

**CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUSCEPTIBLES A METICILINA, CON Y SIN
EFECTO INÓCULO A CEFAZOLINA RECUPERADOS DE UN PACIENTE
CON BACTERIEMIA**

Paula Camila Olivares Manrique

Universidad El Bosque

Facultad de Medicina

Pregrado de Medicina

Bogotá

2021

**CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUSCEPTIBLES A METICILINA, CON Y SIN
EFECTO INÓCULO A CEFAZOLINA RECUPERADOS DE UN PACIENTE
CON BACTERIEMIA**

Paula Camila Olivares Manrique

Directora: Sandra Rincón Núñez PhD, MsC

Profesor Titular Unidad de Genética y Resistencia Antimicrobiana UGRA

Trabajo de Grado para Optar por el Título de Médico Cirujano

Universidad El Bosque

Facultad de Medicina

Pregrado de 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 primer lugar, quiero agradecer a Dios y a mi familia que siempre estuvieron conmigo y me brindaron palabras de apoyo cuando mis ánimos decaían.

En segundo lugar, quiero agradecer a mi tutora académica Sandra Rincón PhD, quien con sus conocimientos y paciencia me guio a través de este proyecto para poderlo finalizar y alcanzar unos resultados favorables.

También quiero agradecer a la Unidad de Genómica y Resistencia Antimicrobiana (UGRA) de la Universidad El Bosque por brindarme todas las herramientas necesarias para poder llevar a cabo esta investigación.

Por ultimo un agradecimiento especial a Minciencias por la financiación de este proyecto (Código 130880764150, Número de contrato 779-2018).

Dedicatoria:

Dedico esta tesis a mi padre Raúl Olivares, mi madre Rocío Manrique que permitieron que llegara hasta este punto con la ayuda de Dios, a mi hermana María Alejandra Olivares, a mi perro Mathias y a mi gato Emiliano. Gracias infinitas por el apoyo incondicional que me ofrecen todos los días.

CONTENIDO

Resumen.....	12
1. Introducción.....	14
2. Antecedentes.....	16
3. Planteamiento del problema	21
4. Justificación	23
5. Objetivo general.....	25
5.1 Objetivos específicos	25
6. Marco teórico.....	26
6.1 Generalidades Microbiológicas <i>S. aureus</i>	26
6.2 Patologías por <i>S. aureus</i>	27
6.2.1 Endocarditis infecciosa (EI)	27
6.2.3 Infecciones de la piel y tejidos blandos.....	28
6.2.4 Bacteriemia	28
6.3 Factores de virulencia	31
6.4 Sistema Agr.....	32
6.4.1 Determinantes de virulencia controlados por Agr.....	33
6.5 Toxinas específicas de <i>S. aureus</i>	35
6.5.1 Toxinas formadoras de poros	36
6.5.1.1 Hemolisina - α (<i>hla</i> o toxina α).....	36
6.5.1.2 Hemolisina- β (<i>esfingomielinasa c</i>).....	37
6.5.2 Toxinas exfoliativas (ETs)	39
6.5.3 Superantígenos (SAGs)	40
6.6 Resistencia antibiótica de <i>Staphylococcus aureus</i>	41
6.7 Tratamiento de la bacteriemia	43
6.8 Cefazolina.....	44
6.9 Efecto inóculo a cefazolina.....	47
6.10 Agr en el contexto de efecto inóculo a cefazolina.....	53
6.11 Betalactamasas	54
6.11.1 Alotipos de betalactamasas.....	56
7. Materiales y métodos.....	58
7.1 Tipo Estudio: Estudio de caso descriptivo con datos retrospectivos de un estudio anterior.	58

7.2	<i>Población:</i>	58
7.2.1	<i>Muestra:</i>	59
7.3	<i>Variables</i>	59
7.3.1	<i>Concentración mínima inhibitoria (CIM) a cefazolina:</i>	59
7.3.2	<i>Características genéticas:</i>	59
7.5	<i>Proceso metodológico</i>	64
8.	Consideraciones éticas.....	66
9.	Resultados y discusión.....	67
10.	Conclusiones.....	85

Lista de abreviaturas

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
µm	Micrómetro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
<i>Agr</i>	Gen regulador accesorio
AIP	Péptido autoinductor
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
BHII	Müller Hinton II Broth
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
CC	Complejos Clonales
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CMAX	Concentración máxima sérica
EI	Endocarditis infecciosa
EIC	Efecto inóculo a cefazolina
Ets	Toxinas exfoliativas
FAME	Fatty acid modifying enzyme
IAAS	Infecciones asociadas a la atención en salud
IDSA	The Infectious Diseases Society of America
ITU	Infección del tracto urinario
Kb	Kilobase
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MAC	Complejo de ataque de membrana
MHC II	Complejo mayor de histocompatibilidad II
MLST	Tipificación multilocus de secuencias

MSCRAMM	Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
PBP	Proteína de unión a la penicilina
PC	Polisacáridos capsulares
PCR	Proteína C reactiva
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis de campo pulsado
PFTs	Toxinas formadoras de poros
PIA	Adhesión intercelular de polisacárido
PSM	Modulinas Solubles en Fenol
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAGs	Superantígenos
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
SARM-AC	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina asociado a la comunidad
SARM-AH	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina asociado al hospital
SARV	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a la vancomicina
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a meticilina
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> susceptible a meticilina
SCC	Cassete cromosómico estafilocócico
ST	Tipo de secuencia
UCI	Unidad de cuidados intensivos
UFC/ml	Unidades formadoras de colonias por mililitro
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> con susceptibilidad intermedia de vancomicina
VSG	Tasa de sedimentación globular

Lista de tablas

Tabla 1 Exotoxinas producidas por <i>S. aureus</i>	35
Tabla 2. Distribución de la frecuencia de efecto inóculo a cefazolina en SASM recuperados de infecciones sanguíneas en hospitales de Latinoamérica.....	51
Tabla 3. Lista de factores de virulencia de <i>S. aureus</i>	60
Tabla 4. Tipos de betalactamasas (BlaZ) clasificación tradicional	62
Tabla 5. CIMs a cefazolina de las cepas estudiadas	67
Tabla 6. Factores de virulencia	73

Lista de figuras

Figura 1. Estructura y función del operón agr en <i>S. aureus</i>	33
Figura 2. Factores de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	40
Figura 3. Línea de tiempo de las cuatro olas de resistencia antibiótica en <i>Staphylococcus aureus</i> ..	42
Figura 4 Inducción de la síntesis de betalactamasas estafilocócicas (BlaZ) en presencia del antibiótico betalactámico penicilina	55
Figura 5. Primers ubicados en Agr para realizar la tipificación	63
Figura 6. Procedimiento para analizar las secuencias genéticas	65
Figura 7. Resultados del análisis de las tres cepas de SASM alotipos	70

Resumen

Staphylococcus aureus es uno de los principales patógenos del ser humano, que causa un espectro de infecciones clínicas que involucran desde la piel y los tejidos blandos hasta infecciones más graves como la bacteriemia. En la actualidad infecciones severas por *Staphylococcus aureus* susceptible a meticilina (SASM) son de gran relevancia y han excedido las causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM). La cefazolina, cefalosporina de primera generación ha mostrado buenos resultados terapéuticos, menos efectos adversos y mejor costo efectividad en infecciones graves causadas por SASM, y es una alternativa terapéutica de los agentes de primera línea en estas infecciones, las penicilinas estafilocócicas. Sin embargo, un obstáculo en la terapia clínica con cefazolina es el efecto inóculo a cefazolina (EIC), fenotipo definido como un aumento significativo en la CIM (concentración inhibitoria mínima) a cefazolina cuando el inóculo bacteriano se incrementa a 10^7 (UFC/ml) comparado con la CIM obtenida con el inóculo bacteriano estándar de 10^5 UFC/ml. El EIC se ha relacionado con falla terapéutica por cefazolina particularmente en enfermedades con alta carga bacteriana como la bacteriemia, endocarditis y también a mayor mortalidad. El presente estudio buscó caracterizar el genoma de aislamientos de *S. aureus* susceptibles a meticilina con y sin efecto inóculo a cefazolina recuperados de bacteriemia a partir de un paciente. Se presenta la descripción de los hallazgos de la secuenciación de genoma completo para estudiar características genéticas asociadas al efecto inóculo a cefazolina y factores de virulencia. Asimismo, se discuten posibles hipótesis sobre el EIC como el tipo de betalactamasa, alotipo de BlaZ, y Agr, ya que el mecanismo genético de este fenotipo no se conoce completamente.

Palabras clave: Efecto inóculo a cefazolina, *Staphylococcus aureus* susceptible a meticilina, bacteriemia, factores de virulencia, agr, betalactamasas.

Summary

Staphylococcus aureus is one of the main human pathogens causing a spectrum of clinical infections ranging from skin and soft tissue to more serious infections such as bacteremia. Currently, severe infections by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) are of great relevance and have exceeded those caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Cefazolin, a first-generation cephalosporin, has shown good therapeutic results, fewer adverse effects, and better cost effectiveness in severe infections caused by MSSA, and is a therapeutic alternative to first-line agents in these infections; staphylococcal penicillins. However, an obstacle in clinical therapy with cefazolin is the inoculum effect to cefazolin, a phenotype defined as a significant increase in the MIC (minimal inhibitory concentration) to cefazolin when the bacterial inoculum is increased to 10^7 (CFU/ml) compared to the MIC obtained with the standard bacterial inoculum of 10^5 (CFU/ml). The cefazolin inoculum effect (CIE) has been related to therapeutic failure due to cefazolin, particularly in diseases with high bacterial load such as bacteremia, endocarditis and also to higher mortality. The present study sought to characterize the genome of methicillin-susceptible *S. aureus* isolates with and without cefazolin inoculum effect recovered from bacteremia from a patient. A description of the findings of the whole genome sequencing is presented to study genetic characteristics associated with the inoculum effect of cefazolin and virulence factors. Likewise, possible hypotheses about CIE

are discussed, such as the beta-lactamase type, BlaZ allotype, and Agr, since the genetic mechanism of this phenotype is not fully understood.

Key words: Cefazolin inoculum effect, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* , bacteremia, virulence factors, agr, betalactamases.

1. Introducción

Staphylococcus aureus es un coco Gram positivo, responsable de varias infecciones en el ser humano tales como la bacteriemia, infecciones de la piel y tejidos blandos, endocarditis infecciosa y relacionadas con dispositivos intravasculares (1).

Es un agente importante causante de bacteriemia, la incidencia de esta entidad por *S. aureus* según varios estudios multicéntricos realizados alrededor del mundo varía desde 20-50/100.000 personas por año, se estima que del 10-30% fallecen por esta infección, superando a la población que muere por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), hepatitis y tuberculosis. Uno de los factores de riesgo más relacionado con la adquisición de bacteriemia es la edad avanzada, la etnia, el género masculino, un estatus socioeconómico bajo y la presencia de comorbilidades como la inmunosupresión, cirrosis, alcoholismo, enfermedad renal crónica e insuficiencia cardiaca (2). *Staphylococcus aureus* susceptible a meticilina (SASM) es el causante de gran porcentaje de bacteriemia con una prevalencia del 35% en Colombia y una mortalidad del 13% (3).

La cefazolina, una cefalosporina de primera generación es una alternativa eficaz para el tratamiento de bacteriemia por su esquema de dosificación, bajos niveles de toxicidad y menor costo (4). Sin embargo, algunos aislamientos de SASM exhiben aumentos significativos en la concentración inhibitoria mínima (CIM) de cefazolina con altos niveles de inóculo bacteriano, lo que se conoce como el efecto inóculo a cefazolina (EIC). Existen reportes desde los años 70 de tres casos específicos de falla terapéutica a cefazolina asociado a este fenotipo, relacionado con mortalidad (5,6). Por otro lado, también se han reportaron que las betalactamasas de estafilococo tipo A y C han sido las responsables de la falla clínica

En Colombia un primer estudio que buscó la prevalencia de efecto inóculo a cefazolina en 199 aislamientos de SASM de hemocultivos recuperados de 22 hospitales encontró que para los aislamientos recolectados de una vigilancia del 2001 al 2002 fue de un 45%, mientras que para los

recolectados durante el 2006 al 2008 fue del 31% (7). En el estudio más reciente realizado por Carvajal y cols., (8) en 2020 en el que se incluyeron 690 aislamientos de bacteriemia por SASM de un estudio prospectivo multicéntrico de 9 hospitales latinoamericanos realizado entre 2010-2014 y 49 aislamientos de un hospital colombiano en los años 2018-2019 se registró una prevalencia general de EIC de 40%.

Los mecanismos genéticos del efecto inóculo a cefazolina aún no se conocen, se han asociado tipos de betalactamasas, sin embargo, sería interesante investigar determinantes genéticos que puedan estar asociados a este fenotipo.

Por eso, en este estudio se caracterizó el genoma completo de aislamientos de *Staphylococcus aureus* susceptibles a meticilina con y sin efecto inóculo a cefazolina, recuperados de un mismo paciente colombiano con bacteriemia. Para esto se realizó la secuenciación de genoma completo de estos aislamientos y se exploró posibles genes relacionados a este fenómeno, con la ayuda de herramientas bioinformáticas.

2. Antecedentes

El *Staphylococcus aureus* es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo, productor de catalasa y coagulasa, esta bacteria es comensal y patógena, pues habita normalmente en un 40% de la población general, en la población colombiana un 31.5%, en la microbiota nasal y perineo (9–11). *S. aureus* causa infecciones hospitalarias y de la comunidad en diferentes áreas geográficas del mundo, estas pueden presentarse desde infecciones de piel y tejidos blandos hasta otras más graves e invasivas como lo son la bacteriemia, neumonía, osteomielitis y la endocarditis infecciosa. Su patogénesis se debe a diversos factores de virulencia que presenta y de su capacidad de adaptarse a diferentes condiciones medio ambientales (12).

La incidencia de bacteriemia por *Staphylococcus aureus* en países occidentales es de 16-41/100.000 personas adultas por año, mientras que es de 6.5-17/100.000 en niños por año. La mortalidad atribuible a 30 días es de 15-25% en adultos, en niños del 0-9%, entre tanto la mortalidad a un año es de 19-62% (13). Entre los factores de riesgo se han descrito: la edad como el factor más importante (mayores de 75 años), el género masculino, comorbilidades como la diabetes mellitus, pacientes en hemodiálisis, VIH, la presencia de catéteres intravasculares, ser usuario de válvulas protésicas y también pertenecer a un bajo estrato socioeconómico (1,13). En la actualidad, *Staphylococcus aureus* es el microorganismo responsable de causar tanto bacteriemia adquirida en la comunidad como a nivel intrahospitalario, se le confiere un porcentaje cercano del 33%, así mismo el 50% del empeoramiento de las enfermedades son causadas por este patógeno (14). En un estudio realizado por David y cols., (15) se encontraron más pacientes con infecciones por SASM asociadas a la atención de la salud en un hospital con mayor frecuencia que con infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM). Por lo que podríamos inferir en que se ha producido un intercambio de roles para las cepas SASM y SARM a lo largo del tiempo (15,16).

En cuanto a la resistencia a antibióticos, la resistencia a oxacilina (o meticilina), betalactámico resistente a la betalactamasa desarrollado en 1959 para el tratamiento de infecciones por *S. aureus*, presenta en la actualidad altas prevalencias de resistencia inclusive del 50% de SARM en algunas áreas geográficas del mundo (17,18).

En un estudio de cohorte prospectivo observacional realizado en hospitales de Latinoamérica que incluyó 675 pacientes adultos con bacteriemia por SARM y SASM se encontró que la mortalidad para los aislamientos por SASM fue de un 25%. La prevalencia de SASM fue más alta en países como Argentina, Chile, Colombia y Ecuador. Colombia específicamente con un porcentaje del 35% y con una mayor frecuencia de adquisición en el hospital (3). En Colombia, *S. aureus* es uno de los principales patógenos aislados en infecciones hospitalarias (14). Según el informe de resultados de la vigilancia por el Laboratorio de Resistencia Antimicrobiana en Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS), en 14 entidades territoriales de nuestro país muestra que *S. aureus* es el tercer microorganismo más frecuente en servicios no UCI y el cuarto en la UCI (Unidad de Cuidados Intensivos) (19). La unidad de cuidados intensivos, es una unidad hospitalaria especializada dedicada a la atención de pacientes que requieren soporte vital y aquellos con un riesgo extremadamente alto de insuficiencia orgánica y muerte (20) mientras que servicios no UCI abarca pisos de hospitalizaciones tanto adultos como pediatría (21).

Las penicilinas antiestafilocócicas como la nafcilina, oxacilina y cloxacilina son la primera línea para bacteriemia por SARM, sin embargo, la cefazolina, una cefalosporina de primera generación ha sido una alternativa prometedora y beneficiosa, pues muchas veces la línea de manejo es cambiada a esta cefalosporina por su mejor esquema de dosificación ya que mejora la adherencia del paciente al medicamento, hay menor cantidad de efectos adversos y menor mortalidad. También es utilizada en la profilaxis perioperatoria porque muestra buena tolerabilidad (22,23).

En una búsqueda sistemática y de metaanálisis realizada por Shi y cols., (24) en el año 2018 en la que evaluaron la eficacia y la seguridad de la cefazolina en comparación con las penicilinas antiestafilocócicas, en varias regiones del mundo como Corea del Sur, Estados Unidos, Singapur e Israel, se encontró que la cefazolina redujo de forma significativa la mortalidad (OR, 0.69, 95% CI, 0.58 a 0.82; I²=3.4%), también posee una menor falla terapéutica (OR, 0.56; 95% CI, 0.37 a 0.85; I² = 44.9%). La hepatotoxicidad (OR, 0.12; 95% CI, 0.04 to 0.41; I² = 0%) y la nefrotoxicidad (OR, 0.36; 95% CI, 0.16 to 0.81; I² =0%) también son menores con la cefazolina y el abandono del tratamiento debido a los eventos adversos es mucho menor (OR, 0.24; 95% CI, 0.12 to 0.48; I² = 18%) así como la recurrencia de bacteriemia (22,24). Este estudio demostró que la cefazolina es superior ya que es mejor tolerada que las penicilinas antiestafilocócicas (24,25).

En Colombia, la cefazolina conforma el segundo lugar en dispensación de antibióticos según datos publicados por la universidad tecnológica de Pereira lo que indicaría que es muy utilizada en nuestro medio (26).

En cuanto a la resistencia a los antibióticos betalactámicos en *S. aureus*, el 90% de las cepas son productoras de betalactamasas (22), que son enzimas codificadas por el gen *blaZ*, gen que se induce en el momento en que la bacteria se expone al betalactámico, este se encuentra en un plásmido (que es un elemento genético extracromosomal que se transfiere de forma horizontal, favoreciendo y propagando la resistencia a betalactámicos) o en el cromosoma bacteriano (12).

Actualmente se conocen 4 tipos de betalactamasas denominadas A, B, C y D, cada una fue definida con base a los sustratos por las que son afines y por estudios inmunológicos. Se encontró que la betalactamasa tipo A hidroliza a la cefazolina de forma eficaz (27).

El efecto inóculo, se define como un aumento significativo en la CIM a cefazolina cuando el inóculo se incrementa a 10⁷ Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml) comparado

con la CIM obtenida al emplear el inóculo bacteriano estándar de 10^5 UFC/ml (7). Este efecto inóculo se ha asociado a falla terapéutica con cefazolina, particularmente en enfermedades con alta carga bacteriana como lo son la bacteriemia y la endocarditis infecciosa (22).

Los primeros reportes de efecto inóculo a cefazolina y falla terapéutica fueron descritos en 1973 por Quinn y cols., (6) donde a partir de 9 pacientes con endocarditis por *S. aureus*, un paciente no respondió al tratamiento con cefazolina. En ese estudio se reportó que el aislamiento de SASM fue susceptible a cefazolina, sin embargo, al evaluar un alto inóculo bacteriano demostró resistencia a esta cefalosporina.

Posteriormente, en el año 1977 un estudio encontró falla terapéutica a cefazolina en dos pacientes con endocarditis, en uno de ellos había compromiso del sistema nervioso central (5). Luego, Nannini y cols., (28) en 2003 investigaron a un paciente que previamente se había sometido a una cirugía de recambio valvular aórtico y que desarrolló posteriormente una endocarditis infecciosa por SASM. Los resultados de los hemocultivos luego de la terapia con cefazolina permanecieron positivos, el paciente no presentó mejoría y por el contrario tuvo una recaída, confirmando el fallo terapéutico a cefazolina (7). En este estudio se aisló la cepa de *S. aureus* denominada TX0117 (por el lugar en donde fue hallada) que presentó un aumento en las CIM a cefazolina con alto inóculo bacteriano y asociación con la degradación de cefazolina. Cabe resaltar que las características genotípicas de esta cepa fueron confirmadas por la secuenciación del gen *blaZ*, cuyos hallazgos indicaron que la cepa presentaba la betalactamasa del tipo A (22,28).

Más adelante, varios estudios de prevalencia de EIC se realizaron en Estados Unidos, Latinoamérica y Asia (Corea y Japón), en aislamientos clínicos de bacteriemia y endocarditis infecciosa que han descrito prevalencias del 3 al 57.5%. También en estos estudios se reportó que la betalactamasa tipo A y C son las más frecuentes en aislamientos que presentan este fenotipo (7,22,27,29–31).

El mecanismo genético relacionado con el efecto inóculo no se conoce aún, no se han encontrado linajes genéticos de *S. aureus* relacionados, pero se ha postulado que: la hiperproducción de la betalactamasa, copias del gen, polimorfismos de *blaZ* y la desregulación del gen regulador accesorio (*agr*) podrían estar relacionados (8,22,29). Más recientemente alotipos de *blaZ* y un linaje genético el ST30 se relacionaron a efecto inóculo en cepas de SASM de bacteriemia de Latinoamérica (8).

3. Planteamiento del problema

La bacteriemia causada por *S. aureus* está asociada a una alta mortalidad y morbilidad, SASM es causante de un 40-90% de esta infección (29). En Colombia, se reporta una prevalencia de 78% de SASM causante de bacteriemia (32) y una mortalidad de alrededor el 25% en bacteriemia en Latinoamérica (3). Cefalosporinas de primera generación como la cefazolina son una alternativa terapéutica a las penicilinas antiestafilocócicas (que son la primera opción para infecciones por SASM) porque tiene una vida media más larga, un mejor esquema de dosificación y menor toxicidad (7,25).

Lo preocupante es que en los últimos años se han registrado fallas terapéuticas con cefazolina a la hora de tratar infecciones donde *S. aureus* es el responsable, pues presentan altas cargas bacterianas como la endocarditis, bacteriemia, osteomielitis, artritis séptica, neumonía, infección metastásica y abscesos mayores sin drenar (29). Esto se ha relacionado a un fenotipo denominado efecto inóculo a cefazolina, que es un aumento en la CIM al evaluar un alto inóculo bacteriano, lo que resulta en una CIM resistente y en fracaso terapéutico al utilizar la cefalosporina (29,30).

Estudios de prevalencia de efecto inóculo realizados en Estados Unidos, Latinoamérica y Asia, han descrito que este fenómeno no es infrecuente, incluso se han encontrado prevalencias cercanas al 58% en aislamientos de SASM de bacteriemia (7,22,27,29–31).

