



# **Perfil biomolecular de aislamientos SARM con resistencia heterogénea a vancomicina (hVISA) de circulación en Latinoamérica.**

**Betsy Esperanza Castro Cardozo**

Universidad El Bosque  
Facultad de Ciencias, Doctorado en Ciencias Biomédicas  
Bogotá D.C, Colombia  
2021

# **Perfil biomolecular de aislamientos SARM con resistencia heterogénea a vancomicina (hVISA) de circulación en Latinoamérica.**

***Betsy Esperanza Castro Cardozo***

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Doctor en Ciencias Biomédicas**

Directora:  
Ph.D. Sandra Lorena Díaz  
Codirectora:  
Ph.D. Jinnethe Reyes

Línea de Investigación:

Resistencia antimicrobiana en enterococos y estafilococos

Grupo de Investigación:

Unidad de Genética y Resistencia Antimicrobiana (UGRA), Universidad El Bosque

Universidad El Bosque

Facultad de Ciencias, Doctorado en Ciencias Biomédicas

Bogotá D.C, Colombia

2021



UNIVERSIDAD **EL BOSQUE**

Por una cultura de la vida, su calidad y su sentido

• • •

## ***Acta de calificación y aprobación de tesis de doctorado***

Los suscritos Directores de la División de Postgrados y el Programa académico, con base en los criterios científicos, metodológicos y éticos que se han establecido para tal efecto y después de haber oído el concepto de los respectivos evaluadores asignados para calificar tesis de doctorado:

***“Perfil biomolecular de aislamientos SARM con resistencia heterogénea a vancomicina (hVISA) de circulación en Latinoamérica”***

Presentado como requisito parcial por la estudiante:

***Betsy Esperanza Castro Cardozo***

Para optar al título de:

***Doctor en Ciencias Biomédicas***

Deciden asignar la calificación final de:

**MERITORIA**

Firmado en Bogotá D.C., el 26 de julio de 2021

Firmado electrónicamente  
**Juan Carlos Sánchez P.**  
**Director**  
**División de Postgrados**

Firmado electrónicamente  
**Jaime E. Castellanos Parra**  
**Director Programa**

Firmado electrónicamente  
**Sandra Lorena Díaz**  
**Directora de tesis**

Firmado electrónicamente  
**Alba Alicia Trespalacios**  
**Jurado**

## Dedicatoria

*“Al Señor que es mi fuerza y mi escudo; mi corazón en él confía; de él recibo ayuda”. (Salmo 28:7)*

*A mi esposo Alejandro Silva y mi hijo Santiago que son mi alegría y motivación diaria*

# Agradecimientos

El presente trabajo se realizó en Unidad de Genética y Resistencia Antimicrobiana (UGRA) de la Universidad El Bosque, con financiación de la Vicerrectoría de Investigaciones de dicha institución y MinCiencias (Contrato 705-2016).

Quiero expresar mi más sincera gratitud en primer lugar, a Dios por guiarme, fortalecerme y acompañarme en este proceso que permitió cumplir este proceso. Al igual que a mi esposo Alejandro Silva, mi hijo Santiago, padres, hermana y toda mi familia, por su amor e incondicional apoyo.

Quiero agradecer a todos mis compañeros de la Unidad de Genética y Resistencia Antimicrobiana (UGRA) de la Universidad El Bosque, conformado por: Liliana Vargas, Rafael Ríos, Lina Millán, Angie Hernández, Sandra Rincón, Sandra Vargas, Aura María Echeverri, Paola Carvajal y Catalina Espitia, por el tiempo compartido, enseñanzas, e inmensa colaboración en el desarrollo del proyecto y apoyo personal, y de una manera muy especial quiero agradecer a mis tutoras la Dra. Lorena Díaz y Dra. Jinnette Reyes por permitirme formar parte del grupo de investigación, apoyarme en mi formación académica, por sus invaluable enseñanzas y confianza que me motivó a continuar en este proceso. Al igual que al Dr. Miguel Otero por todo su confianza, apoyo y colaboración en todos los procesos administrativos y académicos que permitieron la financiación de mi formación doctoral.

A la Dra. Jacqueline Chaparro, docente del Doctorado de Ciencias Biomédicas por todos sus conocimientos transmitidos durante estos años de formación, por creer en mí y apoyarme en este proceso.

¡Muchas gracias!

## Resumen

Vancomicina es la principal opción terapéutica para tratar infecciones severas por *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina, por lo tanto, la emergencia de aislamientos con resistencia intermedia heterogénea a vancomicina (hVISA) pone en riesgo la efectividad de antibiótico ocasionando un aumento en las fallas terapéuticas y estancias hospitalarias. Este fenotipo no se identifica de forma rutinaria por medio de las metodologías estándar de susceptibilidad, en donde hacen parte de los aislamientos susceptibles a la vancomicina y por lo cual su identificación se realiza empleando metodologías dispendiosas no que no se realizan en laboratorios clínicos de diagnóstico. Adicionalmente, el mecanismo de resistencia hVISA involucra cambios genéticos y fisiológicos que afectan el metabolismo celular originando alteraciones principalmente en la envoltura celular. Desafortunadamente, a pesar de que la identificación y la caracterización de cepas hVISA han revelado varias alteraciones genéticas potencialmente asociadas al desarrollo del fenotipo, estas no han sido consistentes en todos los aislamientos con este fenotipo y, por tanto, no han permitido esclarecer el mecanismo molecular. Por otro lado, la epidemiología de las infecciones por SARM es dinámica a nivel mundial; se ha caracterizado por la emergencia y evolución de clones que se establecen en países o regiones específicas. Por esta razón, este trabajo identificar el perfil biomolecular de los aislamientos SARM con fenotipo hVISA que causan infecciones en pacientes en Latinoamérica, por medio de la integración de características genómicas, transcriptómicas y metabólicas.

A partir de 538 aislamientos SARM, se identificaron 30(5.6%) aislamientos con el fenotipo hVISA por métodos basados en E-test, pertenecientes en su mayoría al clon Chileno/Cordobés ST5, sin embargo, de estos, solo 3(0.56%) fueron confirmados mediante perfil de análisis poblacional/área bajo la curva (PAP/AUC). El genoma de estos aislamientos se analizó empleando la búsqueda de cambios puntuales reportados en la

literatura asociados al fenotipo, detección de cambios genéticos que discriminen entre hVISA y VSSA por medio de análisis GWAS (Genome-wide association studies) y discriminante lineal (LDA). De igual manera se caracterizó el transcriptoma y metaboloma de hVISA confirmados por PAP/AUC con el propósito de identificar los procesos fisiológicos alterados. A nivel genómico se identificaron tres cambios predominantes (90% de los hVISA) asociados a sistemas reguladores (VraT-E156G y Walk-L14I) y a la autolisina Atl-Y38H; mientras que por el análisis de GWAS y LDA se identificaron 11 cambios comunes asociados a virulencia (adhesina SdrC,D), transportadores de membrana, metabolismo de carbohidratos y aminoácidos. Algunos de estos hallazgos se correlacionaron con los hallazgos transcripcionales identificados como sobreexpresión en *sdrD* y *lacE* y específicamente en los hVISA-ST5 como sobreexpresión en la capsula y sistema de secreción Ess. Otro hallazgo muy interesante fue la sobreexpresión de *cidA* que está involucrado en el ciclo de ácido tricarboxílico en cual se encuentra alterado en los aislamientos hVISA que conlleva a una reducción de síntesis de aminoácidos (valina, leucina y treonina) y nucleósidos.

Estos resultados ponen en evidencia la detección y caracterización del fenotipo hVISA en la región y que, los cambios adaptativos presentes en los hVISA parecen ser conservados entre linajes como el ST5, los cuales afectan principalmente sistemas reguladores, autolisinas y factores de virulencia.

**Palabras claves:** hVISA, vancomicina, bacteriemia, SARM, mecanismo de resistencia.

## Abstract

Vancomycin is the main therapeutic option to treat severe infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; for this reason, the emergence of resistance including isolates with heterogeneous intermediate resistance to vancomycin (hVISA) threatens the effectiveness of the antibiotic, with an increase of therapeutic failure and hospital costs. Additionally, the hVISA phenotype is not routinely identified by standard methodologies and isolates with this phenotype are frequently categorized as vancomycin susceptible isolates; hVISA identification is performed using more complex methodologies that are not performed in clinical laboratories. Worsening this scenario, the hVISA resistance mechanism is complex; it involves genetic and physiological changes that affect cell metabolism, causing alterations mainly in the cell envelope. Despite the fact that the identification and characterization of hVISA strains have revealed several genetic alterations potentially associated with the development of the phenotype, these have not been consistent in all the isolates with this phenotype and, therefore, have not allowed to clarify the molecular mechanism. On another hand, the epidemiology of MRSA infections is very variable worldwide; it has been characterized by the emergence and evolution of clones that are established in specific countries or regions. For this reason, this work identifies the biomolecular profile of MRSA isolates with hVISA phenotype that cause infections in patients in Latin America, through the integration of genomic, transcriptomic and metabolomic analyses.

A total of 30 (5.6%) out of the 538 MRSA isolates evaluated in this study exhibited the hVISA phenotype (by E-test-based methods). Interestingly, the majority of the hVISA isolates belonged to the Chilean / Cordobes ST5 clone. Surprisingly, using the population analysis profile / area under the curve (PAP / AUC) test, only 3 isolates (0.56% of the total of MRSA) were confirmed as hVISA. The isolates were genomically analyzed using previously reported changes associated with the phenotype, in order to detect genetic changes that discriminate between hVISA and VSSA isolates by means of GWAS

(Genome-wide association studies) and linear discriminant (LDA) analysis. Similarly, the transcriptome and metabolome of the hVISA isolates confirmed by PAP / AUC were characterized in order to identify altered physiological processes. At the genomic level, three predominant changes were identified in 90% of the hVISA isolates, these were associated with regulatory systems (VraT-E156G and WalK-L14I) and with the autolysin Atl-Y38H; while the GWAS and LDA analysis identified 11 common changes associated with virulence (adhesin SdrC, D), membrane transporters, carbohydrate and amino acid metabolism. Some of these findings were linked with the transcriptional findings identified as under-expression in *sdrD* and *lacE* and specifically in hVISA-ST5 as over-expression in the capsule and Ess secretion system. Interesting. We also found the under-expression of *cidA*, which is involved in the tricarboxylic acid cycle in which it is altered in the hVISA isolates, which leads to a reduction in the synthesis of amino acids (valine, leucine and threonine) and nucleosides.

These results show the detection and characterization of the hVISA phenotype in the Latin American region and suggest that the adaptive changes present in hVISA seem to be conserved among lineages such as ST5. The main findings show alterations in *S. aureus* regulatory systems, autolysins and virulence factors.

**Keywords:** hVISA, vancomycin, heteroresistance, bacteremia, resistance mechanism and MRSA

# Contenido

<b>Resumen</b> .....	V
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	XIII
<b>Presentaciones y publicaciones</b> .....	IVX
<b>Introducción</b> .....	1
<b>Objetivos</b> .....	5
<b>1. Revisión de tema – Vancomicina y reducción de la susceptibilidad a vancomicina</b>	7
1.1 Mecanismo de acción de la vancomicina.....	8
1.2 Resistencia a vancomicina en <i>Staphylococcus aureus</i> .....	9
1.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a vancomicina (VRSA).....	11
1.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> con resistencia intermedia a vancomicina (VISA - hVISA)..	12
1.3 Mecanismo de resistencia en aislamientos VISA y hVISA.....	12
1.3.1 Cambios genómicos asociados a los fenotipos VISA y hVISA.....	13
1.3.2 Cambios asociados a la síntesis de la pared bacteriana.....	14
1.3.3 Cambios asociados a sistemas reguladores.....	15
1.3.4 Mutaciones en genes implicados en cambios transcripcionales.....	19
1.3.5 Mutaciones en genes implicados en el metabolismo de <i>S. aureus</i> .....	21
1.4 Identificación del fenotipo hVISA/VISA.....	21
1.5 Importancia clínica de los fenotipos hVISA y VISA.....	23
1.6 Epidemiología de los fenotipos hVISA y VISA.....	25
<b>2. Caracterización de aislamientos SARM con fenotipo hVISA en Latinoamérica</b> .....	28
2.1 Materiales y métodos.....	30
2.2.1 Recolección de aislamientos clínicos .....	31
2.2.2 Perfil de análisis poblacional/área bajo la curva (PAP/AUC).....	32
2.2.3 Secuenciación genómica y ensamblajes.....	33
2.2.4 Caracterización de aislamientos hVISA.....	34
2.2.5 Relación filogenética .....	34
2.3 Resultados .....	34
2.3.1 Prevalencia del fenotipo hVISA en aislamientos SARM de circulación en Latinoamérica.....	34

2.2.2 Características genómicas de los aislamientos hVISA de circulación en Latinoamérica.....	38
2.2.3 Relación filogenética de los aislamientos hVISA en Latinoamérica.....	43
2.3 Discusión .....	45
2.4 Conclusiones .....	48
<b>3. Cambios genéticos presenten en <i>S. aureus</i> resistente a meticilina con el fenotipo hVISA.....</b>	<b>51</b>
3.1 Materiales y métodos .....	52
3.1.1 Identificación de sustitución de aminoácidos en proteínas asociadas al desarrollo del fenotipo hVISA y VISA.....	52
3.1.2 Detección de cambios predominantes en aislamientos hVISA en otros genomas de <i>S. aureus</i> .....	52
3.1.3 Recuperación y caracterización de subpoblaciones con resistencia intermedias a vancomicina presentes en los aislamientos hVISA .....	53
3.1.4 Detección de cambios de aminoácidos y SNPs en las subpoblaciones versus aislamientos hVISA .....	55
3.1.5 Detección de cambios genéticos asociados al fenotipo hVISA.....	55
3.1.6 Análisis del transcriptoma por RNA-Seq.....	56
3.1.7 Formación de biopelícula.....	57
3.2 Resultados .....	58
3.2.1 Cambios en subpoblaciones heterogéneas con resistencia intermedia a vancomicina presentes en los aislamientos hVISA.....	64
3.2.2 Identificación de SNPs de subpoblaciones respecto a parentales hVISA .....	66
3.2.3 SNPs asociados al fenotipo hVISA .....	68
3.3 Perfil transcriptómico en aislamientos hVISA .....	72
3.3.1 Identificación del perfil transcriptómico en aislamientos hVISA.....	73
3.4 Discusión.....	80
3.5 Conclusiones.....	85
<b>4. Cambios metabólicos de aislamientos hVISA.....</b>	<b>88</b>
4.1 Materiales y métodos .....	89
4.1.1 Extracción de metabolitos intracelulares de aislamientos hVISA.....	89
4.1.2 Detección de huellas metabólicas mediante LC/MS.....	90
4.1.3 Detección de huellas metabólicas mediante HILIC-LC/MS.....	91
4.1.4 Tratamiento de datos en metabolómica no dirigida por LC/MS y HILIC-LC/MS.....	91
4.1.5 Análisis estadístico.....	92
4.1.6 Identificación de metabolitos.....	93
4.2 Resultados .....	94
4.2.1 Caracterización metabólica de los aislamientos hVISA y VSSA -ST5.....	95
4.3 Discusión.....	102
4.4 conclusiones.....	105
<b>5. Modelo de cambios fisiológicos en aislamientos hVISA ST5.....</b>	<b>108</b>
<b>6. Conclusiones generales y recomendaciones.....</b>	<b>110</b>
<b>8. Bibliografía .....</b>	<b>112</b>
<b>8. Anexos.....</b>	<b>120</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1-1</b> Estructura química de la vancomicina.....	8
<b>Figura1-2.</b> Modelo del mecanismo de resistencia a vancomicina mediado por <i>vanA</i> en <i>S. aureus</i> .....	11
<b>Figura 2-1</b> Perfil de análisis poblacional de aislamientos de SARM usando vancomicina...	36
<b>Figura 2-2</b> Resistoma y perfil de resistencia de los aislamientos VISA.....	41
<b>Figura 2-3</b> Árbol filogenómico bayesiano utilizando SNP del genoma central de <i>S. aureus</i> recuperados en 9 países de Latinoamérica.....	44
<b>Figura 2-4</b> Relación filogenética en aislamientos hVISA asociada al CC5 (n=249).....	45
<b>Figura 3-1</b> Sustitución de aminoácidos con diferencia de proporción entre hVISA y VSSA...	59
<b>Figura 3-2</b> Red de interacción de Walk.....	60
<b>Figura 3-3</b> Ubicación de en la estructura proteica de los cambios predominantes identificados en los aislamientos hVISA.....	61
<b>Figura 3-4</b> Relación del valor PAP/AUC de los aislamientos hVISA con el número cambios de aminoácidos por proteínas asociados al desarrollo del fenotipo.....	63
<b>Figura3-5</b> Características moleculares y microbiológicas de las subpoblaciones obtenidas de aislamientos hVISA.....	65
<b>Figura 3-6</b> Distribución de las sustituciones identificadas en las subpoblaciones obtenidas de los aislamientos hVISA.....	67
<b>Figura 3-7.</b> Alineamiento de los K-meros significativos en los genomas cerrados hVISA y N315.....	68
<b>Figura 3-8.</b> Distribución en categorías funcionales de los 50 K-meros con mayor significancia estadística.....	69
<b>Figura 3-9.</b> Análisis discriminante lineal de SNP en las cepas de ST5.....	71
<b>Figura 3-10.</b> SNP relevantes identificados entre los genomas hVISA y VSSA ST5 contra el genoma de referencia N315.....	71
<b>Figura 3-11</b> Relación genética de aislamientos SARM con fenotipo hVISA confirmado por PAP/AUC y comparadores VSSA .....	73
<b>Figura 3-12</b> PCA del perfil transcriptómico de aislamientos hVISA y VSSA.....	75
<b>Figura 3-13</b> Genes comunes diferencialmente expresados en las comparaciones de hVISA vs VSSA .....	75
<b>Figura 3-14</b> Genes comunes expresados diferencialmente en pares pertenecientes a ST5.....	75
<b>Figura 3-15</b> Los genes diferencialmente expresados en hVISA y ausentes en VSSA pertenecientes a ST5 normalizaron respecto a la cepa N315 (VSSA).....	76
<b>Figura 3-15.</b> Heatmap de la expresión de factores de virulencia en aislamientos hVISA y VSSA.....	78
<b>Figura 3-15.</b> Figura 3-16. Formación de biopelícula en aislamientos hVISA y VSSA.....	78
<b>Figura 4-1.</b> Crecimiento fisiológico de hVISA y comparadores VSSA.....	95
<b>Figura 4-2.</b> PCA de control de calidad de metabolitos analizados.....	95
<b>Figura 4-3.</b> Modelos OPLS-DA muestras hVISA y VSSA ST5.....	96
<b>Figura 4-4.</b> Principales rutas metabólicas en <i>S. aureus</i> para la síntesis de aminoácidos.....	101
<b>Figura 4-5</b> Análisis de la vía metabólicas.....	110

## Lista de tabla

<b>Tabla 1-1.</b> Sistemas regulatorios globales identificados en <i>S. aureus</i> .....	16
<b>Tabla 2-1</b> Prevalencia de hVISA en Latinoamérica (2011-2014) por GRD y MET.....	35
<b>Tabla 2-2</b> relación PAP/AUC de aislamientos hVISA y cercanos al punto de corte.....	37
<b>Tabla 2-3</b> Características moleculares de los aislamientos hVISA.....	38
<b>Tabla 2-4</b> Factores de virulencia con diferencia de proporciones entre hVISA y VSSA.	43
<b>Tabla 3-1</b> Total de cambios de aminoácidos en proteínas por categoría funcional.....	58
<b>Tabla 3-2</b> Porcentaje de cambios en los genomas de <i>S. aureus</i> disponibles en NCBI.	62
<b>Tabla 3-4</b> Total de SNP presentes en la subpoblación resistente respecto a las cepas parentales hVISA.....	66
<b>Tabla 3-5</b> Anotación de los SNP identificados en el análisis de LDA.....	71
<b>Tabla 3-6</b> Cambios comunes en los aislamientos hVISA por el análisis de LDA y WGAS.....	71
<b>Tabla 3-7</b> Genes diferencialmente expresados en los pares hVISA-VSSA.....	75
<b>Tabla 4-1</b> Metabolitos identificados por LC/MS y Hilic/MS en la comparación de hVISA-VSSA.....	97
<b>Tabla 4-2</b> Lípidos identificados por LC/MS y Hilic/MS en la comparación de hVISA-VSSA.....	114

## Lista de abreviaturas

<i>agr</i>	Gen accesorio regulador
AMR	Resistencia Antimicrobiana (del inglés <i>antimicrobial resistance</i> )
ATP	Adenosín trifosfato
BHIA	Agar infusión cerebro corazón (del inglés <i>brain heart infusion</i> )
CC	Complejo clonal
CDC	Centro para el Control y la Prevención de enfermedades (del inglés <i>Center for Disease Control and Prevention</i> )
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (del inglés <i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i> )
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EUCAST	Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (del inglés <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> )
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (del inglés <i>Food and Drug Administration</i> )
GRD	Detección de Resistencia a Glicopéptidos (del inglés <i>glycopeptide resistance detection</i> )
hVISA	<i>Staphylococcus aureus</i> con resistencia intermedia heterogénea a vancomicina (del inglés <i>heterogeneous vancomycin-intermediate S. aureus</i> )
INDEL	Inserción/Delección
MET	E-test Macrométodo
MHA	Agar Müller-Hinton
MLS <sub>B</sub>	Macrólidos, lincosamidas, estreptogramina B
MLST	Tipificación de secuencias multilocus (del inglés <i>multilocus sequence typing</i> )
NCBI	Centro Nacional para Información de Biotecnología (del inglés <i>National Center for Biotechnology Information</i> )
PAP/AUC	Perfil de análisis poblacional/área bajo la curva
pb	pares de bases
PBP	Proteína de unión a penicilina (del inglés <i>penicillin binding protein</i> )
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsado (del inglés <i>pulsed field gelelectrophoresis</i> )
PVL	Leucocidina de Pantón-Valentine (del inglés <i>Panton-Valentine Leukocidin</i> )
RNA	Ácido ribonucleico

---

SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
SARM-AC	<i>S. aureus</i> resistente a meticilina adquirido en la comunidad
SARM-AH	<i>S. aureus</i> resistente a meticilina adquirido en ambiente hospitalario
SASM	<i>S. aureus</i> susceptible a meticilina
SCC <sub>mec</sub>	Casete estafilocócico cromosomal <i>mec</i> (del inglés <i>Saphylococcal ChromosomeCassette mec</i> )
SNP	Polimorfismo de nucleótido único (del inglés <i>single nucleotide polymorphism</i> )
<i>spa</i>	Gen que codifica para la proteína A
ST	Tipo de secuencia
TCS	Sistema regulador de dos componentes (del inglés <i>two-component regulatory system</i> )
TEI	Teicoplanina
UFC	Unidad formadora de colonias
VAN	Vancomicina
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> con resistencia intermedia a vancomicina (del inglés <i>vancomycin-intermediate S. aureus</i> )
VRE	Enterococos resistentes a vancomicina
VRSA	<i>S. aureus</i> resistentes a vancomicina (del inglés <i>vancomycin-resistant S. aureus</i> )
VSSA	<i>S. aureus</i> susceptible a vancomicina (del inglés <i>vancomycin-susceptible S. aureus</i> )

## Presentaciones en eventos y publicaciones

### Publicación:

**Detection of heterogeneous vancomycin intermediate resistance in MRSA isolates from Latin America. *J Antimicrob Chemother*, 2020. 75(9): p. 2424-2431.**

Betsy E. Castro, Maritza Berrio, Monica L. Vargas, Lina P. Carvajal, Lina V. Millan, Rafael Rios, Angie K. Hernandez, Sandra Rincon, Paola Cubides, Erika Forero, An Dinh, Carlos Seas, Jose M. Munita, Cesar A. Arias, Jinnethe Reyes and Lorena Diaz.

### Presentaciones en congresos:

**Cambios transcriptómicos asociados al fenotipo de resistencia intermedia heterogénea a vancomicina (hVISA) en *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) causantes de infecciones en Latinoamérica.**

Castro B, Ortega-recalde O, Rios R, Hernández A, Carvajal L, Solano S, Hanson B, Dihn A, Seas C, Munita J, Arias C, Rincon S, Reyes J, Diaz L. **ACIN2020, Presentación oral**

**Transcriptomic Alterations Associated to Heterogeneous Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA) Phenotype in Latin-American MRSA Isolates**

Castro Betsy, Rios Rafael, Espitia-Acero Catalina, Carvajal Lina P., Hanson Blake, Dihn An, Seas Carlos, Munita Jose M. Arias Cesar A., Rincon Sandra, Reyes Jinnethe, Diaz Lorena, **Carming**. 2021 **Póster**

**Transcriptomic profile of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA) in Latin-American MRSA isolates.**

Betsy E. Castro, Oscar Ortega-Recalde, Rafael Rios, Angie K. Hernández, Lina P. Carvajal, Sebastian Solano, Blake Hanson, An Dihn, Carlos Seas, Jose M. Munita, Cesar A. Arias, Sandra Rincon, Jinnethe Reyes, Lorena Diaz, 29th **European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, ECCMID 2019**. Ámsterdam, Holanda, 13-16 de abril 2019. **Póster**.

**Genetic Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates Associated with the Development of Reduced Susceptibility to Vancomycin from Latin America**

Vargas ML, **Castro B**, Hernández AK, Millan LV, Rios R, Carvajal LP, Seas C, Munita JM, Arias CA, Reyes J, and Diaz L, **IDweek 2019. Presentación oral**.

**Detección y caracterización genética de en *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en pacientes con bacteremia en Latinoamérica**

Vargas ML, **Castro B**, Hernández AK, Millan LV, Rios R, Carvajal LP, Seas C, Munita JM, Arias CA, Reyes J, and Diaz L. **Bogota Microbial Meeting, BoMM 2019**. Bogotá, Colombia, 25-26 de julio 2019. **Poster**.

## Introducción

Las infecciones por bacterias multirresistentes son un problema de salud pública mundial que afecta a personas de cualquier edad, desmejora su calidad de vida y reducen la efectividad de las opciones terapéuticas disponibles [1, 2]. En Estados Unidos, se estima que dos millones de personas al año cursan con estas infecciones y aumentan en más de veinte mil millones de dólares los costos asociados a la atención en salud, debido al manejo de las complicaciones clínicas asociadas a estas [3]. En las infecciones causadas por bacterias Gram positivas, *Staphylococcus aureus* es el principal patógeno de importancia clínica a nivel mundial con una prevalencia cercana al 11.8% del total de infecciones hospitalarias; debido a su potencial patogénico, puede ocasionar desde infecciones localizadas en piel y tejidos blandos hasta patologías sistémicas potencialmente mortales como bacteriemias y sepsis [3, 4]. El éxito genético y epidemiológico de este patógeno se debe en parte a la plasticidad de su material genético, que le permite adquirir y expresar gran variedad de factores de virulencia y mecanismos de resistencia, que optimizan sus procesos celulares involucrados en la colonización, evasión del sistema inmune del hospedero, adaptación y supervivencia a diferentes nichos en los cuales pueden estar presentes los antimicrobianos [5].

En el caso de *S. aureus*, la resistencia a la meticilina (SARM) es un claro ejemplo de diseminación exitosa de resistencia; tan solo un año después de la inclusión clínica de este antibiótico, en 1960 se identificó el primer caso de resistencia, y pocos años después, incrementaron rápidamente las tasas de morbimortalidad a nivel mundial [6, 7]. Para empeorar el panorama, los aislamientos SARM adquirieron resistencia a múltiples familias de antibióticos (quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos y lincosamidas) reduciendo considerablemente las opciones efectivas de tratamiento [8, 9]. Aunque en la actualidad, la vancomicina se considera el pilar en el tratamiento de las infecciones severas causadas por SARM, la emergencia de *S. aureus* con resistencia o susceptibilidad

disminuida a vancomicina están amenazando la efectividad de este antibiótico [10].

*S. aureus* puede expresar el fenotipo de resistencia a vancomicina (VRSA) con altos niveles de resistencia al presentar concentraciones inhibitoria mínima (CIM) a vancomicina de  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ , debido a la adquisición del grupo de genes *vanA* que sustituye el extremo D-Alanina-D-Alanina (D-Ala-D-Ala) de los monómeros de peptidoglicano por D-Ala-D-Lac, que disminuye casi 1.000 veces la afinidad de este con el antibiótico [11]. Adicionalmente, puede presentar fenotipos con disminución de la susceptibilidad a la vancomicina, en donde se encuentra *S. aureus* con resistencia intermedia a vancomicina (VISA) y con fenotipo heterogéneo (hVISA) [12].

Los aislamientos VISA se caracterizan por presentar CIM de vancomicina de 4-8  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que los hVISA son clasificados como susceptibles a vancomicina (CIM  $\leq 2\mu\text{g/mL}$ ) a pesar de tener una población heterogénea, es decir que la mayor parte de la población bacteriana es susceptible a la vancomicina pero contiene subpoblaciones bacterianas con resistencia intermedia (CIM 4-8  $\mu\text{g/mL}$ ) en frecuencias cercanas a  $10^5$  a  $10^6$  CFU/mL, las que no son detectadas por las pruebas de susceptibilidad estándar empleadas en las instituciones hospitalarias [13]. Infortunadamente, en la actualidad no se cuenta con una prueba de diagnóstico rutinario que permita su oportuna identificación, aunque se han propuesto diferentes metodologías como las pruebas de tamizaje basadas en agar suplementado con glicopéptidos y pruebas basadas en E-test, que incluyen GRD (detección de resistencia a glicopéptidos) y E-test macrométodo (MET), siendo estas últimas las que presentan mayor sensibilidad y especificidad para detectar el fenotipo, pero aún no son recomendadas por el CLSI e implementadas en todas las entidades hospitalarias porque implican costos adicionales. El método considerado la prueba de oro para identificar el fenotipo hVISA es el perfil de análisis de la población/área bajo la curva (PAP/AUC), no obstante, no es un factible implementarla como método de diagnóstico de rutina por ser una técnica demasiado costosa y dispendiosa técnicamente [13, 14].

Esta dificultad en la detección de los aislamientos hVISA, causa una subestimación de la prevalencia real del fenotipo, para antes del 2006, era del 4.7% y entre el 2010 a 2014 alcanzo el 7.0%. aunque algunos estudios indican que esta puede variar entre 0.2 al 19% dependiendo del país, o limitarse solo a casos esporádicos como en latino América (Argentina, Brasil, y Chile). El impacto clínico y epidemiológico real también ha sido difícil

de establecer, aunque se ha identificado una asociación entre la presencia del fenotipo con falla terapéutica; especialmente en infecciones de alto inóculo, aumentando la estancia en unidades de cuidado intensivo (UCI) y tiempos en el tratamiento antimicrobiano comparado a los aislamientos susceptibles a vancomicina (VSSA) ([15, 16].

La naturaleza multifactorial de los fenotipos VISA y hVISA, hace que el mecanismo de resistencia no esté completamente claro. Aunque, en la última década se han identificado alteraciones fenotípicas, genéticas y metabólicas que favorecen el desarrollo de la heteroresistencia, Sin embargo, esta información no ha sido suficiente para entender en detalle el mecanismo, demostrando su complejidad. Algunas de las características comunes reportadas en estos patógenos, involucran la reducción de la autólisis, cambios en la expresión de sistemas reguladores (VraTSR, GraSR y WalkR), alteración de los ácidos teicoicos, aumento del grosor y arquitectura de la pared bacteriana, cambios que favorece la unión de la vancomicina en las capas más externas de la pared bacteriana, impidiendo que el antibiótico se una en el septo bacteriano e inhiba su síntesis. Infortunadamente, estos cambios no son consistentes en todas las cepas que presentan el fenotipo, debido posiblemente a las características propias de cada cepa o linaje genéticos que es muy diverso en los aislamientos SARM, lo que hace necesario caracterizar la mayor cantidad de linajes genéticos para comprender las características propias de los hVISA circulantes en cada región ya que sus características pueden variar significativamente [22].

Aunque en los últimos años se han logrado avances significativos en la comprensión del proceso molecular que causa la susceptibilidad disminuida a vancomicina debido al uso de tecnologías de alto rendimiento que permiten explorar cambios génicos puntuales de los aislamientos con estos fenotipos, como el caso de la secuenciación del genoma completo de las cepas Mu3 y Mu50 (cepas de referencia para los fenotipos hVISA y VISA), comparando cepas isogénicas VSSA y VISA obtenidas *in vivo* (JH1- JH9) *in vivo* o *in vitro*, aislamientos clínicos con el fenotipo en comparación con aislamientos VSSA, como las cepas ATCC29213 o N315 [17], han proporcionado información valiosa que permite asociar la presencia de mutaciones espontáneas, con el desarrollo de los fenotipos hVISA y VISA, aunque, aun se presenta la limitante de establecer la consecuencia biológica de la presencia de estos cambios, y poder establecer si realmente están favoreciendo el desarrollo del fenotipo o es un cambio relacionado más a la caracterización de la cepa o linaje; impidiendo establecer un perfil genético específico que permita identificar de una

forma rápida y precisa en fenotipos [12].

Debido a la naturaleza multifactorial de la heteroresistencia en aislamientos SARM que dificulta la comprensión de mecanismo molecular y la detección de hVISA, es necesario continuar con estudios que permitan caracterizar en detalle las alteraciones celulares que promueven el desarrollo de esta resistencia. Por esta razón, este estudio tiene como objetivo establecer de forma integrada el perfil biomolecular de los aislamientos hVISA identificados en Latinoamérica integrando estrategias ómicas (genómica, transcriptómica y metabolómica), que permitan contribuir en el entendimiento del mecanismo de resistencia a nivel general, caracterizar los aislamientos hVISA circulantes en la región y proporcionar información que permitan optimizar las estrategias diagnósticas y el manejo terapéutico.

# Objetivos

## Objetivo general

Determinar el perfil biomolecular de aislamientos SARM con fenotipo de resistencia intermedia heterogénea a vancomicina (hVISA) de circulación en Latinoamérica.

## Objetivos específicos

- Describir los cambios genéticos y transcripcionales en los aislamientos SARM involucrados en el desarrollo del fenotipo hVISA.
- Integrar el perfil metabólico con los genes diferencialmente expresados en aislamientos de SARM con resistencia intermedia heterogénea a vancomicina.
- Determinar las posibles vías regulatorias que dirigen el desarrollo de hetero-resistencia a la vancomicina en *S. aureus*.

# Capítulo I

# 1. Revisión de tema – Vancomicina y reducción de la susceptibilidad a vancomicina

*Staphylococcus aureus* es uno de los patógeno más importante en humanos que causa un amplio rango de infecciones, desde infecciones leves en piel y tejidos blandos hasta infecciones más complicadas como neumonía necrotizante, fascitis y endocarditis [18]. Desde hace más de un siglo *S. aureus* es considerado como un desafío clínico por su impacto epidemiológico, versatilidad en la adquisición de factores de virulencia y determinantes de resistencia [19]. La adquisición de mecanismos de resistencia antimicrobiana ha sido un evento evolutivo que le brinda ventajas adaptativas a este patógeno, un ejemplo de esto fue el rápido desarrollo de resistencia a la penicilina, pues tan solo dos años después de su introducción a la práctica clínica en 1940, se identificaron las primeras cepas resistentes. Luego en 1961, se demostró resistencia a las penicilinas semisintéticas dando origen a los aislamientos conocidos como *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM), los cuales presentan con frecuencia co-resistencia a otras familias de antibióticos empleadas como tratamiento. Desde entonces, la diseminación de SARM ha sido continua hasta convertirlo en un patógeno endémico a nivel mundial [4, 18].

Debido a la alta prevalencia de cepas de SARM multirresistentes si ha limitado considerablemente las opciones terapéuticas en estas infecciones. La Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA) recomienda el uso de la vancomicina como opción terapéutica de primera línea en tratamiento de infecciones graves causadas por SARM [20, 21]. Sin embargo, su efectividad ha disminuido desde hace aproximadamente dos décadas, debido a su uso excesivo y a la emergencia de aislamientos con susceptibilidad disminuida a este antibiótico, como los *S. aureus* con resistencia intermedia a vancomicina (VISA) y con fenotipo heterogéneo (hVISA), que incrementan las posibilidades de fallas terapéuticas, estancias y costos hospitalarios [12, 21].



La vancomicina ejerce su acción bactericida al inhibir la síntesis de la pared bacteriana, esta estructura desempeña un papel fundamental en la supervivencia y patogenicidad de las bacterias. La pared bacteriana de *S. aureus* está compuesta por ácidos teicoicos, proteínas superficiales y peptidoglicano, conformado por un disacárido de *N*-acetil glucosamina (GlcNAc) y *N*-acetil murámico (MurNAc) unidos por enlaces  $\beta$ -(1-4). Al MurNAc se encuentra unido el pentapéptido (L-Ala, D- Glu, L-Lys, D-Ala y D-Ala) que es translocado a la superficie exterior de la membrana citoplasmática, por el transportador lipídico o undecaprenol para permitir la reticulación de las moléculas de peptidoglicano al formarse un enlace de transpeptidación mediado por las proteínas de unión a penicilina (PBP2/4) entre el grupo  $\epsilon$ -amino del residuo L-Lys de pentapéptido y el grupo carboxilo en el término D-ALA del otro pentapéptido de la pared bacteriana naciente [25, 26]. La vancomicina tiene el efecto bactericida cuando se une a los residuos D-Ala–D-Ala del pentapéptido unidos al undecaprenol, formando un complejo estable no covalente (por medio de 5 puentes de hidrógeno), que genera un impedimento estérico que impide la acción glicosiltransferasa y transpeptidasa de las proteínas de unión a la penicilina (PBP) en el peptidoglicano favoreciendo la continuidad de la síntesis de la pared celular en el septo bacteriano [11, 21, 27].

## 1.2 Resistencia a vancomicina en *Staphylococcus aureus*

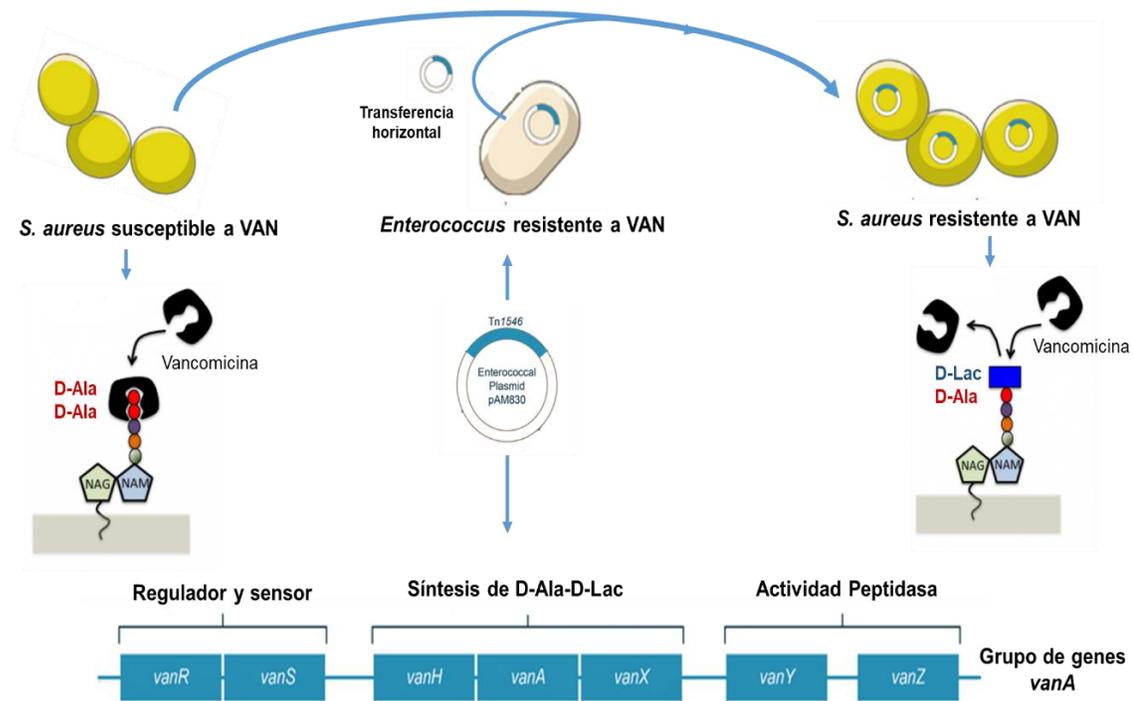
El uso cada vez más frecuente de la vancomicina para el tratamiento de infecciones causadas por SARM, ha llevado a la emergencia de aislamientos con resistentes a este antibiótico aumentando las tasas de fracaso terapéutico [28-30]. Los aislamientos de *S. aureus* pueden ser clasificar teniendo en cuenta los puntos de corte de la concentración inhibitoria mínima (CIM) a vancomicina en susceptible a la vancomicina (VSSA) si presenta una  $CIM \leq 2 \mu\text{g/mL}$ , con resistencia intermedia o aislamiento VISA ( $4-8 \mu\text{g/mL}$ ), o resistente a la vancomicina (VRSA) si la CIM es  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ , empleando los criterios del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) [13]. Para el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST), los aislamientos se clasifican solo en dos categorías, susceptibles (CIM de  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ ) o resistente si tienen una CIM de  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$  [31].

### 1.2.1 *Staphylococcus aureus* resistentes a vancomicina (VRSA)

En 1958 fue aprobado el uso clínico de la vancomicina, pero solo hasta finales de la década de 1980 se masificó su uso a nivel hospitalario, a consecuencia del aumento en la prevalencia de infecciones causadas por SARM. Sin embargo, solo hasta el año de 1988, se identificó la resistencia a vancomicina en aislamientos clínicos de *Enterococcus* spp., lo que generó preocupación respecto a la futura efectividad de este antibiótico en el tratamiento de infecciones causados por Gram positivos, ya que se consideró que rápidamente se diseminaría esta resistencia entre diferentes especies bacterianas, entre ellas *S. aureus* [11, 22].

En *S. aureus*, el primer reporte de resistencia a vancomicina fue en el año 2002, en un aislamiento de Michigan (Estados Unidos) que presentaba el grupo de genes *vanA*. Otros casos fueron identificados posteriormente en Nueva York, Delaware y Pensilvania, sin embargo, la diseminación de este fenotipo es limitada a casos esporádicos; hasta el año 2015 se han registrado 14 casos en Estados Unidos y algunos casos esporádicos en India, Irán, Pakistán, Portugal, Brasil y Guatemala [32-36].

El grupo de genes *vanA* sintetiza un precursor modificado de la pared bacteriana, haciendo que el habitual dipéptido D-alanina (D-Ala-D-Ala) sea reemplazado por D-Ala-D-Lac (lactato) o D-Ala-D-Ser (serina), haciendo que el sitio de unión de la vancomicina reduzca su afinidad por el antibiótico y continúe la síntesis de la pared bacteriana [37]. El grupo de genes *vanA* es transportado por transposón *Tn1546* (proveniente de *Enterococcus* spp.) y está conformado por nueve genes entre los cuales se encuentran: los ORF1 y ORF2 que codifican para una transposasa y una resolvasa, respectivamente, necesarias para la movilización del transposón, los genes reguladores del sistema de dos componentes *vanR* y *vanS*, los genes *vanH*, *vanA* y *vanX* que son esenciales en el proceso de la síntesis del depsipéptido D-Ala-D-Lac, puesto que VanA es una ligasa que cataliza el enlace éster del depsipéptido y VanH es una deshidrogenasa que forma el D-Lactato a partir del piruvato, mientras que VanX es una D-dipeptidasa que hidroliza el enlace éster D-Ala-D-Ala para favorecer la unión de D-Ala-D-Lac al precursor del peptidoglicano. VanY también actúa en este proceso de eliminación de residuos D-Ala-D-Ala unidos al extremo C-terminal, pero en el peptidoglicano ya formado. La presencia de *vanZ* se asocia con la resistencia a teicoplanina, otro glicopéptido, aunque se desconoce su función (figura 1-2) [11, 25, 37].



**Figura1-2. Modelo del mecanismo de resistencia a vancomicina mediado por *vanA* en *S. aureus*.** Los recuadros azules indican la organización del grupo de genes presente en el Tn1546; *vanR*: regulador de respuesta, *vanS*: proteína histidina quinasa, *vanH*: deshidrogenasa, *vanA* ligasa, *vanX*: D-D-dipeptidasa, *vanY*: D-D-carboxipeptidasa y *vanZ*: sin función establecida. Modificada de MacGuinness [38].

### 1.2.2 *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a vancomicina (VISA - hVISA)

En Japón en 1997 se describió el primer aislamiento clínico de *S. aureus* con susceptibilidad disminuida a vancomicina (VISA), recuperado de una herida quirúrgica en un paciente pediátrico de cuatro meses de edad que recibió tratamiento con vancomicina por 29 días sin tener éxito terapéutico. Este aislamiento fue denominado Mu50 y presenta un ligero aumento de la CIM (8 µg/mL) clasificándolo con resistencia intermedia a vancomicina [39, 40]. Aunque, algunos análisis retrospectivos sugieren que la emergencia de aislamientos VISA se remonta desde el año 1987 en Estados Unidos [41]. Actualmente, se define a los aislamientos VISA siguiendo los criterios del CLSI, a aquellos que presentan una CIM a vancomicina entre 4-8 µg/mL empleando microdilución en caldo y que presentan sensibilidad a teicoplanina, ya que los que presentan resistencia intermedia también a teicoplanina (16 µg/mL) son denominados GISA (*S. aureus* con susceptibilidad intermedia a glicopéptidos) [13]. Los VISA no poseen el grupo de genes *vanA* ni otro mecanismo de resistencia adquirido, lo que dificulta la completa comprensión del mecanismo de

resistencia a diferencia de los VRSA.

