*: **Hyperexpression of alpha-hemolysin explains enhanced virulence of sequence type 93 community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. *BMC Microbiol* 2014, **14**:31.
163. Chua KY, Seemann T, Harrison PF, Monagle S, Korman TM, Johnson PD, Coombs GW, Howden BO, Davies JK, Howden BP *et al*: **The dominant Australian community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST93-IV [2B] is highly virulent and genetically distinct**. *PLoS One* 2011, **6**(10):e25887.
164. Montgomery CP, Daniels MD, Zhao F, Spellberg B, Chong AS, Daum RS: **Local inflammation exacerbates the severity of *Staphylococcus aureus* skin infection**. *PLoS One* 2013, **8**(7):e69508.
165. Kwiecinski J, Jin T, Josefsson E: **Surface proteins of *Staphylococcus aureus* play an important role in experimental skin infection**. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 2014, **122**(12):1240-1250.
166. Diep BA, Carleton HA, Chang RF, Sensabaugh GF, Perdreau-Remington F: **Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. *J Infect Dis* 2006, **193**(11):1495-1503.
167. Xu Y, Rivas JM, Brown EL, Liang X, Hook M: **Virulence potential of the staphylococcal adhesin CNA in experimental arthritis is determined by its affinity for collagen**. *J Infect Dis* 2004, **189**(12):2323-2333.
168. Johansson A, Flock JI, Svensson O: **Collagen and fibronectin binding in experimental staphylococcal osteomyelitis**. *Clinical orthopaedics and related research* 2001(382):241-246.
169. Ahmed S, Meghji S, Williams RJ, Henderson B, Brock JH, Nair SP: ***Staphylococcus aureus* fibronectin binding proteins are essential for internalization by osteoblasts but do not account for differences in intracellular levels of bacteria**. *Infect Immun* 2001, **69**(5):2872-2877.
170. Jenkins A, Diep BA, Mai TT, Vo NH, Warrenner P, Suzich J, Stover CK, Sellman BR: **Differential expression and roles of *Staphylococcus aureus* virulence determinants during colonization and disease**. *mBio* 2015, **6**(1):e02272-02214.

Resumen

Resumen

La virulencia y la capacidad de adquirir determinantes de resistencia antimicrobiana convierten a *S. aureus* en un patógeno exitoso que requiere medidas de vigilancia, prevención y control, tanto en el ámbito hospitalario como en la comunidad. A partir de la introducción de la meticilina rápidamente se conocieron cepas de *S. aureus* con resistencia a la misma (SAMR), debida a la adquisición de un elemento genético que codifica una proteína con afinidad disminuida a los antibióticos β -lactámicos. Estas cepas, como otras de *S. aureus*, producen una extensa variedad de factores de virulencia, los cuales facilitan, entre otros, la adhesión bacteriana, la evasión de mecanismos del sistema inmunológico, la producción de daño celular y tisular por medio de toxinas y la formación de biopelículas.

Desde la primera descripción de SAMR en el año 1961, la resistencia a meticilina en esta especie se limitaba principalmente al ámbito hospitalario. Pero alrededor de 1990, SAMR emergió como un patógeno de la comunidad, al conocerse un brote por SAMR en una comunidad remota sin ningún contacto con el sistema de salud.

Según el centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) se considera una infección por SAMR adquirida en la comunidad (SAMR-AC) a aquella ocurrida en pacientes sin factores de riesgo tradicionales para SAMR, fuera del ámbito hospitalario o antes de las 48hs de admisión al hospital. Estos aislamientos se diferencian fenotípicamente y genotípicamente de los SAMR hospitalarios. Si bien las presentaciones clínicas más frecuentes por SAMR-AC son infecciones de piel y estructuras relacionadas (IPER), también puede causar infecciones invasivas con alta morbilidad y mortalidad.

Los clones predominantes de SAMR-AC pertenecen a los complejos clonales 1, 8, 22, 30, 59 y 80, dentro de los cuales se destacan el ST8-IV, ST30-IV, ST59-V, ST80-IV y ST1-IV. En Argentina, hasta el año 2008 se reconoció un clon de SAMR-AC predominante en las infecciones adquiridas en la comunidad, clasificado por técnicas de epidemiología molecular como ST5-IV.

El presente trabajo de tesis se basó en la hipótesis de que luego del año 2008 ocurrió un cambio en la epidemiología molecular de SAMR de la comunidad en Argentina y el clon ST5-IV fue reemplazado. Dicho reemplazo pudo deberse a una mayor capacidad patogénica

de él o los nuevos clones de SAMR-AC prevalentes. Para corroborar dicha hipótesis se genotipificaron aislamientos de SAMR recolectados durante el año 2010-2011 en dos estudios multicéntricos nacionales con 19 hospitales participantes, que incluyeron pacientes mayores de 14 años con infecciones adquiridas en la comunidad (según criterio CDC) invasivas y no invasivas. Además se comparó la virulencia de los principales clones de SAMR-AC circulantes en Argentina en modelos *in vivo* y a través de la búsqueda y análisis de la expresión de factores de virulencia.

La tipificación por distintas técnicas moleculares permitió detectar un cambio en la epidemiología de SAMR-AC. Se comprobó que el clon ST30-IVc se estableció como predominante en las infecciones adquiridas en la comunidad en pacientes adultos, desplazando al clon anteriormente hallado, el ST5-IVa. El clon ST30-IVc provocó la mayoría de las infecciones de piel y estructuras relacionadas, y también la mayor parte de las infecciones invasivas en el periodo analizado. Además se asoció estadísticamente a una mayor producción de infección invasiva.

Se comparó la virulencia del nuevo clon prevalente, ST30-IVc, con el clon ST5-IVa desde distintos aspectos. El clon ST30-SCC*mecIVc* mostró una mayor virulencia en dos modelos experimentales de infección realizados, ya que presentó una mejor replicación en el nicho subcutáneo y mayor capacidad de invasión a partir del foco primario. Además causó mayor daño en el tejido óseo acompañado de una mayor replicación. Se detectó también en ST30-SCC*mecIVc*, una mayor expresión de un gen de virulencia, codificante de una adhesina llamada FnBPA, que también actúa como invasina.

A partir de la búsqueda de genes codificantes de factores de virulencia, se evidenció que ambos clones se diferencian en la portación de algunos genes de adhesinas, dentro del panel estudiado. El perfil específico caracterizado en ST30-SCC*mecIVc*, dado por genes codificantes de proteínas que unen fibronectina, colágeno y sialoproteína ósea, sumado a una probable mayor producción de la proteína FnBPA podría explicar la mayor virulencia en los dos modelos y la asociación con una mayor ocurrencia de infección invasiva.