

**DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE VIRULENCIA EN
CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* CON RESISTENCIA
A METICILINA (MRSA) QUE PRESENTAN EL FENOTIPO DE
RESISTENCIA HETEROGÉNEA A VANCOMICINA (HVISA).**

Karen Bibiana Flórez Arrieta

**Universidad El Bosque
Facultad de Medicina
Pregrado en Medicina
Bogotá
2021**

**DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE VIRULENCIA EN CEPAS DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS CON RESISTENCIA A METICILINA
(MRSA) QUE PRESENTAN EL FENOTIPO DE RESISTENCIA
HETEROGÉNEA A VANCOMICINA (HVISA).**

Karen Bibiana Flórez Arrieta

Directora: Sandra Lorena Díaz Ortiz

Trabajo de Grado para Optar por el Título de Médico Cirujano

**Universidad El Bosque
Facultad de Medicina
Pregrado en Medicina
Bogotá
2021**



La Universidad El Bosque no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia.

Agradecimientos

En primera instancia agradezco a Dios por iluminar mi camino desde el primer día, por darme salud y fuerza para superar todos los obstáculos del camino.

De manera especial y sincera agradezco inmensamente a mi directora de trabajo de grado por haber aceptado dirigir este proyecto de investigación, Sandra Lorena Diaz, quien con su conocimiento, apoyo, orientación y en especial toda su paciencia, me guió en esta etapa para llegar al punto en el que estoy hoy, gracias a su rigurosidad y exigencia se formó una parte importante de mi carrera y aprendí mucho como persona y profesional. Agradezco infinitamente todos los espacios enriquecedores de conocimiento y por hacer posible la realización de este estudio.

También quiero agradecer a todo el equipo de la Unidad de Genética y Resistencia Antimicrobiana (UGRA) por brindarme toda su colaboración y las herramientas necesarias para llevar a cabo este proyecto de investigación. Quiero agradecer en especial a Betsy Castro y a Rafael Ríos por todo su conocimiento, tiempo y trabajo aportado en mi proyecto y en mi formación académica.

Agradezco enormemente a mi familia y en especial a mis padres, Gledys Arrieta y Jorge Flórez por todos los valores que me han inculcado, por todo su apoyo en momentos de angustia y por el ejemplo profesional y de resiliencia que veo reflejado en ellos. El camino no ha sido nada sencillo, pero gracias a todo el soporte emocional, su amor y motivación, he conseguido seguir adelante y concluir el trabajo de grado con mucho aprendizaje de por medio. Ustedes han sido mi motor y quienes impulsan mis sueños todos los días.

También agradezco a mis hermanos José Vivas, Leidy Vivas y Brayán Vivas por estar pendiente de mí y brindarme su apoyo cada día de mi vida. Agradezco a mi abuela Dina Rodríguez y a mi tía Natalia Flórez por cada frase de aliento ofrecido y por estar tan pendientes en esta parte importante de mi vida.

Quiero expresar mi gratitud a mi novio Carlos Guerrero por animarme y apoyarme a diario, por haber estado a mi lado en todo este proceso y por alentarme en los momentos más difíciles. Por último y no menos importante quiero agradecer a Laura Mercedes Lopez por su infinita colaboración y enseñanza en este proceso.

Tabla de contenido

| | |
|--|----|
| 1. Resumen | 11 |
| 2. Abstract | 12 |
| 3. Planteamiento del problema | 13 |
| Pregunta de investigación | 16 |
| 4. Objetivos | 17 |
| 4.1 <i>Objetivo general</i> | 17 |
| 4.2 <i>Objetivos específicos</i> | 17 |
| 5. Justificación | 18 |
| 6. Marco teórico | 21 |
| 6.1 <i>Staphylococcus aureus</i> | 21 |
| 6.2 <i>Factores de virulencia de Staphylococcus aureus</i> | 22 |
| 6.2.1 <i>Toxinas formadoras de poros (PFT)</i> | 23 |
| 6.2.2 <i>Toxinas exfoliativas (ET)</i> | 24 |
| 6.2.3 <i>Superantigenos (SAg)</i> | 24 |
| 6.2.4 <i>Exoenzimas</i> | 25 |
| 6.2.5 <i>Proteínas de superficie</i> | 25 |
| 6.3 <i>Staphylococcus aureus metilino resistente (SARM)</i> | 26 |
| 6.4 <i>Resistencia a vancomicina en Staphylococcus aureus</i> | 27 |
| 6.5 <i>Detección de hVISA</i> | 29 |
| 6.6 <i>Características genéticas asociadas a cambios en virulencia de cepas hVISA</i> | 30 |
| 7. Metodología | 33 |
| 7.1 <i>Genomas de cepas de Staphylococcus aureus a estudiar</i> | 33 |
| 7.2 <i>Detección de factores de virulencia en genomas de Staphylococcus aureus</i> | 34 |
| 7.3 <i>Comparación del potencial de virulencia de cepas hVISA y VSSA</i> | 35 |
| 7.4 <i>Determinación del tipo de agr en genomas de SARM</i> | 37 |
| 7.4.1 <i>Evaluación de la funcionabilidad de agr</i> | 37 |
| 8. Resultados | 39 |
| 8.1 <i>Detección y comparación del potencial de virulencia</i> | 39 |
| 8.2 <i>Tipificación de agr en hVISA y VSSA</i> | 45 |
| 8.3 <i>Funcionabilidad de agr</i> | 49 |
| 9. Discusión | 51 |

| | |
|-------------------------------|----|
| 10. Conclusiones | 55 |
| Referencias | 57 |

Diccionario de siglas

PVL: Panton-Valentine Leucocidina

SAg: Superantigenos

Sak: Estafiloquinasa

SAMS: *Staphylococcus aureus* meticilino sensibles

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

SAVR: *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina

SCC*mec*: Cassette estafilocócico de cromosoma mec

ScpA: Cisteína proteasas

Sdr: Proteínas ricas en serina-aspartato

Sea: Enterotoxina estafilocócica A

Sed: Precursor de enterotoxina estafilococia D

SeIK: Precursor de enterotoxina estafilocócica K

Spa: Proteína de superficie A

SspA: Serina proteasas

TCS: Sistema regulador de dos componentes

TNF: Factor de necrosis tumoral

VISA: *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a vancomicina

vWbp: Factor de unión a la proteína de von Willebrand

Glosario de términos

Bacteremia: Presencia de bacterias viables en la sangre circulante (1).

Bactericida: Antimicrobiano que produce la muerte de los microorganismos responsables del proceso infeccioso (2).

Biopelícula: Comunidades microbianas estructuradas adheridas a la superficie que contienen células sésiles incrustadas en una matriz extracelular autoproducida compuesta de polisacáridos, ADN y otros componentes (3).

Chi-cuadrado (χ^2): es una prueba de hipótesis que compara la distribución observada de los datos con una distribución esperada de los datos.

Coagulasa: Enzimas que causan coagulación del plasma formando un complejo con la protrombina humana.

E-Test: Técnica cuantitativa para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de antibióticos y antifúngicos mediante un gradiente de concentración del antimicrobiano sobre una tira (4).

Endocarditis: Infección de una válvula cardíaca nativa o protésica, una superficie endocárdica o un dispositivo cardíaco permanente (5).

Exoenzimas: Enzima secretada por una célula que funciona fuera de esa célula (6).

Farmacocinética: Procesos a los que un fármaco es sometido a través de su paso por el organismo

Farmacodinámica: Efectos bioquímicos y fisiológicos de los fármacos y de sus mecanismos de acción sobre el organismo (7).

Fenotipo: Expresión del genotipo como cualquier característica o rasgo observable de un organismo (8).

Fibrolisina: Enzima proteolítica que disuelve la fibrina (9).

Gen: Unidad física básica de la herencia (10).

Genoma: Secuencias con la información necesaria para generar moléculas con función biológica denominadas genes (11).

Glicopéptido: Antibiótico de origen microbiano compuesto de péptidos no ribosómicos cíclicos o policíclicos glicosilados.

Hemolisinas: Sustancias que producen lisis de los eritrocitos a través de la formación de poros en la membrana citoplasmática (12).

Hialuronidasa: Enzima que descompone el ácido hialurónico (13).

Infección: Estado de enfermedad resultante de la invasión y el crecimiento de microbios en el cuerpo (14).

Mutación: Alteración en la secuencia del gen que anula su función biológica (8).

Nefrotoxicidad: Lesión renal provocada de forma directa o indirecta por fármacos, representándose clínicamente como insuficiencia renal aguda, tubulopatía o glomerulopatía (15).

Neumonía: Inflamación del parénquima pulmonar (16).

Patogenicidad: Capacidad de los patógenos para multiplicarse y causar una infección la cual, a través de mecanismos bioquímicos de los microorganismos causa enfermedad, al manifestarse síntomas.

Sepsis: Reacción severa, desregulada del cuerpo ante una infección (17).

Transposón: Secuencias de ADN que llevan información genética para poder moverse dentro de los genomas de los seres vivos (18) .

Virulencia: Grado de patogenicidad de un microorganismo, capacidad de causar daño al huésped (19).

1. Resumen

La efectividad de la vancomicina para el tratamiento de infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) se ha visto amenazado por la emergencia de resistencia que puede no ser detectable, como el fenotipo hVISA (*Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a vancomicina heterogénea). hVISA se asocia a falla terapéutica y largas estancias hospitalarias y se ha postulado que su patogenicidad es diferente. En este estudio se evalúa el potencial de patogenicidad de hVISA en Latinoamérica mediante la detección de genes de virulencia en genomas de cepas SARM (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina) con fenotipo hVISA y determinar la funcionabilidad de *agr*, un importante regulador de virulencia en *S. aureus*. Se evaluaron genomas secuenciados de 350 cepas; 310 VSSA (*Staphylococcus aureus* sensible a vancomicina) y 39 hVISA. La detección de los genes se realizó mediante el sistema de búsqueda de alineación local básica BLAST. Adicionalmente, se tipificó el regulador genético de virulencia *agr* mediante *PCR in silico* y también se evaluó la funcionalidad de *agr* a través de la producción de la toxina hld. Los resultados mostraron una disminución en la presencia de los genes de virulencia asociados a inflamación, lesión tisular y adhesión en hVISA, y también un aumento en los factores implicados en la supervivencia bacteriana permitiéndole provocar infecciones más prolongadas y posiblemente aumentando su potencial de patogenicidad, ya que la disfunción de *agr* se asocia con la susceptibilidad reducida a vancomicina. Adicionalmente, se observó prevalencia de *agr II* de un 76% en VSSA y un 96% en hVISA. La funcionalidad de *agr* no demostró una diferencia significativa entre los dos fenotipos

Palabras clave

Vancomicina, Virulencia, hVISA, VSSA, SARM, Detección, *agr*, hld

2. Abstract

Vancomycin effectiveness for Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (SARM), has been affected by the emergence of resistance due to hVISA phenotype (*Staphylococcus aureus* with Heterogenous resistance to Vancomycin) phenotype detection is not always easy. hVISA is generally associated with treatment failure, long term hospital stays and it is known that its pathogenicity is different from VSSA (Vancomycin Sensitive *Staphylococcus aureus*) pathogenicity. In this study there was evaluated hVISA pathogenicity potential in Latin America. Through the virulence gene detection in SARM strain Genomes with hVISA phenotype and, it was established the *agr* functionality, an important *Staphylococcus aureus* virulence regulator. There were evaluated sequenced genomes of 350 strains, las follow: 310 of VSSA and 39 hVISA; Gene detection was made by using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Additionally, the *agr* was typed using the PCR *in silico* and its functionality was tested through the hld production. Results showed a decrease in the presence of virulence genes related to inflammation, tissue damage and hVISA adhesion and it was detected an increase in the bacteria surveillance factors, allowing them to cause prolonged infections, and probably increasing its pathogenicity potential, due to the *agr* dysfunction is linked a reduced susceptibility to Vancomycin. Furthermore, it was observed a 76% *agrII* prevalence in VSSA and a 96% prevalence in hVISSA. *Agr* Functionality didn't show a relevant difference in both phenotypes.

Key words

Vancomycin, Virulence, hVISA, VSSA, SARM, Detection, *agr*, hld.

3. Planteamiento del problema

En la actualidad *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SARM) es reconocido como uno de los más importantes patógenos causantes de infecciones nosocomiales en la comunidad de todo el mundo (20). La resistencia a meticilina en SARM se debe principalmente a la adquisición del gen *mecA* que codifica una proteína de unión a penicilina (PBP2a o PBP2') con baja afinidad por la mayoría de las penicilinas semisintéticas (21,22). Las infecciones por SARM se relacionan con estancias hospitalarias más largas, aumento de la tasa de mortalidad y altos costos en atención médica en comparación con *Staphylococcus aureus* meticilino sensibles (SAMS) (23).

Generalmente SARM cuenta con hábitats en el entorno hospitalario y en la comunidad, aunque hace algún tiempo se ha encontrado en animales domésticos, silvestres y acuáticos (22).