Se considera que el desarrollo de aislamientos VISA a partir de cepas sensibles (VSSA) requiere un proceso de transición de otro fenotipo conocido como resistencia intermedia heterogénea a vancomicina (hVISA). Estos aislamientos son clasificados como susceptibles ( $\leq 2\mu\text{g/mL}$ ) por las pruebas de susceptibilidad estándar, aunque contienen subpoblaciones bacterianas en bajas frecuencias de  $10^5$  a  $10^6$  UFC/mL con fenotipo VISA o resistencia intermedia (CIM 4-8  $\mu\text{g/mL}$ ), las cuales no son detectadas por estas metodologías estándar ya que emplean inóculos bajos ( $5 \times 10^4$  UFC para dilución en caldo y  $1 \times 10^4$  UCF para dilución en agar) [12, 39]. El primer aislamiento con fenotipo hVISA fue reportado en Japón en 1996, en un paciente de 64 años con un cuadro de neumonía por SARM que presentó falla al tratamiento con vancomicina por 12 días. La CIM del aislamiento fue 3  $\mu\text{g/mL}$ , pero contenía subpoblaciones que crecían en mayores concentraciones de vancomicina (5-9  $\mu\text{g/mL}$ ); este aislamiento actualmente es conocido como la cepa Mu3 y es la referencia del fenotipo [40].

### 1.3 Mecanismo de resistencia en aislamientos VISA y hVISA

El mecanismo de resistencia intermedia a vancomicina (VISA y hVISA) no está completamente elucidado, sin embargo, numerosos estudios en aislamientos puntuales como Mu3, Mu50, JH1-JH9 entre otros han permitido establecer que la combinación de varios cambios fenotípicos, genéticos y metabólicos están involucrados simultáneamente en este proceso, aunque la presencia de estos cambios no son consistentes o conservados en todas las cepas hVISA, o entre linajes de SARM que presentan el fenotipo, lo que dificulta aún más su comprensión [12, 26].

Los aislamientos VISA y hVISA presentan cambios morfológicos como reducción del crecimiento bacteriano, menor susceptibilidad a la lisostafina, cambios en la estructura de los ácidos teicoicos y engrosamiento de la pared bacteriana. Esta última característica fue identificada inicialmente en la cepa VISA Mu50 por medio de microscopía de transmisión, en la cual se observó un aumento en el número de las capas de peptidoglicano (entre 30-40 capas) que corresponde a un grosor de la pared de aproximadamente 53  $\mu\text{m}$ , respecto a una susceptible que es cercano a los 31  $\mu\text{m}$  [42]. Este engrosamiento es consecuencia de varios factores: (i) producción excesiva de peptidoglicano, (ii) disminución de la actividad

autolítica que es la responsable de hidrolizar por medio de las enzimas AtlA y LytM de las capas más antiguas de peptidoglicano que se ubican en la parte más externa de la envoltura celular, al ser desplazadas por las capas recién sintetizadas de peptidoglicano [43], (iii) presencia de monómeros de peptidoglicano (D-Ala-D-Ala) no reticulados en proporciones cercanas a  $6 \times 10^6$ , debido a la disminución de la expresión de PBP4; los cuales actúan como trampas de captura de la vancomicina e las capas más externas, haciendo necesario aumentar la concentración del antibiótico (de 3 a 6 veces) para producir el efecto de inhibición, ya que es necesario saturar inicialmente estos monómeros, para que el antibiótico pueda acceder al septo donde se sintetiza la pared bacteriana *de novo*; y (iv) la disminución intracelular de glucosamina 6-fosfato sintetasa a consecuencia de la síntesis constante de monómeros D-Ala-D-Ala, que altera la síntesis de peptidoglicano al generar monómeros alterados (en forma no aminada) que impiden la formación de los enlaces por las PBPs [44, 45].

Adicionalmente, los aislamientos VISA y hVISA presentan una reducción o atenuación de su capacidad virulenta la cual se ha interpretado como una estrategia que permite su diseminación y persistencia clínica al desarrollar procesos infecciosos crónicos al evadir el sistema inmune del huésped. En el análisis del perfil de virulencia de estos aislamientos se ha empleado diversos modelos *in vivo* como infección en ratones, ratas e insectos (*Galleria Mellonella*) en los cuales se observa una reducción de la capacidad virulenta y expresión de factores de virulencia respecto a aislamientos susceptibles a vancomicina (VSSA) [17, 26, 46]. Por ejemplo, en un modelo de sepsis en ratones se observó que, en 14 pares isogénicos, los aislamientos VISA tienen menor capacidad de formar abscesos hepáticos y necrosis que los VSSA. También empleando pares de cepas isogénicas, se asoció a la enzima Stp1 (fosfatasa de serina/treonina) como un nuevo mecanismo en el desarrollo del fenotipo que participa en la biosíntesis de la pared y en la regulación directa de factores de virulencia como superantígenos, modulinas solubles en fenol y la hemolisina [47]. Situación similar se evidenció en un aislamiento VISA perteneciente al clon USA300 en el que se identificaron 239 cambios transcriptómicos asociados a factores de virulencia regulados principalmente por el sistema de tres componentes VraTSR [48].

### **1.3.1 Cambios genómicos asociados a los fenotipos VISA y hVISA**

El mecanismo molecular de la resistencia en aislamientos VISA/hVISA provenientes principalmente de Japón, Corea del Sur y Francia se ha tratado de caracterizar con gran

interés, debido a su naturaleza multifactorial que involucra cambios morfológicos y metabólicos mediados por mutaciones únicas o secuenciales que afectan sistemas reguladores o diferentes genes que juegan un rol muy importante en la fisiología bacteriana [49]. Para mejorar el análisis de los cambios genómicos se han empleado tecnologías de última generación como la secuenciación genómica de alto rendimiento, la cual permite identificar polimorfismos de único nucleótido (SNP) presentes en estos aislamientos que son comparados con pares VSSA, como el par Mu50 (VISA) y la cepa N315 (VSSA) en la cual se identificaron 174 SNP [50]. Sin embargo, estos análisis pueden presentar limitaciones que impiden asociar cada uno de los SNP con el desarrollo del fenotipo ya que no todos pueden ser confirmados experimentalmente por medio de remplazo alélico o complementación [51, 52], y algunos cambios pueden ser propios de cada cepa o su linaje genético ya que no siempre se analizan cepas isogénicas que proviene del mismo paciente durante un tratamiento prolongado, o son cepas obtenidas en el laboratorio por mutagénesis o pasajes continuos con o sin presencia de antibiótico [53, 54]. Una de las series de cepas isogénicas mejor caracterizadas con el propósito de comprender la evolución *in vitro* de la resistencia la conforman las cepas JHI-JH9 recuperadas en Japón (relacionadas genéticamente con Mu50) que representan la transición del fenotipo VSSA a hVISA y VISA, siendo el aislamiento susceptible a vancomicina el JH1 (CIM 1 µg/ml) y el VISA el JH9 (CIM 8 µg/ml); estas han permitido establecer que son múltiples vías las que están involucradas en la disminución de la susceptibilidad a vancomicina. La mayoría de estos cambios se asocian a: (i) síntesis, remodelación e hidrólisis de la pared bacteriana, (ii) cambios en sistemas reguladores, (iii) cambios en genes metabólicos y (iv) genes post-transcripcionales [26].

### 1.3.2 Cambios asociados a la síntesis de la pared bacteriana

La síntesis acelerada de la pared bacteriana y la reducción de la actividad autolítica son causas del engrosamiento de la pared. El gen *atl* codifica para la principal hidrolasa del peptidoglicano en *S. aureus* que actúa como una autolisina bifuncional con un dominio amidasa y uno glucosaminidasa. Atl participa en la división celular, recambio de la pared celular y lisis inducida por antibióticos. Su función se encuentra regulada por el sistema de dos componentes (TCS, por sus siglas en inglés) o reguladores globales como WalKR y mutaciones en este sistema causan reducción en la expresión de Atl y, por ende, una menor actividad autolítica en aislamientos VISA y hVISA [55]. Otra hidrolasa que participa en la síntesis y separación de la pared bacteriana es la *N*-acetilmuramyl-L-alanina amidasa

(Sle1), la cual se identificó con pérdida de su función en la cepa Mu50 a consecuencia de una sustitución en la posición 67. El efecto de este cambio fue verificado con la introducción de los primero 67-aade esta proteína en la cepa N315-IP, causando la drástica disminución de la actividad autolítica y aumentó el grosor de la pared celular [51]. En la Mu50 también se identificó el cambio (E164K) en la proteína MsrR que se adhiere a los ácidos teicoicos reduciendo la carga negativa de estos, contribuyendo así a la resistencia a la vancomicina por repulsión eléctrica a diferentes antibióticos [51].

Otro polímero cargado negativamente que genera un efecto similar, es el ácido lipoteicoico (LTA, por sus siglas en inglés), que se encuentran unidos a la membrana celular por una molécula de diglucosil-diacilglicerol (Glc2-DAG). En la síntesis del LTA, la glucosa 6-fosfato (G6P) se convierte en  $\alpha$ -G1P por acción de PgsA, luego ésta es activa por GtaB para generar UDP-glucosa; YpfP cataliza la adición progresiva de glucosa a diacilglicerol (DAG) a partir de UDP-glucosa para formar el ancla de Glc2-DAG. Aunque la pérdida de función de PgcA, GtaB o YpfP no inhiben la formación de LTA, sí alteran el anclaje y longitud de este cambiando la confirmación de la pared celular, YpfP también interactúan directamente con numerosas proteínas involucradas en la división celular y síntesis de peptidoglicano como FtsA, FtsW, PBP2, PBP4 y DltD contribuyendo a la resistencia de una forma directa o indirecta [56]. En un aislamiento VISA derivado de Mu3 que presenta la eliminación C-terminal de GtaB donde se encuentra ubicado el centro catalítico, se evidenció la pérdida de función de GtaB bloqueando la conversión de G6P a  $\alpha$ -G1P. En general, las mutaciones asociadas a la síntesis y remodelación de peptidoglicano, ácidos teicoicos y lipoteicoicos, pueden contribuir directa o indirectamente a la resistencia a la vancomicina en VISA [56].

### **1.3.3 Cambios asociados a sistemas reguladores**

En estudios previos que pretenden caracterizar el mecanismo de resistencia de los aislamientos hVISA y VISA, se han identificado diversas mutaciones en reguladores transcripcionales o sistemas reguladores globales como *vraTSR*, *graSR* y *walkR*, los cuales controlan la transcripción de cerca de 10% del genoma total de *S. aureus*, lo que los posiciona como actores claves en la resistencia intermedia a vancomicina. Los sistemas reguladores son mecanismos especializados que actúan como un sensor/transductor de señal que le permite a la bacteria monitorear, responder y adaptarse a diversos entornos y condiciones ambientales. También se activan cuando una señal externa producida por el hospedero activa la histidina quinasa del receptor de membrana, lo que conduce a su

autofosforilación y posterior fosforilación del regulador de respuesta para unirse a un motivo de secuencia de ADN específico, lo que da como resultado la expresión del gen diana [57]. En *S. aureus* se han identificado dieciséis sistemas reguladores, siendo WalkR el único esencial para el funcionamiento bacteriano, mientras que los demás se han especializado en diversos procesos como reguladores de virulencia, respuesta a péptidos antimicrobianos y daño de la pared celular, metabolismo de la pared celular, autólisis, respiración, fermentación y metabolismo de nitratos (Tabla 1-1) [58].

**Tabla 1-1. Sistemas regulatorios globales identificados en *S. aureus***

Clasificación funcional	Regulador	Función
Reguladores globales de virulencia	<i>agrCA</i>	Control de detección de quórum de factores de adhesión y virulencia
	<i>saeSR</i>	Regulación de factores de virulencia (toxinas, exoenzimas, etc.)
Respuesta a péptidos antimicrobianos y daño de la pared celular	<i>vraTSR</i>	Resistencia a los antibióticos que afecta la pared celular, biosíntesis de la pared celular
	<i>graRS</i>	AMPs resistencia, crecimiento a pH bajo
	<i>braSR</i>	Resistencia a péptidos antimicrobianos
Metabolismo de la pared celular y autólisis	<i>walRK</i>	Mantenimiento de la pared celular, viabilidad celular
	<i>arlSR</i>	Mecanismos de patogenicidad: autólisis, adhesión, biopelícula
	<i>lytSR</i>	Autólisis, liberación de ADNc, biopelícula
Respiración, fermentación y metabolismo del nitrato	<i>srrBA</i>	Metabolismo de la respiración anaeróbica, crecimiento a baja temperatura
	<i>nreCB</i>	Respuesta a bajo nivel de oxígeno, reducción de nitrato a nitratos a óxido nítrico
	<i>airRS</i>	Respuesta al estrés oxidativo
Metabolismo y señalización de nutrientes	<i>phoRP</i>	Absorción de fosfato y homeostasis
	<i>hptSR</i>	Supervivencia intracelular, absorción de fosfato de hexosa
	<i>tcs7SR</i>	Función no caracterizada
	<i>kdpDE</i>	Regulación de la homeostasis del potasio
	<i>hssRS</i>	Regulación del metabolismo del hemo

### • Sistema regulador WalkR

El sistema regulador WalkR es vital para la supervivencia de *S. aureus* ya que regula múltiples procesos como la síntesis, división y autólisis de la pared bacteriana, algunos factores de virulencia, biopelículas y respuesta al estrés oxidativo. El sistema está conformado por WalkK (sensor histidina kinasa) que es altamente conservado en otras especies de Gram positivos como *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* y *Listeria monocytogenes*, y WalkR que es el regulador de respuesta que posee un dominio de unión

al DNA con repeticiones de hexanucleótidos (5´TGT(A/T)A(A/T/C)-N5-TGT(A/T)A(A/T/C)3´) y un dominio de fosforilación. En aislamientos VISA, se demostró que los transcritos de proteínas que contienen dominio CHAP como *AltA*, *Sle1*, *LytM* son regulados negativamente por *WalkR*. Pero cuando este presenta mutaciones como *WalR-D55E* en el dominio de fosforilación, se activa constantemente el sistema aumentando la capacidad de virulencia, síntesis y grosor de la pared, favoreciendo la resistencia a vancomicina. La presencia de la mutación *Walk-G223D* que reduce la fosforilación de *walkK* en combinación con *GraS-T136I* son suficientes para convertir un aislamiento VSSA en VISA al disminuir la actividad de unión de *WalR* al promotor de *altA*, afecta significativa la autólisis al igual que *Walk-K208R* [59, 60].

La expresión de este sistema regulador no es solo afectada por la presencia de mutaciones sino por la inserción de *IS256*, cuando esta se ubica en la región no traducida 5´-UTR de *walkR*, reduce la expresión de *walkR* en un 50%, aumentando el nivel de resistencia a la vancomicina [61], efecto confirmado al revertir el fenotipo de una VISA a VSSA al eliminar esta secuencia de inserción. Pero cuando la *IS256* se ubica en el promotor de *walkR*, el efecto es inverso ya que potencializa el promotor aumentando los niveles de transcripción de *walkR*, reduciendo la resistencia a la vancomicina en aislamientos VISA (*SA137/93A*) [62, 63]. Estos datos confirman que la reducción de la expresión de *walkR* induce el fenotipo VISA.

### • Sistema regulador *VraTSR*

El sistema *VraTSR* (vancomycin resistance associated sensor/regulator) es un sistema de tres componentes conformado por histidina quinasa *VraS*, el regulador de respuesta *VraR*, y *VraT* (anteriormente llamado *YvqF*) que es el regulador negativo del operón. Este sistema regula positivamente la síntesis de la pared bacteriana ya que modula el denominado "estímulo de estrés de la pared celular" que es conformado por cerca de 46 genes entre los que se encuentran *pbpB*, *murZ*, *tarA*, *lcpC*, *sgtB* y *fntA* que codifican proteínas de biosíntesis de la pared celular y algunas vías metabólicas que le permite responder a condiciones estresantes como la presencia de antibióticos glicopéptidos [64]. En aislamientos VISA se presenta un incremento de la expresión de *VraTSR* aumentando la síntesis de la pared [65], la cual se asocia con la presencia de mutaciones *VraS-I5N*, *VraS-S329L*, *VraS-L114S-D242G* y *VraT-Y220C* identificadas en *Mu50* (VISA). En cepas isogénicas pertenecientes a *USA300-ST8*, la mutación *VraT-Y220C* media la resistencia a

vancomicina por pérdida de la función de este gen que actúa como un regulador negativo, mientras que la reversión del fenotipo VISA a VSSA se puede obtener por la terminación prematura de *VraS* en el aminoácido 234 que genera la pérdida del dominio de histidina quinasa [48].

- **Sistema regulador GraSR**

Este es un sistema TCS asociado a la resistencia a glicopéptidos, modula positivamente la biosíntesis de la pared celular y participa en la regulación de la patogénesis de *S. aureus* al controlar la expresión de genes de virulencia que incluyen toxinas, adhesinas, y exoproteínas [66]. Las proteínas GraSR interactúan con GraX y el transportador *VraFG*, para formar un sistema de cinco componentes que causa resistencia a los péptidos antimicrobianos catiónicos (CAMP) [67].

Esta resistencia a los CAMP está mediada por la d-alanilación de los ácidos teicoicos de la pared celular por las enzimas *dltABCD* y la lisilación dependiente de *MprF* de fospatidilglicerol, los cuales son regulados por GraR una vez se auto-dimerizan tras la fosforilación por GraS en el residuo D51, lo que permite unirse a los promotores de *vraFG*, *dltABCD* y *mprF* e iniciar su transcripción. La eliminación de GraSR en aislamientos VISA causa sensibilidad a vancomicina, incrementa la autólisis y la carga negativa de la superficie celular. En la cepa Mu50 se identificó la sustitución GraR-N197S que en presencia de RpoB-H481Y genera en la cepa hVISA Mu3 niveles de resistencia similares a los de Mu50 [68], al igual que la combinación de GraS-T136I y WalK-G223D. La mutación GraS-T136I también puede aumentar los niveles de resistencia a la vancomicina, aunque por sí sola no es suficiente para convertir VSSA en VISA [12, 17].

- **Sistema accesorio Regulador (Agr)**

El sistema *agr* (*accessory gen regulator*) es un sistema de quorum-sensing que durante la transición de la fase de crecimiento exponencial a estacionaria regula la expresión de aproximadamente 34 proteínas de superficie y toxinas secretadas [69]. El locus de *agr* está conformado por dos unidades transcripcionales divergentes que son controladas por los promotores P2 (RNA II) y P3 (RNA III). El P2 regula el operón *agrBDCA* que se activa al detectar una concentración umbral del péptido autoinductor maduro (PIA), que se encuentra en el espacio extracelular y ha sido procesado proteolíticamente por la

peptidasa de membrana AgrB, el cual es detectado por AgrC que se autofosforila y transmite la señal al receptor de respuesta AgrA que posteriormente regula la transcripción de P2 y luego a P3. La activación de P3-RNA III codifica todos los componentes del sistema *agr*, en un ciclo de retroalimentación positiva y factores de virulencia como delta-hemolisina, alfa toxina, lipasa, exoproteasa, endotoxinas y otros genes relacionados con la síntesis de la pared bacteriana e inhibe la expresión de otras proteínas de superficie como proteína A, permeasa y coagulasa [70]. En aislamientos VISA se han identificado frecuentemente mutaciones en *agrCA* o se ha descrito la disfunción de *agr* a consecuencia de la presencia de *agrC* truncado, disminuyendo la producción de hemolisina (Hla) y atenuación del perfil de virulencia *in vivo* [71].

- **RpoB**

El gen *rpoB* codifica para la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa, aunque no es un regulador global es una enzima fundamental para la transcripción; mutaciones en este gen llevan a cambios en la actividad y alteración drástica en el perfil transcripcional de aislamientos VISA. La sustitución más estudiada en RpoB es H481Y identificada en la cepa VISA Mu50 y por medio de análisis de remplazo alélico se confirmó que es responsable de la generación del fenotipo VISA, resistencia a péptidos antimicrobianos y atenuación de la virulencia en un modelo de bacteriemia murino. Otras mutaciones identificadas en RpoB (N967I y R644H), RpoC o RpoD han sido reportadas en aislamientos VISA y se consideran "variaciones regulatorias" que participan en el desarrollo de resistencia intermedia mediante cambios metabólicos y fisiológicos en las células [26, 68].

### **1.3.4 Mutaciones en genes implicados en cambios transcripcionales**

Aparte del control transcripcional, los procesos de fosforilación y degradación de proteínas son mecanismos de regulación ampliamente empleados por las bacterias en el metabolismo de nutrientes. La fosforilación reversible y la desfosforilación de proteínas por Stk1/Stp1 participan en diversos procesos celulares de *S. aureus*, al igual que la proteasa ClpP que se encarga de la proteólisis intracelular, regulando la respuesta al estrés, cambios del metabolismo y síntesis de la pared celular, los cuales se han visto afectados en aislamientos con resistencia intermedia a vancomicina (VISA).

La proteína de membrana *Stk1* y la citosólica *Stp1* forman un sistema de Ser/Thr quinasa/fosfatasa que regulan la fosforilación reversible de un sustrato. *Stk1* posee un dominio N-terminal con actividad quinasa, mientras que el dominio C-terminal tiene tres dominios de proteína de unión a la penicilina y serina/treonina asociada a quinasa (PASTA), que responde a señales de la pared celular como el muropéptido [72]. La eliminación de *stk1*, *stp1* o ambos, influye en la estructura de la pared celular y la susceptibilidad a algunos antibióticos. Una cepa mutante en la que se eliminó *stp1* mostró engrosamiento de la pared celular, mayor resistencia a la lisostafina y avirulencia [73]. En cambio, una mutante de *stk1* aumentó su virulencia respecto a la cepa parental en un modelo murino de infección [47]. En aislamientos VISA o en aislamientos con disminución de la susceptibilidad a la teicoplanina, la pérdida de la función *stp1* mediante la eliminación de *stp1* o por un codón de parada prematuro dado por la inserción de dos aminoácidos en el dominio de unión de metal, aumentó la resistencia a la vancomicina y teicoplanina; por el contrario, se observó una reducción de la resistencia cuando la cepa fue complementada nuevamente con una copia de *Stp1* [74].

El análisis del transcriptoma de cepas con delección de *stk1*, reveló que *Stk1* puede regular diversos genes implicados en la biosíntesis de nucleótidos, metabolismo de la pared celular y la autólisis. Por ejemplo *Stk1/Stp1* fosforila a *VraR* en múltiples sitios (T106, T119, T175 y T178) regulando negativamente su dimerización y unión al ADN; también regula la fosforilación de cisteínas en proteínas pertenecientes a reguladores globales de la familia *SarA/MgrA* (*SarA*, *MgrA* y *SarZ*) que participan en la virulencia y resistencia a los antibióticos [75]. En cambio, la fosforilación por *Stk1* en *GraR* (T128, T130 y T149) en el dominio de unión al ADN, aumenta la unión de *GraR* al ADN favoreciendo la expresión del operón *dltABCD* que se encarga de la D-alanilación de ácido teicoico aumentando su carga positiva, lo cual repele antibióticos catiónicos como la vancomicina [76].

En el caso de la proteasa *ClpP*, está flanqueada por varias ATPasas (*ClpC*, *ClpX*, *ClpB* y *ClpL*) con actividad chaperona y determina la especificidad del sustrato. Las ATPasas *ClpP* y *Clp* están involucradas en la respuesta al estrés, virulencia, metabolismo y resistencia a los antibióticos. La eliminación de 144 bp en *clpP* causa la pérdida de la función y en combinación con la delección de aminoácidos *Walk-Q371*, media la resistencia a la vancomicina en aislamientos VISA derivados de laboratorio, al afectar la expresión de varios genes reguladores importantes, como *agr*, *sigB*, *sarT* y *walkR* [77]. A nivel proteico,

varias proteínas son sustrato de ClpC o ClpP como lo son proteínas de síntesis de la pared celular (PBP2, MueC, GlmM, FemA y FemB), autolisinas (Sle1 y Atl) y factores de transcripción (CcpA, HprK, CcpA, RpoB y CodY) [78].

### **1.3.5 Alteraciones en genes implicados en el metabolismo de *S. aureus***

La síntesis de la pared bacteriana y los cambios celulares presentes en los aislamientos con resistencia disminuida a vancomicina consumen gran cantidad de sustratos y energía, por ejemplo, la pared engrosada requiere un aumento en la demanda de precursores de la pared celular y para suplir estos requerimientos se genera un ajuste del metabolismo celular. Las cepas hVISA/VISA presentan abundancia de metabolitos de la vía de la urea, vía de las pentosas fosfato, aumento de síntesis de ácidos grasos y alteración en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) que reduce el crecimiento bacteriano y ala síntesis de aminoácidos [12]. Algunos cambios que afectan estas vías están asociados a enzimas como la formate deshidrogenasa (*fdh2*), que al presentar la mutación Fdh2-A297V en combinación con Sle1(67aa), genera un engrosamiento constitutivo de la pared bacteriana, mientras que la Cmk que participa en la vía de síntesis de pirimidina, al disminuirse lleva a un aumento del UTP que es necesario en la síntesis de UDP-GlcNAc, un intermedio clave del peptidoglicano. Mutaciones en el gen *cmk* en Mu3 (Cmk-A20G y T en la secuencia Shine-Dalgarno) convirtieron este aislamiento hVISA en un aislamiento VISA al aumentar el suministro de precursores de la biosíntesis de pared celular intermedia UDP-GlcNAc y la formación de difosfato de citidina (CDP), necesaria para la síntesis de ADN/ARN y la formación de ácidos teicoicos [54]. Otros precursores de síntesis de la pared celular como la fructosa-1,6-P, glucosa-6-P y fructosa-6-P se ven reducidos en mutantes de *stk1* o *stp1*, en comparación con el tipo salvaje al igual que la fosforilato adenilosuccinato sintasa (PurA) [79, 80].

## **1.4 Identificación del fenotipo hVISA/VISA**

En el año 2006, el Instituto de Estándares Clínicos y Laboratorio (CLSI) redujo los puntos de corte de la CIM para vancomicina en *S. aureus* a  $\leq 2$   $\mu\text{g/mL}$  para aislamientos susceptibles, de 4 - 8  $\mu\text{g/mL}$  para resistencia intermedia y  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$  para los resistentes a vancomicina, con el propósito de aumentar la detección de aislamientos potencialmente hVISA, La detección de este fenotipo es un gran desafío en el laboratorio clínico, ya que

no se dispone actualmente de pruebas fiables y prácticas que se puedan implementar rutinariamente.

Para la identificación de aislamientos VISA se emplean dilución en agar o métodos de E-test que permiten determinar la CIM a vancomicina que debe estar entre 4 - 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [13]. En cambio, en aislamientos hVISA la característica de heterogeneidad se debe a que estos aislamientos presentan una CIM en el rango de susceptibilidad, aunque presentan subpoblaciones VISA en baja frecuencia ( $10^5$  a  $10^6$  UFC/mL) que no logran ser detectadas por los métodos convencionales de susceptibilidad (E-test, microdilución en caldo o agar), debido a que utilizan inóculos bacterianos más bajos ( $10^4$  UFC/mL).[12, 81].

Dada la dificultad para la detección de estos aislamientos, se han propuesto varias estrategias que incluyen el uso de tamizajes en agar suplementado con diferentes concentraciones de antibiótico, como el agar infusión cerebro-corazón (BHIA) suplementado con 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  o 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de vancomicina y agar Mueller Hinton (MHA) enriquecido con sangre y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de teicoplanina, en los cuales se evalúan altos inóculos bacterianos y una incubación prolongada (hasta 48 horas) para mejorar la detección de las subpoblaciones VISA. También, los métodos basados en E-test, se emplean como pruebas de tamizaje para la identificación de este fenotipo, entre ellos se encuentran el E-test GRD (detección de resistencia a glicopéptidos, por sus siglas en inglés) que consiste en utilizar una tirilla que en un extremo tiene diferentes concentraciones de vancomicina y en el otro de teicoplanina, frente a un inóculo bacteriano de 0.5 McFarland en MHA enriquecido con sangre de cordero o caballo al 5%; un resultado de  $\geq 8$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  después de 24 a 48 horas de incubación a  $35^\circ\text{C}$ , se interpreta como positivo. El E-test macrométodo (MET) emplea una tirilla con vancomicina o teicoplanina, con un inóculo alto de 2.0 McFarland en BHIA, y la lectura se interpreta de la misma forma que el GRD [17]. Estos métodos han demostrado tener una mayor sensibilidad ( $\geq 77\%$ ) y especificidad (82-97%) que las pruebas con medio suplementado con antibiótico, pero actualmente no se encuentran recomendados por el CLSI, e implican costos adicionales en el diagnóstico rutinario en laboratorios clínicos [20].

El método considerado la prueba de oro para confirmar el fenotipo hVISA, es el perfil de análisis poblacional/área bajo la curva (PAP/AUC) el cual permite detectar y cuantificar las subpoblaciones resistentes de los aislamientos hVISA al determinar las UFC/mL en diferentes concentraciones de vancomicina. Para ello, a partir de un inóculo bacteriano alto

( $10^7$  UFC/mL) se preparan diluciones en base 10, las cuales se inoculan en agar BHI suplementado con las diferentes concentraciones de vancomicina (0 a 10  $\mu\text{g/mL}$ ), para realizar el recuento de UFC/mL por cada concentración de antibiótico. Los datos obtenidos de las UFC/mL se grafican para calcular la relación entre el AUC de los aislamientos evaluados y la cepa de referencia hVISA (Mu3- ATCC 700698). Los aislamientos con una relación  $<0.9$  son clasificados como susceptibles, los que presentan una relación entre 0.9 y 1.3 como hVISA y los de  $>1.3$  como VISA [12, 82]. Sin embargo, esta metodología es bastante dispendiosa y costosa por el consumo de materiales y tiempo, impidiendo su implementación rutinaria en laboratorios clínicos, lo que dificulta establecer una posible falla terapéutica, su verdadero impacto clínico y la prevalencia real a nivel mundial y en la región [12, 14].

## 1.5 Importancia clínica de los fenotipos hVISA y VISA.

Los fenotipos de resistencia intermedia a vancomicina en *S. aureus* (hVISA y VISA), se identifican en pacientes con antecedentes de infecciones previas por SARM, exposición a vancomicina, presencia de comorbilidades como enfermedades malignas, diabetes, cirugías mayores e insuficiencia renal [83]. También la presencia de infecciones de alta carga bacteriana como endocarditis, infecciones osteoarticulares, abscesos profundos pueden predisponer al desarrollo de infecciones por hVISA durante la falla terapéutica, debido a la gran cantidad de bacterias y a la penetración limitada del antibiótico en estas áreas [15, 30, 84]. Algunos estudios, sugieren que las bajas concentraciones séricas inferior a 10  $\mu\text{g / ml}$  de vancomicina al inicio del tratamiento de infecciones por SARM pueden también favorecer al desarrollo del fenotipo, ya que en un mismo episodio de infección se ha detectado el surgimiento de fenotipo a partir de cepas susceptibles a vancomicina [12].

En algunos estudios se ha identificado que los episodios de bacteriemia causados por hVISA son significativamente más propensos que los causados por VISA a estar asociados con fracaso terapéutico con vancomicina ( $p < 0,001$ ), mayor duración del periodo febril ( $p < 0,001$ ), mayor tiempo para la resolución de la bacteriemia ( $p = 0,002$ ), concentraciones séricas de vancomicina inferiores a  $<10 \mu\text{g / ml}$  en la primera semana de tratamiento ( $p = 0,006$ ) y estancias hospitalarias más prolongadas ( $p = 0,006$ ). En el estudio retrospectivo de casos y controles publicado por Maor *et al.* se reportaron resultados

similares al analizar 27 pacientes con bacteriemia por hVISA y 223 pacientes con infección por SARM –VSSA, encontrando que los pacientes con hVISA presentaron un tiempo de infección más prolongado que los infectados por VSSA con una media de 12 y 2 días respectivamente ( $p=0.005$ ), mayor desarrollo de endocarditis (18.5% vs 3.6% respectivamente) y osteomielitis (25.9% vs 7.2%) [85, 86]

Respecto a la mortalidad a los 30 días no se ha observado una asociación contundente ya que algunos estudios no evidencian un incremento de esta en presencia del fenotipo, por ejemplo, en el análisis de 65 casos de endocarditis realizado entre el 2000 al 2005 se identificó una mortalidad de 42% para hVISA y de 35% para VSSA ( $p=0.59$ ) [86], resultado similar en un estudio de 48 casos de bacteriemia identificadas entre el 2008-2010 que reportó 8.1% de hVISA con 0% de mortalidad [28, 87]. Sin embargo en el meta-análisis reportado por Van-Hal *et al*, que incluyó 22 estudios con datos de mortalidad, detectó una diferencia significativa de la mortalidad asociada al fenotipo hVISA sin importar la fuente de infección ( $p=0.01$ ) [88].

Respecto al incremento de la CIM de vancomicina (1.5 a 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en el rango de susceptibilidad, también se ha observado una asociación con la presencia del fenotipo. En un estudio que analizó 559 aislamientos de SARM, se observó una incidencia de hVISA del 40% cuando la CIM cambió de 1 a 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [89, 90], resultados muy similares a los reportados por la Universidad del Sur de California, en donde 45 pacientes de 63, experimentaron fracaso terapéutico cuando las CIM de vancomicina incremento de 0,5 a 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [91]. En general, es claro la asociación del fenotipo hVISA con el desarrollo de falla terapéuticas y estancias hospitalarias prolongadas, sin embargo, es necesario continuar con la caracterización clínica de estos aislamientos, que ha estado limitada por la dificultad de identificación de fenotipo a nivel de laboratorios clínicos, el diseño de los estudios realizados y población de pacientes analizada.

## 1.6 Epidemiología de los fenotipos hVISA y VISA

El primer aislamiento clínico de *S. aureus* con resistencia intermedia a la vancomicina, conocido como Mu50, fue reportado en Japón en 1997, y el primer aislamiento hVISA, conocido como Mu3, fue identificado en Japón un año antes de un paciente con neumonía por SARM que no respondía al tratamiento a vancomicina [39, 40]. Desde entonces, casos esporádicos de hVISA y VISA se han reportado en diversos países del mundo como

Estados Unidos, China, Reino Unido, Francia, Australia, Turquía, Bélgica, Alemania, Italia, Brasil y Corea del Sur [12, 30], aunque su verdadera prevalencia global no se ha determinado con precisión, debido a la variación en las metodologías no estandarizadas empeladas para la detección del fenotipo o a la ausencia de detección de rutina de hVISA, variación en la interpretación, ubicación geográfica, entorno clínico y poblaciones de pacientes analizadas.

Se han informado datos de prevalencia de hVISA en todo el mundo que varían desde 0 a 73,7%. Un estudio retrospectivo que evaluó aislamientos hVISA durante un período de 22 años en tres Hospitales de Detroit, estableció que la prevalencia aumentó del 2,2% (1986-1993) al 7,6% (1992-2002) y a 8,3% entre 2003 y 2007, mientras que la prevalencia del fenotipo VISA fue solo del 0,93% sin presentar variaciones significativas en los tres periodos evaluados [92]. El aumento de hVISA también se describió en un estudio retrospectivo de Turquía del 1,6% en 1998 al 36% en 2001, aunque esta prevalencia puede estar subestimada debido a que los aislamientos fueron almacenados durante períodos sin la presencia de glicopéptidos, lo que puede ocasionar la pérdida de resistencia [93].

Zhang *et al.* en el 2015 reportó una prevalencia de hVISA de 4.68% antes de 2006, y de 7.01% en el periodo 2010-2014 [94]. Para el caso de VISA, la prevalencia fue de 2.05% y 7.93%, respectivamente. Según los datos obtenidos de un meta-análisis con más de 91 estudios analizados. Respecto a hVISA, se ha reportado una prevalencia general que varía entre 0.2 a 19.5%, encontrando que en Asia es en promedio 6.81%, y en Europa y América es en promedio 5.6 % [94]. Como se observa, los datos de prevalencia de hVISA son muy variables, por ejemplo, en China se registró una prevalencia de 10% entre 2007 y 2011 [26], en Taiwán de 0.7% en 2003 [95], y en Japón de 6.51% entre 2008 y 2011 [96]. En Europa, en Reino Unido se encontró una prevalencia de 2.5% entre 2004 y 2006, mientras que en Italia fue de 19.5% entre 2007 y 2009 [97]. En Norteamérica, en Estados Unidos se reportó una prevalencia de hVISA de 1.2% entre 2000 y 2008 y en 2009 de 0.3%[98].

En América Latina, los datos de prevalencia de hVISA son limitados y se asocian principalmente a reporte de casos esporádicos. Por ejemplo, en Argentina se reportó una prevalencia de 3.3% entre 2009 y 2010 [99], en Brasil de 9.7% entre 2009 y 2012 [100], en Venezuela de 2.8% de 2004 a 2007 [101], y Chile reportó apenas el primer caso de hVISA en el Hospital Clínico Regional de Concepción [102]. Adicionalmente, a partir de un estudio

multicéntrico realizado en cuatro países de la región (Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela) entre 2006- 2008, a partir de 651 aislamientos MRSA, se detectaron 9 (1.4%) aislamientos hVISA empleando E-test (GRD y MET), y se confirmaron tres aislamientos (2 de Perú y 1 de Ecuador) mediante PAP/AUC, lo que corresponde a una prevalencia de 0.46% [8, 103]. La mayoría de infecciones causadas por hVISA y VISA se asocian al ambiente hospitalario, y se han relacionado con diferentes clones pandémicos exitosos. Teniendo en cuenta la tipificación de secuencias multilocus (MLST), se han identificado en aislamientos hVISA, se asocian más frecuentemente al ST239 (58.62%), ST5 (14.45%) y ST72 (3.28%). Para VISA, los ST239 y ST5 también son los más frecuentes, con 27.0% y 22.7%, respectivamente [94]. No obstante, existen algunos reportes de aislamientos VISA con ST8 pertenecientes al clon USA300, el cual es un linaje altamente virulento asociado con infecciones adquiridas en la comunidad y emergente en el hospital [74].

## Capítulo II

## 2. Caracterización de aislamientos SARM con fenotipo hVISA en Latinoamérica.

*Staphylococcus aureus* es una bacteria oportunista que, en presencia de condiciones desfavorables para el hospedero como enfermedades de base o traumatismos, puede iniciar procesos infecciosos en piel y tejidos blandos o sistémicos potencialmente mortales como neumonía necrotizante, endocarditis, bacteriemia y sepsis [104]. En Latinoamérica, la prevalencia general de SARM causante de bacteriemia es del 41%, aunque en países como Brasil, Venezuela, México y Perú, presentan índices de esta infección que superan el 54% [26-28]. Curiosamente, los aislamientos SARM circulantes en la región, presentan una diversidad de linajes genéticos, entre los cuales se destacan aquellos de predominio hospitalario (SARM-AH) pertenecientes principalmente al ST5 (tipo de secuencia) como el clon Chileno/Cordobés presente en Chile, Perú, Argentina y Venezuela, el clon Nueva York/Japón circulante en Brasil, Guatemala y México, mientras que Colombia y Ecuador el 72% de las infecciones causadas por SARM se asocian a clones de origen comunitario (SARM-AC) como USA300-LV (variante latinoamericana del clon USA300) perteneciente al ST8, lo cual es un comportamiento epidemiológico divergente a lo reportado en otras partes del mundo [9].

Los clones de circulación hospitalaria, se caracterizan por presentar co-resistencia a más de cuatro familias de antibióticos, limitando el éxito terapéutico en estas infecciones. Actualmente, en los países latinoamericanos, la vancomicina es uno de los tratamientos de última línea para el control de las infecciones complicadas por SARM al considerarla como un antibiótico eficiente, de bajo costo y de fácil disponibilidad en las instituciones hospitalarias [105-107]. Sin embargo, en los últimos años se ha cuestionado su efectividad debido al aumento de reportes de fallas terapéuticas y a la emergencia de bacterias resistentes (VRSA) o con disminución de la susceptibilidad a este antibiótico, asociada al fenotipo VISA y de heteroresistencia (hVISA), en estos últimos solo una subpoblación presenta resistencia intermedia al antibiótico [40, 108]. El fenotipo VISA y

hVISA se ha caracterizado parcialmente, lo que limitando el completo entendimiento de su mecanismo de resistencia. Esto se debe en parte a su amplia variedad de procesos biológicos que intervienen y a la dificultad en la identificación de la heteroresistencia en los laboratorios clínicos, debido a que las pruebas microbiológicas estándar (CIM y difusión en disco) que se realizan rutinariamente, emplean inóculos que no permite la identificación de las subpoblaciones con resistencia intermedia a la vancomicina presentes en recuentos bajos ( $10^5$  a  $10^6$  UFC/mL) causando que sean clasificados como susceptibles a este antibiótico [12, 81].

Debido a esta dificultad en su identificación, se han propuesto diversas metodologías como las basadas en agares suplementados con glicopéptidos (vancomicina o teicoplanina), las cuales han presentado falsos positivos (especificidad 53% -65%) [12], E-test macrométodo (MET) y GRD que son pruebas basadas en E-test, que a pesar de presentar mayor sensibilidad y especificidad en la detección de hVISA, su implementación en los laboratorios clínicos es muy limitada porque incrementan considerablemente los costos de identificación y hasta la fecha su metodología no se ha estandarizado bajo las recomendaciones del CLSI [13, 109]. Situación similar se presenta el perfil de análisis poblacional/área bajo la curva (PAP / AUC) que es la prueba de oro para la detección del fenotipo ya que detecta y cuantifica las subpoblaciones que crecen en las concentraciones más altas de vancomicina, pero, este es un proceso de fácil implementación para el diagnóstico rutinario debido a su metodología engorrosa y altos costos.

La falta de detección del fenotipo hVISA además de no permitir la predicción de un fracaso terapéutico, limita la estimación precisa de su impacto clínico y prevalencia. Algunos estudios han demostrado que las infecciones de alto inóculo causadas por hVISA incrementan 2.7 veces el riesgo de presentar falla terapéutica respecto a los aislamientos susceptibles a vancomicina (VSSA), también presentan mayor riesgo de desarrollar infecciones persistentes e incrementan los costos de tratamiento debido a estancias hospitalarias prolongadas [89]. Respecto a la prevalencia, no se conoce con certeza, aunque, se han reportado prevalencias desde 0.2% hasta el 29.2% dependiendo del diseño del estudio, área geográfica, tipo de infección, método de detección empleado entre otros criterios [89, 94]. En Latinoamérica, por ejemplo, los datos de prevalencia de hVISA son aún más limitados y se asocian a informes de casos esporádicos en países

como Brasil y Argentina [99, 100, 102]. Aunque, un estudio realizado entre 2006 y 2008 en cuatro países de la región, en donde se analizaron 651 aislamientos de SARM se identificó una prevalencia de hVISA del 1.4%, en aislamientos provenientes de Colombia, Ecuador y Perú empleando para su identificación GRD y MET [8, 103], lo cual puso en evidencia una mayor circulación de este fenotipo en la región, donde la vancomicina es ampliamente empleada en el tratamiento de infecciones complicadas por SARM. Esta situación sumada a que los aislamientos SARM circulantes en Latinoamérica presentan una epidemiología molecular específica, motivo la necesidad de establecer la prevalencia y el perfil molecular de los aislamientos hVISA locales ya que sus características genética y molecular podrían variar significativamente respecto a las reportadas en otras regiones del mundo debido a la diversidad clonal que presenta SARM.

## 2.1 Materiales y métodos

### 2.2.1 Colección de aislamientos clínicos

Para la determinación de la prevalencia y las características moleculares de los aislamientos SARM con fenotipo hVISA de circulación en la región, se analizaron 538 aislamientos SARM recolectados y caracterizados por la Unidad de Genética y Resistencia Antimicrobiana (UGRA) de la Universidad El Bosque, en un estudio prospectivo de bacteriemias causadas por *S. aureus* en América Latina, realizado entre 2011 y 2014, en el cual se incluyeron los aislamientos recuperados de pacientes adultos de 24 instituciones hospitalarias en 9 países (Argentina, Brasil, Colombia, Chile, Ecuador, Guatemala, México, Perú y Venezuela) [9].

A los 538 aislamientos SARM (CIM<sub>90</sub> a vancomicina de 1 µg/mL), inicialmente se les realizó un tamizaje empleando agares enriquecidos y suplementados con glicopéptidos; para identificar aislamientos VRSA se empleó BHIA +6 µg/mL siguiendo la recomendación del CLSI [13], para el fenotipo VISA se empleó BHIA +4 µg/mL de vancomicina inoculado con 10 µL de una suspensión bacteriana correspondiente a 0.5 MacFarland, y MHA +5 µg/mL de teicoplanina inoculado con 10µL de una suspensión correspondiente a 2.0 de MacFarland, los cuales fueron incubados por 48 horas a 37°C [81]. Los aislamientos positivos para alguno de estos tamizajes fueron posteriormente evaluados por métodos basados en E-test, como GRD y E-test macrométodo (MET), que tienen mayor sensibilidad ( $\geq 77\%$ ) y especificidad (82-97%) para la detección del

fenotipo hVISA que las pruebas de tamizaje basadas en agares suplementados [12, 110]. La prueba de GRD se realizó inoculando masivamente una suspensión estándar de 0.5 MacFarland en MHA suplementado con 5% de sangre de cordero y empleando una tira de E-test doble con vancomicina/teicoplanina (0.5-32/0.5-32 mg/L) (BioMerieux® y Liofilchem®), mientras que para MET se inoculó 200 µL de una suspensión bacteriana 2.0 MacFarland en BHIA, empleando tiras de E-test individuales (BioMerieux®) de vancomicina y teicoplanina. El resultado positivo para estos métodos se consideró como la presencia de algún crecimiento bacteriano a concentraciones  $\geq 8$  mg/L para alguno de los antibióticos, una vez validada la prueba con las cepas control: Mu3 (hVISA-ST5), Mu50 (VISA-ST5), ATCC 29213 (SASM-VSSA) y N315 (VSSA-ST5). En este estudio, los aislamientos positivos para los tamizajes en agar (BHIA +4 µg/mL y MHA +5 µg/mL de teicoplanina) y las pruebas basadas en E-test (GRD y MET) fueron clasificados como hVISA.

