



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Doctorado en Ciencias, Mención Microbiología

**“EFECTO INDIVIDUAL DE ANTIBIÓTICOS Y EN COMBINACIÓN CON  $\beta$ -  
CLORO-L-ALANINA EN LA EXPRESIÓN DE FACTORES DE  
VIRULENCIA RELACIONADOS CON LA FORMACIÓN DE  
BIOPELÍCULAS DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A  
METICILINA DE ORIGEN INTRAHOSPITALARIO.”**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias  
Mención Microbiología

MARIO ANDRÉS QUEZADA AGUILUZ  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2023

Profesor Guía: Gerardo Enrique González Rocha  
Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

---

Dr. Gerardo González Rocha  
Profesor Guía de Tesis  
Departamento de Microbiología,  
Facultad de Ciencias Biológicas.  
Universidad de Concepción

---

Dra. Helia Bello Toledo  
Profesor Co-Guía de Tesis  
Departamento de Microbiología,  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dr. Gustavo Medina Schwerter  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Universidad Católica de Temuco

---

Dr. José Manuel Munita  
Instituto de Ciencias e Innovación en  
Medicina, Facultad de Medicina  
Clínica Alemana  
Universidad del Desarrollo

---

Dr. Andrés Opazo Capurro  
Departamento de Microbiología,  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dr. Víctor Campos Araneda  
Director  
Doctorado en Cs, Mención Microbiología  
Universidad de Concepción

## **TESIS FINANCIADA POR**

- Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo ANID / Beca de Doctorado Nacional N.º 2017 21171278
- Proyecto VRID N° 218.085.040-1.0IN, Universidad de Concepción.
- Proyecto 1171805, Fondo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (FONDECYT) de Chile.

## AGRADECMIIENTOS

Quisiera partir agradeciendo al Dr. Gerardo González Rocha por su apoyo, consejo y mentoría, tanto en la realización de este proyecto, como en todo mi proceso de formación desde mi carrera de pregrado hasta el final de este doctorado. Gracias por la dedicación y las palabras de aliento, y por todas aquellas actividades fuera de su labor como docente que hicieron que sus alumnos sientan el laboratorio como un hogar, y a sus integrantes como una familia; y eso es algo que quienes tenemos a nuestros seres queridos lejos, valoramos aún más. Sin duda alguna, ese sentimiento es algo que siempre voy a atesorar.

A la Dra. Helia Bello Toledo, por todo lo que me enseñó tanto en las aulas como fuera de ellas; fue un lujo tenerla como profesora, como guía dentro de mi formación académica; y por qué no decirlo, en la vida, cuando más de una vez necesité una voz firme para enderezar el camino y volver a levantarme. Gracias por tomarse el tiempo para entregar no sólo conocimiento académico a sus alumnos.

A la profesora Mariana Domínguez Yévenes, gracias por enseñarme tanto en las aulas y en la vida, gracias por su asistencia y guía en mi trabajo de laboratorio. Gracias por celebrar todas mis locuras. Creo que cada vez que entraba a su oficina y le sacaba una carcajada, me hacía mucho mejor a mi que a ella.

Al Dr. Andrés Opazo-Capurro, le debo mucho más que sólo mi formación académica. Tengo mucho que agradecerle por su mentoría y por sus consejos dentro y fuera de las aulas; fue un lujo tenerlo como docente durante mi paso por el programa de doctorado, y aún más como amigo, soporte, confidente, *partner*.

Al Dr. Felipe Morales León, por toda su ayuda y apoyo durante este proceso. Agradezco enormemente su tiempo y amistad.

A mis compañeros del Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos, por la acogida y ayuda en el periodo que duró esta gran experiencia; lo cual sin duda alguna, la hizo mucho más amena y enriquecedora. A mis amigos Xabier Villanueva, Alexis Opazo, Raúl Molina, Tomás Kappes, Javier Zenis; entre tantos otros buenos compañeros que tuve el agrado de conocer en todos estos años de laboratorio.

A mis amigos, el Dr. Sergio Mella, Dr. Alejandro Aguayo y la Dra. Gisela Riedel, gracias por tanto. Su amistad es una de los grandes regalos que me dejó este proceso.

A Felipe Parada y Horacio Sanhueza, por todo el apoyo y ánimo para terminar este proceso. Fueron parte importante para llegar a término.

A Rodrigo Martínez y al Dr. José Munita, de GerM Lab.

A mi familia, mis padres y hermanos, por su apoyo valioso e incondicional.

A Alejandra Cuevas, por su apoyo, soporte, contención en los momentos más difíciles de este proceso. Gracias por toda tu entrega y sacrificio.

Al profesor Hugo Moyano (Q.E.P.D.), por cimentar el camino hasta acá con su invaluable apoyo...

A mi sobrino Tomás, por ser la fuente de inspiración de todas mis locuras y momentos de lucidez...

Gracias.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>13</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>18</b>
<b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>23</b>
Factores de virulencia en <i>S. aureus</i> .....	30
Factores de adherencia en <i>S. aureus</i> .....	32
Proteínas de unión a fibronectina A y B .....	32
Producción de biopelículas en SARM .....	34
Antibióticos utilizados en el tratamiento de SARM.....	40
<b>CAPÍTULO II: PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN, HIPÓTESIS, OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>46</b>
Hipótesis.....	46
Objetivo general .....	47
Objetivos específicos .....	47
<b>CAPÍTULO III: METODOLOGÍA</b> .....	<b>48</b>
Cepas bacterianas. ....	48
Confirmación de las cepas.....	48
Estudios de susceptibilidad antimicrobiana .....	49
Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CMI) .....	49
Caracterización de las cepas.....	50
Estudios de relación genética. ....	51
Ensayos de formación y erradicación de biopelículas .....	53
Ensayos de adherencia.....	53
Ensayos de formación y erradicación de biopelículas en presencia de antibióticos y $\beta$ -CLA .....	54
Análisis de microscopía confocal de la biopelícula en placa de acero inoxidable .....	56
Ensayos de expresión de genes de virulencia. ....	56
Análisis estadísticos.....	57
Aspectos bioéticos y de bioseguridad .....	59
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS</b> .....	<b>64</b>
Confirmación de las cepas.....	64
Caracterización de las cepas.....	64
Estudios de susceptibilidad antimicrobiana.....	68

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CMI) .....	70
Genes de resistencia a antibióticos .....	71
Genes de virulencia .....	73
Estudios de relación genética .....	79
Ensayos de formación y erradicación de biopelículas .....	81
Ensayos de adherencia.....	81
Ensayos de formación y erradicación de biopelículas en presencia de antibióticos y $\beta$ -CLA .....	83
<b>CAPÍTULO V: DISCUSIÓN .....</b>	<b>90</b>
<b>CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES .....</b>	<b>106</b>
<b>PROYECCIONES.....</b>	<b>107</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>108</b>
<b>Phenotypic and Genotypic Characterization of Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B Resistance Among Clinical Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> Isolates in Chile.....</b>	<b>129</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estructura de la proteína de unión a penicilina 2a (PBP2a) de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina (MRSA). .....	24
<b>Figura 2:</b> Comparación esquemática de los actuales tipos de SCCmec. (Tomado de Yuki Uehara, 2022. Antibiotics (Basel) 2022 Jan 11;11(1):86.) .....	25
<b>Figura 3:</b> Regulación de la expresión génica y quorum sensing en <i>S. aureus</i> , mediante el sistema agr. Tomado de Crit Care. 2008;12(6):236.....	31
<b>Figura 4:</b> Factores de virulencia de <i>S. aureus</i> . Tomado de Zeconi & Scali 2013. Immunol Lett. 2013; 150:12–22. ....	33
<b>Figura 5:</b> Ciclo de vida de una biopelícula bacteriana. Tomado de Reffuveille et al.; (2017). <i>Staphylococcus aureus</i> Biofilms and their Impact on the Medical Field. The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in <i>Staphylococcus aureus</i> . InTech. <a href="http://dx.doi.org/10.5772/67546">http://dx.doi.org/10.5772/67546</a> .....	35
<b>Figura 6:</b> Estructura del sistema (a) y operón (b) icaADBC. Tomado de Nat Rev Microbiol. 2009 Aug; 7(8): 555–567.....	38
<b>Figura 7:</b> Criterios de inclusión para elección de cepas para el estudio del efecto de antibióticos en combinación con $\beta$ -CLA. ....	51
<b>Figura 8:</b> Esquema de ensayos de formación y erradicación de biopelículas en presencia de antibióticos y $\beta$ -CLA (diseño propio).....	55
<b>Figura 9:</b> Distribución del elemento SCCmec en 50 cepas de SARM aisladas en hospitales de Chile .....	65



<b>Figura 10:</b> Tipos de secuencia (ST) encontrados en 50 cepas de SARM-AH aisladas en hospitales de Chile .....	66
<b>Figura 11:</b> Porcentaje de susceptibilidad (verde), susceptibilidad intermedia (amarillo) y resistencia (rojo) de 50 cepas de SARM-AC aisladas en Chile entre 2007 y 2017 determinado mediante el método de difusión en agar. Cefoxitina (FOX), oxacilina (OXA), sulfametoxazol-trimetoprim (SXT), clindamicina (CLI), claritromicina (CLR), eritromicina (ERY), azitromicina (AZM), cloranfenicol (CHL), rifampicina (RIF), linezolid (LZD), gentamicina (GEN), ciprofloxacino (CIP), levofloxacino (LEV) y fosfomicina (FOS). ....	69
<b>Figura 12:</b> Relación genética de las cepas de SARM-AH determinada por macrorestricción con Smal y electroforesis en gel de campo pulsado.....	80
<b>Figura 13:</b> Imagen de microscopía confocal. (A) Biopelícula madura de 21 días de la cepa UCOSA-77 (NFBP), sin antibióticos. (B) Biopelícula madura de 21 días de la cepa UCOSA-77 (NFBP), en presencia de vancomicina 0,125 µg/mL + βCHLA 16 µg/mL. (C) Biopelícula madura de 21 días de la cepa UCOSA-77 (NFBP), en presencia de daptomicina 0,125 µg/mL + βCHLA 16 µg/mL .....	83
<b>Figura 14:</b> Comparación de volumen de biopelículas vivas entre los distintos antibióticos y combinaciones con BCLA en la cepa UCOSA-77.....	84
<b>Figura 15:</b> Comparación de volumen de biopelículas muertas entre los distintos antibióticos y combinaciones con BCLA en la cepa UCOSA-77.....	85
<b>Figura 16:</b> Comparación de volumen de biopelículas muertas entre los distintos antibióticos y combinaciones con BCLA en la cepa UCOSA-77.....	86
<b>Figura 17:</b> Imagen de microscopía confocal. (A) Biopelícula madura de 21 días de la cepa UCOSA-58 (MFBP), sin antibióticos. (B) Biopelícula madura de 21 días de la cepa	

UCOSA-58 (MFBP), en presencia de vancomicina 0,125 µg/mL + βCHLA 16 µg/mL. **(C)**

Biopelícula madura de 21 días de la cepa UCOSA-58 (MFBP), en presencia de daptomicina 0,125 µg/mL + βCHLA 16 µg/mL..... 87

**Figura 18:** Comparación de volumen de biopelículas muertas entre los distintos antibióticos y combinaciones con BCLA en la cepa UCOSA-58. .... 88