Respecto al manejo de infecciones por SARM, la sociedad americana de enfermedades infecciosas Infectious Disease Society of America (IDSA) recomienda el uso de la vancomicina como antibiótico de primera línea (24), un glicopéptido con actividad bactericida que actúa inhibiendo el proceso de síntesis de la pared celular bacteriana (25,26). A pesar de estar indicado para SARM, vancomicina posee unas propiedades dadas por su farmacocinética y farmacodinámica que influyen en su eficacia; su nefrotoxicidad, la disminuida penetrancia en tejidos y su actividad bactericida lenta evitan que el antibiótico alcance concentraciones suficientes en el sitio de la infección para poder optimizar efectos bactericidas en infecciones por SARM (27). Desafortunadamente en la última década se ha observado un creciente fracaso terapéutico en pacientes tratados con vancomicina, que se asocia a la gravedad de la enfermedad subyacente y principalmente a la elevación de las CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) (28–30); este hecho puede explicarse en parte por la pérdida de efectividad del antibiótico sobre la bacteria, debido a la emergencia de cepas con susceptibilidad reducida a vancomicina, lo que

genera gran preocupación en la comunidad médica. En 1997 se reportó el primer caso de VISA con CMI de 8 $\mu\text{g} / \text{ml}$ en Japón (31) y cinco años después, en 2002, se reportó la primera cepa de VRSA *S. aureus* resistente a vancomicina en Estados Unidos (32). Hasta el 2020 la prevalencia en el mundo de los fenotipos VRSA, VISA y hVISA fue del 1,5%, 1,7% y 4,6%, respectivamente (33). Genéticamente, la resistencia a vancomicina en altos niveles (CMI $\geq 16 \mu\text{g}/\text{ml}$) en cepas de *S. aureus* (SAVR) es conferida por el grupo de genes *vanA* codificados en el transposón Tn1546 que deriva de un plásmido de *Enterococcus* resistentes a vancomicina (VRE) (24,34). Adicionalmente de acuerdo a los puntos de corte de susceptibilidad del Clinical Laboratory Standard Institute, además de SAVR existen otros dos fenotipos con susceptibilidad reducida a vancomicina, el primero es *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a vancomicina (VISA) (CMI de 4-8 $\mu\text{g}/\text{ml}$), asociado con infección persistente y tratamiento prolongado con vancomicina, y el fenotipo *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a vancomicina heterogénea (hVISA) (CMI $\leq 2 \mu\text{g}/\text{ml}$) el cual contiene subpoblaciones celulares que sobreviven altas concentraciones de (CMI $\geq 4 \mu\text{g}/\text{ml}$). A diferencia de SAVR que es una resistencia adquirida por la transferencia del operón *vanA*, el desarrollo de los fenotipos VISA y hVISA se presenta por múltiples alteraciones genéticas (24,35). La resistencia a vancomicina se describe desde 1997 donde se reportó el primer caso de VISA con CMI de 8 $\mu\text{g} / \text{ml}$ en Japón (12) y cinco años después, en 2002, se reportó la primera cepa de SAVR *S. aureus* resistente a vancomicina en Estados Unidos (13). Se estima que la prevalencia en el mundo de los fenotipos VRSA, VISA y hVISA es del 1.5%, 1.7% y 4.6% respectivamente

Particularmente la detección de hVISA plantea un reto en el laboratorio clínico, debido a que se clasifican como susceptibles mediante los métodos estándar de laboratorio, sin embargo, estas cepas tienen subpoblaciones celulares no susceptibles a la vancomicina (CMI 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) que pasan desapercibidas (36) y limitando a su vez la estimación de la prevalencia del fenotipo.

A pesar de las limitaciones en su detección rutinaria, se han evidenciado factores de riesgo para infecciones por hVISA, como la alta carga bacteriana presente en las infecciones por endocarditis o en prótesis articulares y las concentraciones subinhibidoras de vancomicina al comienzo del curso de tratamiento de las infecciones por SARM, estudios han referido que provoca una bacteriemia persistente, estancias hospitalarias prolongadas y fracaso del tratamiento con vancomicina (37).

Las cepas VISA y hVISA presentan un aumento del grosor de la pared celular y disminución de la actividad autolítica. Así mismo, se ha descrito que las alteraciones genéticas que se han detectado en cepas de hVISA desencadenan cambios en la estructura celular y en la disminución de la expresión de cierto factores de virulencia que se asocian principalmente a la pérdida funcional del sistema regulador de dos componentes *agr*, un locus que está compuesto por un grupo de genes que regula positivamente la producción de factores de virulencia como las hemolisinas α -, β - y δ y la disminución de la producción de la proteína de superficie A (*spa*) (38,39). De esta forma estudios previos evidencian estas alteraciones genéticas descritas anteriormente como un cambio en el potencial de virulencia que podría describirse como una adaptación que genera *S. aureus* para evadir el sistema inmunológico del huésped y poder prolongar la infección (40).

Además de la dificultad en la detección de hVISA, las implicaciones clínicas de infecciones por este fenotipo no han sido evaluadas en Latinoamérica. Actualmente no hay muchos reportes de detección, prevalencia y caracterización genómica de cepas hVISA, por lo cual se desconoce si este fenotipo presenta cambios en virulencia y patogenicidad en consistencia con lo reportado en otras partes del mundo.

Pregunta de investigación

¿Cuál es el potencial de virulencia de las cepas hVISA de Latinoamérica?

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar el potencial de patogenicidad de cepas de MRSA con fenotipo hVISA causantes de bacteriemia en pacientes de Latinoamérica.

4.2 Objetivos específicos

- Comparar el potencial de patogenicidad de cepas hVISA con cepas VSSA mediante la detección de los genes asociados a virulencia en genomas de cepas de MRSA causantes de bacteriemia en pacientes de Latinoamérica.
- Evaluar el sistema regulatorio de *S. aureus agr* determinando el tipo y su funcionalidad en cepas de MRSA con fenotipo de resistencia hVISA.

5. Justificación

Staphylococcus aureus es una bacteria comensal del cuerpo humano que coloniza aproximadamente el 30% de la población (41), es causa importante de muchas enfermedades humanas como: bacteriemia, neumonía e infecciones de la piel y tejidos blandos, puede causar infecciones de baja complejidad e infecciones fulminantes como la endocarditis infecciosa. Además, tiene ventajas adaptativas en cuanto a la cantidad de factores de virulencia y toxinas que le permiten adaptarse a diversos entornos ambientales y evadir el sistema inmunológico humano (22).

SARM se ha identificado en muchas partes del mundo y representan aproximadamente entre 25 y 50% de las cepas infecciosas de *S. aureus*; aunque hay una variación considerable en la prevalencia de SARM entre países e incluso dentro de la misma región, es claro que este fenotipo se encuentra asociado a un aumento en la tasa de mortalidad (42).

Como se menciona anteriormente, desde hace décadas la vancomicina ha sido el principal agente antimicrobiano para el tratamiento de infecciones por SARM, principalmente en infecciones invasivas graves como neumonía y sepsis. Sin embargo, estudios y reportes han revelado que la tasa de fracaso del tratamiento con vancomicina ha aumentado. Se cree que VISA y hVISA son parte de las causas más importantes de fracaso del tratamiento, así como la severidad de la infección y las condiciones clínicas del paciente (43–45).

El uso de vancomicina para tratar infecciones causadas por SARM ha tomado un enfoque controvertido debido a la aparición de estas cepas con susceptibilidad reducida a vancomicina, entre las que destacan los fenotipos VISA que se caracteriza por una CMI de 4-8 µg/mL, SAVR con una CMI de >16 µg/mL y hVISA que hace referencia a una población mixta, donde la mayoría de sus

células no tienen o tienen poca resistencia y las células restantes cuentan con resistencia intermedia a la vancomicina (46).

Los mecanismos de resistencia presentes en los fenotipos hVISA y VISA son el resultado de características adaptativas, cambios fenotípicos y mutaciones en genes que codifican moléculas involucradas en la biosíntesis de la pared celular. Los principales cambios en hVISA son el engrosamiento de la pared celular y la pérdida de la función del sistema regulador de genes accesorio (*agr*), lo que causa alteraciones en la producción de biopelícula, promueve la resistencia a vancomicina y reduce la actividad de la coagulasa y la hemolisina (35).

La función principal de estos sistemas reguladores, especialmente de *agr*, es llevar a cabo la regulación positiva y negativa de algunos factores de virulencia como las proteínas extracelulares y de superficie, importantes para *S. aureus*, pues la disfunción de este sistema regulador implica una alteración en la producción de dichos factores.

El locus *agr* presenta dos transcripciones adyacentes, RNAII y RNAIII y su expresión es estimulada por dos promotores P2 y P3. RNAII codifica principalmente toda la maquinaria necesaria del sistema de detección de quórum y RNAIII es el efector principal, encargado de regular la expresión de los factores dependientes de *agr*. Debido a que dentro del locus de *agr* también se encuentra *hld*, se va a utilizar esta toxina para evaluar la funcionalidad de *agr* a través de su expresión. Entre los factores regulados positivamente se encuentran *hla*, *hlg*, leucocidinas y lipasa; por otro lado, produce una regulación negativa de *spa* (47).

Estos cambios adaptativos dados por las mutaciones en hVISA le permiten a la bacteria generar resistencia a la vancomicina; en cuanto a las alteraciones asociadas a virulencia, los más estudiados han sido los cambios en la producción de hemolisinas que revelan una disminución de la delta

hemolisina (*hld*) y de la proteína de superficie A (*spa*) que también se encuentra atenuada en este fenotipo.

Comúnmente la detección de hVISA es escasa en el ámbito clínico, ya que por métodos estándar se clasifica como una cepa susceptible a vancomicina debido a que las características de estos métodos como dilución en caldo o E-test, no son capaces de detectar la otra parte de la población de hVISA con susceptibilidad intermedia a vancomicina que se encuentra en mínima proporción.

Por otro lado, su detección e impacto clínico se ha visto reflejado en el ámbito investigativo en estudios que se han basado en indagar los diferentes métodos para la detección correcta de hVISA, su prevalencia, sus cambios estructurales, cambios en virulencia y las repercusiones de estas alteraciones que desencadenan en aumento del fracaso terapéutico, estancias hospitalarias más prolongadas y aumento en la severidad de la infección (46,48).

Estas variaciones se han descrito previamente en Estados Unidos y en países de Europa y Asia (36,49). En Latinoamérica no se han descrito aún y por ello se hace necesario realizar una búsqueda de los cambios de virulencia encontrados en los fenotipos hVISA, además de esclarecer los determinantes genéticos implicados en la susceptibilidad reducida a vancomicina en genomas SARM y su relación con el potencial de patogenicidad.

6. Marco teórico

6.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es un coco Gram positivo dispuesto en racimos, no móvil (no posee flagelos, ni fimbrias), no esporulado lo que quiere decir que no tiene endosporas bacterianas, que son formas de perdurabilidad frente al calor, la radiación y las influencias químicas; son anaerobios facultativos ya que obtienen su energía en ausencia de oxígeno; aunque el oxígeno no es tóxico para ellos y pueden desarrollar metabolismo respiratorio a partir del oxígeno o metabolismo fermentativo (50).

Existen varios métodos para la identificación de *S. aureus* en laboratorio, entre los que destacan el de la morfología y afinidad tintorial en el Gram (Coco Gram positivo), el cultivo en agar sangre que se emplea para evidenciar el crecimiento y las características del género, y el cultivo en agar sal manitol que permite el crecimiento de bacterias Gram positivas e inhibe el crecimiento de Gram negativas y, además, permite diferenciar *Staphylococcus* coagulasa positivo de los coagulasa negativos. *S. aureus* se caracteriza por formar colonias de 0.5-1.5 mm de diámetro, lisas, elevadas, brillantes y de bordes enteros, presentan consistencia cremosa y pigmentación que va del amarillo a dorado, también son coagulasa positivo, es decir convierte el fibrinógeno en fibrina y catalasa positivo que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno; estas dos pruebas son esenciales para su identificación en laboratorio.

Adicionalmente, *S. aureus* posee una serie de factores de virulencia dentro de los cuales están las enzimas como la hialuronidasa que hidroliza el ácido hialurónico en el tejido conectivo, la fibrolisina que disuelve los coágulos de fibrina y la lipasa que hidroliza los lípidos; además de estas exoenzimas

S. aureus tiene una gran variedad de toxinas, factor importante para la virulencia de esta bacteria, y se dividen en tres grupos principales: las toxinas formadoras de poros (PFT), las toxinas exfoliativas (ET) y los superantígenos (SAg) (50). Gracias a la enorme variedad de factores de virulencia con los que cuenta éste patógeno, *S. aureus* puede producir varias enfermedades como: el síndrome de shock tóxico, intoxicación alimentaria, endocarditis infecciosa, infecciones en piel como el impétigo, neumonía necrotizante y bacteriemia.

6.2 Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es un patógeno importante con gran versatilidad, tiene la capacidad de adaptarse a diferentes entornos y vivir como organismo comensal en la piel, nariz y garganta. Puede comportarse como colonizador permanente o intermitente de las fosas nasales humanas y de la piel, por lo que los individuos colonizados tienen un mayor riesgo de desarrollar una infección y de estar expuestos a la amplia gama de factores de virulencia producidos por *S. aureus* (51).

Produce toxinas, enzimas y antígenos de superficie que provocan el debilitamiento de la respuesta inmune y adaptativa del huésped. Las toxinas (PFT, ET y SAg) en general degradan ciertas células del huésped como las células epiteliales, endoteliales y los linfocitos T y cuentan además con la capacidad de modular las respuestas inmunitarias que se describen a continuación.

6.2.1 Toxinas formadoras de poros (PFT)

Las toxinas son moléculas secretadas por la bacteria que interfieren directamente con el huésped comportándose como una sustancia venenosa para el organismo. Estas toxinas en particular se encargan de formar poros en la membrana, provocando la salida de moléculas y metabolitos vitales de las células del huésped generando lisis celular. Este grupo está compuesto por las hemolisinas, las leucotoxinas y las modulinas solubles en fenol (52).

- **Hemolisinas:** pueden ser de tipo alfa o beta, son toxinas que causan lisis en una amplia variedad de células humanas como: eritrocitos, células epiteliales, células endoteliales y células T, todas encargadas de la respuesta inmunitaria del huésped frente a la infección por la bacteria (50,52).
- **Leucotoxinas, Pantón-Valentine Leucocidina (PVL):** estas toxinas formadoras de poros constan de dos componentes proteicos diferentes clasificados como "S" y "F" que se encargan principalmente de la inflamación y la lesión tisular aguda. PVL está asociada mayormente con neumonía necrotizante grave y aunque se encuentra en un pequeño porcentaje en las cepas de *S. aureus* PVL se asocia con las cepas SAMR (53,54).
- **Modulinas solubles en fenol (PSM):** pueden ser δ -toxina y PSM α 1-4, tienen como función lisar neutrófilos, monocitos y eritrocitos, pero no las células dendríticas que son las células presentadoras de antígenos, evadiendo de esta forma la respuesta inmune innata. Las PSM también alteran la proliferación de células B y células T, lo que impide el establecimiento de respuestas inmunitarias protectoras (55).