### 2.2.2 Perfil de análisis poblacional/área bajo la curva (PAP/AUC)

A los aislamientos hVISA identificados por GRD y MET se les realizó el perfil de análisis poblacional/área bajo la curva (PAP/AUC), empleando la técnica de microdilución, que es un método que detecta y cuantifica las subpoblaciones que crecen en concentraciones altas de vancomicina en comparación con la cepa de referencia hVISA Mu3 [14, 111]. Para ellos se parte de un inóculo bacteriano ajustado a  $10^7$  UFC/mL en solución salina al 0.89%, se prepararon diluciones seriadas en base 10 ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ) y de cada una se inocularon cuatro gotas de 20 µL cada una, en placas de BHIA suplementadas con concentraciones crecientes de vancomicina (0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 10 µg/mL). Después de la incubación a 37°C por 48 h se realizó un recuento manual de las unidades formadoras de colonias ( $\log_{10}$ UFC/mL) por cada concentración de vancomicina. Se realizaron tres replicas biológicas para cada uno de los aislamientos y las cepas control; ATCC 29213 (VSSA), Mu3 (hVISA) y Mu50 (VISA).

Para la determinación del área bajo la curva (AUC) se realizó según la descripción e interpretación de Wootton *et al.* [14]. La cual fue empleada para calcular la relación PAP/AUC de cada aislamiento respecto a la cepa Mu3, para ello se dividió el valor obtenido de PAP/AUC de cada aislamiento sobre el valor AUC del control (Mu3). La interpretación de resultados clasifica a un aislamiento como VSSA si su relación de PAP/AUC  $< 0.9$ , hVISA si la relación esta entre 0.9 y 1.3 y hVISA, los que presentan una

relación >1.3.

### 2.2.3 Secuenciación genómica y ensamblajes

La extracción del ADN de los aislamientos hVISA identificados por GRD y MET se realizó a partir de cultivos de 14 a 16 horas de incubación en caldo BHI y empleando el kit comercial DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen) según las recomendaciones del fabricante, con un tratamiento previo con buffer lisis y lisostafina (5mg/mL) por 30 minutos. La integridad del ADN se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, y se cuantificó por fluorometría con el equipo Qubit 2.0 (Invitrogen), empleando el kit Qubit dsDNA BR (Thermo Fisher Scientific Inc). A partir del DNA extraído, se prepararon las librerías genómicas empleando el kit comercial Nextera XT DNA sample preparation (Illumina®, San Diego CA), según las instrucciones del fabricante. En resumen, se realizó el marcaje con adaptadores Illumina de secuencias de DNA específicas fragmentadas (tagmentación), que posteriormente fueron amplificadas mediante PCR, las librerías obtenidas fueron limpiadas usando perlas magnéticas Ampure XP (Angencourt Bioscience corporation, MA, USA). La cuantificación de las librerías se hizo por Qubit 2.0 (Invitrogen), utilizando el estuche comercial Qubit HS- DNA (Thermo Fisher Scientific Inc), y se utilizó el bioanalizador de ácidos nucleicos Agilent 2100 Bioanalyzer con el High sensitivity DNA chip para determinar la distribución y tamaño de los fragmentos de DNA. Después, cada librería fue ajustada a una concentración de 4nM y se elaboraron pools de librerías para realizar la secuenciación que se llevó a cabo en el secuenciador MiSeq o HiSeq (Illumina Inc. San Diego CA), para obtener lecturas pareadas (150 PE, 250 PE o 300 PE). Las lecturas obtenidas fueron depuradas removiendo los adaptadores y las secuencias de baja calidad (empleando un valor *Phred* de 30 y probabilidad de error de 0.001) empleando Trimmomatic v0.36 [112]. A partir de estas secuencias (*reads*), se realizaron los ensamblajes *de novo* descartando los contigs cortos (<300pb), empleando los parámetros por defecto por el programa Spades v13.3 [113]. En la tabla de Anexo A se indican las características de los ensamblajes obtenidos y el código de BioProjects para el acceso en NCBI de para cada uno de los aislamientos. Adicionalmente, en algunos análisis comparativos del estudio se incluyeron 305 genomas de SARM susceptibles a vancomicinas clasificados por los tamizajes basados en agar, los cuales pertenecen a la misma vigilancia y fueron secuenciados por el grupo UGRA y los genomas de las cepas de referencias se descargaron de NCBI con los siguientes códigos de acceso del GenBank: FPR3757 (NC\_007793.1), Mu3 (NC\_009782.1), Mu50

(NC\_002758.2) y ATCC29213 (LHUS 02000001.1), JKD6009 (NZ\_LR027876.1), TW20 (NC\_017331) y JKD6008 (NC\_017341.1) y N315 (NC\_002745.2) Anexo B.

## 2.2.4 Caracterización de aislamientos hVISA

La caracterización molecular de los aislamientos hVISA se realizó por medio de análisis *in silico*, en el cual se determinó el tipo de SCC*mec* usando los iniciadores previamente reportados [114, 115]; el tipo de *agr* se determinó por medio de alineamientos con las secuencias de referencia reportadas para cada tipo de *agr*: *agr-I* (X52543.1), *agr-II* (AF001782.1), *agr-III* (AF001783.1) y *agr-IV* (AF288215.1) empleando BLASTN (*Basic Local Alignment Search Tool*) y la PCR *in silico* empleando los iniciadores reportados por Gilot *et al.* [70] y Strommenge *et al.* [116]. El tipo de secuencia (ST), se determinó mediante la tipificación de secuencias multilocus (MLST por sus siglas en inglés) en la cual se amplifican siete genes esenciales: *arcC* (Carbonato quinasa), *aroE* (Shikimate deshidrogenasa), *glpF* (glicerol quinasa), *gmk* (Guanilato quinasa), *pta* (Fosfato acetiltransferasa), *tpi* (Triosefosfato isomerasa), *yqi* (Acetil coenzima A acetiltransferasa) [117]. El resistoma se identificó empleando el repositorio de determinantes de resistencia adquiridos de ResFinder 4.0 disponible en el servidor del Centro de Epidemiología Genómica de Dinamarca (<http://www.genomicepidemiology.org/>) [118], el cual fue complementado con la búsqueda de mutaciones de resistencia a fluoroquinolonas presentes en GyrA (S84L, A457T, N495D E887D), GyrB (Q66K), GrlA (S80F, M1V, Y410F) y GrlB (S80F, M1V, Y410F), rifampicina: *rpoB* (M1L, A326V, D471E) y linezolid (G2576T). Los resultados en este resistoma se correlacionaron con el perfil de resistencia obtenido al determinar las CIM para antibióticos 12 antibióticos (oxacilina, gentamicina, rifampicina, eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina, clindamicina, cloranfenicol, trimetoprim–sulfametoxazol, vancomicina y daptomicina) por medio de microdilución en caldo [9]. Finalmente, el viruloma se determinó realizando por medio de BLASTX en el cual se alinearon las secuencias de los genomas con las secuencias de referencia de los factores de virulencia disponibles en la base de datos central de VFDB (disponible en <http://www.mgc.ac.cn/VFs/>), que en su última actualización de febrero del 2021 contiene 3.223 genes, de los cuales 728 genes corresponden a factores de virulencia presentes en el género de *Staphylococcus* spp [119]. Aquellos hits obtenidos que presentaron una cobertura mayor o igual al 80% y una identidad mayor o igual 95% fueron seleccionados como positivos, indicando la presencia de las secuencias buscadas.

## 2.2.5 Relación filogenética

La reconstrucción filogenética se basó en la identificación de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP) en genoma central (*core genome*) (genes presentes en el 95% de los genomas incluidos). El *core genome* se obtuvo con la herramienta Roary v.3.0. Cada uno de los grupos ortólogos identificados fue alineado con MUSCLE [120] y posteriormente concatenados. Los SNP fueron obtenidos a partir de los grupos ortólogos concatenados empleando la herramienta SNP-Sites [121], para realizar la reconstrucción bayesiana utilizando la plataforma BEASTv2.6.3 [122] utilizando un modelo GTR + gamma, con una población constante, reloj estricto y 100 millones de pasos. El árbol de clados de máxima credibilidad se obtuvo luego de descartar los primeros 70 millones de pasos (para obtener valores de tamaño de muestra efectiva mayor a 200), una probabilidad 0.5. Adicionalmente, se realizó un análisis filogenético ajustado solo a los aislamientos pertenecientes al Complejo Clonal 5 (CC5).

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Prevalencia del fenotipo hVISA en aislamientos SARM en Latinoamérica.

En el desarrollo de este estudio se analizaron 538 aislamientos SARM recuperados en un estudio previo de bacteriemia en pacientes adultos en nueve países de Latinoamérica entre el periodo comprendido entre el 2011 al 2014. En la caracterización microbiológica de resistencia o disminución de la susceptibilidad a vancomicina de estos aislamientos, se evaluaron por pruebas de tamizaje en agar, inicialmente, se empleó el tamizaje de BHIA +6 µg/mL recomendado por el CLSI para la identificación de aislamientos resistentes a vancomicina (VRSA), con el cual no se identificó la presencia de ningún aislamiento resistente, resultado que era de esperar ya que los aislamientos presentan una MIC<sub>90</sub> de vancomicina de 1 µg/mL.

Para la identificación de la susceptibilidad disminuida a vancomicina se emplearon los tamizajes de BHIA +4 µg/mL de VAN y MHA +5 µg/mL TEI, encontrando que 230 (42.7%) de los aislamientos SARM fueron positivos para alguno de los dos tamizajes, sin embargo, es importante resaltar que estas metodologías pueden presentar falsos positivos en la identificación de aislamientos VISA y hVISA, como se ha indicado en varios estudios [109]. Debido a esto, los 230 aislamientos positivos para estos tamizajes

en agar se evaluaron por métodos basados en E-test como GRD y MET que presentan mayor sensibilidad (57%) y especificidad (97%) para la identificación del fenotipo hVISA, encontrando que de los 230 aislamientos, 49 (9%) fueron positivos para GRD y 30 aislamientos fueron positivos para GRD y MET, clasificando a estos 30 aislamientos como hVISA por estas técnicas basadas en E-test, los cuales fueron incluidos en todos los análisis posteriores.

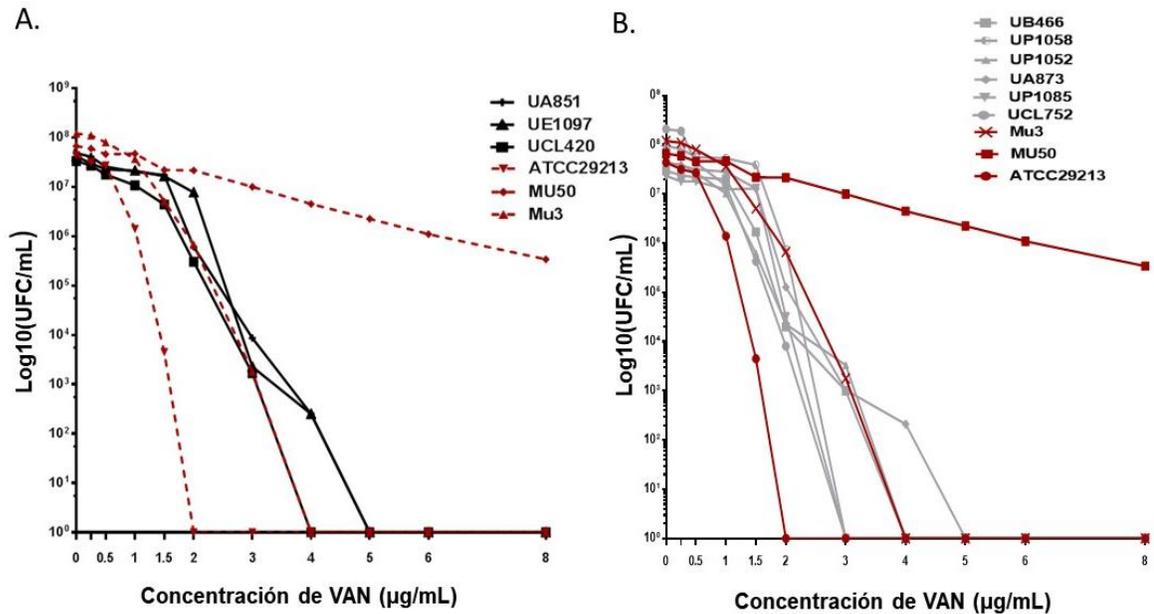
La identificación de estos 30 aislamientos hVISA por metodologías como MET y GRD corresponde a una prevalencia del fenotipo del 5.6% del total de SARM analizados, presentando la mayor prevalencia en Perú con 16 (19.0%) aislamientos, seguido de Chile con 9 (12.2%). En países como Brasil, Argentina y Ecuador la prevalencia fue  $\leq 5\%$ , mientras que México, Guatemala, Venezuela y Colombia no se detectó la presencia del fenotipo. En la tabla 2-1 se observa la distribución de la prevalencia del fenotipo por pruebas basadas en E-test en cada uno de los países participantes.

**Tabla 2-1 Prevalencia de hVISA en Latinoamérica (2011-2014) por GRD y MET.**

País	N° de hospitales	N° SARM	Prevalencia por GRD y MET No (%)
Brasil	3	126	1 (0.8)
Perú	3	84	16 (19.0)
Chile	3	74	9 (12.2)
Guatemala	2	74	0 (0)
Argentina	3	60	3 (5.0)
Colombia	3	41	0 (0)
Venezuela	3	33	0 (0)
Ecuador	3	29	1 (3.4)
México	1	17	0 (0)
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>538</b>	<b>30 (5.6)</b>

Los 30 aislamientos hVISA identificados por GRD y MET, adicionalmente se evaluaron por la metodología PAP/AUC (Gold estándar para la identificación de hVISA), encontrando que tres aislamientos presentaron una relación con Mu3 entre 0.9 a 1.3 clasificándolos como hVISA por este método. En la figura 2-1, panel A, se observa el perfil de análisis poblacional de estos tres aislamientos nombrados como UE1097, UA851 y UCL420 que presentaron una relación de PAP/AUC 1.07, 1.04 y 1.03 respectivamente y las cepas de referencia cepa Mu3 (hVISA), ATCC29213 (VSSA) y Mu50 (VISA), estas últimas con una relación de PAP/AUC de 0.42 y 2.5. La prevalencia de los aislamientos hVISA por PAP/AUC corresponde al 0,56% de los 538 SARM

incluidos en el estudio, recuperados de instituciones hospitalarias en Argentina (AU851), Chile (UCL420) y Ecuador (UE1097).



**Figura 2-1 Perfil de análisis poblacional de aislamientos de SARM usando vancomicina.** Se representa el recuento de UFC/mL a concentraciones crecientes de vancomicina. Los resultados corresponden al promedio de tres replicas experimentales independientes. **A)** Aislamientos confirmados como hVISA mediante PAP/AUC con una relación AUC > 0.9. La relación de PAP/AUC para la ATCC29213 es de 0.42 y Mu50 de 2.5. **B)** Aislamientos con relación PAP/AUC cercana al punto de corte hVISA 0.75 a 0.89. Las cepas control empeladas fueron: ATCC29213 (VSSA), Mu3 (hVISA) y Mu50 (VISA) y son representadas en color rojo.

Adicionalmente, fue interesante observar que algunos aislamientos no clasificados como hVISA por esta metodología por presentar radios inferiores a 0.9, presentaban subpoblaciones bastante comparables a la cepa de referencia Mu3. En la figura 2-1, panel B se observar el perfil de análisis poblacional de 6 (1.1%) aislamientos que fueron clasificados por esta metodología como VSSA, pero presentan una relación PAP/AUC entre 0.75 a 0.89. Estos aislamientos recuperados de Chile, Perú, Brasil y Argentina presentan recuentos alto de UFC (superiores a  $1 \times 10^7$  UFC/mL) en la concentración de 1,5 µg/mL de vancomicina, lo cual evidencia la presencia de subpoblaciones con disminución de la susceptibilidad a este antibiótico, pero sin alcanzar la relación correspondiente al rango para hVISA. En la tabla 2-2 se discriminan las características de los 30 aislamientos hVISA en la que se evidencia que los aislamientos positivos por GRD y MET presentaron relación de PAP/AUC más altas que la cepa susceptible a vancomicina N315 que tiene una relación de 0.35, aunque la cepa con relación PAP/AUC

más cercana a la N315 fue UP1088 que presenta una relación de 0.46.

**Tabla 2-2 Relación PAP/AUC de los aislamientos hVISA**

Aislamiento	Clon	País	PAP/AUC	Fenotipo PAP/AUC
UE1097	Brasilero	Ecuador	1,07	hVISA
UA851	Chileno/Cordobés	Argentina	1,04	hVISA
UCL420	Chileno/Cordobés	Chile	1,03	hVISA
Mu3	NY/Japón	Japón	1	hVISA
UB466	NY/Japón	Brasil	0,89	VSSA
UP1058	Chileno/Cordobés	Perú	0,88	VSSA
UP1052	Chileno/Cordobés	Perú	0,88	VSSA
UA873	Chileno/Cordobés	Argentina	0,87	VSSA
UP1085	Chileno/Cordobés	Perú	0,78	VSSA
UCL752	Chileno/Cordobés	Chile	0,75	VSSA
UP1013	Chileno/Cordobés	Perú	0,74	VSSA
UP89	Chileno/Cordobés	Perú	0,73	VSSA
UA859	Chileno/Cordobés	Argentina	0,7	VSSA
UP686	Chileno/Cordobés	Perú	0,7	VSSA
UP1014	Chileno/Cordobés	Perú	0,68	VSSA
UP120	Chileno/Cordobés	Perú	0,67	VSSA
UCL381	Chileno/Cordobés	Chile	0,67	VSSA
UP977	Chileno/Cordobés	Perú	0,66	VSSA
UP131	Chileno/Cordobés	Perú	0,66	VSSA
UP1161	Chileno/Cordobés	Perú	0,66	VSSA
UCL395	Chileno/Cordobés	Chile	0,65	VSSA
UCL361	Chileno/Cordobés	Chile	0,65	VSSA
UP106	Chileno/Cordobés	Perú	0,64	VSSA
UCL436	Chileno/Cordobés	Chile	0,61	VSSA
UP1049	Chileno/Cordobés	Perú	0,56	VSSA
UP1057	Chileno/Cordobés	Perú	0,55	VSSA
UCL412	Chileno/Cordobés	Chile	0,53	VSSA
UP1081	Chileno/Cordobés	Perú	0,52	VSSA
UCL432	Chileno/Cordobés	Chile	0,52	VSSA
UCL461	Chileno/Cordobés	Chile	0,52	VSSA
UP1088	Chileno/Cordobés	Perú	0,46	VSSA
N315	NY/Japón	Japón	0,35	VSSA

Aislamientos sombreados en amarillo corresponden a hVISA por PAP/AUC y en color azul los VSSA que presentan las relaciones de PAP/AUC más altas.

### 2.2.2. Características moleculares y genómicas de los aislamientos hVISA en Latinoamérica

Se realizó la caracterización molecular de los 30 aislamientos hVISA clasificados por GRD y MET, los cuales en su totalidad fueron confirmados como SARM, de estos 29(96.6%) pertenecen al complejo clonal 5 (CC5) distribuidos en 28 (93.3%) aislamientos

con tipo de *SCCmec*-I, ST5 y perfil electroforético por PFGE característico del clon Chileno/Cordobés y 1(3.3%) aislamiento *SCCmec*-II, ST5 perteneciente al clon Nueva York/Japón. El aislamiento restante pertenece al CC239 el cual presenta un *SCCmec*-III, perfil de PFGE del clon brasilero y un ST1341 (variante de locus único -SLV- del ST239). Respecto a la tipificación del gen regulador accesorio (*agr*), 20(66.6%) aislamientos presentan *agr* tipo II y 10 (33.4%) *agr* tipo I. Ninguno de los aislamientos presentó la Leucocidina de Pantón-Valentine (PVL), en la tabla 2-3 se registran las características moleculares de estos aislamientos y su relación PAP/AUC.

**Tabla 2-3 Características moleculares de los aislamientos hVISA.**

Aislamiento	País	Año	Clon	<i>SCCmec</i>	ST	<i>Agr</i>
Mu50*	Japón	1997	NY/Japón	II	5	II
UE1097	Ecuador	2013	Brasilero	III	1341	I
UA851	Argentina	2013	Chileno/Cordobés	I	5	II
UCL420	Chile	2012	Chileno/Cordobés	I	5	I
Mu3*	Japón	1997	NY/Japón	II	5	II
UB466	Brasil	2016	NY/Japón	II	5	II
UP1058	Perú	2012	Chileno/Cordobés	I	5	I
UP1052	Perú	2013	Chileno/Cordobés	I	5	II
UA873	Argentina	2013	Chileno/Cordobés	I	5	II
UP1085	Perú	2013	Chileno/Cordobés	I	5	I
UCL752	Chile	2012	Chileno/Cordobés	I	5	II
UP1013	Perú	2013	Chileno/Cordobés	I	5	II
UP89	Perú	2011	Chileno/Cordobés	I	5	II
UA859	Argentina	2013	Chileno/Cordobés	I	5	II
UP686	Perú	2013	Chileno/Cordobés	I	5	I
UP1014	Perú	2013	Chileno/Cordobés	I	5	I
UP120	Perú	2011	Chileno/Cordobés	I	5	II
UCL381	Chile	2012	Chileno/Cordobés	I	5	II
UP977	Perú	2013	Chileno/Cordobés	I	5	I
UP131	Perú	2011	Chileno/Cordobés	I	5	II
UP1161	Perú	2013	Chileno/Cordobés	I	5	II
UCL395	Chile	2013	Chileno/Cordobés	I	5	II
UCL361	Chile	2012	Chileno/Cordobés	I	5	II
UP106	Perú	2011	Chileno/Cordobés	I	5	II
UCL436	Chile	2012	Chileno/Cordobés	I	5	II
UP1049	Perú	2013	Chileno/Cordobés	I	5	I
UP1057	Perú	2013	Chileno/Cordobés	I	5	I
UCL412	Chile	2012	Chileno/Cordobés	I	5	II
Aislamiento	País	Año	Clon	<i>SCCmec</i>	ST	<i>Agr</i>

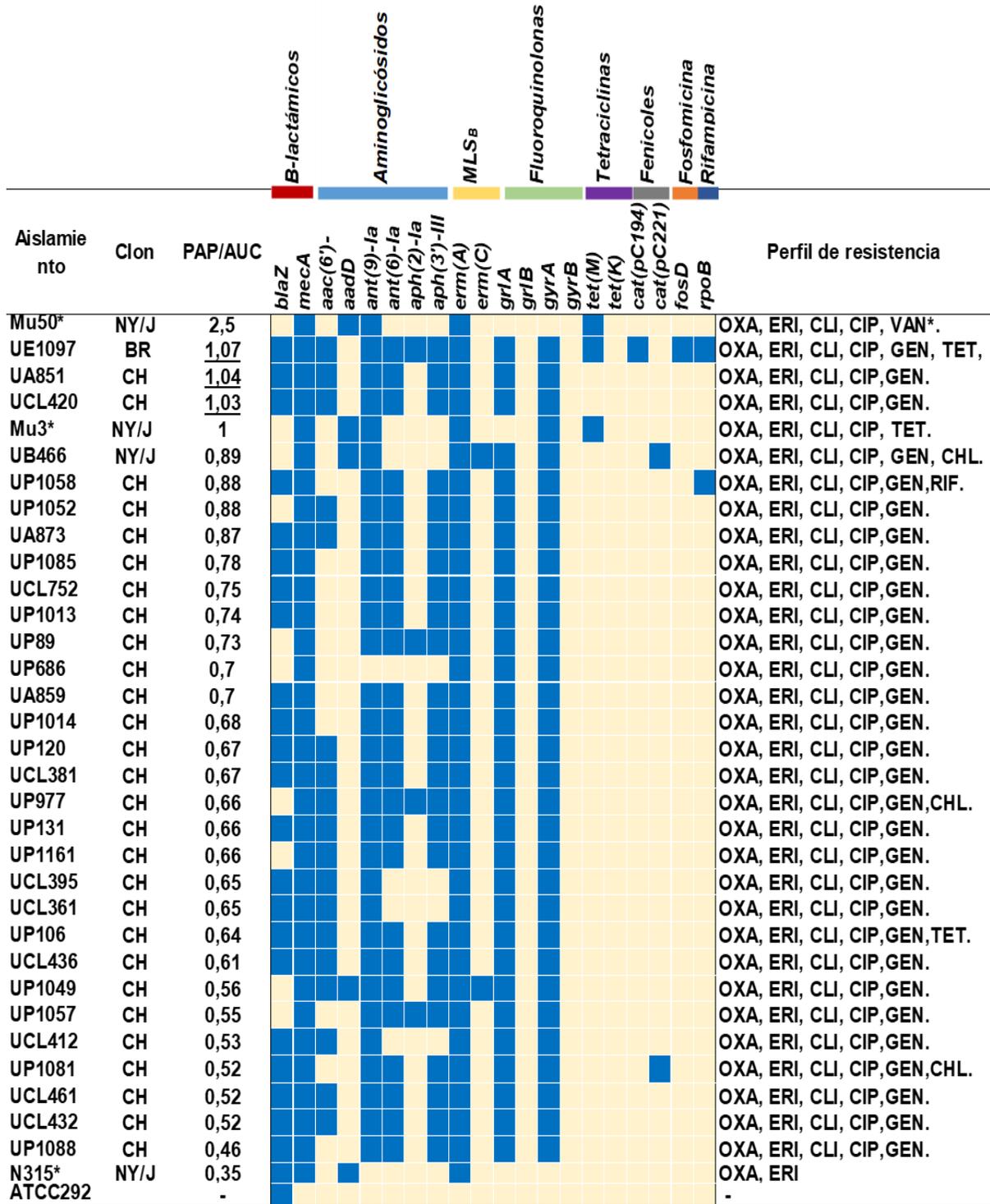
UP1081	Perú	2013	Chileno/Cordobés	I	5	II
UCL432	Chile	2012	Chileno/Cordobés	I	5	II
UCL461	Chile	2012	Chileno/Cordobés	I	5	II
UP1088	Perú	2013	Chileno/Cordobés	I	5	I
N315*	Japón	1982	NY/Japón	II	5	II
ATCC29213*	USA	-	ND	NA	5	II

(\*) representa cepas de referencia.

Debido a la característica de multirresistencia de los aislamientos SARM reportadas en el estudio previo de Arias *et al* [9], en donde se registra que la mayoría de las cepas presentaron altas frecuencia de resistencia a eritromicina (81%), clindamicina (74%) y ciprofloxacina (78%), mientras que para cloranfenicol, tetraciclina, rifampicina y trimetoprim-sulfametoxazol la mayoría fueron susceptibles con resistencia del 15%, 5%, 3% y 2%, respectivamente. Todos los aislamientos fueron sensibles a la minociclina, linezolid y daptomicina (CIM<sub>90</sub> de 0.5 µg/mL). Siendo este último antibiótico una de las opciones terapéuticas para el tratamiento de infecciones complicadas por SARM pero que pueden presentar resistencia cruzada en aislamientos hVISA ya que el engrosamiento de la pared bacteriana puede limitar la penetración del antibiótico a través de esta.

Debido a estas características que quiso ampliar la caracterización del perfil de resistencia, determinando el resistoma de los 30 hVISA, a partir del análisis de sus genomas secuenciados; evaluando la presencia de 2.126 genes de resistencia adquirida, registrados en la base de datos de ResFinder y mutaciones específicas de resistencia a fluoroquinolonas (*gyrA* y *gyrB*, *griA* y *griB*), rifampicina (*rpoB*) y linezolid. Identificando que todos los aislamientos presentan determinantes de resistencia a antibióticos β-lactámicos, aminoglicósidos, MLS<sub>B</sub> (macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B) y fluoroquinolonas, lo que coincide con el perfil de resistencia (oxacilina, eritromicina, clindamicina, ciprofloxacina y gentamicina), característico del clon Chileno/Cordobés (figura 2-2). Sin embargo, un aislamiento presentaro resistencia adicional a rifampicina (UP1058) y tetraciclina (UP106) y dos a cloranfenicol (UP1081 y UP977). El aislamiento asociado al clon brasilero (UE1097) mostró el perfil de resistencia más amplio con resistencia adicional a tetraciclina, cloranfenicol, rifampicina y trimetoprim-sulfametoxazol. A continuación, se describen los determinantes de resistencia identificados por familia de antibióticos.

- **$\beta$ -lactámicos:** Todos los aislamientos presentaron el gen *mecA* que confiere resistencia a la mayoría de antibióticos  $\beta$ -lactámicos (excepto ceftobiprole y ceftarolina), el 22(73.6%) aislamientos presentaron el gen *blaZ* que codifica la  $\beta$ -lactamasa tipo A.
- **Aminoglucósidos:** Los genes más frecuentes fueron la nucleotidiltransferasa *ant(9)-Ia* en 28 (93.3%) aislamientos, seguido de la nucleotidiltransferasas *ant(9)-Ia* y fosfotransferasa *aph(3')-III* presentes simultáneamente en 26 (86.6%) aislamientos. El gen de la enzima bifuncional *aac(6')-aph(2'')* que confiere alto nivel de resistencia a gentamicina se identificó en 16 (53.3%) aislamientos.
- **MLS<sub>B</sub>:** El mecanismo de resistencia más frecuente en los aislamientos con fenotipo hVISA a esta familia de antimicrobianos es la modificación por metilación o mutación en el sitio de unión al *rRNA-23s*, mediada por los genes *ermA* y *ermC*. En todos los aislamientos hVISA se identificó la presencia del gen *ermA*, lo que sugiere que es el principal mecanismo de resistencia en estos aislamientos, mientras que el gen *ermC* se identificó solo en dos aislamientos 2 (6.6%), perteneciente al clon Nueva York/Japón y chileno/cordobés.
- **Fluoroquinolonas:** En los aislamientos hVISA se identificó que 29 (96.6%) presentaron mutaciones en los genes *griA* (S80F) y *gyrA* (S84L) y 28 (93.3%) en *parC* (Y410F).
- **Otras familias:** Respecto a las otras familias de antibióticos, solo un (3.3%) aislamiento presentó resistencia a tetraciclinas mediada por la presencia de *tetM* y fosfomicina (*fosD*), y dos (6.6%) a fenicoles por presencia de *cat* (pC194) y rifampicina *rpoB* (H481N). Ninguno de los aislamientos presentó genes de resistencia a vancomicina como el clúster de genes *vanA*.



**Figura 2-2 Resistoma y perfil de resistencia de los aislamientos hVISA.** Los aislamientos subrayados corresponden a los hVISA confirmados por PAP/AUC. **BR:** Clon brasilero; **NY/J:** clon Nueva York/Japón; **CH:** clon chileno/cordobés; **ATCC29213:** cepa VSSA. Los recuadros de color azul representan la presencia del determinante de resistencia y los de color crema la ausencia de estos. **OXA:** oxacilina, **GEN:** gentamicina, **RIF:** rifampicina, **ERI:** eritromicina, **CIP:** ciprofloxacina, **VAN:** vancomicina, **TET:** tetraciclina, **CLI:** clindamicina, **CHL:** cloranfenicol, y **SXT:** trimetoprim-sulfametoxazol y (\*) Resistencia intermedia a vancomicina por CIM. El (\*) corresponde a cepas de referencia.

En la caracterización molecular también se analizó el viruloma de los 30 hVISA y a los 305 VSSA pertenecientes a la misma vigilancia, ya que los factores de virulencia juegan un rol importante en la colonización y patogenicidad en diferentes entornos y hospederos. Para clasificar y establecer presencia de los factores de virulencia se determinó la presencia de 3.223 genes almacenados en la base de datos de VFDB (Virulence Factor Database), encontrando que 93 genes de virulencia se identificaron en los aislamientos analizados (hVISA y VSSA). Los factores de virulencia identificados en los aislamientos se agruparon en estas seis categorías funcionales: adhesión (n=18), evasión del sistema inmune (n=20), adquisición de hierro y otros metabolitos (n=7), toxinas (n=26) entre las que se encuentran hemolisinas, leucocidinas, enterotoxinas, exoenzimas y toxinas exfoliativas, sistemas de secreción (n=11) y otros (n=11), los que se encuentran descritos en detalle en el anexo C.

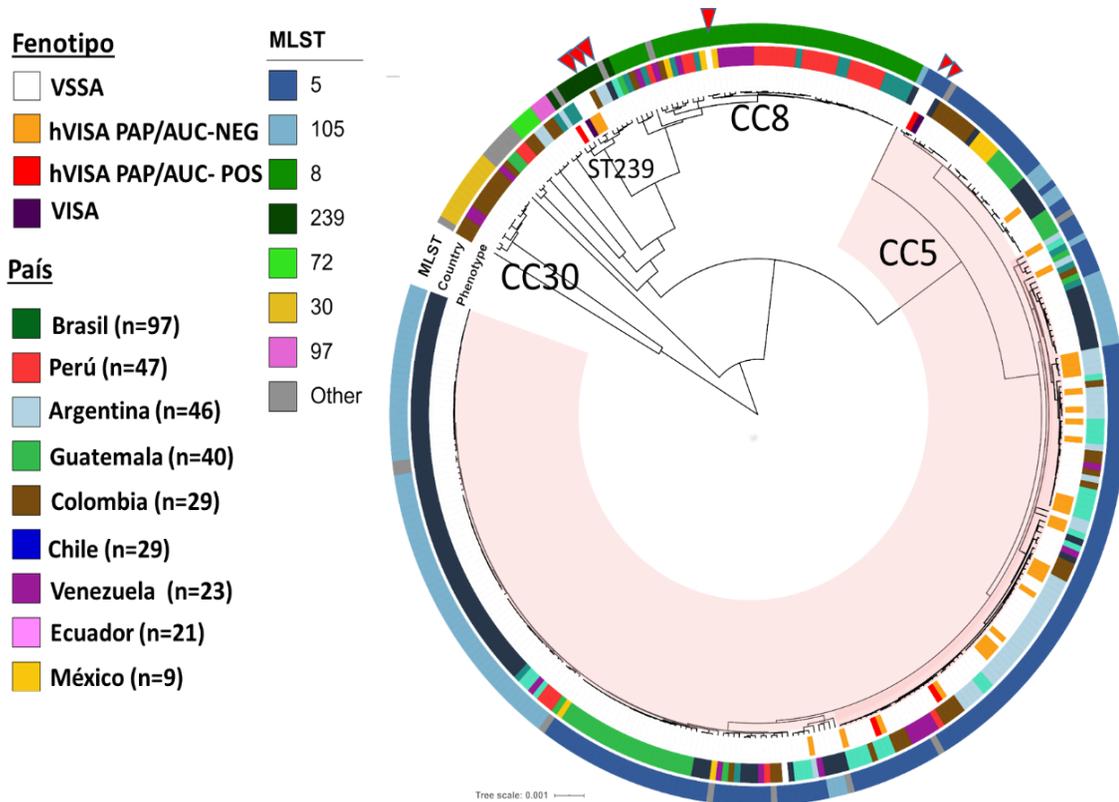
En la categoría de adherencia se incluyeron 18 factores de virulencia entre los cuales se encuentran factores de aglutinación, proteínas de unión al colágeno y fibronectina, proteínas análogas al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), proteínas de anclaje de superficie de la pared celular y adhesinas intercelulares como el operón *icaADBC* que participan en la formación de biopelícula, entre otras, de las cuales solo se evidenció diferencia de proporciones entre los VSSA y hVISA en el regulador IcaR del operón IcaADBC, que está presente en 83% de aislamientos hVISA y 97% en VSSA, y la proteína extracelular Map que previene el reclutamiento de células inflamatorias al sitio de infección mediada por la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), que solo se encontró en un aislamiento hVISA correspondiente al 3.3%, mientras que en los VSSA se identificó en 53(17.3%) aislamientos. Adicionalmente, se identificó en mayor proporción en hVISA la presencia de la proteína de membrana EsaD encargada de seleccionar el sustrato del sistema de secreción tipo VII, presente en 96% de los aislamientos y la proteína de unión al factor Von-Willebrand (33.3%) tabla 2-4. Es importante resaltar que ninguno de los hVISA presentó la Leukocidina Pantón-Valentine (PVL) mientras que en los VSSA se identificó en 19.2% asociado al linaje USA300-LV. En la tabla 2-4 se describen las categorías y los factores de virulencia que presentaron diferencias en proporción entre hVISA y VSSA.

Tabla 2-4 Factores de virulencia con diferencia de proporciones entre hVISA y VSSA.

Categoría	Factor de virulencia	Gen	VSSA (n=305)	hVISA (n=30)
Adhesinas	Regulador transcripcional del operón <i>icaADBC</i>	<i>icaR</i>	299(97,7%)	25(83,3%)
	Proteínas extracelulares Map	<i>map</i>	53(17,3%)	1(3,3%)
Sistema de secreción	Proteína del sistema tipo VII	<i>esaD</i>	234(76,4%)	29(96,7%)
Toxinas	Delta hemolisina	<i>hld</i>	296(96,7%)	25(83,3%)
	Leukocidina Pantón-Valentine	<i>lukSF-PV</i>	59(19,2%)	0(0%)
	Factor de unión a Von Willebrand	<i>vWbp</i>	45(14,7%)	10(33,3%)

### 2.2.3 Relación filogenética de los aislamientos hVISA en Latinoamérica

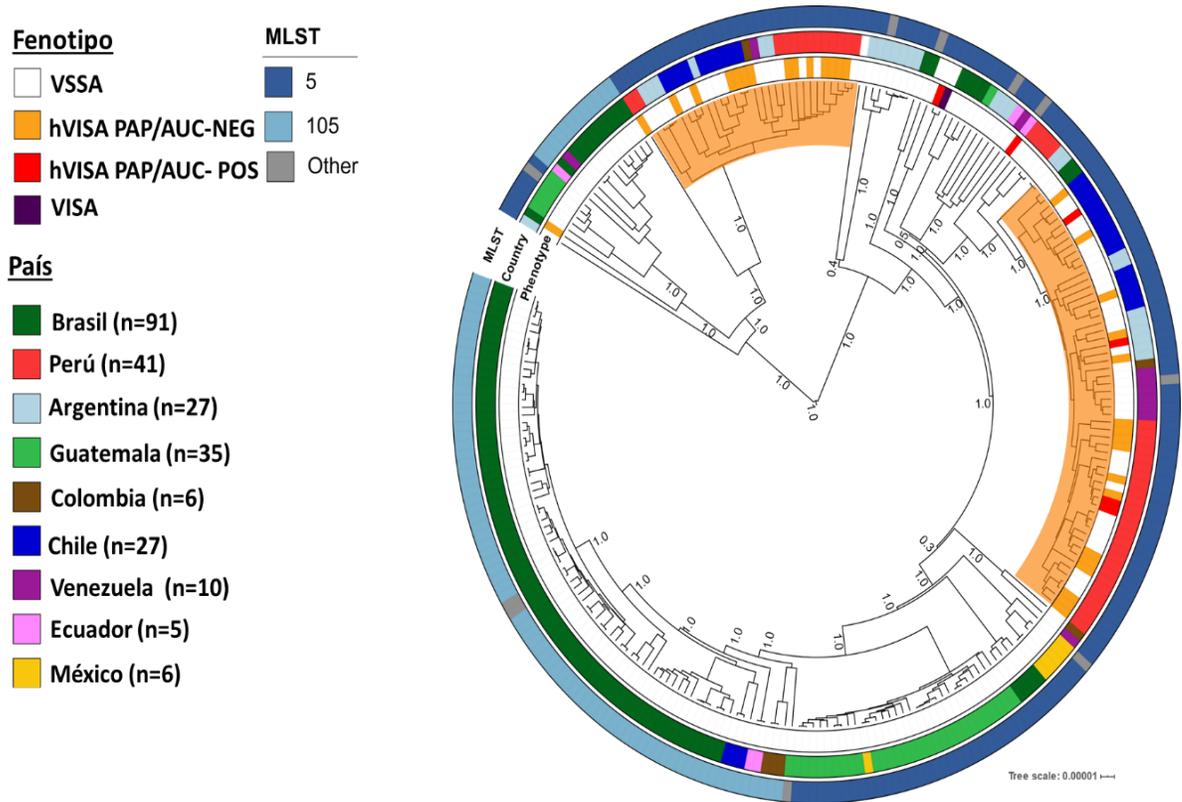
Para establecer la relación filogenética de los aislamientos hVISA que circulan en Latinoamérica, se realizó un análisis filogenómico basado en los SNP del *core genome* de 341 genomas de SARM, de los cuales 30 corresponden a hVISA y 305 a VSSA clasificados por pruebas de tamizaje y pertenecientes a la misma vigilancia y 6 cepas control tanto hVISA como VSSA disponibles en el repositorio público de NCBI. En la figura 2-3 se observa el árbol filogenómico donde se observa la relación filogenética por linajes genéticos y país de origen del aislamiento y el MLST. En el anillo interior se observar una agrupación predominante de los aislamientos al complejo clonal 5 (CC5), lo cual está en concordancia con el MLST (anillo exterior) ya que la mayoría de los aislamientos incluidos en este clado son ST5 y ST105. En relación con el fenotipo, 29 de los 30 aislamientos hVISA están presentes en el clado del CC5 (excepto la muestra UE1097 que pertenece al ST239), sin embargo, no se observó una agrupación específica de entre los hVISA dentro de este clado, ni se presentó una asociación con un país de origen en especial. Es importante mencionar que los tres aislamientos confirmados como hVISA mediante PAP/AUC no presentan una evidente agrupación entre sí o una estrecha relación genómica, ni tampoco se evidencia entre los dos aislamientos pertenecientes al clon Chileno/Cordobés (UA851 y UCL420), (figura 2-3).



**Figura 2-3** Árbol filogenómico bayesiano utilizando SNP del genoma central de *S. aureus* recuperados en 9 países de Latinoamérica. Se analizaron 341 genomas distribuidos en 30 hVISA, 305 VSSA y seis cepas de referencia. Los anillos coloreados de adentro hacia afuera indican el fenotipo a vancomicina, el país del cual se tomó la muestra y el tipo de secuencia (ST) del aislado. Las ramas resaltadas en el sombreado rosado representan al CC5. Los puntos de color rojo en el anillo externo indican la posición de las cepas de referencia.

Debido al predominio de aislamientos hVISA y VSSA pertenecientes al CC5 (ST5 y ST105 principalmente), se realizó un segundo análisis de la reconstrucción filogenética en el que se incluyeron únicamente los aislamientos pertenecientes a este complejo clonal, en el cual se incluyó 248 genomas pertenecientes al CC5, distribuidos en 30 hVISA (incluyendo la cepa de referencia Mu3) y 217 VSSA (negativos para el tamizaje en agar). En este análisis, el árbol obtenido fue enraizado con una cepa ST8 no perteneciente al CC5, lo que permitió observar una agrupación de los aislamientos hVISA pertenecientes al CC5, ya que estos se distribuyeron en dos clados, como se observa en el anillo interno de la figura 2-4 sombreados de color naranja. El primer clado está compuesto por 28 aislamientos de los cuales, 12 (43.3%) fueron hVISA procedentes de Chile y Perú, mientras que en el segundo clado se agruparon 53 aislamientos de los cuales 16 fueron hVISA (incluyendo los dos confirmados por PAP/AUC) procedentes de Perú, Chile y Argentina, confirmando que no se presenta asociación geografía específica

entre los aislamientos hVISA a nivel general (figura 2-4).



**Figura 2-4 Relación filogenética en aislamientos hVISA asociada al CC5 (n=249).** La relación genética fue determinada basado en SNP el genoma central, la longitud del árbol fue corregida teniendo en cuenta la cepa SARM FPR3757 – USA300 (ST8) como *outgroup*. Los principales clados que agrupan los aislamientos hVISA se encuentran sombreados de color naranja. Los anillos del interno al exterior indican fenotipo a vancomicina, el país de origen de los aislamientos y el tipo de secuencia (ST) determinado por el MLST.

## 2.3 Discusión

*Staphylococcus aureus* ha desarrollado resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y glicopéptidos como vancomicina, limitando considerablemente las opciones terapéuticas para el control de estas infecciones y aumentando las tasas de morbi-mortalidad [60]. Particularmente, la resistencia intermedia a vancomicina asociada al fenotipo hVISA se ha convertido en una amenaza para la práctica clínica, debido a la falla en la detección de este fenotipo en laboratorios clínicos y la consecuente falla terapéutica. Debido a esto, este estudio multicéntrico determinó la frecuencia y las características moleculares de aislamientos SARM con fenotipo hVISA en 24 hospitales de 9 países latinoamericanos en el periodo del 2011 al 2014, teniendo como resultados que la prevalencia del fenotipo hVISA es del 5.6% empleando métodos basados en E-test como MET y GRD que

presentan una especificidad (97%) [109]. Datos similares a los reportados previamente en los meta-análisis de Zhang *et al* y Shariati *et al*, las cuales la prevalencia global de hVISA fue del 6.0% y 4.7% respectivamente, e inferior a la prevalencia reportada para el periodo comprendido entre el 2010 al 2014 la cual fue del 7.01% [94, 123].

Es de destacar que la prevalencia de hVISA oscila entre el 0.2% hasta el 29.2% en diferentes regiones del mundo, esta variación puede ser el resultado de la dificultad para la detección de estos aislamientos, así como a los diversidad de variables incluidas en los estudios como criterios de inclusión empleados, diferencias en área geográficas, fuente de infección analizadas, método de diagnóstico utilizado y tiempos de almacenamiento de las cepas, ya que en estas condiciones el fenotipo puede ser inestable [94, 124, 125]. Específicamente en Latinoamérica, los reportes de hVISA se limitan principalmente a casos esporádicos, aunque en Brasil y Argentina han registrado prevalencias del 9.7% y 3.3% respectivamente [99, 100, 102]. En el primer estudio multicéntrico que determinó la frecuencia de aislamientos hVISA en Latinoamérica, realizado por nuestro grupo de investigación, se analizaron 651 aislamientos SARM causantes de infección procedentes de cuatro países de la región (Perú, Colombia, Venezuela y Ecuador) recuperados entre el año 2006 al 2008, en el que se identificó 9 aislamientos hVISA, correspondiente a una prevalencia del 1.4% empleando los métodos basados en E-test y de estos 3 (0.46%) fueron clasificados como hVISA (2 de Perú y 1 de Ecuador) por la prueba confirmatoria PAP/AUC [8, 103]. Estos resultados pusieron en evidencia la presencia del fenotipo en varios países de la región.