Rincón y cols., (7) realizaron el primer estudio en Latinoamérica sobre efecto inóculo a cefazolina en SASM de hospitales de Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela, en 2013. Evaluaron 364 aislamientos de SASM de sangre y osteomielitis, y pudieron encontrar una prevalencia total del fenotipo de 36%. El 50% de estos aislamientos pertenecían a osteomielitis y 33% de infecciones sanguíneas. El efecto inóculo a cefazolina se observó en cepas de SASM de Ecuador con una prevalencia del 45% y en Colombia en cepas de osteomielitis con un 63% (7). Luego, Miller y cols., (33) en 2018 evaluaron 89 cepas de SASM de bacteriemia recuperados de 77 pacientes de 3 hospitales

argentinos, en donde el 54.5% presentaron efecto inóculo a cefazolina y este fenotipo se asoció con aumento en la mortalidad a los 30 días ($P = .034$) en comparación con los pacientes infectados con aislamientos de SASM que no presentaron el EIC.

4. Justificación

Staphylococcus aureus susceptible a meticilina es uno de los patógenos Gram positivos más importantes que causan infecciones en hospitales. SASM en la actualidad sobrepasa los números de prevalencia de SARM en infecciones severas como bacteriemia (33). Es el tercer microorganismo más frecuente en servicios no UCI y el cuarto en la UCI en hospitales de Colombia (19). Adicionalmente, es el responsable de causar tanto bacteriemia adquirida en la comunidad como a nivel intrahospitalario, con porcentajes cercanos al 33%, así mismo aproximadamente el 50% de las complicaciones son causadas por este patógeno (14). Las penicilinas antiestafilocócicas como la nafcilina, oxacilina y cloxacilina son la primera línea para bacteriemia por SASM (22). Sin embargo, la cefazolina es la primera línea de manejo en casos de reacción alérgica no inmediata a penicilina (6,28), inclusive se ha propuesto dejarla como primera línea por sus beneficios ya que no altera de manera importante la microbiota natural del tracto gastrointestinal (34).

No obstante el efecto inóculo a cefazolina, parece ser un obstáculo en el tratamiento para bacteriemia y otras enfermedades estafilocócicas que se presentan con altas cargas bacterianas (5,6,28). Los rangos de prevalencias reportadas de efecto inóculo a cefazolina en SASM en Colombia son del 31 al 45%, siendo las betalactamasas tipo A y C las que más relacionadas con este fenómeno (7,22,27,28).

En la actualidad los estudios genómicos tienen mayor resolución y son más económicos de realizar, esto permite secuenciar un genoma bacteriano en aproximadamente 10 horas y por un precio aproximado de 100 dólares (35). Este método contribuye a la investigación y a la detección de brotes de diversas enfermedades lo que favorece los estudios epidemiológicos y otorga mayor sensibilidad y especificidad a la diferenciación de cepas bacterianas, pues el estándar oro ha sido la tipificación bacteriana con la electroforesis de campo pulsado (PFGE por sus siglas en inglés) sin embargo, su

poder de discriminación es limitado y los patrones no son muy confiables para cepas de *S. aureus* (36).

Por otro lado, se aporta de manera importante a la salud pública pues ya conociendo el genoma de una bacteria que está involucrada en el efecto inóculo a cefazolina, permitiría en un futuro conocer los genes involucrados en este fenómeno. Finalmente se contribuiría con el aporte a la base de datos de los genomas bacterianos conocidos del planeta como el que existe en Dinamarca (37) o el de Estados Unidos NCBI (38).

Todo lo mencionado, justifica la realización de este estudio que busca la caracterización genómica de aislamientos de SASM con y sin efecto inóculo a cefazolina, recuperados a partir de hemocultivos de un paciente con bacteriemia en un hospital en Colombia. De esta manera se espera contribuir con el conocimiento de características genéticas de *S. aureus* asociado con este fenotipo de resistencia que es poco conocido, pero de gran relevancia clínica.

5. Objetivo general

Caracterizar el genoma de aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* susceptibles a meticilina con y sin efecto inóculo a cefazolina recuperados de un paciente con bacteriemia.

5.1 Objetivos específicos

1. Investigar el efecto inóculo a cefazolina en aislamientos de *S. aureus* recuperados de un paciente con bacteriemia.
2. Realizar la secuenciación de genoma completo para estudiar características genéticas asociadas al efecto inóculo y factores de virulencia.

6. Marco teórico

6.1 Generalidades Microbiológicas *S. aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria descubierta en el año 1880 por el doctor Alexander Ogston, el nombre proviene del griego *staphyle* que significa racimo de uvas, este agente posee gran potencial para causar diversidad de infecciones desde las que parecen más simples como las de piel y tejidos blandos hasta otras más graves que amenazan la vida como lo son la bacteriemia, la osteomielitis y las infecciones asociadas a uso de dispositivos intravasculares (37,39,40).

Staphylococcus aureus pertenece al género *Staphylococcus* de la familia *Micrococcaceae*. Este género está conformado por cocos Gram positivos, dentro de sus características principales se describe que tiene un diámetro de 0.5 a 1.5 μ m (micrómetro), se encuentran agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Adicionalmente, son bacterias no móviles, no esporuladas, tampoco poseen cápsula, pero existen algunas que sí tienen cápsula de limo, son anaerobias y facultativas. Son productoras de catalasa, es decir pueden desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre, método usado para diferenciar entre los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*. Por otro lado, en cuanto a las características estructurales este patógeno tiene unidos los ácidos teicoicos, encargados de mediar la unión de los estafilococos a las mucosas con uniones de fibronectina, induciendo la producción de anticuerpos. Estructuralmente se compone de una membrana de lípidos, rodeada de una delgada capa de peptidoglicano que le proporcionan rigidez a la pared celular, determinando su forma y protegiéndola de la lisis osmótica y ácido lipoteicoico anclado por diacilglicerol. Contiene 32 especies, de las cuales 16 están presentes en humanos (40–42).

S. aureus es la especie más patógena y virulenta para el ser humano, no obstante, puede estar como colonizador en la piel y las mucosas. Es catalasa, coagulasa, DNAsa positivo, también fermenta el manitol esto ayuda a diferenciarlo del resto de especies del género *Staphylococcus*. Sus colonias

cuando crecen dan un color amarillo dorado por la producción de carotenoides (43–45). El genoma de *S. aureus* es de aproximadamente 2.800 kb (kilobase), el cual está conformado por un único cromosoma circular que en su interior contiene elementos genéticos móviles como transposones, plásmidos y secuencias de inserción (42).

6.2 Patologías por *S. aureus*

La epidemiología de *S. aureus* ha variado las dos últimas décadas, de forma que se han incrementado las infecciones asociadas al cuidado de la salud como la endocarditis y las infecciones asociadas al uso de dispositivos intravasculares, así mismo las infecciones asociadas a la comunidad como las de piel y tejidos blandos que son resistentes a betalactámicos (1).

6.2.1 Endocarditis infecciosa (EI)

S. aureus es el agente etiológico que causa con mayor frecuencia la endocarditis infecciosa (EI), su incidencia es de 1.5 a 6 por 100,000 personas-años, y *S. aureus* es responsable del 16-34% de los casos, el principal factor de riesgo es el contacto con cuidados de la salud. La EI puede ser producida por uso de válvulas protésicas en un 23-33%, esto ocurre porque *S. aureus* frecuentemente produce bacteriemia asociada al cuidado de la salud. El riesgo de desarrollar bacteriemia cuando se tiene una válvula protésica es de alrededor el 51% (46). El principal mecanismo encargado del desarrollo de esta patología es la endotelización insuficiente de la válvula protésica luego de haberla puesto y además el ser usuario de drogas intravenosas incrementa este riesgo. El daño endotelial cardiaco puede ser por trauma directo como un flujo turbulento o inflamación, por ejemplo secundario a una fiebre reumática (46)

En el momento en que las células subendoteliales producen matriz extracelular, factores tisulares, depósitos de fibrina y plaquetas hacen que se formen vegetaciones estériles, estas pueden ser colonizadas por bacterias como *S. aureus* y producir EI. La colonización se logra porque *S. aureus* posee factores celulares que atacan esas proteínas de matriz extracelular, fibrina y plaquetas,

denominados factores *clumping* A y B (CIfA y CIfB) conocidos también como proteínas de unión a fibrinógeno, luego del anclaje causan invasión celular endotelial e inflamación (1).

6.2.3 Infecciones de la piel y tejidos blandos

S. aureus puede causar desde impétigo (infección cutánea superficial) hasta una celulitis que se puede complicar gravemente, *S. aureus* es la bacteria que se aísla principalmente en las infecciones de sitio quirúrgico, abscesos cutáneos y celulitis purulenta (1). La patogénesis se centra en la respuesta de los neutrófilos y macrófagos, *S. aureus* evade esta respuesta bloqueando la quimiotaxis de los leucocitos, secuestrando anticuerpos del huésped, de esta forma evita la detección de la cápsula de polisacáridos o de la formación de biopelículas (1).

6.2.4 Bacteriemia

En un estudio prospectivo de cohorte realizado en 10 hospitales colombianos entre 2007 y 2008 mostró que los microorganismos más frecuentemente en infecciones del torrente sanguíneo fueron los cocos Gram positivos en un 38.4%, siendo el *S. aureus* un 7.8%. *Staphylococcus aureus* fue sensible a meticilina en 82% de los pacientes. La fuente de infección fue secundaria a un foco conocido en 67%, desconocido en 24% y asociada a catéter intravascular en 9%. En los países industrializados los Gram positivos lideran la lista de aislamientos mientras que en los países no desarrollados son los bacilos Gram negativos (47).

En Latinoamérica se han realizado estudios epidemiológicos, específicamente en Brasil de bacteriemia donde la mortalidad cruda está entre el 28,8 y el 40% y la mortalidad atribuible entre 17 y 37.8%. En la mayoría de los estudios de Latinoamérica, los microorganismos predominantes son bacilos Gram negativos, que representan entre 52 y 60% de los casos, pero en otros estudios, realizados en un solo centro en Argentina, predominaron las cocáceas Gram positivas, entre 51,4 y 65,5% (47). Por otro lado en un estudio retrospectivo realizado en la ciudad de Medellín en el hospital San Vicente de Paul se encontró que la mortalidad más alta estaba en el grupo de SASM adquirido

en la comunidad en un 40.2% y en este mismo grupo se encontró la necesidad de UCI posterior al hemocultivo con un 36.6% (32).

La bacteriemia se define como la presencia de bacterias en la sangre, solo se necesita un hemocultivo positivo para diagnosticarla. Las manifestaciones clínicas de la bacteriemia por *S. aureus* generalmente son respuestas sistémicas como fiebre e hipotensión y la endocarditis infecciosa es una de las complicaciones más graves (1).

El *S. aureus* se adhiere a los tejidos de materiales protésicos y es capaz de crecer de varias maneras, evadiendo el sistema inmune y los antibióticos con la formación de biopelículas en el huésped y las superficies protésicas. Es importante mencionar que *S. aureus* sobrevive dentro de varios tipos de células como las endoteliales, así sucede en la bacteriemia y en la endocarditis infecciosa, otro mecanismo de supervivencia es que puede formar variantes de colonias pequeñas que pueden esconderse en las células del huésped, perpetuando la infección (1). La producción de una microcápsula antifagocítica es otro método de defensa utilizado por *S. aureus* produciendo abscesos. *S. aureus* puede detener aún más las defensas del huésped al reducir la extravasación de neutrófilos y la quimiotaxis en el área infectada al producir una proteína inhibidora de quimiotaxis. Además, secreta leucocidinas que destruyen los leucocitos porque le generan agujeros en la membrana celular. Cuando hay una regulación de la expresión de agentes de virulencia de forma coordinada reduce las demandas metabólicas del patógeno, como las proteínas MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) estas son de adhesión propias de los *Staphylococcus*, que se secretan de forma temprana en el proceso infeccioso ayudando al establecimiento de la infección en el foco primario mientras que las toxinas facilitan la propagación y la extensión de la infección. Por otra parte, Agr es un sistema de detección de quórum que regula la virulencia estafilocócica (1).

En cuanto a la bacteriemia causada por *S. aureus* es una patología muy bien descrita en la literatura, la incidencia mundial en países industrializados es de 10-30 por cada 100.000 vivos (1). Algunos

factores de riesgo para la adquisición de bacteriemia por *S. aureus* son: pertenecer a raza negra, indígena, pertenecer a una clase socioeconómica baja, tener VIH con un bajo conteo de células CD4, hombres que tienen sexo con otros hombres, ser usuario de drogas intravenosas o de dispositivos intravasculares y estar en las edades extremas de la vida (1,44). En cuanto a las manifestaciones clínicas va a depender del foco primario que la vincule.

Las infecciones relacionadas al uso de catéteres intravasculares tienen una mortalidad de 7-21%, infecciones de la piel y de tejidos blandos de 15-17%, endocarditis infecciosa de un 25-60%, sin embargo el foco no es encontrado en el 25% de los casos, lo que a su vez incrementa el riesgo de mortalidad en un 22-48% (1).

La bacteriemia causada por *S. aureus* puede ser clasificada en complicada y no complicada, esto nos ayuda a diagnosticarla, saber cuál será la duración del esquema antibiótico y el pronóstico de la misma. La complicada debe incluir compromiso del sistema nervioso central, un evento tromboembólico, metástasis o infección recurrente dentro de las 12 próximas semanas y se atribuye mayor mortalidad. Algunos predictores para bacteriemia complicada son 1. Adquisición en la comunidad 2. Positividad de los cultivos de seguimiento a las 48-96 horas, fiebre persistente a las 72 horas y hallazgos dermatológicos que sugieran una infección aguda como vasculitis, petequias, equimosis o pústulas. Mientras que la IDSA (The Infectious Diseases Society Of America) considera que la bacteriemia no complicada está definida por la exclusión de endocarditis infecciosa por ecocardiografía, la no existencia de implantes protésicos, negatividad de los cultivos pasados 2-4 días desde la positividad de los mismos, defervescencia (disminución o desaparición de la fiebre) a las 72 horas de comienzo del tratamiento antibiótico y que no haya evidencia de metástasis de la infección, sino posee lo anterior se debe tomar como una bacteriemia complicada (1).

En cuanto al tratamiento la evidencia no es muy concreta, pues están las guías para manejarla, pero no se sustentan de forma adecuada. En este orden de ideas primero, se debe clasificar al paciente en

bacteriemia complicada o no complicada, luego se debe identificar el foco causante de la enfermedad y después se selecciona el antibiótico de mejor elección. Es importante contar con que infectología haga seguimiento a los cultivos sanguíneos porque se ha demostrado que reduce la mortalidad. Los betalactámicos como la oxacilina son la mejor opción para tratar la bacteriemia causada por SASM, en cuanto a la duración de antibioticoterapia intravenosa para la forma no complicada es de al menos 2 semanas, para evitar una recaída, acompañada de dosis de aminoglucósidos pues ha demostrado un éxito del 77-94%, mientras que si es complicada el tratamiento se debe extender por lo menos por 4 a 6 semanas (1).

Los betalactámicos inhiben el ensamblaje de la pared celular bacteriana al unirse a proteínas de unión a la penicilina (PBP). Entonces estas enzimas se unen a la membrana impidiendo que catalizan la síntesis de peptidoglicano para formar la pared celular, el anillo betalactámico se une a las PBP y evita el ensamblaje de la pared celular, causando la muerte celular por autólisis e inestabilidad osmótica (1). Más adelante se propondrá una alternativa terapéutica para tratar la bacteriemia pues la resistencia a penicilinas y su esquema no es muy favorable para el paciente en la actualidad.

6.3 Factores de virulencia

Las infecciones por *S. aureus* van en aumento y cada vez es más difícil conseguir un tratamiento efectivo. La habilidad para colonizar y causar infección de *S. aureus* radica en la expresión de diferentes factores de virulencia acompañados de una enorme cantidad de toxinas (40). Las toxinas pueden provocar una respuesta débil en el huésped ya que degradan algunas de las células de él mismo, también pueden manipular las respuestas inmunes innatas y adaptativas y degradar las uniones intercelulares lo que facilita la proliferación de *S. aureus*, algunas toxinas se encuentran estrechamente correlacionadas con el tipo de enfermedad que producen (40).

Cabe resaltar que la matriz de sustancias poliméricas que rodea a *S. aureus* la protege de la fagocitosis, antibióticos, desinfectantes y otros componentes de la respuesta inmune innata y

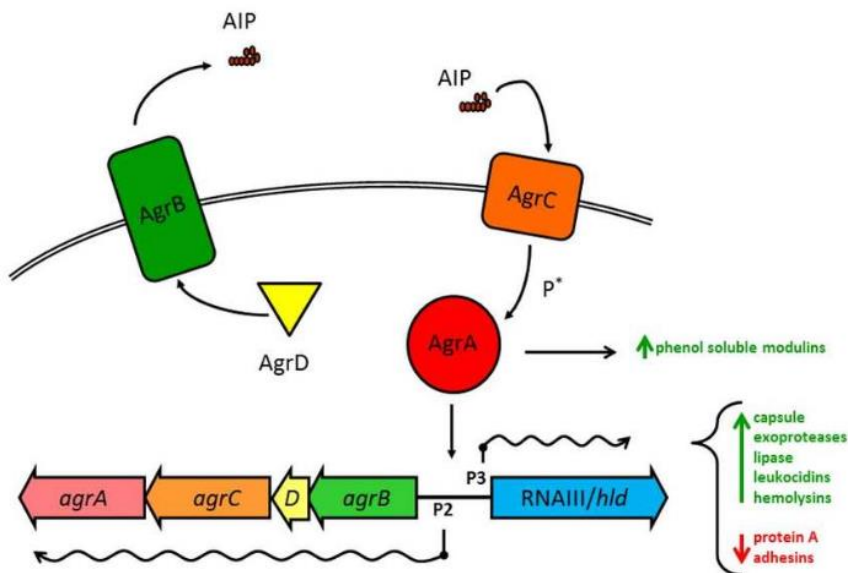
adaptativa, lo que le permite captar los nutrientes esenciales necesarios para sobrevivir y perpetuarse en el tiempo, como lo son el carbón y el nitrógeno (45).

6.4 Sistema Agr

Dentro de los sistemas genéticos de *S. aureus* que regulan gran número de genes de virulencia está el sistema *agr*. Este es un sistema de detección de quórum, encargado de sentir la densidad celular y de responder con adaptaciones genéticas mediante la comunicación célula-célula (48). Agr es considerado como el prototipo de *quorum sensing* regulador en las bacterias Gram positivas. Bajo condiciones de alta densidad celular, este gen accesorio es el encargado de incrementar la expresión de toxinas y de exoenzimas degradadoras, así mismo hace que disminuya la expresión de varios factores de colonización. Esto es importante porque regula el tiempo de expresión de los factores de virulencia durante la infección y el desarrollo de una enfermedad aguda, mientras que una baja actividad de *agr* está asociada con infecciones crónicas estafilocócicas(45,48).

agr está codificado por el locus regulador del gen accesorio regulador, este produce una molécula de comunicación llamada péptido autoinductor (AIP). Figura 1. Cuando el AIP alcanza concentraciones importantes es suficiente para activar una cascada reguladora que expresa factores de virulencia. Este sistema consta de dos transcripciones divergentes, RNAII y RNAIII, iniciadas a partir de dos promotores distintos, P2 y P3, respectivamente. El operón P2 contiene cuatro genes *agrB* *agrD* *agrC* y *agrA* y codifica la transcripción de RNAII, mientras que P3 impulsa la transcripción de la molécula efectora del locus *agr* RNAIII. Un aumento en la transcripción de P2 y P3 al parecer da lugar a un aumento de las concentraciones intracelulares de RNAIII, que a su vez, también parece aumentar la expresión de factores de virulencia secretados (49).

Figura 1. Estructura y función del operón *agr* en *S. aureus*,



Tomado de Gray y cols. (50).

La señal AIP se produce a partir del precursor de AgrD mediante la maduración y exportación de AgrB, a cierto umbral de concentración, AIP activa el sistema de dos componentes AgrC-AgrA y AgrA fosforilada activa la transcripción del promotor P2, lo que resulta en la regulación de retroalimentación automática (50).

Se ha demostrado en varios modelos animales que *agr* es un locus genético importante en el desarrollo de infecciones como endocarditis infecciosa e infecciones de la piel y tejidos blandos (51,52). Mientras que la baja regulación de *agr* se ha relacionado con una mejor formación de biopelículas y colonización bacteriana de dispositivos intravasculares (53).

6.4.1 Determinantes de virulencia controlados por *Agr*

Entre las toxinas más importantes reguladas por *agr* está la alfa-toxina (alfa-hemolisina, Hla), codificada por el locus *hla*. Esta toxina se encarga de formar poros beta-barril de 319 aminoácidos que se unen al receptor de desintegrina y metaloproteasa 10 (ADAM10) en la membrana de la célula huésped. Esta toxina se ha visto involucrada en varias infecciones humanas estafilocócicas. Los

mutantes *hla* isogénicos demostraron consistentemente una reducción de la gravedad de la patología en comparación con la cepa de tipo salvaje cuando se examinó en modelos animales con neumonía, infección de piel y tejidos blandos e infección endovascular. Por otro lado están las leucocidinas de dos componentes que son otra familia de toxinas encargadas de la formación de poros, estas son la leucocidina Pantón-Valentine (PVL), la hemolisina γ , LukDE y LukGH (LukAB) (45,51,54,55).

Actualmente se conoce que PVL tiene un papel más limitado en la patogénesis estafilocócica en SASM por ejemplo Bocchini y cols., (56) demostraron que el tener una cepa PVL positiva cuando se cursa con una osteomielitis, está asociada a mayor cantidad de días febriles, aumento en la tasa de sedimentación globular (VSG) y un nivel más alto de proteína C reactiva (PCR), también tenían más probabilidades de tener un cultivo de sangre positivo para *S. aureus* durante su admisión. Adicionalmente eran más propensos a tener miositis o piomiositis concomitantes (56), mientras que LukED otra leucocidina ha ganado protagonismo en el desarrollo patogénico de las enfermedades causadas por *S. aureus* ya que causa la lisis de las células fagocíticas al dirigirse al receptor de quimiocinas CCR5 en linfocitos, macrófagos y células dendríticas (57). LukGH (LukAB) es la única toxina de *S. aureus* además de los péptidos PSM α que contribuye a la lisis después de la fagocitosis (58).

Los PSM (modulinas solubles en fenol) son una familia de toxinas peptídicas, son las únicas que están bajo el control directo de AgrA, destacando un papel central en fisiología estafilocócica dado por su estilo de vida no infeccioso de los comensales estafilocócicos (54). Entre los PSM, los codificados en el locus *psma* de *S. aureus*, especialmente PSM α 3, son fuertemente proinflamatorios y líticos en células como los neutrófilos, macrófagos, osteoblastos y eritrocitos. Por eso, los péptidos PSM α tienen un fuerte impacto en los tipos agudos de infección por *S. aureus*, como infecciones de piel y tejidos blandos, sepsis y osteomielitis (26,59).

Por otro lado, existen muchas enzimas secretadas que están bajo la regulación de *agr*. Varias proteasas además de representar factores de virulencia por derecho propio, pueden dar forma a la composición del secretoma (conjunto de proteínas de un agente) del patógeno y, por lo tanto, sus propiedades patogénicas (51).