6.2.2 *Toxinas exfoliativas (ET)*

Las ET conocidas son ET A/B/C/D, ETA Y ETB, son las toxinas más implicadas en el daño de la piel humana; son serinas proteasas con alto grado de especificidad que reconocen y escinden las cadherinas desmosómicas de los queratinocitos únicamente en las capas superficiales de la piel, provocando así el síndrome de piel escaldada por estafilococos (SSSS) que se caracteriza por erupción eritematosa, formación de ampollas grandes, frágiles y desprendimiento de la piel; este cuadro de epidermólisis aguda es más frecuente en los lactantes y los niños (56).

6.2.3 *Superantigenos (SAg)*

Se dividen en 3 grupos, las enterotoxinas estafilocócicas (SE) con capacidad de inducir emesis y diarrea que se consideran características de intoxicación alimentaria, SAg similares a enterotoxinas estafilocócicas (SE-1) que estimulan la proliferación de células T pero no están asociadas con vómito y diarrea y la toxina-1 del síndrome de shock tóxico (TSST-1) caracterizada por una enfermedad sistémica aguda, con hipotensión, fiebre, erupción cutánea y descamación, este síndrome puede clasificarse como menstrual cuando se asocia a colonización vaginal por uso de tampones o como no menstrual (57).

Otros factores de virulencia fundamentales en la supervivencia y diseminación de *S. aureus* son las exoenzimas y las enzimas que degradan el tejido como: nucleasas, proteasas, lipasas y proteínas de superficie como las Fnbp's y Clf's que facilitan la adhesión a componentes de la matriz extracelular como el colágeno, la fibronectina y el fibrinógeno (53).

6.2.4 *Exoenzimas*

Estos factores son secretados con la función de adquirir nutrientes para la supervivencia bacteriana y la degradación de tejidos para evadir el sistema inmunológico del huésped, algunas de ellas son las nucleasas que se encargan de descomponer sustratos de ADN y ARN, las proteasas que se dividen en 3 grupos: metaloproteasas, cisteína proteasas y serina proteasas, encargadas de la diseminación y nutrición bacteriana, y las lipasas y las hialuronidasas, que cumplen la función de degradar lípidos y ácido hialurónico respectivamente para obtener energía, degradar tejidos, facilitar la diseminación bacteriana y promover la formación de biopelícula.

6.2.5 *Proteínas de superficie*

Se dividen en 3 grupos: 1) La familia MSCRAMM que hace referencia a las proteínas de superficie que median la unión a componentes de la matriz extracelular del huésped como el fibrinógeno, la fibronectina y el colágeno; dentro de estos se encuentra el factor de aglutinación ClfA y ClfB, la proteína serina-aspartato SdrG, la proteína de unión a fibronectina FnBPA o FnBPB, la proteína de unión a sialoproteína ósea Bbp y la proteína de adhesión al colágeno Cna. 2) Las proteínas transportadoras de hierro que cumplen la función de capturar el grupo hemo de la hemoglobina promoviendo la supervivencia bacteriana y 3) La proteína de superficie A SpA que cumple un papel importante en la evasión inmunitaria bacteriana (58).

6.3 *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SARM)

Actualmente *S. aureus* es un patógeno con gran importancia clínica debido a su versatilidad y capacidad para causar diferentes enfermedades en humanos como infecciones en piel, tejidos blandos, torrente sanguíneo, tracto respiratorio inferior, hueso, etc. Con el transcurso del tiempo, el tratamiento de esta bacteria se ha hecho cada vez más complicado, debido a que este microorganismo tiene habilidad para desarrollar resistencia a los antimicrobianos por medio de mecanismos que incluyen la producción de enzimas y síntesis de blancos moleculares con baja afinidad por los antibióticos (59).

En 1944 con el fin de combatir las infecciones por *S. aureus* la penicilina se incluyó en la práctica clínica, lamentablemente al poco tiempo esta bacteria creó resistencia al antibiótico mediada por la producción de β -lactamasa; posteriormente, en 1959 este problema se solucionó por el momento con la introducción de la meticilina, la primera penicilina semisintética resistente a penicilinasas (60).

Desafortunadamente, al año siguiente de la introducción de la meticilina contra estafilococos productores de β -lactamasa, *S. aureus* desarrolló resistencia. Las cepas de SARM adquirieron esta resistencia por medio de la transferencia horizontal de genes por un elemento genético móvil llamado cassette estafilocócico de cromosoma mec (*SCCmec*), que es una secuencia genética que propaga el gen *mecA* encargado de codificar una proteína de unión a penicilina adicional (PBP2a PBP2') con baja afinidad por las penicilinas semisintéticas y β -lactámicos (22).

La PBP2a es una proteína con un dominio transpeptidasa, un dominio transmembrana y un dominio que posee un sitio alostérico y no se une a penicilina (61), este sitio activo de PBP2a es más estrecho para los β -lactámicos y en consecuencia el antibiótico no consigue afectar la síntesis de peptidoglicano (22). Este gen no se encuentra exclusivamente en *S. aureus* también se ha descrito en otras especies

como *S. sciuri*, *S. pseudintermedius*, *S. intermedius*, *S. vitulinus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. saprophyticus* (62). La prevalencia de SARM representa aproximadamente del 25 al 50% de las infecciones causadas por *S. aureus* en entornos hospitalario a nivel global, sin embargo, esto varía significativamente dependiendo del continente, de los países y hasta del hospital (42).

6.4 Resistencia a vancomicina en *Staphylococcus aureus*

La terapia de elección para el tratamiento de infecciones por SARM son los glicopéptidos, principalmente la vancomicina. Posterior al lanzamiento de éste antimicrobiano durante algún tiempo no hubo reportes de resistencia a vancomicina hasta 1997 en Japón donde se describió el primer caso con susceptibilidad reducida (63).

El sitio de acción de la vancomicina es la pared celular bacteriana, estructura fundamental para mantener la integridad celular que se encuentra formada por cadenas de peptidoglucanos compuestas de amino azúcares alternados llamados N-acetil glucosamina y N-acetil murámico; cada cadena de peptidoglucano contiene una cadena pentapeptídica compuesta por l-Ala-d-Iso-Gln-l-Lys-d-Ala-d-Ala, unidos entre sí por puentes interpeptídicos que conectan el residuo lisina de un péptido con la penúltima d-alanina de un péptido madre vecino; además, está compuesta por ácidos teicoicos y lipoteicoicos unidos covalentemente al peptidoglucano. La vancomicina, actúa uniéndose específicamente a un residuo d-Ala-d-Ala C-terminal del precursor de peptidoglucano y forma un complejo estable que evita la síntesis de la pared celular (35).

El primer caso de *S. aureus* resistente a vancomicina (SAVR) fue reportado en el año 2002 en Estados Unidos en un paciente diabético. La resistencia a vancomicina en altos niveles (SAVR) (CMI de >16

µg/mL) se debe a la presencia de los genes *vanA* que en general se encuentran en una estructura genética móvil denominada transposón Tn1546, el cual proviene originalmente de un plásmido conjugativo de enterococos resistentes a vancomicina (ERV) (64).

VanA está compuesto por genes *vanA*, *vanH*, *vanX*, *vanS*, *vanR*, *vanY* y *vanZ*, se encuentra regulado por un sistema regulador de dos componentes (TCS) *vanS* y *vanR* que al detectar la vancomicina activan la transcripción del operón; *vanA* y *vanH* son responsables de sintetizar el dipéptido D-Ala-D-Lac, *vanX* es una D-dipeptidasa que hidroliza el enlace éster D-Ala-D-Ala asegurándose de que el dipéptido D-Ala-D-Lac recién formado por *vanA* y *vanH* pueda unirse al precursor del peptidoglicano. *VanY* tiene una función similar a *vanX*, y *vanZ* tiene una función no muy bien comprendida pero que ha demostrado ser importante en resistencia contra teicoplanina. En conclusión, el grupo de genes *VanA* le confiere a *S. aureus* la capacidad de sintetizar nuevos precursores del peptidoglucano D-Ala-D-Lac (reemplazando los propios que son D-ala D-ala), alterando la pared celular nativa y provocando que la vancomicina no pueda unirse a su sitio primario (65).

El otro tipo de resistencia a la vancomicina es el fenotipo de resistencia intermedia a vancomicina (VISA) asociado con infección persistente, fracaso terapéutico y tratamiento prolongado con vancomicina. El CLSI definió los puntos de corte de resistencia como una CMI de caldo de vancomicina de 4 a 8 µg/mL.

Los determinantes genéticos de VISA se encuentran relacionados con mutaciones en los genes *walkR*, *vraSR*, *rpoB* y el sistema *yvqF/vraSR* (66–68), la mayoría de los genes anteriores se encuentran relacionados con la biosíntesis y el metabolismo de la pared celular estafilocócica, específicamente, con sistemas reguladores de dos componentes que controlan la transcripción de genes en la síntesis de la pared provocando el aumento del grosor de la misma y una disminución de la actividad autolítica de las enzimas encargadas de la sustitución de la pared celular (24).

VISA viene precedido por el fenotipo *S. aureus* con resistencia intermedia a vancomicina heterogénea hVISA que hace referencia a una población de células mixtas en las que una parte tiene poca resistencia a vancomicina ($\text{CMI} \leq 2 \mu\text{g/mL}$) y otra parte es resistente a nivel de VISA ($\text{CMI} \geq 4 \mu\text{g/mL}$). Este fenotipo tomó importancia gracias a la asociación de cepas VISA con CMI en $4 \mu\text{g}$ y el fracaso del tratamiento con vancomicina. Adicionalmente, la mayoría de las infecciones por estas cepas ocurren en pacientes con comorbilidades graves como malignidad, diabetes o insuficiencia renal.

Se ha determinado que el desarrollo de las cepas hVISA/VSSA se debe a un proceso de mutaciones genéticas acompañado de disminución de la virulencia y de interacciones huésped-patógeno alteradas que favorecen la infección persistente y recurrente (68).

6.5 Detección de hVISA

Las infecciones por hVISA representan un reto en el laboratorio clínico ya que son cepas susceptibles *in vitro* a la vancomicina con $\text{CMI} < 4 \mu\text{g/mL}$, por lo tanto, se clasifican como susceptibles por los métodos estándar de laboratorio como la microdilución en caldo, dilución en agar y los métodos estándar de E-Test, es por esto que se hace necesario utilizar otros métodos no convencionales para su identificación (36).

Existen métodos de detección más especializados para hVISA como el análisis poblacional del área bajo la curva (PAP-AUC) que es el 'Gold standard' para su detección, aunque tiene uso limitado pues su implementación en los laboratorios clínicos es demasiado laboriosa. Este método se basa en la

detección y cuantificación de las subpoblaciones que son capaces de crecer a concentraciones más elevadas de vancomicina comparándolas con la cepa de referencia de hVISA (35).

El E-Test GRD (detección de resistencia a glicopéptidos) tiene una gran sensibilidad y especificidad pero aún no se encuentra aprobado para su uso en la práctica clínica, consiste en la aplicación de una tira E-Test con un gradiente de doble cara, en un extremo tiene vancomicina y en el otro teicoplanina y se adiciona un suplemento nutricional en un agar con suspensión bacteriana, el aislado de prueba se considera positivo para hVISA si la tira de E-Test GRD es ≥ 8 mg/L para vancomicina o teicoplanina y la CMI estándar de vancomicina E-Test es ≤ 4 mg/L (69).

El macrométodo (MET) tiene sensibilidad y especificidad considerablemente aceptables, aunque no tan buenas como las del E-Test GRD; esta prueba consiste en aplicar una suspensión de colonias aisladas de un cultivo de agar, luego se aplican las tiras de gradiente de CMI de vancomicina y teicoplanina E-Test y los resultados se interpretan como cuando las CMI con vancomicina y teicoplanina son ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$ o cuando la CMI de teicoplanina es ≥ 12 $\mu\text{g/mL}$ (70).

6.6 Características genéticas asociadas a cambios en virulencia de cepas hVISA

Como se explicó anteriormente, el mecanismo de resistencia de las cepas VISA y hVISA se produce por mutaciones que provocan una reducción del recambio y de la actividad autolítica de la pared celular, causando impacto en las respuestas inmunitarias del huésped. Así mismo, se ha observado que estos cambios alteran la formación de biopelícula, la producción de cápsulas de polisacáridos, la expresión de proteína A de superficie (SpA) y la activación del sistema regulador *agr* (35).

El regulador genético accesorio *agr* es un locus con unidades transcripcionales que están dirigidas por promotores (P) y consta de 4 genes *agrBDCA* controlados por el P2. La transcripción de este locus produce RNAIII que es la unidad funcional de *agr* (38), esta tiene la capacidad de efectuar la regulación positiva de la transcripción de genes para las proteínas extracelulares que incluyen alfa-toxina (Hla), serina proteasas (SspA), cisteína proteasas (ScpA), gamma-hemolisina (Hlg), leucocidinas (LukAB, lukGH) y lipasa, y regula negativamente la transcripción de genes que codifican para proteínas de superficie incluidas la proteína A (SpaA), la proteína secretora de la pared celular (IsaA) y los receptores de superficie (MnhA, MnhF y MnhG) (47).

El gen *spa* codifica SpaA, una proteína de superficie importante que interviene en una serie de funciones que aumentan la virulencia de *S. aureus*, entre estas funciones destacan la actividad anti fagocítica que le proporciona la unión a la fracción Fc de la IgG (71), y la unión al factor Von Willebrand que le permite activar la coagulación y la actividad proinflamatoria tras activar el factor de necrosis tumoral (TNF) (72).

Se ha evidenciado que en algunas cepas de hVISA se produce una regulación negativa del gen *spa* lo que ocasiona disminución de la expresión de la proteína SpaA afectando la interacción huésped-patógeno al evitar la coagulación y la actividad proinflamatoria (46). Otro cambio observado en hVISA y VSSA que propicia disminución de la función de *agr* es la ausencia de hemólisis, lo que sugiere disfunción en los pasos que producen las toxinas hemolisinas o incapacidad de estas cepas para secretar las hemolisinas por una pared celular engrosada (38,63,73).