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Composición de los actuales tipos de SCC <i>mec</i> * .....	26
<b>Tabla 2:</b> Partidores para detección de determinantes de virulencia y plásmido pUB110. .....	58
<b>Tabla 3:</b> Distribución spa types en 50 cepas de SARM-AH aisladas en hospitales de Chile .....	67
<b>Tabla 4:</b> Resultados de CMI <sub>50</sub> y CMI <sub>90</sub> sobre cepas de SARM de origen hospitalario referidas desde el ISP Chile (N=45). .....	70
<b>Tabla 5:</b> Distribución porcentual de cepas de SARM con genes de resistencia a diferentes familias de antibióticos (N:45 cepas).....	72
<b>Tabla 6:</b> Distribución de genes de virulencia relacionados a la adherencia en 45 cepas de SARM-AH. ....	74
<b>Tabla 7:</b> Distribución de genes de virulencia que codifican exoenzimas en 45 cepas de SARM-AH .....	75
<b>Tabla 8:</b> Distribución de genes que codifican factores de virulencia implicados en la evasión del sistema inmune del hospedero en 45 cepas de SARM-AH.....	76
<b>Tabla 9:</b> Distribución de genes que codifican factores de virulencia implicados en la adquisición de hierro en 45 cepas de SARM-AH. ....	76
<b>Tabla 10:</b> Distribución de genes que codifican factores de virulencia implicados en la síntesis de toxinas en 45 cepas de SARM-AH.....	77
<b>Tabla 11:</b> Distribución de genes que codifican factores de virulencia implicados en la evasión del sistema inmune del hospedero en 45 cepas de SARM-AH.....	78

<b>Tabla 12:</b> CMI de $\beta$ -CLA en los 3 fenotipos de formación de biopelículas en cepas de SARM hospitalarios seleccionados de los ensayos de adherencia. ....	81
<b>Tabla 13:</b> CMI y Sub-CMI de antibacterianos para cepas seleccionadas para los experimentos de microscopía confocal de biopelícula de 21 días. ....	82
<b>Tabla 14:</b> Lecturas de los experimentos de microscopía confocal a biopelícula madura, utilizadas para la confección de los gráficos. ....	152

## RESUMEN

*Staphylococcus aureus* es un importante patógeno bacteriano implicado en infecciones humanas y animales. Desde su aparición, al inicio de la era antibiótica, *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) ha mostrado gran capacidad de incorporar genes que codifican determinantes de resistencia a múltiples antibióticos y un gran arsenal de factores de virulencia. Además, SARM representa un gran problema debido a la persistencia de infecciones asociadas a dispositivos médicos, principalmente por la capacidad de formar biopelículas, permitiéndole resistir el tratamiento antibiótico, incluso en cepas que no presentan determinantes genéticos de resistencia, lo que finalmente ocasiona el retiro de la prótesis del paciente. En el último tiempo, se han probado alternativas al tratamiento terapéutico habitual, empleando combinaciones de antibióticos usados en la práctica clínica, o bien, utilizando compuestos capaces de desagregar biopelículas. En algunos aislados de SARM se ha demostrado que el uso de algunos antibióticos puede incluso aumentar la expresión de genes implicados en la formación de biopelículas, generando fenotipos hiperadhesivos. Por esta razón, es importante conocer la capacidad de formación de biopelículas y la epidemiología de las cepas de SARM circulantes en Chile. Recientemente,  $\beta$ -cloro-L-alanina ( $\beta$ -CLA), un compuesto con actividad antibacteriana, ha mostrado desagregar biopelículas de SARM en combinación con fosfomicina. Sin embargo, se desconoce el efecto de este compuesto en combinación con otros antibióticos usados en clínica sobre la expresión de los genes que codifican factores de virulencia asociados a la formación de biopelículas. Es por esto, que en esta tesis doctoral se planteó como objetivo general caracterizar las cepas de SARM provenientes de hospitales de Chile y determinar el

efecto de antibióticos utilizados en el tratamiento de SARM y la combinación de ellos con  $\beta$ -CLA en la formación de biopelículas como también en la expresión de genes que codifican factores de virulencia asociados con esta capacidad de cepas de SARM aisladas en hospitales de Chile. Inicialmente, se trabajó con 50 cepas categorizadas por el Instituto de salud Pública de Chile como SARM hospitalarias, aisladas entre los años 2007 y 2017, las cuales fueron caracterizadas en función del perfil de susceptibilidad a linezolid, daptomicina y vancomicina; el tipo de *cassette* SCC*mec*; y tipificación molecular mediante macrorrestricción con enzima *Sma*I y electroforesis de campo pulsante (PFGE). Además se confirmó el fenotipo de meticilino resistencia mediante la prueba de susceptibilidad a cefoxitina y la detección del gen *mecA* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional. Posteriormente, se realizó la secuenciación del genoma completo (Illumina® MiSeq) utilizando Unicycler v0.4.8 y Spades v3.15.4 para su ensamblaje, visualización con Bandage v0.8.1 y anotación genómica mediante Prokka. Se identificaron los *loci* tipo multilocus (MLST), *spa type*, se confirmó la tipificación del tipo de SCC*mec*, genes de resistencia a los antimicrobianos y genes de virulencia mediante SpeciesFinder 2.0, MLSTFinder 2.0, SCC*mec*Finder 1.2, spaTyper 1.0, ResFinder 4.1 y VirulenceFinder 2.0, respectivamente. La capacidad de formación de biopelículas se evaluó mediante ensayos de adherencia en placas de 96 pocillos, y la formación y erradicación de biopelículas en presencia de los antibióticos linezolid, daptomicina y vancomicina solos y asociados con  $\beta$ -CLA fue investigada en placas de poliestireno de 6 pocillos de fondo plano, con una lámina de acero inoxidable lisa, las que posteriormente se sometieron a tinción mediante LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit y analizadas por microscopía electrónica confocal (MEC), para evaluar

viabilidad de las cepas y grosor de la biopelícula tras la exposición a los compuestos antibacterianos.

Se confirmó el fenotipo meticilino resistente en las 50 cepas referidas por el ISP de Chile, además de la presencia del gen *mecA*. Se determinó que el 76% de las cepas de SARM presentaban el SCC*mec* tipo I, 14% SCC*mec* tipo II, 8% el SCC*mec* tipo IVa y 1 cepa (2%) el SCC*mec* tipo IVc. El MLST determinó que los tipos de secuencia (ST) prevalentes fueron el ST5 (76%), seguido de los ST105 (14%), ST8 (4%) y los ST5575, ST2802, y ST72 con 2% de prevalencia. El *spa* type t149 fue prevalente, encontrándose en el 33% de las cepas, seguido del t002 en el 12% de éstas. En cuanto al *agr* predominante, grupo *agr* era tipo II (30%) fue el más presente, y en la misma línea, la tipificación del polisacárido capsular determinó que el tipo capsular prevalente era el *cap8* (82%), seguido de *cap5* (18%). Sin embargo, se descartaron 5 cepas clasificadas originalmente como SARM de origen hospitalaria, pero la tipificación molecular de los SCC*mec* determinó su origen comunitario. Y de acuerdo al criterio de inclusión no se siguió trabajando con estas cepas.

Las cepas presentaron un perfil de multirresistencia, destacando un 98% de resistencia a los antibióticos del grupo MLSB, sobre 98% a quinolonas y 64% a gentamicina. No se encontraron cepas resistentes a cotrimoxazol, linezolid (LZD), vancomicina (VAN) o daptomicina (DAP). Concordantemente, las cepas presentaron una alta prevalencia de genes de resistencia a distintas familias de antibióticos, como son los que codifican enzimas modificantes de aminoglucósidos: *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* (82%), *aad(6)* y *ant(6)-Ia* (64%), *aadD* (16%), *aadE* (7%), *ant(9)-Ia* (98%), *ant(4')-Ib* (16%), *sat4* (40%), *aph(3')-IIIa* (64%), enzimas metilasas: *ermA* (98%), *ermC* (4%), betalactamasa: *blaZ* (82%),

rifampicina fosfotransferasa: *rphB* (91%), y dihidrofolato reductasa: *dfrC* (1%). Además, todas las cepas presentaron los genes *fosB* (resistencia a fosfomicina), *norA*, *mgrA*, *mepA*, *mepR*, *sav1866* (resistencia a fluoroquinolonas), *tet38* (resistencia a tetraciclinas) y el sistema regulador de 2 componentes *arlRS*.

Respecto a la caracterización de genes que codifican factores de virulencia implicados en la formación de biopelículas, el 98% de las cepas presentaron el gen *fnbA* y 26% el gen *fnbB* (codificantes de las proteínas de unión a fibronectina A y B, respectivamente); 98% el operón *icaABC*DR; 80% *hly/hla* y el todas portaban los genes *hly* y *hlyD*, codificantes de las hemolisinas b y d, respectivamente. No se detectó la presencia del gen *bap*, ni de los operones *pmsA* y *pmsB* en ninguna de las 45 cepas ensayadas. Sobre el 85% de las cepas presentaron otros genes de virulencia asociados a la adhesión, producción de exoenzimas, toxinas, enterotoxinas y la captación de hierro.

Los estudios de relación genética mostraron la presencia de 5 clados, destacando el clado principal con cepas portadoras del SCC *mec I* distribuidas en la zona centro sur de Chile entre los años 2012 al 2017.

Los estudios de formación de biopelículas indicaron que sólo el 73% de las cepas eran productoras de biopelículas, y que el 55% y el 18% del total mostraron un índice de formación de biopelículas débil (DFBP) y moderado (MFBP), respectivamente. De estas cepas se seleccionó una de cada fenotipo y se realizaron ensayos de formación y erradicación de biopelículas en presencia de VAN, DAP, LZD y  $\beta$ -CLA separadamente, y en combinación con este último. Los análisis de MEC indicaron que la cepa no formadora de biopelículas presentó un aumento de la biomasa viva de la biopelícula madura en concentraciones sub-CMI de VAN, DAP y  $\beta$ -CLA, y una disminución frente a



LZD. Las cepas con fenotipo NFBP y MFBP mostraron un aumento en la lectura del espectro rojo cuando se expusieron a concentraciones sub-CMI de LZD, y de las combinaciones LZD +  $\beta$ -CLA, VAN +  $\beta$ -CLA y DAP +  $\beta$ -CLA ( $p= 0,019$ ) y sub-CMI de VAN, DAP,  $\beta$ -CLA, LZD +  $\beta$ -CLA, VAN +  $\beta$ -CLA y DAP+  $\beta$ -CLA ( $p=0,037$ ), respectivamente; lo cual indica que a estas concentraciones ensayadas se induce la muerte celular dentro en la biopelícula, permitiendo además su desagregación.

Las cepa con fenotipo DFBP no mostró cambios en la producción de biopelículas frente a los compuestos ensayados.

Los ensayos de expresión de genes de virulencia no arrojaron resultados concluyentes con la metodología ensayada.

Las cepas de SARM-AH referidas por el ISP de Chile analizadas en esta tesis, presentan prevalentemente, a nivel tanto fenotípico como genotípico, el perfil clásico del clon chileno/cordobés con un amplio arsenal de genes virulencia, principalmente codificantes de factores de adherencia, exoenzimas, toxinas y hemolisinas.

Por otra parte, el uso de sub-CMI  $\beta$ -CLA, VAN y DAP contribuyen al a formación de biopelículas en una cepa con fenotipo no productor de biopelículas. El uso de combinaciones a concentraciones sub-CMI de 1  $\mu\text{g/mL}$  LZD, y de las combinaciones de 1  $\mu\text{g/mL}$  LZD +16  $\mu\text{g/mL}$   $\beta$ -CLA, 0,5  $\mu\text{g/mL}$  VAN + 16  $\mu\text{g/mL}$   $\beta$ -CLA y 0,125  $\mu\text{g/mL}$  de DAP + 16  $\mu\text{g/mL}$   $\beta$ -CLA, provocan una disminución de la formación de esta biopelícula, favoreciendo su erradicación.

## ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is an important bacterial pathogen implicated in human and animal infections. Since the dawn of the antibiotic era, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has demonstrated a remarkable ability to acquire genes responsible for resistance to multiple antibiotics, along with a vast array of virulence factors. In addition, MRSA represents a great problem due to the persistence of infections associated with medical devices, mainly due to the ability to form biofilms, allowing it to resist antibiotic treatment, even in strains that do not present genetic determinants of resistance, which ultimately necessitates the removal of the patient's drug-impregnated medical device. In recent times, alternatives to the usual therapeutic treatment have been tested, using combinations of antibiotics employed in clinical practice and compounds capable of disaggregating biofilms. In some MRSA isolates, it has been shown that the use of some antibiotics can even increase the expression of genes involved in the formation of biofilms, generating hyperadhesive phenotypes. For this reason, it is important to know the biofilm formation capacity and the epidemiology of circulating MRSA strains in Chile. Recently,  $\beta$ -chloro-L-alanine ( $\beta$ -CLA), a compound with antibacterial activity, has been shown to disaggregate MRSA biofilms in combination with fosfomicin. However, the effect of this compound in combination with other clinically used antibiotics on the expression of genes encoding virulence factors associated with biofilm formation is unknown. For this reason, in this doctoral thesis, the general objective was to characterize the MRSA strains from hospitals in Chile and to determine the effect of antibiotics used in the treatment of MRSA and the combination of them with  $\beta$ -CLA on the formation of biofilms and also to determine the impact on gene expression for virulence factors associated with this biofilm-forming ability in MRSA strains isolated from Chilean

hospitals. We worked with 50 hospital MRSA strains provided by the Chilean Public Health Institute, isolated between 2007 and 2017, which were characterized based on the susceptibility profile to linezolid, daptomycin, and vancomycin; the SCC*mec* cassette type; and molecular typing by macrorestriction with SmaI enzyme and pulsed field electrophoresis (PFGE). In addition, the methicillin resistance phenotype was confirmed by means of the ceftiofur susceptibility test and the detection of the *mecA* gene by conventional polymerase chain reaction (PCR). Subsequently, whole genome sequencing (Illumina® MiSeq) was performed using Unicycler v0.4.8 and Spades v3.15.4 for assembly, visualization with Bandage v0.8.1, and genomic annotation using Prokka. Multilocus type loci (MLST), *spa* type, SCC*mec* typing, antimicrobial resistance genes, and virulence genes were confirmed using SpeciesFinder 2.0, MLSTFinder 2.0, SCC*mec*Finder 1.2, spaTyper 1.0, ResFinder 4.1, and VirulenceFinder 2.0., respectively. Biofilm formation capacity was assessed by adhesion assays in 96-well plates, and biofilm formation and eradication in the presence of the antibiotics linezolid, daptomycin and vancomycin alone and associated with  $\beta$ -CLA was investigated in 6-well polystyrene plates flat bottom wells, with a smooth stainless steel sheet, which were subsequently stained using the LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit and analyzed by confocal electron microscopy (CEM), to assess viability of the strains and thickness of the biofilm after exposure to antibacterial compounds.

The methicillin-resistant phenotype, along with the presence of the *mecA* gene, was confirmed in all 50 strains reported by the Chilean Public Health Institute (ISP), in addition to the presence of the *mecA* gene. It was determined that 76% of the MRSA strains had SCC*mec* type I, 14% SCC*mec* type II, 8% SCC*mec* type Iva, and 1 strain (2%) SCC*mec*

type Ivc. The MLST determined that the prevalent sequence types (ST) were ST5 (76%), followed by ST105 (14%), ST8 (4%), and ST5575, ST2802, and ST72 with 2% prevalence. The *spa* type t149 was the most prevalent, identified in 33% of the strains, with t002 found in 12%. Regarding the predominant *agr*, *agr* group was type II (30%) was the most present, and in the same line, the typing of the capsular polysaccharide determined that the prevalent capsular type was cap8 (82%), followed by cap5 (18 %). However, molecular typing of *SCCmec* revealed that 5 strains initially classified as hospital-associated MRSA were actually of community origin. In accordance with the inclusion criteria, these strains were excluded from further study.

The strains showed a multiresistance profile, highlighting 98% resistance to antibiotics of the MLSB group, more than 98% to quinolones, and 64% to gentamicin. No strains resistant to cotrimoxazole, linezolid (LZD), vancomycin (VAN) or daptomycin (DAP) were found. Concordantly, the strains presented a high prevalence of resistance genes to different families of antibiotics, such as those encoding aminoglycoside-modifying enzymes: *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* (82%), *aad(6)* and *ant(6)-Ia* (64%), *aadD* (16%), *aadE* (7%), *ant(9)-Ia* (98%), *ant(4')-Ib* (16%), *sat4* (40%), *aph(3')-IIIa* (64%), methylase enzymes: *ermA* (98%), *ermC* (4%), beta-lactamase: *blaZ* (82%), rifampin phosphotransferase: *rphB* (91%), and dihydrofolate reductase: *dfcC* (1%). In addition, all the strains presented the genes *fosB* (resistance to fosfomicin), *norA*, *mgrA*, *mepA*, *mepR*, *sav1866* (resistance to fluoroquinolones), *tet38* (resistance to tetracyclines) and the 2-component regulatory system *arIRS*.

Regarding the characterization of genes that encode virulence factors involved in the formation of biofilms, 98% of the strains presented the *fnbA* gene and 26% the *fnbB* gene

(encoding fibronectin binding proteins A and B, respectively); 98% the *icaABCDR* operon; 80% *hly/hla* and all carried the *hly* and *hly* genes, encoding hemolysins b and d, respectively. The presence of *bap* gene, or *pmsA* and *pmsB* operons was not detected in any of the 45 strains tested. Over 85% of the strains presented other virulence genes associated with adhesion, production of exoenzymes, toxins, enterotoxins, and iron uptake.

The genetic relationship studies showed the presence of 5 clades, highlighting the main clade with strains carrying SCC*mec* I distributed in the south-central zone of Chile between 2012 and 2017.

The biofilm formation studies indicated that only 73% of the strains were biofilm producers, and that 55% and 18% of the total showed a weak (DFBP) and moderate (MFBP) index of biofilm formation, respectively. One of each phenotype was selected from these strains and biofilm formation and eradication assays were performed in the presence of VAN, DAP, LZD and  $\beta$ -CLA separately, and in combination with the latter. The MEC analyzes indicated that the non-biofilm-forming strain showed an increase in live biomass of the mature biofilm at sub-MIC concentrations of VAN, DAP and  $\beta$ -CLA, and a decrease compared to LZD. Strains with NFBP and MFBP phenotypes showed an increase in the red spectrum reading when exposed to sub-CMI concentrations of LZD, and of the combinations LZD +  $\beta$ -CLA, VAN +  $\beta$ -CLA and DAP +  $\beta$ -CLA ( $p = 0.019$ ) and sub-MIC of VAN, DAP,  $\beta$ -CLA, LZD +  $\beta$ -CLA, VAN +  $\beta$ -CLA and DAP+  $\beta$ -CLA ( $p=0.037$ ), respectively; which indicates that at these tested concentrations cell death is induced within the biofilm, also allowing its disaggregation. Strains with DFBP phenotype did not

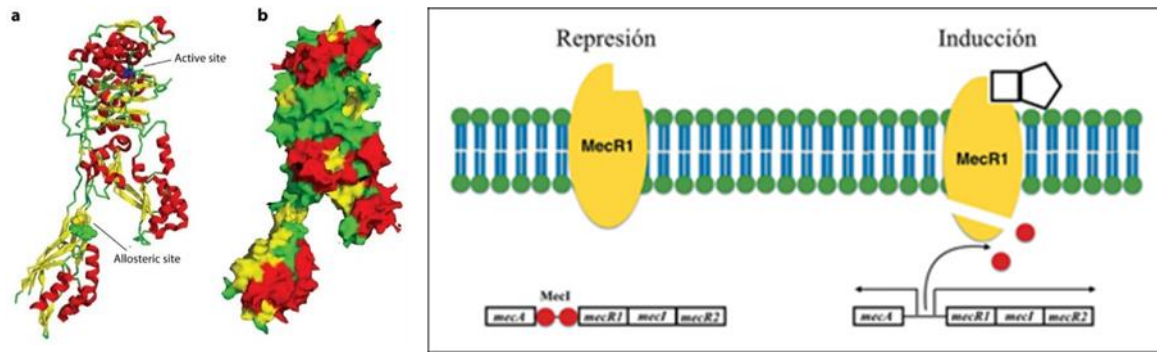
show changes in biofilm production against the tested compounds. Virulence gene expression assays did not yield conclusive results with the tested methodology.

The MRSA-HA strains referred to by the ISP of Chile analyzed in this thesis present predominantly, at both the phenotypic and genotypic level, the classic profile of the Chilean/Cordobes clone with a wide arsenal of virulence genes, mainly encoding adhesion factors, exoenzymes, toxins and hemolysins.

On the other hand, the use of sub-CMI  $\beta$ -CLA, VAN and DAP contribute to the formation of biofilms in a strain with a non-biofilm-producing phenotype. The use of combinations at sub-MIC concentrations of 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LZD, and of combinations of 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LZD +16  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\beta$ -CLA, 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  NPV + 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\beta$ -CLA and 0.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of DAP + 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\beta$ -CLA, cause a decrease in the formation of this biofilm, favoring its eradication.

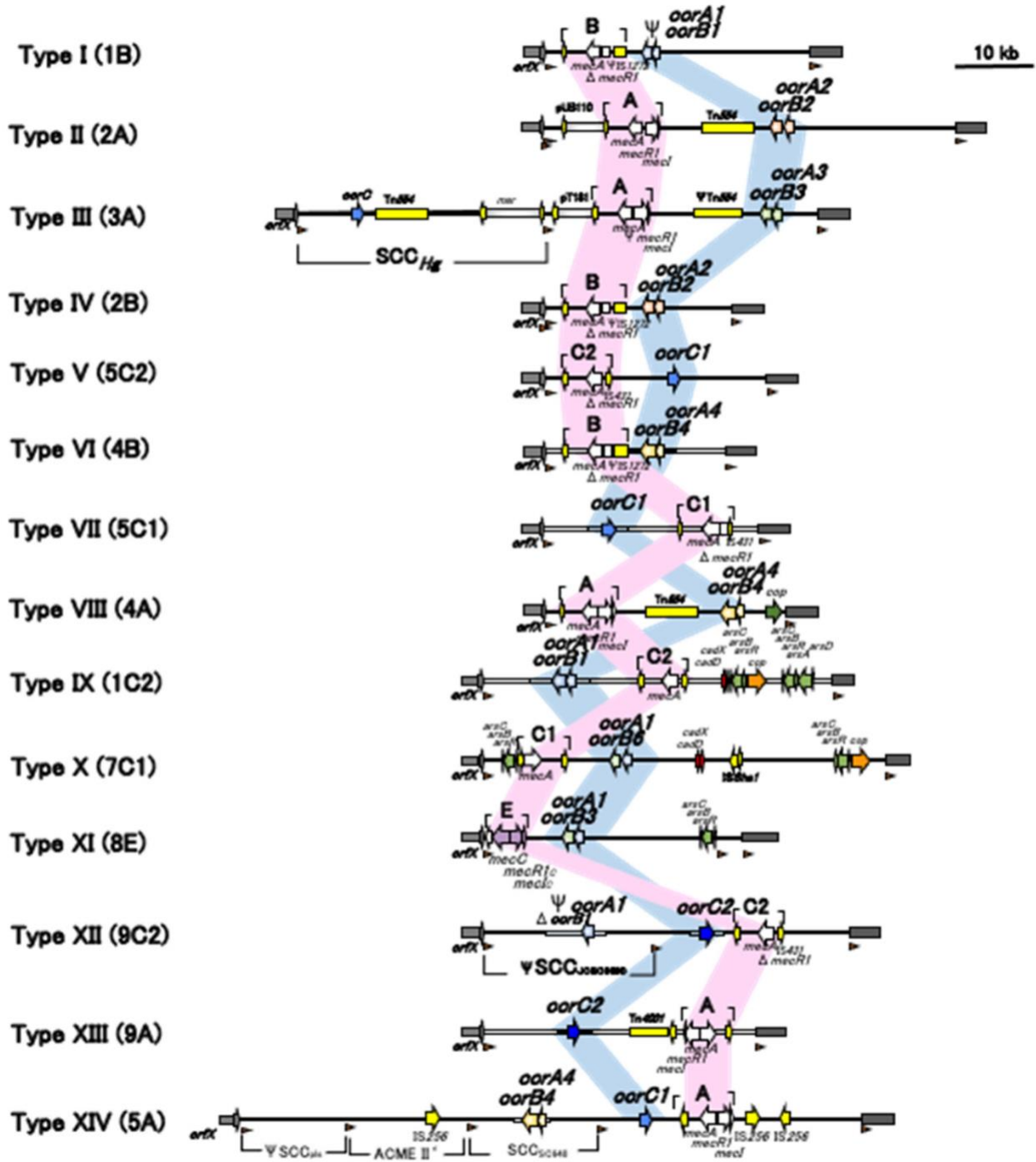
## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