Entre las proteínas de superficie generalmente reguladas por *agr* está la proteína A (Spa) (51), esta proteína se ha implicado en modelos de infección, incluida la neumonía, artritis séptica e infección del torrente sanguíneo ya que desencadena mediadores proinflamatorios en el parénquima pulmonar a través de la activación del receptor TNF- α (TNFR1) y también tiene la capacidad de inactivar la respuesta inmune humoral del huésped tras la liberación del envoltura estafilocócica al unir el dominio Fc γ de IgG para bloquear la opsonofagocitosis mediada por el receptor Fc, y también al unirse al dominio Fab de IgM VH 3-clan y desencadenar apoptosis (46,51).

6.5 Toxinas específicas de *S. aureus*

A continuación, se describirán de forma más específica las toxinas que posee *S. aureus* y que están involucradas en la virulencia de este patógeno. Estas toxinas se pueden dividir en tres grupos, como se observa en la Tabla 1:

1. Toxinas formadoras de poros (PFTs) subdividida en cuatro tipos: Hemolisina- α (Hla o toxina α), Hemolisina- β , leucotoxinas y modulinas solubles en fenol (PSM)
2. Toxinas exfoliativas (ETs)
3. Superantígenos (SAgs)

Tabla 1. Exotoxinas producidas por *S. aureus*.

Exotoxinas	Genes	Funciones
α -Toxina	<i>hla</i>	Formadora de poros
PVL (LukSF-PV)	<i>lukS, lukF</i>	Formadora de poros
HlgAB	<i>hlgA, hlgB</i>	Formadora de poros
HlgCB	<i>hlgC, hlgB</i>	Formadora de poros

LukED	<i>lukE, lukD</i>	Formadora de poros
LukAB/HG	<i>lukA/H, lukB/G</i>	Formadora de poros
LukMF'	<i>lukM, lukF</i>	Formadora de poros
LukPQ	<i>lukP, lukQ</i>	Formadora de poros
PSM α 1 to PSM α 4	<i>psma1 to psma 4</i>	Modulina soluble en fenol
PSM β 1, PSM β 2	<i>psmβ1, psmβ2</i>	Modulina soluble en fenol
δ -Toxin	<i>hdl</i>	Modulina soluble en fenol
PSM-mec	<i>psm-mec</i>	Modulina soluble en fenol
ϵ -Toxina	<i>cytE</i>	Citotoxina
SpaA	<i>spa</i>	Células B superantígenos
β -Toxina	<i>hly</i>	Esfingomielasa, ligasa de biopelícula
Toxina exfoliativa A	<i>eta</i>	Serina proteasa
Toxina exfoliativa B	<i>etb</i>	Serina proteasa

Elaboración propia, fuente Tam y Torres 2019 (61)

6.5.1 Toxinas formadoras de poros

6.5.1.1 Hemolisina - α (*hla* o toxina α)

La hemolisina α la poseen el 95% de las cepas de *S. aureus*, esta toxina forma otras toxinas secretadas como monómeros solubles en agua, es importante recalcar que por sí sola no se considera tóxica, lo que la hace peligrosa es su capacidad de unión y de oligomerización en la membrana de la célula del huésped. Altera las vías de señalización porque interviene en la proliferación celular, la respuesta inflamatoria, la secreción de citocinas y las interacciones célula-célula. En las células epiteliales, que son objetivos clave de Hla, la E-cadherina es un sustrato principal para ADAM10. ADAM10, es un receptor celular para Hla, es una metaloproteasa dependiente de zinc expresada como una proteína transmembrana de tipo I en la superficie de la mayoría de las células huésped. La enzima que degrada la E-cadherina se activa después de que el enlace Hla compromete la función de barrera del tejido epitelial, lo que a su vez permite la invasión de *S. aureus* (40).

6.5.1.2 Hemolisina- β (*esfingomielinasa c*)

Esta hemolisina tiene gran capacidad de hemolizar los eritrocitos de ovejas, se propone que es por la alta cantidad de esfingomielina que poseen los eritrocitos, en el ser humano se ha encontrado asociada con infecciones crónicas de la piel humana siendo citotóxica para los queratinocitos humanos (40).

6.5.1.3 Leucotoxinas

Son toxinas encargadas de formar poros beta barril. Actualmente solo se han aislado cuatro tipos de leucotoxinas asociadas a infecciones en el humano, estas son similares a Hla: leucocidina de Pantón-Valentine (PVL), gamma (γ) -hemolisina (HlgA, HlgC, HlgB), Leucotoxina ED (LukE, LukD) y Leucotoxina AB / GH (LukAB / LukGH). Las cuatro últimas se conoce que lisan las células del linaje leucocitario y también matan a los neutrófilos, mientras que solo γ -hemolisina y LukED ha demostrado actividad lítica contra los glóbulos rojos (40).

- γ -hemolisina (HlgAB / HlgCB): γ -hemolisina, HlgAB, HlgCB o HlgACB son tres proteínas con diferentes combinaciones de subunidades. HlgAB es particularmente efectivo en la lisis de glóbulos rojos humanos y exhibe actividad citolítica hacia leucocitos humanos y de conejo. En contraste, HlgCB exhibe actividad limitada hacia los glóbulos rojos. El papel de HlgACB en la virulencia de *S. aureus* no se entiende bien. Se ha demostrado que HlgAB es necesario para la supervivencia y proliferación de *S. aureus* durante la infección del torrente sanguíneo, probablemente a través de la evasión de macrófagos y la liberación de nutrientes ferrosos de los eritrocitos (40).
- LukED: Posee actividad citotóxica contra las células sanguíneas de los conejos y los leucocitos, pero estudios posteriores muestran que esta toxina es la única capaz de matar a los fagocitos de ratones con alta efectividad (40).

- LukAB/GH: LukAB (también conocido como LukGH) es la toxina más reciente y no se conoce su mecanismo de acción aún. Los estudios in vitro informaron que LukAB/GH se dirige a monocitos, células dendríticas y leucocitos y puede cooperar con la leucocidina de Pantón-Valentine (PVL) cuando se coexpresan. Esta leucotoxina de dos componentes es la única que se sabe que mejora la supervivencia de *S. aureus*, ya que desempeña un papel en el escape de los fagocitos y neutrófilos. A diferencia de otras leucotoxinas, que se secretan como monómeros que se oligomerizan después de unirse a la superficie celular, LukAB / GH se heterodimerizara antes de unirse a su receptor de superficie celular (40).
- Pantón-Valentine (PVL): PVL está presente en un pequeño porcentaje, aproximadamente 5% en cepas clínicas de SASM, pero está fuertemente asociado con cepas de SARM adquiridas en la comunidad aproximadamente en un 85%, especialmente las que causan neumonía e infecciones de piel y tejidos blandos. La PVL es una citotoxina que afecta a los leucocitos y causa necrosis tisular y se ha asociado con forúnculos, abscesos cutáneos e infecciones cutáneas necróticas graves. Sin embargo, los genes *pvl* no se detectaron en cepas responsables de endocarditis, mediastinitis, neumonía adquirida en el hospital, infecciones del tracto urinario y enterocolitis, ni en el síndrome de shock tóxico (35). Muttaiyah y cols., (60) demostraron que la prevalencia de PVL en SASM fue de un 48% en infecciones de piel y tejidos blandos, 31% en enfermedad ósea y articular, 18% en neumonía, 2% en infección del sitio quirúrgico, 1% en infección relacionada con el catéter y 0% en bacteriemia primaria y endocarditis. Se realizó un análisis univariado para comparar las características de las infecciones por SASM positivas para PVL con las características de las infecciones por SASM negativas para PVL. La incidencia de infecciones por SASM positivas para PVL durante el período de estudio de 2 meses fue de 8.7 por 1,000 pacientes; alcanzó su punto máximo para aquellos individuos de entre 10 y 20 años, a 15.4 por 1,000 pacientes, y disminuyó constantemente a 0.77 por 1,000 pacientes para aquellos con edades entre 80 y 90 años ($r =$

–PVL durante el período de estudio de 2 meses fue de 8.7 por 1,000 pacientes; alcanzó su punto máximo para aquellos (62). Sin embargo, Hewagama y cols., (61) en 2016 demostraron que algunos clones de SASM como ST93 muestran positividad para PVL lo que podría ser un factor de riesgo para presentar bacteriemia luego de tener una infección de piel y tejidos blandos.

6.5.1.4 Modulinas solubles en fenol (PSM)

Las modulinas solubles en fenol (PSM) fueron descubiertas en un cultivo de *Staphylococcus epidermidis*. En ese estudio, se identificaron tres péptidos: PSM α , PSM β y PSM γ , y se describieron como un complejo proinflamatorio aislado por extracción con fenol caliente del filtrado del cultivo (40).

En *S. aureus*, las PSM están codificadas en tres ubicaciones diferentes en el genoma. Se cree que se unen a la membrana citoplasmática de una manera no específica, lo que a su vez puede conducir a la desintegración de la membrana. La tendencia de las PSM a agregarse en oligómeros, formando poros de vida corta y su capacidad para facilitar la propagación en superficies o estructurar biopelículas parece ser el aspecto principal de la patogénesis. Además la producción de PSM está altamente correlacionada con la capacidad de las especies de estafilococos para causar infecciones invasivas como la bacteriemia, debido a su capacidad para lisar los neutrófilos humanos y estimular las respuestas inflamatorias (40).

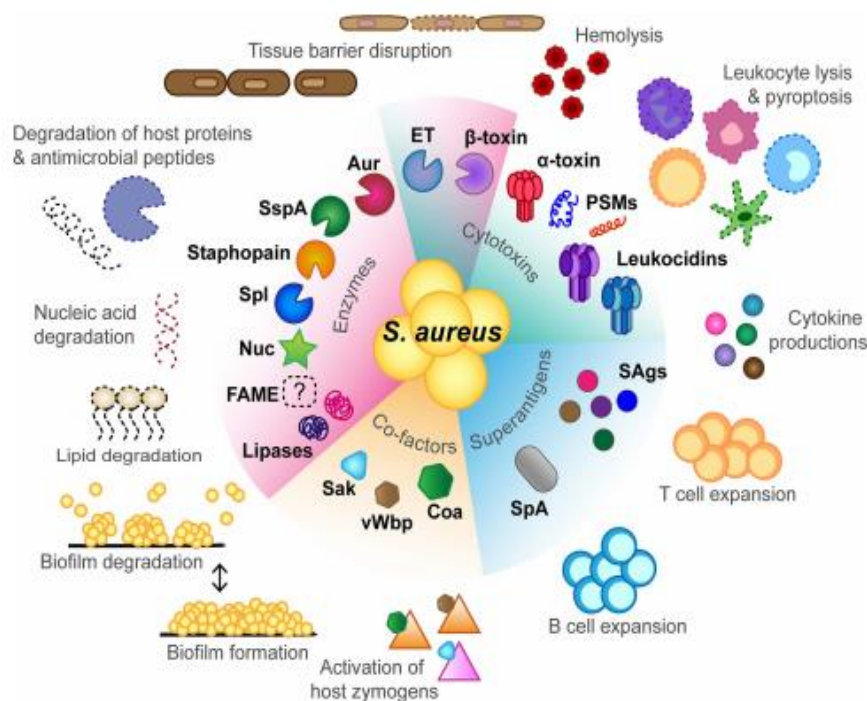
6.5.2 Toxinas exfoliativas (ETs)

Las toxinas exfoliativas (ETs), también conocidas como toxinas epidermolíticas, son serina proteasas extremadamente específicas secretadas por *S. aureus*. Estas proteasas reconocen e hidrolizan las cadherinas desmosómicas en las capas superficiales de la piel. Las ETs son exotoxinas asociadas con la escisión de las uniones de queratinocitos y la adhesión célula-célula en la epidermis del huésped, lo que puede inducir la descamación de la piel y la formación de ampollas (40).

6.5.3 Superantígenos (SAGs)

Los SAGs activan una gran fracción de linfocitos T simultáneamente al entrecruzar directamente ciertos dominios V β del receptor de células T con estructuras conservadas en el complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II). Las moléculas del MHC II parecen afectar la capacidad de los macrófagos para regular la respuesta de las células T a los SAGs. Los SAGs liberados actúan sistémicamente, provocando que una gran cantidad de células T produzcan cantidades masivas de citoquinas proinflamatorias (IL-2, IFN- γ y TNF), generando síntomas como fiebre alta, erupción cutánea, descamación, vómitos, diarrea, hipotensión, y con frecuencia pueden provocar insuficiencia orgánica múltiple. Después de esta tormenta de citoquinas, sigue la falta de respuesta de las células T donde las células T no proliferan o secretan IL-2, o pueden sufrir muerte celular. Esto sugiere que los SAGs son inmunógenos potentes, que provocan y neutralizan la respuesta de anticuerpos (40).

Figura 2. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*,



Tomada de Tam y Torres 2019 (62).

En la figura 2 se puede apreciar que *S. aureus* secreta grandes cantidades de toxinas y enzimas diferentes. Los superantígenos tienen propiedades mitogénicas, generando células T y B provocando deleción clonal y producción masiva de citoquinas. Las citotoxinas, como la toxina α y las leucocidinas causan hemólisis y muerte celular de los leucocitos a través de receptores específicos de superficie celular. Los péptidos PSM median la citolisis insertándose en la bicapa lipídica de las membranas celulares. Las enzimas, como la toxina β y las ETs, causan citotoxicidad en las células de mamíferos desarrollando inflamación e interrupción de la barrera tisular. Otras enzimas, como las proteasas y nucleasas, median la degradación de proteínas del huésped, evadiendo la defensa inmunológica del huésped. Las lipasas y FAME (fatty acid modifying enzyme) trabajan sinérgicamente para degradar los lípidos en el medio ambiente en busca de nutrientes. Los cofactores, incluidos Coa, vWbp (coagulasa, factor Von Willebrand) y Sak, estafiloquinas se unen y activan los zimógenos del huésped en el sistema de coagulación para mediar la formación y disolución del coágulo. En conjunto, estas toxinas y enzimas proporcionan nutrientes fundamentales como el hierro y el carbono, importantes para el crecimiento y la supervivencia de las bacterias (62).

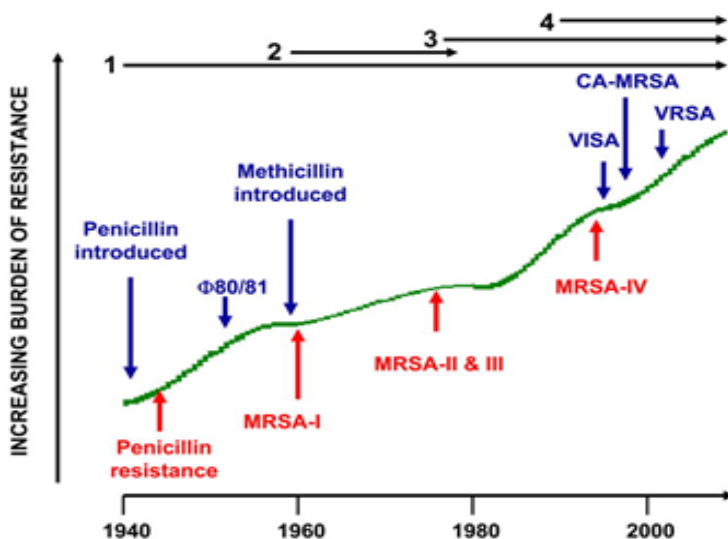
6.6 Resistencia antibiótica de *Staphylococcus aureus*

Antiguamente en el siglo XIX la mortalidad por bacteriemia causada por *S. aureus* era de alrededor 80%, esta disminuyó por la introducción de penicilina. Más tarde apareció la resistencia a la penicilina por la adquisición del plásmido que porta el gen *blaZ* que codifica para la betalactamasa o penicilinas estafilocócica, al final de la década de 1940 el 25-80% de las cepas ya presentaban resistencia a la penicilina (12,39). Aunque la meticilina y la oxacilina (betalactámicos resistentes a penicilinas) se desarrollaron para superar este problema de resistencia en la década de 1960, solo un año después de su introducción surgieron nuevamente cepas resistentes a estos antibióticos, denominadas como SARM, con la adquisición del gen *mecA*, gen que codifica para una proteína específicamente la PBP2a', otorgando resistencia a todos los antibióticos betalactámicos incluyendo penicilinas antiestafilocócicas, cefalosporinas y carbapenémicos. Este gen *mecA* está contenido en un elemento

genético móvil llamado el *cassete* cromosómico estafilocócico (SCC*mec*) (1,39,40). Posteriormente, entre las décadas de 1960 y 1980, las infecciones hospitalarias por SARM se hicieron más frecuentes y en la década de 1990 el porcentaje de infecciones relacionadas con SARM alcanzó un 29% (40).

En cuanto a SARM existen dos criterios *S. aureus* resistente a la meticilina asociado a la atención sanitaria (SARM-AH) y *S. aureus* resistente a la meticilina asociado a la comunidad (SARM-AC), difieren con respecto a su epidemiología clínica y molecular. En todo el mundo, la prevalencia de SARM-AH varía considerablemente, desde <1 % en Escandinavia hasta 40% en Japón, Israel y algunas partes de Europa (64). La prevalencia de SARM en Latinoamérica es muy heterogénea pues se ha reportado desde del 6% en América Central mientras que en América del Sur se ha documentado un 80% (3).

Figura 3. Línea de tiempo de las cuatro olas de resistencia antibiótica en *Staphylococcus aureus*



Tomada de Chamber y cols. (63)

En la figura 3 se observan las olas de resistencia a antibióticos en *S. aureus*. La primera ola comenzó después de la introducción de la penicilina en 1940. Estas cepas eran resistentes a la

penicilina. La segunda ola comenzó casi inmediatamente después de la introducción de meticilina, a esta cepa se le denominó SARM, contenía SCCmec tipo I (SARM-I) y se extendió hasta la década de 1970. La tercera ola comenzó a mediados y finales de la década de 1970 con la aparición de nuevas cepas de SARM, que contenían nuevos SCCmec, tipos II y III (SARM-II y III). El incremento en el uso de vancomicina para enfermedades por SARM condujo a la llegada de cepas de *S. aureus* intermedias de vancomicina (VISA). Finalmente, la cuarta ola, comenzó a mediados y finales de la década de 1990, con cepas SARM de la comunidad. Las cepas comunitarias de SARM (SARM-AC) más susceptibles a la mayoría de los antibióticos diferentes a betalactámicos, no estaban relacionadas con las cepas hospitalarias, contenían un SCCmec tipo IV (SARM-IV) más pequeño, con mayor movilidad y con una variedad de factores de virulencia, incluyendo PVL. Las cepas de *S. aureus* resistentes a la vancomicina (SARV), de las cuales aproximadamente 10 se han aislado exclusivamente en entornos de atención médica, se identificaron por primera vez en 2002 (63).

6.7 Tratamiento de la bacteriemia

La incidencia de bacteriemia por *S. aureus* según varios estudios multicéntricos realizados alrededor del mundo varía desde 20-50/100.000 personas por año y se estima que del 10-30% fallecen por esta infección (2). La bacteriemia causada por *Staphylococcus aureus* está asociada a una alta mortalidad y morbilidad, SARM es causante de un 40-90% de esta infección (29). En Colombia, se reportó una prevalencia del 78% de SARM causante de bacteriemia. Hincapie y cols., (32) en su estudio de cohorte prospectivo en la ciudad de Medellín, demuestran que la mortalidad es más alta en SARM adquirido en la comunidad con un 40.2%, con necesidad de UCI posterior al hemocultivo con un 36.6%. Más del 50% de las cepas estudiadas fueron asociadas al cuidado de la salud siendo SARM el más patógeno y prevalente, aislado en un 73.8% del total de las muestras (32).

La mortalidad de bacteriemia a pesar de un tratamiento óptimo puede ser de 15-50% (1). Es importante conocer la epidemiología de cada región geográfica. Los principios fundamentales para

tratar la bacteriemia son: detectar el sitio de infección primario, la extracción de un cuerpo extraño infectado, si está presente, el drenaje o la evacuación de una fuente de infección que no se puede esterilizar solo con terapia antimicrobiana, documentación de que la sangre se ha vuelto estéril, y terapia para la bacteriemia con un fármaco antibacteriano eficaz (64).

Para la bacteriemia por SASM el tratamiento de primera línea son las penicilinas antiestafilocócicas como la oxacilina y nafcilina, entre las alternativas están las cefalosporinas de primera generación (34,65) que estudios recientes retrospectivos de cohorte han demostrado que no hay diferencia estadísticamente significativa entre la mortalidad comparando cefazolina y nafcilina, sin embargo, las penicilinas antiestafilocócicas se encuentran en desventaja por la cantidad de efectos adversos que producen como la nefritis intersticial y la injuria aguda renal, es decir la cefazolina es más segura en comparación con la nafcilina (4). Adicionalmente por su esquema de dosificación frecuente se tiende a cambiar a una opción más segura y adherente para el paciente como lo es la cefazolina (7).

6.8 *Cefazolina*

La cefazolina es una cefalosporina de primera generación perteneciente al grupo de los antibióticos betalactámicos. Su mecanismo de acción es inhibir la síntesis de la pared bacteriana al unirse a una o más de las proteínas de unión a la penicilina (PBP) que a su vez inhibe el paso final de transpeptidación de la síntesis de peptidoglicano en las paredes celulares bacterianas (66). En cuanto a su farmacocinética y farmacodinamia, cuenta con una vida media de ocho horas por lo que se administra usualmente cada ocho horas, lo que sería más conveniente para un paciente que se está tratando de forma ambulatoria (7,66). Se distribuye ampliamente en la mayoría de los tejidos y fluidos corporales, incluyendo vesícula biliar, hígado, riñones, huesos, esputo, bilis, líquido pleural y líquido sinovial, sin embargo, la penetración en el líquido cefalorraquídeo (LCR) es pobre. Cuenta con una unión a proteínas del 80%, alcanza su concentración máxima sérica (C_{MAX}) cuando se aplica de

forma intramuscular de 0.5 a 2 horas mientras que si se administra de forma intravenosa dentro de 5 minutos y se elimina de forma renal. En la literatura no se registran efectos adversos frecuentes relacionados con el uso de este antibiótico, no obstante se debe ajustar la dosis en personas que posean función renal disminuida (67).

El uso de la cefazolina se popularizó ya que no había disponibilidad comercial de las isoxazolilpenicilinas (penicilina del grupo de los betalactámicos resistente a las penicilinasas) en algunos países para el tratamiento de las infecciones severas producidas por SASM (33), adicionalmente estas presentan un esquema de dosificación más favorable para el paciente, pues la disponibilidad de sistemas ambulatorios eficientes para la administración intravenosa de medicamentos como las isoxazolilpenicilinas es limitada en algunos países de América Latina como Argentina, también es más costo efectiva que los otros antibióticos (7,27).

Por otro lado, Lee y cols., demostraron que la cefazolina es mejor tolerada por los pacientes y que tiene efectos similares a la nafcilina en la terapéutica de la bacteriemia (68). En estudios retrospectivos compararon la cefazolina con la vancomicina, y descubrieron que la cefazolina está relacionada con una menor tasa de mortalidad, de igual forma otros estudios confirman que la tolerancia es mucho mejor para la cefazolina que para la vancomicina (69). También, se ha evidenciado que la cefazolina no altera la microbiota gastrointestinal (34).

Sin embargo, se ha observado falla terapéutica en el tratamiento de enfermedades severas con cefazolina, los primeros en reportarlo fueron Quinn y cols.,(6) pues encontraron que la CIM de cefazolina aumentó 10 veces más cuando se probó a alto inóculo bacteriano (10^7 UFC/ml)) en un aislamiento de SASM recuperado de un paciente al que no le funcionó la antibioticoterapia de cefazolina para la endocarditis infecciosa (6). Posteriormente, se reportaron más fracasos terapéuticos de cefazolina y recaídas en el tratamiento de cepas SASM que demuestran la existencia del efecto inóculo a cefazolina (28). La actividad de la cefazolina puede verse comprometida en al menos un

tercio de los pacientes que presentan bacteriemia por SASM por ejemplo en Ecuador o Colombia en donde el porcentaje de efecto inóculo a cefazolina varía de un 45-63% respectivamente (7).