Adicionalmente, en este trabajo se identificó una prevalencia del 0.56% de aislamientos hVISA empleando PAP/AUC y correspondieron a tres aislamientos provenientes de Argentina, Ecuador y Chile. A pesar de que PAP/AUC es la prueba de oro para detectar este fenotipo, se observó al igual que en reportes previos [98, 103], que este método clasifica como VSSA a una pequeña proporción de los aislamientos potenciales hVISA identificados por MET y GRD. Esto se debe a que esta técnica clasifica a un aislamiento como hVISA, si presenta un recuento de las subpoblaciones resistentes lo suficientemente alto para mantener una proporción de los recuentos reportados obtenidos en la cepa de referencia hVISA Mu3, generando posiblemente que aislamientos que presenten el fenotipo, pero con subpoblaciones resistentes más pequeñas, sean clasificados como VSSA. Es por esto, que pruebas como GRD y MET,

que presentan alta sensibilidad (94-96%) y especificidad (82-97%) para detectar el fenotipo, podrían considerarse viables para ser implementadas en el diagnóstico clínico, una vez se realicen estudios epidemiológicos y de costo-efectividad, que permitan ser recomendadas por el CLSI, aunque, esto genere un incremento en los costos de identificación bacteriana [12, 13].

A nivel epidemiológico, se ha observado una tendencia de hVISA a asociarse a linajes específicos de SARM, por ejemplo en Asia, Europa y América del Sur los linajes más frecuentes en estos aislamientos son el ST239 (58.6%) y el ST5 (14.4%) [94]. En este análisis predominó el ST5 en el 96.6% en los hVISA detectados por E-test, de los cuales el 93.3% pertenecen al clon chileno/cordobés, distribuidos principalmente en Perú 16 (19%) y en Chile 9 (12%), mostrando consistencia con la epidemiología en la región, ya que este clon causa el 90% de las bacteriemias por SARM en estos países [9]. Mientras que el único aislamiento proveniente de Brasil estuvo relacionado con el clon Nueva York/Japón - ST5, clon al cual también pertenecen las cepas de referencia Mu3 (hVISA) y Mu50 (VISA) que tiene una prevalencia del 80% en este país [39, 40]. Curiosamente, de los aislamientos analizados no se identificó el fenotipo en Venezuela y Colombia, donde el linaje de SARM predominante es USA300-LV perteneciente al CC8, ni en Guatemala y México, donde predomina el clon Nueva York/Japón-ST5 [9]. Otro hallazgo interesante fue que solo un aislamiento procedente de Ecuador, confirmado por PAP/AUC, pertenece al clon brasilero con un ST1341, que es una variante de locus único (SLV por sus siglas en inglés) del ST239, siendo este el segundo clon más frecuente en ese país después de USA300-LV [9]. En general estos hallazgos también ayudan a soportar la posible asociación del fenotipo con algunos linajes específicos de SARM.

Respecto al perfil de resistencia los aislamientos hVISA del estudio presentan un perfil de multiresistencia ( $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, lincosamidas, macrólidos y fluoroquinolonas) que limita las opciones terapéuticas disponibles para su tratamiento, y es concordante con el perfil de multiresistencia presente en el clon chileno/cordobés. Afortunadamente, los aislamientos analizados en este estudio presentan bajas tasas de resistencia (3,3%) trimetoprim - sulfametoxazol y (6.6%) a rifampicina y ninguno de los aislamientos presentó resistencia a Linezolid ni no susceptibilidad a daptomicina (CIM<sub>90</sub> 0.5  $\mu$ g/mL). Sin embargo, varios investigadores han informado una asociación entre

la sensibilidad reducida a la vancomicina, que a menudo ocurre después del fracaso del tratamiento con este antibiótico y la no susceptibilidad a la daptomicina, ya que esta es mediada por mutaciones en *mprF* y *yycG*, genes también implicados en el desarrollo del fenotipo de algunos hVISA y VISA, lo cual puede generar una resistencia cruzada, al igual que el engrosamiento de la pared bacteriana frecuentemente asociado al fenotipo VISA y hVISA que pueden limitar la penetración de la daptomicina a través de esta [126].

## 2.4 Conclusiones

- Se identificó la presencia de aislamientos SARM causantes de bacteriemia en Latinoamérica con el fenotipo hVISA con una prevalencia de 5.6% empleando metodologías de GRD y MET, los cuales fueron identificados en aislamientos recuperados en Ecuador, Argentina, Chile, Brasil y Perú y asociados al complejo CC5 principalmente.
- Los linajes genéticos de SARM como el clon Chileno/Cordobés y New-York /Japón pertenecientes al CC5 de alta prevalencia en Latinoamérica (Perú, Chile, Brasil, Guatemala y México) mostraron una mayor asociación al fenotipo hVISA, lo cual sugiere que son linajes que podrían estar predispuestos genéticamente a desarrollar el fenotipo hVISA.
- Para la detección oportuna del fenotipo hVISA en laboratorios clínicos, ya que no es viable implementar una técnica como PAP-AUC, los métodos basados en E-test (GRD y MET) parecen ser la mejor alternativa de identificación de acuerdo a su sensibilidad y especificidad, lo cual puede contribuir en la orientación del manejo de infecciones severas por SARM. Así mismo, en este estudio observamos que las técnicas de GRD o MET permiten identificar aislamientos no categorizados por PAP/AUC como hVISA, por no presentar subpoblaciones en proporciones similares a la cepa Mu3, pero que, si presentan importantes subpoblaciones resistentes, lo que podrían influir en fracasos terapéuticos con vancomicina.
- Los aislamientos hVISA identificados en el estudio presentan co-resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos,  $MLS_B$ , fluoroquinolonas, y baja frecuencia de resistencia (<6.0%) a rifampicina y trimetoprim-sulfametoxazol.

- Los aislamientos hVISA fueron en su totalidad susceptibles a linezolid y daptomicina, este último resultado muy interesante ya que se ha reportado frecuentemente la resistencia cruzada a daptomicina en aislamientos hVISA debido a la presencia de mutaciones en MprF y al engrosamiento de la pared bacteriana que limite el acceso de este antibiótico a la membrana celular reduciendo su efectividad.

## Capítulo III

### **3. Cambios genéticos presenten en *S. aureus* resistente a meticilina con el fenotipo hVISA**

*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) es un patógeno versátil que causa una amplia gama de infecciones devastadoras a nivel mundial [4]. Rápidamente adquirió un perfil de resistencia a diversas familias de antibiótico que reduce significativamente las opciones terapéuticas disponibles [3]. Actualmente, antibiótico glicopéptido como la vancomicina, es el tratamiento de primera línea para el control de las infecciones severas causadas por SARM multiresistentes, [23]. Sin embargo, desde la aparición de casos esporádicos de cepas resistentes a vancomicina (VRSA) o con susceptibilidad intermedia a la vancomicina (VISA) y VISA heterogénea (hVISA), estos últimos desde 1997, han aumentado los reportes de fracaso terapéutico [39, 40].

El mecanismo molecular que confiere la resistencia en VRSA está claramente definido e involucra el clúster de genes *vanA*, que reemplaza el dipéptido terminal D-Ala-D-Ala del peptidoglicano por el dipéptido alterado D-Ala-D-Lac, el cual impide la unión de la vancomicina [11]. En el caso de los aislamientos VISA y hVISA el entendimiento del mecanismo genético sigue siendo un desafío, debido a que no está mediado por un único determinante de resistencia como en el caso de los VRSA. En los últimos años, con ayuda de los análisis genómicos comparativos de aislamientos clínicos específicos con y sin exposición a la vancomicina se ha podido establecer que el incremento de la CIM en estas bacterias se correlaciona con la acumulación de mutaciones en diversas vías funcionales lo que genera una respuesta adaptativa multifactorial [26, 53].

Entre los cambios adaptativos más comunes identificados en VISA y hVISA analizados principalmente en aislamientos relacionados con el clon ST239 se encuentra la alteración de la envoltura celular, como el engrosamiento de la pared debido al aumento de la síntesis de peptidoglicano, la reducción de la reticulación de peptidoglicano causando la presencia de los residuos libres de D-Ala-D-Ala, disminución de la actividad autolítica y reducción de

la expresión de proteínas de unión a penicilina (PBP) [12, 71]. Esto se debe a mutaciones en sistemas reguladores del metabolismo de la pared bacteriana como WalRK, VraTSR y GraSR que regulan la expresión de un grupo considerable de genes denominados “estimulón de la pared bacteriana”, la funcionalidad de *agr* que reduce la expresión de quórum sensing en *S. aureus* y factores de virulencia como la capsula, afectando posiblemente la interacción hospedero patógeno y la evasión inmune [95].

Otras alteraciones que se detentan con alguna frecuencia en este fenotipo afectan la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa (*rpoB*), genes de remodelación o síntesis de la pared celular (*sle1* y *msrR*), proteínas transmembranales (*tcaA*) y genes metabólicos (*cmk* y *fdh2*), que a su vez causan cambios transcriptómicos relevantes, como por ejemplo, las sustituciones I5N, S329L y L114S-D242G en VraS se asocian experimentalmente al fenotipo VISA ya que permiten la sobreexpresión de hemolisinas (Hla y Hlb) y la coagulasa (*coa*) [55, 58]. También, el aumento de la expresión capsular, del operón *dltABCD*, *mprF*, alta alanilación de ácidos teicoicos y una disminución de la expresión de *walKR*, entre otros [66, 67, 77]. Infortunadamente, estos cambios genéticos ni transcriptómicos son consistentes en todos los aislamientos que presentan el fenotipo, interfiriendo considerablemente en la comprensión de mecanismos de resistencia o en la determinación de un perfil molecular de los hVISA asociado a linajes específicos que circulan en determinadas regiones geográficas como el caso de Latinoamérica que presenta una diversidad genética y epidemiológica de SARM particular.

## 3.1 Materiales y métodos

### 3.1.1 Identificación de sustitución de aminoácidos en proteínas asociadas al desarrollo del fenotipo hVISA y VISA

Inicialmente, se realizó la identificación de la sustitución de aminoácidos o cambios genéticos en proteínas previamente reportadas con asociación al desarrollo el fenotipo hVISA o VISA por análisis genómicos y/o comprobación experimental (mutagénesis) en aislamientos clínicos procedentes de pacientes con tratamientos prolongados con vancomicina, cepas isogénicas u obtenidas *in vitro* por presión continua con el antibiótico, para ello se realizó una búsqueda exhaustiva y sistemática de la literatura científica en la que se incluyeron artículos de revistas indexadas publicados hasta septiembre de 2019, empleando los siguientes términos booleanos: vancomycin Intermediate *Staphylococcus*

*aureus*, VISA, heterogeneous vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*, hVISA, *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility, glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*, GISA, heterogeneous glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* y hGISA.

A partir de esta información se elaboró una base de datos donde se registraron las proteínas y los cambios asociados al fenotipo. A partir de esta información, se procedió a determinar todos los cambios presentes en estas proteínas predichas en los aislamientos del estudio (30 hVISA y 305 VSSA). Para esto se extrajeron inicialmente, las secuencia de aminoácidos (aa) de todas las proteínas de interés del genoma de la cepa N315 (NC\_002745.2), empleadas posteriormente para realizar la búsqueda de estas secuencias en todos los genomas del estudio por medio de BLASTX [127], se extrajeron las secuencias de los ensamblajes que presentaban >95% de similitud y >80% de cobertura de la secuencia de referencia, para realizar nuevamente un alineamientos de éstas secuencias contra la secuencia de N315 empleando MUSCLE, con el propósito de identificar todos los cambios de aa presentes en estas proteínas predichas a partir de los genomas del estudio [3]. Luego, los cambios de aminoácidos identificados en los hVISA se filtraron para excluir aquellos presentes en las cepas de referencia ATCC29213 MSSA susceptible a vancomicina. A cada sustitución de aminoácido identificado se calculó el valor *P* (prueba de chi-cuadrado) de la diferencia en la proporción en cada grupo de cepas (VSSA y hVISA), para analizar únicamente los cambios de aminoácidos relevantes que presentaron un valor de  $p < 0.05$  y una diferencia en la proporción superior al 10%. Estos cambios fueron consultados bases de datos (Interpro, Uniprot y Pfam) para establecer si su ubicación afectaba dominios funcionales de las proteínas.

En la caracterización de cambios genéticos posiblemente relacionados con el desarrollo del fenotipo hVISA se emplearon los ensamblajes de los 30 aislamientos identificados por MET y GRD obtenidos de la secuenciación por tecnología MiSeq (Illumina) como se describió en la metodología del capítulo 2 los ensamblajes obtenidos previamente de los 305 VSSA y las cepas de referencia disponibles en NCBI. Los tres aislamientos hVISA PAP/AUC positivos (UE1097, UA851 y UCL420), se secuenciaron adicionalmente por la tecnología Oxford-Nanopore (MinION), para obtener el ensamblaje del genoma completo o cerrado. Este proceso se realizó a partir del ADN extraído, con el cual se prepararon librerías empleando el kit de secuenciación rapid Barcoding (SQK-RBK004) siguiendo las

instrucciones del fabricante. Las librerías fueron secuenciadas empleando una celda de flujo (Flo-Min-R9.4.1-106D). Posteriormente, se eliminaron los adaptadores y secuencias de baja calidad mediante Porechop y se realizó un ensamblaje híbrido de *novo* Illumina y Nanopore utilizando la versión 2.0 de Madeka.

### **3.1.2 Detección de cambios predominantes en aislamientos hVISA en otros genomas de *S. aureus***

Para evaluar si los cambios predominantes identificados en los aislamientos hVISA de este estudio se relacionan con el linaje bacteriano, se realizó una búsqueda de estos cambios en 10.050 genomas de *S. aureus* disponibles en el repositorio de NCBI (National Center for Biotechnology Information), y se comparó su frecuencia con el tipo de secuencia (ST), determinado por medio de MLST 1.8 disponible en el servidor del Centro de Epidemiología Genómica de Dinamarca (<http://www.genomicepidemiology.org/>) [117].

### **3.1.3 Recuperación y caracterización de subpoblaciones con resistencia intermedia a vancomicina presente en los aislamientos hVISA**

Debido a la naturaleza heterogénea de los aislamientos hVISA, se quiso identificar cambios genéticos adicionales que estuviesen presentes en las subpoblaciones resistentes recuperadas a partir de aislamientos hVISA. Para esto, se aislaron las subpoblaciones presentes en los tres aislamientos hVISA confirmados por PAP/AUC (UE1097, UA851 y UCL420), empleando la metodología del perfil de análisis poblacional descrita previamente en el (materiales y métodos capítulo 2), en la cual se recuperaron aquellas UFC que crecieron en altas concentraciones de vancomicina ( $\geq 3$   $\mu\text{g/mL}$  de VAN). Cada UFC fue denominada para este estudio como subpoblación, fueron sembradas en agar BHI+1  $\mu\text{g/mL}$  de VAN, y se conservaron en caldo TSB+15% de glicerol con 1  $\mu\text{g/mL}$  de VAN a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su posterior caracterización microbiológica y molecular. Para corroborar que las subpoblaciones recuperadas conservaban las mismas características de los aislamientos de donde se obtuvieron (parentales) y no presentaran contaminación se determinaron las mismas características moleculares que las parentales (materiales y métodos capítulo 2) como la CIM de vancomicina y teicoplanina por dilución en caldo, GRD, MET y PAP/AUC, determinación de género – especie, tipo de *agr* y tipificación de *SCCmec* empleando las condiciones de PCR previamente reportadas [9, 115]. La relación genética (clonalidad) de las subpoblaciones obtenidas se corroboró por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) antes de su proceso de secuenciación por MiSeq siguiendo

el protocolo descrito en materiales y métodos capítulo 2 [111, 128, 129].

### **3.1.4 Detección de cambios de aminoácidos y SNPs en las subpoblaciones versus aislamientos hVISA**

Se evaluaron los cambios de aminoácidos de las proteínas previamente relacionadas al desarrollo del fenotipo (Anexo C), en dos subpoblaciones seleccionadas como representantes por cada cepa parental. La comparación de sustituciones de aa se realizó en dos subpoblaciones y su respectivo parental de donde se obtuvieron (UE1097, UA851 y UCL420), empleando el mismo protocolo empleado para identificar estos cambios en los 30 hVISA y 305 VSSA. También se evaluó la presencia de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés), inserciones y deleciones en genomas bacterianos de las subpoblaciones respecto a la parental por medio de la herramienta breseq versión 0.24 disponible en <http://barricklab.org/breseq>.

### **3.1.5 Detección de cambios genéticos asociados al fenotipo hVISA**

Para identificar los cambios posiblemente implicados en el fenotipo hVISA de manera general y que permitieran predecir si un aislamiento presenta fenotipo hVISA, se emplearon dos análisis, el primero de GWAS (Genome-wide association studies) basado en k-meros, en el cual se extrajeron y contaron todos los K-meros con longitud variable (9 a 100 nucleótidos) de todos los cromosomas de los aislamientos del estudio (hVISA y VSSA), con esta información se generó el recuento del número de veces que estos k-meros estaban presentes en cada genoma según su agrupación (hVISA o VSSA) para luego realizar un modelo de regresión lineal, en el cual se podrá establecer un valor de significancia corregido (corrección de Bonferroni) para cada K-mero y establecer la relevancia del K-mero en la predicción del fenotipo. Posteriormente estos K-meros se alinearon en los genomas cerrados de los aislamientos hVISA UE1097, UA851, UCL420 y N315 para establecer su ubicación en el genoma y su anotación funcional.

En la segunda aproximación se empleó el análisis discriminante lineal (LDA), en el cual se identificaron los SNPs de las cepas relacionadas al ST5 tanto VSSA (n= 127) como hVISA (n=38) por medio de la herramienta Mummer al hacer alineamientos parados respecto a la cepa N315 [130], con estos SNPs se construyó una matriz de presencia – ausencia y su ubicación en el genoma para establecer un nuevo eje o discriminante lineal que permite

maximizar la diferenciación de los dos grupos analizados (hVISA y VSSA). El análisis de LDA se realizó empleando el módulo scikit-learn de Python [131].

### 3.1.6 Análisis del transcriptoma por RNA-Seq.

Con el propósito de establecer cambios transcriptómicos posiblemente relacionados con el desarrollo del fenotipo hVISA, se comparó el perfil transcriptómico de los tres aislamientos hVISA clasificados por PAP/AUC y aislamientos comparadores VSSA. Estos comparadores fueron seleccionados acorde a tamizajes en agar, a su pertenencia a la misma vigilancia (año y país) y relacionados genéticamente (relación filogenómica), ya que no se cuentan con cepas isogénicas VSSA para cada hVISA, los cuales habrían sido los comparadores ideales. La extracción de ARN se realizó a partir de cultivos bacterianos en caldo tripticosa soya (TSB) incubados a 37°C en continua agitación a 180 rpm sin la presencia de vancomicina hasta obtener un crecimiento de la fase media exponencial, la cual fue determinada por medio de una curva de crecimiento obtenida para cada aislamiento correspondiente a una absorbancia entre 0.55 y 0.60. La extracción de ARN se realizó en tres replicas biológicas independientes, empleando el sistema comercial Ribopure RNA Purification Kit (Ambion, Life Technologies) y posterior tratamiento con DNAsa para la eliminación de ADN genómico. La calidad del ARN obtenido fue analizada empleando el sistema de Agilent 2100 Bioanalyzer Chip RNA Nano, Nano Drop y Fluorómetro Qubit 2.0. Muestras de ARN con ratios A260/ A280 y A260/ A230 iguales o mayores 2.0 y valores de integridad (RIN) iguales o mayores a 8.0 fueron empleados para continuar con el protocolo. La depleción del ARN ribosomal se realizó empleando el kit Ribozer bacteria (Illumina), posteriormente fue evaluada empleando el sistema de Agilent 2100 Bioanalyzer Chip RNA Pico. El ARN total fue empleado para la preparación de librerías de cADN empleando el sistema TrueSeq ARN Sample Preparation v2 (Illumina). Las librerías se secuenciaron en la plataforma Illumina siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las secuencias obtenidas se mapearon contra el genoma de referencia *S. aureus* N315 (NC:\_000011265.1), posteriormente se determinó el RPKM para cada uno de los genes analizados empleando EDGE-pro [132], y la identificación de los genes diferencialmente expresados (GDE) fueron determinados por DESeq2 [133], usando la corrección de Benjamini & Hochberg con un valor de  $p < 0.05$  como punto de corte. Posteriormente los GED se analizaron empleando dos estrategias de comparación; (i) se realizaron comparaciones por pares entre hVISA / VISA y (ii) comparaciones de los niveles de expresión respecto a la cepa de referencia VSSA (N315) e identificando los GDE común

en todos los hVISA, pero sin expresión diferencial en los VSSA

### 3.1.7 Formación de biopelícula

La evaluación de formación de la biopelícula se realizó a partir de un crecimiento bacteriano en la fase media del crecimiento exponencial, el cual se obtiene del crecimiento de dos o tres colonias en 3 mL de caldo BHI, incubado a 37°C en agitación a 170 rpm durante 4 horas. A partir de este crecimiento bacteriana se prepararon una suspensión correspondiente a una absorbancia de 0.01 a 625nm, de la cual se tomaron 5 µl y se inocularon en 195 µl de caldo BHI en placas de 96 pozos de fondo plano, que se incubaron por 24 horas a 37°C. Después se descartó el sobrenadante y se lavó tres veces con PBS, para retirar las células no adheridas y proceder a tinte con violeta cristal al 0,5% durante 20 min, posterior a este proceso se lavó nuevamente hasta eliminar el colorante no adherido. El colorante fijado a la biopelícula se eluyó con alcohol acetona 2:1 por media hora, para luego hacer la lectura a 600nm en el espectrofotómetro TECAM.

## 3.2 Resultados

Para identificar cambios genéticos asociados al fenotipo hVISA, inicialmente se analizaron 52 proteínas que fueron seleccionadas por revisión de literatura científica, que presentan cambios genéticos (sustituciones de aminoácidos) asociados al desarrollo del fenotipo VISA o hVISA, mostrada en detalle en el Anexo D, según su agrupación en ocho categorías funcionales. Las secuencias predichas de las 52 proteínas obtenidas de los 30 genomas de hVISA y 305 VSSA, se emplearon para identificar todas las sustituciones de aminoácidos presentes estas. En este estudio se definió como sustitución de aminoácido aquel cambio presentado respecto a la cepa de referencia N315 susceptible a vancomicina y que estuviera ausente en la cepa ATCC23913 también susceptible a vancomicina.

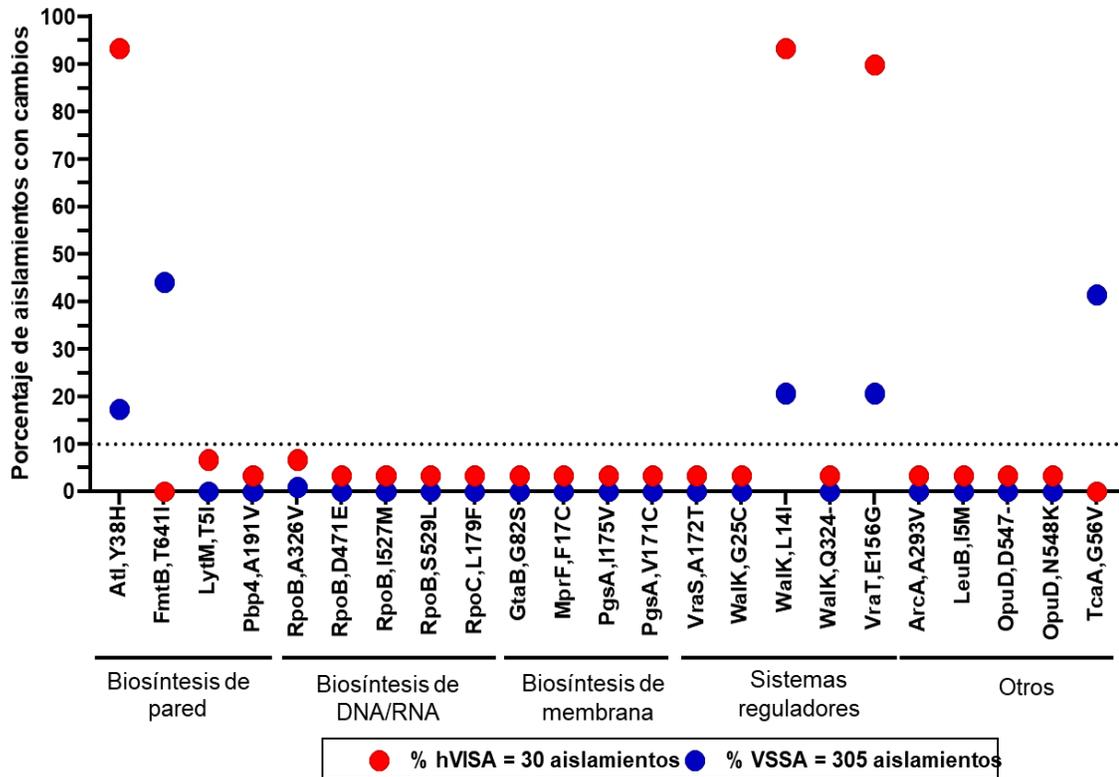
En los genomas evaluados no se identificó la presencia de ninguna sustitución en 7 proteínas (TarO, ClpP, VraG, AgrA, AgrC, SarA y DltC), debido a esto, en los siguientes análisis solo se incluyeron 46 proteínas, indicadas en la tabla 3-1, agrupadas principalmente en las categorías de biosíntesis de pared bacteriana, procesamiento de DNA/RNA y sistemas reguladores, en las que se identificó un total de 2965 sustituciones de aminoácidos respecto a la N315. En los aislamientos hVISA se identificaron 49 sustituciones de aminoácidos en 21 proteínas como se indican en la tabla anexo D, las

cuales biosíntesis de pared celular, membrana y procesamiento de ADN /ARN presentan el mayor número de cambios, muestras que en categorías como virulencia y procesamiento de ATP no se evidencio ningún cambio (figura 3-1).

**Tabla 3-1 Total de cambios de aminoácidos en proteínas por categoría funcional**

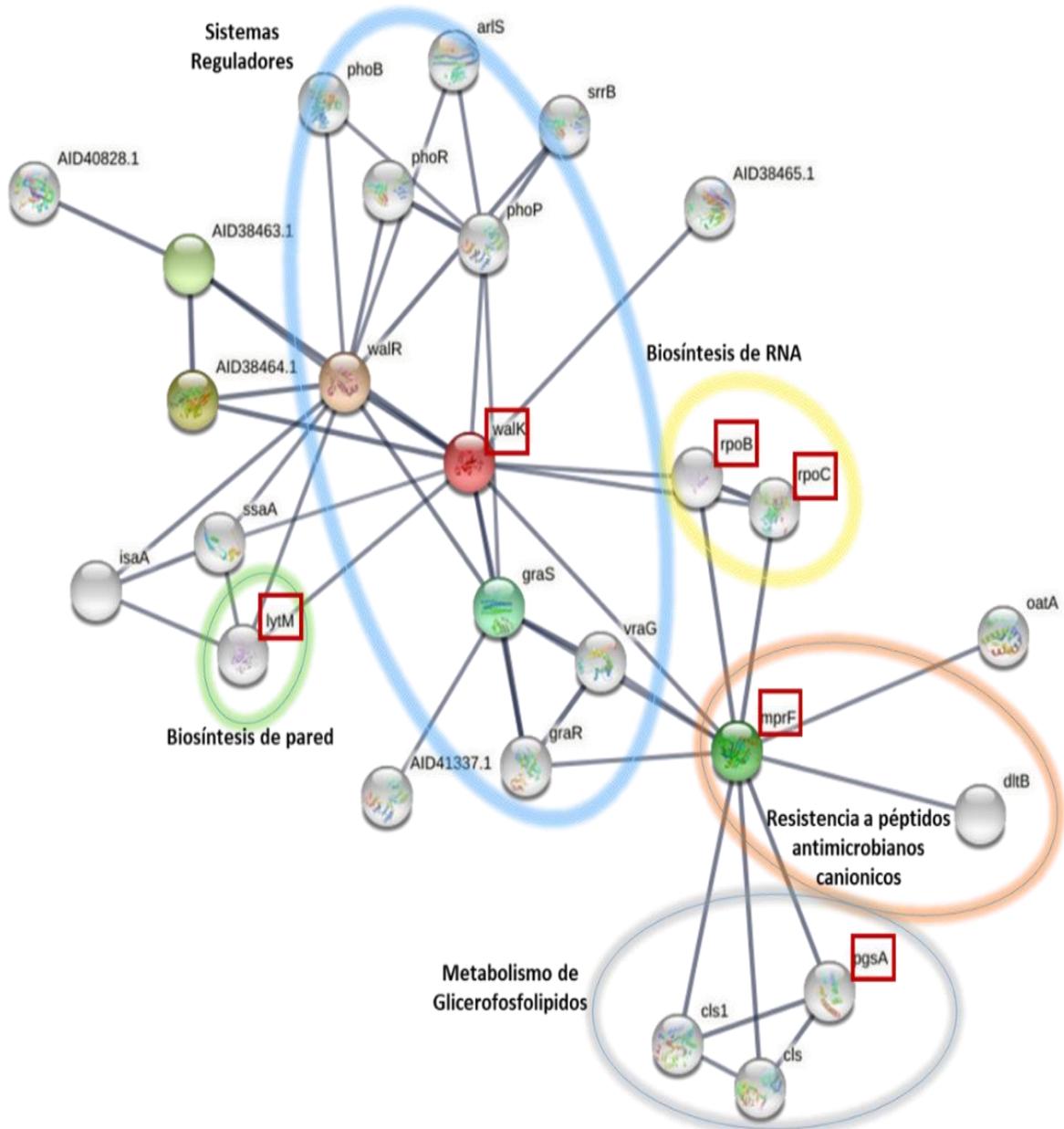
<b>Categoría funcional</b>	<b>Proteínas con cambio</b>	<b>N ° proteínas analizadas</b>	<b>Total de cambios</b>	<b>Total de cambios en hVISA</b>
<b>Biosíntesis de la pared celular</b>	Atl, CapP, Dlt(A,B,D), LytM, PBP4, SceD, TagO, tagA	10	99	12
<b>Procesamiento de ADN / ARN</b>	MutL, PurR, RpiL, Rpo(A,B,C,D), SigB, RpsU	9	329	10
<b>Biosíntesis de membrana</b>	GtaB, MprF, PgsA, TcaA, FmtB	5	1749	10
<b>Sistemas reguladores</b>	GraS, GraR, Walk, WalR, VraT, VraS, VraR	7	33	9
<b>Metabolismo de aminoácidos</b>	ArcA, LeuB,	2	14	5
<b>Virulencia</b>	Msa(A,B,C), MsrR	4	33	0
<b>Procesamiento de ATP</b>	AtpA, RecA, cmk	3	15	0
<b>Otros</b>	PykA, UreD, TrpC, OpuD, PotD, Ddh	6	62	3
<b>TOTAL</b>		<b>46</b>	<b>2965</b>	<b>49</b>

Una vez identificadas las sustituciones de aminoácidos en las proteínas de interés, se identificaron las diferencias de proporciones estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) de estos cambios entre los dos grupos (hVISA y VSSA). Encontrando que 23 sustituciones de aminoácidos presentes en 16 proteínas presentaron diferencias significativas, estos cambios están presentes en proteínas de biosíntesis de pared bacteriana (Atl, FmtB, LytM y PBP4), síntesis de RNA (RpoB y C), síntesis de membrana (MprF, PgsA, TcaA y GtaB), sistemas reguladores (Walk, VraS y VraT) y otras proteínas (ArcA, LeuB, OpuD) como se indica en la figura 3-1. De los cuales solo los cambios presentes en Atl, Fmtb, Walk, VraT y TcaA presentaron una diferencia de proporciones  $>10\%$ .



**Figura 3-1 Sustitución de aminoácidos con diferencia de proporción entre hVISA y VSSA.** Se representa el porcentaje de aislamientos que presentan sustitución con proporción estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) agrupados por categoría funcional. Los aislamientos de VSSA están representados por círculos de color azul  $n=305$  aislamientos y los círculos de color rojo corresponden a los hVISA.

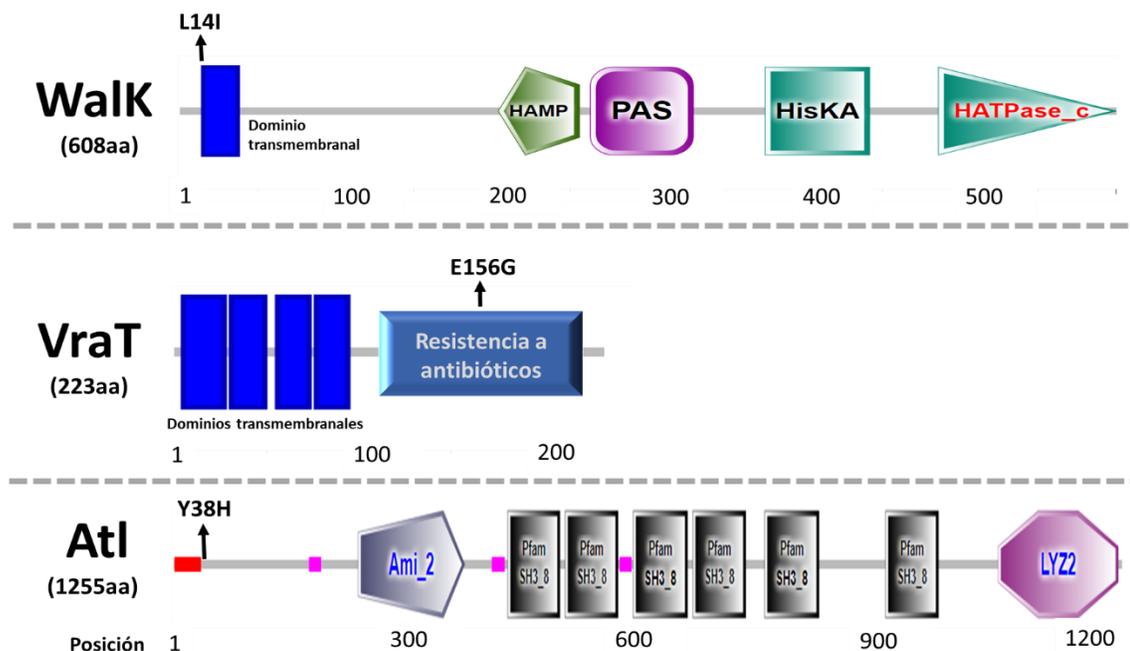
En los aislamientos VSSA las sustituciones más frecuentes fueron FmtB-T641I en la glicina-glicotransferasa del lípido II involucrada en la síntesis de la pared bacteriana, presente en 134 (44.1%) aislamientos y Tca-AG56V, que es una proteína de membrana asociada con resistencia a glicopéptidos presente en 126 (41.4%) aislamientos. Mientras que en los aislamientos hVISA, se identificó de forma predominante tres sustituciones; la primera es Walk-L14I, presente en 29 (96.6%) aislamientos, esta sustitución involucra cambio entre dos aminoácidos no polares que se ubica en el dominio transmembrana en la proteína sensor del sistema de dos componentes WalkR; encargado de la regulación del metabolismo de pared bacteriana. En la red predicha de interacción proteína-proteína para Walk, realizada por medio de la herramienta STRING se identificó interacción con cinco proteínas (LytM, RpoB, RpoC, MprF y PgsA) que también presentaron sustituciones estadísticamente significativas indicadas en la figura 3-1, las cuales se asocian a biosíntesis de pared, síntesis de RNA y metabolismo de glicerofosfolípidos como se indica en la figura 3-2.



**Figura 3-2 Red de interacción de WalK.** Se observa la red predicha por interacción de proteína-proteína por medio de la herramienta string, el grosor de las líneas grises indica alto coeficiente de confianza >0,07

La segunda sustitución es *VraT*- E156G donde se cambia un aminoácido ácido por uno polar presente en 27 (90%) aislamientos, afectando el dominio de resistencia a antibióticos de esta proteína presente entre la posición 199 al 230, que pertenece al sistema regulador de tres componentes *VraTSR*, homólogo al sistema *LiaFSR* presente en otras bacterias Gram positivas, encargado de regular la respuesta al estrés de la envoltura celular el cual se ha reportado en aislamientos VISA de origen coreano [134].

De igual manera, se identificó la sustitución en la autolisina Atl-Y38H que es un cambio de un aminoácido polar por uno básico en 28 (93.3%) aislamientos hVISA sin afectar ningún dominio funcional ya se encuentra posterior al péptido señal como se indica en la figura 3-3. Las sustituciones Walk-L14I y VraT- E156G, se encontraron en el 21% de los aislamientos VSSA (63/305), mientras que Atl-Y38H se identificó en 53 (17.4%) con un ( $P < 0,01$ ) (Anexo E). Es importante resaltar que en los aislamientos del estudio encontraron otros cambios con frecuencia de 6.7% en proteínas como LytM y del 3.3% en PBP4, RpoB y C, GtaA, MprF, PsgA, VraS, Walk y ArcA entre otras (Anexo E), además no se identificaron frecuentemente relacionados al fenotipo como GraSR (I59L, T224I y L26F) que regulan positivamente la biosíntesis de síntesis y la respuesta al estrés de la pared celular.



**Figura 3-3 Ubicación de en la estructura proteica de los cambios predominantes identificados en los aislamientos hVISA,** Imagen diseñada con la herramienta SMAT disponible en <http://smart.embl-heidelberg.de>

Debido al predominio de los cambios Walk-L14I, VraT-E156G y Atl-Y38H en los aislamientos hVISA, y que a su vez el 96.6% de estos aislamientos pertenecen al clon chileno/cordobés ST5, se quiso evaluar una posible relación entre la presencia de estos cambio y el linaje genético CC5 (ST5); para ello, se determinó el ST de 10.050 genomas de *S. aureus* disponibles en NCBI, y a partir de estos se seleccionaron 2.895 genomas pertenecientes al CC5 distribuidos en 2.307 del ST5 y 588 del ST105, en los cuales se

determinó que la proporción de la presencia de estos cambios era solo del 6% en el linaje ST5 y menos del 1% en otros linajes como ST105, ST22 y ST1100, descartando que la presencia predominante de estos cambios sea característico o propio del linaje (tabla 3-2).

**Tabla 3-2 Porcentaje de cambios en los genomas de *S. aureus* disponibles en NCBI**

Proteína	Cambio	ST5 (n=2,307)	ST105 (n=588)	ST239 (n=204)	Otros* (n=6.951)	Total (n=10,050)
VraT	E156G	141 (6.11%)	6 (1.02%)	0(0%)	20 (0.28%)	161 (1.6%)
Walk	L14I	138 (6%)	0(0%)	0(0%)	2 (0.03%)	140 (1.4%)
	L14F	2 (0.09%)	0(0%)	0(0%)	2 (0.03%)	4 (0.04%)
Atl	Y38H	138 (6%)	0(0%)	0(0%)	2 (0.03%)	140 (1.4%)

\*Otros ST: 22, 36, 45, 182, 239, 1100, 1550

Adicionalmente, con el propósito de establecer si existe una asociación entre el valor PAP/AUC y el perfil de cambios presenten en los aislamientos hVISA, se compararon el número sustituciones presentes en cada una de las 16 proteínas que presentaron diferencia estadísticamente significativa respecto al valor la relación del perfil de análisis poblacional. En este análisis no se encontró un perfil de cambios conservados en los aislamientos adicional a los anteriormente mencionados (Atl, Walk y VraT) o una relación entre mayor número de sustituciones en las proteínas con el incremento del valor de PAP/AUC en los aislamientos hVISA, excepto en el aislamiento UE1097 perteneciente al clon brasileiro ST1341, que presentó el mayor número de proteínas (LytM, RpoB, MprF, VraS, Walk y ArcA) con cambios de aminoácidos, pertenecientes a las categorías de biogénesis de la pared celular, procesamiento de ADN/ARN, biosíntesis de membrana, sistemas reguladores y metabolismo de aminoácidos, y la relación de PAP/AUC más alta (1.07).

Es importante resaltar que en los 27 aislamientos clasificados como VSSA según su relación de PAP/AUC, pero hVISA por los métodos basados en E-test, comparten algunos de los cambios presentes en los clasificados como hVISA por PAP/AUC, por ejemplo, en proteínas de los sistemas reguladores (Figura 3-4), lo que sugiere que todos los aislamientos hVISA están siendo detectados por PAP/AUC, ya que aislamientos con la presencia de subpoblaciones resistentes más pequeñas, también comparten la presencia de cambios identificados en los aislamientos con fenotipo hVISA clasificados por PAP/AUC. En general, estos resultados indican que los aislamientos hVISA de circulación

en Latinoamérica, presentan pocas características comunes o consistentes entre ellos, además, que no se observa de manera predominante cambios relacionados con el fenotipo identificados en otros linajes bacterianos, resaltando la complejidad del fenotipo heterogéneo y de su mecanismo molecular.

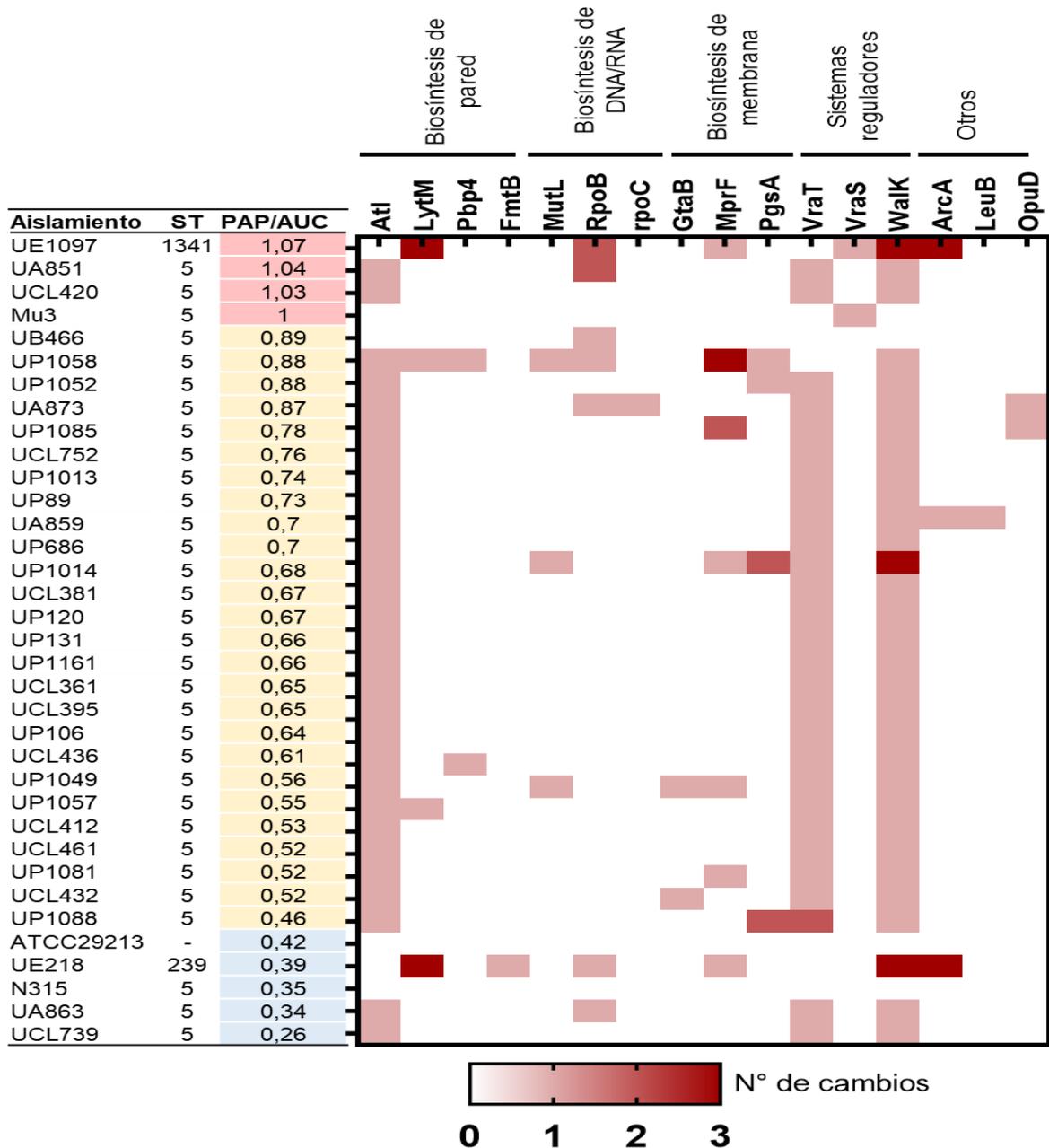
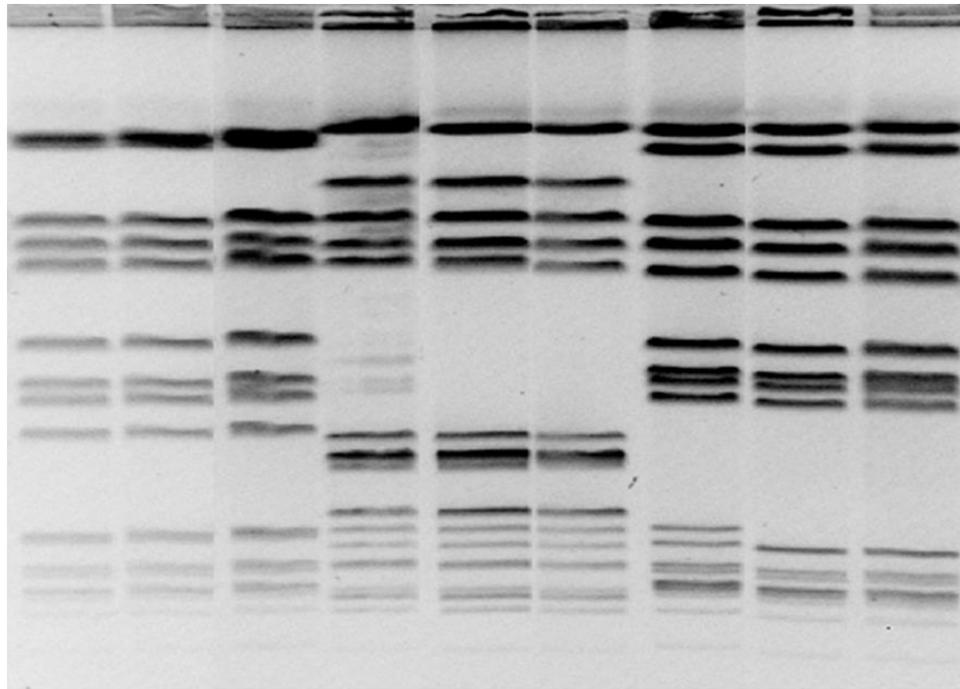


Figura 3-4 Relación del valor PAP/AUC de los aislamientos hVISA con el número de cambios de aminoácidos por proteínas asociados al desarrollo del fenotipo. La intensidad de los cuadros rojos indica el número de cambios presentes para cada proteína. Los aislamientos se organizan según el valor de la relación de PAP/AUC. Los datos sombreados en rojo corresponden a hVISA confirmados por PAP/AUC, en amarillo los hVISA negativos por PAP/AUC y el azul los VSSA confirmados por PAP/AUC. ST: tipo de secuencia. Se incluyeron solo las proteínas que presentaron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los hVISA respecto a los VSSA valor  $p < 0.05$ .