*Staphylococcus aureus* es un importante patógeno que coloniza el epitelio de las narinas anteriores y superficies mucosas en humano <sup>1</sup> y animales <sup>2</sup>, y es reconocido como el principal agente causal de infecciones de piel y partes blandas. También es implicado como agente etiológico en infecciones cardiovasculares y osteoarticulares, neumonías, infecciones asociadas a cuerpos extraños, sepsis y hasta toxemia severa, incluyendo el síndrome del shock tóxico <sup>3,4</sup> y, también, mastitis en el ganado <sup>5</sup>. Antes del inicio de la era antibiótica, la mortalidad por bacteriemia estafilocócica era sobre el 80%, por lo que el descubrimiento de la penicilina significó un importante avance en la medicina <sup>6</sup>. En 1942, tan sólo 2 años después de la introducción de la penicilina G, se documentaron los primeros casos de cepas resistentes a este fármaco <sup>7</sup>, mediada por la inactivación de la molécula por una  $\beta$ -lactamasa/penicilinasa <sup>8</sup>. En 1959 se introdujo al mercado la meticilina,  $\beta$ -lactámico semisintético resistente a la acción de la penicilinasa descrita hasta entonces, debido a la estructura diferente de este nuevo antibiótico. Sin embargo, durante la década de 1960 se informan los primeros aislados resistentes a meticilina en el Reino Unido, y posteriormente en el resto del mundo, aún en países en los cuales este medicamento no estaba disponible; marcando el inicio de la era del *S. aureus* resistente a meticilina (SAMR) <sup>9</sup>. A diferencia de la resistencia a penicilina, ésta se genera por la síntesis de una PBP adicional con baja afinidad por los  $\beta$ -lactámicos, denominada PBP2a (figura 1a, 1b), codificada por el gen *mecA* (figura 1c), ubicado en un elemento genético móvil llamado SCC*mec* (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*), y de los cuales a la fecha se han descrito 14 variantes <sup>10</sup> (tipos), con algunos subtipos (figura 2).



**Figura 1:** Estructura de la proteína de unión a penicilina 2a (PBP2a) de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA). **(a)** Vista de un monómero de PBP2a. La serina del sitio activo (posición 403) se muestra como esferas azules. El sitio alostérico se denota por el resaltado de dos de los residuos que son importantes en su interacción con ceftarolina: Y105 (esferas verdes) e Y297 (esferas amarillas). **(b)** Vista de topología de superficie de la misma molécula. Ambas estructuras están coloreadas según la estructura secundaria: hélice, rojo; hoja, amarillo; lazo, verde. Figura generada a partir del código 1VQQ de Protein Data Bank usando PYMOL. **(c):** Regulación de la resistencia a meticilina. En ausencia del antimicrobiano, MecI actúa como represor del complejo de genes *mec* tras unirse en forma de homodímero a la región operadora. En presencia del  $\beta$ -lactámico, éste se une al dominio PBP de MecR1 el que se activa y gatilla la ruptura de MecI, liberando la represión y permitiendo de esta forma la expresión de los genes del complejo *mec*. (Tomados de: Peacock & Paterson Annu. Rev Biochem. 2015; 84:577-601; Aguayo y cols. Rev Chilena Infectol. 2018; 35:7-14.)





**Figura 2:** Comparación esquemática de los actuales tipos de SCC*mec*. (Tomado de Yuki Uehara, 2022. Antibiotics (Basel) 2022 Jan 11;11(1):86.)

**Tabla 1:** Composición de los actuales tipos de *SCCmec*\*

<b>SCCmec</b>	<b>complejo <i>ccr</i></b>	<b>complejo <i>mec</i></b>
<b>I (1B)</b>	1 (A1B1)	B
<b>II (2A)</b>	2 (A2B2)	A
<b>III (3A)</b>	3 (A3B3)	A
<b>IV (2B)</b>	2 (A2B2)	B
<b>V (5C2)</b>	5 (C1)	C2
<b>VI (4B)</b>	4 (A4B4)	B
<b>VII (5C1)</b>	5 (C1)	C1
<b>VIII (4A)</b>	4 (A4B4)	A
<b>IX (1C2)</b>	1 (A1B1)	C2
<b>X (7C1)</b>	7 (A1B6)	C1
<b>XI (8E)</b>	8 (A1B3)	E
<b>XII (9C2)</b>	9 (C2)	C2
<b>XIII (9A)</b>	9 (C2)	A
<b>XIV (5A)</b>	5 (C1)	A

\*Modificado de Yuki Uehara, 2022. *Antibiotics (Basel)* 2022 Jan 11;11(1):86.

Aunque inicialmente SARM era un patógeno asociado a infecciones hospitalarias (*health-care-associated* MRSA, HA-MRSA), éste evolucionó rápidamente y desde la década de 1990 se informa la aparición de SAMR en infecciones asociadas a la comunidad (*community-associated* MRSA, CA-MRSA) <sup>9</sup>. Recientemente, además se ha informado la aparición de cepas que pueden colonizar e infectar una amplia gama de hospederos animales, incluyendo ganado, silvestres y de compañía, lo que no sólo tiene importancia desde el punto de vista del bienestar animal y el impacto económico, sino que también epidemiológico, ya que ellos pueden actuar como reservorio de infecciones zoonóticas <sup>11</sup>. En particular, el complejo clonal (CC) CC398 es abundante en cerdos y otros animales en Europa continental, y la infección de humanos que han tenido contacto directo con estos animales ha llevado al reconocimiento de una tercera ola epidemiológica de SARM, en este caso asociado a ganado (*Livestock-associated* MRSA, LA-MRSA) <sup>12</sup>. Las cepas SARM-AH son portadoras principalmente del elemento genético *SCCmec* I, II o III, a diferencia de las cepas SARM-AC, asociadas a los *SCCmec* tipo IV o V y a la presencia del gen *pvl*, que codifica la leucocidina de Panton-Valentine (PVL), un factor de virulencia frecuente en infecciones necrotizantes de piel y tejidos blandos. Otra diferencia notable entre los tipos de *SCCmec*, es la portación de diferentes genes de resistencia, así los *SCCmec* I, II y III albergan genes de resistencia a varias familias de antibióticos, tales como macrólidos, lincosamidas, estreptograminas y aminoglucósidos; mientras que el elemento *SCCmec* IV por lo general sólo portan el gen *mecA*, y codifica clásicamente resistencia sólo a  $\beta$ -lactámicos <sup>13</sup>.

En los últimos años, SARM ha demostrado un incremento en las infecciones asociadas a biopelículas bacterianas, en infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) <sup>14,15</sup>. Un área de preocupación principal con las infecciones por biopelículas de SARM es el rápido aumento de infecciones relacionadas con el uso de implantes y prótesis médicas <sup>16,17</sup>. El aumento de la esperanza de vida promedio también se correlaciona con un aumento en la población de personas de edad avanzada que requieren tales prótesis, lo que hace que el SARM sea una preocupación particular <sup>16,18</sup>.

Las infecciones por SARM conducen a un aumento en los días de hospitalización del paciente y en las tasas de mortalidad hospitalaria generando un fuerte impacto económico en el sistema de salud, lo que se ha estimado en aproximadamente US\$ 450 millones en EE.UU., en la última década <sup>19,20</sup>. En el caso de las infecciones de prótesis articulares, las cuales son menos frecuentes en países desarrollados (< 2% vs lo informado en Chile de 2,5-3,5%) <sup>21</sup>, representan un alto costo e impacto económico, tanto para los pacientes como para el sistema de salud. Si bien, el aseo quirúrgico y el tratamiento antibiótico vía sistémica con conservación del implante es la recomendación estándar, generalmente es necesario remover la prótesis <sup>22,23</sup>. En EE.UU., se proyecta que el costo asociado a las infecciones de implantes ortopédicos excederá US\$ 1,6 billones en el año 2020 <sup>24</sup>, mientras que en Chile, el aumento del costo promedio en un paciente con complicación infecciosa aumenta de US\$2.354 a US\$6.174, además de un aumento en las secuelas graves y letalidad de la infección de 46,2 y 15,4%, respectivamente; siendo *S. aureus* uno de los principales agentes etiológicos en este tipo de infecciones <sup>25</sup>.

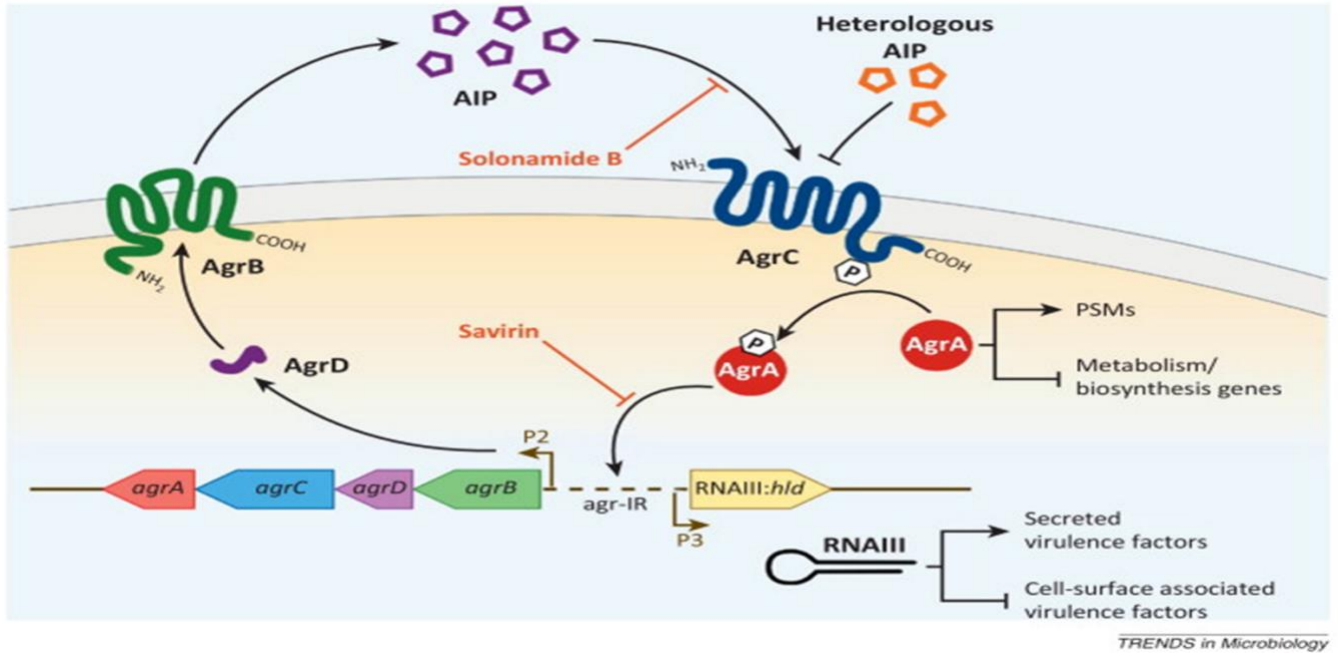
Las heridas crónicas constituyen otro grupo de infecciones asociadas a la formación de biopelículas de SARM. Estas incluyen heridas asociadas con el sitio quirúrgico, heridas traumáticas, úlceras del pie diabético, úlceras por presión y úlceras venosas del pie. Estas heridas a menudo se asocian con infecciones bacterianas, las que se presentan con frecuencia como biopelículas<sup>26,27</sup>. Dado que *S. aureus* se encuentra frecuentemente colonizando la superficie de la piel y en las narinas anteriores, no es sorprendente que sea el patógeno más común asociado a este tipo de infecciones (93,5% de las úlceras) tanto en Europa, Estados Unidos y Chile. Además, entre el 20 y 50% de las infecciones de la herida se deben a SARM, convirtiéndolas en un problema evidente tanto en la atención de pacientes hospitalizados como en las clínicas de heridas<sup>28-30</sup>.