Algunas de las ventajas de la cefazolina es que contiene menor cantidad de sodio, requiere menos volumen para diluirse y está disponible para ser usado como inyección rápida en bolo, mientras que las penicilinas estafilocócicas requieren administración en infusión lenta por el riesgo de extravasación, el esquema de dosificación es más adherente para la cefazolina porque requiere menos dosis al día, idealmente cada 8 horas por el contrario las penicilinas antiestafilocócicas cada 4-6 horas, además la cefazolina es más económica por lo que de forma directa estaría contribuyendo en las metas de costo efectividad de un sistema de salud (4,70).

En un metanálisis realizado en 2017 que incluían estudios multicéntricos y monocéntricos de Estados Unidos y Corea del Sur en donde comparan los diferentes beneficios o efectos adversos de la cefazolina contra las penicilinas antiestafilocócicas, demostraron la superioridad de la cefazolina. En este estudio se contó con pacientes con infecciones sanguíneas por SASM, con una edad promedio entre 49 a 65 años. Se tuvo en cuenta la nefrotoxicidad como la elevación de la creatinina sérica mayor o igual que 0.5 mg/dl o un aumento de la filtración glomerular mayor o igual al 50% y la hepatotoxicidad como el incremento de la aspartato aminotransferasa (AST) o de la alanina aminotransferasa (ALT) mayor de 3 del límite superior normal. Los resultados arrojan que ningún paciente tuvo nefrotoxicidad o nefritis intersticial aguda con el uso de cefazolina comparado con 12 pacientes de 136 que utilizaron las penicilinas antiestafilocócicas correspondiente a un 8.82%. Por otro lado, la hepatotoxicidad solo fue de un 0.78% en pacientes que recibieron cefazolina, mientras que los que recibieron oxacilina o nafcilina fue de un 7.6%. En cuanto a la discontinuación del medicamento por sus efectos adversos solo un 1.49% de pacientes que usó cefazolina abandonó el tratamiento a comparación de un 11.19% del grupo de las penicilinas antiestafilocócicas. Para la neutropenia y trombocitopenia no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los

dos grupos. Reacciones de hipersensibilidad fueron mayores en el grupo que usó penicilinas antiestafilocócica y finalmente diarrea o infecciones por *Clostridium difficile* (*C. difficile*) no fueron estadísticamente significativas entre los dos medicamentos (70).

McDanel y cols., (70) demostraron que pacientes con infecciones complicadas por bacteriemia tienen un 37% menos de riesgo de mortalidad a los 30 días y un 90% menos de riesgo de mortalidad a los 80 días si son tratados con cefazolina en vez de nafcilina u oxacilina, probablemente por la tasa de abandono del medicamento debido a efectos adversos de este grupo de penicilinas antiestafilocócicas (70).

En las infecciones donde existe un alto inóculo bacteriano como lo son la bacteriemia o la osteomielitis, la cefazolina se ve sometida ante el denominado efecto inóculo a cefazolina donde las betalactamasas específicamente las tipo A y C, degradan el antibiótico, inhabilitándolo por completo y generando falla terapéutica pues disminuyen la concentración del antibiótico en el sitio específico de la infección (7).

6.9 Efecto inóculo a cefazolina

El efecto inóculo a cefazolina se define como un aumento significativo en la CIM a cefazolina cuando el inóculo se incrementa a 10^7 (UFC/ml) comparado con la CIM obtenida con el inóculo bacteriano estándar de 10^5 UFC/MI (7,22,71). Este fenotipo se observa in vitro al realizar la prueba de susceptibilidad, pero tiene implicaciones clínicas relevantes.

Su importancia clínica radica en que en múltiples estudios se ha encontrado falla terapéutica cuando la cefazolina es usada en infecciones profundas que cursan con un alto inóculo bacteriano por ejemplo en la bacteriemia, neumonía adquirida en el hospital, abscesos sin drenar, infecciones de la piel y tejidos blandos (5,6,22,29,68,72).

El efecto inóculo a la cefazolina ha sido un fenotipo poco estudiado sin embargo actualmente es discutible si es clínicamente significativo. Es importante mencionar que se ha descrito en diferentes especies como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus* se ha demostrado efecto inóculo a betalactámicos *in vitro*, que es más frecuente mientras que en los carbapenémicos no lo es. La presencia de enzimas betalactamasas se postula es el principal mecanismo responsable, pero la observación de un efecto de inóculo en múltiples patógenos que carecen de enzimas betalactamasas indica que probablemente existen múltiples mecanismos que pueden resultar en un efecto de inóculo (70).

En la literatura se identificaron 16 estudios que evaluaron el efecto inóculo *in vitro* al realizar las pruebas de sensibilidad a cefazolina con inóculos bacterianos alto (7,22,27,31,69,70,73–80), realizados en Estados Unidos, Latinoamérica y Asia (Corea y Japón). Con base en los artículos analizados se puede decir que la prevalencia general del efecto inóculo a cefazolina varía entre un 13%-58% (7,8,29,77).

También en un estudio realizado por Zygmunt y cols.,(81) demostraron que la betalactamasa (BlaZ) tipo A tenía mayor afinidad a la cefazolina, mientras que BlaZ tipo C a la cefalotina. Seis estudios identificaron cepas de SASM que presentan la betalactamasa de tipo A son más propensos a mostrar efecto inóculo a cefazolina durante las pruebas de susceptibilidad (7,22,29,31,72,82), mientras que ocho estudios han reportado BlaZ tipo C asociada a efecto inóculo (8,22,29,30,79,82–84). Por otra parte, estudios latinoamericanos reportaron prevalencias de la betalactamasa tipo A de 33-66% y tipo C de 31%-37% con relación a este fenotipo (7,8). En conjunto, los resultados de las investigaciones *in vitro* sugieren que la probabilidad de que la cefazolina muestre efecto inóculo durante las pruebas de susceptibilidad se basa en la producción de betalactamasas específicas que variarán en su capacidad para hidrolizar la cefazolina, principalmente la betalactamasa tipo A y C (73).

En cuanto a los estudios de efecto inóculo a cefazolina en modelos animales, cuatro estudios evaluaron el fenotipo utilizando un modelo animal *in vivo*. Singh y cols., (75) usaron un modelo murino en ratas de endocarditis infecciosa para demostrar que la nafcilina y la ceftarolina lograron una destrucción significativamente mejor contra una cepa de SASM que expresaba una betalactamasa de tipo A en comparación con la cefazolina. Sin embargo, cuando se interrumpió la producción de betalactamasa, la cefazolina y la ceftarolina lograron reducciones bacterianas similares (75).

Por otro lado, Nannini y cols., (85) en un modelo de endocarditis infecciosa en ratas encontraron que la nafcilina y la daptomicina producen reducciones superiores en las vegetaciones de aislamientos de SASM en comparación con la cefazolina cuando SASM produce betalactamasa del tipo A, lo que permitía a la cefazolina matar una mayor cantidad de SASM cuando se inactivaba la betalactamasa tipo A. Sin embargo, Fields y cols., (86) observaron un aumento más modesto en la CIM (1g/ml para inóculo estándar a 32 g/ml para alto inóculo) en modelos de abscesos de conejo inoculados con una cepa de *S. aureus* portadora de la betalactamasa tipo A, pero con una eliminación exitosa de la infección.

Actualmente existe escasez de ensayos clínicos que evalúan la importancia del efecto inóculo a cefazolina. Por ejemplo Chong y cols., (29) en su estudio retrospectivo analizaron aislamientos de SASM de bacteriemia y concluyeron que la presencia de un efecto inóculo a cefazolina no se asoció con peores resultados clínicos.

Miller y cols., en su modelo de endocarditis infecciosas en ratas observaron que al adicionar ácido clavulánico a la cefazolina, se contribuía a la destrucción eficaz *in vivo* de los aislamientos de SASM productores de betalactamasa tipo A (33).

Por su parte Lee y cols.,(79) en un estudio de cohorte retrospectivo de pacientes con bacteriemia por SASM revelaron que el efecto inóculo a cefazolina *in vitro* se asoció con una bacteriemia

persistente ($P=0.004$) pero no influía de forma significativa en la probabilidad de que hubiera fracaso en el tratamiento ($P=0.13$). Nannini y cols., (22) en un estudio de 2009 de pacientes hemodializados con bacteriemia por SASM mostraron que el efecto inóculo a cefazolina *in vitro* podría estar asociado con el fracaso del tratamiento, no obstante, el estudio estuvo limitado por la comparación de solo seis fracasos y seis curas clínicas.

Song y cols., (82) evaluaron 300 casos de bacteriemia por SASM para identificar qué posibles factores de riesgo y características clínicas de pacientes infectados por SASM que mostraban efecto inóculo a cefazolina podrían tener y se evidencio que la resistencia a la clindamicina y la resistencia a la eritromicina pueden usarse como marcadores del efecto inóculo a cefazolina *in vitro* con altas especificidades (92,9% y 90,9%, respectivamente) y valores predictivos negativos (82,3% y 84,6%, respectivamente).

En otro estudio de cohorte observacional prospectivo se comparó el uso de nafcilina con cefazolina para el tratamiento de SASM, demostrando que el fracaso del tratamiento fue más alto en el grupo de nafcilina ($P = 0.015$) ya que discontinuaron con mayor frecuencia el fármaco por sus múltiples efectos adversos (79). Mientras que los pacientes que utilizaron la cefazolina no discontinuaron el tratamiento por su esquema más adherente, pero si mostraban efecto inóculo *in vitro* contaban con mayores probabilidades de experimentar falla terapéutica ($P=0.049$) y mayor mortalidad al mes ($P=0.047$) en comparación con los pacientes infectados por SASM que no mostraban este fenotipo *in vitro*.

Otra investigación prospectiva en Estados Unidos (33) en la que se evaluaron 77 pacientes que recibieron cefazolina o cefalotina para la bacteriemia por SASM, encontraron que los aislamientos por SASM que demostraban efecto inóculo a cefazolina *in vitro* se asociaron de forma significativa con mortalidad por todas las causas a los 30 días en un análisis multivariado.

En Latinoamérica la prevalencia general de efecto inóculo a cefazolina fue del 36% en 2013 (7), en este estudio se incluyó aislamientos de SASM de infecciones como la osteomielitis y la bacteriemia, recuperados de varios hospitales de Ecuador, Colombia, Venezuela y Perú. El 50% de las cepas recogidas en osteomielitis exhibieron este fenómeno, mientras que el 33% fue observado en bacteriemia. Para Colombia el 63% de las cepas recuperadas de osteomielitis mostraron este fenotipo mientras que para bacteriemia fue del 31%. Ecuador mostró la prevalencia más alta de efecto inóculo con un 45% (7).

En este estudio Rincón y cols., (7) demostraron que las betalactamasas más relacionadas con el efecto inóculo a cefazolina fueron la tipo A en un 66% de los aislamientos de SASM y la tipo C en un 31%, mientras que la tipo D solo se encontró en el 3%, de las cepas en Colombia y Ecuador (7). Es importante mencionar que en este mismo estudio la betalactamasa tipo A fue la más presente en la bacteriemia con un 67% y en la osteomielitis con un 63%, seguida por el tipo C (28.5% y 37.5% de los aislamientos, respectivamente). Los aislamientos de SASM con betalactamasa tipo A tuvieron valores de CIM más altos con alto inóculo que aquellos que portaban betalactamasa tipo C (7).

Mientras que, algunos estudios norteamericanos reportan prevalencias de efecto inóculo a cefazolina del 19-27% y las betalactamasas más relacionadas con este fenotipo fueron las tipo A y C (22,30) por el contrario en Corea del Sur se reportan prevalencias del 13-22% y las betalactamasas más relacionadas a este fenómeno fueron también las tipo C, B y A (29,82) en un 43-53%, 20-26% y 13-17% respectivamente. En la Tabla 2 se puede observar que los países con mayores prevalencias de efecto inóculo a cefazolina han sido Argentina y Colombia (8).

Tabla 2. Distribución de la frecuencia de efecto inóculo a cefazolina en SASM recuperado de infecciones sanguíneas en hospitales de Latinoamérica

País	No. de aislamientos de SASM	Frecuencia de EIC	
		No. de aislamientos (%) con EIC	No. de aislamientos (sin EIC)
Argentina	89	48 (54)	41 (46)
Colombia	196	78 (40)	118 (60)
Ecuador	72	30 (42)	42 (58)
Chile	88	28 (32)	60 (68)
Perú	69	26 (38)	43 (62)
Brasil	77	25 (32)	52 (68)
Guatemala	63	28 (44)	35 (56)
México	11	4 (36)	7 (64)
Venezuela	25	11 (44)	14 (56)
Total	690	278 (40)	412 (60)

Tomado de Carvajal y cols., 2020 (8)

En la evidencia más reciente encontrada en la literatura, Carvajal y cols., (8) en su estudio de 690 aislamientos de SASM de sangre de Latinoamérica (región donde la prevalencia a efecto inóculo es muy alta (7,72)) se encontró que el efecto inóculo a cefazolina en general fue de un 40%. Ellos encontraron que la betalactamasa tipo C tuvo una prevalencia de 37% seguida del tipo A con un 33% pero la más asociada a efecto inóculo a cefazolina fue la tipo A con un 78% luego la tipo C con un 50%. (8) Además, en este estudio reclasificaron las betalactamasas teniendo en cuenta toda la secuencia genómica de desde el péptido señal. Un solo alotipo, BlaZ-2 (del BlaZ tipo A), mostró una asociación importante y estadísticamente significativa con el efecto inóculo a cefazolina. Otros dos alotipos (BlaZ-3 y BlaZ-5) se asociaron con la falta de este fenotipo. También detectaron que tres sustituciones de aminoácidos (A9V, E112A 68 y G145E) en BlaZ mostraron una asociación estadísticamente significativa con el efecto inóculo a cefazolina. Así mismo encontraron que ST30 fue el linaje genético de *S. aureus* que presentó más relación con el efecto inóculo a cefazolina (8).

6.10 Agr en el contexto de efecto inóculo a cefazolina

Dentro de los sistemas genéticos de *S. aureus* que regulan gran número de genes de virulencia está el sistema *agr*. Este es un sistema de detección de quórum, encargado de sentir la densidad celular y de responder con adaptaciones genéticas mediante comunicación célula-célula (48).

Se ha demostrado en varios modelos animales que *agr* es un agente importante en el desarrollo de infecciones como endocarditis infecciosa e infección de la piel y tejidos blandos. Mientras que la baja regulación de *agr* se ha relacionado con una mejor formación de biopelículas y colonización bacteriana de dispositivos intravasculares (51–53). Cuatro tipos de Agr tipo I, II, III, y IV se han descrito y se ha relacionado la disfunción del tipo I y III con el EIC y la producción de betalactamasa tipo A (8).

Agr se encarga en SASM de regular la densidad de los determinantes de la virulencia de este microorganismo, pues expresa de forma positiva las hidrolasas de muchas mureinas precediendo a la autólisis celular (87). Por ende, se postula que si este operón tiene algún defecto podría estar involucrado en el desarrollo de una cepa deficiente para autólisis en poblaciones bacterianas altas. Otros estudios revelan que un *agr* disfuncional podría estar asociado con la atenuación de la actividad bactericida de la vancomicina así como las cepas de *S. aureus* resistentes a vancomicina (88). Un estudio realizado en el 2011 por Schweizer y cols., (69) demostró que la disfuncionalidad de *agr* se asociaba con una mayor mortalidad en pacientes que recibían terapia con vancomicina.

Wi y cols., (31) describieron el efecto inóculo a cefazolina y la relación con la disfunción de *agr* en aislamientos sanguíneos de SASM. El EIC fue significativamente más común en los aislamientos con *agr* disfuncional y se observó solo en los aislamientos de los tipos I y III de Agr. Este fue el primer estudio en demostrar lo anterior en aislamientos de SASM. También mostraron en su estudio que el grupo de Agr más prevalente fue el tipo I (66,4%) y que el 13,0% de todos los aislamientos de SASM presentaron disfunción de *agr*. Aunque un estudio reciente estudio el aumento de la mortalidad

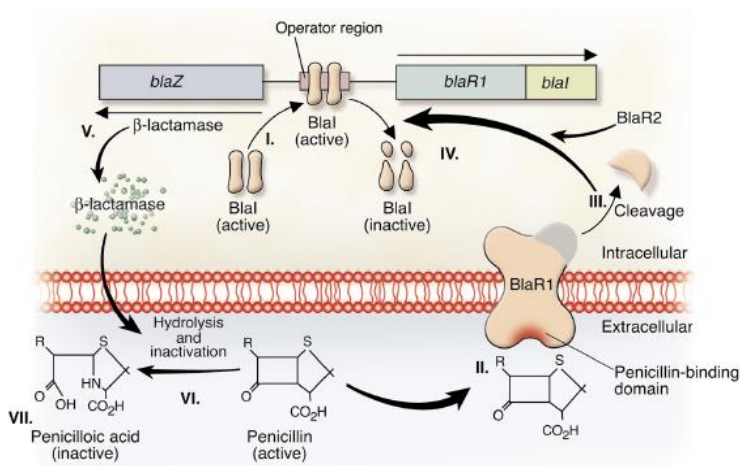
asociada con la disfunción de *agr* entre los episodios bacteriémicos de *S. aureus* (69), los estudios que se centraron en la bacteriemia por SASM mostraron que no hubo diferencias estadísticamente significativas en las tasas de mortalidad dentro de los 30 días entre los grupos que codifican un *agr* funcional y disfuncional (29,89).

Lee y cols., (90) es su estudio publicado en 2019 en Corea encontraron que el Agr tipo III se asoció significativamente con el efecto inóculo a cefazolina. Además, la asociación entre el tipo de Agr y EIC fue más evidente en los aislamientos de SASM positivos para el gen *blaZ* tipo A. Además, encontraron que casi todos los aislamientos de SASM con genotipo Agr tipo III y BlaZ tipo A exhibieron EIC. Por lo tanto, existe la posibilidad de que Agr tipo III pueda ser un indicador útil para discriminar la positividad de EIC entre los aislamientos de SASM de tipo A *blaZ* positivos (8,31,90).

6.11 *Betalactamasas*

La producción de betalactamasas es uno de los principales mecanismos de resistencia bacteriana. Las betalactamasas son enzimas capaces de inactivar los antibióticos de la familia de antibióticos betalactámicos (91) en la actualidad casi el 90% de *S. aureus* tiene el gen *blaZ* y producen la betalactamasa (12). Estas enzimas hidrolizan el anillo betalactámico responsable de la actividad antibacteriana, por lo que eliminan su función. En condiciones normales el gen *blaZ* está bajo el control de dos genes reguladores, el antirrepresor *BlaR1* y el represor *BlaI* (Figura 4). En presencia del antibiótico betalactámico se activa la vía de señalización responsable de la síntesis de BlaZ que requiere la escisión secuencial de las proteínas reguladoras BlaR1 y BlaI. Entonces, después de la exposición a betalactámicos BlaR se escinde, y se plantea la hipótesis de que la proteína escindida funciona como una proteasa que corta el represor BlaI, directa o indirectamente (se dice que BlaR2 es una proteína adicional que puede estar involucrada en esta vía) y permitir que el gen *blaZ* sintetice la enzima (12).

Figura 4 Inducción de la síntesis de betalactamasas estafilocócicas (BlaZ) en presencia del antibiótico betalactámico penicilina



Tomada de Lowy y cols.,(12)

Existen 4 tipos de betalactamasas de *S. aureus* BlaZ tipo A, B, C, y D (92,93). Cada betalactamasa tiene afinidad por un sustrato específico esto se pudo determinar en el estudio de Zygmunt y cols., (81) en donde se realizaron determinaciones cinéticas teniendo en cuenta las velocidades iniciales de hidrólisis de los antibióticos controlando las longitudes de onda que correspondían al cambio máximo de absorbancia entre el sustrato no hidrolizado y el producto hidrolizado y que incluían lo siguiente: cefaloridina, cefazolina, cefamandol, nitrocefina, cefapirina, cefalotina, cefuroxima, ampicilina y penicilina G, de esta forma se determinaron los sustratos a los que eran a fines cada betalactamasa.

Se lograron clasificar las betalactamasas por análisis de la secuencia del BlaZ encontrando diferencias en los aminoácidos 128 y 216. Según Voladri y cols. (93). En la actualidad se clasifican las betalactamasas por el análisis de la secuencia de una región de 355pb dentro del *blaZ*, por ejemplo para la betalactamasa tipo A la treonina se encuentra en la posición 128 y la serina en la 216, los genes *blaZ* tipo B tienen una lisina en la posición 128 y un asparagina en la posición 216, los genes

blaZ tipo C tienen una treonina en la posición 128 y asparagina en la posición 216, y el tipo *blaZ D* tienen una alanina en la posición 128 y serina en la posición 216 (7,22,27).

Como ya se mencionó previamente en la parte de efecto inóculo, la mayoría de aislamientos de SASM con efecto inóculo a cefazolina que se han reportado se han asociado a los tipos de Betalactamasa A y C. (7,8,22,29–31,72,79,82–84)

6.11.1 Alotipos de betalactamasas

Existe otra forma de clasificar las betalactamasas usando toda la secuencia genómica de *blaZ*, esta nueva categoría surge por un estudio reportado en 2020 por Carvajal y cols.,(8) en aislamientos de SASM recolectados de bacteriemias en Latinoamérica, en la que realizaron este estudio con base en la relación de BlaZ y efecto inóculo a Cefazolina. En este estudio a partir de 641 aislamientos de SASM, 517 (81%) portaban el gen *blaZ*. El tipo BlaZ C fue la betalactamasa más predominante (37%), seguido de los tipos A y B (33% y 29%, respectivamente) mientras que el tipo D BlaZ fue encontrada solo en 5 cepas de SASM (8). Inicialmente se tuvo en cuenta la secuencia de aminoácidos de las betalactamasas que se predice de la secuencia de nucleótidos traducido a proteínas comenzando por el péptido señal (que son los primeros aminoácidos) hecho que no se había tenido en cuenta en ningún estudio anterior reportado en la literatura, es decir se analizó toda la secuencia, posteriormente se realizó un alineamiento con las secuencias de los aminoácidos para compararlos y determinar el nivel de similitud que poseían las secuencias entre sí. Los autores del estudio definieron como alotipos las secuencias únicas de la secuencia de aminoácidos de BlaZ encontrados en los genomas de *S. aureus*. De los 29 alotipos reportados en este estudio, algunos fueron relacionados con la presencia de efecto inóculo (8).

El alotipo BlaZ-1 pertenecía al grupo tradicional de BlaZ tipo C, en donde 81 cepas poseían este fenotipo, mientras que 82 cepas no lo presentaban, por ende, el pertenecer al alotipo BlaZ1 no se observó totalmente relacionado con el efecto inóculo a cefazolina. Mientras que el alotipo BlaZ-2 que

pertenecía a la clasificación tradicional de las betalactamasas tipo A, agrupo 96 cepas que tuvieron relación con el efecto inóculo a cefazolina y 4 cepas que no lo presentaron, sugiriendo una asociación significativa con el fenotipo. De esta manera los alotipos más frecuentes en el estudio correspondieron a BlaZ-1 y BlaZ-2 que mostraron aproximadamente 50% y 96% de correlación con el efecto inóculo a cefazolina, respectivamente (8).