### 3.2.1 Cambios en subpoblaciones heterogéneas con resistencia intermedia a vancomicina presentes en los aislamientos hVISA

Debido a la naturaleza heterogénea del fenotipo hVISA, se quiso evaluar si el genoma de estos aislamientos podría ser heterogéneo también, para ello se secuenciaron dos subpoblaciones por cada aislamiento hVISA confirmados por PAP/AUC (UE1097, UA851 y UCL420) y observar directamente en estas la presencia de cambios adicionales a los detectados en el análisis realizado a las cepas parentales. Inicialmente las subpoblaciones obtenidas o UFC recuperadas a partir de medios suplementados con altas concentraciones de vancomicina (>3 µg/mL) se caracterizaron molecular y microbiológicamente con el propósito de comparar su clonalidad genética con las parentales de donde se obtuvieron.

Todas las subpoblaciones obtenidas fueron confirmadas como SARM por PCR, con tipificación del *SCCmec* concordante a la parental (*SCCmec-I* para las obtenidas de UCL420 y UA851) y *SCCmec-II* para las obtenidas de UE1097, tipificación de *agr* concordante con las parentales y en la relación genética por PFGE, las subpoblaciones tienen un perfil electroforético idénticos a las parentales. Respecto al valor de la CIM a vancomicina determinado por microdilución en caldo, agar, E-test y las pruebas de GRD y MET, no se encontró variación entre las subpoblaciones y la parental, manteniendo el fenotipo hVISA, excepto en la subpoblación UE1097-12 que se clasificó como VISA por microdilución en caldo y agar con una CIM de 4 µg/mL. En el resistoma de las subpoblaciones se observaron los mismos determinantes de resistencia que los aislamientos de donde provinieron. Dado que las características moleculares y microbiológicas se conservaban en las subpoblaciones, se seleccionaron dos subpoblaciones representantes de cada aislamiento para realizar la caracterización genómica. En la figura 3-5 se indican las características de dos subpoblaciones seleccionadas a partir de cada aislamiento.



Aislamiento	<u>UA851</u>	UA851 - 1	UA851 - 10	<u>UE1097- 2</u>	<u>UE1097</u>	UE1097 - 12	<u>UCL420</u>	UCL420- 3	UCL420 -4
CIM VAN <sup>a, b</sup>	1 S	2 S	2 S	1 S	1 S	4 I	1 S	2 S	2 S
CIM VAN <sup>c</sup>	1 S	2 S	2 S	1 S	1 S	2 S	2 S	2 S	1.5 S
GRD	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MET	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fenotipo	hVISA	hVISA	hVISA	hVISA	hVISA	VISA	hVISA	hVISA	hVISA
SCC <sub>mec</sub>	I	I	I	III	III	III	I	I	I
<i>agr</i>	II	II	II	I	I	I	II	II	II
Clon	ST5 CH	ST5 CH	ST5 CH	ST1341 BR	ST1341 BR	ST1341 BR	ST5 CH	ST5 CH	ST5 CH

**Figura3-5 Características moleculares y microbiológicas de las subpoblaciones obtenidas de aislamientos hVISA**, comparación del perfil electroforético de las subpoblaciones por PFGE, CIM VAN<sup>a</sup>: CIM de vancomicina por dilución en caldo, CIM VAN<sup>b</sup>: por dilución en agar, CIM VAN<sup>c</sup>: por E-test. S=susceptible, I=intermedio. BR: clon brasilero, CH: clon chileno/cordobés. Los aislamientos subrayados identifican a los parentales

Empleando los genoma secuenciado de las subpoblaciones se realizó inicialmente la búsqueda de todas las sustituciones presentes en las 46 proteínas, en comparación con los cambios detectados en hVISA parentales (Anexo D), teniendo como resultado que no se identificó cambios adicionales en las subpoblaciones a los encontrados en las parentales UE1097, UA851 y UCL420, excepto la sustitución PotD-Y121D que corresponde a la proteína espermidina/putrescina, que se encontró en la subpoblación UA851-1 pero no en parental UA851 ni en la otra subpoblación UA851-1. Esta sustitución se ubica en el dominio de unión a soluto extracelular bacteriano de la proteína, lo que podría afectar su funcionabilidad alterando el sistema de transporte periplásmico de

poliaminas necesarias en actividades biológicas como síntesis de ácidos nucleicos [135].

### 3.2.2 Identificación de SNPs de subpoblaciones respecto a parentales hVISA

Adicional a la búsqueda de los cambios en las 46 proteínas, se exploró la presencia en general de SNPs en las subpoblaciones respecto al genoma completo de su correspondiente parental, con el propósito de detectar otros cambios posiblemente involucrados con el desarrollo del fenotipo hVISA presentes en otras proteínas no previamente asociadas. Teniendo como resultado un total de SNP variable para cada comparación (de 64 a 125 SNPs); para la comparación de subpoblaciones UCL420-3 y UCL420-34 se identificaron 64 SNPs con 13 y 14 cambios no sinónimas que afecta a 7 y 9 proteínas, para UA851-1 y UA851-10 que presentaron el mayor número de SNPs no sinónimos con 29 y 18 respectivamente afectando 22 y 14 proteínas, mientras que para UE1097-2 y UE1097-12 presentaron 10 y 15 SNPs no sinónimos en 9 y 6 proteínas respectivamente como se indica en la (tabla 3-4).

**Tabla 3-4 Total de SNP presentes en la subpoblación resistente respecto a las cepas parentales hVISA**

Subpoblaciones	Total de cambios	SNPs no sinónimos	N° de proteínas afectadas SNPs no sinónimos	N° de SNPs no sinónimos comunes
UCL420-3	64	13	7	12
UCL420-4	64	14	8	
UA851-1	125	29	22	18
UA851-10	98	18	14	
UE1097-2	73	15	9	11
UE1097-12	75	10	6	

No se identificaron SNPs no sinónimos comunes para todas las cepas comparadas. Sin embargo, se identificaron SNP comunes entre las subpoblaciones obtenidas del mismo parental. Para las subpoblaciones de UCL420 se identificaron 12 cambios comunes, para las de UA851, 18 y para las de UE1097, 11 SNP no sinónimos (tabla 3-4). Estos cambios adicionalmente, se verificaron que no estuviesen presentes en cepas de referencia VSSA como la N135 y la ATCC 29213, encontrando en total 17 SNPs que afectan 11 proteínas con diferentes funciones ( figura 3-6) las cuales se distribuyen así: la mayor cantidad de

proteínas con SNP se identificó en las subpoblaciones de UCL420 entre las que se encuentran proteínas asociadas a fagos, factores de virulencia (PIs) y proteínas con actividad fosfatidiltransferasa, en UCL851 se identificaron SNP en el represor de la B-lactamasa (Blal) y dos proteínas hipotéticas y para UE1097, los cambios afectan la ADN translocasa (FtsK), la transposasa IS431 y proteína de síntesis de capsula (EpsC), las cuales intervienen en procesos biológicos afectados en aislamientos hVISA.

Proteína	Sustitución de aa.	Subpoblaciones										
		ATCC29213	N315	UCL420	UCL420-3	UCL420-4	UA851	UA851-1	UA851-10	UE1097	UE1097-2	UE1097-12
2',3'-nucleótido cíclico 2'-fosfodiesterasa	Thr106Ser											
Activador de la proteína de la familia Hsp90- ATPasa 1	His160Tyr											
Antiadhesina PIs	Ser1251Ala											
Proteína que contiene dominio de tipo HTH Cro / C1	Trp14Leu											
Transposasa, familia IS4	Ala400Ser											
	Ala463Val											
	Gln403Lys											
	Ile462Val											
	Lys413Asn											
Proteína hipotética	Leu10*											
Represor de B-lactamase: Blal	Tyr500His											
FIG01109368: Proteína hipotética	Gly24Val											
FtsK	Asn167fs											
	Phe166Cys											
	Ser168Phe											
Proteína de elemento móvil (transposasa similar a IS431mec)	Glu37Gly											
EpsC	Asp310Asn											

**Figura 3-6 Distribución de las sustituciones identificadas en las subpoblaciones obtenidas de los aislamientos hVISA.** Los cuadros de color azul oscuro indican la presencia del cambio, en amarillo la ausencia y en color gris que esta proteína no fue identificada en el aislamiento.

En general, fue posible detectar cambios genéticos entre las subpoblaciones y sus aislamientos hVISA correspondientes, aunque estos cambios no fueron consistentes en todas las subpoblaciones, lo que pone en manifiesto la variabilidad en los procesos involucrados y cambios que estos presentan.

### 3.2.3 SNPs asociados al fenotipo hVISA

Para complementar el análisis de los cambios genéticos asociados al fenotipo hVISA se buscaron cambios globales presentes en los genomas del estudio que permitiera discriminar los aislamientos hVISA de VSSA. Para esto se emplearon dos estrategias de análisis, en la primera estrategia fue el análisis GWAS (Genome-wide association studies) basados en k-meros, los cuales permiten identificar si existen una asociación estadísticamente significativa entre la presencia un cambio genético (k-mero) y el fenotipo hVISA y, capaz de diferenciar cambios provenientes de la clonalidad de las cepas de aquellos causantes del fenotipo; mientras que el segundo análisis que corresponde al discriminante lineal (LDA) basado en SNP se realizó enfocado en la identificación de cambio que permitan discriminar hVISA y VSSA pertenecientes al ST5.

En el análisis de WGS se extrajeron y contaron los K-meros de longitud variable de (9 a 100 nucleótidos) presentes en todos los genomas del estudio (30 hVISA y 305 VSSA), y con esta información se aplicó un modelo de regresión lineal que permito identificar 162 K-meros estadísticamente significativos ( $p=0.01$ ), y que pueden tener relevancia en la predicción del fenotipo hVISA y VSSA. Estos K-meros fueron alineados respecto a los genomas de los hVISA por PAP/AUC (UE1097, UCL420 y UA851) y la cepa N315 (VSSA) para establecer su ubicación en el genoma, encontrando que 115 k-meros se ubican en regiones codificantes y 45 en regiones no codificantes. En la figura 3-7, en color rojo se representa la ubicación de estos k-meros en los genomas de interés para establecer su anotación.

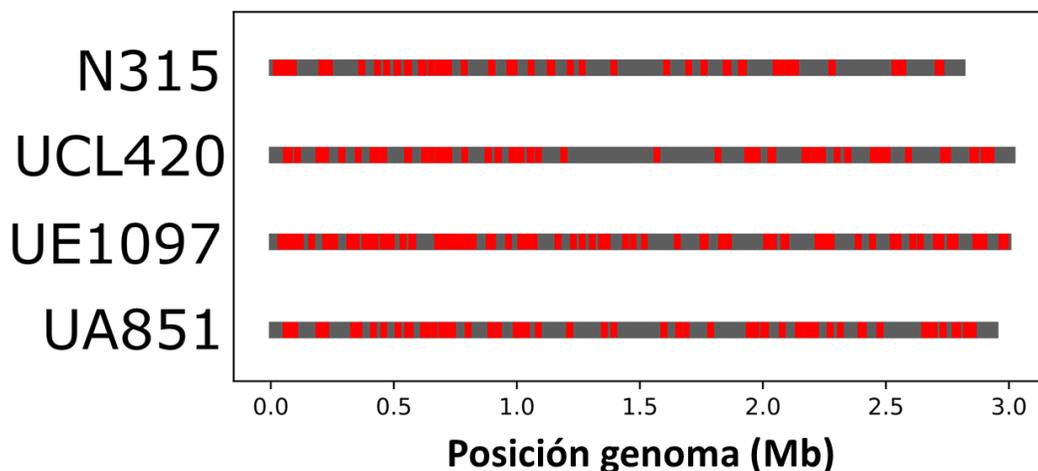
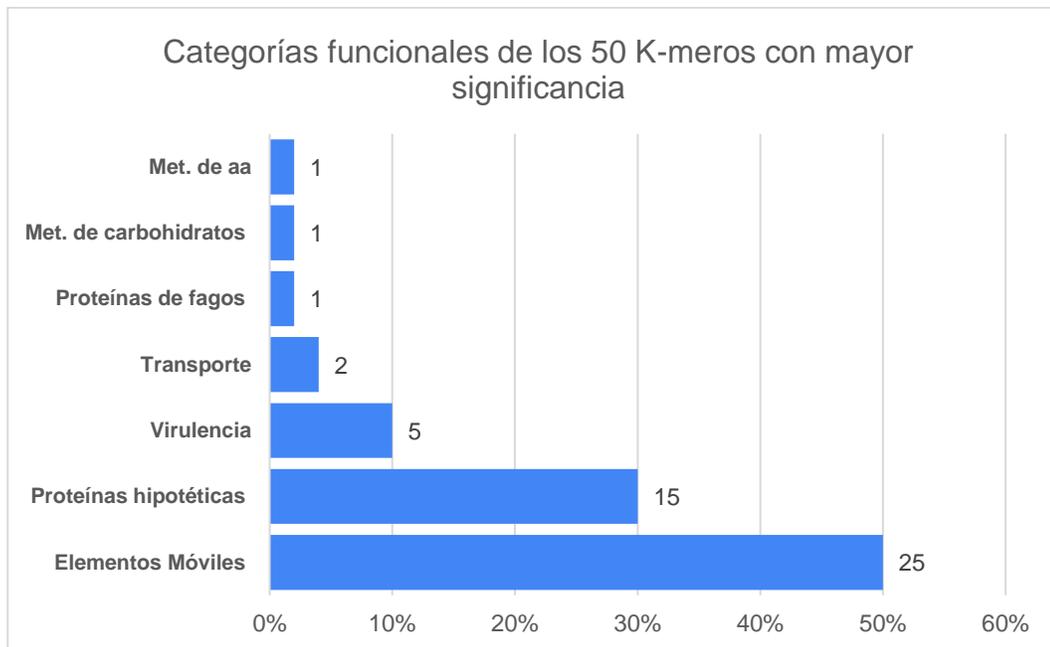


Figura 3-7. Alineamiento de los K-meros significativos en los genomas cerrados hVISA y N315. Las zonas resaltadas rojo indican la ubicación de los K-meros con significancia estadística en el genoma bacteriano.

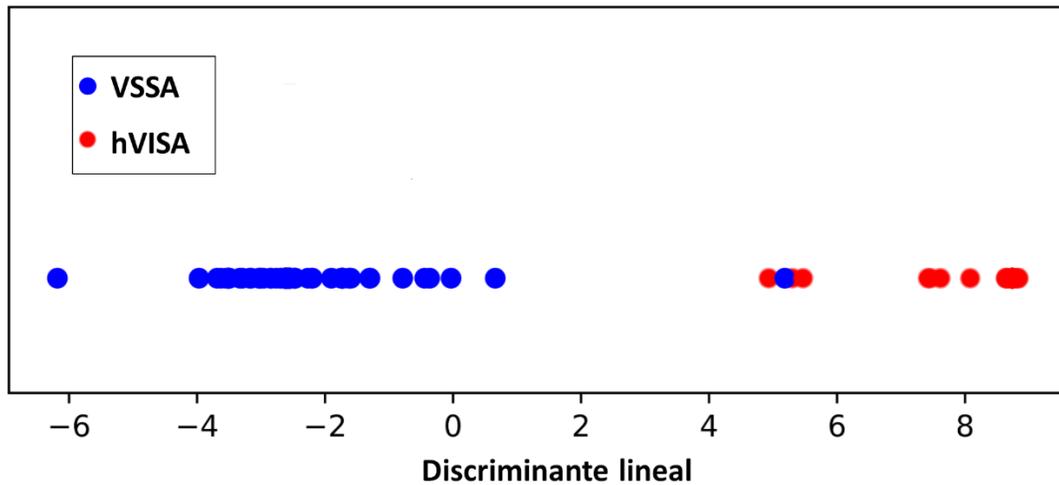
Para la anotación de los K-meros se organizaron por el valor  $p$  más significativo, y se seleccionaron los primeros 50 K-meros de las regiones codificantes, los cuales se agruparon según sus categorías funcionales (figura 3-8), de los cuales el 50% pertenecen a elementos genéticos móviles y el 30% a proteínas hipotéticas, el 20% restante se distribuyó en 10% asociado a virulencia, categoría en la cual se identificaron genes que codifican la adhesina SdrC y SdeE, factor Clumping ClfB, la proteína de unión a fibronectina (FnbA) y antiadhesina PIs de unión al endotelio, el 4% a genes de transporte (proteínas transportadoras tipo ABC y proteína FhuC del transporte del férrico) y en menor proporción (2%) proteínas asociadas a fagos, y metabolismo de carbohidratos y aminoácidos los cuales son características diferenciales en los hVISA.



**Figura 3-8. Distribución en categorías funcionales de los 50 K-meros con mayor significancia estadística.** Los valores al lado de las barras corresponden al número de genes en cada categoría.

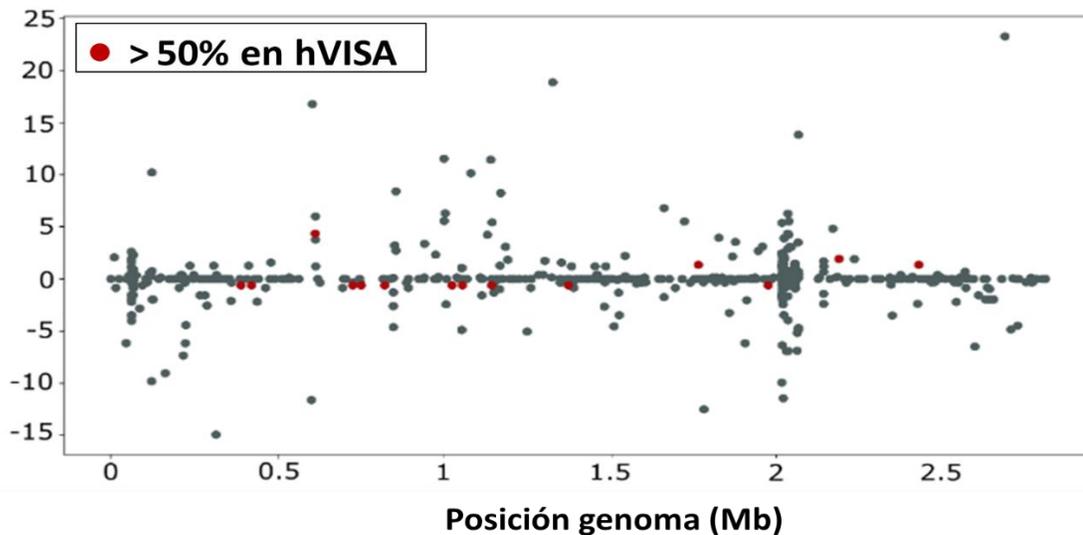
En la segunda aproximación que corresponde al análisis de LDA basado en SNP. En este análisis se incluyeron 165 genomas pertenecientes al ST5, ya que éste es el ST predominante en los aislamientos del estudio, tanto hVISA como VSSA. A estos genomas se les determinó la presencia de SNPs por medio de alineamientos pareados con la cepa N315, con los cuales se calculó el discriminante lineal que permite maximizar la diferencia entre los aislamientos hVISA y VSSA. En la figura 3-9 se observa una clara agrupación de los aislamientos hVISA y VSSA respecto al discriminante lineal (excepto un hVISA incluido en el grupo de hVISA), lo cual indica que los SNP identificados en estos genomas e

incluidos en el análisis permite predecir si un aislamiento corresponde a hVISA o VSSA.



**Figura 3-9. Análisis discriminante lineal de SNP en las cepas de ST5.** Donde se observa la agrupación de las cepas evaluadas; en color azul se representan los aislamientos VSSA y en rojo los hVISA.

De los SNPs incluidos en el análisis se identificaron aquellos que presentaban una diferencia de proporción  $>30\%$  entre cualquiera de los dos grupos (VSSA y hVISA) y se identificaron los SNP con  $>50\%$  de proporción en los genomas de hVISA, lo cual se representa en la figura 3-8 en color gris y rojo respectivamente, adicionalmente en la figura se pueden observar la ubicación de los SNP en relación del puntaje de la discriminación lineal (eje Y) donde los valores positivos corresponden a SNP asociados a hVISA y los negativos a VSSA como se indica en la Figura 3.10.



**Figura 3-10. SNP relevantes identificados entre los genomas hVISA y VSSA ST5 contra el genoma de referencia N315.** Los puntos rojos muestran la ubicación de los SNP con frecuencia superior al 50% en hVISA y los de color gris los que presentan una frecuencia mayor al 30% en cualquiera de los grupos.

En la tabla 3-5 se indican la anotación de las 11 proteínas donde se ubicaron los SNP identificados con una frecuencia >50% en los aislamientos hVISA, los cuales se relacionan con metabolismo de aminoácidos como la ornitina y triptófano, a carbohidratos como la enzima con función oxidoreductasa o acetiltransferasa, la enzima autolítica N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (LytM) que interviene en la formación de la pared bacteriana y a virulencia (adhesina SdrE) entre otros, los cuales permitieron diferencia efectivamente los aislamientos hVISA y VSSA empleando este análisis de LDA.

**Tabla3-5 Anotación de los SNP identificados en el análisis de LDA**

<b>Categoría</b>	<b>Anotación</b>
Met. de los aminoácidos	Ornitina carbamoiltransferasa (arcA)
Met. de los aminoácidos	Indol-3-glicerol fosfato sintasa
Met. de los aminoácidos	Fosfoserina fosfatasa
Met. de los carbohidratos	Familia de acetiltransferasa GNAT
Met. de los carbohidratos	Oxidoreductasa de la familia de la aldo / ceto reductasa
Met. del nitrógeno	Proteína de la familia de las nitroreductasa
Virulencia	Adhesina (SdrE)
Catabolismo de la pared celular	N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (LytM)
Transporte de metales	Proteína periplásmica de transporte de hierro ferroso (EfeO)
Fago	Proteína de infección de fago
Unión de ATP: hipotético	Proteína de unión a ATP hipotética UPF0042

Metabolismo (Met.).

Finalmente, se compararon las anotaciones de los hallazgos en las dos estrategias de análisis para identificar las características comunes presentes en estos aislamientos hVISA, destacando la presencia de 11 proteínas entre las cuales se encuentran factores de virulencia (FnbA, SdrC y SdrE), proteínas transmembranales de unión a fosfato (PstC) como se indica en la tabla 3-6.

**Tabla3-6 Cambios comunes en los aislamientos hVISA por el análisis de LDA y WGAS**

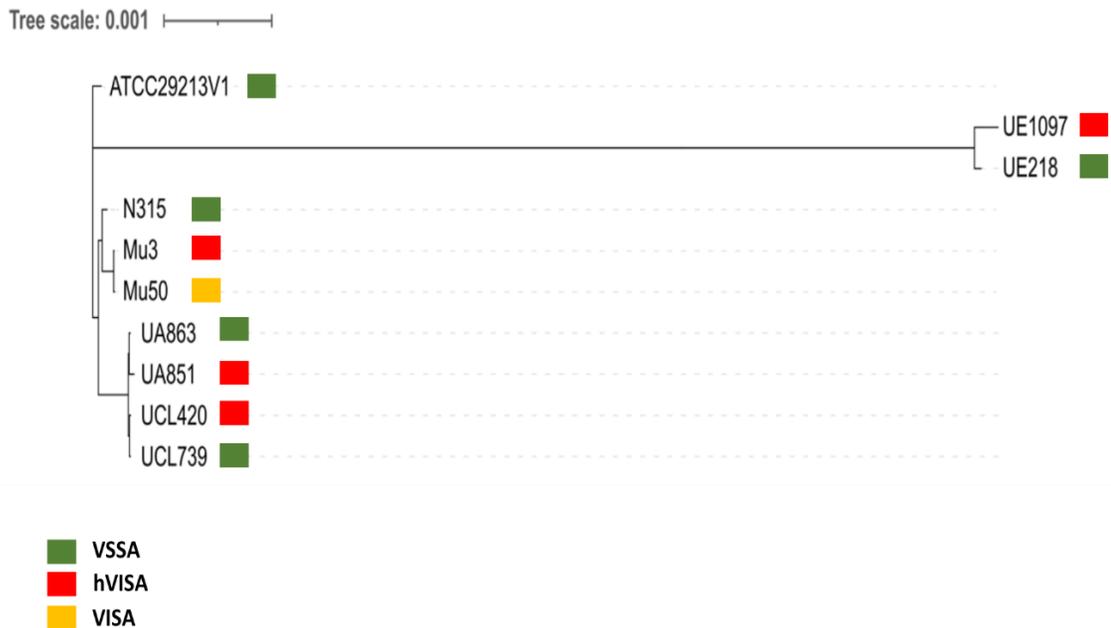
<b>Nombre</b>	<b>Categoría</b>	<b>Anotación</b>
<b>FnbA</b>	Virulencia	Proteína de unión a fibronectina (FnbA)
<b>SdrC</b>	Virulencia	Adhesina (SdrC)
<b>SdrE</b>	Virulencia	Adhesina (SdrD)
<b>PstC</b>	Sistema de transporte	transportador ABC de fosfato permeasa subunidad C
<b>AID38744.1</b>	Sistema de transporte	YjiH: proteína de membrana no caracterizada
<b>FhuC</b>	Sistema de transporte	FepC: sistema de transporte de cobalamina tipo sideróforos
<b>HemL1</b>	Met. de los carbohidratos	Glutamato-1-semialdehído 2,1-aminomutasa
<b>AID38605.1</b>	Metabolismo de los aa	Proteína con dominio de adenilación de aa, péptido sintasa y Lys2B
<b>TruB</b>	síntesis de ARNt	ARNt pseudouridina sintasa B
<b>Hipotético</b>	Proteína hipotética	Proteína hipotética conservada
<b>AID39364.1</b>	Proteína hipotética	Proteína hipotética con dominio DUF86 similar a YutE <i>B.subtilis</i>

Estos resultados en general permitieron identificar cambios genéticos asociados a carbohidratos y aminoácidos, virulencia y sistema de transporte transmembranal entre otro, presentes en aislamientos hVISA y VSSA que pueden favorecer el desarrollo de la resistencia en estos aislamientos y permitir identificación. Además, se pone en evidencia que el aislamientos relacionados con el ST5 presenten cambios genómicos diferentes a los asociados frecuentemente al fenotipo hVISA y VISA, los cuales pueden estar regulando procesos celulares importantes y comunicación bacteriana no identificadas previamente con el desarrollo del fenotipo.

### 3.3 Perfil transcriptómico en aislamientos hVISA

Una vez caracterizados los cambios genéticos de hVISA se exploró el transcriptoma de los aislamientos hVISA circulantes en Latinoamérica con el propósito de identificar posibles cambios transcripcionales (sobreexpresión o sub-expresión de genes) que puedan estar favoreciendo al desarrollo del fenotipo heterogéneo, para conocer de una manera más amplio el perfil biomolecular de estos patógenos.

Se analizó el perfil transcriptómico de las cepas de referencia Mu3 (hVISA), N315 (VSSA), los tres aislamientos hVISA clasificados por PAP/AUC (UE1097, UA851 y UCL420) seleccionados como representantes de los hVISA incluidos en el estudio y tres aislamientos comparadores VSSA (uno para cada aislamiento hVISA), ya que no se contaba con aislamientos VSSA isogénicos de cada hVISA que serían los comparadores ideales. Los aislamientos comparadores fueron seleccionados empleando estos los siguientes criterios: (i) pertenecer a la misma vigilancia, (ii) ser un aislamiento causante de bacteriemia, (iii) ser procedente del mismo país que su par hVISA, (iv) ser clasificado como VSSA por PAP/AUC y (v) presentar una estrecha relación genética con su aislamiento par hVISA como se puede observar en la reconstrucción filogenética basado en SNP del *core* genoma como se observa en la figura 3-11.

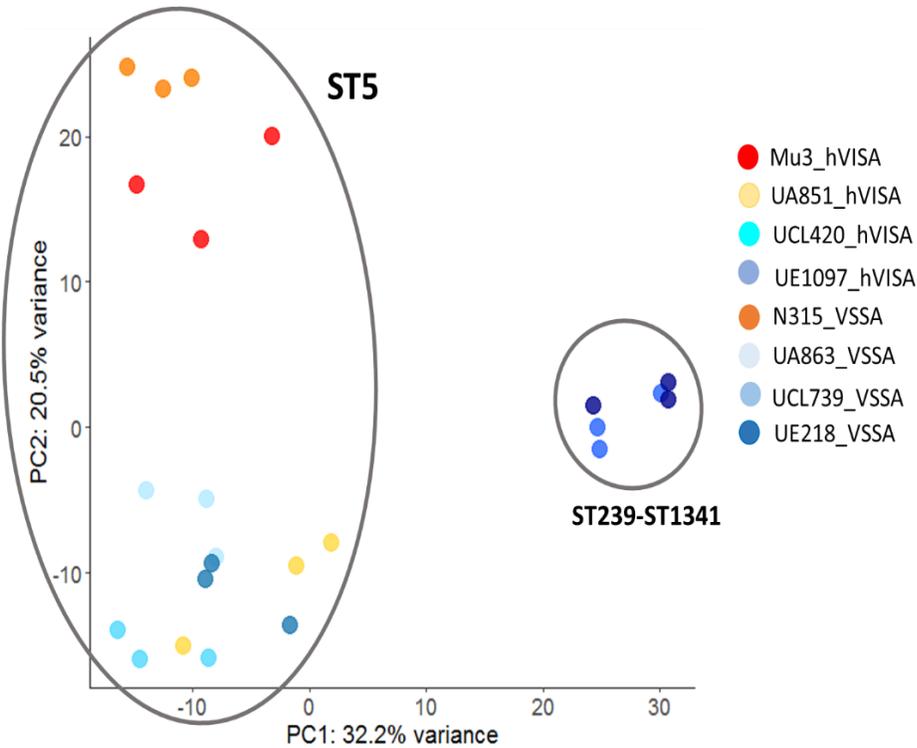


**Figura 3-11 Relación genética de aislamientos SARM con fenotipo hVISA confirmado por PAP/AUC y comparadores VSSA.** La relación fue determinada por el árbol filogenético basado en SNP utilizando el genoma central.

Todos los perfiles transcriptómicos de los aislamientos se analizaron con dos estrategias de análisis con el propósito de identificar cambios relacionados con el desarrollo del fenotipo, en el primero se compararon los perfiles transcriptómicos por pares de aislamientos, es decir, hVISA respecto a su comparador VSSA, y en el segundo se identificaron los genes diferencialmente expresados (GDE) en todos los aislamientos respecto a la cepa de referencia N315 para identificar cambios presentes en todos los hVISA y que no estuvieran diferencialmente expresados en VSSA.

### 3.3.1 Identificación del perfil transcriptómico en aislamientos hVISA

En esta primera exploración se determinó el perfil transcriptómico de cada aislamiento y su cepa comparadora susceptible, en el cual se incluyeron 2.760 transcritos usando como genoma de referencia el cromosoma de N315. Estos perfiles fueron comparados entre sí por medio de un análisis de componentes principales que permitió observar la agrupación entre los perfiles, encontrando que estos se agrupan claramente por tipo de ST o linaje genético, ya que tanto los aislamientos VSSA y hVISA pertenecientes al ST5 se agruparon entre sí, al igual que los asociados al ST1341. Curiosamente no observó una agrupación por perfiles asociado al fenotipo hVISA y VSSA como se indica en la figura 3-12.



**Figura 3-12 PCA del perfil transcriptómico de aislamientos hVISA y VSSA.** En los círculos se encuentra la agrupación de los aislamientos por tipo de secuencia (ST). En la agrupación ST239-ST1341 se hace referencia estos dos ST porque el aislamiento hVISA presenta un ST1341 que es SLV: single locus variant del ST239 presente en el aislamiento VSSA.

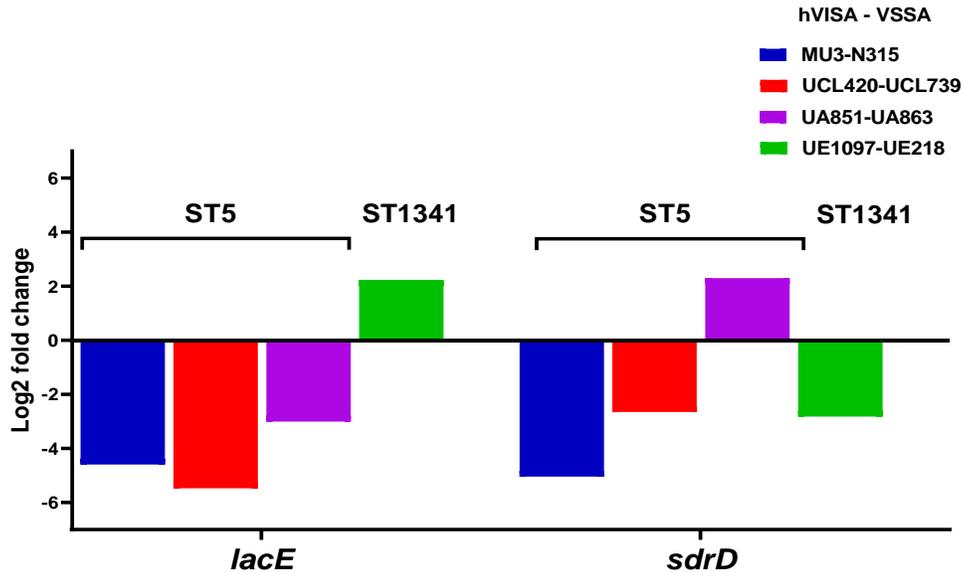
Posteriormente, se determinó los genes diferencialmente expresados (GDE) en los aislamientos hVISA respecto a su par comparador VSSA como se relaciona en la tabla 3-5. Encontrando que el número de GDE identificados para cada par varía considerablemente desde 189 hasta 502, este último resultado para el par de las cepas de referencia (Mu3-N315) que probablemente a pesar de presentar ST5 no presenten una relación evolutiva tan cercana entre ellas.

**Tabla3.-5 Genes diferencialmente expresados en los pares hVISA-VSSA**

hVISA	VSSA comparador	País	ST	GDE
UA851	UA863	Argentina	5	189
UCL420	UCL739	Chile	5	283
UE1097	UE218	Ecuador	1341	205
Mu3	N315	Japón	5	502

Al analizar en detalle la anotación de estos genes para establecer cuáles de estos se

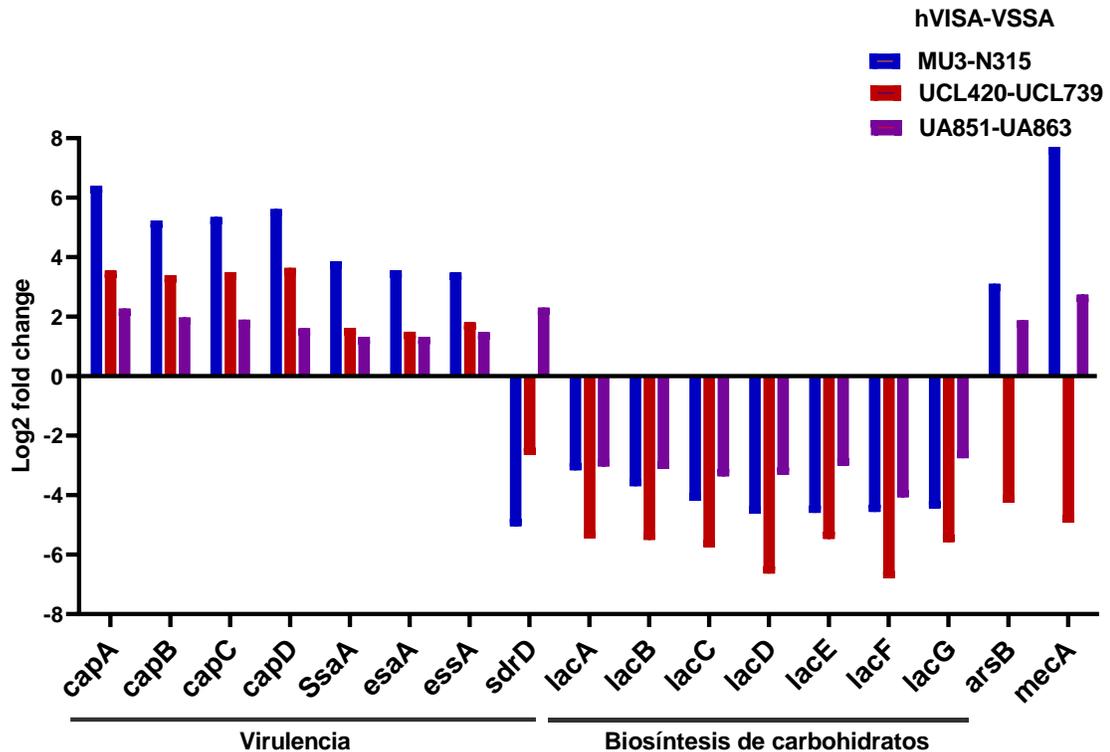
encontraban en común en todos los pares analizados, se identificó que los genes *lacE* y *sdrD* fueron los únicos en común. El componente EIICB del sistema de transporte activo específico de lactosa codificado por *lacE* se encontró subexpresado en todos los pares comparadores perteneciente al ST5 incluyendo el par de referencia Mu3 y N315 el cual no había sido previamente asociados al fenotipo hVISA, mientras que en el par conformado por los aislamientos relacionados al ST1341-ST239 se encontró sobreexpresado 2.2 veces figura 3-13. En el caso de SdrD que es una adhesina (MSCRAMM) anclada a pared bacteriana y rica en repetidos de aspartato – serina involucrada en procesos de supervivencia bacteriana y virulencia se encuentra subexpresada en los aislamientos excepto en el par UA851-UA863 relacionado con el ST5 que se encuentra sobreexpresada 2.3 veces.



**Figura 3-13 Genes comunes diferencialmente expresados en las comparaciones de hVISA vs VSSA.** *lacE*: Sistema de transporte activo específico de lactosa - componente EIICB y *sdrD*: proteína D que contiene repetidos de aspartato - serina. Los aislamientos en color rojo indican los hVISA y en azul corresponde a los VSSA

Debido a la asociación de los aislamientos hVISA con el linaje ST5 se realizó un sub-análisis en el cual se identificaron los genes comunes solo en los pares pertenecientes a este linaje, encontrando 21 genes diferencialmente expresados, entre los cuales se encuentran sobreexpresados los genes asociados capsula (*capA*, *capB*, *capC* y *capD*), el secretor de antígenos (*ssaA*), los codificantes para las proteínas accesorias del sistema de secreción Ess ortólogo del sistema de secreción tipo VII (*esaA* y *essa*) afectando posiblemente la capacidad de virulencia. También se observó una disminución de la

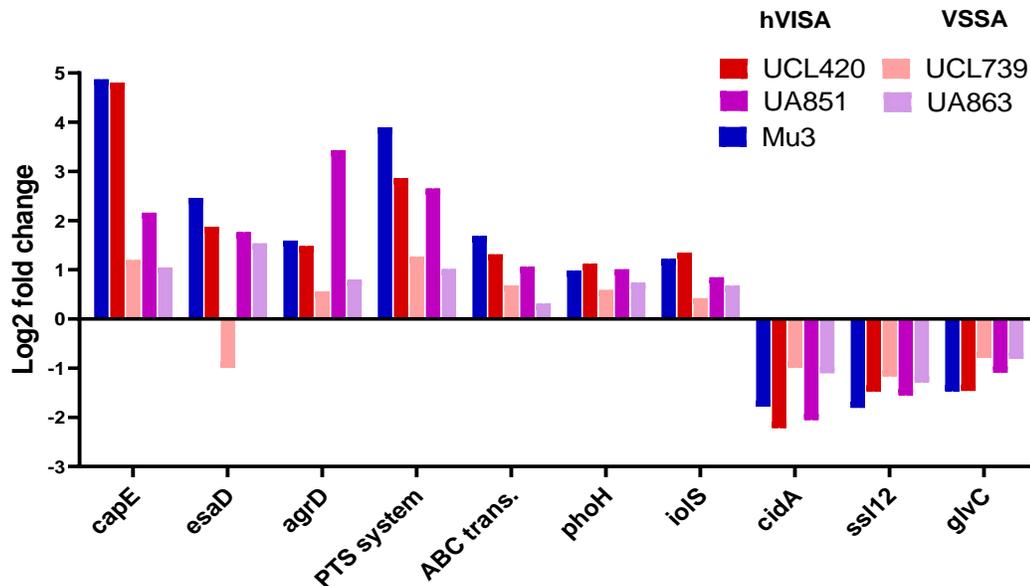
síntesis de carbohidratos debido a la subexpresión del operón Lac (*lacFDCBA*) encargado de la captación de lactosa por vía del fosfatidil piruvato, al igual que la proteína de membrana de la bomba de eflujo de arsénico (*arsB*) y el gen de resistencia a meticilina (*mecA*) en el par UCL420-UCL739 (figure 3-14).



**Figura 3-14 Genes comunes expresados diferencialmente en pares pertenecientes a ST5.** Se identificaron 21 genes, entre los que se encuentran genes de virulencia como los capsulares *cap*, *ssaA*: precursor secretor de antígeno regulada por *walkK*, *esaA* y *essa*: pertenecen al sistema de secreción *Ess* ortólogo de tipo VII que interviene en la adhesión y el operón *LacA-G* involucrado en el metabolismo específico de la lactosa, *arsB* proteína de membrana de la bomba de arsénico. Los DEG no incluidos en la figura corresponden a proteínas hipotéticas.

En la segunda estrategia de análisis se comparó los genes diferencialmente expresados en los aislamientos hVISA y VSSA respecto a los 2.760 transcritos la cepa de referencia susceptible a vancomicina N315. Encontrando 110 GDE en los aislamientos hVISA, sin embargo, de estos no se identificó ninguno sin una expresión diferencial también en los aislamientos VSSA. De igual manera que en el análisis anterior, se restringió la comparación solo a los aislamientos pertenecientes al ST5, identificando 164 GDE en los hVISA de los cuales 15 no estaba diferencialmente expresados en los VSSA. Entre estos genes se encuentran sobrepresados los asociados a la síntesis de la capsula *capE*, el gen *esaD* del sistema de secreción *Ess*, el regulón de fostato (*phoH*) y *agrD* el precursor del polisacárido intracelular de adhesión (PIA) del sistema de detección de quórum y formación de biopelícula. Mientras que la proteína asociada al superantígeno de

*Staphylococcus (ssl12)*, el sistema transportador *givC* y *cidA* que codifica la proteína de membrana que controla el acceso de la mureína hidrolasa a su sustrato que es el peptidoglicano, se encuentran subexpresadas como se observa en la figura 3-15.



**Figura 3-15.** Los genes diferencialmente expresados en hVISA y ausentes en VSSA pertenecientes a ST5 normalizaron respecto a la cepa N315 (VSSA). Se identificaron 15 genes, entre ellos *agrD*: precursor de PIA del sistema de detección de quórum, *cidA*: proteína de membrana que controla el acceso de la mureína hidrolasa a peptidoglicano, *iolS*: cetoreductasa, *phoH*: fosfato regulón. Los DEG no trazados corresponden a proteínas hipotéticas, los aislamientos en colores oscuros representan los hVISA y los de colores claros los VSSA.

Dado que los aislamientos de hVISA presentaron una sobreexpresión significativa del péptido autoinductor *agrD*, el cual activa el sistema *agr* cuando alcanzar altas concentraciones para permitir la regulación de hasta 200 genes de virulencia (según lo reportado en la literatura), se quiso determinar la expresión de viruloma (67 genes) en los aislamientos hVISA y sus comparadores. De todos los genes analizados 36 presentaron una expresión diferencial significativa ( $p \text{ adj. } < 0,05$ ) respecto a la expresión en la cepa N315 como se observa en la figura 3-8. En la cual se puede apreciar que no existe un perfil transcriptómico conservado o predominante en los aislamientos. Sin embargo, se identificaron hallazgos interesantes como la sobreexpresión de la autolisina (Atl) únicamente en los aislamientos hVISA UE1097 y Mu3, las proteínas de adhesión como SdrC, SdrD, la proteína de unión a fibronectina B (FnbB) y las proteínas IcaADC relacionadas con la formación de biopelícula están con tendencia a la subexpresadas en hVISA y VSSA excepto en la Mu3, perfil similar observado en la  $\alpha$ -toxina (Hla) y las enterotoxinas M, N y O asociada a infecciones de piel lo cual es un resultado de esperar ya que estas toxinas se producen principalmente en la fase post-exponencial. Mientras



### 3.4 Discusión

Para determinar los cambios genómicos asociados al desarrollo del fenotipo hVISA en aislamientos recuperados en hospitales de Latinoamérica durante el periodo de 2011-14, se secuenciaron 30 aislamientos SARM con este fenotipo que fueron identificados por GRD y MET, los cuales fueron analizados por varias estrategias de genómica comparativa con el propósito de conocer su perfil genómico y transcriptómico de una forma integral. En los resultados de este trabajo se identificó un amplio perfil de cambios genéticos potencialmente asociados al fenotipo hVISA, sin embargo, no parece haber un perfil de alteraciones definidas o conservadas en todos los aislamientos, lo cual dificulta la comprensión del mecanismo de resistencia, aunque esto sea un resultado concordante con la naturaleza heterogénea y multifactorial del fenotipo, como se ha reportado en caracterizaciones previas de cepas hVISA-ST239 predominantes en el continente asiático [50, 94]. Sin embargo, es de resaltar que los aislamientos hVISA identificados en Latinoamérica asociados principalmente al clon ST5 Chileno/Cordobés se identificaron tres cambios puntuales en reguladores globales (WalK-L14I y VraT- E156G) y en Atl que es la autolisina que interviene en el remodelación de la pared bacteriana, presentes en más del 90% de los aislamientos, los cuales no son cambios característicos de linajes genéticos pertenecientes al CC5, ya que se han observado cambios genómicos conservados los cuales se asocian al linaje genético que se deben de considerar en este tipo de análisis.