Por otra parte, *S. aureus* es una causa importante de endocarditis infecciosa, con una prevalencia de 40 a 50% en los Estados Unidos, 28% en Europa, 17% en América del Sur y 25% en Chile<sup>31,32</sup>. Los pacientes con lesiones mecánicas o válvulas cardíacas inflamadas son particularmente susceptibles a la endocarditis asociada a biopelículas de *S. aureus*. Las válvulas lesionadas proporcionan una superficie para la unión y la formación de biopelículas, así como la infección intracelular del endotelio inflamado, lo que induce una mayor destrucción del tejido, mayor turbulencia y sedimentación de factores de coagulación<sup>31</sup>. La biopelícula de *S. aureus* puede replicarse en el endotelio valvular dañado y diseminarse (embolización) para causar una enfermedad sistémica,<sup>31</sup> lo que resulta en complicaciones como insuficiencia cardíaca congestiva, sepsis, bacteriemia persistente y formación de abscesos intracardíacos, que contribuyen a una tasa más alta de mortalidad hospitalaria en estos pacientes<sup>33</sup>.

## Factores de virulencia en *S. aureus*

Las distintas infecciones causadas por *S. aureus* están relacionadas a factores de virulencia que le permiten adherirse a la superficie, invadir y evitar el sistema inmune, causando efectos tóxicos, daño tisular y enfermedad distal <sup>34,35</sup>.

La expresión de los genes que codifican éstos y otros factores de virulencia es regulada mediante el locus *agr* (del inglés *accessory gene regulator*), mediante mecanismos de *quorum-sensing* (figura 3). Este locus ejerce una regulación negativa sobre las moléculas de adhesinas en la etapa de colonización del hospedero durante la fase estacionaria; sin embargo, en etapa de crecimiento postexponencial cuando se alcanza una alta carga del péptido autoinductor (proteína AgrD), activa la molécula efectora (RNAIII) de este sistema que actúa a nivel transcripcional inhibiendo la expresión de proteínas de adhesión, activando la expresión de toxinas y enzimas extracelulares ( $\alpha$ - $\beta$  hemolisinas, lipasas, proteasas, etc), factores de virulencia relacionados con la adquisición de nutrientes, la supervivencia y la diseminación bacteriana <sup>36-40</sup>



**Figura 3:** Regulación de la expresión génica y *quorum sensing* en *S. aureus*, mediante el sistema *agr*. Tomado de Tong y cols. Crit Care. 2008;12(6):236

## **Factores de adherencia en *S. aureus***

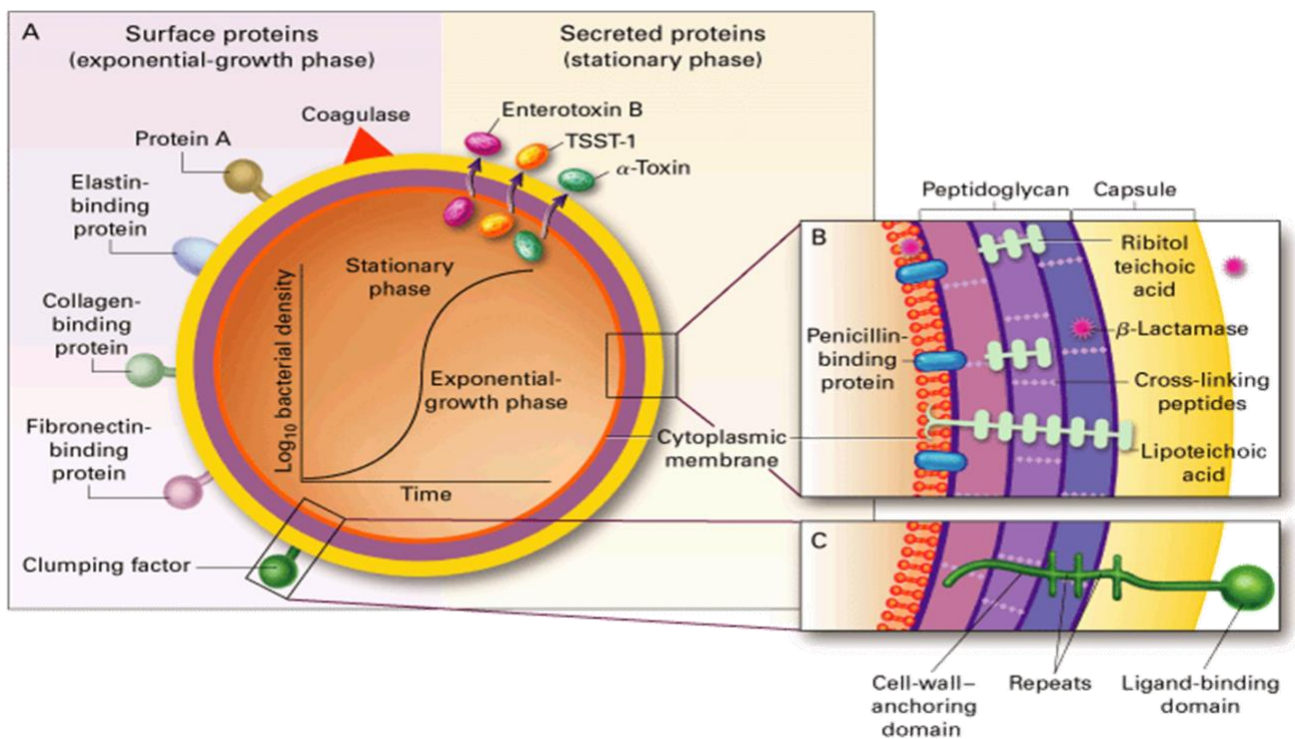
El proceso de colonización del hospedero se inicia con la adhesión de *S. aureus*, lo cual es mediado por proteínas ancladas covalentemente a la pared de peptidoglicán y que se unen específicamente a los componentes de plasma o matriz extracelular (MEC) y que colectivamente se denominan “componentes de la superficie microbiana que reconoce moléculas de matriz adhesiva” (MSCRAMM, por sus siglas en inglés) <sup>34,41–43</sup>. Las MSCRAMMs reconocen e interactúan con los componentes de la MEC, y moléculas del plasma sanguíneo, como el fibrinógeno, la fibronectina y el colágeno <sup>34,44–46</sup>, y dentro de estas moléculas se encuentra la proteína estafilocócica A (SpA), las proteínas de unión a fibronectina A y B (FnbpA y FnbpB), la proteína de unión al colágeno y las proteínas del factor aglutinante (Clf) A y B (figura 4) <sup>34,47</sup>.

## **Proteínas de unión a fibronectina A y B**

El proceso de adhesión a la célula hospedera está mediado principalmente por la formación de un puente de fibronectina (Fn), entre la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , por el lado de la célula hospedera, y la proteína de unión a fibronectina (FnBP) por parte de *S. aureus* <sup>48–51</sup>. Este paso es un requisito para el establecimiento de la colonización, infección y evasión de la respuesta inmune mediante la internalización en las células fagocíticas no profesionales; lo cual ha sido corroborado mediante ensayos con una mutante isogénica de *S. aureus* NCTC 8325-4 defectuosa en la expresión de FnBP, las cuales no puede invadir las células fagocíticas no profesionales (NPPC) <sup>50</sup>. Experimentos *in vivo* demuestran que la eliminación de las FnBPs atenúa fuertemente la capacidad de *S.*



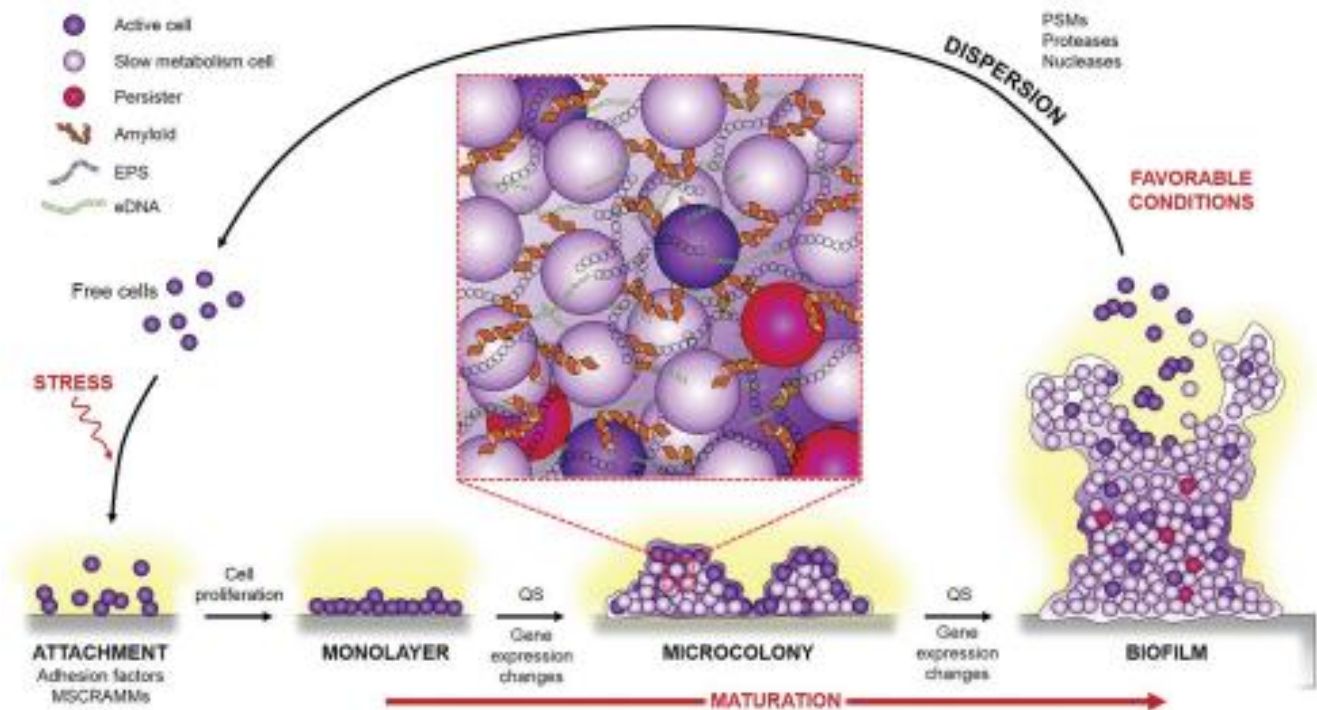
*aureus* para colonizar y multiplicarse a nivel renal, y para causar sepsis fatal en ratones. Aunque FnbpA contribuye más a estos efectos antes mencionados que FnbpB, ambas FnBP parecen necesarias para el desarrollo de infecciones graves, lo que sugiere que la cooperación entre ambas isoformas puede ser necesaria para una fuerte adhesión celular, o para activar de manera eficiente la vía de internalización *in vivo*<sup>52</sup> y contribuir a la adherencia de las células de *S. aureus* a los coágulos de plasma y al biomaterial *ex vivo* que ha estado en contacto a largo plazo con el hospedero; por lo tanto, son factores importantes que contribuyen al inicio de la infección por cuerpos extraños<sup>53,54</sup>.



**Figura 4:** Factores de virulencia de *S. aureus*. Tomado de Zeconi & Scali 2013. Immunol Lett. 2013; 150:12–22.

## **Producción de biopelículas en SARM**

Una biopelícula corresponde a un consorcio estructurado de células bacterianas que están inmersas en una matriz polimérica que consiste en moléculas de polisacáridos, proteínas, ADN extracelular (eADN), lípidos y otras macromoléculas; mediante la cual, la bacteria tiene capacidad para adherirse a superficies inertes o vivas y constituye un modo de crecimiento protegido que permite la supervivencia en un ambiente hostil <sup>55</sup>. Las biopelículas son además un medio de evasión frente a la acción del sistema inmune del hospedero, debido a que son intrínsecamente tolerantes a la acción de mecanismos de defensa como la fagocitosis mediada por neutrófilos, además de otros componentes del sistema inmune innato y adaptativo, antibióticos y desinfectantes. Por su parte, las biopelículas estafilocócicas son la causa de muchas infecciones bacterianas persistentes y/o crónicas en humanos y animales <sup>55</sup>. Debido a esto, se torna alarmante la frecuencia en que las bacterias que, normalmente presentan susceptibilidad a los antibióticos, tienden a desarrollar sus ciclos de vida inmersas en una biopelícula como una estrategia de vida constante (figura 5) <sup>55-57</sup>.