La delta-hemolisina es una toxina citotóxica con actividad principalmente sobre los eritrocitos, es el único factor de virulencia que es secretado y regulado por *agr*, esto se debe a que el gen que la codifica *hld* se encuentra ubicado en el locus de *agr*, así, la expresión de delta hemolisina puede utilizarse como marcador de la función adecuada de *agr* y la disminución de su producción se asocia a cepas

hVISA (38), por su parte la hemolisina alfa (Hla) es una toxina con actividad lítica en eritrocitos, células epiteliales y macrófagos, la producción de esta toxina también se encuentra disminuida en cepas VISA cuando la función y la activación de *agr* se encuentra comprometida. Esta disminución de la producción de Hla reduce considerablemente la virulencia en comparación con las cepas VSSA (74).

7. Metodología

7.1 Genomas de cepas de *Staphylococcus aureus* a estudiar

En este estudio se incluyeron genomas secuenciados de 350 cepas de las cuales 310 corresponden a VSSA, 39 a hVISA y una única cepa VSSA control (Mu3), estos genomas fueron secuenciados en un estudio de ‘Detección de resistencia intermedia heterogénea a vancomicina en aislados de SARM de América Latina’ (75). Estos aislamientos bacterianos fueron recolectados de un total de 1189 cepas confirmadas como SARM en dos estudios de vigilancia multicéntricos realizados en América Latina (2006-2008 y 2011-2014) (53,54).

La detección de los aislados de VISA y hVISA se realizó con la prueba de E-test y macrometodo, adicionalmente se utilizó la prueba PAP-AUC de las que solo 6 cepas se confirmaron como hVISA. Estos genomas fueron secuenciados utilizando el Kit DNeasy® Blood & Tissue kit (QIAGEN) diseñado para la extracción y purificación rápida del ADN. Posteriormente las librerías de ADN se prepararon con el kit ADN Nextera XT se secuenciaron las lecturas utilizando la maquina HiSeq and MiSeq, con la plataforma Illumina.

Además, a los genomas ensamblados se les realizó una tipificación de secuencias multilocus (MLST) que se llevó a cabo con el servidor web MLST 1.8, por último, los genes de resistencia a antibióticos se detectaron utilizando Blastx contra la base de datos Resfinder. Todos estos genomas se encuentran disponibles en la base de datos de NCBI (78).

7.2 Detección de factores de virulencia en genomas de *Staphylococcus aureus*

La detección se realiza con información procedente de la página Virulence Factors of pathogenic Bacteria, creada por el NHC Key Laboratory of Systems Biology of Pathogens de Beijing China, que dispone de una gran base de datos de factores de virulencia. Esta detección se realizó con el fin de identificar los factores de virulencia expresados en hVISA y VSSA, y también para establecer las diferencias entre ambos fenotipos.

Staphylococcus aureus tiene una gran variedad de factores de virulencia, que incluyen 7 factores de adherencia (CNA, clfA y clfB, Eap, Map, FnBPs, icaABCDR, SDr), un factor específico de antifagocitosis (Capsula), 7 exoenzimas (aur, Hialuronidasa, Lipasa, sspBC, coa, SspA, vWbp), 5 factores de evasión inmune (Adenosín sintasa A, CHIPS, sbi, SCIN, spa), un factor de captación de hierro (Isd), un factor activador del plasminógeno (sak), un factor de sistema de secreción (Sistema de secreción tipo VII) y 8 tipos de toxinas (hla, hlb, hld, γ -hemolisina, ETAB, PVL, SE, TSST-1).

El tamaño del cromosoma de *S. aureus* es de aproximadamente 2,82 Mpb y está conformado por 2.278 genes totales, 2.696 regiones totales que codifican un gen (CDS), 2.645 genes que codifican, 2.645 CDS para proteínas, 82 genes ARN, 59 ARNt, 4 ncRNA, 51 pseudogenes, 51 CDS sin proteínas, 11 pseudogenes de parada interna, 14 pseudogenes con múltiples problemas, 24 pseudogenes incompletos y ningún pseudogen de residuos ambiguos.

De esta forma, los genomas de *S. aureus* se analizan utilizando la página Virulence Factors of pathogenic Bacteria, que cuenta con información sobre factores de virulencia de todas las bacterias. Además, permite un acceso sencillo a genomas completos y factores de virulencia de patógenos bacterianos mediante la plataforma VFAnalyzer. Para esto se utilizó el sistema de búsqueda de

alineación local básica BLAST del servidor NCBI que compara una secuencia problema de nucleótidos o de proteínas con todas las secuencias de una amplia base de datos, calculando de esta manera las coincidencias (79).

En este estudio se utilizó dos variantes de la herramienta BLAST, BLASTX que compara una secuencia de nucleótidos frente a una de proteínas de la base de datos del mismo tipo con el objetivo de localizar e identificar secuencias de ADN en el genoma (31,52).

7.3 Comparación del potencial de virulencia de cepas hVISA y VSSA

Una vez detectados los genes de virulencia asociados a hVISA y mediante la aplicación de la prueba estadística chi-cuadrado (χ^2) se realiza una comparación del potencial de virulencia entre hVISA y VSSA con el fin de evaluar si existe o no diferencias estadísticamente significativas entre ambas cepas.

El test de chi-cuadrado, es una herramienta estadística ampliamente difundida en investigación biomédica. Este test contrasta dos hipótesis, una hipótesis nula o hipótesis de independencia de las variables (H_0) y una hipótesis alternativa o hipótesis de asociación de las variables (H_1). En términos simples, el test de χ^2 compara los resultados observados con resultados teóricos, estos últimos calculados bajo el supuesto que las variables fuesen independientes entre sí, es decir, bajo el supuesto que H_0 fuese verdadera. Si los resultados observados difieren significativamente de los resultados teóricos, es decir, difieren de H_0 , es posible rechazar H_0 y afirmar que H_1 es verdadera, concluyendo que las variables están asociadas. Por el contrario, si los resultados observados y teóricos no difieren

significativamente, se confirma la veracidad de H_0 y se afirma que las variables son independientes (80).

Para determinar la asociación o independencia de las dos cepas se considera que valores de $p > 0,01$ son estadísticamente no significativos; también se evaluó cada factor de virulencia como una variable independiente para evitar sesgos debido a que el tamaño de la muestra de hVISA es mucho menor.

Adicionalmente se realizó la prueba de 'T' de Student cuyo fundamento es evaluar si hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de dos grupos con distribución normal y homogeneidad en sus varianzas. La prueba 'T' de Student forma parte de las pruebas paramétricas que son un tipo de pruebas de significación estadística que cuantifican la asociación o independencia entre una variable cuantitativa y una categórica, estas pruebas exigen ciertos requisitos previos para su aplicación: la distribución Normal de la variable cuantitativa en los grupos que se comparan, la homogeneidad de varianzas en las poblaciones de las que proceden los grupos y una n muestral no inferior a 30. Su incumplimiento conlleva la necesidad de recurrir a pruebas estadísticas no paramétricas (81,82).

La utilidad de realizar 2 pruebas estadísticas es obtener resultados más específicos y que aporten mayores bases de comparación a la investigación con el fin de facilitar la inferencia a partir de la información estudiada. Las pruebas de chi-cuadrado y 'T' de Student ofrecen información detallada que permite definir y establecer elementos básicos en la toma de decisiones.

7.4 Determinación del tipo de *agr* en genomas de SARM

La tipificación de *agr* tiene como objetivo principal establecer si en Latinoamérica existe mayor prevalencia de alguno de sus 3 tipos (*agr I*, *agr II* y *agr III*), pues en estudios previos en algunas partes del mundo se ha evidenciado que *agr II* se relaciona con una susceptibilidad reducida a vancomicina en mayor proporción (38,83–85), y en otras regiones se relaciona con *agr I*.

En este caso y aprovechando la disponibilidad de los genomas de las 350 cepas se emplea la estrategia de PCR *in silico*, que es una herramienta computacional usada para calcular los resultados de la PCR empleando un conjunto de cebadores que amplifican una secuencia de ADN de interés, obteniendo finalmente secuencias coincidentes y no coincidentes con la secuencia diana en una base de datos de nucleótidos (50,51,62).

La amplificación de la región variable del operón *agr* se lleva a cabo con esta PCR empleando los cebadores propuestos por Strommenger y Gilot (87,88). Estos cebadores serán buscados en los genomas con BLAST y finalmente poder clasificar los fragmentos de ADN en cada grupo de *agr* (*agr I*, *II*, *III*).

7.4.1 Evaluación de la funcionabilidad de *agr*

Debido a que el gen accesorio regulador *agr* es fundamental para la expresión génica de la mayoría de los factores de virulencia de *S. aureus*, la detección de su funcionabilidad es importante ya que se encuentra relacionada con la disminución de la susceptibilidad a la vancomicina.

Como se mencionó anteriormente, la delta hemolisina puede utilizarse como marcador para evaluar la funcionalidad de *agr* y el método clásico para llevar a cabo esta prueba es el ensayo de hemólisis sinérgica CAMP que expresa la toxina delta hemolisina. Este método consiste en sembrar muestras con un asa redonda en la parte central de una caja Petri con agar sangre de oveja y de forma vertical la cepa RN4420, que se caracteriza por producir una gran zona de beta-hemolisina sin la interferencia de alfa- o delta-hemolisinas.

Las cepas a evaluar de VSSA fueron seleccionadas aleatoriamente ya que comparar la totalidad de VSSA (310) con las hVISA (39) podía causar un sesgo en los resultados. La siembra se realiza de forma horizontal y se deja incubando por 24 horas a 37°C. La interpretación de los resultados se basa en la presencia de delta hemólisis, que se visualiza cuando la delta-hemolisina producida por una cepa de prueba produce una zona de hemólisis mejorada en áreas donde esta superpuesta con la zona de beta-hemolisina de RN4420 (38,89).

8. Resultados

8.1 Detección y comparación del potencial de virulencia

Con el objetivo de detectar y comparar la presencia de factores de virulencia en cepas VSSA y hVISA, se realizaron análisis bioinformáticos para definir la presencia y ausencia de los genes asociados a patogenicidad en *S. aureus* utilizando la base de datos NHC Key Laboratory of Systems Biology of Pathogens, de la página de Virulence factor de Beijín China.

Se detectó la presencia de 41 genes asociados a virulencia en los genomas empleando la herramienta BLAST. Una vez obtenidos los datos de los factores de virulencia que estaban o no presentes en cada fenotipo se procedió a realizar una prueba estadística a través del cálculo de chi cuadrado y la prueba de 'T' de Student y se escogieron los factores más variables para graficarlos.

De los 41 factores de virulencia evaluados, se muestran 38 en la tabla 1, ya que en la comparación se omitieron 3 factores que estaban ausentes en su totalidad (0%) en VSSA y hVISA; estos fueron Prgb, Sistema de agregación y Eta, incluirlos no provocaría una diferencia significativa en la comparación.

| Grupo | Factor | SARM | VSSA | hVISA | P valor Xi Cuadrado | P valor T Student |
|-----------------------------|------------------|--------------|--------------|-------------|---------------------------|----------------------|
| | | n=349 | n=309 | n=40 | <0,01 | |
| Toxinas | Gamma hemolisina | 341 | 98% | 90% | 0,0000 | 0,0799 |
| | Alfa hemolisina | 340 | 98% | 92% | 0,0000 | 0,2022 |
| | Delta hemolisina | 333 | 96% | 85% | 0,0000 | 0,0492 |
| | Beta Hemolisina | 346 | 99% | 100% | 0,3148 | 0,0832 |
| | Sea | 29 | 6% | 22% | 0,0000 | 0,0237 |
| | Seb | 5 | 1% | 0% | 0,2022 | 0,0251 |
| | Seh | 3 | 1% | 0% | 0,3148 | 0,0832 |
| | Sed | 25 | 8% | 0% | 0,0029 | 0,0000 |
| | Selq | 28 | 8% | 2% | 0,0278 | 0,0392 |
| | SelK | 34 | 10% | 2% | 0,0454 | 0,0089 |
| | tsst-1 | 8 | 1% | 5% | 0,0231 | 0,3973 |
| | Sell | 4 | 1% | 0% | 0,2511 | 0,0453 |
| Sec | 4 | 1% | 0% | 0,2511 | 0,0453 | |
| Plasminógeno | sak | 321 | 92% | 85% | 0,0020 | 0,1886 |
| Adhesión | Ebp | 342 | 98% | 92% | 0,0000 | 0,1534 |
| | Sdr | 49 | 15% | 5% | 0,0044 | 0,0000 |
| | Ica | 321 | 93% | 77% | 0,0000 | 0,0210 |
| | FnbAB | 9 | 2% | 5% | 0,0716 | 0,4504 |
| | Cna | 4 | 1% | 0% | 0,2511 | 0,0453 |
| | Map | 54 | 16% | 5% | 0,0015 | 0,0050 |
| | Clf AB | 6 | 1% | 0% | 0,1640 | 0,0140 |
| Exoenzimas | Ssp | 334 | 95% | 92% | 0,3346 | 0,4658 |
| | Aur | 329 | 93% | 97% | 0,1325 | 0,2050 |
| | Hys | 6 | 1% | 0% | 0,1640 | 0,0140 |
| | Geh | 343 | 98% | 100% | 0,1640 | 0,0140 |
| | Lip | 348 | 99% | 100% | 0,5833 | 0,3180 |
| | vWbp | 56 | 13% | 32% | 0,0000 | 0,0122 |
| | Coa | 3 | 1% | 0% | 0,3148 | 0,0832 |
| Captación Fe | Isd | 339 | 97% | 92% | 0,0005 | 0,2304 |
| Capsula | Cap | 23 | 7% | 0% | 0,0047 | 0,0000 |
| Sistema de secreción | Ess | 320 | 91% | 95% | 0,1892 | 0,3348 |
| Leucocidinas | LukD | 335 | 95% | 97% | 0,3967 | 0,5371 |
| | Pvl | 59 | 18% | 2% | 0,0000 | 0,0000 |
| Evasión inmune | Spa | 255 | 77% | 37% | 0,0000 | 0,0000 |
| | Sbi | 326 | 93% | 92% | 0,6850 | 0,8181 |
| | Adsa | 84 | 21% | 42% | 0,0000 | 0,0152 |
| | Chip | 291 | 82% | 90% | 0,0483 | 0,1614 |
| | Scn | 307 | 87% | 90% | 0,4837 | 0,6576 |

Tabla 1. Resultados de la detección de factores de virulencia en hVISA y VSSA.