El sistema WalKR es el único regulador esencial para la viabilidad de *S. aureus* que es altamente conservado y específico de las bacterias Gram-positivas, que controla procesos importantes como el metabolismo de la pared celular y la división celular [53]. En varios estudios han reportado diversidad de sustituciones de aminoácidos en aislamientos con el fenotipo hVISA y VISA, siendo algunas de las más frecuentes K208R y A96T en el regulador de respuesta WalR; K208R, ΔQ371 y G223D en WalK [26]. El cambio ΔQ371 aunque es uno de los más frecuentes reportados en VISA no se identificó en nuestros aislamientos ni es suficiente para generar el paso de un VSSA a VISA, mientras que el G223D en presencia de GraS-T136I si lo puede realizar como se comprobó por medio de reemplazamiento alélico, ya que la mutación WalK-G223D disminuye la autofosforilación de WalK, reduciendo así la fosforilación del regulador de respuesta WalR, generando una reducción de la actividad de unión de WalR a *alt*, por lo tanto, se da una regulación negativamente de esta autolisina, que puede mediar la resistencia a la vancomicina en

VISA [12, 17, 28]. En este estudio, el aislamiento UE1097, confirmado como hVISA mediante PAP/AUC, fue el único que presentó una sustitución adyacente R222K (arginina por lisina) en el mismo dominio HAMP de Walk, lo que podría estar afectando su función de respuesta ante el estrés de la pared celular. La sustitución L14I (leucina por isoleucina) se encontró en 29 (93.3%) aislamientos y se ubica en el dominio transmembranal que actúa como el transmisor de señal celular [59]. Esta sustitución poco frecuente en aislamientos hVISA no se le ha determinado su rol experimental en el desarrollo de la resistencia [17]. El sistema Walk ejerce una actividad regulatoria en diferentes genes asociados a la síntesis de la pared bacteriana, esto debido a que WalR se une específicamente *in vitro* a las regiones promotoras regulando positivamente autolisinas con actividad endopeptidasa (*lytM*), y hexosaminidasas (*ssaA*, *isaA* y *atl*), que están potencialmente implicadas en la hidrólisis de peptidoglicano. Algunas de las mutaciones en Walk pueden generar una expresión constante de estos genes generando daños fatales para la bacteria [136]. En los aislamientos del estudio se identificó la sustitución LytM-T5I como un cambio estadísticamente significativo presente en mayor proporción en hVISA.

La siguiente sustitución predominante (96.6% hVISA) se presentó en el VraT anteriormente conocido como YvqF, el cual forma parte del sistema regulador VraTSR asociado a resistencia bacteriana a antibióticos, al regular positivamente la biosíntesis y la respuesta a estrés de la pared celular en *S. aureus* [26]. Esta sustitución VraT-E156G que causa un cambio de ácido glutámico (polar) por glicina (no polar) en el dominio de respuesta a los antibióticos puede afectar la funcionabilidad de la proteína, sin embargo, esta hipótesis debe ser comprobada por ensayo de mutagénesis. VraT-E156G se reportó en el 10% de los aislamientos VISA en Corea pertenecientes al ST5 y ST239 sugiriendo que es cambio asociado al fenotipo [134]. Estudios recientes han determinado que VraT regula negativamente a VraSR, ya que estudios de mutagénesis en la cepa USA300-ST8, que cambian aa no polares en VraT y VraU, modificó la resistencia a meticilina *in vitro* debido a la regulación del estímulo de la pared [65]. Otras mutaciones en este regulador como VraT-Y220C, VraS-I5N, VraS-S329L y VraS-L114S-D242G se han asociado experimentalmente con el fenotipo VISA, sin embargo, ninguna de estas se identificó en los aislamientos de este estudio [26].

Las cepas hVISA analizadas presentaron alteraciones en proteínas relacionadas con la envoltura celular bacteriana (pared celular, membrana y los ácidos teicoicos), que pueden

contribuir al desarrollo de resistencia a antibióticos como vancomicina y daptomicina [12, 17]. Entre ellos está la autolisina bifuncional Atl (dominio amidasa y glucosaminidasa) que participa activamente en la remodelación de la pared bacteriana, división celular, adherencia y formación de biopelícula mediada por lisis, en la que se identificó la variación Y38H (tirosina por histidina) en 28 (93.3%) hVISA; ubicada entre el péptido señal y propéptido afectando posiblemente la liberación de la proteína a nivel extracelular. En la cepa mutante UAMS-1 obtenida a partir de un aislamiento clínicos con ausencia de la expresión de *atl* el eliminar de sus dos dominios se redujo la formación de biopelícula y causó inadecuada una división celular anormal formando conglomerados en células bacterianas recién formadas [137]. La sustitución PBP4-A191V, se identificó en el 3.3% de hVISA y ausente en VSSA, cambio que se ha relacionado previamente con VISA y hVISA afectando el dominio carboxipeptidasa, lo que posiblemente podría reducir su actividad en el proceso de reticulación del peptidoglicano [26]. A nivel de síntesis de membrana se identificaron cambios en proteínas regulada por GraSR como GtaB, MprF y PgsA las cuales están en una diferencia de proporción menor al 5% entre los hVISA y VSSA. Es importante resaltar que los cambios identificados en estas proteínas no se han reportados como relevantes en el fenotipo hVISA, además, no se identificó el cambio en MprF-S295L responsable de la resistencia a daptomicina [126].

En los aislamientos VISA y hVISA se ha reportado con relativa frecuencia la presencia de diversas mutaciones en los genes reguladores *rpoB* y *rpoC*, que pueden contribuir en la conversión del fenotipo hVISA a VISA [53, 54]. Una de las mutaciones más frecuentes en RpoB es la H481Y reportada en la cepa de referencia Mu50 (VISA) y confirmada su contribución a la resistencia por remplazo alélico e introducción de *graR*-N197S y RpoB-H481Y que llevó a la conversión de la cepa hVISA a una VISA con el mismo nivel de resistencia a vancomicina que presenta la cepa Mu50 [68], situación similar se presenta con la sustitución H481N, reportada por Hafer *et al.* en el 2012 en aislamientos VISA y hVISA [138], identificada en el 6.6% de los aislamientos hVISA del estudio afectando el dominio RNA polimerasa. Estas dos mutaciones también se han asociado con la resistencia a la rifampicina cuando RpoB contiene una doble sustitución, como H481N + L466S [138] [51]. Consistente con esto, UE1097 exhibe una doble sustitución en RpoB: H481N + I527M, y es resistente a la rifampicina como se observó en la determinación del resistoma y perfil de resistencia.

Para establecer el perfil genético de los hVISA identificados en la región, en este estudio se diseñaron y emplearon diversas estrategias de análisis como la comparación de cambios genéticos presentes en las subpoblaciones resistentes respecto a los aislamientos hVISA parentales de donde fueron obtenidas, se determinaron cambios relacionados al fenotipo identificados por análisis de SNPs y K-meros en el genoma completo de estas cepas empleando análisis como GWAS y LDA, que permitieran identificar marcadores propios del fenotipo en cepas ST5, obteniendo como resultado la identificación de cambios presentes en elementos genéticos móviles, proteínas hipotéticas y adhesinas (SdrC, SdrD y FnbA) que están involucrados en adhesión, colonización y formación de biopelícula permiten la clasificación del fenotipo. De igual manera se identificaron cambios por el análisis de LDA maximizar las diferencias presentes entre los hVISA y VSSA y permitir su clasificación, vinculados a metabolismo de aminoácidos (ornitina y triptófano), a enzimas con función oxidoreductasa, acetiltransferasa, y autolítica como la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa que interviene en la formación de la pared bacteriana. Sin embargo, estos resultados colocan nuevamente en evidencia la complejidad de este fenotipo heterogéneo, la diversidad genética que conlleva las adaptaciones fisiológicas en estos patógenos y la falta de soporte experimental que permita relacionar estos cambios con la disminución de la resistencia.

En este estudio, se profundizó en la caracterización de los hVISA confirmados por PAP/AUC y sus cepas comparadores VSSA con el propósito de establecer los cambios transcripcionales que permitieran describir de forma global la adaptación fisiológica de estas cepas. Inicialmente al comparar los perfiles transcriptómicos de los aislamientos se identificó una relación de estos por linajes ST5 y ST239 y no por fenotipo, siendo estos ST los frecuentemente asociados al hVISA y VISA con 58.6% y 14.4%, respectivamente [94]. Aunque es importante resaltar que los aislamientos de nuestro estudio pertenecen únicamente a estos dos linajes, lo cual puede ser una limitante superada si se analizaran aislamientos de otros linajes.

A nivel de las comparaciones de los GDE entre todos los pares analizados se identificó cambios significativos en la sobreexpresión de SdrD y lacE en los pertenecientes al ST5 y aumento de expresión en el par ST1341 (SLV- ST239). La sobreexpresión de SdrCDE fue reportada en aislamientos clínicos SARM y SASM con resistencia intermedia a vancomicina del linaje ST239 [139] y se ha demostrado que la regulación positiva de

SdrCDE contribuye en procesos de virulencia permitiendo la adherencia a células escamosas, inducción de la formación de biopelícula que permite evadir el sistema inmune del hospedero y persistencia de infecciones causadas por *S. aureus*, como se determinó en un modelo de endocarditis experimental [140].

El gen *lacE* perteneciente al operón LacABCDFEG que codifica la permeasa EII, la cual es responsable del transporte activo de lactosa en *S. aureus*. Aunque no se ha relacionado específicamente con el desarrollo del fenotipo VISA o hVISA, puede reducir el crecimiento bacteriano, generando que las bacterias puedan entrar en la fase estacionaria de una forma más temprana en presencia de lactosa (cultivos en TSB). La capacidad de entrar antes en la fase estacionaria puede contribuir a la virulencia ya que las bacterias dediquen su esfuerzo energético a la producción del factor de virulencia en lugar del crecimiento. Por ejemplo, la toxina  $\alpha$  y TSST-1, no alcanza niveles máximos hasta que *S. aureus* deja de crecer [141]. Esta característica de crecimiento lento es una característica típica de los aislamientos hVISA y VISA asociado a la formación de variantes de colonias pequeñas (SCV) mediado por alteración de producción de ATP, transporte de electrones y presencia de los genes *hemB* y *hemL1*. El crecimiento lento o presencia de SVC promueve el desarrollo de infecciones persistentes al evadir el sistema inmune del huésped cuando invade las células. Adicional a la presencia de SCV se ha identificado la sobreexpresión de Hla, TSSt-1 y Agr [12, 142, 143]

Al restringir este análisis transcripcional a los hVISA del ST5, linaje predominante en los hVISA analizados, se identificó sobreexpresión en los genes *capA*, *capB* y *capD* que forman parte de los genes capsulares. En varios estudios se han demostrado que la producción de cápsulas está regulada a la sobreexpresión en cepas VISA; por ejemplo, en Mu50 se encuentra sobre-expresada la capsula respecto a la cepa susceptible Newman, tanto en la fase de crecimiento exponencial como estacionaria. Sin embargo, las mutaciones que dan como resultado la ausencia de cápsula no tienen efecto sobre la resistencia a la vancomicina de las cepas VISA [144]. Otro hallazgo importante fue la sobreexpresión de *essA* y *esaA* que son proteínas de membrana pertenecientes al módulo 1, altamente conservados en el sistema de secreción similar a ESAT-6 (ESS), los cuales intervienen en lesiones persistentes como abscesos y la modulación de la respuesta inmune durante la infección del torrente sanguíneo [145], los cuales se han visto esporádicamente relacionados en cepas hVISA como la cepa 6R-P derivada de Mu3, pero sin tener claro el

mecanismo [146].

En el segundo análisis de comparación donde se identificaron los GDE en todos los aislamientos ST5 respecto a la cepa N315, se identificaron que genes los *agrD*, *phoH*, *cid* y *ssI* presentan diferencia de expresión en los hVISA y no en los VSSA. En el caso de *agrD* este hace parte de regulador *agr*. Este consta de dos unidades de transcripción divergentes reguladoras por los promotores P2 y P3 [147]. El operón P2 codifica para AgrC (receptor), AgrA (regulador de respuesta) las proteínas AgrB y D necesarias para producir y secretar un péptido autoinductor (AIP) codificado por *agrD* que se une a AgrC. AgrA se encarga de activar la transcripción de su propio promotor y del promotor P3, para la síntesis de RNAIII que regula la producción de adhesinas y proteínas secretadas. Mutaciones en *agr* dan como resultado la pérdida de la producción de RNAIII y por consiguiente de la alfa-toxina y proteína A (Spa). En cepas de *S. aureus* como COL y Mu50 (VISA) no producen proteína A en la fase post-exponencial lo cual sugiere no funcionalidad de *agr*, resultados similar al presentado en los hVISA y VSSA del estudio [147].

Respecto al operón *cidABC* encargado de la actividad mureína hidrolasa es regulado por las concentraciones de ácido acetato, en los aislamientos hVISA y VSSA pertenecientes al ST5 se identificó una sobreexpresión tanto en los hVISA como los VSSA, aunque esta sobreexpresión fue más notoria en las hVISA (entre -1.1 a -2.2 veces), siendo este resultado contradictorio a los reportado en cepas VISA como MU50 y cepas isogénicas con altos niveles de resistencia en los cuales se observó aumento de la transcripción de *cidABC* relacionado con la gravedad del deterioro de catabolismo del acetato en esta cepas. Esta diferencia de resultados se puede deber a que durante la fase de crecimiento medio exponencial en la cual se realizó el análisis transcriptómico no evidencia esta alteración en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y por ende en el operón *cidABC*, la cual es más marcada en la fase post- exponencial [148].

### 3.5 Conclusiones

- La mayoría de aislamientos hVISA identificados en Latinoamérica presentaron cambios genéticos en sistemas reguladores globales como *WalKR* y *VraTSR* y la autolisina *Atl* involucrados en procesos de síntesis de la pared bacteriana.
- No se evidenció ninguna relación entre la relación de PAP/AUC con el número o

tipo de sustituciones presentes en los aislamientos hVISA.

- Los modelos de análisis de GWAS y LDA pueden ser una herramienta de análisis adecuada que permite identificar cambios asociados al metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, catabolismo de la pared bacteriana y virulencia que permite clasificar los aislamientos con fenotipo hVISA de los VSSA.
- Los únicos cambios transcriptómico identificado en común en los aislamientos hVISA involucran el metabolismo de carbohidratos (*lacE*) y virulencia con la adhesina SdrD, lo que sugieren que los cambios no son conservados entre linajes de SARM con el fenotipo hVISA en especial los del ST5 y ST1341.
- Los perfiles transcriptómicos sugieren que la sobreexpresión en genes con actividad autolítica de la envoltura celular (*ssaA*), cápsula (*capA,B,C,D*), adherencia celular mediada por sistema de secreción Ess (ortólogo de tipo VII) y *sdrD*, son cambios adaptativos de pueden intervenir en el desarrollo de la susceptibilidad disminuida en los aislamientos SARM pertenecientes al linaje ST5, al igual que sub-expresión de la mureína hidrolasa (*cidA*) relacionados con alteración en el metabolismo del acetato.
- Todos los aislamientos hVISA evaluados formar biopelícula, de los cuales el 83.3% con una adherencia moderada y 16% con fuerte adherencia, mientras que el 56% de los aislamientos VSSA son no formadores o débilmente formador de biopelícula lo cual puede ser una característica favorecida o relacionada a la presencia del fenotipo HVISA.

## **Capítulo IV**

## 4. Cambios metabólicos de aislamientos hVISA ST5

La disminución de la susceptibilidad a vancomicina en *S. aureus* está mediada por adaptaciones fisiológicas y metabólicas que le permiten mantener su viabilidad y crecer en presencia de vancomicina. Algunas de las adaptaciones más comunes son la disminución del recambio de la pared celular y la reducción de la actividad autolítica que causan engrosamiento de la pared, que a su vez evita el acceso de las moléculas de vancomicina al septo bacteriano al quedar capturadas en las capas más externas de la envoltura celular, permitiendo la supervivencia de la bacteria [87].

La caracterización genética y transcriptómica de cepas VISA han permitido identificar cambios en el metabolismo de ácidos grasos necesarios para la síntesis de membrana celular, en transportadores ABC y en el catabolismo de la fructosa que afecta la formación de la pared celular, lo que se ve reflejado en el agotamiento de metabolitos como glucosa, glutamina, acetato entre otros, como se ha reportado en las cepas Mu50 [45]. Sin embargo, la diversidad de alteraciones genéticas en los hVISA y VISA pueden variar significativamente entre los linajes genéticos, por ejemplo, en los aislamientos hVISA identificados en Latinoamérica se detectaron cambios en los sistemas reguladores globales WalkR y VraTSR que se encargan de la respuesta al estrés en la pared bacteriana y reducción en Atl que controla el recambio de la misma, así como reducción del metabolismo de carbohidratos, acetato, adhesinas entre otros hallazgos, lo cual hace necesario caracterizar de una forma integral la funcionabilidad de los procesos celulares ya que, en los sistemas biológicos se presenta redundancia y algunas funciones pueden ser suplidas por una vía alterna. Esta caracterización funcional es de gran interés en la determinación del perfil molecular de estos aislamientos hVISA asociados principalmente al ST5 lo que permitirá comprender con mayor claridad el efecto de estos cambios en las

adaptaciones fisiológicas que favorecen el desarrollo del fenotipo en aislamientos locales.

Una herramienta muy valiosa y poco utilizada en la caracterización de este fenotipo es la determinación de perfiles metabolómicos, el cual permite realizar análisis comparativo de compuestos orgánicos celulares con pequeño tamaño molecular (inferior a 1000 Daltons), los cuales son un reflejo directo del estado fisiológico de una célula y que permite comprender la función celular, ya que la perturbación en una ruta metabólica puede causar no solo daño a la célula, sino un efecto protector en las bacterias, optimizando su gasto energético, reduciendo el nivel de subproductos metabólicos citotóxicos, inhibiendo la captación de antibióticos o moléculas extracelulares y / o ralentizar el crecimiento celular para optimizarlo.

## **4.1 Materiales y métodos**

### **4.1.1 Extracción de metabolitos intracelulares de aislamientos hVISA**

Para la caracterización metabolómica no dirigida de aislamientos hVISA se extrajeron los metabolitos intracelulares de los hVISA (UA851 y UCL420) pertenecientes al ST5, sus respectivos aislamientos VSSA comparadores (UA863 y UCL739) y las cepas de referencias Mu3 y N315. Los metabolitos intracelulares se obtuvieron a partir de pellet bacterianos del crecimiento en 20 mL de tripticasa soya (TSB) sin presencia vancomicina en la fase media del crecimiento exponencial (Abs a 625nm entre 0,5-0,6), los cuales fueron obtenidos por centrifugación del crecimiento bacteriano a 9.000 rpm por 5 min a 4°C, el sobrenadante se descartó y se realizó un lavado con 1,5 ml de solución salina estéril 0,65% a 4°C y posterior centrifugación a 9.000 rpm por 5 min a 4°C, se repitió el proceso de lavado pero con una centrifugación a 13.000 rpm por 5 min a 4°C, se descartó nuevamente todo el sobrenadante. Los pellets obtenidos fueron almacenados de inmediato a -80° hasta el momento de la extracción. Se realizaron dos pellets por cada una de las cinco replicas independientes por aislamiento. Esta extracción de metabolitos se realizó en las mismas condiciones de crecimiento bacteriano empleadas en los ensayos transcriptómicos con el propósito de integrar los resultados obtenidos.

Los pellets bacterianos se descongelaron en cama de hielo, inmediatamente, se adicionó 0.5 mL de perlas de 0.1 mm y 1 mL de Etanol al 60% con ribitol 10 µg/mL. Luego estas mezclas se llevaron a TissueLyser (1 min, 30 Hz, 4 veces) para hacer el proceso de lisis, para luego centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C, el sobrenadante fue separado y centrifugado nuevamente a durante 5 min a 10.000 rpm a 4°C con el fin de eliminar cualquier residuo de perlas. Finalmente, se transfirió 80 µl de esta sobrenadante a un vial de LC-MS para los análisis posteriores por cromatografía líquida de fase reversa acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (RP-LCMS-QTOF) y cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) por cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (LC/MSQTOF). Los análisis cromatográficos fueron realizados por medio de un servicio técnico-colaborativo con el Centro de Metabolómica Met-Core de la Universidad de los Andes.

Paralelamente, se prepararon los controles de calidad (QC) los cuales se obtuvieron mezclando volúmenes iguales del extracto metabólico de cada muestra siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, para determinar la reproducibilidad de la preparación de las muestras de extracto metabólico y la estabilidad de la plataforma analítica utilizada. Se realizaron varias corridas de control de calidad antes del análisis de todas las muestras hasta que se logró el equilibrio del sistema analítico. También se analizaron muestras de extractos metabólicos de QC cada seis muestras inyectadas de forma aleatoria.

#### **4.1.2 Detección de huellas metabólicas mediante LC/MS**

El análisis metabólico no dirigido de las muestras se analizó empleando un sistema de Cromatografía de Líquidos (LC) Agilent Technologies 1260 acoplado a un analizador de masas de cuadrupolo con tiempo de vuelo Q-TOF 6545 con ionización por electrospray. Se inyectaron 10 µL de cada muestra en una columna C18 (InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (100 x 3.0 mm, 2.7 µm). La separación se realizó a 30°C y en una fase móvil compuesta por: 0.1 % (v/v) de ácido fórmico en agua Milli-Q (Fase A) y 0.1 % (v/v) de ácido fórmico en acetonitrilo (Fase B) con un flujo constante de 0,5 mL/min. La detección por espectrometría de masas (MS) se realizó en modo ESI positivo en full scan de 70 a 1100 m/z. Durante todo el análisis, para la corrección de masas se emplearon dos masas de referencia: m/z 121.0509 (C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>) y m/z 922.0098 (C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>F<sub>24</sub>).

### 4.1.3 Detección de huellas metabólicas mediante HILIC-LC/MS

Las muestras se analizaron adicionalmente con el sistema de Cromatografía de Líquidos (LC) Agilent Technologies 1260 acoplado a un analizador de masas de cuadrupolo con tiempo de vuelo Q-TOF 6545 con ionización 0, 5 10, 5 22, 95 24, 95 24.1, 5 32, 5 0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 0 5 10 15 20 25 30 35 Fase B (%) Tiempo (min) 5 por electrospray. 5  $\mu$ L del extracto de metabolitos fueron inyectados en una columna Kinetex HILIC 100A (150 x 3.0 mm, 2.6  $\mu$ m) a 40°C y una elución en gradiente compuesta de: 10 mM acetato de amonio en acetonitrilo: agua (50:50) (Fase A) y 10 mM acetato de amonio en acetonitrilo: agua (95:5) (Fase B) con un flujo constante de 0,4 mL/min. La detección por espectrometría de masas se realizó en modo ESI negativo en full scan de 50 a 1100 m/z. Durante todo el análisis, para la corrección de masas se emplearon dos masas de referencia: m/z 121.0509 (C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>) y m/z 922.0098 (C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>F<sub>24</sub>).

### 4.1.4 Tratamiento de datos en metabolómica no dirigida por LC/MS y HILIC-LC/MS

Los compuestos presentes en el análisis de LC-MS fueron analizados e inspeccionados manualmente utilizando el software Agilent Mass Hunter Profinder 10.0, empleando el algoritmo Recursive Molecular Extraction con condiciones de extracción de 0-24 minutos; 10000 conteos, especies de iones positivas (+H, +Na) y para las muestras analizadas por HILICLC/MS se emplearon condiciones de extracción de 0-16 minutos; 10000 conteos, especies de iones positivas (+H, +Cl, +CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>). Este algoritmo realiza una deconvolución del cromatograma e integración de las características moleculares presentes en las muestras y en el blanco de solvente de acuerdo con la masa y el tiempo de retención. Los datos obtenidos del alineamiento, deconvolución e integración fueron filtrados por reproducibilidad y por presencia. Para el filtrado por reproducibilidad, se calculó el coeficiente de variación (CV) del área en las muestras de Control de calidad (QC) y se eliminaron las características moleculares con 7 CV > 20%. Posteriormente, para el filtrado por presencia se mantuvieron los datos que estuvieran presentes en la totalidad de las muestras de al menos un grupo.

### 4.1.5 Análisis estadístico

Las diferencias significativas entre las huellas metabolómicas de los aislamientos hVISA y VSSA pertenecientes al ST5 obtenidas dentro de cada técnica, se evaluaron mediante análisis estadístico multivariado (MVA) y univariado (UVA). Los MVA se realizó utilizando SIMCA-P + 16.0 (Umetrics, Umea, Suecia). En este caso, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para evaluar la distribución y la calidad de las muestras analizadas. Luego, se realizó un método supervisado, regresión ortogonal de mínimos cuadrados parciales (OPLS-DA) para maximizar las diferencias entre hVISA y VSSA, y para seleccionar las características moleculares responsables de la separación entre los grupos diferentes. El UVA se realizó empleando Matlab (7.10.0 Mathworks, Inc., Natick), en donde el valor p se determinó mediante pruebas paramétricas (prueba U de MannWhitney) y se calculó el p valor con una corrección de False Discovery Rate post hoc (FDR). Para estas comparaciones, las características moleculares estadísticamente significativas se seleccionaron con los siguientes requisitos: 1) UVA: p-value < 0.05 de la prueba de hipótesis y 2) MVA: varianza importante en la proyección (VIP) > 1 con intervalo de confianza Jack-knife (JK) sin incluir 0.

### 4.1.6 Identificación de metabolitos

La anotación de los metabolitos obtenidos con abundancia estadísticamente significativas entre las comparaciones de los hVISA y VSSA se realizará teniendo en cuenta tres herramientas de identificación: Molecular Formula Generator, CEU Mass Mediator y análisis de datos de autoMS/MS. Adicionalmente se realizó la anotación empleando estándares de metabolitos. Para los metabolitos se generó su fórmula molecular basados en datos experimentales empleando el Software Agilent MassHunter Qualitative 10 con los siguientes parámetros: para LC/MS ion positivo (+H, +Na) y elementos (H, C, O, N, P) mientras que para HILIC-LC/MS se emplearon Ion negativo (-H, +Cl, +CH<sub>3</sub>COO) y elementos (H, C, O, N, P).

Con las fórmulas generadas por el algoritmo, se realizó una búsqueda con las bases de datos de METLIN (metabolitos y lípidos) de los compuestos presentes en la muestra QC. Esto se llevó a cabo aplicando el algoritmo Identification workflow con las dos bases de datos previamente mencionadas. Posteriormente, la anotación de los metabolitos obtenidos se realizará empleando las bases de datos KEGG (<http://genome.jp/kegg>),

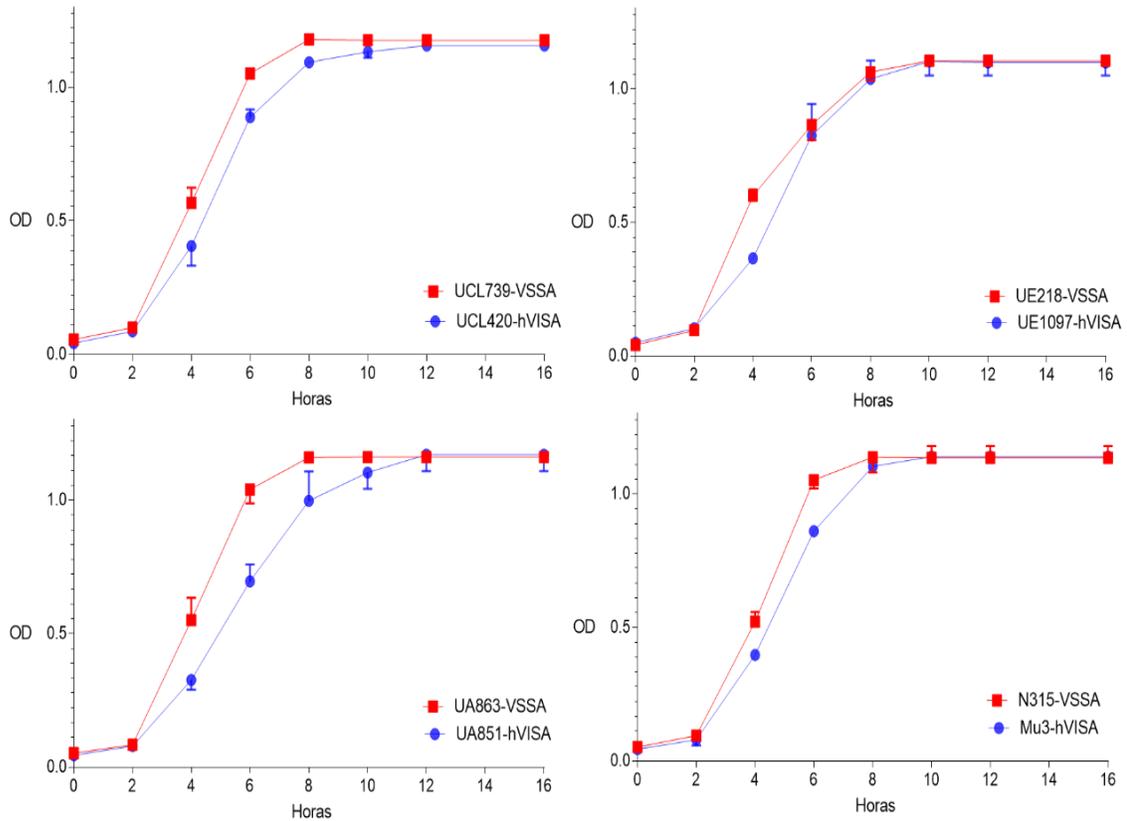
MAPS de lípidos ( <http://lipidMAPS.org> ) y HMDB ( <http://hmdb.ca> ) con la herramienta CEU Mass Mediator ( <http://ceumass.eps.uspceu.es/mediator/> ). Finalmente, algunos metabolitos significativos de LC-MS se analizaron adicionalmente mediante análisis MS / MS, con el fin de confirmar la identidad del metabolito.

El mapeo de las vías metabólicas se realizó utilizando la herramienta MetaboAnalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>), que integra dos enfoques de análisis de vías, el enriquecimiento y el análisis de vías de topología. Para ello se cargó y procesó la lista de nombres de compuestos de metabolitos significativos identificados utilizando la biblioteca del *S. aureus* N315 [ 57 ].

## 4.2 Resultados

El análisis metabolómico se realizó con el propósito de comparar los cambios en los perfiles de metabolitos presentes en los aislamientos hVISA respecto a comparadores VSSA e identificar perturbaciones que puedan favorecer el desarrollo del fenotipo. Para ello se realizó la extracción de los metabolitos intracelulares de dos pares de aislamientos clínicos; cada par conformado por un hVISA y un aislamiento VSSA comparador, más las cepas de referencian Mu3 y N315, todos pertenecientes al ST5. Este análisis se restringió específicamente a este linaje debido a que es el predominante en los hVISA identificado en la región, además, que los cambios genéticos como transcriptómicos presentan una asociación con el linaje.

Para determinar el perfil metabolómico de los aislamientos se analizaron cinco replicas biológicas independientes de los metabolitos intracelulares extraídos en la fase media de crecimiento exponencial sin presencia de vancomicina para no afectar la viabilidad de las células. Inicialmente se observó de forma consistente una reducción en las curvas de crecimiento de los aislamientos respecto a los VSSA como se puede observar en la figura 4-1. Lo cual da una primera evidencia de diferencias esenciales en el metabolismo de los hVISA, los cuales pueden ser respuesta a condiciones de estrés dadas limitaciones en el uso o asimilación de nutrientes, optimización de los recursos energéticos de las células bacterianas como sucede en las variantes de colonias pequeñas (SCV), las cuales presentan un crecimiento lento, tamaño irregular de las colonias y disminución de la pigmentación debido a cambio en la cadena de transporte de electrones.



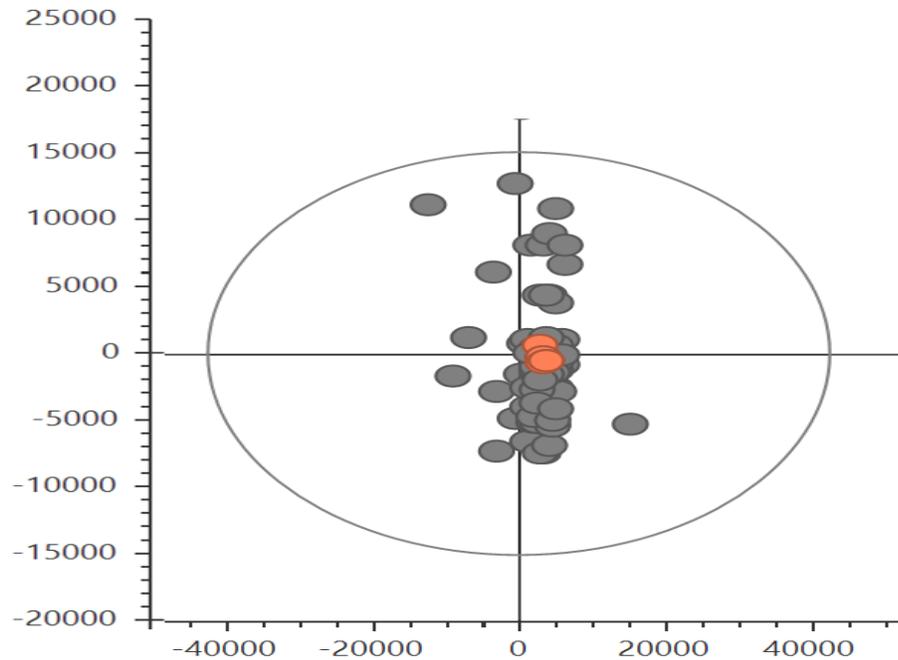
**Figura 4-1. Crecimiento fisiológico de hVISA y comparadores VSSA.** Curvas de crecimiento de pares hVISA y VSSA en caldo tripticasa soya (TSB) sin antibiótico incubado a 37°C a 170 rpm. Los resultados presentados corresponden a tres replicas independientes

#### 4.2.1 Caracterización metabólica de los aislamientos hVISA y VSSA -ST5

La identificación de los metabolitos intracelulares de aislamientos hVISA y VSSA pertenecientes al ST5 se realizó empleando las plataformas de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC/MS) que permite identificar gran variedad de metabolitos como nucleósidos, nucleótidos, cofactores, azúcares, ácidos grasos entre otros y cromatografía líquida de interacción hidrófila (HILIC-LC/MS) que permite identificar con mejor resolución que LC/MS metabolitos polares, neutros y ácidos orgánicos, las cuales se emplearon con el objetivo de detectar el mayor número de metabolitos de diferentes características químicas.

Inicialmente se determinó el rendimiento de las dos plataformas analíticas por medio del agrupamiento de los datos en un modelo de análisis de componentes principales (PCA),

que permitió evidenciar que las muestras cumplían con los patrones de control de calidad y reproducibilidad teniendo en cuenta la variación biológica y el sesgo experimental. Este análisis se emplea para descartar valores atípicos que puedan alterar el análisis de los datos, sin embargo, en este experimento todas las réplicas de las muestras cumplieron los criterios y no fue necesario eliminar ningún dato, como se puede observar en la figura 4-2.

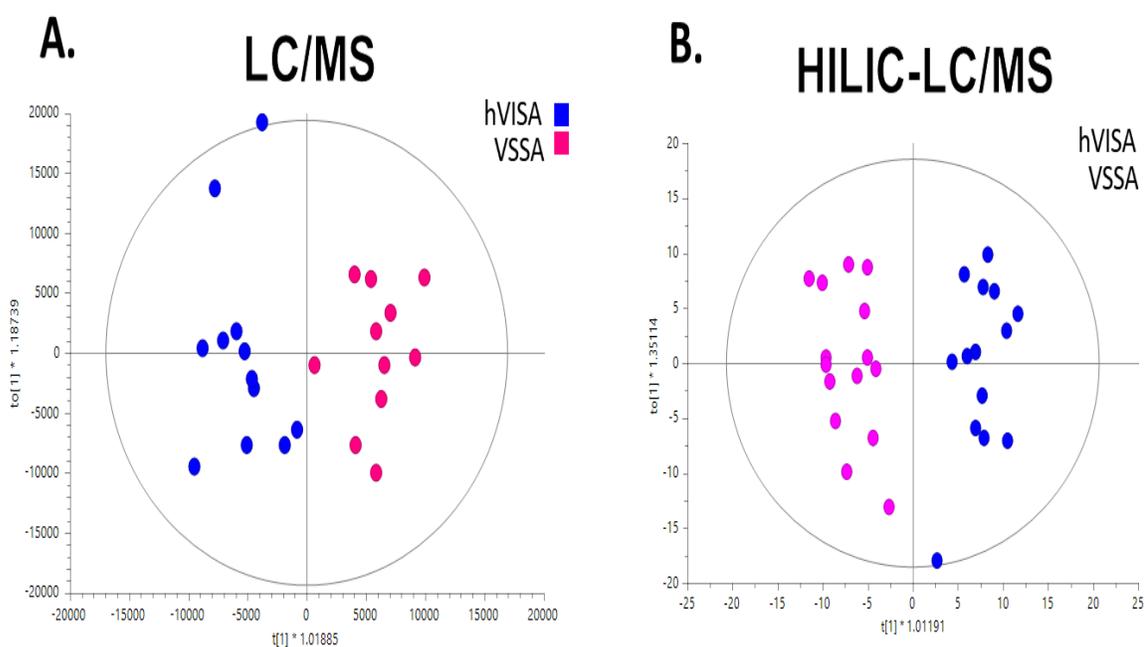


**Figura 4-2. PCA de control de calidad de metabolitos analizados.** Puntuación de PCA para el conjunto de datos filtrados por presencia y reproducibilidad puntos grises muestras analizadas y puntos naranja controles de control de calidad, si se presentaran datos por fuera de la circunferencia deberías ser descartados.

A partir de esta información se procedió a establecer la cobertura total de metabolitos intracelulares recuperados a partir del pellet bacteriano los cuales fueron en promedio de 428 metabolitos. En general, estos cambios se agrupan en las categorías funcionales de aminoácidos, carbohidratos, nucleósidos y lípidos. Sin embargo, el interés en este análisis más halla de describir el perfil metabólico de los aislamientos es comparar la presencia de cambios metabólicos reflejados en el aumento o reducción de la abundancia de metabolitos en los aislamientos hVISA respecto a sus comparadores VSSA lo cual se verá reflejado en el porcentaje de cambio de cada metabolito.

Con el fin de discriminar los cambios presentes en los perfiles de los aislamientos hVISA respecto a los VSSA en la fase de crecimiento exponencial, se realizaron proyecciones

ortogonales al análisis discriminante de estructura latente (OPLS-DA) para los datos obtenidos en cada plataforma como se muestra en la figura 4-3, lo cual permitió observar que los perfiles se diferencian claramente entre los grupos evaluados en las dos metodologías, con valores aceptables de varianza predicha ( $R^2$ ) y capacidad predictiva ( $Q^2$ ). Los metabolitos diferenciadores para cada muestra se determinaron mediante la combinación de criterios del análisis multivariado (MVA) con un  $VIP > 1$  con JK y univariado (UVA) con un porcentaje de cambio  $> 30\%$  y  $p < 0.05$ , obteniendo como resultado la presencia de 69 metabolitos significativos que potencialmente corresponden a cambios metabólicos diferenciadores entre los hVISA y VSSA.



**Figura 4-3. Modelos OPLS-DA muestras hVISA y VSSA ST5.** **A.** Modelos OPLS-DA con transformación logarítmica y escala de Pareto para perfiles metabólicos por plataforma LC/MS de aislamientos hVISA (color azul) y VSSA (color rosado) pertenecientes al ST5 para LC/MS  $R^2 = 0,367$   $Q^2 = 0,681$ . **B.** Modelo OPLS-DA plataforma HILIC-LC/MS con transformación logarítmica, Perfiles metabólicos de aislamientos hVISA (color rosado) y VSSA (color azul) pertenecientes al ST5  $R^2 = 0,291$   $Q^2 = 0,678$

En el anexo G se registran los metabolitos que presentaron una diferencia significativa al comparar los hVISA respecto a los VSSA, discriminando su categoría funcional, masa molecular, aductos, porcentaje de cambio y valor VIP el cual permite identificar los metabolitos que permiten diferenciar el perfil de cada grupo. La categoría de ácidos grasos con 47 metabolitos o compuestos fue la que presentó el mayor número de metabolitos identificados, seguido de la categoría de aminoácidos y nucleósidos que presentan 7 y 6

metabolitos respectivamente. En la tabla 4-1 se identifican los principales metabolitos agrupados en las diferentes categorías funcionales.

**Tabla 4-1 Metabolitos identificados en la comparación de hVISA- VSSA**

Compound	Formula	Mas	% Change	VIP
<b>Amino acids</b>				
L-Leucine	C6H13NO2	131,0946	-40,8	1,393
L-Tyrosinal	C9H11NO2	165,079	-56,7	1,49
L-Theanine	C7H14N2O3	174,1004	-51,6	1,381
L-Valine	C5H11NO2	117,079	-34	1,518
L- arginine	C10H18N4O6	290,1226	96,1	1,1854
Betaine	C5H11NO2	117,079	72,32	<b>6,4098</b>
L-Glycine	C6H9NO3	143,0582	51,24	1,4172
<b>Imidazopyrimidines</b>				
Adenine	C5H5N5	135,0545	-36,34	<b>4,1789</b>
Hypoxanthine	C5H4N4O	136,0385	-34,78	1,3449
<b>Nucleosides</b>				
Thymidine	C10H14N2O5	242,0903	-41,8	1,305
Uridine	C9H12N2O6	244,0695	-36,4	1,277
FAD	C27H33N9O15P2	785,1571	-32	1,526
NADH	C21H29N7O14P2	665,1248	-23,5	1,28
Adenosine	C10H13N5O4	267,0968	-51,2	<b>1,5684</b>
Guanosine	C10H13N5O5	283,0917	-44,7	1,497
<b>Carbohydrates</b>				
Alpha-Lactose	C12H22O11	342,1162	-68,4	<b>1,953</b>
<b>Phospholipids</b>				
L-Phosphatidic acid	C29H57O10P	596,3689	-32,9	1,337
<b>Pyridines</b>				
2-Picolinic acid	C6H5NO2	123,032	-57,65	1,185

- **Aminoácidos**

En la categoría de aminoácidos, se identificaron cambio en aminoácidos no polares como la valina, tirosina y leucina que presentaron porcentajes de cambio del -34.0%, -56.7% y -40.8% respectivamente, lo cual quiere decir que estos metabolitos están en menor abundancia en los hVISA respecto a los VSSA. La leucina y la valina son sintetizados

directamente a partir del piruvato, mientras que la tirosina, se sintetiza a partir del piruvato, pero por medio de la vía del ácido shikímico que permite la síntesis de otros aminoácidos aromáticos como el triptófano, fenilalanina y el indol, los cuales estarían inhibidos también en los aislamientos hVISA. Adicionalmente, se identificó que la treonina presenta un -51.6% de cambio, reflejando que los hVISA presentan reducción de la actividad del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) ya que este aminoácido se sintetiza a partir del oxalacetato. En general estos resultados, permiten identificar que los aislamientos hVISA presentan una alteración en dos fases más importantes del metabolismo celular; la primera que corresponde a la producción de acetil-CoA en la cual interviene el piruvato y en la segunda que corresponde a la oxidación de acetil-CoA que se da por medio del ciclo TCA, el cual es el principal productor de ATP (metabolismo energético) y generador de compuestos intermediarios de otras rutas metabólicas como la síntesis de aminoácidos (figura 4-4).

Aunque la betaína es un derivado de aminoácidos como serina y glicina se identificó que se encuentra en mayor abundancia en los aislamientos hVISA con 72.3% de cambio, resultado que respalda la abundancia de glicina que presentó un cambio del 51.2%. Un comportamiento similar se observó en la arginina un aminoácido polar que interviene en el ciclo de la urea (figura 4-4). Un resultado poco esperado se presentó en la alamina que es un componente del pentapéptido precursor del peptidoglucano y sitio de unión de la vancomicina, el cual no se identificó como metabolito con cambio significativo en la comparación de los grupos.