**Figura 5:** Ciclo de vida de una biopelícula bacteriana. Tomado de Reffuveille et al. InTech, 2017. <http://dx.doi.org/10.5772/67546>

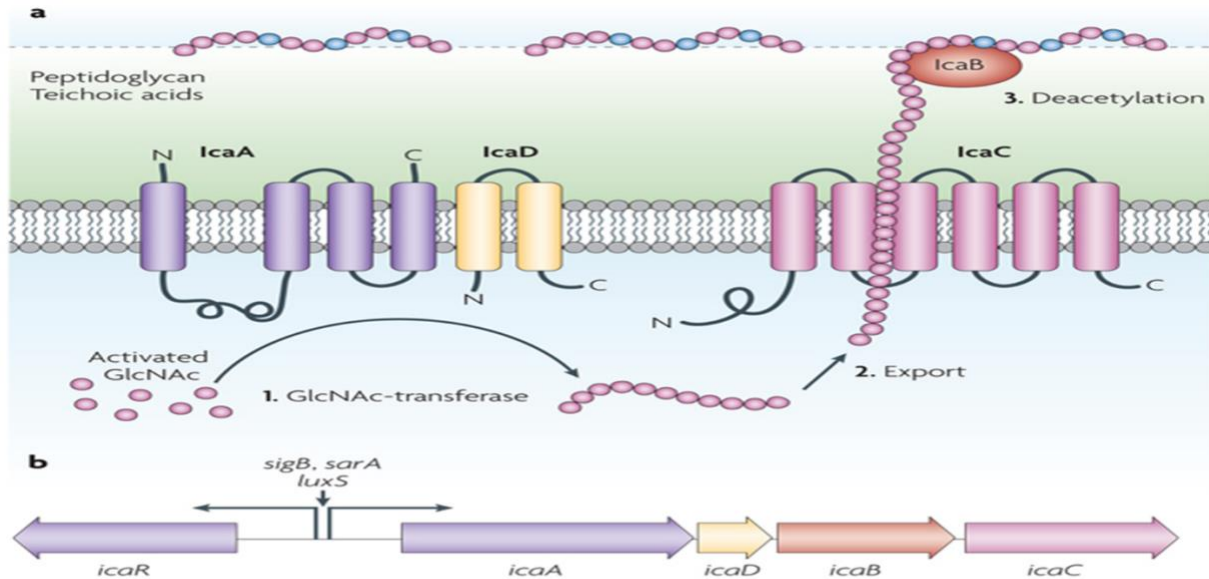
La formación de una biopelícula comienza con la etapa de adhesión, la que implica una interacción inicial de una célula planctónica que se une reversiblemente a la superficie, y al no producirse la disociación de la superficie, se unirá irreversiblemente a ésta. Posteriormente, un grupo de proteínas de superficie, particularmente las de tipo MSCRAMM<sup>58</sup> se unen a la matriz orgánica e inorgánica de manera irreversible. Este proceso se ve afectado por factores como carga de la superficie, hidrofobicidad, topografía y tiempo de exposición<sup>59</sup>. Otro factor importante en esta etapa es el polisacárido capsular (PC), que además de facilitar la adhesión al hospedero, en conjunto con las moléculas adhesinas mediante el desarrollo de biopelículas, tiene actividad antifagocitaria. El PC es un componente de la pared celular bacteriana, producido por la

mayoría de las cepas clínicas de *S. aureus*<sup>60</sup> está compuesto por unidades repetidas de trisacáridos de ácido D-N-acetil mannosaminurónico (ManNAcA), I-N-acetil fucosamina (I-FucNAc), and D-N-acetil fucosamina (D-FucNAc), los cuales difieren solo en los enlaces glucosídicos entre los azúcares y los sitios de O-acetilación<sup>61</sup>. La biosíntesis del PC es llevada a cabo por los 16 genes presentes en el operón *capA-P* y que codifican las proteínas involucradas en la síntesis, la O-acetilación, el transporte y la regulación de los PCs, de los cuales, los 12 genes de la región flanqueante de este operón son componen la región común entre los operones *cap5* y *cap863*. La región central de ambos operones, *capHIJK*, comparten un muy pequeño porcentaje de homología entre sí, y son los que le entregan la especificidad a cada tipo de PC<sup>62</sup>.

Una vez estabilizada la adhesión a la matriz comienza la segunda etapa, denominada fase de agregación o acumulación. Esta etapa se caracteriza por la proliferación celular en multicapas, la adhesión célula a célula y finalmente la formación de microcolonias de una o más especies bacterianas<sup>56</sup>. Estas estructuras son rodeadas por una matriz de polisacárido extracelular, donde tienen un rol crucial el polisacárido de adhesión intercelular PNAG/PIA, eADN, y la proteína asociada a la acumulación, SasG<sup>63-65</sup>. Sin embargo, y a pesar de ser una etapa multifactorial, se describe que el polisacárido de adhesión intercelular (PIA) es el principal determinante de la fase de acumulación de la formación de la biopelícula estafilocócica. La producción de PIA, también denominado *slime*, está mediada por el operón *icaADBC*, y todas las cepas que albergan este elemento genético son potenciales productores de biopelícula<sup>66,67</sup>. Además, se han identificado otras proteínas en la formación de biopelículas, tales como la proteína

asociada a biopelículas (Bap, por sus siglas en inglés), la cual está codificada por el gen *bap*<sup>68</sup>. Cucarella y cols. (2001) demostraron que, a diferencia de otras especies bacterianas, en *S. aureus* Bap está involucrada en la unión primaria al sustrato inerte en la formación de la biopelícula<sup>69</sup> y en la agregación de célula a célula junto con PIA y, por lo tanto, en la maduración de la biopelícula; y algunos estudios indican que cepas *bap*<sup>+</sup>, son fuertes productores de biopelícula, incluso en ausencia del operón *icaADBC* (figura 6)<sup>70</sup>.

La etapa siguiente, o etapa III, es la maduración de la biopelícula y es en esta fase en la cual cambios fisiológicos en la bacteria y en la matriz de polisacáridos son regulados por el locus *agr* mediante el sistema de detección de *quorum sensing*, y es entonces cuando la comunidad microbiana asume la forma sésil, la cual se vuelve más resistente a la acción de desinfectantes y antimicrobianos<sup>56</sup>. La etapa de desagregación es el paso final del ciclo de formación de biopelículas, y en ésta, grandes segmentos de la biopelícula se desagregan de la superficie en formas planctónicas, las cuales se liberan y se dispersan para causar una mayor invasión, ya sea a nivel local o de sitios distantes, iniciando así un ciclo completamente nuevo. Esta fase está mediada por proteasas, modulinas solubles en fenol, las fuerzas de arrastre o erosivas, y es, además, regulada por el sistema *agr*.



**Figura 6:** Estructura del sistema (a) y operón (b) *icaADBC*. Tomado de Otto. Nat Rev Microbiol. 2009 Aug; 7(8): 555–567.

Otro tipo de moléculas involucradas en la formación de biopelículas de *S. aureus* son las modulinas solubles en fenol (del inglés *Phenol-soluble modulins*, PSM). Las PSM son una familia de péptidos alfa helicoidales anfipáticos de 20-40 aminoácidos, descubiertos en 1999 por Klebanoff y col <sup>71</sup>, quienes detectaron péptidos con propiedades inmunomoduladoras en *S. epidermidis*, al realizar la extracción con fenol caliente, a las cuales denominaron complejo pro inflamatorio de tres péptidos <sup>71</sup>. En *S. aureus* se han descrito las PSM de tipo PSM $\alpha$ , PSM $\beta$  y la  $\delta$  toxina, las cuales se encuentran codificadas en 3 diferentes loci del genoma <sup>72</sup>. PSM $\alpha$ 1-PSM $\alpha$ 4 están codificados en el operón *psma*; PSM $\beta$ 1 y PSM $\beta$ 2 en el operón *psm $\beta$*  y  $\delta$ -toxina dentro de la secuencia de codificación para RNAIII, la cual es la molécula efectora de ARN del sistema de detección de *quorum sensing* del locus *agr* <sup>73</sup>. El rol de las PSM en la formación de biopelículas se debe principalmente a las propiedades características de tipo surfactante, de acuerdo a su

naturaleza anfipática; lo cual se refleja en la tendencia a agregarse en oligómeros, y en su capacidad para facilitar la dispersión en superficies o para estructurar biopelículas <sup>74,75</sup>. Estas características probablemente tienen, además, un rol adicional promoviendo la colonización de la piel y emulsionando nutrientes en el medio, lo que podría constituir el propósito "original" de los PSM antes de que algunos evolucionaran para cumplir funciones en la patogénesis (por ejemplo, al alterar los fagocitos primitivos) <sup>76</sup>.

Además, las PSM tienen la capacidad de lisar células eucariotas de manera independiente del receptor, por lo que se dirige a casi todas las membranas citoplasmáticas eucariotas y distingue a las PSM de otras toxinas citolíticas de *S. aureus*, como la toxina  $\alpha$  o las leucocidinas de dos componentes, que son altamente específicas para un tipo de célula particular y especie hospedera, e incluso se han descrito algunas PSM con actividad antibacteriana; en particular contra estreptococos <sup>77,78</sup>. Las PSM también afectan el sistema inmune adaptativo al inducir un fenotipo tolerogénico en las células dendríticas e inhibir la diferenciación celular de los linfocitos T *helper* 1; además de activar el receptor N -formil-péptido 2 (FPR2); lo que conduce a la activación de neutrófilos, la liberación de citocina y quimiotaxis <sup>79</sup>.

## Antibióticos utilizados en el tratamiento de SARM

Desde el inicio de la era antibiótica *S. aureus* ha demostrado una gran versatilidad para el rápido desarrollo de resistencia a los antibióticos, lo que se ve agravado, en las infecciones en las cuales esta bacteria forma biopelículas. Ensayos *in vitro* han comprobado el aumento de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los antibióticos en comparación con las bacterias isogénicas planctónicas<sup>80</sup>. Vancomicina (VAN), por ejemplo, es el antibiótico de elección para infecciones asociadas a biopelículas de SARM<sup>81</sup>; sin embargo, se recomienda un uso cauteloso para evitar la selección de cepas resistentes o con resistencia intermedia. En presencia de una biopelícula, la CMI se ve aumentada en 10 veces en comparación a las células planctónicas (CMI ~ 2 µg/ml para células planctónicas a ~ 20 µg/ml para biopelícula)<sup>82</sup>. En tales casos se requiere usar una combinación de VAN con otros antibióticos, tales como linezolid (LZD), tigeciclina (TGC) o rifampicina (RIF) para prevenir falla terapéutica, las cuales aún no encuentran un total consenso<sup>80,83–85</sup>. Además, la combinación de VAN con RIF ha mostrado resultados contradictorios, y los diversos estudios que avalan esta combinación contra *S. aureus* susceptible a meticilina (SASM), no respaldan la efectividad contra SARM<sup>83,86,87</sup>.