En cuanto a sustituciones de aminoácidos se reportaron tres: alanina por valina en la posición nueve, ácido glutámico en la posición 112 por alanina, y la sustitución de glicina en la posición 145 por el ácido glutámico (A9V, E112A y G145E) que tuvieron una asociación estadísticamente significativa individual con el efecto inóculo a cefazolina ($P = <0.01$). La presencia de un residuo de lisina en la posición 119 de BlaZ, no se correlacionó con el efecto inóculo a cefazolina esta sustitución fue encontrada en ese estudio en 135 aislamientos que carecían de este fenotipo en comparación con 15 aislamientos que presentaban el EIC (8).

7. Materiales y métodos

7.1 Tipo Estudio: Estudio de caso descriptivo con datos retrospectivos de un estudio anterior.

Este estudio hace parte de un estudio financiado por Minciencias llamado “Caracterización del efecto inóculo a Cefazolina en *Staphylococcus aureus* susceptibles a Meticilina (MSSA) causantes de infecciones: Implementación de una prueba de detección rápida - Rapid IE - MSSA” Contrato 779-2018. Código 130880764150 de la Unidad de Genética y Resistencia Antimicrobiana UGRA.

7.2 Población:

La selección de los aislamientos del estudio se realizó por conveniencia a partir de la base de datos del estudio de cohorte observacional prospectivo de bacteriemias en Latinoamérica realizado por Arias y cols., (72) entre Enero de 2011 a Enero de 2014. En ese estudio se incluyeron 1185 aislamientos bacterianos recuperados de 1010 pacientes de 24 hospitales de Latinoamérica que incluyó Argentina (tres hospitales de Buenos Aires), Brasil (tres hospitales de Sao Paulo y Porto Alegre), Chile (tres hospitales en Santiago y concepción), Colombia (tres hospitales en Bogotá), Ecuador (tres hospitales en Quito), Guatemala (dos hospitales en la ciudad de Guatemala), México (un hospital en Guadalajara), Perú (tres hospitales en Lima) y Venezuela (tres hospitales en Caracas). En cuanto a los criterios de inclusión de los aislamientos: se escogieron pacientes mayores de 18 años, que hayan tenido un episodio de bacteriemia por *S. aureus* y los criterios de exclusión fueron bacteriemia polimicrobiana, bacteriemia recidivante (resolución de las características clínicas durante el tratamiento y recurrencia con aislamiento fenotípicamente similar al episodio original), un episodio anterior durante la hospitalización actual se consideró como una recaída, pacientes transferidos de otra institución con el fin de excluir pacientes que puedan haber adquirido la bacteriemia en otro hospital y retirada del estudio en las primeras 48 horas (72).

7.2.1 Muestra:

Estudio de caso de un paciente de una institución hospitalaria de Colombia, que fue seleccionado a partir de la base de datos del estudio realizado por Arias y cols. (72). Este caso se seleccionó por conveniencia de tres aislamientos bacterianos de *S. aureus* recuperados de bacteriemia del paciente.

No se realizó un muestreo probabilístico y la selección de aislamientos fue por conveniencia: se seleccionaron aislamientos de SASM de bacteriemia que provenían de un mismo paciente, de un hospital de Colombia, los aislamientos presentaron diferencias en cuanto al fenotipo de efecto inóculo a cefazolina pues dos aislamientos si poseían este fenómeno y uno no lo presentó.

7.3 Variables

Las variables incluidas en el estudio correspondieron a:

7.3.1 Concentración mínima inhibitoria (CIM) a cefazolina: se define como la mínima concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento visible del microorganismo en la prueba de susceptibilidad *in vitro* después de incubación durante toda la noche (43). Esta se definió de acuerdo al resultado de la prueba de susceptibilidad en micro dilución en caldo. Así el efecto inóculo a cefazolina corresponde a una CIM susceptible de acuerdo al punto de corte del Clinical Laboratory Institute (CLSI) 2012 (8) de $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ al evaluar el inóculo estándar 10^5UFC/ml y una CIM a cefazolina resistente $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ al evaluar un inóculo bacteriano alto de 10^7UFC/ml (7,22).

7.3.2 Características genéticas:

- Factores de Virulencia

Se emplearon los genomas ensamblados para la búsqueda de determinantes genéticos relevantes de *Staphylococcus aureus* como tipos de Agr, factores de virulencia: genes que codifican para (PVL, toxinas formadoras de poros) (62), cofactores secretados enzimas, enterotoxinas y superantígenos

empleando la base de datos Virulence Factors Database (VFDB) (94), como se describe a continuación en la Tabla 3:

Tabla 3. Lista de factores de virulencia de S. aureus

Variable	Definición	Metodología
PVL	Factor de virulencia	Se realizó el análisis de estos genes de virulencia empleando la base de datos Virulence Factors Database (VFDB) http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/genus.cgi?Genus=Staphylococcus (Presencia o ausencia)
α -Toxina	Toxina formadora de poros	
HlgAB	Toxina formadora de poros	
HlgCB	Toxina formadora de poros	
LukED	Toxina formadora de poros	
LukAB/HG	Toxina formadora de poros	
LukMF'	Toxina formadora de poros	
LukPQ	Toxina formadora de poros	
PSM α 1 to PSM α 4	Modulina fenol soluble	
PSM β 1, PSM β 2	Modulina fenol soluble	
hly β -Toxina	Toxina formadora de Poros	
δ -Toxin	Citotoxina	
SpA	Proteína A de estafilococo	
ETA Toxina exfoliativa A	Serina proteasas	
ETB Toxina exfoliativa B	Serina proteasas	

Enterotoxinas de Staphylococcus	SEA a SEG Enterotoxinas, superantígenos activadores células T	
Proteínas tipo Enterotoxinas de Staphylococcus (SEI)	SEI-H a SEI-Y Enterotoxinas, superantígenos activadores células T	
CAP (operón de la cápsula CAP8 y CAP5)	Genes para cápsula serotipo 8 o serotipo 5	
Coagulasa	Cofactor, activador de protrombina	
Von Willebrand	Cofactor, activador de protrombina	
Serina proteasas (SplA a SplF)	Serinas proteasas de estafilococo	
Staphopain A scpA	Cisteína proteasa	
Staphopain B sspB	Cisteína proteasa	
Hyaluronidasa HysA	Hialuronidasa	
Geh	Lipasa	
Sak estafilokinasa	Cofactor, activa plasminógeno	
FnBPA y FnBPB	Proteína de unión a fibronectina	
IcaABCD (Operón ica)	Operón de adhesión intracelular	
Genes de sistema de secreción ESAT-6	Genes del sistema de secreción tipo VII	

- Tipos de Betalactamasa:

Los cuatro serotipos de betalactamasas de *Staphylococcus aureus* (A, B, C, o D) fueron identificados de acuerdo a la presencia de aminoácidos en las posiciones 128 y 216 de la secuencia de la proteína de BlaZ (93) (ver Tabla 4).

Tabla 4. Tipos de betalactamasas (BlaZ) clasificación tradicional

Tipo de betalactamasa (BlaZ)	Posición de Aminoácido en BlaZ	
	128	216
A	Treonina	Serina
B	Lisina	Asparagina
C	Treonina	Asparagina
D	Alanina	Serina

Elaboración propia (93).

- Alotipos de BlaZ

La asignación de alotipos de BlaZ se realizó de acuerdo a la metodología descrita en el estudio realizado de Carvajal y cols., (8) pues se predijo la secuencia de aminoácidos de BlaZ, tomando desde el péptido señal a partir de la secuencia de nucleótidos y se comparó la secuencia obtenida con los alotipos reportados en ese estudio realizando alineamiento empleando Multalin (95).

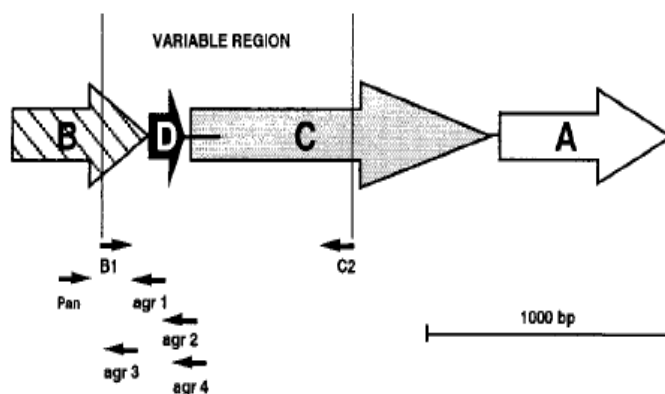
- Linajes genéticos de *S. aureus*

Se asignaron los Complejos Clonales (CC), o Tipo de Secuencia (ST) de *S. aureus* para definir linajes genéticos de *S. aureus*. Se revisó la secuencia de los 7 genes metabólicos de *S. aureus* incluidos en el esquema de tipificación multilocus de secuencias (MLST) (96) Los cuales son: *arcC* (carbamato kinasa), *aroE* (shikimato deshidrogenasa), *glpF* (glicerol kinasa), *gmk* (guanilato kinasa), *pta* (fosfato acetiltransferasa), *tpi* (triosefosfato isomerasa) y *yqil* (acetil coenzima A acetiltransferasa). Después, se realizó MLST, procedimiento en el cual se evalúan los alelos de los 7 genes conservados, utilizando fragmentos internos de aproximadamente 450-500 bp de cada gen. Para cada gen las diferentes secuencias (alelos) presentes de una especie bacteriana se asignan como alelos distintos y, para cada cepa, los alelos de cada uno de los siete loci definen el perfil alélico o el tipo de secuencia (ST). Por lo tanto, cada cepa se caracteriza por una serie de siete números enteros que corresponden a los alelos de los siete loci en la página web pubmlst (97).

- Agr (Gen regulador accesorio)

Para la tipificación del gen regulatorio accesorio (tipos I, II, III, IV), se realizó una PCR *in silico* empleando la secuencia de Agr de las tres cepas del estudio y los *primers* o cebadores descritos por Gilot P y cols., y Strommenger B y cols., (98,99). Estos *primers* corresponden a oligonucleótidos que se dirigen a una región variable entre *agrD* y *agrC*. Figura 5 (flechas pequeñas señalando la ubicación de los *primers* para cada *agr1*, *agr2*, *agr3* y *agr4*) y permiten identificar así los 4 tipos de Agr en *S. aureus* validándose frente a cepas de referencia.

Figura 5. Primers ubicados en Agr para realizar la tipificación,



Tomado de Gilot P y cols., y Strommenger B y cols., (98,99).

7.4 Herramientas para el manejo de la información

Las herramientas para el manejo de información genética (para verificar la presencia o ausencia de genes) correspondieron a archivos de Excel. También se incluyó el resultado de la CIM a cefazolina a alto inóculo e inóculo estándar), tipo de BlaZ, alotipos de BlaZ y tipo de Agr y ST.

En cuanto a las herramientas bioinformáticas utilizadas, se utilizó "Multalin" que es un software que permite alinear simultáneamente varias secuencias biológicas, de forma que se dispone de varias secuencias de proteínas o ácidos nucleicos con espacios postulados yuxtaponiendo residuos similares y se asigna una puntuación positiva a las identidades, sustituciones conservadoras o no conservadoras,

la amplitud de la puntuación mide la similitud este se empleó para alineamiento de secuencias de proteína de BlaZ y alotipos (100).

Para búsqueda de genes de virulencia se empleó la base de datos VirulenceFinder (94), que es un repositorio, este busca proporcionar una fuente de fácil acceso para acceder a los factores de virulencia de varios patógenos bacterianos. Se busca por cada género bacteriano realizando un *Blast* (herramienta bioinformática que compara una secuencia de aminoácidos con una secuencia en una base de datos) o también escribiendo palabras clave (101). Para buscar los linajes genéticos de *S. aureus* se realizó mediante el análisis de los siete genes metabólicos mencionados anteriormente se empleando la base de datos PubMLST (102).

Como el presente es un estudio descriptivo y por solo tener tres aislamientos no se realizaron análisis estadísticos.

7.5 Proceso metodológico

- Determinación de efecto inóculo a cefazolina:

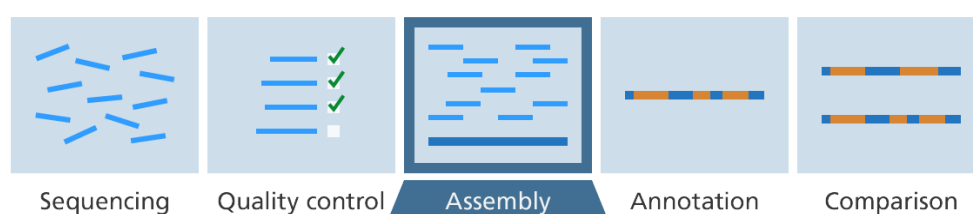
Se realizó la prueba de susceptibilidad en microdilución en caldo (7,22) empleando Mueller Hinton-II (BHII) y placas de 96 pozos estériles. Para la evaluación de inóculo bacteriano estándar 10^5 (UFC/ml) se empleó un cultivo fresco de *S. aureus* en agar infusión cerebro, corazón y espectrofotómetro con filtro de 600nm. Para el alto inóculo 10^7 (UFC/ml) se empleó un cultivo de colonias bacterianas (1 a 2 colonias) en caldo BHII, para obtener un *overnight* (o cultivo de toda la noche). La inoculación de la suspensión bacteriana y el antibiótico se realizó a 37°C por 24 horas.

Para la interpretación del alto inóculo, la bacteria tiene que presentar una CIM a cefazolina de $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ al evaluar el inóculo estándar y una CIM $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ con inóculo bacteriano alto: Los controles de esta prueba corresponden a la cepa positiva de EIC TX0117 *blaZ*-A positiva y controles

negativos *S. aureus* ATCC 29213 positiva para *blaZ-A* y ATCC 25923 negativa para betalactamasa (71).

1. Secuenciación genómica completa y análisis bioinformático: Constó de los siguientes pasos: Extracción del ADN (ácido desoxirribonucleico) y realización de las diluciones de ADN: Se procedió a extraer el ADN de *S. aureus* empleando lisostafina por 30 minutos a 37°C. Luego, con el kit QIAGEN se realizó la extracción y purificación del ADN. Posteriormente se cuantifico por Nanodrop, tecnología por espectrofotometría que indica la pureza del ADN extraído, verificando los radios 260/280 y 260/230, luego se realizó la medición fluorométrica, por Qubit BR el cual permitió la verificación total de la concentración de ADN.
2. Preparación de librerías: Las librerías se utilizan para etiquetar el ADN extraído para que en el momento de la secuenciación sea identificado fácilmente, se utilizó la plataforma Ilumina con el kit de Nextera XT, el cual cuenta con cinco pasos: en donde se tagmenta el ADN para prepararlo y pueda ser etiquetado para su identificación, amplificación y limpieza de librerías, normalización de librerías y agrupación de las mismas para la secuenciación.
3. Secuenciación por amplificación: Se realizó con el secuenciador Miseq plataforma Ilumina.
4. Análisis de genomas con herramientas bioinformáticas: Se obtuvieron las secuencias de los genomas, se ensamblaron y luego se realizó la anotación de los genes y comparación con bases de datos (Figura 6). Se empleó el formato FASTA (Fast all, formato basado en texto para representar secuencias de nucleótidos o aminoácidos mediante códigos que emplean letras. El formato permite describir nombres de secuencias y comentarios de dichas secuencias) se estudiaron las secuencias de aminoácidos, traducidos a proteínas con las diferentes herramientas mencionadas anteriormente.

Figura 6. Procedimiento para analizar las secuencias genéticas.



Tomado de (103).

8. Consideraciones éticas

En este trabajo se tendrán en cuenta la Declaración de Helsinki y la resolución 8430 de 1993 Ministerio de Salud de Colombia. Este estudio es clasificado en la categoría de riesgo menor que el mínimo. No hay conflicto de intereses, ni intervención en humanos o animales.

9. Resultados y discusión

Se estudiaron tres cepas de SASM (UC791, UC809 y UC953) recuperadas de un mismo paciente con bacteriemia en un hospital de Colombia a partir de una vigilancia multicéntrica realizada entre enero de 2011 a enero de 2014, en la cual se incluyeron 1185 aislamientos bacterianos recuperados de 1010 pacientes de 24 hospitales de Latinoamérica que incluyó Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, Guatemala, México, Perú y Venezuela (72). Se confirmó que eran cepas susceptibles a meticilina porque no presentaron el gen *mecA*. En cuanto a las CIM a cefazolina de cada cepa los resultados encontrados fueron:

Tabla 5. CIMs a cefazolina de las cepas estudiadas

CEPAS	CIM ESTÁNDAR	CIM ALTO INÓCULO
UC791	1/S	16/R
UC809	0.5/S	8/S
UC953	2/S	≥128/R

S: sensible, R: resistente

Para la definición de un efecto inóculo a cefazolina, si la cepa presentó una CIM de $\geq 16\mu\text{g/ml}$ con alto inóculo y menor de $8\mu\text{g/ml}$ con inóculo estándar la cepa se consideró positiva para efecto inóculo. Dos cepas del estudio presentaron efecto inóculo a cefazolina (CIM de $16\mu\text{g/ml}$ y $128\mu\text{g/ml}$) que fueron la primera y última cepa aislada del paciente, mientras que una cepa obtenida después del primer aislamiento UC809 no presentó este fenotipo.

En este estudio en los tres aislamientos de SASM se encontró que poseen la betalactamasa tipo C de acuerdo a la clasificación tradicional. La prevalencia de producción de betalactamasas en SASM en un estudio de Corea del Sur fue del 92% y de 80% en Estados Unidos (27,29,30) y en Latinoamérica se ha encontrado en 81% de los aislamientos (8). En cuanto a la relación que existe entre el tipo de betalactamasas y el EIC se ha reportado que la BlaZ A es la más prevalente (7).

Seguida de la BlaZ C (22) por otro lado, también hay estudios como el de Saeki y cols.,(83) que muestran una distribución más o menos uniforme entre los tipos de BlaZ del tipo A, B y C. Aunque cinco estudios muestran que la BlaZ A en aislamientos de SASM son los más propensos a mostrar EIC (7,22,29,31,82). En Estados Unidos un estudio de Wang y cols., (27) en el que incluyeron 269 aislamientos de SASM adquiridos de todas las fuentes excepto LCR y orina en hospitales de Chicago, BlaZ tipo C fue la más frecuente en un 40% de aislamientos seguida de tipo A 23% (27) Asimismo, Livorsi y cols., (30) en 5 hospitales de Georgia en Estados Unidos en 185 aislamientos de SASM de sangre encontraron que BlaZ tipo C 27%, y tipo A 26%. fueron las más frecuente Nannini y cols., (80) en su estudio de varios países de 98 cepas de infecciones de piel y tejidos blandos, neumonía adquirida en el hospital, endocarditis infecciosa y sangre, encontraron que la BlaZ más frecuente fue la tipo C 46%, luego la tipo A (26%) y la tipo B (15%).

Igualmente, Song y cols., (82) en hospitales de Corea del Sur en el que evaluaron 303 aislamientos de SASM de sangre encontraron que BlaZ tipo C fue la más prevalente (44%) seguida de la tipo B (26%). Chong y cols., en un hospital en Corea del Sur, en 218 SASM de sangre mostraron que BlaZ tipo C fue la más frecuente en 54% de SASM, seguida de tipo B (20%) . Lee y cols., (104) en tres hospitales de Corea del Sur en 113 aislamientos de SASM de sangre hallaron que la *blaZ* más frecuente fue la tipo C (41%)seguida de la tipo B (21%).

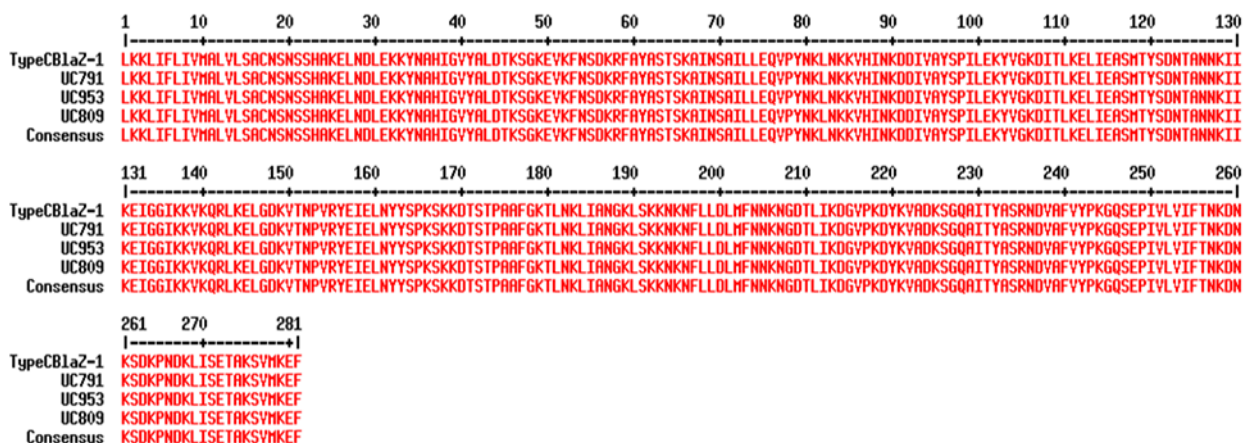
En Latinoamérica en el estudio más reciente de Carvajal y cols.,(8) encontraron que en 690 cepas de SASM de sangre de 9 países latinoamericanos la BlaZ tipo C fue la más predominante 37%, seguida de los tipos A y B (33% y 29%, respectivamente). Mientras que, en el primer estudio de Rincón y cols.,(7) en 296 aislamientos de SASM de sangre y 68 de osteomielitis de hospitales de América del sur la BlaZ más frecuente fue la A 66% y luego la tipo C 31%. Ciertamente de los anteriores estudios se puede concluir que la BlaZ relacionada más frecuentemente con el efecto

inóculo a cefazolina fue la tipo C, seguida de la tipo A y en menor medida la tipo B, y BlaZ tipo D es muy inusual ya que puede variar su prevalencia desde un 0-2% (7,8,22,27,29–31,82,104).

Es importante mencionar que para los estudios nombrados con relación a la producción del tipo de betalactamasa y efecto inóculo a cefazolina se tuvo como punto de corte de resistencia que presentaran $>16\mu\text{g/ml}$ en un inóculo alto de 10^7 (UFC/ml), concluyendo que dos de nuestras cepas que son positivas para efecto inóculo a cefazolina cumplen con el punto de corte propuesto, mientras que la otra no poseía dicho fenotipo a pesar de que provenían del mismo paciente, como se puede observar en la Tabla 5. Esto es interesante pues no ha sido muy estudiado por la literatura. Se cuentan con pocos estudios que tratan esta temática, teniendo en cuenta que el efecto inóculo a la cefazolina tiene una prevalencia alta sobre todo en nuestro medio, Latinoamérica.