Fuente: Autoría propia

De los resultados obtenidos tras detectar los factores de virulencia, se procedió a comparar la frecuencia en cada fenotipo (hVISA o VSSA), como se muestra en la tabla 1. Se observa que en la sección de toxinas existe una leve disminución de alfa, gama y delta hemolisina en hVISA respecto a VSSA; en alfa hemolisina hay un 98% en VSSA y un 92% en hVISA, en Gama hemolisina hay un 98% en VSSA y un 90% en hVISA y en delta hemolisina se encuentra una diferencia más grande respecto a las demás toxinas con un 96% para VSSA y 85% para hVISA. Estas toxinas tienen capacidad de lisar neutrófilos y eritrocitos induciendo un daño celular que desencadena en la producción de citoquinas que son las encargadas de enviar señales al sistema inmunitario.

Las enterotoxinas como SelK y Sed responsables de la sintomatología de intoxicación alimentaria se encontraron en baja proporción, con un 10% para SelK y 8% para Sed en el fenotipo VSSA; a diferencia de esto en hVISA solo estuvo un 2% para SelK. Particularmente Sea (enterotoxina estafilocócica A) es la única enterotoxina presente en mayor proporción (22%) y se encuentra aumentada en las cepas hVISA, de los 29 genes encontrados en los 349 genomas, 20 se encuentran en hVISA.

En cuanto a las proteínas de adhesión, se encontró diferencia significativa en 3 factores (Sdr, Ebp, Map) pertenecientes a la familia de MSCRAM (componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas de matriz adhesiva), uno de ellos es Sdr que hace referencia a las proteínas ricas en serina aspartato que se unen a la sialoproteína ósea y fibrinógeno, y se encuentra en mayor

proporción en las cepas hVISA respecto a las VSSA, además de tener una fuerte función de adhesión, es una proteína importante en la evasión inmune de *S. aureus*.

La proteína de unión a elastina Ebp, es otra proteína perteneciente a esta familia que le brinda la capacidad a *S. aureus* de unirse a fibras elásticas presentes en todo el cuerpo principalmente en pulmón, piel y vasos sanguíneos, en hVISA encontramos una disminución de este factor en comparación con VSSA que estaba casi en la totalidad del fenotipo. Map, tiene la función de unión a todos los componentes de la matriz extracelular promoviendo la unión bacteriana, también se encuentra atenuada en hVISA con un 5 % en comparación con VSSA que está presente en un 15%.

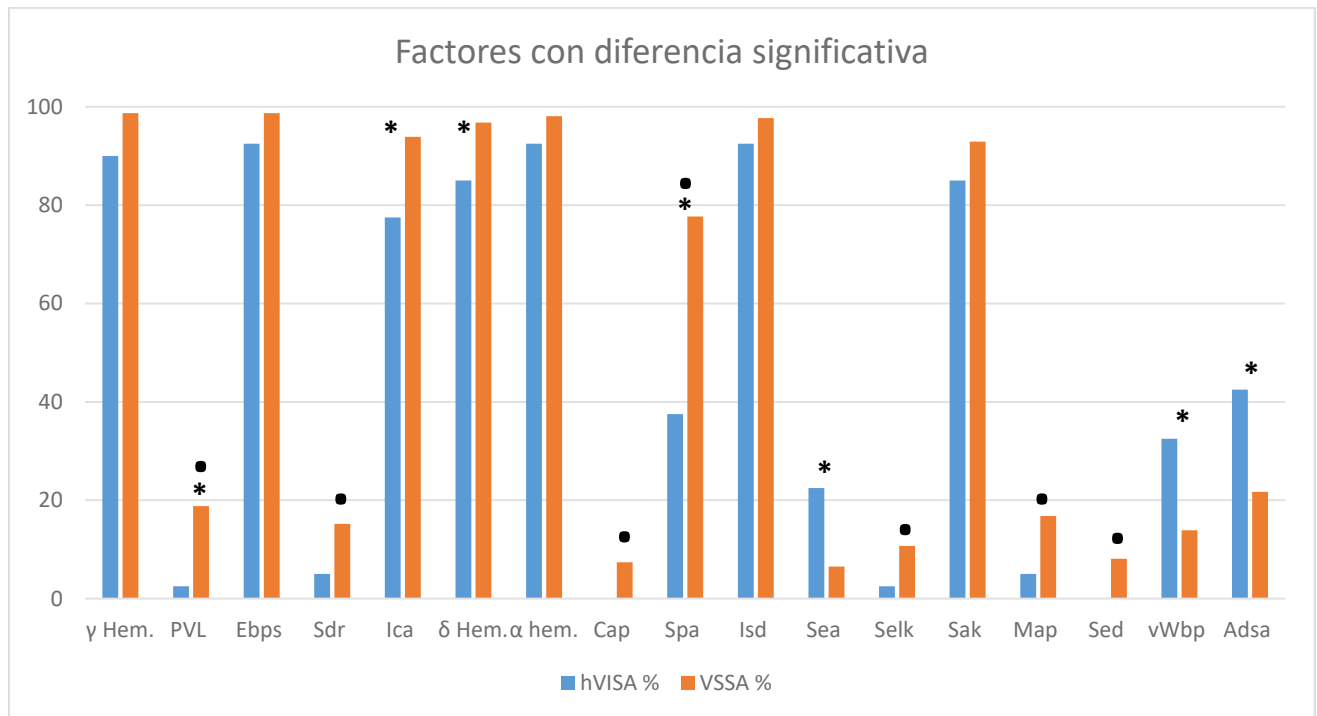
Otra de las proteínas en las que se encontró una diferencia significativa es Ica, un conjunto de polisacáridos de adhesión intercelular. En hVISA se encuentra en un 72 % y en VSSA en un 91%, este resultado muestra que Ica además de tener una disminución en la capacidad de adherencia en hVISA, también se relaciona con la disminución de formación de biopelícula en cepas con susceptibilidad reducida a vancomicina.

En cuanto a las exoenzimas, se evidencia una disminución de vWbp proteína de unión al factor de Von Willebrand en hVISA, esta exoenzima es una coagulasa que permite a las bacterias diseminarse como lesiones tromboembólicas y resistir el aclaramiento opsonofagocítico por las células inmunes del huésped.

El conjunto de genes Cap (capsula), tiene función en la promoción de la supervivencia bacteriana y en la prevención anti fagocítica y promoviendo la adherencia, los resultados revelaron que la expresión de estos genes estaba en mayor proporción en hVISA respecto a VSSA.

La leucocidina PVL tiene una función bastante importante en la inflamación y lesión tisular, además de ser causante de neumonía necrotizante grave, que aunque se encuentra en pocas cepas, la totalidad de los genes encontrados de PVL pertenecen a VSSA.

En la sección de evasión inmune, los resultados indicaron una marcada disminución del factor de virulencia Spa, relacionado con la activación proinflamatoria y de coagulación; Por otro lado, Adsa adenosín sintetasa, se encuentra aumentado en hVISA, y tiene la capacidad de amortiguar las respuestas innatas y la evasión inmunológica del huésped.



Grafica 1. Factores con diferencia estadística significativa entre hVISA y VSSA.

Fuente: Autoría propia

Los genes representados en la grafica 1. corresponden a γ Hem (Gamma hemolisina), PVL (Leucocidina de Pantón-Valentine), Ebps (Proteínas de unión a elastina), Sdr (Proteínas ricas en serina-aspartato), Ica (proteínas de adhesión intercelular), δ Hem (Delta hemolisina), α hem. (alfa

hemolisina), *Cap* (Proteína de capsula), *Spa* (Proteína de superficie A), *Isd* (Proteína de captación de hierro), *Sea* (Enterotoxina estafilocócica A), *SelK* (Precursor de enterotoxina estafilocócica K), *Sak* (Estafiloquinasa), *Map* (Proteína de adherencia a matriz extracelular), *Sed* (Precursor de enterotoxina estafilocócica D), *vWbp* (factor de unión a la proteína de von Willebrand), *Adsa* (Adenosin Sintetasa).

Los resultados mostrados en la gráfica 1 indican los factores con diferencia estadísticamente significativos (P-valor < 0.01); los indicados con un punto son los factores con resultado estadísticamente significativo por las dos pruebas (Chi cuadrado y T Student) y los señalados con un asterisco son los que al realizar una diferencia de proporción obtuvieron un porcentaje mayor al 15%. El factor de virulencia que obtuvo una mayor diferencia de proporción fue *Spa*, que se encuentra significativamente disminuido en hVISA; este factor tiene función anti fagocítica bacteriana, proinflamatoria y de coagulación.

Al igual que *Spa*, la proteína de unión al factor de von Willebrand *vWbp* tiene la capacidad de adherirse al endotelio de los vasos sanguíneos y causar infecciones vasculares severas, es un factor importante en la coagulación (90) y en este estudio se encontró en mayor proporción en hVISA con un 32%, respecto a VSSA donde solo está en un 13%.

Este estudio también reveló una disminución del factor *ica* en hVISA que se encuentra asociado con el recambio de la pared celular; este cambio se ha encontrado predominantemente en las cepas con susceptibilidad reducida a la vancomicina y en conjunto con una de sus principales características que es el aumento del grosor de la pared celular bacteriana.

En hVISA también se visualiza un leve descenso de la expresión de la delta hemolisina, factor de virulencia que se encuentra directamente relacionado con la funcionabilidad del regulador genético

accesorio *agr*, ya que se encuentra en el locus de *agr*. Este está controlado positivamente por el sistema regulador y en estudios previos se ha asociado con la susceptibilidad reducida a vancomicina (91).

La leucocidina de Pantón-Valentine PVL generalmente se asocia a cepas SARM, es una toxina formadora de poros que se encuentra asociada a una serie de enfermedades graves como la neumonía necrotizante (92). Los resultados evidenciaron una disminución considerable de este factor en hVISA estando únicamente en un 2% a diferencia de VSSA donde se encontraba en el 18%.

Otra toxina con diferencia significativa es la enterotoxina estafilocócica A Sea, que se encuentra asociada a la mayoría de intoxicaciones alimentarias, es una toxina termoestable con capacidad de producir emesis, fiebre y diarrea (93). Sea se encontró considerablemente aumentada en hVISA con 22%, en comparación con VSSA donde solo se encontró en un 6%.

La adenosina sintasa A AdsA, al igual que Spa, tuvo una diferencia de proporción alta de un 20%, 42% estuvo presente en hVISA, mientras que en VSSA estuvo un 21%. La función principal de AdsA es la evasión inmune ya que le da la capacidad a *S. aureus* de modular las respuestas proinflamatorias del huésped y de inducir la apoptosis de los macrófagos dando como resultado una infección más prolongada (94).

8.2 Tipificación de *agr* en hVISA y VSSA

Con el fin de determinar la presencia de factores de virulencia en hVISA en pacientes de Latinoamérica, se analizó el regulador genético accesorio *agr*, un regulador maestro en virulencia que ha tenido gran impacto en las cepas con susceptibilidad reducida a vancomicina. *Agr* tiene la

capacidad de regular al alza factores secretados y a la baja algunas proteínas extracelulares, por esto, estudiar su funcionabilidad en hVISA es de suma importancia si de factores de virulencia se trata.

Agr es un locus compuesto por 4 genes *agrB*, *D*, *C* y *A*, y el gen de la toxina delta-hemolisina que es el único factor de virulencia secretado y regulado por *agr* se utiliza comúnmente como marcador de la función de *agr*.

La tipificación de *agr* por países se realizó a partir de 306 cepas de VSSA y 30 cepas de hVISA (las 14 cepas faltantes no se tomaron en cuenta en esta sección debido a que eran de control). Esta tipificación se realizó con PCR *in silico* para poder definir el tipo de *agr* (*I*, *II* y *III*) de cada cepa. Las figuras 2 y 3 muestran el tipo de *agr* (*I*, *II*, *III* y no tipificable) más prevalente en los fenotipos hVISA y VSSA por países, clasificados así Argentina (ARG), Brasil (BR), Chile (CL), Colombia (COL), Ecuador (EC), Guatemala (GT), México (MX), Perú (PE) y Venezuela (VE).

Al evaluar la prevalencia del tipo de *agr* por países de Latinoamérica figuras 2 y 3, los resultados fueron un poco más heterogéneos para el fenotipo VSSA en Argentina, Brasil, Chile, Guatemala, México, Perú y Venezuela el *agr* que predominó fue *agr II*. Por otro lado, en el fenotipo hVISA en Colombia y Ecuador el tipo más predominante fue *agr I*. En Argentina, Chile y Perú se encontró un tipo de *agr* definido en ambos fenotipos que es *agr II*. Además, en Colombia, Guatemala, México y Venezuela no se detectó ninguna cepa hVISA, y las únicas cepas encontradas en Brasil y Ecuador no se pudieron confirmar en ningún tipo de *agr*. Por consiguiente, se puede llegar a la conclusión de que *agr II* fue el tipo más prevalente en ambas cepas y en la mayoría de los países de Latinoamérica exceptuando a Colombia y a Ecuador en donde cepas VSSA obtuvieron una mayor prevalencia de *agr I*.