Por otra parte, daptomicina (DAP), es un antibiótico utilizado para tratar infecciones por *S. aureus* que no responden a VAN. Este lipopéptido cíclico interrumpe la membrana citoplásmica mediante la formación de canales iónicos dependientes de calcio, conduciendo a una rápida despolarización de la membrana citoplasmática y la salida de potasio, lo cual conduce al cese de la síntesis de ADN, ARN y proteínas<sup>88</sup>. Smith y cols,



2005 <sup>89</sup>, en un estudio comparativo de DAP con otros cuatro antibióticos (LZD, clindamicina, VAN, TGC), demostraron que DAP es el tratamiento más efectivo para eliminar una biopelícula *S. aureus*; sin embargo, una pequeña población de bacterias de la biopelícula se mantuvo tolerante al efecto del antibiótico. Se debe enfatizar que DAP ha mostrado resultados ambiguos cuando se utiliza en combinación con otros antibióticos <sup>86,90</sup>, pero debido a que su mecanismo de acción no requiere células bacterianas en activo crecimiento, una combinación con el antimicrobiano apropiado proporciona una mayor eficacia. Además, LZD también forma parte del arsenal terapéutico anti-SARM, y corresponde a una oxazolidinona que inhibe el inicio de la síntesis proteica, evitando la formación del complejo de iniciación al unirse al ARNr 23S de la subunidad ribosómica 50S <sup>91</sup>.

Además del efecto antibacteriano de los antibióticos, los antibióticos pueden presentar algunos otros efectos no-antibacterianos. Así, se ha comprobado el efecto en la modulación de la síntesis de factores de virulencia, por ejemplo, LZD a concentraciones subinhibitorias (sub-CMI) produce una reducción en la síntesis de: PSMa1-4 <sup>92</sup>, toxina  $\zeta$  <sup>93</sup>,  $\alpha$ -toxina <sup>94,95</sup>, toxina del síndrome de shock tóxico <sup>96</sup> y proteína SpA <sup>95,97</sup>. No obstante, existe evidencia que respalda la generación de un fenotipo hiperadhesivo, debido a que estimula el incremento en los niveles de Fnbp A/B <sup>98</sup>. Por otra parte, existen estudios que correlacionan VAN (1/2 CMI) con un incremento en la expresión del gen *spa*, lo cual conduce a la producción de 4 veces más de proteína SpA, induciendo con esto la formación de biopelícula de SARM <sup>99</sup>.

Hallazgos recientes <sup>100</sup>, informan que sub-CMI de ceftarolina (CPT) mejoran adhesión y la formación de biopelícula en SARM, principalmente mediante la inducción de la sobreexpresión de algunos genes, como, por ejemplo, los del operón *icaADBC*. Sin embargo, CPT a 1 X CMI demostró incluso ser capaz de erradicar una biopelícula madura. Por lo tanto, se destaca la importancia de mantener concentraciones bactericidas efectivas de CPT y otros antibióticos para combatir las infecciones relacionadas con biopelículas de SARM <sup>100</sup>. Esto da cuenta que una inadecuada concentración de antibiótico, por un error en el cálculo de la dosis, podría tener efectos colaterales en el tratamiento con estos fármacos que van más allá de su efecto bactericida o bacteriostático. En casos como el de CPT y VAN, los fenotipos relacionados con el aumento en la formación de biopelícula fueron dependiente de la cepa y el ST, lo que nos insta a generar esfuerzos por conocer la epidemiología de cepas circulantes en Chile.

Teniendo en cuenta el actual escenario, se ha sugerido que el uso de agentes de dispersión en combinación con antibióticos, podría ser una estrategia terapéutica eficaz para tratar infecciones asociadas a biopelículas, desagregando la biopelícula y restaurando funcionalmente la susceptibilidad a los antimicrobianos en las células planctónicas. Para esto se ha evaluado la actividad de algunos aminoácidos, principalmente D-aminoácidos (D-aás), en combinación con antibióticos. La contribución de los D-aás en la dispersión de biopelículas, ha mostrado mejoras en la actividad bactericida de los antibióticos en cepas productoras de biopelículas *in vitro*. La principal ventaja es que, a diferencia de otros agentes de dispersión de biopelículas, los D-aás

actúan interfiriendo más de un proceso esencial para el desarrollo de ellas. Las actividades dispersivas de los D-aás se han atribuido a múltiples mecanismos, que incluyen inhibición del crecimiento bacteriano y expresión de genes implicados en la producción de la matriz extracelular de la biopelícula <sup>101</sup>, disminución de la expresión de la superficie de las fibras amiloides involucradas en la formación de biopelículas, mediante la incorporación de D-aás en la pared celular bacteriana <sup>102</sup>, e inclusive, actividad dispersiva sobre biopelículas de *Bacillus subtilis*, *S. aureus* y *Pseudomonas aeruginosa in vitro* <sup>103,104</sup> y sobre biopelículas de *S. aureus* en un modelo *in vivo* de injerto óseo modificado <sup>105</sup>.

No obstante lo descrito anteriormente, muy poco se ha estudiado sobre el efecto de L-aminoácidos (L-aás) o análogos de éstos sobre las biopelículas bacterianas. Uno de estos compuestos es el β-cloro-L-alanina (β-CLA), un análogo aminoacídico, que ha demostrado ser un potente inhibidor del crecimiento bacteriano. Stuart y col., ya en el año 1971 informan la actividad bacteriostática de β-CLA sobre *Salmonella Typhimurium*, mediante la inhibición de las enzimas treonina desaminasa y la transaminasa B <sup>106</sup>. Además, en 1974 Manning y cols demostraron que este compuesto inhibe el crecimiento de *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* <sup>107</sup>. El β-CLA actúa inhibiendo las enzimas alanina valina transaminasa C (MurC) <sup>108</sup>, implicada en la etapa citoplasmática de la síntesis del precursor del peptidoglicán, UDP- N-acetilmuramil pentapéptido, componente principal de la pared bacteriana <sup>109</sup> y la alanina racemasa (Alr) o L-alanina racemasa, responsable de la racemización del sustrato L-alanina en D-alanina, constituyente esencial del peptidoglicán, por lo que

estas enzimas son imprescindibles para la supervivencia bacteriana <sup>110</sup>. Además, un estudio reveló que el uso de  $\beta$ -CLA restaura la susceptibilidad a los antibióticos betalactámicos de cepas de SARM <sup>111</sup>. En estos mismos trabajos se informó mortalidad de ratones tratados intraperitonealmente con  $\beta$ -CLA, pero los autores señalan no tener conocimiento si el compuesto exhibió toxicidad acumulativa o si se produjeron productos de degradación tóxica al almacenar la solución del compuesto, por lo que concluyeron que el  $\beta$ -CLA es poco específico en su espectro de reactividad y probablemente conduzca a la pérdida de viabilidad no sólo de células bacterianas, sino también de mamíferos, mediante el bloqueo de la producción de aminoácidos esenciales <sup>107</sup>. Aún en estudios recientes, el  $\beta$ -CLA sigue siendo denominado como un compuesto poco tóxico, asumiendo conclusiones que nunca fueron probadas por los autores en 1974 <sup>112</sup>. Sin embargo, estos trabajos no reparan en las dosis utilizadas en los estudios *in vivo* con el modelo murino, las cuales fueron 50 veces más elevadas que las recomendadas para este tipo de ensayos <sup>113-115</sup>, por lo que es importante analizar la real toxicidad de este compuesto, a raíz del aporte que puede resultar para el tratamiento en infecciones por biopelículas de SARM. Estudios recientes han comprobado que alanina-glioxilato aminotransferasa es capaz de catalizar la eliminación alfa, beta del  $\beta$ -CLA <sup>116</sup>. Contrario a lo que se especulaba en estudios anteriores, Beuster y col. 2011; descartan el efecto inhibitorio del  $\beta$ -CLA sobre la actividad de la enzima aspartato aminotransferasa e informan un efecto inhibitorio del crecimiento celular dependiente de la malignidad, en un modelo de células de fibroblastos <sup>117</sup>.

Recientemente, se ensayó el efecto de  $\beta$ -CLA y fosfomicina (FOS) en un modelo *in vitro* de formación de biopelícula de SARM, donde la combinación de estas moléculas demostró un importante efecto sinérgico <sup>118</sup>. Sin embargo, se desconoce el efecto de ésta y otras combinaciones de antibióticos de importancia clínica en SARM como LZD, VAN y DAP con  $\beta$ -CLA; en la formación y erradicación de biopelículas establecidas. Tampoco se ha estudiado el efecto de estas combinaciones en la expresión de genes que codifican factores de virulencia involucrados en la síntesis de biopelículas en SARM, lo que se suma al escaso trabajo realizado en la caracterización molecular de este patógeno en Chile.

En base a todos estos antecedentes discutidos, esta tesis pretende resolver las siguientes interrogantes:

- ¿El uso de sub-CMI de antibióticos de uso clínico favorece la selección de fenotipos productores de biopelículas en SARM?
- ¿Puede el uso de antibióticos de uso clínico en combinación con  $\beta$ -cloro-L-alanina contribuir a la erradicación de biopelículas de SARM?

## **CAPÍTULO II: PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN, HIPÓTESIS, OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Teniendo en cuenta el actual escenario de falta de conocimiento acerca de las características moleculares de los clones de SARM circulantes en nuestro país, la escasez en el arsenal de antibióticos, para tratar las infecciones que ellos producen, y el problema que supone la falta de una alternativa real de tratamiento efectivo frente a infecciones mediadas por biopelículas producidas por SARM; es que este trabajo, con base en la literatura citada, plantea las siguientes hipótesis:

### **Hipótesis**

1. Concentraciones sub-CMI de antibióticos utilizados en el tratamiento de infecciones por SARM, estimula la aparición de un fenotipo hiper-adhesivo que favorece el establecimiento de una biopelícula de SARM.
2. La combinación de  $\beta$ -cloro-L-alanina con antibióticos de uso habitual en el tratamiento de infecciones por SARM, disminuye la expresión de genes que codifican factores de virulencia implicados en la formación de biopelículas de esta bacteria, favoreciendo su erradicación.

## **Objetivo general**

Determinar el efecto individual de antibióticos de uso habitual en el tratamiento de infecciones por SARM y en combinación con  $\beta$ -cloro-L-alanina, en la expresión de genes de virulencia que contribuyen a la formación de biopelículas; y el efecto de estos compuestos en la formación y erradicación de biopelículas de cepas de SARM aisladas en hospitales de la zona centro-sur de Chile.

## **Objetivos específicos**

1. Caracterizar las cepas de SARM aisladas en hospitales de Chile, en función de sus perfiles de susceptibilidad a los antibióticos, factores de virulencia y relación genética.
2. Determinar el efecto de antibióticos, de uso habitual en el tratamiento de infecciones producidas por SARM, individualmente y en combinación con  $\beta$ -cloro-L-alanina en la formación y erradicación de biopelículas producidas por cepas de SARM.
3. Determinar el efecto en la expresión de genes de virulencia, asociados a la síntesis de adhesinas y formación de biopelículas, de  $\beta$ -cloro-L-alanina en combinación con antibióticos de uso habitual en el tratamiento de infecciones producidas por SAMR.

### **CAPÍTULO III: METODOLOGÍA**

#### **Cepas bacterianas.**

Se trabajó con 50 cepas de SARM aisladas de muestras de sangre en hospitales de 11 ciudades de Chile (Tabla 3) y todas ellas presentan el fenotipo hospitalario, que se caracteriza por perfiles de resistencia más amplios que su contraparte comunitaria, y la ausencia del gen *pvl*. Las cepas y la información de la presencia del gen *pvl* fueron proporcionadas por el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP, Chile) y se mantuvieron almacenadas a -80°C en una mezcla de caldo tripticasa de soya (Oxoid) y glicerol (Diprolab M.R.) 50% v/v en una proporción a:b, en el biorrepositorio del Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos (LIAA-UdeC). Los aislados fueron recuperados al momento de su utilización experimental en placas de agar sangre de cordero al 5%, incubadas a 37°C por 24 h.

#### **Confirmación de las cepas.**

Se confirmó la identificación de las cepas como *S. aureus* mediante la detección de los genes *nuc*, *coag* <sup>119,120</sup>. El genotipo de meticilino resistente se confirmó mediante detección de los genes *mecC* y *mecA* por PCR convencional, utilizando los partidores y condiciones descritas en la literatura <sup>121,122</sup>.