También, en este estudio los tres aislamientos presentaron betalactamasa alotipo BlaZ-1 de acuerdo a la nueva clasificación de betalactamasas de estafilococo propuesto por Carvajal y cols.,(8) en el 2020. En la figura 7 se observa el resultado del alineamiento del alotipo de BlaZ de las tres cepas del estudio comparada con una cepa de este alotipo del estudio (8). Carvajal y cols., plantean que el alotipo BlaZ-1 estuvo relacionado con EIC pero solo la mitad de las cepas, ya que la otra mitad fueron negativas para efecto inóculo a cefazolina, curiosamente a pesar de tener la misma secuencia de BlaZ tiene esta diferencia en el fenotipo, similar a lo que encontramos en nuestro estudio (dos cepas si la presentan, una no), sugiriendo que hay otros determinantes genéticos implicados en el efecto inóculo a cefazolina (no únicamente el tipo de BlaZ o alotipo) (8).

Figura 7. Resultado del análisis de las tres cepas de SASM alotipos realizado mediante Multalin del Alineamiento de BlaZ



(95).

En cuanto a los linajes genéticos de *S. aureus*, las tres cepas del presente estudio mostraron un linaje genético ST8, este clon es uno de los más importantes de *S. aureus* que se ha descrito en varios estudios relacionándose con infecciones invasivas (105,106) especialmente en población pediátrica. En el estudio de Havaei y cols., (107) se aislaron 83 cepas de *S. aureus* en un hospital de Irán, y se encontró que el linaje de *S. aureus*, ST8-SASM, fue la causa más común de infección entre los pacientes del Hospital Alzahra. Este linaje también se encontró en diferentes salas de hospitales: pediátrica, cirugía, cuidados intensivos y medicina interna, así como en el entorno comunitario. Además, ST8 se asoció con una variedad de infecciones, que incluyen neumonía, septicemia, infección del tracto urinario (ITU) y meningitis, lo que indicaría que es un linaje bastante virulento. Por otro lado, Rincón y cols., (7) demostraron que el linaje ST8 estuvo estrechamente relacionado con el efecto inóculo a la cefazolina, además es uno de los clones prevalentes de *S. aureus* resistentes a meticilina que circulan en América del Sur. Por otro lado, recientemente se describió el ST30 como clon asociado a EIC en aislamientos de *S. aureus* también de Latinoamérica y Wi y cols., (30) también lo confirmaron pero en Corea (8).

En cuanto al sistema regulador Agr, se observó que las tres cepas de SASM tenían sistema de Agr tipo I, el cual se relacionó de forma positiva con el efecto inóculo a cefazolina en SASM en hospitales de Corea (29,82,90). Los datos recientes sugieren que el efecto inóculo a cefazolina en SASM tiene una asociación con la funcionalidad o variación genotípica del locus *agr* (90).

Lee y cols. (90) estudiaron en Corea 195 cepas de SASM de sangre y encontraron que el efecto inóculo contra antibióticos betalactámicos, como cefazolina, se asoció con el Agr tipo III en un 40%, comparado con aislamientos con Agr diferente al tipo III (en el que solo 5,5 % presentaron efecto inóculo). Además, la asociación entre el tipo Agr y EIC fue más evidente en los aislados de SASM positivos para el gen *blaZ* tipo A. Aunque, *blaZ* tipo A se ha asociado positivamente con EIC, no es de forma absoluta pues no es raro encontrar aislamientos de SASM con el gen *blaZ* tipo A que no muestren EIC (22,30,77,104).

Ciertamente Lee y cols., (90) hallaron que casi todos los aislamientos de SASM con genotipo Agr tipo III y *blaZ* tipo A exhibían efecto inóculo a cefazolina. Por ende, una hipótesis que se plantea es que existe una correlación entre estas variables Agr tipo III como indicador útil para discriminar la positividad de este fenómeno en SASM con *blaZ* tipo A en Corea. También mencionan que el Agr tipo III está relacionado con la resistencia a clindamicina y eritromicina (90). Por lo anterior podríamos deducir que en caso de que sea necesario la utilización de cefazolina debe ser con precaución en las infecciones por SASM de alto inóculo si los aislamientos presentan resistencia a la clindamicina o la eritromicina. Es importante mencionar que Mirani y cols y Viedma y cols., (89,108) demostraron una asociación entre locus *agr* disfuncional y una susceptibilidad reducida a la vancomicina y una mayor capacidad para producir biopelículas en SASM, lo que sugiere que este sistema podría ser importante en el desarrollo de resistencia a antibióticos y posiblemente al efecto inóculo a cefazolina.

En otro estudio en Corea, realizado por estudio de Wi y cols., (31) fue el primer estudio que sugirió una relación de *agr* con el efecto inóculo a cefazolina en SASM. En su estudio incluyeron 146 aislamientos de SASM de sangre de dos vigilancias multicéntricas y observaron que el efecto inóculo a cefazolina estuvo presente en 16 aislamientos (11.0%) y 125 aislamientos (85.6%) fueron positivos para el gen *blaZ*. La betalactamasa tipo A fue la más prevalente (41,1%), Además encontraron que el Agr más prevalente fue el tipo I (99 aislamientos; 66,4%), seguido del tipo III (31 aislamientos; 21,2%). La prevalencia de betalactamasa tipo A fue significativamente mayor en los aislamientos que exhibieron efecto inóculo a cefazolina que en las cepas negativas (100% vs 33,3%) Además, el EIC solo se observó en los aislamientos del Agr tipo III (12 aislamientos; 75.0%) luego en el tipo I (4 aislamientos; 25.0%) y fue significativamente más común en los aislamientos con disfunción del *agr* que en aquellos con *agr* funcional (56.3% versus 7.7%). Entre los aislamientos que producían BlaZ tipo A, el EIC fue más prevalente en aislamientos con Agr disfuncional que en aquellos con Agr funcional (69,2% frente a 14,9%; $P = 0,025$). Adicionalmente, también proponen que, si bien la bacteriemia persistente fue más común en el grupo con EIC, esta diferencia no fue significativa 50% frente a 27,7%, respectivamente. Wi y cols., (31) también evaluaron los efectos de la disfunción *agr* y el EIC sobre la mortalidad a 30 días en pacientes con bacteriemia por SASM que reciben terapia con cefazolina ($n = 28$), sin embargo, no observaron diferencias en la mortalidad entre el grupo disfuncional *agr* y el grupo con efecto inóculo a cefazolina en los pacientes que recibieron cefazolina (31).

En conclusión, de acuerdo a estos dos reportes se observa que el efecto inóculo a cefazolina fue significativamente más común en los aislamientos con *agr* disfuncional que en aquellos con *agr* funcional y solo en los aislamientos de los tipos de Agr tipo I o tipo III (31). Esto podría concordar con los resultados del presente trabajo en el que dos cepas que presentan efecto inoculo a cefazolina tenían Agr tipo I.

Es importante también mencionar que, la bacteriemia persistente por SASM que es la que se mantiene a pesar de un tratamiento apropiado, de dos a cuatro días o más, se ha correlacionado con una disfunción de *agr* (109). Al comienzo de una infección, la baja densidad celular y la consiguiente baja expresión de *agr* da como resultado una mayor producción de componentes de la superficie necesarios para la colonización inicial de los tejidos. Una vez que esto se establece, las bacterias crecen a densidades celulares más altas, lo que requiere fuentes de alimentos adicionales y una mayor protección contra las defensas del huésped, lo que se logra mediante la regulación ascendente dependiente de *agr* de exoenzimas y toxinas degradantes (45). También se ha demostrado que las concentraciones subinhibitorias de antibióticos aumentan la expresión de *agr* (110). Esto resalta la importancia de *agr* en la bacteriemia y en la resistencia a antibióticos, sugiriendo que posiblemente sea un factor importante en el desarrollo de EIC.

Por otra parte, respecto a los factores de virulencia encontrados en los genomas de las tres cepas de SASM del estudio, en la Tabla 6 se presentan los resultados de los diferentes determinantes genéticos encontrados relacionados con la patogénesis y/o virulencia en *S. aureus*.

Tabla 6. Factores de virulencia.

Genes que codifican para	Función	Sistema	Aislamientos		
			UC91	UC809	UC953
<i>essA</i>	Proteína de membrana	Sistema de secreción VII			
<i>essaA</i>	Factor de virulencia secretado				
<i>esaA</i>	Proteína de membrana				
<i>esaB</i>	Proteína citosólica soluble				
<i>essB</i>	Proteína de membrana				
<i>essC</i>	Proteína de membrana				
<i>essC</i>	Factor de virulencia secretado				
<i>essB</i>	Factor de virulencia secretado				
<i>esaE</i>	Proteína citosólica soluble				
<i>essD</i>	Factor de virulencia secretado				
<i>esaD</i>	Factor de virulencia secretado				
<i>esaG1</i>	Proteína antitoxina EsaG1				
<i>esaG2</i>	Proteína antitoxina EsaG2				
<i>esaG3</i>	Proteína antitoxina EsaG3				
<i>esaG4</i>	Proteína antitoxina EsaG4				
<i>esaG5</i>	Proteína antitoxina EsaG5				
<i>esaG6</i>	Proteína antitoxina EsaG6				
<i>esaG7</i>	Proteína antitoxina EsaG7				
<i>esaG8</i>	Proteína antitoxina EsaG8				
<i>esaG9</i>	Proteína antitoxina EsaG9				
<i>clfA</i>	Factor de agrupación A	MSCRAMM			
<i>clfB</i>	Factor de agrupación B				
<i>cna</i>	Proteína de unión a al colágeno				
<i>hld</i>	Toxinas formadoras de poros	Modulina soluble a fenol			
<i>hly/hla</i>		α -hemolisina			
<i>sspC</i>	Cisteína proteasa	Estafopafina			
<i>sspB</i>	Cisteína proteasa	Estafopafina			
<i>sspA</i>	Exoenzima	Proteasa V8			
<i>spa</i>	Ahesina durante el inicio de infección intravascular	MSCRAMM			
<i>aur</i>	Modifica las proteínas de la superficie celular bacteriana, promueve el desprendimiento de células bacterianas de los sitios colonizados y facilita la propagación de la infección	Aureolisina			
<i>hysA</i>	Degradación del ácido hialurónico	Hialuronidasa			
<i>geh</i>	Libera ácidos grasos, contribuye a que la bacteria persista en las secreciones grasas de la piel.	Lipasa			
<i>isdB</i>	Codifican factores para la unión de la hemoglobina y el paso del hierro al citoplasma	Sistema Isd			
<i>isdA</i>					
<i>isdC</i>					
<i>isdD</i>					
<i>isdE</i>					
<i>isdF</i>					
<i>srtB</i>					
<i>isdG</i>					
<i>sea</i>	Responsable de la intoxicación alimentaria	Enterotóxina estafilocócica			
<i>selq</i>					
<i>selk</i>					
<i>sak</i>	Activador del plasminógeno	Estafiloquinasa			
<i>hlyB</i>	Esfingomielasa, ligasa de biopelícula	β -Toxina			
<i>map</i>	Capaz de modular la respuesta inflamatoria a través de sus interacciones con ICAM-1	MSCRAMM			
<i>eta</i>	Proteínas exfoliativas	Genes et			
<i>etb</i>					
<i>seb</i>					
<i>seh</i>					
<i>sed</i>	Responsables de la intoxicación alimentaria por <i>S. aureus</i>	Enterotoxinas			
<i>see</i>					
<i>tsst-1</i>	Responsable de los síntomas del choque tóxico	Superantígeno			
<i>Cap8A</i>	Previenen la fagocitosis	Subunidades de la cápsula			
<i>Cap8B</i>					
<i>Cap8C</i>					
<i>Cap8D</i>					
<i>Cap8E</i>					
<i>Cap8F</i>					
<i>Cap8G</i>					
<i>Cap8H</i>					
<i>cap8I</i>					
<i>cap8J</i>					
<i>cap8K</i>					
<i>cap8L</i>					
<i>cap8M</i>					
<i>cap8N</i>					
<i>cap8O</i>					
<i>cap8P</i>					
<i>hlgA</i>	Toxinas formadoras de poros	Leucocidinas			
<i>hlgC</i>					
<i>hlgB</i>					
<i>lukF-PV</i>					
<i>lukS-PV</i>					
<i>ebp</i>	Unión a elastina Formación de biopelículas en forma dependiente de Zn ²⁺	MSCRAMM			
<i>sdrC</i>	Evasión inmune Degradación del factor de complemento C3b Infección por endocarditis				
<i>sdrD</i>					
<i>sdrE</i>					
<i>fnbB</i>	Proteína de unión a fibronectina media la adhesión a fibrinógeno, elastina y fibronectina	MSCRAMM			
<i>fnbA</i>					
<i>icaR</i>	Codifican adhesión intercelular de polisacárido (PIA)	Operón ica			
<i>icaA</i>					
<i>icaD</i>					
<i>icaB</i>					
<i>icaC</i>					

MSCRAMM: Son los componentes de la superficie microbiana que reconocen las moléculas de la matriz adhesiva. La columna genes que codifican para, corresponde a **los genes que se encontraron en los genomas y su función se describe en la columna ubicada a la derecha. Sistema muestra genes /proteínas que hacen parte del mismo sistema u operón de genes.** ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1. **La columna de aislamientos muestra la presencia o la ausencia de los factores de virulencia en las tres cepas UC791, UC809 y UC95. Rojo:** indica la presencia del gen. **Blanco:** indica la ausencia del gen. **Verde:** cepa con ausencia de efecto inóculo a cefazolina (UC809).

Los resultados de la tabla 6 muestra que en total se estudiaron 85 genes de virulencia en los tres aislamientos de SASM, donde 49 en promedio se encontraban presentes. A continuación, se discutirá sobre los genes de mayor relevancia.

Las bacterias poseen una variedad de mecanismos de transporte para exportar proteínas a través de la envoltura celular, los sistemas de secreción bacteriana que median la translocación de proteínas a través de la envoltura celular Gram negativa se han clasificado en seis tipos enumerados de tipo I al tipo VI mientras que para los Gram positivos en el caso de *S. aureus* posee el sistema de secreción tipo VII, un sistema encargado de la competencia bacteriana y especializado para secretar proteínas extracelulares asociado a la virulencia (111,112).

El sistema de secreción tipo VII (T7SS, conocido como el sistema de secreción ESX-1 o ESAT-6), tiene los genes *ess* que se han descrito previamente en cepas SARM ST8 en Reino Unido (112) sin embargo, los tres aislamientos del presente trabajo tienen genes de este sistema a pesar de ser SASM. La maquinaria *Ess* comprende seis componentes centrales, que incluyen una proteína extracelular, una proteína citoplasmática y cuatro proteínas de membrana. El componente más abundante es EsxA, esta muestra un alto grado de conservación de la secuencia a través de las cepas de *S. aureus* y es necesario para la secreción de otros sustratos de *Ess* lo que implica que es un componente extracelular

central. La segunda proteína soluble es EsaB, que parece regular la maquinaria Ess y finalmente los cuatro genes que codifican para las proteínas de membrana clave incluyen EssA, EssB, EssC y EsaA (111), que también se encuentran presentes en los tres aislamientos.

EsxA se requiere para la virulencia bacteriana y recientemente se demostró que suprime la apoptosis de la célula huésped durante la infección intracelular. Además de EsxA, se han descrito cuatro sustratos del sistema de secreción: EsxB, EsxC, EsxD y EsaD (111).

Los genes *ess* mostraron altos niveles de regulación positiva durante la infección crónica por *S. aureus* en pacientes con fibrosis quística (113), lo que sugiere un papel similar en la infección persistente en humanos (111). Por otro lado se encontró en los tres aislamientos *esaE* una proteína soluble de función desconocida (87), mientras que *esaD* no estuvo presente en ninguna cepa, su función es actuar como un factor accesorio requerido para la secreción de otros sustratos de Ess (112), se ha visto que los mutantes de *S. aureus* que carecen de *esaD* son defectuosos en la secreción de EsxA, después de la inoculación intravenosa a ratones, los mutantes de *S. aureus esaD* generan menos abscesos con una carga bacteriana reducida en comparación con la cepa original de tipo salvaje Newman (114). Por ende, *esaD* se requiere para la formación de abscesos y la persistencia estafilocócica en los tejidos del huésped, también se ha reportado que las cepas altamente virulentas como *S. aureus* USA300 sintetizan mayores cantidades de *EsaD* que los aislados menos virulentos (113).

Se ha visto que los mutantes en el T7SS tienen una capacidad deteriorada para persistir en la compleja interacción entre el huésped y el patógeno durante la colonización y el desarrollo de abscesos (112). Wang y cols, sugieren que el incremento de la expresión de *ess* puede contribuir al aumento de las infecciones. También afirman que *ess* y los determinantes de virulencia secretados dependientes de ESS, EsxA y EsxB promueven la virulencia aguda (115).

También se encontraron los genes que codifican para las toxinas formadoras de poros *hld*, y *hly/hla* en dos de las cepas de este estudio. La hemolisina δ (*hld*) es importante para lisar eritrocitos y otras células de mamíferos, así como estructuras subcelulares (94) Janzon y Arvidson y cols., (116) demuestran que el gen que codifica para *hld* participa en la regulación dependiente de *agr* de los genes de virulencia en *S. aureus*, pues la inactivación de *hld* tuvo el mismo efecto pleiotrópico sobre la síntesis de varios factores de virulencia extracelular que las mutaciones de *agrA*. Dado que la transcripción de *hld* se activa al final de la fase de crecimiento exponencial por un mecanismo dependiente de *agrA*, esto sugiere que *hld* codifica el regulador de los genes de virulencia mientras que *agrA* codifica una proteína que puede activar la transcripción de *hld* en respuesta a cambios en las condiciones de crecimiento. Es interesante que en la cepa UC953 no se encontró *hld*.

El gen de la hemolisina α , toxina alfa o también conocida como *hla* estuvo presente en las tres cepas, esta hemolisina está involucrada en la lisis de eritrocitos, plaquetas, células endoteliales, células epiteliales y algunos leucocitos (62). Esta forma poros en la membrana celular para matar o limitar la capacidad de los neutrófilos e inducir daño celular que desencadena la producción de citoquinas. Motamedi y cols., (117) estudiaron la presencia de genes productores de hemolisina en las cepas SARM y SASM. Los genes *hla*, *hly*, *hld* y *hlg* detectados en SARM se encontraron en un 63,35% mientras que para SASM en un 72,13%. También se evidenció que los aislamientos clínicos de *S. aureus* productores de hemolisina se encuentran principalmente en la sangre y úlceras y causan más daño al paciente (117).

Las hemolisinas y sus efectos sobre el aumento de las infecciones estafilocócicas pueden ser uno de los aspectos más importantes que hacen más relevante la identificación de cepas generadoras de hemolisina. En muestras de sangre y úlceras las bacterias pueden verse afectadas por diversos factores, como la fiebre y la temperatura corporal, para alterar su estructura metabólica para hacer frente a este aumento de temperatura. Un cambio en la actividad de genes reguladores como el *agr*

puede cambiar la producción de hemolisina en *S. aureus* (55,118–120). Los datos epidemiológicos y experimentales sugieren un papel importante para las hemolisinas como α -HL, β -HL, γ -HL y PSM en las infecciones por *S. aureus*, sobre la base de la resistencia a los antibióticos. Esto resalta la importancia de la presencia de estos genes de hemolisinas en cepas de *S. aureus*.

Por otro lado, se encontró que los tres aislamientos tenían el gen para la β -hemolisina o la toxina beta. Su función es la hemólisis de eritrocitos de oveja y humanos. Su capacidad hemolítica depende de la cantidad de esfingomielina que contengan los eritrocitos, teniendo los humanos una sensibilidad media a ello. Se ha reportado que la infección por *S. aureus* productora de toxina β produce lesiones más grandes en los órganos sin afectar la carga bacteriana general en los modelos de endocarditis y neumonía en conejos (62). Por otro lado, según Montarelo y cols., (121) en su estudio de 785 aislamientos de *S. aureus* de bacteriemia de diferente origen y 48 cepas de colonización recolectadas durante un período de 15 años (2002-2017), encontraron que la presencia de *hly* se relaciona significativamente con fuentes, como catéteres e infecciones de la piel y tejidos blandos (122,123) e infecciones relacionadas con biofilm (124). *hly* fue encontrada en los tres aislamientos estudiados.

También, se encontraron genes para cisteína proteasas en los tres aislamientos de este estudio, estos genes están codificados por un operón de serina proteasa estafilocócica (Ssp) que contiene los genes *sspA*, *sspB* y *sspC*, que codifican la proteasa V8 (SspA), la estafopaina B (SspB) y su inhibidor intracelular estafostatina B (SspC). SspB degrada el péptido antimicrobiano, LL-37, promoviendo así la supervivencia bacteriana. SspB también escinde CD11b y CD31, proteínas de superficie importantes para la activación y supervivencia de los fagocitos, respectivamente. Por lo tanto, SspB previene la fagocitosis de *S. aureus* al tiempo que disminuye la capacidad de los leucocitos para detectar patógenos. También se ha visto que SspB puede funcionar para promover el estilo de vida intracelular de *S. aureus* para infecciones persistentes (62). Las estafopainas A y B son las principales cisteína proteasas secretadas de *S. aureus*. ScpA escinde las elastinas que se

encuentran en los tejidos conectivos, la proteína A del surfactante pulmonar en los pulmones y el receptor de quimiocinas CXCR2 en los leucocitos. Además, la ScpA promueve la fuga capilar (aumento de la permeabilidad capilar, lo que permite el escape de fluidos y proteínas desde el sistema sanguíneo al espacio intersticial causando edema masivo y shock (125)) lo que produce hipotensión (126). Ambas se encuentran involucradas en la formación de biopelículas y su dispersión. También tienen un efecto directo sobre el tejido conectivo y los sistemas de coagulación del huésped. Las estafopainas inactivan varias proteínas del huésped, incluidos el inhibidor de proteinasa $\alpha 1$, el colágeno y los fibrinógenos; sin embargo, SspB tiene una mayor actividad en la escisión de fibrinógeno y colágeno en comparación con ScpA (62).

El gen que codifica para la metaloproteasa de *S. aureus*, aureolisina (Aur) fue encontrada en las tres cepas del estudio. La amplia especificidad de sustrato de Aur permite que la metaloproteasa se dirija a una variedad de sustratos. Aur activa SspA, la segunda proteasa en la cascada de activación de la proteasa estafilocócica, Además, Aur puede degradar el factor de aglutinación B (ClfB) y los péptidos PSM α . Aur contribuye directamente a la evasión y diseminación inmunitaria de *S. aureus* a través de la escisión e inactivación del péptido antimicrobiano LL-37, promoviendo así la supervivencia de *S. aureus*. Aur también puede degradar los inhibidores de la proteasa plasmática humana: el inhibidor de la $\alpha 1$ -proteínasa y la $\alpha 1$ -anticimotripsina presentes en el suero. La degradación de C3 por Aur da como resultado el agotamiento de las proteínas C3, evitando así la formación del complejo de ataque de membrana (MAC) en las bacterias y promueve la supervivencia de las bacterias. Además, Aur activa la protrombina e inactiva los inhibidores de plasminógeno, manipulando así el sistema de coagulación del huésped (62). En conclusión ayuda al procesamiento del precursor de la proteasa V8 en una forma activa, puede promover el desprendimiento de células bacterianas de los sitios colonizados y facilitar la propagación de la infección (94).

También se apreció en los tres aislamientos de *S. aureus* el gen que codifica para las lipasas Geh. Estas enzimas provocan la hidrólisis de triglicéridos lo que hace que se liberen ácidos grasos libres bactericidas que pueden interferir en la patogenicidad. Se ha estudiado que en los aislamientos clínicos de *S. aureus* de infecciones de tejidos profundos producen más lipasas que en infecciones superficiales. Las lipasas purificadas provocan la agregación de granulocitos y disminuyen la fagocitosis a altas concentraciones (62). También se ha descrito que Geh inhibe la activación de las células inmunes innatas. En este orden de ideas puede aumentar la producción de citocinas proinflamatorias durante la infección (127).