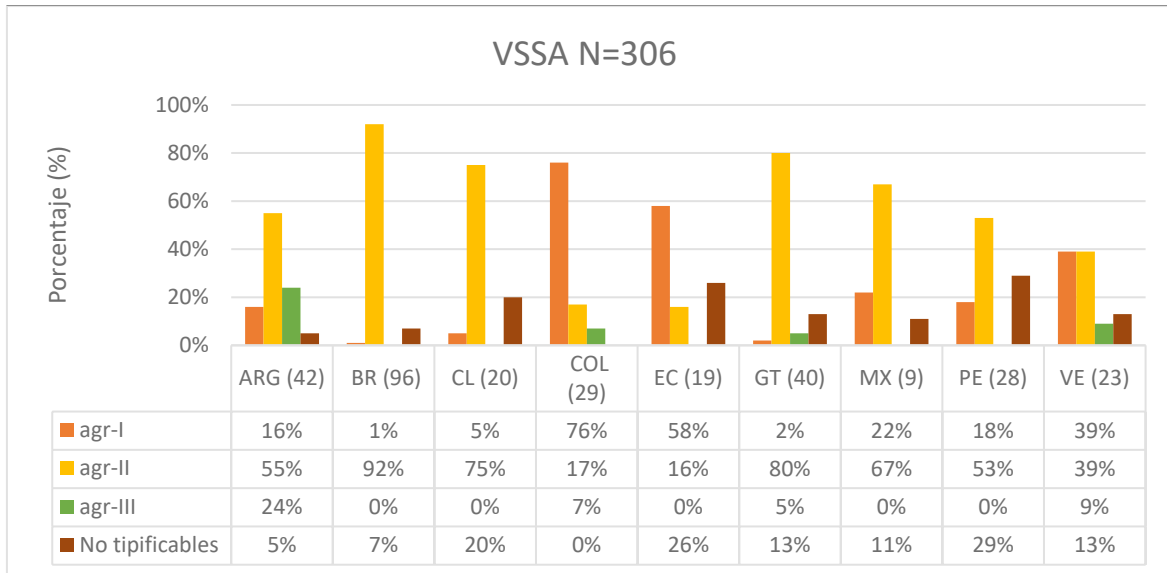


Figura 2. Tipificación de *agr* por países de Latinoamérica en VSSA.

Fuente: Autoría propia

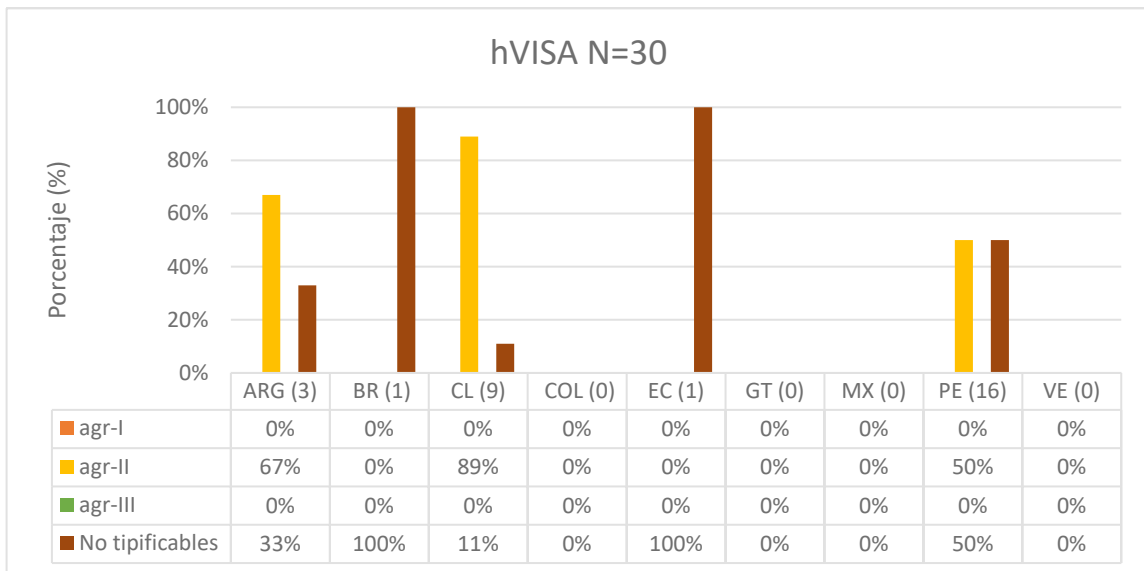


Figura 3. Tipificación de *agr* por países de Latinoamérica en hVISA

Fuente: Autoría propia

En los resultados obtenidos en la tipificación de *agr* están representados en la figura 4, las cepas no tipificables se omitieron de la gráfica (15 cepas de hVISA y 47 cepas de VSSA) y se clasificaron así porque mediante ninguno de los métodos de tipificación demostraron tener alguno de los 3 tipos de *agr*.

Los resultados evidenciaron que *agr II* tuvo mayor prevalencia en ambos grupos de cepas en Latinoamérica con un 73% para VSSA y un 96% para hVISA. Por otro lado, *agr I* fue el segundo tipo más común en cepas VSSA, en contraste con estudios previos que reportan una mayor frecuencia del tipo *agr I* en VSSA. También se determinó que *agr III* se encuentra en menor proporción con un 6% para VSSA y un 0% para hVISA. En general, no se observaron diferencias en el tipo de *agr* entre los fenotipos hVISA y VSSA.

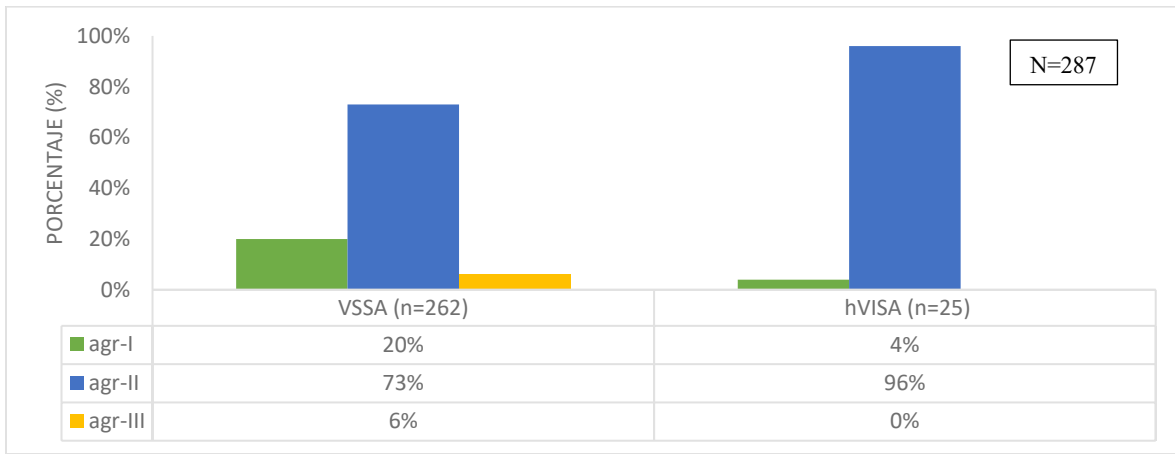


Figura 4. Tipificación de *agr* en SARM con fenotipos hVISA y VSSA

Fuente: Autoría propia

8.3 Funcionabilidad de *agr*

La evaluación de la funcionabilidad de *agr* se realizó a través de la expresión de la delta hemolisina por medio del ensayo de hemolisis sinérgica, donde la cepa RN4420 que expresa beta hemolisina se encuentra verticalmente y las cepas a evaluar de forma horizontal.

Las cepas N315 y MW2 fueron utilizadas como controles, cuando la cepa produce expresión de delta hemolisina al tener contacto con la beta hemolisina de la cepa RN4420 se forma una zona de hemolisis acentuada y/o una formación de una flecha en esta interacción entre los dos halos de hemolisis, esto se observa en la figura 4 señalado con una flecha negra en la cepa P1923.

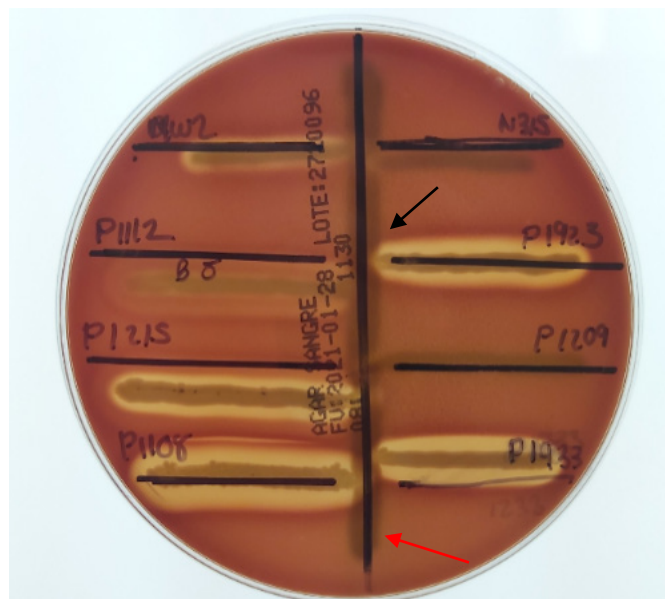


Figura 4. Ensayo de hemolisis sinérgica para la detección de delta hemolisina.

Fuente: Autoría propia

La flecha roja en la figura 4 ubicada en la placa indica la cepa RN4420 que expresa la beta hemolisina, las líneas perpendiculares a esta son las siembras de las cepas a estudiar. La flecha roja indica la zona de hemolisis mejorada por la interacción de delta hemolisina y beta hemolisina, se alcanza a visualizar un halo en forma de flecha característico de la expresión de delta hemolisina.

Para esta evaluación de la funcionalidad se tomaron únicamente 23 cepas VSSA seleccionadas aleatoriamente, esto se hizo con el fin de acercar la cantidad de cepas VSSA a las de hVISA que se encontraba en menor proporción. Los resultados de este estudio ubicados en la tabla 2 demostraron que el 33.6% de las cepas hVISA (13 cepas) tuvieron producción de delta hemolisina, en comparación con las cepas VSSA donde el 34.7% tuvo producción de delta hemolisina (8 cepas). Comparando los resultados, en otros países se ha evidenciado una marcada disminución de la producción de delta hemolisina en cepas hVISA en comparación con VSSA. En nuestros resultados encontramos que no hubo una diferencia considerable en el la producción de hemolisis entre ambos fenotipos. Sin embargo, fue interesante observar que de las 39 cepas hVISA solo 7 fueron confirmadas por PAP-AUC y de estas, todas presentaron prueba negativa.

| Fenotipo | Hemolisis | Porcentaje | Cantidad | Total |
|-----------------|------------------|-------------------|-----------------|--------------|
| hVISA | Positiva | 33.4% | 13 | 39 |
| hVISA | Negativa | 66.6% | 26 | |
| VSSA | Positiva | 34.8% | 8 | 23 |
| VSSA | Negativa | 65.2% | 15 | |

Tabla 2. Resultados del ensayo de hemolisis sinérgica en VSSA y hVISA

Fuente: Autoría propia

9. Discusión

En los últimos años, en el mundo se han iniciado diferentes proyectos de vigilancia de la resistencia bacteriana como los proyectos SENTRY e ICARE (95,96), los cuales han generado información valiosa con relación a la prevalencia de patrones de resistencia. En hVISA a pesar de que no hay un reporte sistemático, se ha informado que las infecciones causadas por este fenotipo conducen a una serie de complicaciones, entre ellas, un aumento en las tasas de fracaso del tratamiento con vancomicina, hospitalización prolongada, un aumento en el riesgo de infección persistente (97). Una revisión sistemática publicada en el 2020 estudió la prevalencia de hVISA, VISA, SAVR, la información fue tomada de países de Asia, Europa, América, África y Oceanía, dando como resultado una prevalencia a nivel global de 4.6% de hVISA. En América la prevalencia de hVISA es de 5.2%, de VISA 1% y de SAVR de 3.6% (33). Adicionalmente este estudio se enfocó en el fenotipo hVISA que ha ido en aumento progresivamente alrededor del mundo convirtiéndose en un problema clínico. La evidencia de la circulación en el medio de fenotipos de *S. aureus* resistentes a la vancomicina constituye un problema a enfrentar en forma multidisciplinaria por todo el equipo de salud: clínicos, microbiólogos, infectólogos, administradores de salud y personal de enfermería. Además, en los laboratorios de microbiología se debe implementar la adecuada detección de los mecanismos de resistencia que pueden tener este tipo de microorganismos. Y para ello se debe contar con adecuados métodos de identificación hasta nivel de especie y métodos para determinar CMI a vancomicina, teicoplanina, ampicilina y gentamicina (98).

La importancia de la prevalencia y proliferación de los fenotipos hVISA y VSSA radica en que sus cepas se asocian a infecciones prolongadas y al fracaso del tratamiento con vancomicina, además, su difícil identificación en el laboratorio causa confusión en el tratamiento debido a que en la mayoría

de los casos se trata una infección con resistencia heterogénea a la vancomicina como si fuese una cepa susceptible a la vancomicina.

Esta susceptibilidad reducida a vancomicina se desarrolla mediante mutaciones genéticas que conduce a alteraciones de diferentes vías provocando cambios en la disposición de la pared celular, el recambio, la estructura y el potencial de la membrana, cambios en las modificaciones de la autólisis, cambios en la permeabilización celular (99) y cambios en la expresión de algunas exoproteínas; estas alteraciones tienen unas implicaciones clínicas como falla en el tratamiento con vancomicina, infecciones persistentes y hospitalización prolongada.

En esta investigación, a partir de 350 genomas secuenciados de SARM obtenidos de 2 estudios multicéntricos realizados en Latinoamérica en periodos de tiempo diferentes 2006-2008 y 2011-2014, se realizó la determinación del potencial de virulencia de hVISA y la tipificación de *agr* por países y por cepas.

La determinación del potencial de virulencia se realizó tras la detección de 41 genes asociados a virulencia de *S. aureus* entre cepas hVISA y VSSA, los que mayor variabilidad presentaron fueron los genes Gamma hemolisina, PVL, Ebp, Sdr, Ica, Delta hemolisina, Alfa hemolisina, Cap, Spa, Isd, Sea, SelK, Sed, Map, vWbp, Adsa; en este estudio el gen *spa* en hVISA se encontró en un 37% y VSSA en 77%. La regulación a la baja de este gen es un cambio frecuentemente asociado a cepas hVISA (16,63,64), que consiste en una proteína de superficie con actividad proinflamatoria que inhibe la fagocitosis y favorece la adherencia a superficies celulares (78).