- **Nucleósidos**

Otra categoría que presentaron cambios significativos en los aislamientos hVISA fueron los nucleósidos (timidina, uridina, adenosina y guanosina), hipoxantina y los dinucleótidos FAD y NADH los cuales todos presentaron menor abundancia en los hVISA que en los VSSA dando como resultados porcentajes de cambio negativos como se indica en la tabla 4-1. Estos resultados indican que los aislamientos hVISA presentan una perturbación en la vía de las pentosas-fosfato que cumple funciones vitales en el

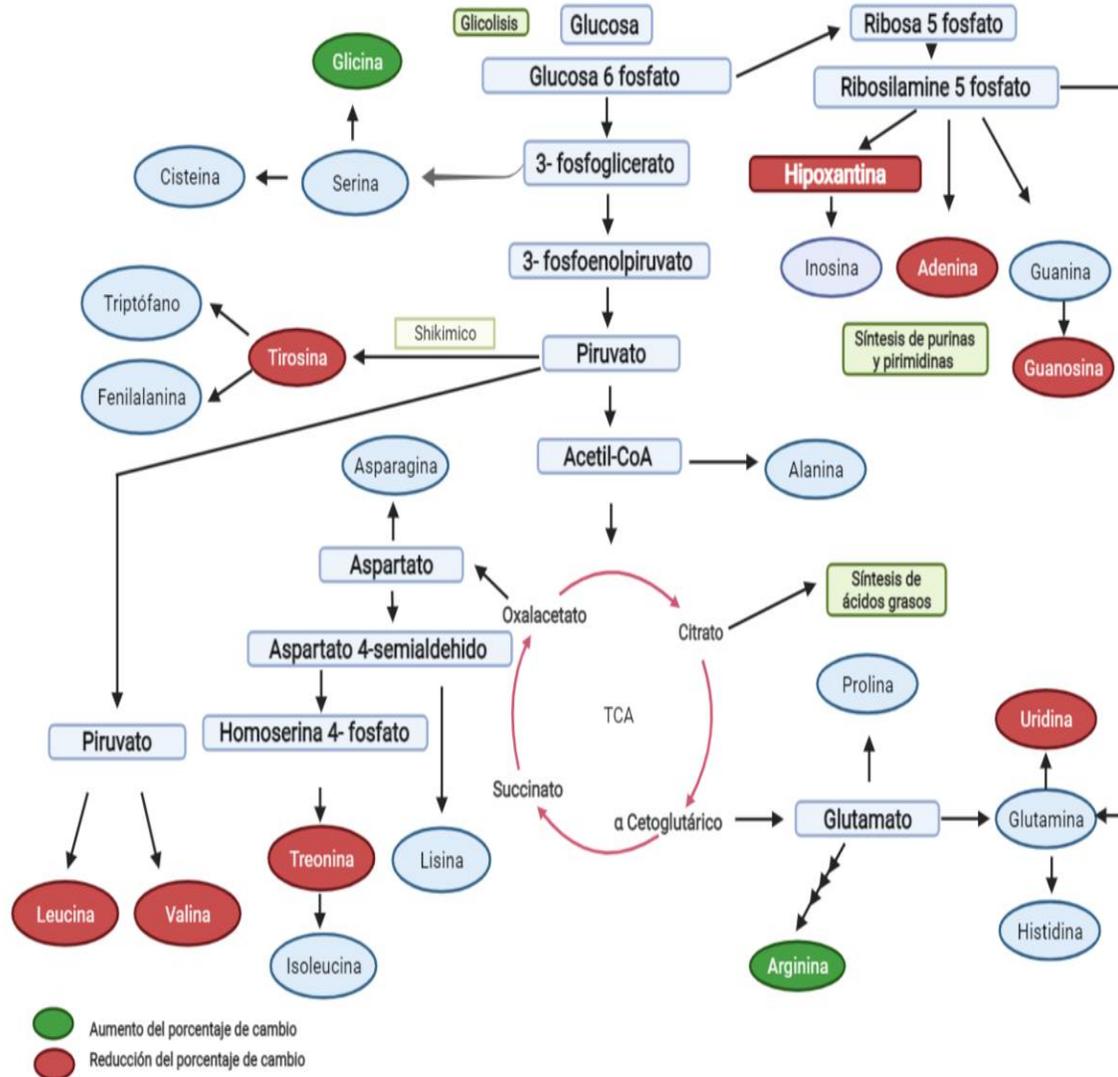
metabolismo bacteriano como producir ribosa- 5-fosfato requerido para la síntesis de purinas y pirimidinas necesarias en la síntesis de ácidos nucleicos y producir NADPH necesario también en la síntesis de nucleótidos y ácidos grasos. Procesos biológicos muy activos normalmente en la fase de crecimiento exponencial dado que la división celular.

- **Carbohidratos**

Respecto al metabolismo de los carbohidratos se identificó como único cambio significativo la alfa-lactosa con un porcentaje de cambio del -68.4% el cual es metabolizada por el operón LacABCDFEG, resultado concordante con la sub-expresión de este operón identificado en los aislamientos hVISA. Aunque, fue curioso no identificar otro tipo de azúcares como el manitol, ribitol o xilitol o precursores de la pared celular como se ha reportado en aislamientos VSSA[149].

- **Ácidos grasos**

En la identificación de ácidos grasos se identificaron 47 metabolitos o compuestos los cuales se clasificaron principalmente en glicerofosfolípidos 39(82.9%), los cuales son los principales constituyentes lipídicos de la membrana celular y algunos precursores de señalización y lipoproteínas, seguido de ácidos grasos 3 (6.3%) que son compuestos lipídicos muy diversos que en su síntesis que requiere la adición de un acetil-CoA con grupos malonil-CoA (metilmalonil-CoA), los cuales son lípidos complejos y fundamentales de lípidos biológicos y glicerolípidos; 2(4.2%) entre los cuales se encuentra el glicerol, que este en abundancia con un 56% en hVISA. El glicerol es un producto de degradación de lípidos requerido en el ciclo de TCA, que también hace parte de estructura de los fosfolípidos. La relación completa de los lípidos identificados en estos aislamientos se indica en el Anexo H. El general los cambios del perfil lipídico en bacterias como *S. aureus* puede afectar la estructura la membrana celular, cambios en la hidrofobicidad celular que causa de una forma indirecta resistencia a algunos antimicrobianos.

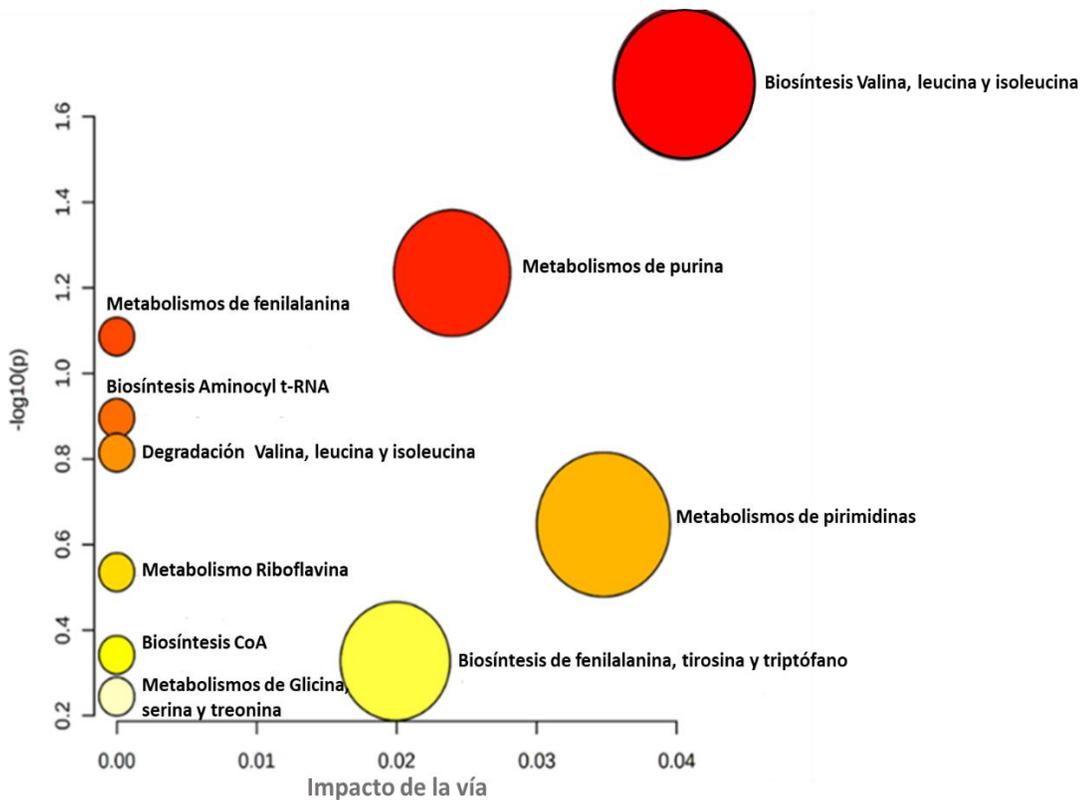


**Figura 4-4. Principales rutas metabólicas en *S. aureus* para la síntesis de aminoácidos.** Realizado en <https://app.biorender.com/>. Los metabolitos indicados en color rojo representan los que presentaron baja abundancia respecto a los VSSA y los verdes abundancia alta. Esquema basado en la publicación de Hattangady et al [150]

En este grupo también se identificó un aumento en la abundancia en los VSSA de ácido fosfatídico el cual es un fosfolípido aniónico importante en la señalización celular y la activación directa de canales iónicos activados por lípidos que constituyen aproximadamente el 0,25% de los fosfolípidos en la bicapa, al igual que el ácido polínico que es un derivado de la síntesis de pirimidina.

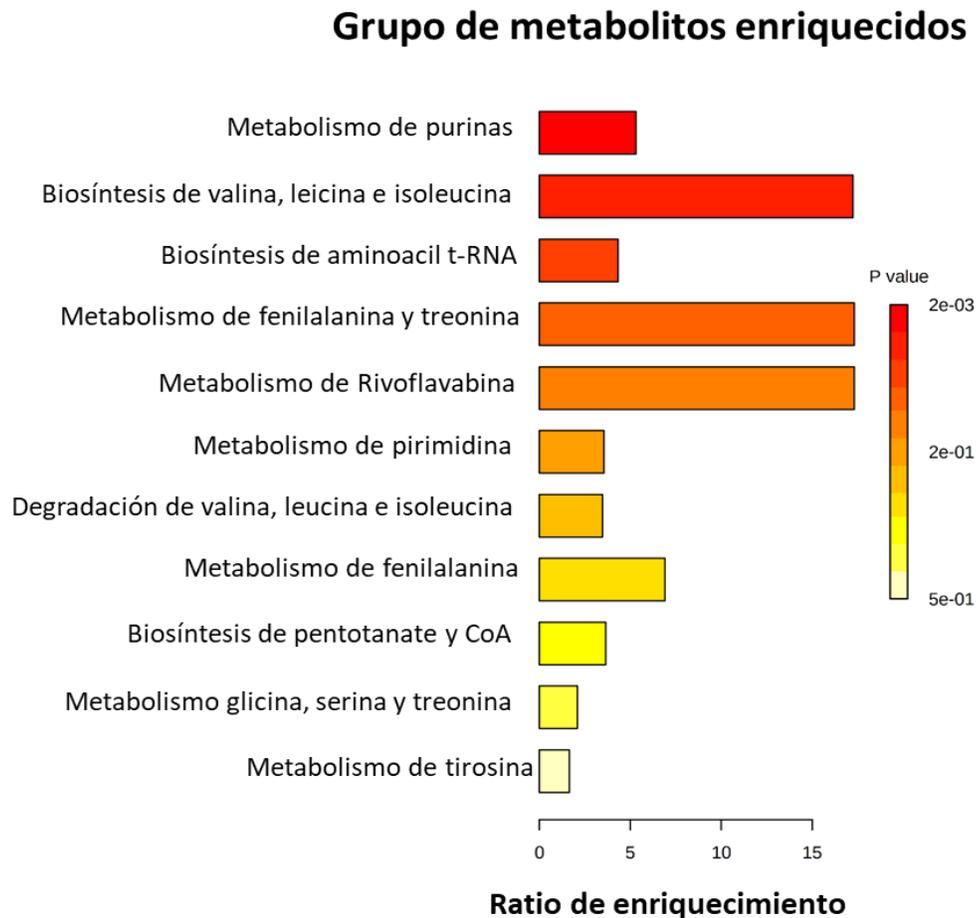
### 4.2.2 Análisis de enriquecimiento de vías metabólicas

El enriquecimiento del conjunto de metabolitos y los análisis de las vías metabólicas se realizaron utilizando MetaboAnalyst 5.0 para descubrir las vías metabólicas más afectadas en los aislamientos analizados. El valor del impacto de la vía se calculó a partir del análisis de la vía de la topología; aquellos con una puntuación superior a 0,10 se consideraron como una vía metabólica significativa. El análisis identificó 10 vías, que incluyen metabolismo de purina, pirimidina, ciclo de metabolismo de la fenilalanina, biosíntesis de aminoacil t-RNA, degradación de la valina, leucina e isoleucina, biosíntesis de CoA (glucólisis), metabolismo de glicina, serina y treonina entre otras como se indica en la figura 4-5, en donde el tamaño de los círculos indica el impacto en la alteración funcional de la vía.



**Figura 4-5 Análisis de impacto de la vía metabólicas.** En este análisis se muestra las vías metabólicas ordenadas por puntuaciones del enriquecimiento de la vía (eje y) y del análisis de topología (eje x) utilizando la herramienta MetaboAnalyst 5.0. Todas las vías en común se muestran reunidas en los círculos. El color y el tamaño de cada círculo se basan en el valor  $p$  y el valor de impacto de la vía, respectivamente. La intensidad de los colores de los círculos está basada en valores  $p$ . Los colores más oscuros indican una vía más significativa ( $p < 0,05$ ).

Adicionalmente, se utilizó un análisis de enriquecimiento cuantitativo para determinar las principales vías perturbadas afectadas en los aislamientos hVISA (figura 4-6). En total se identificaron once vías bioquímicas de las cuales dos se vieron afectadas significativamente ( $p < 0.05$ ), que corresponden al metabolismo de la purinas y biosíntesis de valina, isoleucina y leucina relacionadas con el ciclo del citrato por medio de ciclo TCA.



**Figura 4-6** Enriquecimiento del conjunto metabólico utilizando concentraciones de metabolitos utilizando la herramienta MetaboAnalyst 5.0.

### 4.3 Discusión

La susceptibilidad intermedia a vancomicina en *Staphylococcus aureus* asociada al

fenotipo hVISA y VISA esta mediada por alteraciones genéticas y metabólicas que causan aumento en el grosor de la pared celular, disminución de la autólisis y un crecimiento lento entre otros cambios morfológicos [45]. En este estudio se identificó la reducción de las curvas de crecimiento de las cepas hVISA respecto a cepas VSSA durante la fase exponencial, lo cual se puede deber a varias causas como la limitada asimilación de nutrientes como el carbono, fosfato o acetato este último empleado principalmente cuando hay deficiencia de nutrientes en el medio, catabolismo inadecuado de aminoácidos y al desarrollo del fenotipo auxotróficos como se presenta en las SCV (small colony variant) que se estimulan en ausencia de hierro y presencia de compuestos como menadiona, tiamina, hemina, timidina y ácidos grasos de cadena larga, estos últimos algunos identificados en abundancia en nuestros aislamientos hVISA analizados [151].

La mayoría de estudios han empleado enfoques genéticos y transcripcionales para determinar principalmente los cambios fisiológicos relacionados con la transición del fenotipo VISA, y ningún estudio según nuestro conocimiento se ha enfocado en la caracterización metabolómica en hVISA. Debido a esto, en este trabajo se compararon los perfiles metabolómicos de pares clínicos de hVISA y sus comparadores VSSA confirmados por PAP/AUC y las cepas de referencia Mu3- N315, todas pertenecientes al linaje ST5, el cual es el más predominantes en aislamientos con este fenotipo en Latinoamérica. Este análisis permitió identificar cambios en hVISA como la abundancia aumentada de betaína que interviene en la síntesis de glicina y glicerol y disminución de síntesis de aminoácidos de cadena ramificada como valina, leucina e isoleucina, resultados concordante con los hallazgos reportó Gardner *et al* en el 2018, en el cual se determinó el perfil metabolómico por resonancia magnética nuclear (RMN) en un par de cepas isogénicas VSSA-VISA [152].

En nuestros resultados no se identificó un cambio estadísticamente significativo en la abundancia del citrato que es uno de los producto principales de ciclo de TCA que se asocia con la disminución de la susceptibilidad a vancomicina, lo que puede deberse a que su concentración es dependiente de la fase de crecimiento, presentando mayor concentración en la fase estacionaria debido a la ausencia de fuentes de carbono disponibles, y nuestros datos se obtuvieron en la fase exponencial [148, 152]. Sin embargo, se puede inferir con los resultados obtenidos que los aislamientos hVISA

presentan alteración en la vía de la glicolisis y en el ciclo de TCA ya que se presenta reducción en la abundancia de aminoácidos como valina y leucina, producidos a partir del piruvato y treonina que se sintetizada a partir del oxalacetato en este ciclo, lo que correlaciona con los datos transcriptómicos obtenidos de *cidA*, gen regulado por la concentración de acetato [153].

En las cepas VISA se han establecido varias implicaciones celulares debido a la perturbación de la funcionabilidad de ciclo TCA; algunas de estas se relacionan con la reducción del crecimiento bacteriano ya que el acetato es una fuente de carbono que maximiza su crecimiento en condiciones nutricionales limitadas, también puede generar tolerancia a los antibióticos e intervenir en la regulación de la muerte celular como se identificado en Mu50 y sus cepas isogénicas [45, 153-155]. Estudios metabólicos también han demostrado una fuerte relación entre la formación de biopelículas y los cambios en el ciclo de TCA ya que la producción del polisacárido intercelular de adhesión (PIA) parte fundamental de la biopelícula está regulada por componentes del ciclo TCA. Esta relación se ha descrito en aislamientos VISA y en nuestros aislamientos hVISA se identificó una capacidad moderada de producir biopelícula. Adicionalmente se han sugerido que el metabolismo aumentado de arginina y el catabolismo de otros aminoácidos juegan un papel importante en la supervivencia bacteriana durante la formación de biopelícula, ya que a través de ciclo de la urea se genera amoníaco que restaurar el equilibrio del pH en respuesta a la producción de ácido generado por la biopelícula [156]. En general el catabolismo del acetato es posiblemente el cambio metabólico más conservado en los aislamientos VISA, lo cual hace de esta característica en un posible predictor temprano del fenotipo, ya que el 71% de los aislamientos VISA lo presentan reducción y solo el 8% de los VSSA [148].

Otros de los cambios significativos identificados en el análisis de enriquecimiento de vías de los aislamientos hVISA de estudio, fue la reducción de componentes de la vía de las pentosas-fosfato como la hipoxantina, guanosina y adenina que cumple funciones vitales en el metabolismo bacteriano como producir la síntesis de ADN y ARN. Además, está vía contribuye a la síntesis y flujo de nuevas fuentes de carbono como la ribosa- 5-fosfato, xilosa 5-fosfato y *N*-acetil-glucosamina necesarios para la síntesis de la pared bacteriana. Este resultado obtenido es contradictorio a los hallazgos identificados en aislamientos VISA como los reportados por Gardner *et al*, en los cuales se reporta una actividad

aumentada de esta vía favoreciendo el engrosamiento de la pared, lo cual se puede deber a la diferencia de las fases de crecimiento analizadas en cada estudio, puesto que en la fase estacionaria la síntesis de ADN es menos activa que en la fase exponencial lo que aumentar las concentraciones de estos intermediarios y/o se direccionan los recursos de las fuentes de carbono de esta vía a otros procesos biológicos como la síntesis de pared [152]. Adicionalmente, en los aislamientos hVISA analizados se identificó la presencia de mutaciones en genes subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa (*rpoB* y *rpoC*) los cuales pueden afectar el funcionamiento de la síntesis de ácidos nucleicos, favoreciendo la conversión a fenotipo VISA como se ha reportado previamente, puesto que mutaciones en *rpoC* (P440L) y *rpoB* (R512S) permiten la conversión del fenotipo hVISA a VISA de crecimiento lento (sVISA) [146]. Sin embargo, se requieren estudios adicionales que permitan evaluar el impacto de los cambios identificados en estos genes.

## 4.4 Conclusiones

- Los aislamientos hVISA-ST5 presentan una reducción de la curva de crecimiento, específicamente en la fase exponencial respecto a los aislamientos VSSA, reflejando una diferencia metabólica entre los dos grupos, la cual se puede deber a la asimilación de nutrientes u optimización de recursos energéticos como se ha observado en las variantes de crecimiento lento SVC que son estimuladas por la acumulación de ácidos grasos de cadena larga o deficiencia de hierro debido a la afectación del transportador de hierro (EfeO), identificado en el análisis de SNPs por LDA.
- Los aislamientos hVISA del linaje ST5 presentan perturbación a la producción y oxidación de acetil-CoA procesos fundamentales en el metabolismo energético, en el que interviene el piruvato y el ciclo TCA, limitando la producción de compuestos intermediarios en otras rutas metabólicas como los aminoácidos valina, leucina y treonina.
- Se identificó abundancia de glicina, aminoácido de naturaleza polar que se sintetiza a partir del 3-fosfoglicerato que es derivado de la fructosa 6-fosfato precursor de los azúcares necesarios para la síntesis del peptidoglicano, lo cual sugiere la funcionabilidad de estos procesos bioquímicos favoreciendo el engrosamiento de la pared bacteriana.

- Los aislamientos hVISA analizados presentan disminución de los componentes de las pentosas-fosfato durante la fase de crecimiento exponencial encargados de la síntesis de ácidos nucleicos y producción NADPH requerido en la síntesis de ácidos grasos componente principal de los lípidos de membrana celular, componentes identificados en su mayoría con reducida abundancia en los hVISA.

## Capítulo V

## 5. Conclusiones generales y recomendaciones

En este estudio se determinó la presencia de aislamientos SARM con fenotipo hVISA en una baja prevalencia (5.6%), empleando métodos basados en E-test como GRD y MET. Los aislamientos hVISA fueron recuperados a partir de pacientes con bacteriemia en Ecuador, Argentina, Chile, Brasil y Perú, durante el periodo entre el 2011 y 2014. De forma interesante, se observó que solo 3 aislamientos (0.56% del total de SARM evaluados) fueron clasificados por perfil de análisis poblacional/área bajo la curva (PAP/AUC), aunque esta metodología es considerada la prueba de oro para la identificación del fenotipo, su implementación como procedimiento de rutina en los laboratorios de diagnóstico clínico es inviable debido a sus altos costos y laboriosidad técnica, mientras que los métodos basados en E-test (GRD y MET) podrían ser una mejor alternativa en la determinación de este fenotipo de acuerdo a su sensibilidad y especificidad, lo que puede contribuir en la orientación del tratamiento de infecciones severas por SARM.

En la caracterización molecular de los 30 aislamientos hVISA se identificó que el 96.6% pertenecieron al complejo clonal 5, asociado al clon Chileno/Cordobés ST5, en un 93.3% y al clon Nueva York/Japón ST5 en un 3.3%; mientras que solo un aislamiento (3.3%) pertenece al ST1341 (SLV de ST239) fue identificado (linaje es frecuentemente relacionado con el fenotipo VISA o hVISA en países asiáticos y europeos). Esta observación podría indicar que los aislamientos con linajes pertenecientes al CC5 asociados a estos dos clones que son ampliamente diseminados en Latinoamérica (prevalencia superior al 82% en Brasil, Guatemala, México, Perú y Chile) podrían tener una mayor predisposición para desarrollar el fenotipo hVISA. Adicionalmente, en los aislamientos hVISA analizados poseen co-resistencia a antibióticos de otras familias

como  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, MLS<sub>B</sub> y fluoroquinolonas y baja frecuencia de resistencia (<6.0%) a rifampicina y trimetoprim-sulfametoxazol, mientras que en daptomicina, se presentó susceptibilidad en todos los aislamientos, un resultado importante ya que en diversos estudios han reportado de forma consistente la relación del fenotipo hVISA con la pérdida de la susceptibilidad a daptomicina, debido al engrosamiento de la pared bacteriana que limita el acceso de la molécula a la membrana celular, y a la presencia de mutaciones en el gen *mprF*, lo que puede poner en riesgo la efectividad de este antibiótico empleado como última opción terapéutica para infecciones complicadas causadas por SARM, lo cual hace necesario continuar con vigilancia activa que permitan identificar cambios en la susceptibilidad a daptomicina a consecuencia del fenotipo hVISA.

A nivel genético se identificaron sustituciones predominantes, presentes en más del 93% de los aislamientos hVISA que afectan a sistemas reguladores globales como WalkR y VraTSR y la autolisina Atl involucrados directamente en la síntesis y mantenimiento de la pared bacteriana. Adicional a estos cambios, se identificaron alteraciones adaptativas en el metabolismo de carbohidratos (*lacE*) y expresión de adhesinas como Sdr, presentes en los linajes ST5 y ST1341. Sin embargo, como características propias de los hVISA pertenecientes al ST5, se identificó un aumento de la actividad autolítica de la envoltura celular mediada por SsaA, reducción en la actividad mureína hidrolasa relacionados la síntesis del peptidoglucano y que es controlada por el metabolismo del acetato, así como una capacidad moderada de formación de biopelícula, aumento de expresión de la cápsula y adherencia mediada por el sistema de secreción ESS (ortólogo de tipo VII), estas últimas características favoreciendo la evasión del sistema inmune del hospedero, facilitando el desarrollo de infecciones persistentes.

Adicionalmente, se identificaron factores claves en el desarrollo del fenotipo hVISA como la reducción del crecimiento bacteriano que permite optimizar el rendimiento fisiológico bacteriano y perturbación en la producción y oxidación de acetyl-CoA, procesos fundamentales en el metabolismo energético bacteriano, en los cuales intervienen el piruvato y el ciclo TCA, lo que reduce la producción de compuestos intermediarios en otras rutas metabólicas como la síntesis de aminoácidos (síntesis de ADN), producción de precursores de carbono (síntesis de la pared bacteriana) y ácidos grasos y lípidos (síntesis de membrana celular), en la figura 5-1 se esquematizan los principales procesos



investigación que permitan establecer el rol de cada uno de estos cambios en el desarrollo del fenotipo heterogéneo y de disminución a la susceptibilidad a vancomicina, así como promover el desarrollo de estudios de vigilancia prospectiva que permitan establecer con mayor precisión la prevalencia real del fenotipo y su impacto clínico.

## 5.2 Recomendaciones

Con el desarrollo de este trabajo fue posible generar nuevas preguntas que serán abordadas en futuros proyectos de nuestro grupo de investigaciones, lo cual permitirá seguir construyendo en la comprensión del mecanismo molecular, epidemiológico y clínico del fenotipo hVISA que es de gran interés de la comunidad médico-científica.

Desde el punto de vista de vigilancia epidemiológica y clínico sería muy importante determinar en estudios prospectivos en Colombia y países Latinoamericanos para determinar la prevalencia real del fenotipo hVISA, superando limitaciones técnicas presentes en estudios retrospectivos como pérdida o reversión del fenotipo por congelación prolongada. Así mismo, este tipo de estudios permitiría realizar la búsqueda activa de casos de infecciones con falla terapéutica a vancomicina, lo que facilitaría hacer un seguimiento clínico más preciso y establecer el impacto clínico de estas infecciones en pacientes de la región, analizando variables clínicas y epidemiológicas asociadas directamente al fenotipo, como tiempo y dosis de tratamiento con vancomicina. De igual forma, estos estudios, permitirían evaluar y considerar el uso de herramientas basadas en E-test (GRD y MET) como opción diagnóstica de hVISA en instituciones hospitalarias lo que permitiría priorizar el uso de antibióticos, ya que estos métodos son menos dispendiosos y no excluyen aislamientos que contienen subpoblaciones resistentes en proporciones inferiores a  $Mu3$  como sucede en PAP/AUC.

Se sugiere continuar realizando estudios de mutagénesis que permitan verificar el rol que tienen en la disminución de la susceptibilidad a vancomicina los cambios identificados en WalkR, VraTSR y la autolisina Atl. Así como, evaluar en más detalle la relación que presentan el aumento de la capsula, formación de biopelícula y disminución en general de la virulencia con el desarrollo de infecciones persistentes por SARM con fenotipo hVISA o con falla terapéutica a este antibiótico, empleando modelo de evasión de la fagocitosis con neutrófilos humanos y/o de infección inicialmente en invertebrado

(*Galleria mellonella*).

Se sugiere realizar experimentos adicionales que contribuyan a entender papel de los cambios encontrados en este estudio, por ejemplo, se podría cuantificar por medio de ensayos enzimáticos la producción de citrato en total de aislamientos hVISA y VSSA con el fin de establecer si la reducción de citrato es en aislamientos hVISA-ST5 pueda ser propuesta como un predictor del fenotipo hVISA y finalmente sería de gran utilidad ampliar el conocimiento del comportamiento de los cambios identificados en este estudio en diferentes condiciones experimentales dirigidos a comparar estos cambios en entre las fases de crecimiento, en presencia de concentraciones sub-inhedorias de vancomicina o comparar el perfil transcriptómico y metabolómicos de cepas isogénicas clínicas pertenecientes al linaje ST5.

## 6. Bibliografía

1. Kapoor, G., S. Saigal, and A. Elongavan, *Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians*. J Anaesthesiol Clin Pharmacol, 2017. **33**(3): p. 300-305.
2. Pal, C., et al., *The structure and diversity of human, animal and environmental resistomes*. Microbiome, 2016. **4**(1): p. 54.
3. Habboush, Y. and N. Guzman, *Antibiotic Resistance*, in *StatPearls*. 2020: Treasure Island (FL).
4. Turner, N.A., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an overview of basic and clinical research*. Nat Rev Microbiol, 2019. **17**(4): p. 203-218.
5. Partridge, S.R., et al., *Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance*. Clin Microbiol Rev, 2018. **31**(4).
6. Rodriguez-Noriega, E. and C. Seas, *The changing pattern of methicillin-resistant staphylococcus aureus clones in Latin America: implications for clinical practice in the region*. Braz J Infect Dis, 2010. **14 Suppl 2**: p. S87-96.
7. Chambers, H.F. and F.R. Deleo, *Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(9): p. 629-41.
8. Reyes, J., et al., *Dissemination of methicillin-resistant Staphylococcus aureus USA300 sequence type 8 lineage in Latin America*. Clin Infect Dis, 2009. **49**(12): p. 1861-7.
9. Arias, C.A., et al., *A Prospective Cohort Multicenter Study of Molecular Epidemiology and Phylogenomics of Staphylococcus aureus Bacteremia in Nine Latin American Countries*. Antimicrob Agents Chemother, 2017. **61**(10).
10. Liu, C., et al., *Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in adults and children*. Clin Infect Dis, 2011. **52**(3): p. e18-55.
11. Courvalin, P., *Vancomycin resistance in gram-positive cocci*. Clin Infect Dis, 2006. **42 Suppl 1**: p. S25-34.
12. Howden, B.P., et al., *Reduced vancomycin susceptibility in Staphylococcus aureus, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications*. Clin Microbiol Rev, 2010. **23**(1): p. 99-139.
13. CLSI, *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020. **30th Edition**: p. 332.
14. Wootton, M., et al., *A modified population analysis profile (PAP) method to detect heteroresistance to vancomycin in Staphylococcus aureus in a UK hospital*. J Antimicrob Chemother, 2001. **47**(4): p. 399-403.
15. Fong, R.K., et al., *Clinical features and treatment outcomes of vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus (VISA) and heteroresistant vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus (hVISA) in a tertiary care institution in Singapore*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009. **28**(8): p. 983-7.
16. Yang, C.C., et al., *Risk factors of treatment failure and 30-day mortality in patients with bacteremia due to MRSA with reduced vancomycin susceptibility*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 7868.

17. Howden, B.P., et al., *Evolution of multidrug resistance during Staphylococcus aureus infection involves mutation of the essential two component regulator WalkR*. PLoS Pathog, 2011. **7**(11): p. e1002359.
18. Tong, S.Y., et al., *Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management*. Clin Microbiol Rev, 2015. **28**(3): p. 603-61.
19. Stryjewski, M.E. and G.R. Corey, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an evolving pathogen*. Clin Infect Dis, 2014. **58 Suppl 1**: p. S10-9.
20. Rybak, M., et al., *Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: a consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists*. Am J Health Syst Pharm, 2009. **66**(1): p. 82-98.
21. Levine, D.P., *Vancomycin: a history*. Clin Infect Dis, 2006. **42 Suppl 1**: p. S5-12.
22. Moellering, R.C., Jr., *Vancomycin: a 50-year reassessment*. Clin Infect Dis, 2006. **42 Suppl 1**: p. S3-4.
23. Alvarez, R., et al., *Optimizing the Clinical Use of Vancomycin*. Antimicrob Agents Chemother, 2016. **60**(5): p. 2601-9.
24. Nagarajan, R., *Structure-activity relationships of vancomycin-type glycopeptide antibiotics*. J Antibiot (Tokyo), 1993. **46**(8): p. 1181-95.
25. Walters, M.S., et al., *Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus - Delaware, 2015*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2015. **64**(37): p. 1056.
26. Hu, Q., H. Peng, and X. Rao, *Molecular Events for Promotion of Vancomycin Resistance in Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus*. Front Microbiol, 2016. **7**: p. 1601.
27. Rincon, S., et al., *[Resistance to "last resort" antibiotics in Gram-positive cocci: The post-vancomycin era]*. Biomedica, 2014. **34 Suppl 1**: p. 191-208.
28. Howden, B.P., et al., *Failure of vancomycin for treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections*. Clin Infect Dis, 2004. **39**(10): p. 1544; author reply 1544-5.
29. Moore, M.R., F. Perdreau-Remington, and H.F. Chambers, *Vancomycin treatment failure associated with heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus in a patient with endocarditis and in the rabbit model of endocarditis*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(4): p. 1262-6.
30. Gomes, D.M., K.E. Ward, and K.L. LaPlante, *Clinical implications of vancomycin heteroresistant and intermediately susceptible Staphylococcus aureus*. Pharmacotherapy, 2015. **35**(4): p. 424-32.
31. EUCAST, *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2020. **version 10**.
32. Saadat, S., et al., *VanA and VanB Positive Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus Among Clinical Isolates in Shiraz, South of Iran*. Oman Med J, 2014. **29**(5): p. 335-9.
33. Antony, S.J., *Case series describing an outbreak of highly resistant vancomycin Staphylococcus aureus (possible VISA/VRSA) infections in orthopedic related procedures in Guatemala*. Infect Disord Drug Targets, 2014. **14**(1): p. 44-8.
34. Melo-Cristino, J., et al., *First case of infection with vancomycin-resistant Staphylococcus aureus in Europe*. Lancet, 2013. **382**(9888): p. 205.
35. Panesso, D., et al., *Methicillin-Susceptible, Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus, Brazil*. Emerg Infect Dis, 2015. **21**(10): p. 1844-8.
36. Rossi, F., et al., *Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage*. N Engl J Med, 2014. **370**(16): p. 1524-31.
37. Perichon, B. and P. Courvalin, *VanA-type vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(11): p. 4580-7.
38. McGuinness, W.A., N. Malachowa, and F.R. DeLeo, *Vancomycin Resistance in Staphylococcus aureus*. Yale J Biol Med, 2017. **90**(2): p. 269-281.
39. Hiramatsu, K., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin susceptibility*. J Antimicrob Chemother, 1997. **40**(1): p. 135-6.
40. Hiramatsu, K., et al., *Dissemination in Japanese hospitals of strains of Staphylococcus aureus heterogeneously resistant to vancomycin*. Lancet, 1997. **350**(9092): p. 1670-3.
41. Jackson, M.A. and R.A. Hicks, *Vancomycin failure in staphylococcal endocarditis*. Pediatr

- Infect Dis J, 1987. **6**(8): p. 750-2.
42. Cui, L., et al., *Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(2): p. 428-38.
  43. Sieradzki, K. and A. Tomasz, *Inhibition of cell wall turnover and autolysis by vancomycin in a highly vancomycin-resistant mutant of Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 1997. **179**(8): p. 2557-66.
  44. Hiramatsu, K., *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus: a new model of antibiotic resistance*. Lancet Infect Dis, 2001. **1**(3): p. 147-55.
  45. Cui, L., et al., *Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by Staphylococcus aureus Mu50*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(9): p. 2276-85.
  46. Peleg, A.Y., et al., *Reduced susceptibility to vancomycin influences pathogenicity in Staphylococcus aureus infection*. J Infect Dis, 2009. **199**(4): p. 532-6.
  47. Cameron, D.R., et al., *Serine/threonine phosphatase Stp1 contributes to reduced susceptibility to vancomycin and virulence in Staphylococcus aureus*. J Infect Dis, 2012. **205**(11): p. 1677-87.
  48. Gardete, S., et al., *Genetic pathway in acquisition and loss of vancomycin resistance in a methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strain of clonal type USA300*. PLoS Pathog, 2012. **8**(2): p. e1002505.
  49. Saito, M., et al., *"Slow VISA," a novel phenotype of vancomycin resistance, found in vitro in heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus strain Mu3*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(9): p. 5024-35.
  50. Avison, M.B., et al., *Preliminary analysis of the genetic basis for vancomycin resistance in Staphylococcus aureus strain Mu50*. J Antimicrob Chemother, 2002. **49**(2): p. 255-60.
  51. Katayama, Y., et al., *Complete Reconstitution of the Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus Phenotype of Strain Mu50 in Vancomycin-Susceptible S. aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2016. **60**(6): p. 3730-42.
  52. Bae, T. and O. Schneewind, *Allelic replacement in Staphylococcus aureus with inducible counter-selection*. Plasmid, 2006. **55**(1): p. 58-63.
  53. Howden, B.P., A.Y. Peleg, and T.P. Stinear, *The evolution of vancomycin intermediate Staphylococcus aureus (VISA) and heterogenous-VISA*. Infect Genet Evol, 2014. **21**: p. 575-82.
  54. Matsuo, M., et al., *Comprehensive identification of mutations responsible for heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus (hVISA)-to-VISA conversion in laboratory-generated VISA strains derived from hVISA clinical strain Mu3*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(12): p. 5843-53.
  55. Gotz, F., C. Heilmann, and T. Stehle, *Functional and structural analysis of the major amidase (Atl) in Staphylococcus*. Int J Med Microbiol, 2014. **304**(2): p. 156-63.
  56. Reichmann, N.T., et al., *Differential localization of LTA synthesis proteins and their interaction with the cell division machinery in Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol, 2014. **92**(2): p. 273-86.
  57. Jenul, C. and A.R. Horswill, *Regulation of Staphylococcus aureus Virulence*. Microbiol Spectr, 2019. **7**(2).
  58. Haag, A.F. and F. Bagnoli, *The Role of Two-Component Signal Transduction Systems in Staphylococcus aureus Virulence Regulation*. Curr Top Microbiol Immunol, 2017. **409**: p. 145-198.
  59. Ji, Q., et al., *Structure and mechanism of the essential two-component signal-transduction system WalkR in Staphylococcus aureus*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 11000.
  60. Hiramatsu, K., et al., *Multi-drug-resistant Staphylococcus aureus and future chemotherapy*. J Infect Chemother, 2014. **20**(10): p. 593-601.
  61. McEvoy, C.R., et al., *Decreased vancomycin susceptibility in Staphylococcus aureus caused by IS256 tempering of WalkR expression*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(7): p. 3240-9.
  62. Jansen, A., et al., *Role of insertion elements and yycFG in the development of decreased susceptibility to vancomycin in Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol, 2007. **297**(4):

- p. 205-15.
63. Kuroda, M., et al., *IS256-Mediated Overexpression of the WalkR Two-Component System Regulon Contributes to Reduced Vancomycin Susceptibility in a Staphylococcus aureus Clinical Isolate*. Front Microbiol, 2019. **10**: p. 1882.
  64. McCallum, N., et al., *Mutational analyses of open reading frames within the vraSR operon and their roles in the cell wall stress response of Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(4): p. 1391-402.
  65. Boyle-Vavra, S., et al., *VraT/YvqF is required for methicillin resistance and activation of the VraSR regulon in Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(1): p. 83-95.
  66. Cui, L., et al., *Contribution of vraSR and graSR point mutations to vancomycin resistance in vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(3): p. 1231-4.
  67. Falord, M., et al., *GraXSR proteins interact with the VraFG ABC transporter to form a five-component system required for cationic antimicrobial peptide sensing and resistance in Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(2): p. 1047-58.
  68. Matsuo, M., et al., *Mutation of RNA polymerase beta subunit (rpoB) promotes hVISA-to-VISA phenotypic conversion of strain Mu3*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(9): p. 4188-95.
  69. Painter, K.L., et al., *What role does the quorum-sensing accessory gene regulator system play during Staphylococcus aureus bacteremia?* Trends Microbiol, 2014. **22**(12): p. 676-85.
  70. Gilot, P., et al., *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): p. 4060-7.
  71. Cameron, D.R., et al., *Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus isolates are attenuated for virulence when compared with susceptible progenitors*. Clin Microbiol Infect, 2017. **23**(10): p. 767-773.
  72. Ruggiero, A., et al., *Bacterial cell division regulation by Ser/Thr kinases: a structural perspective*. Curr Protein Pept Sci, 2012. **13**(8): p. 756-66.
  73. Tamber, S., J. Schwartzman, and A.L. Cheung, *Role of PknB kinase in antibiotic resistance and virulence in community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain USA300*. Infect Immun, 2010. **78**(8): p. 3637-46.
  74. Passalacqua, K.D., et al., *A mutation in the PP2C phosphatase gene in a Staphylococcus aureus USA300 clinical isolate with reduced susceptibility to vancomycin and daptomycin*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(10): p. 5212-23.
  75. Sun, F., et al., *Protein cysteine phosphorylation of SarA/MgrA family transcriptional regulators mediates bacterial virulence and antibiotic resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(38): p. 15461-6.
  76. Fridman, M., et al., *Two unique phosphorylation-driven signaling pathways crosstalk in Staphylococcus aureus to modulate the cell-wall charge: Stk1/Stp1 meets GraSR*. Biochemistry, 2013. **52**(45): p. 7975-86.
  77. Shoji, M., et al., *walk and clpP mutations confer reduced vancomycin susceptibility in Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(8): p. 3870-81.
  78. Feng, J., et al., *Trapping and proteomic identification of cellular substrates of the ClpP protease in Staphylococcus aureus*. J Proteome Res, 2013. **12**(2): p. 547-58.
  79. Donat, S., et al., *Transcriptome and functional analysis of the eukaryotic-type serine/threonine kinase PknB in Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 2009. **191**(13): p. 4056-69.
  80. Liebeke, M., et al., *A metabolomic view of Staphylococcus aureus and its ser/thr kinase and phosphatase deletion mutants: involvement in cell wall biosynthesis*. Chem Biol, 2010. **17**(8): p. 820-30.
  81. Khatib, R., et al., *Screening for Intermediately Vancomycin-Susceptible and Vancomycin-Heteroresistant Staphylococcus aureus by Use of Vancomycin-Supplemented Brain Heart Infusion Agar Biplates: Defining Growth Interpretation Criteria Based on Gold Standard Confirmation*. J Clin Microbiol, 2015. **53**(11): p. 3543-6.

82. Liu, C. and H.F. Chambers, *Staphylococcus aureus with heterogeneous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(10): p. 3040-5.
83. Charles, P.G., et al., *Clinical features associated with bacteremia due to heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis, 2004. **38**(3): p. 448-51.
84. Howden, B.P., et al., *Treatment outcomes for serious infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus with reduced vancomycin susceptibility*. Clin Infect Dis, 2004. **38**(4): p. 521-8.
85. Maor, Y., et al., *Clinical features of heteroresistant vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus bacteremia versus those of methicillin-resistant S. aureus bacteremia*. J Infect Dis, 2009. **199**(5): p. 619-24.
86. Bae, I.G., et al., *Heterogeneous vancomycin-intermediate susceptibility phenotype in bloodstream methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from an international cohort of patients with infective endocarditis: prevalence, genotype, and clinical significance*. J Infect Dis, 2009. **200**(9): p. 1355-66.
87. Kim, T., et al., *Phenotypic changes of methicillin-resistant Staphylococcus aureus during vancomycin therapy for persistent bacteraemia and related clinical outcome*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2017. **36**(8): p. 1473-1481.
88. van Hal, S.J., T.P. Lodise, and D.L. Paterson, *The clinical significance of vancomycin minimum inhibitory concentration in Staphylococcus aureus infections: a systematic review and meta-analysis*. Clin Infect Dis, 2012. **54**(6): p. 755-71.
89. Casapao, A.M., et al., *Clinical Outcomes in Patients with Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus Bloodstream Infection*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(9): p. 4252-4259.
90. Sakoulas, G., et al., *Relationship of MIC and bactericidal activity to efficacy of vancomycin for treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteremia*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(6): p. 2398-402.
91. Hidayat, L.K., et al., *High-dose vancomycin therapy for methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections: efficacy and toxicity*. Arch Intern Med, 2006. **166**(19): p. 2138-44.
92. Rybak, M.J., et al., *Characterization of vancomycin-heteroresistant Staphylococcus aureus from the metropolitan area of Detroit, Michigan, over a 22-year period (1986 to 2007)*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(9): p. 2950-4.
93. Boyle-Vavra, S., et al., *Reversion of the glycopeptide resistance phenotype in Staphylococcus aureus clinical isolates*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(2): p. 272-7.
94. Zhang, S., et al., *Systematic Review and Meta-Analysis of the Epidemiology of Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus Isolates*. PLoS One, 2015. **10**(8): p. e0136082.
95. Ho, C.M., et al., *Prevalence and accessory gene regulator (agr) analysis of vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus among methicillin-resistant isolates in Taiwan--SMART program, 2003*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010. **29**(4): p. 383-9.
96. Hanaki, H., et al., *Antibiotic susceptibility survey of blood-borne MRSA isolates in Japan from 2008 through 2011*. J Infect Chemother, 2014. **20**(9): p. 527-34.
97. Campanile, F., et al., *Changing Italian nosocomial-community trends and heteroresistance in Staphylococcus aureus from bacteremia and endocarditis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012. **31**(5): p. 739-45.
98. Pitz, A.M., et al., *Vancomycin susceptibility trends and prevalence of heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus in clinical methicillin-resistant S. aureus isolates*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(1): p. 269-74.
99. Di Gregorio, S., et al., *Clinical, microbiological, and genetic characteristics of heteroresistant vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus bacteremia in a teaching hospital*. Microb Drug Resist, 2015. **21**(1): p. 25-34.
100. da Costa, T.M., et al., *Clinical and Microbiological Characteristics of Heteroresistant and Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus from Bloodstream Infections in a Brazilian Teaching Hospital*. PLoS One, 2016. **11**(8): p. e0160506.