El sistema determinante de superficie regulado por hierro (Isd) también fue encontrado en los tres aislamientos de *S. aureus*, este sistema es el encargado del transporte de moléculas que contienen hierro a través de la membrana citoplasmática (128). Es importante mencionar que la patogenia de este microorganismo depende de la adquisición de hierro a partir de hemoproteínas del huésped. Torres y cols., (129) proponen que *S. aureus* puede utilizar hemoproteínas del huésped como la hemoglobina y la mioglobina, pero no la hemopexina como fuentes de hierro para el crecimiento bacteriano. Demostrando que los estafilococos capturan la hemoglobina en la superficie bacteriana a través de IsdB y que la inactivación de isdB, pero no isdA o isdH, disminuye significativamente la unión de la hemoglobina a la pared celular del estafilococo y altera la capacidad de *S. aureus* para utilizar la hemoglobina como fuente de hierro. Es importante destacar que los mutantes que carecen de isdB, pero no de isdH, muestran una reducción de la virulencia en un modelo murino de formación de abscesos (129). Por tanto, la eliminación de hierro de la hemoglobina mediada por IsdB representa una importante estrategia de virulencia para la replicación de *S. aureus* en los tejidos del huésped y para el establecimiento de infecciones estafilocócicas persistentes. Finalmente, se ha registrado que este sistema también tiene un papel importante como receptor para la proteína de matriz extracelular y plasma vitronectina. Pietrocola y cols., (130) demostraron que las células bacterianas que expresan IsdB se unieron a cantidades significativamente mayores de vitronectina del plasma humano que un

mutante de *isdB*. Vitronectina promovió la adhesión e invasión de células epiteliales y endoteliales por células de *S. aureus* que expresan *IsdB* (130).

Adicionalmente se encontró en los tres aislamientos la presencia del gen que codifica para *Map* una proteína extracelular de adherencia. Algunas de las funciones que posee *map* son la adherencia e internalización de las células huésped, así como efectos inmunomoduladores (131,132). Lee y cols., (131) mostraron que las cepas bacterianas con *map* causan con menos frecuencia artritis y osteomielitis.

Los genes que codifican para las subunidades de cápsula *cap8A*; *cap8B*; *cap8C*; *cap8D*; *cap8E*; *cap8F*; *cap8G*; *cap8H*; *cap8I*; *cap8J*; *cap8K*; *cap8L*; *cap8M*; *cap8N*; *cap8O*; *cap8P* casi todos fueron hallados en las tres cepas estudiadas, excepto *cap8D*, *cap8I*, *cap8J* y *cap8K*. Estos genes son producidos por más del 90% de las cepas de *S. aureus*, predominan dos serotipos (5 y 8) entre los aislados clínicos de *S. aureus* de humanos (94), y previenen la fagocitosis. En un modelo de bacteriemia de infección en ratones, la cepa sobreproductora de CP8 persistió más tiempo en el torrente sanguíneo, el hígado y el bazo de los ratones que la cepa parental. Estos resultados indican que CP8 es un factor de virulencia antifagocítico de *S. aureus*. Para muchos patógenos humanos, los polisacáridos capsulares (PC) juegan un papel importante en la evasión bacteriana de la vigilancia inmunológica del huésped, lo que confiere virulencia a los patógenos (133). Cunnion y cols., (134,135) proponen que el complemento es un componente crítico de la inmunidad innata y los experimentos in vitro sugieren que este es importante para incrementar la fagocitosis de neutrófilos de varias cepas estafilocócicas. El complemento también es importante para la supervivencia de las proteínas de cápsula en la bacteriemia por *S. aureus* en modelos de ratón y que la presencia de estas proteínas disminuye la unión de los fragmentos C3 del complemento opsonico (136). Luong y cols., (132) reportaron que las cepas de *S. aureus* productoras de CP5 y CP8 no producen una gran cantidad de cápsulas cuando se cultivan en medio de caldo in vitro. Por ende, es difícil evaluar el papel de

estas cápsulas en la virulencia, porque no se ha desarrollado un modelo animal in vivo adecuado para detectar una diferencia tan pequeña en la producción de cápsulas entre el tipo salvaje y los mutantes deficientes en cápsula. Y en su estudio reflejan que la sobreproducción de CP8 aumentó la virulencia de *S. aureus* en un modelo de bacteriemia murina en el que las bacterias se inocularon intraperitonealmente y se analizaron para determinar su capacidad para diseminarse y sobrevivir en el torrente sanguíneo y los tejidos. Asimismo también sugieren que CP8 ayuda a las bacterias a escapar de la vigilancia inmunológica del huésped a medida que las bacterias se diseminan hacia el torrente sanguíneo y los tejidos (133). Wildeman y cols., (137) en un estudio retrospectivo que incluyó 100 aislamientos de *S. aureus* de infecciones articulares encontraron que los genes que codifican para *cap8H*, *cap8I*, *cap8J* y *cap8K* se asociaron con el éxito del tratamiento, *cap8H* y *cap8I* se asociaron con la erradicación de *S. aureus*. La ausencia de *cap8I*, *cap8J* y *cap8K* en las tres cepas de SASM del presente estudio puede reforzar el resultado anteriormente descrito por Wildeman y cols., (137) correlacionando el efecto inóculo con la ausencia quizá de los genes nombrados anteriormente mostrando la resistencia a cefazolina en dos de las tres cepas.

Los genes que codifican para las proteínas de la familia de γ -hemolisinas encontradas en los genomas de las tres cepas de este estudio fueron γ -hemolisinas AB y CB (HlgAB, HlgCB), que se ha demostrado que causan daño tisular agudo e inflamación y contribuyen a la patogénesis de *S. aureus* en diferentes modelos animales (62) Son toxinas formadoras de poros que inducen la activación celular vinculada a un influjo de Ca^{2+} causando efectos sublétricos (94). HlgA, HlgB, HlgC se dirigen principalmente a los leucocitos (62) El locus γ -hemolisina es parte del genoma central de *S. aureus*, presente en el 99% de los genomas secuenciados de *S. aureus* (62). La administración retroorbital de cantidades de microgramos de HlgAB fue letal para los ratones (138).

También se encontró en los tres aislamientos analizados la presencia del gen *ebp* que codifica para una proteína de unión a la elastina que promueve la colonización bacteriana para facilitar la

patogénesis. En un hospital en Pekin Liu y cols., (142) afirman que esta proteína es propia de las infecciones del tracto urinario por SASM. Nowrouzian y cols., (143) reportaron en un estudio suizo de 68 cepas de *S. aureus* de muestras fecales de 49 bebés que la presencia de Ebp se asociaba con la persistencia de la infección.

Los genes para proteínas ricas en serina y ácido aspártico *sdrC* y *sdrE* fueron encontradas en los tres aislamientos de SASM sin embargo el gen de la proteína *sdrD* no estaba presente. Estas proteínas se unen a la sialoproteína ósea y al fibrinógeno (100). La SdrC promueve tanto la adherencia bacteriana a las superficies como la formación de biopelículas. La expresión de *SdrC* y *SdrD* contribuye a la capacidad de *S. aureus* para adherirse a las células epiteliales nasales descamadas humanas. Peacock y cols., (144) encontraron una fuerte correlación entre la invasividad de *S. aureus* y la presencia de una de las variantes alélicas del gen *sdrE*. La presencia del gen *sdrD* en los aislados de *S. aureus* es más prevalente en las infecciones óseas por eso podríamos explicar su ausencia en este estudio.

Los genes *icaABCD* se encontraron en las tres cepas de este estudio. Estos genes codifican para la adhesión intercelular de polisacárido (PIA), que es una estructura compacta que protege a la comunidad de *S. aureus* contra condiciones ambientales adversas. La formación de biopelículas dependientes de Ica juega un papel importante en las infecciones persistentes en pacientes hospitalizados (145). El operón *ica* contiene 4 genes *icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC* y un represor *icaR*, este operón se ha estudiado mayormente en *S. epidermidis*, sin embargo hay una secuencia de nucleótidos que está relacionada en un 78% con *S. aureus*. *S. aureus* también utiliza *ica ADBC* como adhesinas intercelulares de polisacáridos para la formación de biopelículas. Primeramente, se ha descrito en la mastitis bovina. Adicionalmente se encontró que la producción de PIA fue encontrada esencial para la formación de biopelículas en SASM (94). En varios estudios, las cepas deficientes de *ica* mostraron una reducción en la virulencia (146,147), Por otro lado, en estudio de un modelo de bacteriemia e infección renal (147) la pérdida total del operón *ica* redujo significativamente la cantidad de *S. aureus*

en los riñones pues se evaluó en tres modelos de ratón de infección sistémica: bacteriemia, formación de absceso renal y letalidad después de una infección intraperitoneal. Las cepas de *S. aureus* deficientes de genes *ica* fueron mucho más susceptibles a la muerte opsónica independiente de anticuerpos que implicaba leucocitos de sangre periférica humana y complemento de conejo (147).

En cuanto a genes que codifican para los superantígenos de células T (SAgs) su papel más importante es ejercer una propiedad mitogénica en una célula T con el MHCII en una célula presentadora de antígeno (APC) dando como resultado una proliferación de células T sin embargo a esto le sigue un estado de anergia de las células donde estas células T no proliferan y experimentan apoptosis, evadiendo de esta forma el sistema inmune del huésped. Esta categoría agrupa también a las enterotoxinas estafilocócicas como SEA, SEE y SEB, estos genes no fueron encontradas en las tres cepas de este estudio, estas proteínas se encargan de inducir emesis y diarrea característica importante de una intoxicación alimentaria por estafilococo (62).

Es importante mencionar que los genes para LukSF-PV (leucocidina de Pantón-Valentine, PVL) no se encontraron presente en ninguno de los genomas de los tres aislamientos de este estudio. Esta se asocia sobre todo en aislamientos de SARM pues se ha descrito que más del 90% de las cepas asociadas con infecciones severas como neumonía necrotizante severa e infecciones adquiridas en la comunidad portan esta leucocidina (1,138). La relación entre *S. aureus* que codifica PVL y las infecciones graves en humanos está respaldada por datos epidemiológicos sólidos y datos recientes que utilizan modelos animales de infección (138–141). PVL es un factor crítico en enfermedades invasivas como la osteomielitis y la neumonía en conejos. La eliminación de PVL produce una menor inflamación, reduce las lesiones tisulares y la carga bacteriana, y promueve la supervivencia del huésped. Sorprendentemente, los niveles subclínicos de PVL pueden mejorar la fagocitosis y la muerte de las bacterias por los neutrófilos humanos primarios (62).

Finalmente, no se encontró en los aislamientos de este estudio el gen que codifica para la toxina del síndrome de shock tóxico (TSST-1) toxina importante en la enfermedad sistémica aguda caracterizada por la hipotensión, fiebre, erupción cutánea y descamación (62). Además, tampoco se encontró el gen que codifica para la proteína estafilocócica A (SpA) que es el único superantígeno de células B conocido producido por *S. aureus*. Para las toxinas exfoliativas no encontramos genes que codifican para (ETA y ETAB) que son las causantes del síndrome de piel escaldada estafilocócica (SSSS) (40).

10. Conclusiones

1. Este es el primer estudio que se realiza con aislamientos de SASM de bacteriemia de un mismo paciente que presentan diferencias con el fenotipo de efecto inóculo a cefazolina, con el fin de buscar diferencias genéticas que puedan explicar este fenómeno.
2. Dos aislamientos presentaron efecto inoculo a cefazolina, uno con CIM $>16\mu\text{g/ml}$ (UFC/ml) y el otro aislamiento con CIM de $>128\mu\text{g/ml}$ (UFC/ml). Por otro lado, un aislamiento no presento el fenotipo con una CIM $<8\mu\text{g/ml}$ (UFC/ml).
3. Los genes para la betalactamasa tipo C y alotipo BlaZ-1 fueron encontrados en los 3 aislamientos y las secuencias de proteínas fueron iguales para los tres aislamientos.
4. El gen que codifica para Agr tipo I se encontró en las tres cepas de SASM.
5. Los resultados de determinantes que han sido asociados a efecto inoculo como betalactamasa, alotipo de BlaZ y Agr de las tres cepas indican que el efecto inoculo es un fenotipo multifactorial, como lo sugieren varios estudios, y no se pueden explicar solo por los resultados obtenidos de estos tres determinantes genéticos pues es una población muy limitada.
6. Los tres aislamientos de SASM hicieron parte del mismo linaje genético el ST8.

7. Se encontraron genes que codifican para factores de virulencia en los 3 aislamientos relacionados a colonización, evasión inmune, supervivencia bacteriana, y patogénesis. Indicando que los aislamientos susceptibles a meticilina de este estudio tienen numerosos genes de virulencia y por ende muchas formas de perpetrar la patogenicidad.

Como limitaciones tenemos que es un estudio descriptivo con una población pequeña y tomado de un solo lugar en el mundo, Colombia. Además, se requieren más estudios genéticos para determinar cuáles son las diferencias genéticas de estas tres cepas respecto a la presencia de efecto inóculo.

Referencias

1. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin Microbiol Rev. julio de 2015;28(3):603-61.
2. van Hal SJ, Jensen SO, Vaska VL, Espedido BA, Paterson DL, Gosbell IB. Predictors of Mortality in Staphylococcus aureus Bacteremia. Clin Microbiol Rev. abril de 2012;25(2):362-86.
3. Seas C, Garcia C, Salles MJ, Labarca J, Luna C, Alvarez-Moreno C, et al. Staphylococcus aureus bloodstream infections in Latin America: results of a multinational prospective cohort study. J Antimicrob Chemother. 1 de enero de 2018;73(1):212-22.
4. Flynt LK, Kenney RM, Zervos MJ, Davis SL. The Safety and Economic Impact of Cefazolin versus Nafcillin for the Treatment of Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus Bloodstream Infections. Infect Dis Ther. 1 de junio de 2017;6(2):225-31.
5. Bryant RE. Unsuccessful Treatment of Staphylococcal Endocarditis With Cefazolin. JAMA J Am Med Assoc. 7 de febrero de 1977;237(6):569.
6. Quinn EL, Pohlod D, Madhavan T, Burch K, Fisher E, Cox F. Clinical Experiences with Cefazolin and Other Cephalosporins in Bacterial Endocarditis. J Infect Dis. 1 de octubre de 1973;128(Supplement 2):S386-91.
7. Rincón S, Reyes J, Carvajal LP, Rojas N, Cortés F, Panesso D, et al. Cefazolin high-inoculum effect in methicillin-susceptible Staphylococcus aureus from South American hospitals. J Antimicrob Chemother. diciembre de 2013;68(12):2773-8.
8. Carvajal LP, Rincon S, Echeverri AM, Porras J, Rios R, Ordoñez KM, et al. Novel Insights Into The Classification of Staphylococcal β -Lactamases In Relation To The Cefazolin Inoculum Effect. Antimicrob Agents Chemother. 18 de febrero de 2020;AAC.02511-19, aac;AAC.02511-19v1.
9. Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infection. Clin Infect Dis. 1 de junio de 2008;46(Supplement_5):S350-9.

10. Davis CP. Normal Flora. En: Baron S, editor. Medical Microbiology [Internet]. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996 [citado 25 de septiembre de 2019]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7617/>
11. Rodríguez Tamayo EA, Jiménez Quiceno JN. Factors related with colonization by *Staphylococcus aureus*. *Iatreia*. marzo de 2015;28(1):66-77.
12. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest*. mayo de 2003;111(9):1265-73.
13. Asgeirsson H, Thalme A, Weiland O. *Staphylococcus aureus* bacteraemia and endocarditis – epidemiology and outcome: a review. *Infect Dis*. 4 de marzo de 2018;50(3):175-92.
14. Tibavizco D, Rodríguez JY, Silva E, Cuervo SI, Cortés JA. Enfoque terapéutico de la bacteriemia por *Staphylococcus aureus*. *Biomédica*. junio de 2007;27(2):294-307.
15. David MZ, Boyle-Vavra S, Zychowski DL, Daum RS. Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* as a Predominantly Healthcare-Associated Pathogen: A Possible Reversal of Roles? *PLoS ONE* [Internet]. 13 de abril de 2011 [citado 25 de febrero de 2020];6(4). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3076382/>
16. Public Health Importance of Invasive Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* Infections: Surveillance in 8 US Counties, 2016 | Clinical Infectious Diseases | Oxford Academic [Internet]. [citado 5 de noviembre de 2020]. Disponible en: <https://academic.oup.com/cid/article/70/6/1021/5477381>
17. Stapleton PD, Taylor PW. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Sci Prog*. 2002;85(Pt 1):57-72.
18. Lee AS, de Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primer*. junio de 2018;4(1):18033.
19. Ovalle MV, Rojas SYS, Rodríguez MK, Valderrama CD, Polo CRL. Informe de Resultados de la Vigilancia por Laboratorio de Resistencia antimicrobiana en Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS) 2017. :31.
20. Ervin JN, Kahn JM, Cohen TR, Weingart LR. Teamwork in the Intensive Care Unit. *Am Psychol*. 2018;73(4):468-77.
21. UCI.pdf [Internet]. [citado 19 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.mschs.gov.es/organizacion/sns/planCalidadSNS/docs/UCI.pdf>
22. Nannini EC, Stryjewski ME, Singh KV, Bourgogne A, Rude TH, Corey GR, et al. Inoculum Effect with Cefazolin among Clinical Isolates of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*: Frequency and Possible Cause of Cefazolin Treatment Failure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 de agosto de 2009;53(8):3437-41.
23. Calzadilla Moreira V, Leyva Basterrechea F, Álvarez González J, Castillo García I, Reyes Rojas A, Almira Moraga M. Profilaxis perioperatoria con cefazolina en cirugía ortopédica. *Rev Cuba Med Mil*. septiembre de 2007;36(3):0-0.

24. Shi C, Xiao Y, Zhang Q, Li Q, Wang F, Wu J, et al. Efficacy and safety of cefazolin versus antistaphylococcal penicillins for the treatment of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 11 de octubre de 2018;18(1):508.
25. Eljaaly K, Alshehri S, Erstad BL. Systematic Review and Meta-analysis of the Safety of Antistaphylococcal Penicillins Compared to Cefazolin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 de abril de 2018;62(4):e01816-17.
26. Machado-Alba JE, González-Santos DM. Dispensación de antibióticos de uso ambulatorio en una población colombiana. *Rev Salud Pública*. 1 de septiembre de 2009;11(5):734-44.
27. Wang SK, Gilchrist A, Loukitcheva A, Plotkin BJ, Sigar IM, Gross AE, et al. Prevalence of a Cefazolin Inoculum Effect Associated with blaZ Gene Types among Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Isolates from Four Major Medical Centers in Chicago. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 27 de julio de 2018 [citado 21 de septiembre de 2019];62(8). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6105856/>
28. Nannini EC, Singh KV, Murray BE. Relapse of type A beta-lactamase-producing *Staphylococcus aureus* native valve endocarditis during cefazolin therapy: revisiting the issue. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1 de noviembre de 2003;37(9):1194-8.
29. Chong YP, Park S-J, Kim ES, Bang K-M, Kim M-N, Kim S-H, et al. Prevalence of blaZ gene types and the cefazolin inoculum effect among methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* blood isolates and their association with multilocus sequence types and clinical outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. febrero de 2015;34(2):349-55.
30. Livorsi DJ, Crispell E, Satola SW, Burd EM, Jerris R, Wang YF, et al. Prevalence of blaZ gene types and the inoculum effect with cefazolin among bloodstream isolates of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. agosto de 2012;56(8):4474-7.
31. Wi YM, Park YK, Moon C, Ryu SY, Lee H, Ki HK, et al. The cefazolin inoculum effect in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* blood isolates: their association with dysfunctional accessory gene regulator (agr). *Diagn Microbiol Infect Dis*. noviembre de 2015;83(3):286-91.
32. Hincapié-Osorno C, Caraballo-Cordovez C, Tibaduiza-García MF, Garcés-Rodríguez D de J, Echeverri-Toro L, Ascuntar-Tello J, et al. Caracterización clínica y microbiológica de la bacteriemia por *Staphylococcus aureus*. *Acta Médica Colomb*. 15 de diciembre de 2018;43(4):200-6.
33. Miller WR, Seas C, Carvajal LP, Diaz L, Echeverri AM, Ferro C, et al. The Cefazolin Inoculum Effect Is Associated With Increased Mortality in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Open Forum Infect Dis*. 1 de junio de 2018;5(6):ofy123.
34. Loubet P, Burdet C, Vindrios W, Grall N, Wolff M, Yazdanpanah Y, et al. Cefazolin versus anti-staphylococcal penicillins for treatment of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a narrative review. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. febrero de 2018;24(2):125-32.

35. Quainoo S, Coolen JPM, van Hijum SAFT, Huynen MA, Melchers WJG, van Schaik W, et al. Whole-Genome Sequencing of Bacterial Pathogens: the Future of Nosocomial Outbreak Analysis. *Clin Microbiol Rev.* octubre de 2017;30(4):1015-63.
36. Castellano-González MJ, Perozo-Mena AJ, Vivas-Vega RL, Ginestre-Pérez MM, Rincón-Villalobos GC. Tipificación molecular y fenotípica de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SAMR) en un hospital universitario. *Rev Chil Infectol.* febrero de 2009;26(1):39-48.
37. Moreno Switt AI, Toledo V. Infectología en la era de la genómica. *Rev Chil Infectol.* octubre de 2015;32(5):571-6.
38. Information NC for B, Pike USNL of M 8600 R, MD B, Usa 20894. National Center for Biotechnology Information [Internet]. [citado 8 de septiembre de 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
39. Sci-Hub | Worldwide Epidemiology and Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus Aureus*, 21–56 | 10.1007/82_2016_3 [Internet]. [citado 25 de septiembre de 2019]. Disponible en: https://sci-hub.tw/10.1007/82_2016_3
40. Oliveira D, Borges A, Simões M. *Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. *Toxins.* junio de 2018;10(6):252.
41. Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. Características generales del *Staphylococcus aureus*. :13.
42. Acera VA. Tipificación molecular y estudio de clonalidad de “*Staphylococcus aureus*” resistente a meticilina, productores de infecciones intrahospitalarias y extrahospitalarias en Extremadura. :251.
43. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother.* 1 de julio de 2001;48(suppl_1):5-16.
44. Youssef D, Molony K. *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Adults. *Front IStaphylococcus Aureusi* [Internet]. 8 de marzo de 2017 [citado 15 de febrero de 2020]; Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/frontiers-in-i-staphylococcus-aureus-i-/staphylococcus-aureus-bacteremia-in-adults>
45. Le KY, Otto M. Quorum-sensing regulation in staphylococci—an overview. *Front Microbiol* [Internet]. 27 de octubre de 2015 [citado 9 de diciembre de 2019];6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4621875/>
46. Fang G. Prosthetic Valve Endocarditis Resulting from Nosocomial Bacteremia: A Prospective, Multicenter Study. *Ann Intern Med.* 1 de octubre de 1993;119(7_Part_1):560.
47. De La Rosa G, León AL, Jaimes F. Epidemiología y pronóstico de pacientes con infección del torrente sanguíneo en 10 hospitales de Colombia. *Rev Chil Infectol.* abril de 2016;33(2):141-9.
48. Waters CM, Bassler BL. QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol.* noviembre de 2005;21(1):319-46.