Como se ha mencionado anteriormente, la cuantificación de la expresión del gen *hld* para verificar la funcionalidad de *agr* se hizo a través de la producción de delta hemolisina, que es una toxina de la familia de las PSM con función proinflamatoria, citolítica y con capacidad de producir degranulación

de mastocitos, proporcionando más severidad a la infección por *S. aureus*. Tras la detección de este gen en ambos fenotipos, los datos si mostraron una disminución de su expresión en hVISA con un 85% y en VSSA con 96%, una diferencia no tan significativa, pero que coincide con estudios en otras regiones del mundo (12, 48,57–59).

Posteriormente al realizar la tipificación de *agr*, se evidenció que *agr I* se encuentra en mayor proporción (19%) en las cepas VSSA que en las hVISA (2%). Por su parte, la prevalencia de *agr II* en VSSA fue del 64% y en hVISA del 60 %, datos que permiten inferir que en Latinoamérica el *agr II* es predominante independientemente del fenotipo. Estos resultados coinciden con estudios previos que evidencian que el *agr II* se encuentra asociado a la susceptibilidad reducida a vancomicina, como es el caso de la investigación realizada por Berrio (2018), quien encontró en aislamientos de Perú y Ecuador prevalencia del *agr II* (100); en otros países fuera de Latinoamérica sucede algo similar por ejemplo, en un estudio realizado en China entre 2007 y 2011, a partir 757 aislamientos de *S. aureus* encontraron 10% de hVISA y 0,5% de VISA, y observaron también un incremento en la incidencia año por año, pasando de 1,2% en 2007 a 7,2% en 2010, en donde 80% de estos aislamientos presentaban *agr II* (83).

En esta investigación al realizar el análisis de la tipificación de *agr* por países se encontró que en Argentina, Chile y Perú en los fenotipos hVISA y VSSA predominó el tipo de *agr II*. Mientras que en Colombia, Guatemala, México y Venezuela no se pudo realizar la tipificación ya que no se detectaron cepas hVISA. (101).

Adicionalmente se evaluó la funcionalidad del *agr* mediante la producción de delta hemolisina que es la única exoproteína entre los factores de virulencia que son secretados y regulados por *agr*, pues la producción de delta hemolisina ha sido utilizada para evaluar la expresión o funcionalidad del operón

agr, dado que el gen estructural que codifica para la delta hemolisina *hld*, es regulado por el ARNIII (100).

La detección de la expresión de delta hemolisina, se realizó teniendo en cuenta que la disminución de la funcionalidad de *agr* en aislamientos hVISA y VSSA puede ser evaluada mediante la disminución de la producción de la misma. En estudios previos se ha observado que su producción disminuye en cepas con susceptibilidad reducida a vancomicina (12,48,57–59); en los resultados de esta investigación las 7 cepas hVISA confirmadas por PAP AUC demostraron ausencia total de producción de delta hemolisina como se esperaba, ya que en estudios previos se evidenció una disminución de la producción de esta toxina (38,105). Por el contrario, en el resto de cepas hVISA que no fueron confirmadas por este método los resultados revelaron que no hubo una diferencia significativa en la expresión de la delta hemolisina entre los dos fenotipos, la prueba fue negativa para hVISA en un 66.6% y fue negativa para VSSA en un 65.2%.

10. Conclusiones

- Al realizar la detección y comparación del potencial de virulencia se encontró una disminución en algunos factores en hVISA como alfa y delta hemolisinas, Spa, PVL, Selk y Sea, Ebp, Map, Sdr, implicados en la inflamación, lesión tisular y adhesión, con lo que se podría predecir una disminución en las señales de respuesta inflamatoria del sistema inmunológico del huésped. Este hecho se constituye en una ventaja, ya que estas toxinas, proteínas de superficie y adhesinas provocan una señal de alerta al sistema inmune para que pueda combatir la infección a tiempo; en hVISA al presentar una atenuación de estos factores la bacteria podría pasar desapercibida por más tiempo en el cuerpo causando así infecciones más prolongadas.
- Además de encontrar una atenuación en algunos factores de virulencia en hVISA, también se evidenció el aumento de factores con función antifagocítica y de supervivencia bacteriana como el sistema de secreción (Ess) y la proteína de capsula (Cap), cuyo objetivo es preservar la supervivencia de la bacteria en el foco infeccioso alterando de esta forma la patogenicidad de la bacteria.
- Este estudio muestra que el potencial de virulencia de cepas hVISA en Latinoamérica en comparación con el fenotipo VSSA, se encuentra disminuido por la disminución en la presencia de varios factores como: exoproteínas, proteínas de superficie, y también por cambios en la pared celular. A nivel clínico esta atenuación de la virulencia se puede ver asociada al fracaso del tratamiento con vancomicina, la persistencia de la infección y a una carga bacteriana elevada; por lo anterior, al encontrar estas condiciones en un paciente el médico debe plantearse que podría

estar enfrentado a una cepa con susceptibilidad reducida a la vancomicina como hVISA, ya que por las características intrínsecas a su fenotipo es indetectable en las pruebas de rutina en el laboratorio.

- Al realizar la tipificación de agr por países se evidencio que en latinoamerica el tipo de agr que se encuentra predominantemente es agr II, tanto en VSSA como en hVISA, exceptuando a Colombia y Ecuador donde fue predominante agr I en las cepas VSSA.
- La evaluación de la funcionalidad de agr se realizó teniendo en cuenta la disminución de la producción del factor delta hemolisina. Este estudio reveló que la expresión de la delta hemolisina en los fenotipos hVISA y VSSA no presentó mucha diferencia, solo una leve disminución en hVISA. Sin embargo, las cepas hVISA confirmadas por PAP AUC demostraron una ausencia total de la producción de delta hemolisina.

Referencias

1. Shah A, DeSimone DC. Bacteremia. A Ration Approach to Clin Infect Dis [Internet]. 2022 [cited 2022 Mar 9];268–76. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323695787000193>
2. Paredes F, Roca JJ. Acción de los antibiòticos. *Ámbito Farm Farmacol* [Internet]. 2004;23(3):116–24. Available from: pps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=13059414&pident_usuario=0&pcontactid=&pident_revista=4&ty=144&accion=L&origen=zonadelectura&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=4v23n03a13059414pdf001.pdf
3. Schachter H. Glycobiology of *Caenorhabditis elegans*. *Compr Glycosci From Chem to Syst Biol*. 2007;4–4:81–100.
4. Alippi AM, Reynaldi FJ, López AC. Evaluación del método epsilométrico Etest para la determinación de la sensibilidad a tetraciclina en *Paenibacillus larvae*, agente causal de la loque americana de las abejas. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. 2013 Oct 1 [cited 2022 Mar 9];45(4):257–61. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-argentina-microbiologia-372-articulo-evaluacion-del-metodo-epsilometrico-etest-S0325754113700336>
5. Yang E, Frazee BW. Infective Endocarditis. *Emerg Med Clin North Am* [Internet]. 2018;36(4):645–63. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.emc.2018.06.002>
6. Garza-Velasco R, Zúñiga-Rangel O, Manuel Perea-Mejía L. La importancia clínica actual de *Staphylococcus aureus* en el ambiente intrahospitalario. *Educ Química*. 2013;24(1):8–13.
7. Ordovás Baines JP, Climent Grana E, Jover Botella A, Valero García I. Farmacocinética y

- farmacodinamia de los nuevos anticoagulantes orales. *Farm Hosp.* 2009;33(3):125–33.
8. Carvallo P. Conceptos sobre genética humana para la comprensión e interpretación de las mutaciones en cáncer y otras patologías hereditarias. *Rev Médica Clínica Las Condes.* 2017 Jul 1;28(4):531–7.
 9. Hamdan-Partida A, González García S, Bustos-Martínez J. Identificación de *Staphylococcus aureus* utilizando como marcadores los genes *nucA* y *femB*. *Ciencias Clínicas.* 2015;16(2):37–41.
 10. Martínez-Frías ML. Estructura y función del ADN y de los genes. I Tipos de alteraciones de la función del gen por mutaciones. *Semergen.* 2010;36(5):273–7.
 11. Zolezzi IS. Genómica y medicina. *Educ Química.* 2011;22(1):15–27.
 12. da Silva ER, Boechat JUD, Martins JCD, Ferreira WPB, Siqueira AP, da Silva N. Corrigendum to “Hemolysin production by *Staphylococcus* species isolated from mastitic goat milk in Brazilian dairy herds” [*Small Rumin. Res.* 56 (2005) 271-275] (DOI:10.1016/j.smallrumres.2004.04.011). *Small Rumin Res.* 2006 Sep;65(1–2):182.
 13. Zendejas G, Avalos H, Soto M. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades de patogenicidad, métodos de identificación. *Rev Biomed.* 2014;25(3):129–43.
 14. Cadena de infección y métodos de transmisión de microbios [Internet]. [cited 2022 Mar 9]. Available from: <https://www.elsevier.com/es-es/connect/enfermeria/edu-cadena-de-infeccion-y-metodos-de-transmision-de-microbios>
 15. Morales J. Drogas nefrotóxicas. *Rev Médica Clínica Las Condes* [Internet]. 2010 Jul 1 [cited 2022 Mar 9];21(4):623–8. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-medica-clinica-las-condes-202-articulo-drogas-nefrotoxicas-S0716864010705782>

16. Lozano J. Neumonía adquirida en la comunidad. *Arch Bronconeumol*. 2010;46(SUPPL.7):26–30.
17. Arsanios D, Barragan A, Garzón D, Cuervo Millán F, Pinzón J, Ramos Isaza E, et al. Actualización en sepsis y choque séptico: nuevas definiciones y evaluación clínica. *Acta Colomb Cuid Intensivo*. 2017;17(3):158–83.
18. Song X, Cao X. Transposon-mediated epigenetic regulation contributes to phenotypic diversity and environmental adaptation in rice. *Curr Opin Plant Biol* [Internet]. 2017;36:111–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2017.02.004>
19. Beceiro A, Tomás M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: A beneficial relationship for the microbial world? *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30(8):492–9.
20. Boucher HW, Corey R. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2008 Jun 1 [cited 2021 Sep 16];46 Suppl 5(SUPPL. 5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18462089/>
21. Velázquez-Meza ME. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente. *Salud Publica Mex*. 2005;47(5):381–7.
22. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(4):1–103.
23. Antonanzas F, Lozano C, Torres C, Antonanzas F, Lozano C, Torres AC. Economic Features of Antibiotic Resistance: The Case of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharmacoeconomics*. 2015;33:285–325.
24. McGuinness W, Malachowa N, DeLeo F. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* strains. *Arch Razi Inst*. 2017;90(54):107–10.

25. Srinivasan A, Dick JD, Perl TM. Vancomycin resistance in Staphylococci [Internet]. Vol. 15, *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology (ASM); 2002 [cited 2021 May 30]. p. 430–8. Available from: [/pmc/articles/PMC118075/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/118075/)
26. Zeng D, Debabov D, Hartsell T, Cano R, Adams S, Schuyler J, et al. Approved Glycopeptide Antibacterial Drugs: Mechanism of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2016 [cited 2021 Sep 16];6(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27663982/>
27. Jeffres MN. The Whole Price of Vancomycin: Toxicities, Troughs, and Time. *Drugs*. 2017;77.
28. Kullar R, Davis SL, Levine DP, Rybak MJ. Impact of Vancomycin Exposure on Outcomes in Patients With Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia: Support for Consensus Guidelines Suggested Targets. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/52/8/975/287680>
29. Lodise TP, Graves J, Evans A, Graffunder E, Helmecke M, Lomaestro BM, et al. Relationship between Vancomycin MIC and Failure among Patients with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia Treated with Vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2008;52(9):3315–20. Available from: <https://journals.asm.org/journal/aac>
30. Yeh YC, Yeh KM, Lin TY, Chiu SK, Yang YS, Wang YC, et al. Impact of vancomycin MIC creep on patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Microbiol Immunol Infect* [Internet]. 2012;45(3):214–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2011.11.006>
31. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover F. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob*

- Chemother [Internet]. 1997 [cited 2021 Sep 16];40(1):135–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9249217/>
32. Goldrick B. First Reported Case of VRSA in the United States: An alarming development in microbial resistance. *AJN, Am J Nurs.* 2002;102(11).
 33. Shariati A, Dadashi M, Moghadam MT, van Belkum A, Yaslianifard S, Darban-Sarokhalil D. Global prevalence and distribution of vancomycin resistant, vancomycin intermediate and heterogeneously vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* clinical isolates: a systematic review and meta-analysis. *Sci Reports* 2020 101 [Internet]. 2020 Jul 29 [cited 2021 Sep 16];10(1):1–16. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-69058-z>
 34. Arthur M, Molinas C, Depardieu F, Courvalin P. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J Bacteriol.* 1993;175(1):117–27.
 35. Howden BP, Davies JK, Johnson PDR, Stinear TP, Grayson ML. 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):99–139.
 36. Satola SW, Farley MM, Anderson KF, Patel JB. 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):177–83.
 37. Charles PGP, Ward PB, Johnson PDR, Howden BP, Grayson ML. Clinical Features Associated with Bacteremia Due to Heterogeneous Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* 2004;38(3):448–51.

38. Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering RC, Wennersten C, Venkataraman L, Novick RP, et al. Accessory gene regulator (agr) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(5):1492–502.
39. Sakoulas G, Moellering RC, Eliopoulos GM. Adaptation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the face of vancomycin therapy. *Clin Infect Dis.* 2006;42(SUPPL. 1).
40. Peleg AY, Monga D, Pillai S, Mylonakis E, Moellering RC, Eliopoulos GM. Reduced susceptibility to vancomycin influences pathogenicity in *Staphylococcus aureus* infection. *J Infect Dis.* 2009;199(4):532–6.
41. Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, Van Leeuwen W, Van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis.* 2005;5(12):751–62.
42. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, et al. Survey of Infections Due to *Staphylococcus* Species: Frequency of Occurrence and Antimicrobial Susceptibility of Isolates Collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY Antimicrobial Surveillanc. *Clin Infect Dis [Internet].* 2001;32(2):114–46. Available from: https://academic.oup.com/cid/article/32/Supplement_2/S114/275412
43. Casapao AM, Davis SL, Mcroberts JP, Lagnf AM, Patel S, Kullar R, et al. Evaluation of Vancomycin Population Susceptibility Analysis Profile as a Predictor of Outcomes for Patients with Infective Endocarditis Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journals ASM.org [Internet].* 2014; Available from: <https://journals.asm.org/journal/aac>
44. Takesue Y, Nakajima K, Takahashi Y, Ichiki K, Ishihara M, Wada Y, et al. Clinical characteristics of vancomycin minimum inhibitory concentration of 2 lg/ml methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with bacteremia. *Infect Chemother.* 2011;17.

45. Moore CL, Osaki-Kiyan P, Haque NZ, Perri MB, Donabedian S, Zervos MJ. Daptomycin Versus Vancomycin for Bloodstream Infections Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* With a High Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration: A Case-Control Study. *Major Artic* [Internet]. 2012;54. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/54/1/51/368096>
46. Howden BP, Smith DJ, Mansell A, Johnson PDR, Ward PB, Stinear TP, et al. Different bacterial gene expression patterns and attenuated host immune responses are associated with the evolution of low-level vancomycin resistance during persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *BMC Microbiol*. 2008;8:1–14.
47. Jenul C, Horswill AR. Regulation of *staphylococcus aureus* virulence. *Gram-Positive Pathog*. 2019;6(1):669–86.
48. Yang C-C, Sy C-L, Huang Y-C, Shie S-S, Shu J-C, Hsieh P-H, et al. Risk factors of treatment failure and 30-day mortality in patients with bacteremia due to MRSA with reduced vancomycin susceptibility OPEN. *Sci RepoRtS* | [Internet]. 2018;8:7868. Available from: www.nature.com/scientificreports/
49. Zhang S, Sun X, Chang W, Dai Y, Ma X. Systematic Review and Meta-Analysis of the Epidemiology of Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Isolates. *PLoS One*. 2015;
50. Oliveira D, Borges A, Simões M. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. *Toxins (Basel)*. 2018;10(6).
51. Ryu S, Song PI, Seo CH, Cheong H, Park Y. Colonization and infection of the skin by *S. aureus*: Immune system evasion and the response to cationic antimicrobial peptides. *Int J Mol Sci*. 2014;15(5):8753–72.

52. Otto M. Staphylococcus aureus toxins. *Curr Opin Microbiol.* 2014;17(1):32–7.
53. Tam, K; Torres VJ. Staphylococcus aureus Secreted Toxins & Extracellular Enzymes *Kayan. Physiol Behav.* 2016;176(1):139–48.
54. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, et al. Community-acquired methicillin-resistant staphylococcus aureus carrying panton-valentine leukocidin genes: Worldwide emergence. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(8):978–84.
55. Richardson JR, Armbruster NS, Günter M, Biljecki M, Klenk J, Heumos S, et al. PSM Peptides from Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Impair the Adaptive Immune Response via Modulation of Dendritic Cell Subsets in vivo. *Front Immunol.* 2019;10(MAY):1–12.
56. Bukowski M, Wladyka B, Dubin G. Exfoliative toxins of Staphylococcus aureus. *Toxins (Basel).* 2010;2(5):1148–65.
57. Spaulding AR, Salgado-Pabón W, Kohler PL, Horswill AR, Leung DYM, Schlievert PM. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(3):422–47.
58. Timothy J. Foster, Joan A. Geoghegan, Vannakambadi K. Ganesh and MH. Response. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(1):46–62.
59. Guo Y, Song G, Sun M, Wang J, Wang Y. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in Staphylococcus aureus. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Mar 17;0:107.
60. Spagnolo AM, Orlando P, Panatto D, Amicizia D, Perdelli F, Cristina ML. Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to vancomycin in healthcare settings. *J Prev Med Hyg.* 2014;55:137–

44.

61. Otero LH, Rojas-Altuve A, Llarrull LI, Carrasco-López C, Kumarasiri M, Lastochkin E, et al. How allosteric control of *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 2a enables methicillin resistance and physiological function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(42):16808–13.
62. Tsubakishita S, Kuwahara-Arai K, Sasaki T, Hiramatsu K. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(10):4352–9.
63. Hanaki H, Kuwahara-Arai K, Boyle-Vavra S, Daum RS, Labischinski H, Hiramatsu K. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *J Antimicrob Chemother*. 1998;42(2):199–209.
64. Périchon B, Courvalin P. VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(11):4580–7.
65. Ye J, McGinnis S, Madden TL. BLAST: Improvements for better sequence analysis. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(WEB. SERV. ISS.):6–9.
66. Hafer C, Lin Y, Kornblum J, Lowy FD, Uhlemann AC. Contribution of selected gene mutations to resistance in clinical isolates of vancomycin-intermediate staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(11):5845–51.
67. Watanabe Y, Cui L, Katayama Y, Kozue K, Hiramatsu K. Impact of *rpoB* mutations on reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2011;49(7):2680–4.
68. Roch M, Clair P, Renzoni A, Reverdy ME, Dauwalder O, Bes M, et al. Exposure of

- Staphylococcus aureus to subinhibitory concentrations of β -lactam antibiotics induces heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(9):5306–14.
69. Yusof A, Engelhardt A, Karlsson Å, Bylund L, Vidh P, Mills K, et al. Evaluation of a new etest vancomycin-teicoplanin strip for detection of glycopeptide-intermediate Staphylococcus aureus (GISA), in particular, heterogeneous GISA. *J Clin Microbiol.* 2008;46(9):3042–7.
70. Voss A, Mouton JW, van Elzakker EP, Hendrix RG, Goessens W, Kluytmans JA, et al. A multi-center blinded study on the efficiency of phenotypic screening methods to detect glycopeptide intermediately susceptible Staphylococcus aureus (GISA) and heterogeneous GISA (h-GISA). *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2007;6:1–5.
71. O’Seaghdha M, Van Schooten CJ, Kerrigan SW, Emsley J, Silverman GJ, Cox D, et al. Staphylococcus aureus protein A binding to von Willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG binding regions. *FEBS J.* 2006;273(21):4831–41.
72. Gómez MI, Lee A, Reddy B, Muir A, Soong G, Pitt A, et al. Staphylococcus aureus protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat Med.* 2004;10(8):842–8.
73. Cui L, Ma X, Sato K, Okuma K, Tenover FC, Mamizuka EM, et al. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in Staphylococcus aureus. *J Clin Microbiol.* 2003;41(1):5–14.
74. Cameron DR, Lin YH, Trouillet-Assant S, Tafani V, Kostoulias X, Mouhtouris E, et al. Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus isolates are attenuated for virulence when compared with susceptible progenitors. *Clin Microbiol Infect [Internet].* 2017;23(10):767–73.

Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.03.027>

75. Castro BE, Berrio M, Vargas ML, Carvajal LP, Millan L V., Rios R, et al. Detection of heterogeneous vancomycin intermediate resistance in MRSA isolates from Latin America. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(9):2424–31.
76. Reyes J, Rincón S, Díaz L, Panesso D, Germán A, Zurita J, et al. NIH Public Access Author Manuscript *Clin Infect Dis.* Author manuscript; available in PMC 2010 December 15. Published in final edited form as: *Clin Infect Dis.* 2009 December 15; 49(12): 1861–1867. doi:10.1086/648426. Dissemination. *Clin Infect Dis.* 2009;49(12):1861–7.
77. Arias CA, Jinnethe R. A Prospective Cohort Multicenter Study of Molecular Epidemiology and Phylogenomics of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2017;61(10):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.00816-17>.
78. Larsen M V., Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol.* 2012;50(4):1355–61.
79. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, et al. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinforma* 2009 101 [Internet]. 2009 Dec 15 [cited 2021 Sep 12];10(1):1–9. Available from: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-10-421>
80. Cerda L. J, Villarroel Del P. L. Interpretación del test de Chi-cuadrado (X^2) en investigación pediátrica. *Rev Chil Pediatr* [Internet]. 2007 Aug [cited 2021 May 30];78(4):414–7. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-41062007000400010&lng=es&nrm=iso&tlng=es
81. Silvente VB. Com aplicar les proves paramètriques bivariades t de Student i ANOVA en SPSS.

Cas pràctic. REIRE Rev d'Innovació i Recer en Educ. 2012;5(2):83-100–100.

82. Alberto R, Turcios S. t-Student. Usos y abusos. 2015 [cited 2021 Sep 12]; Available from: <http://www.medigraphic.com/revmexcardiol>
83. Hu J, Ma XX, Tian Y, Pang L, Cui LZ, Shang H. Reduced Vancomycin Susceptibility Found in Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates in Northeast China. PLoS One. 2013;8(9).
84. Sun W, Chen H, Liu Y, Zhao C, Nichols WW, Chen M, et al. Prevalence and characterization of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates from 14 cities in China. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(9):3642–9.
85. Xu J, Pang L, Ma XX, Hu J, Tian Y, Yang YL, et al. Phenotypic and molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility derivated in vitro. Open Med. 2018;13(1):475–86.
86. Weezep E Van, Kooi EA, Rijn PA Van. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information . 2020;(January).
87. Gilot P, Lina G, Cochard T, Poutrel B. Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. J Clin Microbiol. 2002;40(11):4060–7.
88. Strommenger B, Cuny C, Werner G, Witte W. 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):15–9.

89. Gomes-Fernandes M, Laabei M, Pagan N, Hidalgo J, Molinos S, Villar Hernandez R, et al. Accessory gene regulator (Agr) functionality in *Staphylococcus aureus* derived from lower respiratory tract infections. *PLoS One*. 2017;12(4):1–14.
90. Viljoen A, Viela F, Mathelié-Guinlet M, Missiakas D, Pietrocola G, Speziale P, et al. *Staphylococcus aureus* vWF-binding protein triggers a strong interaction between clumping factor A and host vWF.
91. Janzon L, Arvidson S. The role of the δ -lysin gene (*hld*) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *EMBO J*. 1990;9(5):1391–9.
92. Chamon RC, Marques LM, Timenetsky J, da Costa Rachid CTC, Ferreira RBR, de Oliveira TLR, et al. Genome Sequence of a Highly Virulent *pvl*-positive Vancomycin intermediate-resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type 30. *Curr Genomics*. 2020;21(2):128–37.
93. Machado V, Pardo L, Cuello D, Giudice G, Luna PC, Varela G, et al. Presence of genes encoding enterotoxins in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from food, food establishment surfaces and cases of foodborne diseases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo [Internet]*. 2020 [cited 2021 Sep 12];62. Available from: [/pmc/articles/PMC7014549/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33814549/)
94. J D, BZ Z, H C, XL W, Y W, HR G, et al. Adenosine synthase A contributes to recurrent *Staphylococcus aureus* infection by dampening protective immunity. *Ebiomedicine [Internet]*. 2021 Jul 28 [cited 2021 Sep 12];70:103505–103505. Available from: <https://europepmc.org/articles/PMC8340124>
95. Fridkin S, Steward C, Edwards J, Pryor E, McGowan J, Archibald L, et al. Surveillance of antimicrobial use and antimicrobial resistance in United States hospitals: project ICARE phase 2. Project Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology (ICARE) hospitals. *Clin Infect Dis*

- [Internet]. 1999 [cited 2021 Sep 16];29(2):245–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10476720/>
96. Diekema DJ, Pfaller MA, Jones RN, Doern G V, Kugler KC, Beach ML, et al. Trends in antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infections in the USA, Canada and Latin America. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2000 [cited 2021 Sep 16];13:257–71. Available from: www.ischemo.org
 97. Maor Y. Características clínicas de la bacteriemia por *Staphylococcus aureus* intermedio a la vancomicina heterorresistente versus las de la bacteriemia por *S. aureus* resistente a la meticilina. *J Infect* [Internet]. 2009;199. Available from: [http://www.editorial.unca.edu.ar/Publicacione on line/Ecologia/imagenes/pdf/012-poblacion.pdf](http://www.editorial.unca.edu.ar/Publicacione%20on%20line/Ecologia/imagenes/pdf/012-poblacion.pdf)
 98. Sander HS. Enterococos resistentes a vancomicina: ¿Infección emergente inminente? *Rev Chil infectología* [Internet]. 2002 [cited 2021 Aug 18];19:S50–5. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182002019100010&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 99. Purrello SM. Multiple gene contribution to the phenotypic and genotypic Daptomycin non-susceptible (DNS) variants of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* isogenic strains. 2009;
 100. Maritza O, Pérez B. Caracterización de aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, con susceptibilidad disminuida a vancomicina, de 3 países en Suramérica. 2018;
 101. Rodríguez APV, Ortega MHD, Garzón LIB, Vargas SMR, Iguarán DEH, Botero MVV, et al. Trends of bacterial resistance phenotypes in high-complexity public and private hospitals in Colombia. *Rev Panam Salud Pública*. 2011;30(6):627–33.
 102. Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering RC, Novick RP, Venkataraman L, Wennersten C, et al.

- Staphylococcus aureus Accessory Gene Regulator (agr) Group II: Is There a Relationship to the Development of Intermediate-Level Glycopeptide Resistance? *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;929(326):929–67.
103. Sakoulas G, Eliopoulos GM, Fowler VG, Moellering RC, Novick RP, Lucindo N, et al. Reduced Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to Vancomycin and Platelet Microbicidal Protein Correlates with Defective Autolysis and Loss of Accessory Gene Regulator (agr) Function. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(7):2687–92.
104. Howden BP, Johnson PDR, Ward PB, Stinear TP, Davies JK. Isolates with low-level vancomycin resistance associated with persistent Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2006 [cited 2021 Aug 18];50(9):3039–47. Available from: <http://aac.asm.org/>
105. Cafiso V, Bertuccio T, Spina D, Purrello S, Campanile F, Di Pietro C, 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* [Internet]. 2012 Jan 9 [cited 2021 Sep 16];7(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22253738/>