101. Mendes, R.E., et al., *Characterization of baseline methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates recovered from phase IV clinical trial for linezolid*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(2): p. 568-74.
102. Vega, F., et al., *[Isolation of Staphylococcus aureus hetero-resistant to vancomycin (hVISA) in the Regional Hospital of Concepcion, Chile]*. Rev Chilena Infectol, 2015. **32**(5): p. 588-90.
103. Berrio, O., *Caracterización de aislamientos clínicos de Staphylococcus aureus resistentes a meticilina, con susceptibilidad disminuida a vancomicina, de 3 países en Suramérica. Tesis de Maestría en Ciencias- Microbiología. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia*. 2018.
104. Wertheim, H.F., et al., *The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections*. Lancet Infect Dis, 2005. **5**(12): p. 751-62.
105. Holmes, N.E., et al., *Treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: vancomycin and beyond*. Semin Respir Crit Care Med, 2015. **36**(1): p. 17-30.
106. Jeffres, M.N., *The Whole Price of Vancomycin: Toxicities, Troughs, and Time*. Drugs, 2017. **77**(11): p. 1143-1154.
107. Lewis, P.O., et al., *Treatment strategies for persistent methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteraemia*. J Clin Pharm Ther, 2018. **43**(5): p. 614-625.
108. van Hal, S.J. and V.G. Fowler, Jr., *Is it time to replace vancomycin in the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections?* Clin Infect Dis, 2013. **56**(12): p. 1779-88.
109. Satola, S.W., et al., *Comparison of detection methods for heteroresistant vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus, with the population analysis profile method as the reference method*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(1): p. 177-83.
110. Leonard, S.N., et al., *Evaluation of the Etest GRD for the detection of Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to glycopeptides*. J Antimicrob Chemother, 2009. **63**(3): p. 489-92.
111. Nigo, M., et al., *Ceftaroline-Resistant, Daptomycin-Tolerant, and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Causing Infective Endocarditis*. Antimicrob Agents Chemother, 2017. **61**(3).
112. Bolger, A.M., M. Lohse, and B. Usadel, *Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data*. Bioinformatics, 2014. **30**(15): p. 2114-20.
113. Bankevich, A., et al., *SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing*. J Comput Biol, 2012. **19**(5): p. 455-77.
114. Milheirico, C., D.C. Oliveira, and H. de Lencastre, *Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome mec type IV in methicillin-resistant Staphylococcus aureus: 'SCCmec IV multiplex'*. J Antimicrob Chemother, 2007. **60**(1): p. 42-8.
115. Zhang, K., J.A. McClure, and J.M. Conly, *Enhanced multiplex PCR assay for typing of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Mol Cell Probes, 2012. **26**(5): p. 218-21.
116. Strommenger, B., et al., *Obvious lack of association between dynamics of epidemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus in central Europe and agr specificity groups*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2004. **23**(1): p. 15-9.
117. Jolley, K.A., J.E. Bray, and M.C.J. Maiden, *Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications*. Wellcome Open Res, 2018. **3**: p. 124.
118. Bortolaia, V., et al., *ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes*. J Antimicrob Chemother, 2020.
119. Liu, B., et al., *VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface*. Nucleic Acids Res, 2019. **47**(D1): p. D687-D692.
120. Edgar, R.C., *MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(5): p. 1792-7.
121. Page, A.J., et al., *SNP-sites: rapid efficient extraction of SNPs from multi-FASTA alignments*. Microb Genom, 2016. **2**(4): p. e000056.
122. Bouckaert, R., et al., *BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis*.

- PLoS Comput Biol, 2014. **10**(4): p. e1003537.
123. Shariati, A., et al., *Global prevalence and distribution of vancomycin resistant, vancomycin intermediate and heterogeneously vancomycin intermediate Staphylococcus aureus clinical isolates: a systematic review and meta-analysis*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 12689.
  124. Delgado, A., et al., *Hetero-vancomycin-intermediate methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolate from a medical center in Las Cruces, New Mexico*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(4): p. 1325-9.
  125. Adam, H.J., et al., *Detection and characterization of heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus isolates in Canada: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program, 1995-2006*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(2): p. 945-9.
  126. Chen, C.J., Y.C. Huang, and C.H. Chiu, *Multiple pathways of cross-resistance to glycopeptides and daptomycin in persistent MRSA bacteraemia*. J Antimicrob Chemother, 2015. **70**(11): p. 2965-72.
  127. Camacho, C., et al., *BLAST+: architecture and applications*. BMC Bioinformatics, 2009. **10**: p. 421.
  128. He, Y., Y. Xie, and S. Reed, *Pulsed-field gel electrophoresis typing of Staphylococcus aureus isolates*. Methods Mol Biol, 2014. **1085**: p. 103-11.
  129. Oliveira, D.C. and H. de Lencastre, *Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(7): p. 2155-61.
  130. Riva, G. and M. Mauri, *MuMMER: How Robotics Can Reboot Social Interaction and Customer Engagement in Shops and Malls*. Cyberpsychol Behav Soc Netw, 2021. **24**(3): p. 210-211.
  131. Abraham, A., et al., *Machine learning for neuroimaging with scikit-learn*. Front Neuroinform, 2014. **8**: p. 14.
  132. Magoc, T., D. Wood, and S.L. Salzberg, *EDGE-pro: Estimated Degree of Gene Expression in Prokaryotic Genomes*. Evol Bioinform Online, 2013. **9**: p. 127-36.
  133. Love, M.I., W. Huber, and S. Anders, *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2*. Genome Biol, 2014. **15**(12): p. 550.
  134. Yoo, J.I., et al., *Prevalence of amino acid changes in the yvqF, vraSR, graSR, and tcaRAB genes from vancomycin intermediate resistant Staphylococcus aureus*. J Microbiol, 2013. **51**(2): p. 160-5.
  135. Sugiyama, S., et al., *The 1.8-Å X-ray structure of the Escherichia coli PotD protein complexed with spermidine and the mechanism of polyamine binding*. Protein Sci, 1996. **5**(10): p. 1984-90.
  136. Dubrac, S., et al., *New insights into the Walk/WalR (YycG/YycF) essential signal transduction pathway reveal a major role in controlling cell wall metabolism and biofilm formation in Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 2007. **189**(22): p. 8257-69.
  137. Bose, J.L., et al., *Contribution of the Staphylococcus aureus Atl AM and GL murein hydrolase activities in cell division, autolysis, and biofilm formation*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e42244.
  138. Hafer, C., et al., *Contribution of selected gene mutations to resistance in clinical isolates of vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(11): p. 5845-51.
  139. Jin, Y., et al., *Comparative Analysis of Virulence and Toxin Expression of Vancomycin-Intermediate and Vancomycin-Sensitive Staphylococcus aureus Strains*. Front Microbiol, 2020. **11**: p. 596942.
  140. Que, Y.A., et al., *Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in Staphylococcus aureus experimental endocarditis*. J Exp Med, 2005. **201**(10): p. 1627-35.
  141. Sharer, M.V., et al., *Differential expression of the lactose transporter gene affects growth of Staphylococcus aureus in milk*. J Dairy Sci, 2003. **86**(7): p. 2373-81.
  142. Tsuji, B.T., et al., *Attenuated vancomycin bactericidal activity against Staphylococcus aureus hemB mutants expressing the small-colony-variant phenotype*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(4): p. 1533-7.

143. Tuchscher, L., B. Löffler, and R.A. Proctor, *Persistence of Staphylococcus aureus: Multiple Metabolic Pathways Impact the Expression of Virulence Factors in Small-Colony Variants (SCVs)*. Front Microbiol, 2020. **11**: p. 1028.
144. Jansen, A., et al., *Production of capsular polysaccharide does not influence Staphylococcus aureus vancomycin susceptibility*. BMC Microbiol, 2013. **13**: p. 65.
145. Aly, K.A., et al., *Isolation of a Membrane Protein Complex for Type VII Secretion in Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 2017. **199**(23).
146. Matsuo, M., et al., *A mutation of RNA polymerase beta' subunit (RpoC) converts heterogeneously vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus (hVISA) into "slow VISA"*. Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(7): p. 4215-25.
147. Traber, K.E., et al., *agr function in clinical Staphylococcus aureus isolates*. Microbiology (Reading), 2008. **154**(Pt 8): p. 2265-2274.
148. Nelson, J.L., et al., *Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus strains have impaired acetate catabolism: implications for polysaccharide intercellular adhesin synthesis and autolysis*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(2): p. 616-22.
149. Alreshidi, M.M., *Selected Metabolites Profiling of Staphylococcus aureus Following Exposure to Low Temperature and Elevated Sodium Chloride*. Front Microbiol, 2020. **11**: p. 834.
150. Hattangady, D.S., et al., *Genomic, Transcriptomic and Metabolomic Studies of Two Well-Characterized, Laboratory-Derived Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus Strains Derived from the Same Parent Strain*. Antibiotics (Basel), 2015. **4**(1): p. 76-112.
151. Lin, Y.T., et al., *Emergence of a small colony variant of vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus in a patient with septic arthritis during long-term treatment with daptomycin*. J Antimicrob Chemother, 2016. **71**(7): p. 1807-14.
152. Gardner, S.G., et al., *Metabolic Mitigation of Staphylococcus aureus Vancomycin Intermediate-Level Susceptibility*. Antimicrob Agents Chemother, 2018. **62**(1).
153. Rice, K.C., et al., *Acetic acid induces expression of the Staphylococcus aureus cidABC and IrgAB murein hydrolase regulator operons*. J Bacteriol, 2005. **187**(3): p. 813-21.
154. Mongodin, E., et al., *Microarray transcription analysis of clinical Staphylococcus aureus isolates resistant to vancomycin*. J Bacteriol, 2003. **185**(15): p. 4638-43.
155. McAleese, F., et al., *Overexpression of genes of the cell wall stimulon in clinical isolates of Staphylococcus aureus exhibiting vancomycin-intermediate- S. aureus-type resistance to vancomycin*. J Bacteriol, 2006. **188**(3): p. 1120-33.
156. Stipetic, L.H., et al., *A novel metabolomic approach used for the comparison of Staphylococcus aureus planktonic cells and biofilm samples*. Metabolomics, 2016. **12**: p. 75.
157. Cafiso, V., et al., *Modulating activity of vancomycin and daptomycin on the expression of autolysis cell-wall turnover and membrane charge genes in hVISA and VISA strains*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e29573.

**ANEXO A. Resultados generales de la secuenciación y ensamblaje de los genomas de los aislamientos hVISA y las subpoblaciones.**

Aislamiento	Longitud del ensamblaje	Número de contigs	Cobertura	N50	%GC
UP89	2,978,292	137	228X	60,460	33
UP106	2,893,014	161	117X	43,062	33
UP120	2,931,120	168	232X	55,464	32.8
UP131	2,915,550	165	193X	58,207	32.8
UCL361	2,835,855	237	115X	589,212	32.9
UCL381	2,918,546	232	253X	68,942	32.8
UCL395	2,872,699	113	253X	73,969	32.7
UCL412	2,863,055	133	257X	58,959	32.8
UCL420	2,935,530	147	201X	48,098	32.8
UCL432	2,916,109	122	252X	67,158	32.8
UCL436	2,877,987	148	247X	44,466	32.9
UCL461	2,899,987	116	288X	69,123	32.8
UP686	2,848,964	97	315X	76,880	32.7
UCL752	2,927,747	115	336X	87,316	32.7
UA851	2,890,778	128	323X	52,389	33
UA859	2,938,793	136	346X	71,970	32.8
UA873	2,903,683	134	121X	48,011	32.8
UP977	2,962,177	155	200X	61,461	33
UP1013	2,917,372	152	156X	50,148	32.8
UP1014	2,815,711	402	116X	21,237	33.4
UP1049	3,019,521	402	186X	17,016	33.1
UP1052	2,780,702	299	179X	17,466	32.9
UP1057	2,962,694	164	390X	51,320	33.1
UP1058	2,853,769	405	154X	17,670	33.3
UP1081	2,904,407	292	159X	21,102	32.9
UP1085	2,778,947	408	173X	16,538	33.4
UP1088	2,788,818	403	177X	18,367	33.3
UE1097	2,991,331	158	188X	43,902	33
UP1161	2,958,253	118	139X	120,805	33.1
UB466	3,075,890	309	220X	85,150	32.7

**Anexo B. Números de acceso de NCBI de los genomas hVISA de estudio y cepas control**

<b>Muestra</b>	<b>Acceso</b>	<b>BioSample</b>	<b>BioProject</b>
ATCC29213	NZ_LHUS00000000.2	SAMN03963290	PRJNA224116
Mu3	NC_009782.1	SAMD00060910	PRJNA224116
Mu50	NC_002758.2	SAMD00061098	PRJNA224116
UA851	JAANEO000000000	SAMN13577538	PRJNA595928
UA859	JAANEN000000000	SAMN13577539	PRJNA595928
UA873	JAANEM000000000	SAMN13577540	PRJNA595928
UB466	NZ_QEKF00000000.1	SAMN08977784	PRJNA291213
UCL361	JAANEK000000000	SAMN13577542	PRJNA595928
UCL381	JAANEH000000000	SAMN13577545	PRJNA595928
UCL395	JAANEL000000000	SAMN13577541	PRJNA595928
UCL412	JAANEI000000000	SAMN13577544	PRJNA595928
UCL420	JAANEJ000000000	SAMN13577543	PRJNA595928
UCL432	JAANEG000000000	SAMN13577546	PRJNA595928
UCL436	NZ_QEKB00000000.1	SAMN08977798	PRJNA291213
UCL461	JAANEE000000000	SAMN13577548	PRJNA595928
UCL752	JAANEF000000000	SAMN13577547	PRJNA595928
UE1097	JAANEC000000000	SAMN13577550	PRJNA595928
UP1013	JAANDV000000000	SAMN13577557	PRJNA595928
UP1014	JAANDM000000000	SAMN13577566	PRJNA595928
UP1017	JAALWK000000000	SAMN14171758	PRJNA595928
UP1049	JAANDX000000000	SAMN13577555	PRJNA595928
UP1052	JAANDP000000000	SAMN13577563	PRJNA595928
UP1057	JAANDJ000000000	SAMN13577569	PRJNA595928
UP1058	JAANEB000000000	SAMN13577551	PRJNA595928
UP106	NZ_MJIA00000000.1	SAMN05721752	PRJNA291213
UP1066	JAALRP000000000	SAMN14171764	PRJNA595928
UP1081	JAANEA000000000	SAMN13577552	PRJNA595928
UP1085	JAANDO000000000	SAMN13577564	PRJNA595928
UP1088	JAANDL000000000	SAMN13577567	PRJNA595928
UP1161	JAANDT000000000	SAMN13577559	PRJNA595928
UP120	JAANDQ000000000	SAMN13577562	PRJNA595928
UP131	JAANDU000000000	SAMN13577558	PRJNA595928
UP686	JAANDS000000000	SAMN13577560	PRJNA595928
UP89	JAANDN000000000	SAMN13577565	PRJNA595928
UP977	JAANDY000000000	SAMN13577554	PRJNA595928

### ANEXO C. Distribución de factores de virulencia en aislamientos hVISA por categoría funcional

Categoría	Factor de virulencia	Gen	VSSA	hVISA
Adherencia	Factor de agrupamiento A al fibrinógeno	<i>clfA</i>	6(1,9%)	0(0%)
	Factor de agrupamiento B	<i>clfB</i>	2(0,6%)	0(0%)
	Precursor de adhesina de colágeno	<i>cna</i>	6(1,9%)	0(0%)
	Proteína de unión a elastina de la superficie celular	<i>ebp</i>	303(99,0%)	27(90%)
	Proteína B de unión a fibronectina	<i>fnbB</i>	4(1,3%)	0(0%)
	Proteína A de unión a fibronectina	<i>fnbA</i>	7(2,2%)	0(0%)
	Proteína de unión rica en fibrinógeno de Ser-Asp	<i>sdrC</i>	48(15,6%)	1(3,3%)
	Proteína de unión rica en fibrinógeno de Ser-Asp	<i>sdrD</i>	45(14,7%)	1(3,3%)
	Proteína de unión rica en fibrinógeno de Ser-Asp	<i>sdrE</i>	269(87,9%)	29(96,7%)
	Regulador transcripcional del oerón ica	<i>icaR</i>	299(97,7%)	25(83,3%)
	N-acetilglucosaminiltransferasa	<i>icaA</i>	304(99,3%)	30(100%)
	Proteína de adhesión intercelular D	<i>icaD</i>	299(97,7%)	29(96,7%)
	N-desacetilasa	<i>icaB</i>	304(99,3%)	29(96,7%)
	Proteína C de adhesión intercelular	<i>icaC</i>	300(98,0%)	27(90%)
	Proteínas extracelulares Map	<i>map</i>	53(17,3%)	1(3,3%)
	Metaloproteinasas de zinc aureolisina	<i>aur</i>	287(93,7%)	29(96,7%)
	Precursor de hialuronato liasa	<i>hysA</i>	8(2,6%)	0(0%)
	Éster de glicerol hidrolasa	<i>geh</i>	306(100%)	30(100%)
Evasión del sistema inmune	Síntesis de polisacáridos capsulares	<i>cap8A</i>	299(97,7%)	29(96,7%)
	Síntesis de polisacáridos capsulares	<i>cap8B</i>	299(97,7%)	29(96,7%)
	Síntesis de polisacáridos capsulares	<i>cap8C</i>	305(99,6%)	30(100%)
	Síntesis de polisacáridos capsulares	<i>cap8D</i>	257(83,9%)	29(96,7%)
	Síntesis de polisacáridos capsulares	<i>cap8E</i>	299(97,7%)	30(100%)
	Síntesis de polisacáridos capsulares	<i>cap8F</i>	306(100%)	30(100%)
	Síntesis de polisacáridos capsulares	<i>cap8G</i>	306(100%)	30(100%)
	Síntesis de polisacáridos capsulares	<i>cap8H</i>	23(7,5%)	1(3,3%)
	Síntesis de polisacáridos capsulares	<i>cap8I</i>	25(8,1%)	1(3,3%)
	Síntesis de polisacáridos capsulares	<i>cap8J</i>	26(8,4%)	2(6,7%)
	Síntesis de polisacáridos capsulares	<i>cap8K</i>	25(8,1%)	0(0%)
	Síntesis de polisacáridos capsulares	<i>cap8L</i>	306(100%)	30(100%)
	Síntesis de polisacáridos capsulares	<i>cap8M</i>	306(100%)	30(100%)
	Síntesis de polisacáridos capsulares	<i>cap8N</i>	306(100%)	30(100%)
	Síntesis de polisacáridos capsulares	<i>cap8O</i>	306(100%)	30(100%)
	Síntesis de polisacáridos capsulares	<i>cap8P</i>	306(100%)	30(100%)

	CHIPS de proteína inhibidora de la quimiotaxis	<b>chp</b>	252(82,3%)	26(86,6%)
	Inhibidor del complemento SCIN	<b>scn</b>	268(87,5%)	27(90%)
	Proteína A - unión inmunoglobulina G	<b>spa</b>	251(82,07%)	16(53,3%)
	Proteína SBI de unión a IgG	<b>sbi</b>	286(93,4%)	29(96,7%)
Adquisición de hierro y metabolismo	Determinante de superficie regulado por hierro	<b>isdA</b>	295(96,4%)	30(100%)
	Determinante de superficie regulado por hierro	<b>isdB</b>	306(100%)	29(96,7%)
	Determinante de superficie regulado por hierro	<b>isdC</b>	306(100%)	30(100%)
	Determinante de superficie regulado por hierro	<b>isdD</b>	304(99,3%)	30(100%)
	Determinante de superficie regulado por hierro	<b>isdE</b>	306(100%)	30(100%)
	Determinante de superficie regulado por hierro	<b>isdF</b>	305(99,6%)	30(100%)
	Determinante de superficie regulado por hierro	<b>isdG</b>	305(99,6%)	30(100%)
Sistema de secreción	Proteína del sistema tipo VII	<b>esaA</b>	305(99,6%)	30(100%)
	Proteína del sistema tipo VII	<b>esaB</b>	305(99,6%)	30(100%)
	Proteína del sistema tipo VII	<b>esaD</b>	234(76,4%)	29(96,7%)
	Chaperona del sistema tipo VII	<b>esaE</b>	287(93,7%)	29(96,7%)
	Proteína del sistema tipo VII	<b>essA</b>	306(100%)	30(100%)
	Proteína del sistema tipo VII	<b>essB</b>	300(98,0%)	29(96,7%)
	Proteína del sistema tipo VII	<b>essC</b>	285(93,1%)	29(96,7%)
	Proteína secretada tipo VII	<b>esxA</b>	306(100%)	30(100%)
	Proteína secretada tipo VII	<b>esxB</b>	287(93,7%)	29(96,7%)
	Proteína secretada tipo VII	<b>esxC</b>	287(93,7%)	29(96,7%)
	Proteína secretada tipo VII	<b>esxD</b>	287(93,7%)	29(96,7%)
Hemolisina	Alpha-hemolina precursor	<b>hly/hla</b>	301(98,3%)	28(93,3%)
	Beta-hemolisina	<b>hlyB</b>	304(99,3%)	30(100%)
	Delta hemolisina	<b>hlyD</b>	296(96,7%)	25(83,3%)
	Gamma-hemolisina cadena II precursor	<b>hlyG</b>	303(99,0%)	27(90%)
	Gamma-hemolisina componente C	<b>hlyC</b>	305(99,6%)	29(96,7%)
	Gamma-hemolisina componente B	<b>hlyB</b>	306(100%)	30(100%)
Leucocidina	Panton-Valentine leukocidina	<b>lukF-PV</b>	59(19,2%)	0(0%)
	Panton-Valentine leukocidina	<b>lukS-PV</b>	58(18,9%)	0(0%)
	Leucocidina D	<b>lukD</b>	293(95,7%)	30(100%)
TSST	Toxina del síndrome de Shock tóxico	<b>tsst-1</b>	5(1,6%)	1(3,3%)
Toxina exfoliativa	Toxina exfoliativa A	<b>eta</b>	2(0,6%)	0(0%)
Exoenzimas	Serina proteasa V8	<b>sspA</b>	295(96,4%)	29(96,7%)
	Estafopaina cisteína proteinasa Ssp	<b>sspB</b>	304(99,3%)	30(100%)
	Estafostatina B	<b>sspC</b>	305(99,6%)	30(100%)

	Factor-bin secretado de Von Willebrand	<b>vWbp</b>	45(14,7%)	10(33,3%)
	Precursor de estafiloagulasa	<b>coa</b>	3(0,9%)	0(0%)
	Precursor de triacilglicerol lipasa	<b>lip</b>	306(100%)	30(100%)
	Precursor de estafiloquinasa	<b>sak</b>	32(10,4%)	0(0%)
Enterotoxinas	Precursor de enterotoxina A estafilocócica	<b>sea</b>	19(6,2%)	5(16,7%)
	Enterotoxina B estafilocócica	<b>seb</b>	5(1,6%)	0(0%)
	Enterotoxina C estafilocócica precursor	<b>sec</b>	4(1,3%)	0(0%)
	Enterotoxina D estafilocócica precursor	<b>sed</b>	25(8,1%)	0(0%)
	Enterotoxina H estafilocócica precursor	<b>seh</b>	3(0,9%)	0(0%)
	Enterotoxina K estafilocócica precursor	<b>selk</b>	32(10,4%)	0(0%)
	Enterotoxina G estafilocócica precursor	<b>selq</b>	26(8,4%)	0(0%)
	Enterotoxina L estafilocócica precursor	<b>sell</b>	4(1,3%)	0(0%)
Otros	Sortasa B específica NPQTN	<b>srtB</b>	303(99,0%)	28(93,3%)
	Sustancia de agregación prgb / A	<b>prgB</b>	1(0,3%)	0(0%)
	Sustancia de agregación	<b>EF0485</b>	1(0,3%)	0(0%)
	Antitoxina de esaG	<b>esaG1</b>	214(69,9%)	25(83,3%)
	Proteína antitoxina homólogo de esaG	<b>esaG4</b>	3(0,9%)	0(0%)
	Proteína antitoxina homólogo de esaG	<b>esaG2</b>	3(0,9%)	0(0%)
	Proteína antitoxina homólogo de esaG	<b>esaG3</b>	7(2,2%)	0(0%)
	Proteína antitoxina homólogo de esaG	<b>esaG5</b>	3(0,9%)	0(0%)
	Proteína antitoxina homólogo de esaG	<b>esaG6</b>	3(0,9%)	0(0%)
	Proteína antitoxina homólogo de esaG	<b>esaG9</b>	196(64,0%)	24(80%)
	Adenosina sintasa A	<b>adsA</b>	67(21,8%)	11(36,7%)

**ANEXO D. Proteínas previamente reportadas con cambio genéticos en aislamientos hVISA/VISA**

<b>Categoría funcional</b>	<b>Proteína</b>	<b>ID en el genoma N315</b>	<b>Descripción</b>	<b>Ref</b>
<b>Biogénesis de la pared celular</b>	<b>Atl</b>	BAB42150.1	Autolisina bifuncional que escinde el peptidoglicano que une a las células hijas al final del ciclo de división celular, lo que da como resultado la separación de las dos células recién divididas.	[47]
	<b>CapP</b>	BA000018.3	Enzima capsular de síntesis de polisacáridos Cap5, precursor de la cápsula UDP-ManNAcA .	[54]
	<b>DltA</b>	BAB42032.1	Ligasa de proteína transportadora de D-alanina-D- alanilo. Esta proteína está involucrada en la biosíntesis del ácido lipoteicoico, que forma parte de la biogénesis de la pared celular.	[47]
	<b>DltB</b>	BAB42033.1	Esta proteína de membrana participa en el transporte de D-alanina a través de la membrana plasmática.proteína de biosíntesis de ácido lipoteicoico	[47]
	<b>DltC</b>	BAB42034.1	Proteína transportadora de D-alanilo. Esta proteína está involucrada en la biosíntesis del ácido lipoteicoico.	[47]
	<b>DltD</b>	BAB42035.1	Proteína de transferencia de poli D-alanina. Esta proteína está involucrada la biosíntesis del ácido lipoteicoico.	[26]
	<b>LytM</b>	BAB41489.1	Peptidoglicano hidrolasa (autolisina) que actúa sobre los puentes interpeptídicos de poliglicina del peptidoglicano de la pared celular.	[51]
	<b>Pbp4</b>	BAB41830.1	Proteína de unión a penicilina 4 con actividad carboxipeptidasa de D-Ala-D-Ala de tipo serina.	[54]
	<b>SceD</b>	Q7A4F2.1	Transglicosilasa SceD capaz de escindir el peptidoglicano y afecta la aglutinación y separación de las células bacterianas.	[15 7]
	<b>TagA</b>	BAB41824.1	Esta proteína está involucrada en la vía de la biosíntesis del ácido teicoico, que forma parte de la biogénesis de la pared celular.	[54]
	<b>TagO</b>	BAB41935	Glicosil transferasa putativa que cataliza la formación de undecaprenil -PP - N- acetilglucosamina. Interviene en la síntesis de polímeros aniónicos de pared celular.	[54]

<b>Biosíntesis de membrana</b>	<b>GtaB</b>	BAB43591.1	UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa involucrada en la vía de biosíntesis de diglucosil-diacilglicerol, que es parte del metabolismo de los glicolípidos.	[54]
	<b>FmtB</b>	BAB43253	Lípido II: glicina glycytransferasa que une los residuos de glicina al residuo de lisina de los péptidos madre.	[12]
	<b>MprF</b>	BAB42452.1	Fosfatidilglicerol lisiltransferasa que cataliza la transferencia de un grupo lisilo de L- lisil - tRNA ( Lys) al fosfatidilglicerol (PG) unido a la membrana, que produce lisilfosfatidilglicerol (LPG), un componente principal de la membrana bacteriana con una carga positiva.	[54]
	<b>PgsA</b>	BAB42378.1	Fosfatidilglicerofosfato sintasa es una proteína involucrada en el primer paso de la síntesis del fosfatidilglicerol a partir de CDP- diacilglicerol en el metabolismo de los fosfolípidos.	[13 8]
	<b>TcaA</b>	BAB43448.1	Asociada a la membrana y desempeña un papel importante en la disminución de la resistencia a los antibióticos glucopéptidos. Unión de iones metálicos	[12]
<b>Sistemas reguladores</b>	<b>AgrA</b>	BAB43126	Regulador genético accesorio A requerido para la expresión de fase post-exponencial de alto nivel de una serie de proteínas secretadas	[12]
	<b>AgrC</b>	BAB43125	Regulador genético accesorio C con actividad histidina quinasa.	[12]
	<b>GraR</b>	Q99VW2.1	Proteína reguladora de respuesta GraR. Miembro del sistema regulador de dos componentes GraR / GraS implicado en la resistencia frente a péptidos antimicrobianos catiónicos (CAMP).	[17, 66]
	<b>GraS</b>	Q7A6Z3.1	Sensor de histidina quinasa. Miembro del sistema regulador de dos componentes GraR / GraS implicado en la resistencia frente a péptidos antimicrobianos catiónicos (CAMP).	[13 8]
	<b>SarR</b>	BAB43387	Regulador transcripcional de tipo HTH SarR	[12]
	<b>VraG</b>	BAB41850	Permeasa transportadora ABC	[47]
	<b>VraR</b>	BAB69827.1	Proteína reguladora de respuesta VraR. Miembro del sistema regulador de dos componentes VraS / VraR involucrado en el control de la biosíntesis de peptidoglicanos de la pared celular.	[65]
	<b>VraS</b>	Q99SZ7.1	Proteína sensor VraS. Miembro del sistema regulador de dos componentes VraS / VraR involucrado en el control de la biosíntesis de peptidoglicanos de la pared celular. Probablemente activa VraR por fosforilación. Promueve la expresión de betalactámicos y resistencia a glucopéptidos.	[48, 65, 66]

	<b>VraT</b>	QHX59371	VraT transportador. en <i>S. aureus</i> responde a diversas clases de antibióticos en la pared inhibidora de las células, como la metilina, que utilizan el sistema regulador de dos componentes VraSR. Regular por inhibición de un conjunto de genes (Stimulon la pared celular) que presumiblemente, facilita la resistencia a estos antibióticos	[47, 48, 65]
	<b>WalR</b>	BA000018.3	Proteína reguladora transcripcional WalR. Miembro del sistema regulador de dos componentes WalK / WalR que regula los genes implicados en la autólisis, la formación de biopelículas y el metabolismo de la pared celular. La sobreexpresión de walK / walR reduce la susceptibilidad a la vancomicina.	[12]
<b>Síntesis de ADN / ARN</b>	<b>MutL</b>	BAB42391.1	Proteína de reparación de desajustes de ADN. Involucrado en la reparación de desajustes en el ADN. Es necesario para la reparación de errores de apareamiento de ADN.	[54]
	<b>PurR</b>	BAB41684.1	Homólogo represor operón pur. Represor de la vía de biosíntesis de purina	[54]
	<b>RplL</b>	BAB41729.1	Proteína ribosómica 50S L7 / L12. Forma parte del tallo ribosómico que ayuda al ribosoma a interactuar con los factores de traducción unidos a GTP	[54]
	<b>RpoA</b>	BAB43316.1	Subunidad alfa de la ARN polimerasa	[54]
	<b>RpoB</b>	BAB41731.1	Subunidad beta de la ARN polimerasa dirigida por ADN	[47, 54]
	<b>RpoC</b>	BAB41732.1	La ARN polimerasa dependiente de ADN cataliza la transcripción de ADN en ARN utilizando los cuatro trifosfatos de ribonucleósidos como sustratos.	[54]
	<b>RpoD</b>	QDS66936.1	Factor sigma de la ARN polimerasa. Promueven la unión de la ARN polimerasa a sitios de iniciación específicos y luego se liberan	[54]
	<b>RpsU</b>	BAB42667.1	Proteína ribosómica 30S S21. Componente estructural del ribosoma	[54]
	<b>SigB</b>	AAP42804.1	Factor sigma de la ARN polimerasa.	[26]
<b>Virulencia</b>	<b>MsaA</b>	SUK46446.1	Regulador de virulencia. Regulación al alza del gen <i>sarA</i> , producción de proteasas y formación de biopelículas	[26]
	<b>MsaB</b>	WP_064126235.1	Regulador de virulencia. Activador transcripcional del operón <i>cap</i>	[26]
	<b>MsaC</b>	WP_031922007.1	Regulador de virulencia. Regulación a la baja del gen <i>sarA</i> , producción de proteasas y formación de biopelículas	[26]

	<b>MsrR</b>	BAB42454.1	Regulador de péptido metionina sulfóxido reductasa MsrR:Involucrado en la atenuación de SarA . Afecta la resistencia a oxacilina y teicoplanina, así como la síntesis de factores de virulencia.	[51]
<b>Síntesis de aminoácidos</b>	<b>ArcA</b>	BAB43733.1	Arginina desiminasa. Involucrado en la degradación de L-arginina a través de la vía ADI	[54]
	<b>LeuB</b>	BAB43145.1	3-isopropilmalato deshidrogenasa. Involucrado en la biosíntesis de L-leucina	[54]
<b>ATP</b>	<b>AtpA</b>	BAB43191.1	Cadena alfa de ATP sintasa. Subunidad reguladora. Produce ATP a partir de ADP en presencia de un gradiente de protones a través de la membrana.	[54]
	<b>RecA</b>	BAB42380.1	RecA proteína / recombinasa RecA. Catalizar la hidrólisis de ATP en presencia de ADN monocatenario, la captación de ADN monocatenario dependiente de ATP por el ADN dúplex y la hibridación dependiente de ATP de ADN monocatenario homólogo	[54]
	<b>Cmk</b>	BAB42571.1	Citidilato quinasa. Involucrado en el proceso metabólico de nucleótidos de pirimidina	[54]
<b>Otros</b>	<b>Ddh</b>	BAB43615.1	D-lactato deshidrogenasa dependiente de NAD +. Involucrado en el metabolismo del lactato y asociado con alto nivel de resistenciaglucopeptidos en <i>Enterococcus</i>	[77]
	<b>ClpP</b>	OBY01723	Subunidad proteolítica de proteasa Clp dependiente de ATP. Desempeña un papel importante en la degradación de proteínas mal plegadas	[26]
	<b>OpuD</b>	BAB42441.1	Transportador de glicina betaína. Componente integral de membrana	[54]
	<b>PotD</b>	BAB42199.1	Homólogo del precursor de la proteína de unión a la espermidina / putrescinaInvolucrado en el transporte de poliaminas	[54]
	<b>PykA</b>	BAB42787.1	Piruvato quinasa. Involucrado en la subvía que sintetiza piruvato a partir de D-gliceraldehído 3-fosfato	[54]
	<b>TarO</b>	AGY88858	N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa. Involucrado en la biosíntesis de ácidos teicoicos de la pared celular	[54]
	<b>TrpC</b>	QCY30012.1	Indol-3-glicerol-fosfato sintasa. Involucrado en la subvía que sintetiza L-triptófano a partir del corismato	[54]
	<b>UreD</b>	BAF68466.1	Proteína accesoria ureasa UreD. Requerido para la maduración de la ureasa mediante la incorporación funcional del metalocentro de níquel ureasa	[54]

**ANEXO E. Total de cambios identificados en las 47 proteínas agrupadas por categoría funcional**

<b>Categoría funcional</b>	<b>Proteína</b>	<b>Locus tag en el genoma de la cepa N315</b>	<b>N° de cambio de amino ácidos</b>	<b>N° de hVISA con proteína</b>	<b>N° de VSSA con proteína</b>
<b>Biogénesis de la pared celular</b>	Atl	SA_RS05135	13	30	305
	CapP	SA_RS00965	17	30	305
	DltA	SA_RS04530	9	30	305
	DltB	SA_RS04535	6	30	305
	DltC	SA_RS04540	0	30	305
	DltD	SA_RS04545	7	30	305
	LytM	SA_RS01560	20	30	305
	Pbp4	SA_RS03435	14	30	304
	SceD	SA_RS10925	6	30	305
	TagA	SA_RS03405	7	30	305
	TagO	SA0702	5	30	305
<b>Biogénesis de membrana</b>	GtaB	SA_RS13120	7	30	305
	FmtB	SA1964	1729	30	305
	MprF	SA_RS06785	606	30	305
	PgsA	SA_RS06365	10	30	305
	TcaA	SA_RS12325	11	30	305
<b>Sistemas reguladores</b>	GraR	SA_RS03525	6	30	305
	GraS	SA_RS03530	6	30	305
	VraR	SA_RS09755	3	30	305
	VraS	SA_RS09760	7	30	305
	VraT	SA1702	4	30	305
	WalK	SA_RS00245	12	30	305
	WalR	SA_RS00240	3	30	304
<b>Síntesis de DNA/RNA</b>	MutL	SA_RS13920	17	30	305
	PurR	SA_RS02615	5	30	304
	RplL	SA_RS02920	3	30	305
	RpoA	SA_RS11635	2	30	305
	RpoB	SA_RS02930	22	30	305
	RpoC	SA_RS02935	9	30	305
	RpoD	SA1390	262	30	305
	RpsU	SA_RS07930	1	30	305
	SigB	SA_RS10750	8	30	305
<b>Virulencia</b>	MsaA	SA_RS07015	13	30	305

	MsaB	SA_RS06790	1	30	305
	MsaC	SA_RS07000	12	30	305
	MsrR	SA_RS06795	7	30	305
<b>Síntesis de Aminoácidos</b>	ArcA	SA_RS13920	7	30	305
	LeuB	SA_RS10695	8	30	305
<b>ATP</b>	AtpA	SA_RS10975	7	30	305
	RecA	SA_RS06375	4	30	305
	Cmk	SA_RS07420	7	30	305
<b>Otros</b>	Ddh	SA_RS13255	13	30	305
	OpuD	SA_RS06725	11	30	305
	PotD	SA_RS05395	13	30	305
	PykA	SA_RS08560	6	30	305
	TrpC	SA_RS06835	16	30	305
	UreD	SA_RS11995	3	30	305

## ANEXO F. Total de cambios identificados en los aislamientos hVISA y VSSA

Sustitución de aa	hVISA = 30		VSSA =305		Dominio funcional afectado (posición en aa)
	n	%	n	%	
Atl - Y38H	28	93,3	53	17,4	
FmtB - T641I	0	0	135	44,1	
LytM - T5I	2	6,7	0	0	
Pbp4 - A191V	1	3,3	0	0	Peptidasa (56-288)
RpoB - A326V	2	6,7	3	1	
RpoB - D471E	1	3,3	0	0	RNA polimerasa Rpb2 (468- 536)
RpoB - I527M	1	3,3	0	0	RNA polimerasa Rpb2 (468- 536)
RpoB - S529L	1	3,3	0	0	RNA polimerasa Rpb2 (468- 536)
RpoC - L179F	1	3,3	0	0	RNA polimerasa Rpb1 (6-331)
GtaB - G82S	1	3,3	0	0	
MprF - F17C	1	3,3	0	0	Lisilfosfatidilglicerol-sintasa (11-290)
PgsA - I175V	1	3,3	0	0	
PgsA - V171C	1	3,3	0	0	
VraS - A172T	1	3,3	0	0	
WalK - G25C	1	3,3	0	0	PAS (68 – 175)
WalK - L14I	28	93,3	63	20,7	HAMP (11 – 63)
WalK - Q324-	1	3,3	0	0	
VraT - E156G	27	90	63	20,7	
ArcA - A293V	1	3,3	0	0	
LeuB - I5M	1	3,3	0	0	Dominio similar a deshidrogenasa de isopropilmalato (4-342)
OpuD - D547	1	3,3	0	0	Transportador de Betaina/Carnitina/Colina (17- 503)
OpuD - N548K	1	3,3	0	0	
TcaA - G56V	0	0	126	41,4	

### ANEXO G. Metabolitos que presentan cambios significativos en la comparación del perfil metabolómicos de hVISA y VSSA

Compound	Formula	Mas	CV for QC (%)	% Change	VIP
<b>Amino acids</b>					
L-Leucine	C6H13NO2	131,0946	5,3	-40,8	1,393
L-Tyrosinal	C9H11NO2	165,079	3,6	-56,7	1,490
L-Theanine	C7H14N2O3	174,1004	8,0	-51,6	1,381
L-Valine	C5H11NO2	117,079	5,1	-34,0	1,518
L- arginine	C10H18N4O6	290,1226	8,87	96,10	1,1854
Betaine	C5H11NO2	117,079	4,17	72,32	6,4098
L-Glycine	C6H9NO3	143,0582	3,42	51,24	1,4172
<b>Imidazopyrimidines</b>					
Adenine	C5H5N5	135,0545	1,31	-36,34	4,1789
Hypoxanthine	C5H4N4O	136,0385	3,30	-34,78	1,3449
<b>Nucleosides</b>					
Thymidine	C10H14N2O5	242,0903	4,8	-41,8	1,305
Uridine	C9H12N2O6	244,0695	3,9	-36,4	1,277
FAD	C27H33N9O15P2	785,1571	4,8	-32,0	1,526
NADH	C21H29N7O14P2	665,1248	4,2	-23,5	1,280
Adenosine	C10H13N5O4	267,0968	6,57	-51,20	1,5684
Guanosine	C10H13N5O5	283,0917	3,3	-44,7	1,497
<b>Amines</b>					
2-Hydroxyphenethylamine	C8H11NO	137,0841	6,86	-33,17	4,8756
<b>Carbohydrates</b>					
Alpha-Lactose	C12H22O11	342,1162	2,9	-68,4	1,953
<b>Phenylpropanoids</b>					
Hydroxyphenyllactic acid	C9H10O4	182,0579		-23,0	1,109
<b>Phospholipids</b>					
L-Phosphatidic acid	C29H57O10P	596,3689	4,7	-32,9	1,337
<b>Prenol lipids</b>					
Hydroxyiridodial glucoside pentaacetate	C26H36O13	556,2156	4,02	109,36	2,6776
<b>Pyridines</b>					
2-Picolinic acid	C6H5NO2	123,032	3,69	-57,65	1,1851
<b>Saccharolipids</b>					
N2-Maltulosylarginine	C18H34N4O12	498,2173	9,9	-54,5	1,573

Anexo H. Tabla 4-2 lípidos identificados por LC/MS y Hilic/MS en la comparación de hVISA- VSSA

Compound	Formula	Mass	<sup>a</sup> CV QC (%)	% Change	VIP
<b>Glycerolipids</b>					
Glycerol 1,3-dihexadecanoate	C35H68O5	568,5067	4,2	56,6	1,475
DG (18:0)	C21H40O5	372,2876	0,19	36,68	1,4899
<b>Glycerophosphoinositols</b>					
PI(44:4)	C53H95O13P	970,651	6,2	32,9	1,022
<b>Glycerophospholipids</b>					
PA(O-36:1)	C39H77O7P	688,5407	3,2	44,9	1,292
PA(P-33:0)	C36H71O7P	646,4937	3,1	35,2	1,326
PI(41:0)	C50H97O13P	936,6667	5,0	51,9	1,082
PE-NMe(13M5/13D5)	C53H94NO10P	935,6615	5,0	52,4	1,080
PG(36:1)	C42H81O10P	776,5567	19,4	-43,2	1,249
PG(32:1)	C38H73O10P	720,4941	4,6	-51,5	1,847
PA(O-37:1)	C40H79O7P	702,5563	4,7	-30,7	1,400
PA(33:0)	C36H71O8P	662,4887	4,9	-30,6	1,242
PG(32:0)	C39H75O10P	734,5098	4,7	-29,7	1,092
PG(31:1)	C37H71O10P	706,4785	4,5	-36,4	1,257
PG(i-25:0)	C31H61O10P	624,4002	9,2	-46,7	1,268
PG(38:6)	C44H75O10P	794,5098	13,3	-29,4	1,184
PA(44:3)	C47H87O8P	810,6139	4,0	33,4	1,125
PC(P-34:4)	C42H76NO7P	737,5359	5,1	20,4	1,038
PG(a-37:0)	C43H85O10P	792,588	5,5	27,5	1,003
PG(i-30:0)	C36H71O10P	694,4785	4,8	-18,3	1,131
PG(37:1)	C43H83O10P	790,5724	6,0	50,5	1,400
PG(29:0)	C35H69O10P	680,4628	12,2	-38,8	1,071
PG(34:0)	C41H79O10P	762,5411	4,0	23,8	1,260
PG(34:2)	C40H75O10P	746,5098	5,3	-23,3	1,272
PG(24:0)	C30H59O10P	610,3846	4,2	-40,5	1,437
PG(32:1)	C38H73O10P	720,4941	5,0	-32,6	1,473
PG(30:1)	C36H69O10P	692,4628	5,1	-36,2	1,424
PG(i-29:0)	C35H69O10P	680,4628	4,2	-24,6	1,608
PG(28:0)	C34H67O10P	666,4472	7,4	-43,9	1,651
PC(19:3)	C27H50NO7P	531,3325	6,8	-45,2	1,535
1-glycero-3-phosphocholine	C28H52NO7P	545,3481	5,2	-44,5	1,579
PC(20:2)	C28H52NO8P	561,3431	6,7	-40,1	1,553
PC(19:1)	C27H52NO8P	549,3431	11,4	-41,9	1,536
PG(i-26:0)	C32H63O10P	638,4159	9,7	-36,4	1,630
PG(26:1)	C32H61O10P	636,4002	10,9	-45,1	1,651
PG(24:0)	C30H59O10P	610,3846	5,6	-44,9	1,562
PG(20:0)	C26H53O9P	540,3427	4,0	-73,9	1,394
Stearoylglycerophosphoglycerol	C24H49O9P	512,3114	3,8	-60,3	1,327

PG(15:0)	C21H43O9P	470,2645	6,2	124,9	1,754
LPA(18:0)	C21H43O7P	438,2746	9,9	-26,7	1,035
PG(P-36:5)	C42H73O9P	752,4992	4,3	-38,0	1,460
1-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	C27H52NO7P	533,3481	5,1	-44,0	1,578
PS(22:2)	C28H52NO9P	577,338	5,7	-39,5	1,475
<b>Glycoside</b>					
N3'-Acetylpramycin	C23H43N5O12	581,2908	3,4	-40,6	1,606
Sarmentosin	C11H17NO7	275,1005	17,90	65,23	1,6754
<b>Fatty Acyls</b>					
1-O-alpha-D-glucopyranosyl-(2-tetradecanoyloxy)-eicosan-1-ol	C40H78O8	686,5697	3,3	89,5	1,356
FAHFA(O-44:0)	C34H66O4	538,4961	9,7	41,3	1,066
2,3-Dihydroxy-3-methylvalerate	C6H12O4	148,0736	4,7	-66,0	1,115