49. Novick RP, Geisinger E. Quorum Sensing in Staphylococci. *Annu Rev Genet.* diciembre de 2008;42(1):541-64.
50. Gray B, Hall P, Gresham H. Targeting agr- and agr-Like Quorum Sensing Systems for Development of Common Therapeutics to Treat Multiple Gram-Positive Bacterial Infections. *Sensors.* 18 de abril de 2013;13(4):5130-66.
51. Cheung GYC, Wang R, Khan BA, Sturdevant DE, Otto M. Role of the Accessory Gene Regulator agr in Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Pathogenesis. *Infect Immun.* mayo de 2011;79(5):1927-35.
52. Cheung AL, Eberhardt KJ, Chung E, Yeaman MR, Sullam PM, Ramos M, et al. Diminished virulence of a sar-/agr- mutant of Staphylococcus aureus in the rabbit model of endocarditis. [Internet]. 1994 [citado 24 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://www.jci.org/articles/view/117530/pdf>
53. Vuong C, Saenz HL, Götz F, Otto M. Impact of the agr Quorum-Sensing System on Adherence to Polystyrene in Staphylococcus aureus. *J Infect Dis.* 1 de diciembre de 2000;182(6):1688-93.
54. Queck SY, Jameson-Lee M, Villaruz AE, Bach T-HL, Khan BA, Sturdevant DE, et al. RNAlII-independent target gene control by the agr quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in Staphylococcus aureus. *Mol Cell.* 10 de octubre de 2008;32(1):150-8.
55. Alonzo F, Torres VJ. The Bicomponent Pore-Forming Leucocidins of Staphylococcus aureus. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* junio de 2014;78(2):199-230.
56. Bocchini CE. Panton-Valentine Leukocidin Genes Are Associated With Enhanced Inflammatory Response and Local Disease in Acute Hematogenous Staphylococcus aureus Osteomyelitis in Children. *PEDIATRICS.* 1 de febrero de 2006;117(2):433-40.
57. III FA, Kozhaya L, Rawlings SA, Reyes-Robles T, DuMont AL, Myszka DG, et al. CCR5 is a receptor for Staphylococcus aureus leukotoxin ED. *Nature.* 3 de enero de 2013;493(7430):51-5.
58. DuMont AL, Yoong P, Surewaard BGJ, Benson MA, Nijland R, van Strijp JAG, et al. Staphylococcus aureus elaborates leukocidin AB to mediate escape from within human neutrophils. *Infect Immun.* mayo de 2013;81(5):1830-41.
59. Date SV, Modrusan Z, Lawrence M, Morisaki JH, Toy K, Shah IM, et al. Global gene expression of methicillin-resistant Staphylococcus aureus USA300 during human and mouse infection. *J Infect Dis.* 15 de mayo de 2014;209(10):1542-50.
60. Muttaiyah S, Coombs G, Pandey S, Reed P, Ritchie S, Lennon D, et al. Incidence, Risk Factors, and Outcomes of Panton-Valentine Leukocidin-Positive Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus Infections in Auckland, New Zealand. *J Clin Microbiol.* 1 de octubre de 2010;48(10):3470-4.
61. Hewagama S, Spelman T, Woolley M, McLeod J, Gordon D, Einsiedel L. The Epidemiology of Staphylococcus aureus and Panton-Valentine Leukocidin (pvl) in Central Australia, 2006-

2010. BMC Infect Dis [Internet]. 8 de agosto de 2016 [citado 26 de febrero de 2020];16. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4977826/>
62. Tam K, Torres VJ. Staphylococcus aureus Secreted Toxins & Extracellular Enzymes. Microbiol Spectr [Internet]. marzo de 2019 [citado 16 de abril de 2020];7(2). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6422052/>
63. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of Resistance: Staphylococcus aureus in the Antibiotic Era. Nat Rev Microbiol. septiembre de 2009;7(9):629-41.
64. Holland TL, Arnold C, Fowler VG. Clinical Management of *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Review. JAMA. 1 de octubre de 2014;312(13):1330.
65. Li J, Echevarria KL, Traugott KA. β -Lactam Therapy for Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Comparative Review of Cefazolin versus Antistaphylococcal Penicillins. Pharmacotherapy. 2017;37(3):346-60.
66. Cefazolin: Drug information - UpToDate [Internet]. [citado 30 de agosto de 2019]. Disponible en: https://www-uptodate-com.ezproxy.unbosque.edu.co/contents/cefazolin-drug-information?search=what%20is%20cefazolin&topicRef=480&source=see_link
67. Cephalosporins - UpToDate [Internet]. [citado 30 de agosto de 2019]. Disponible en: https://www-uptodate-com.ezproxy.unbosque.edu.co/contents/cephalosporins?search=what%20is%20cefazolin&source=search_result&selectedTitle=2~120&usage_type=default&display_rank=1
68. Lee S, Song K-H, Jung S-I, Park WB, Lee SH, Kim Y-S, et al. Comparative outcomes of cefazolin versus nafcillin for methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a prospective multicentre cohort study in Korea. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. febrero de 2018;24(2):152-8.
69. Schweizer ML, Furuno JP, Harris AD, Johnson JK, Shardell MD, McGregor JC, et al. Comparative effectiveness of nafcillin or cefazolin versus vancomycin in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. BMC Infect Dis. 19 de octubre de 2011;11(1):279.
70. McDanel JS, Roghmann M-C, Perencevich EN, Ohl ME, Goto M, Livorsi DJ, et al. Comparative Effectiveness of Cefazolin Versus Nafcillin or Oxacillin for Treatment of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Infections Complicated by Bacteremia: A Nationwide Cohort Study. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 01 de 2017;65(1):100-6.
71. Nannini EC, Singh KV, Murray BE. Relapse of Type A β -Lactamase-Producing *Staphylococcus aureus* Native Valve Endocarditis during Cefazolin Therapy: Revisiting the Issue. Clin Infect Dis. 2003;37(9):1194-8.
72. Arias CA, Reyes J, Carvajal LP, Rincon S, Diaz L, Panesso D, et al. A Prospective Cohort Multicenter Study of Molecular Epidemiology and Phylogenomics of *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Nine Latin American Countries. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(10).

73. Lenhard JR, Bulman ZP. Inoculum effect of β -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 6 de junio de 2019;dkz226.
74. Reymann MT, Holley HP, Cobbs CG. Persistent bacteremia in staphylococcal endocarditis. *Am J Med.* noviembre de 1978;65(5):729-37.
75. Singh KV, Tran TT, Nannini EC, Tam VH, Arias CA, Murray BE. Efficacy of Ceftaroline against Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Exhibiting the Cefazolin High-Inoculum Effect in a Rat Model of Endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 de julio de 2017;61(7):e00324-17.
76. Sabath LD, Garner C, Wilcox C, Finland M. Effect of Inoculum and of Beta-Lactamase on the Anti-Staphylococcal Activity of Thirteen Penicillins and Cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* septiembre de 1975;8(3):344-9.
77. Lee SH, Park WB, Lee S, Park S, Kim SW, Lee J-M, et al. Association between Type A blaZ Gene Polymorphism and Cefazolin Inoculum Effect in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 de noviembre de 2016;60(11):6928-32.
78. Takenouchi T, Utsui Y, Ohya S, Nishino T. Role of β -lactamase of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in resistance to first-generation oral cepheims both in vitro and in vivo. *J Antimicrob Chemother.* 1 de diciembre de 1994;34(6):909-20.
79. Lee S, Kwon KT, Kim H-I, Chang HH, Lee J-M, Choe PG, et al. Clinical implications of cefazolin inoculum effect and β -lactamase type on methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Microb Drug Resist Larchmt N.* diciembre de 2014;20(6):568-74.
80. Nannini EC, Stryjewski ME, Singh KV, Rude TH, Corey GR, Fowler VG, et al. Determination of an Inoculum Effect with Various Cephalosporins among Clinical Isolates of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 de mayo de 2010;54(5):2206-8.
81. Zygmunt DJ, Stratton CW, Kernodle DS. Characterization of four beta-lactamases produced by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992;36(2):440-5.
82. Song K-H, Jung S-I, Lee S, Park S, Kiem SM, Lee SH, et al. Characteristics of cefazolin inoculum effect-positive methicillin-susceptible *staphylococcus aureus* infection in a multicentre bacteraemia cohort. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* febrero de 2017;36(2):285-94.
83. Saeki M, Shinagawa M, Yakuwa Y, Nirasawa S, Sato Y, Yanagihara N, et al. Inoculum effect of high concentrations of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* on the efficacy of cefazolin and other beta-lactams. *J Infect Chemother.* marzo de 2018;24(3):212-5.
84. Nannini EC, Stryjewski ME, Singh KV, Rude TH, Corey GR, Fowler VG, et al. Determination of an Inoculum Effect with Various Cephalosporins among Clinical Isolates of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* mayo de 2010;54(5):2206-8.
85. Nannini EC, Singh KV, Arias CA, Murray BE. In Vivo Effects of Cefazolin, Daptomycin, and Nafcillin in Experimental Endocarditis with a Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*

- Strain Showing an Inoculum Effect against Cefazolin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 de septiembre de 2013;57(9):4276-81.
86. Fields MT, Herndon BL, Bamberger DM. beta-Lactamase-mediated inactivation and efficacy of cefazolin and cefmetazole in *Staphylococcus aureus* abscesses. *Antimicrob Agents Chemother.* febrero de 1993;37(2):203-6.
87. Dunman PM, Murphy E, Haney S, Palacios D, Tucker-Kellogg G, Wu S, et al. Transcription Profiling-Based Identification of *Staphylococcus aureus* Genes Regulated by the agr and/or sarA Loci. *J Bacteriol.* diciembre de 2001;183(24):7341-53.
88. Tsuji BT, Harigaya Y, Lesse AJ, Sakoulas G, Mylotte JM. Loss of vancomycin bactericidal activity against accessory gene regulator (agr) dysfunctional *Staphylococcus aureus* under conditions of high bacterial density. *Diagn Microbiol Infect Dis.* junio de 2009;64(2):220-4.
89. Viedma E, Sanz F, Orellana MA, San Juan R, Aguado JM, Otero JR, et al. Relationship between agr dysfunction and reduced vancomycin susceptibility in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* causing bacteraemia. *J Antimicrob Chemother.* 1 de enero de 2014;69(1):51-8.
90. Lee SO, Lee S, Park S, Lee JE, Lee SH. The Cefazolin Inoculum Effect and the Presence of type A bla_Z Gene according to agr Genotype in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Infect Chemother.* diciembre de 2019;51(4):376-85.
91. Morejón García M. Betalactamasas de espectro extendido. *Rev Cuba Med.* diciembre de 2013;52(4):272-80.
92. Richmond MH. Wild-type variants of exopenicillinase from *Staphylococcus aureus*. *Biochem J.* marzo de 1965;94(3):584-93.
93. Voladri RKR, Tummuru MKR, Kernodle DS. Structure-Function Relationships among Wild-Type Variants of *Staphylococcus aureus* ^{III}-Lactamase: Importance of Amino Acids 128 and 216. *J BACTERIOL.* 1996;178:6.
94. VFDB - «Toxin» Virulence Factors in *Staphylococcus* [Internet]. [citado 31 de agosto de 2020]. Disponible en: <http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/vfs.cgi?VFID=VF0007#VF0007>
95. Multalin interface page [Internet]. [citado 16 de abril de 2020]. Disponible en: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>
96. Public databases for molecular typing - PubMLST.org [Internet]. [citado 16 de abril de 2020]. Disponible en: <https://pubmlst.org/>
97. Multilocus sequence typing (MLST) [Internet]. [citado 21 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://pubmlst.org/general.shtml>
98. 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.* noviembre de 2002;40(11):4060-7.
99. 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 Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. enero de 2004;23(1):15-9.
100. Multalin help page [Internet]. [citado 14 de agosto de 2020]. Disponible en: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/help.html#Introduction>
 101. CGE Server [Internet]. [citado 14 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>
 102. About PubMLST.org [Internet]. [citado 14 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://pubmlst.org/about.shtml>
 103. How do you put a genome back together after sequencing? [Internet]. yourgenome. [citado 14 de septiembre de 2020]. Disponible en: </facts/how-do-you-put-a-genome-back-together-after-sequencing>
 104. Lee S, Kwon KT, Kim H-I, Chang HH, Lee J-M, Choe PG, et al. Clinical Implications of Cefazolin Inoculum Effect and β -Lactamase Type on Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia. Microb Drug Resist. diciembre de 2014;20(6):568-74.
 105. Kaplan SL, Hulten KG, Gonzalez BE, Hammerman WA, Lamberth L, Versalovic J, et al. Three-year surveillance of community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in children. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 15 de junio de 2005;40(12):1785-91.
 106. Mongkolrattanothai K, Aldag JC, Mankin P, Gray BM. Epidemiology of community-onset *Staphylococcus aureus* infections in pediatric patients: an experience at a Children's Hospital in central Illinois. BMC Infect Dis. 16 de julio de 2009;9:112.
 107. Havaei SA, Vidovic S, Tahmineh N, Mohammad K, Mohsen K, Starnino S, et al. Epidemic Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Lineages Are the Main Cause of Infections at an Iranian University Hospital ∇ . J Clin Microbiol. noviembre de 2011;49(11):3990-3.
 108. Mirani ZA, Aziz M, Khan MN, Lal I, Hassan N ul, Khan SI. Biofilm formation and dispersal of *Staphylococcus aureus* under the influence of oxacillin. Microb Pathog. agosto de 2013;61-62:66-72.
 109. Fowler VG, Sakoulas G, McIntyre LM, Meka VG, Arbeit RD, Cabell CH, et al. Persistent Bacteremia Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection Is Associated with agr Dysfunction and Low-Level In Vitro Resistance to Thrombin-Induced Platelet Microbicidal Protein. J Infect Dis. 15 de septiembre de 2004;190(6):1140-9.
 110. Joo H-S, Chan JL, Cheung GYC, Otto M. Subinhibitory Concentrations of Protein Synthesis-Inhibiting Antibiotics Promote Increased Expression of the agr Virulence Regulator and Production of Phenol-Soluble Modulin Cytolysins in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. noviembre de 2010;54(11):4942-4.
 111. (PDF) The Enigmatic Esx Proteins: Looking Beyond Mycobacteria [Internet]. [citado 14 de mayo de 2020]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/310837792_The_Enigmatic_Esx_Proteins_Looking_Beyond_Mycobacteria

112. Warne B, Harkins CP, Harris SR, Vatsiou A, Stanley-Wall N, Parkhill J, et al. The Ess/Type VII secretion system of *Staphylococcus aureus* shows unexpected genetic diversity. *BMC Genomics* [Internet]. 11 de marzo de 2016 [citado 20 de mayo de 2020];17. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4788903/>
113. Windmüller N, Witten A, Block D, Bunk B, Spröer C, Kahl BC, et al. Transcriptional adaptations during long-term persistence of *Staphylococcus aureus* in the airways of a cystic fibrosis patient. *Int J Med Microbiol*. 1 de enero de 2015;305(1):38-46.
114. Anderson M, Chen Y-H, Butler EK, Missiakas DM. EsaD, a Secretion Factor for the Ess Pathway in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 1 de abril de 2011;193(7):1583-9.
115. Role of the ESAT-6 secretion system in virulence of the emerging community-associated *Staphylococcus aureus* lineage ST398 [Internet]. [citado 31 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4844983/>
116. Janzon L, Arvidson S. The role of the delta-lysin gene (*hld*) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *EMBO J*. mayo de 1990;9(5):1391-9.
117. Motamedi H, Asghari B, Tahmasebi H, Arabestani MR. Identification of Hemolysine Genes and their Association with Antimicrobial Resistance Pattern among Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* in West of Iran. *Adv Biomed Res* [Internet]. 19 de diciembre de 2018 [citado 1 de septiembre de 2020];7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6319038/>
118. Arabestani MR, Rastiyani S, Alikhani MY, Mousavi SF. The Relationship Between Prevalence of Antibiotics Resistance and Virulence Factors Genes of MRSA and MSSA Strains Isolated from Clinical Samples, West Iran. *Oman Med J*. marzo de 2018;33(2):134-40.
119. Osman K, Alvarez-Ordóñez A, Ruiz L, Badr J, ElHofy F, Al-Maary KS, et al. Antimicrobial resistance and virulence characterization of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from imported beef meat. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* [Internet]. 10 de mayo de 2017 [citado 1 de septiembre de 2020];16. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5424316/>
120. Loughran AJ, Atwood DN, Anthony AC, Harik NS, Spencer HJ, Beenken KE, et al. Impact of individual extracellular proteases on *Staphylococcus aureus* biofilm formation in diverse clinical isolates and their isogenic *sarA* mutants. *MicrobiologyOpen*. diciembre de 2014;3(6):897-909.
121. Pérez-Montarelo D, Viedma E, Larrosa N, Gómez-González C, Ruiz de Gopegui E, Muñoz-Gallego I, et al. Molecular Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Bacteremia: Association of Molecular Factors With the Source of Infection. *Front Microbiol* [Internet]. 25 de septiembre de 2018 [citado 22 de febrero de 2020];9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6167439/>
122. Lebughe M, Phaku P, Niemann S, Mumba D, Peters G, Muyembe-Tamfum J-J, et al. The Impact of the *Staphylococcus aureus* Virulome on Infection in a Developing Country: A Cohort Study. *Front Microbiol* [Internet]. 29 de agosto de 2017 [citado 1 de septiembre de 2020];8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5581934/>

123. Salgado-Pabón W, Herrera A, Vu BG, Stach CS, Merriman JA, Spaulding AR, et al. Staphylococcus aureus β -toxin Production is Common in Strains With the β -toxin Gene Inactivated by Bacteriophage. *J Infect Dis*. 1 de septiembre de 2014;210(5):784-92.
124. Winkler KC, De Waart J, Grooten C, Zegers BJM, Tellier NF, Vertregt CD. Lysogenic Conversion of Staphylococci to Loss of β -Toxin. *J Gen Microbiol*. 1 de junio de 1965;39(3):321-33.
125. Muñoz-Guillén NM, León-López R, de la Cal-Ramírez MA, Dueñas-Jurado JM. Síndrome de fuga capilar sistémica: hipoalbuminemia, hemoconcentración y shock. A propósito de un caso. *Med Fam SEMERGEN*. 1 de marzo de 2014;40(2):e33-6.
126. Imamura T, Tanase S, Szmyd G, Kozik A, Travis J, Potempa J. Induction of vascular leakage through release of bradykinin and a novel kinin by cysteine proteinases from *Staphylococcus aureus*. *J Exp Med*. 16 de mayo de 2005;201(10):1669-76.
127. Chen X, Alonzo F. Bacterial lipolysis of immune-activating ligands promotes evasion of innate defenses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 de febrero de 2019;116(9):3764-73.
128. VFDB - Iron uptake virulence factors in *Staphylococcus* [Internet]. [citado 20 de noviembre de 2020]. Disponible en: <http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/vfs.cgi?VFID=VF0015#VF0015>
129. Torres VJ, Pishchany G, Humayun M, Schneewind O, Skaar EP. *Staphylococcus aureus* IsdB Is a Hemoglobin Receptor Required for Heme Iron Utilization. *J Bacteriol*. diciembre de 2006;188(24):8421-9.
130. The iron-regulated surface determinant B (IsdB) protein from *Staphylococcus aureus* acts as a receptor for the host protein vitronectin. :28.
131. Lee LY, Miyamoto YJ, McIntyre BW, Höök M, McCrea KW, McDevitt D, et al. The *Staphylococcus aureus* Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses. *J Clin Invest*. 15 de noviembre de 2002;110(10):1461-71.
132. Luong TT, Lee CY. Overproduction of Type 8 Capsular Polysaccharide Augments *Staphylococcus aureus* Virulence. *Infect Immun*. julio de 2002;70(7):3389-95.
133. Nanra JS, Buitrago SM, Crawford S, Ng J, Fink PS, Hawkins J, et al. Capsular polysaccharides are an important immune evasion mechanism for *Staphylococcus aureus*. *Hum Vaccines Immunother*. 18 de marzo de 2013;9(3):480-7.
134. Cunnion KM, Zhang H-M, Frank MM. Availability of Complement Bound to *Staphylococcus aureus* To Interact with Membrane Complement Receptors Influences Efficiency of Phagocytosis. *Infect Immun*. febrero de 2003;71(2):656-62.
135. Cunnion KM, Lee JC, Frank MM. Capsule Production and Growth Phase Influence Binding of Complement to *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. noviembre de 2001;69(11):6796-803.
136. Fattom AI, Sarwar J, Ortiz A, Naso R. A *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide (CP) vaccine and CP-specific antibodies protect mice against bacterial challenge. *Infect Immun*. mayo de 1996;64(5):1659-65.

137. Wildeman P, Tevell S, Eriksson C, Lagos AC, Söderquist B, Stenmark B. Genomic characterization and outcome of prosthetic joint infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep.* 3 de abril de 2020;10(1):5938.
138. Diep BA, Le VTM, Badiou C, Le HN, Pinheiro MG, Duong AH, et al. IVIG-mediated protection against necrotizing pneumonia caused by MRSA. *Sci Transl Med.* 21 de septiembre de 2016;8(357):357ra124-357ra124.
139. Hamilton SM, Bryant AE, Carroll KC, Lockary V, Ma Y, McIndoo E, et al. In Vitro Production of Pantone-Valentine Leukocidin among Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Causing Diverse Infections. *Clin Infect Dis.* 15 de diciembre de 2007;45(12):1550-8.
140. Tromp AT, Van Gent M, Abrial P, Martin A, Jansen JP, De Haas CJC, et al. Human CD45 is an F-component-specific receptor for the staphylococcal toxin Pantone-Valentine leukocidin. *Nat Microbiol.* junio de 2018;3(6):708-17.
141. Boakes E, Kearns AM, Badiou C, Lina G, Hill RL, Ellington MJ. Do Differences in Pantone-Valentine Leukocidin Production among International Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones Affect Disease Presentation and Severity? *J Clin Microbiol.* mayo de 2012;50(5):1773-6.
142. Liu M, Liu J, Guo Y, Zhang Z. Characterization of Virulence Factors and Genetic Background of *Staphylococcus aureus* Isolated from Peking University People's Hospital Between 2005 and 2009. *Curr Microbiol.* 1 de noviembre de 2010;61(5):435-43.
143. Nowrouzian FL, Dauwalder O, Meugnier H, Bes M, Etienne J, Vandenesch F, et al. Adhesin and Superantigen Genes and the Capacity of *Staphylococcus aureus* to Colonize the Infantile Gut. *J Infect Dis.* 1 de septiembre de 2011;204(5):714-21.
144. Peacock SJ, Day NPJ, Thomas MG, Berendt AR, Foster TJ. Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* Exhibit Diversity in *fnb* Genes and Adhesion to Human Fibronectin. *J Infect.* julio de 2000;41(1):23-31.
145. Ghasemian A, Peerayeh SN, Bakhshi B, Mirzaee M. Comparison of Biofilm Formation between Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Iran Biomed J.* :7.
146. Arciola CR, Campoccia D, Ravaioli S, Montanaro L. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 10 de febrero de 2015 [citado 2 de septiembre de 2020];5. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fcimb.2015.00007/abstract>
147. Kropec A, Maira-Litran T, Jefferson KK, Grout M, Cramton SE, Götz F, et al. Poly-N-Acetylglucosamine Production in *Staphylococcus aureus* Is Essential for Virulence in Murine Models of Systemic Infection. *Infect Immun.* octubre de 2005;73(10):6868-76.