## **Estudios de susceptibilidad antimicrobiana**

La confirmación fenotípica de resistencia a meticilina realizó por cultivo en placa de agar Müller-Hinton (Oxoid), utilizando un disco de cefoxitina (FOX) con una potencia de 30 µg a 35°C por 18-24 h <sup>123</sup>. Adicionalmente, se evaluó la actividad antibacteriana de antibióticos de distintas familias, recomendados para tratar infecciones causadas por *S. aureus*, como: eritromicina (ERY), clindamicina (CLI), sulfametoxazol-trimetoprim (SXT), rifampicina (RIF), tetraciclina (TET) y fosfomicina (FOS). Los ensayos de susceptibilidad se llevaron a cabo mediante el método de difusión en placa de agar Müller-Hinton, siguiendo las recomendaciones y puntos de corte para definir susceptibilidad y resistencia propuestos por el CLSI 2018 <sup>123</sup> utilizando como control la cepa *S. aureus* ATCC® 25923 <sup>124,125</sup>.

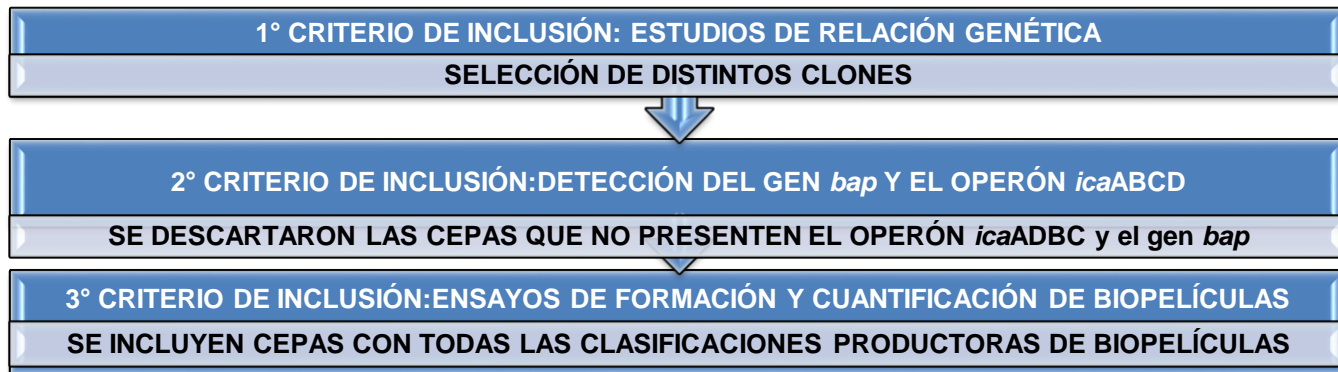
## **Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CMI)**

Se determinó la CMI de los antibióticos VAN, DAP, LZD y FOS mediante el método de microdilución en caldo Müller-Hinton, siguiendo las recomendaciones y puntos de corte propuestos por el CLSI 2018 <sup>123</sup>. Se utilizó como control la cepa *S. aureus* ATCC® 29213. La CMI de β-CLA se determinó de acuerdo a lo descrito por Akbari-Ayezloy y col.<sup>118</sup>

## Caracterización de las cepas.

En la tipificación de las cepas se investigó mediante PCR convencional la presencia del elemento *SCCmec* I-XI <sup>122,126</sup>, el locus *agr* I-IV <sup>127,128</sup> y la confirmación del gen *pvl* <sup>129</sup>, de acuerdo a las condiciones descritas en la literatura. Junto a esto, se detectó mediante amplificación por PCR convencional genes que codifican los factores de virulencia *hla*, *hlb*, *fnbA*, *fnbB* y los operones *cap1*, *cap2*, *cap5*, *cap8*, *agr*, *bap* e *icaABCD*, de acuerdo a las condiciones descritas en literatura citada en la tabla 1. Además, para la caracterización se incluyeron ensayos de formación y cuantificación de biopelículas y estudios de relación genética; descritos más adelante en la metodología.

En base a estos análisis, se confeccionaron perfiles de virulencia y se determinaron si existe asociación de estos perfiles entre grupos clonales, producción de biopelículas y *SCCmec* de las cepas. Además, se utilizaron los análisis de relación genética de las cepas, presencia del operón *icaADBC*, el gen *bap* y la capacidad de formación de biopelículas, como criterios de inclusión para el estudio del efecto de antibióticos en combinación con  $\beta$ -CLA en los ensayos de erradicación de biopelículas, ensayos de expresión de genes de virulencia descritos más adelante en la metodología. Estos criterios de inclusión se detallan en la figura 7:



**Figura 7:** Criterios de inclusión para elección de cepas para el estudio del efecto de antibióticos en combinación con  $\beta$ -CLA.

### **Estudios de relación genética.**

Se utilizó la metodología de macrorrestricción con la enzima endonucleasa *Sma*I y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, por sus siglas en inglés *Pulsed-field gel electrophoresis*) basada en el protocolo del *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, por sus siglas en inglés) de Canadá para SARM, con las modificaciones descritas por el ISP de Chile<sup>130</sup>. Los fragmentos producidos se separaron en un gel de agarosa al 1% en búfer TBE 0,5X y 5  $\mu$ L de *GelRed*<sup>TM</sup> *Thermo Fisher Scientific*, en el cual se depositaron los *plugs* de agarosa digeridos. La PFGE se realizó en el equipo CHEF DR II (BioRad) y se utilizaron los parámetros para la corrida electroforética indicados por el ISP de Chile durante 19 h, con un pulso inicial de 5,3 s, un pulso final de 34,9 s, a 6 V/cm, con un ángulo de 120° y temperatura de 14°C. Los productos de la macrorrestricción separados en la PFGE fueron visualizados y fotografiados en el fotodocumentador UVIdoc HD5 (Uvitec, Cambridge). Se realizó un análisis de las bandas de restricción con

el software BioNumerics v.6.611. El índice de similitud se calculó utilizando el coeficiente DICE, una tolerancia de posición de banda del 1 % y una optimización del 0,5 %. El método del grupo de pares no ponderados con promedios aritméticos (UPGMA) se utilizó para construir un dendrograma, y los conglomerados se seleccionaron usando un corte al 80 % <sup>131</sup>.

### **Secuenciación del genoma completo y análisis del genoma *in silico***

El ADN total para la secuenciación del genoma completo (WGS, por sus siglas en inglés) se extrajo con el kit de purificación de ADN genómico Wizard™ (Promega, EE. UU.) siguiendo el protocolo del fabricante.

Las bibliotecas de muestras se prepararon con el kit Illumina DNA Prep y los índices UDI de 10 pb de IDT, y se secuenciaron en un Illumina NextSeq 2000, produciendo lecturas de 2x151 pb. La demultiplexación, el control de calidad y el recorte del adaptador se realizaron con bcl-convert (v3.9.3) <sup>132</sup>.

Los ensamblajes de novo se lograron utilizando los ensambladores Unicycler v0.4.8 y SPades v3.15.4, según las plataformas de secuenciación utilizadas. Los contigs resultantes se visualizaron con Bandage v0.8.1, mientras que la anotación genómica se realizó con Prokka <sup>133</sup>.

A partir del genoma ensamblado, se realizó la confirmación de la especie, se identificaron los *loci* tipo multilocus (MLST), *spa type*, se confirmó la tipificación del tipo de SCC*mec*, genes de resistencia a los antimicrobianos y genes de virulencia utilizando las siguientes plataformas:

1. SpeciesFinder 2.0 (<https://cge.food.dtu.dk/services/SpeciesFinder/>)

2. MLSTFinder 2.0 (<https://cge.food.dtu.dk/services/MLST/>)
3. SCCmecFinder 1.2 (<https://cge.food.dtu.dk/services/SCCmecFinder/>)
4. spaTyper 1.0 (<https://cge.food.dtu.dk/services/spaTyper/>)
5. ResFinder 4.1 (<https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder/>)
6. VirulenceFinder 2.0 (<https://cge.food.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>)

## **Ensayos de formación y erradicación de biopelículas**

### **Ensayos de adherencia.**

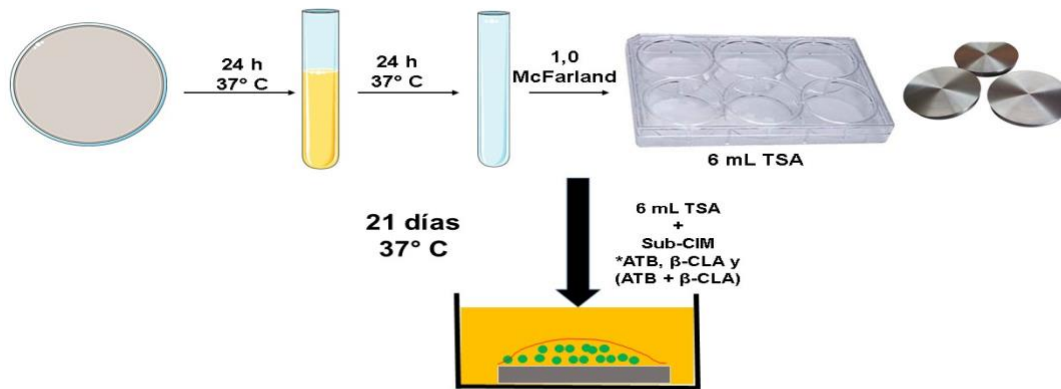
Para evaluar la capacidad de adherencia de *S. aureus* se utilizó el método de placa de microtitulación utilizado por Stepanović y col. 2007<sup>134</sup> con modificaciones. Brevemente, las placas de microtitulación de 96 pocillos fueron pre-tratadas durante 18 a 20 h con 200 µL de plasma humano a 4°C, el cual fue posteriormente aspirado por medio de una pipeta estéril. Una vez aspirado el plasma, se depositaron 200 µL de un cultivo de 18-24 h en caldo tripticasa de soya (TSB) (Oxoid) ajustado a una turbidez de 1,0 McFarland. Transcurrido el período de incubación, se enjuagó cada pocillo 3 veces con 200 µL de PBS estéril, se fijó la biopelícula con etanol al 100 % y se aspiró inmediatamente para su secado en cámara estéril con su tapa. Una vez seca, se realizó la etapa de teñido con 200 µL de cristal violeta por 2 min, seguido de un aspirado con una pipeta estéril y una elución por 10 min con etanol al 100%. Finalizada la etapa de elución, la solución fue depositada en una nueva placa para la lectura del resultado mediante un lector de placas a una absorbancia de 595 nm ( $A_{595}$ ). La  $A_{595}$  de los pocillos con TSB fue considerada como control negativo de producción de biopelícula. Los valores de 0,5 a una  $A_{595}$  fueron

considerados punto de corte y resultado positivo para la producción de biopelícula, y la formación de biopelícula para cada aislamiento fue analizada y categorizada en función de la absorbancia a los siguientes valores: fuerte formador de biopelículas (FFBP) ( $A_{595} > 2$ ), mediano formador de biopelículas (MFBP) ( $A_{595} > 1 < 2$ ), débil formador de biopelículas (DFBP) ( $A_{595} > 0,5 < 1$ ), y no formador de biopelículas (NFBP) ( $A_{595} < 0,5$ )

135.

### **Ensayos de formación y erradicación de biopelículas en presencia de antibióticos y $\beta$ -CLA**

Se realizaron de acuerdo a Hochbaum y cols <sup>104</sup> con algunas modificaciones. Se cultivaron las cepas seleccionadas en placas de poliestireno de 6 pocillos de fondo plano, con una lámina de acero inoxidable lisa de 18 mm de diámetro inmersa en medio TSB con y sin LZD, VAN, DAP y con estos mismos antibióticos en combinación con  $\beta$ -CLA durante 21 días (figura 8). Posteriormente, las placas de acero inoxidable fueron lavadas con agua desionizada estéril y las células adheridas se fijaron usando una solución de glutaraldehído al 5% durante 1 h con surfactina 0,05 M (Sigma-Aldrich), para luego ser lavadas dos veces con PBS.



\*ATB: LZD 1µg/mL, VAN 0,5 µg/mL, DAP 0,125 µg/mL

**Figura 8:** Esquema de ensayos de formación y erradicación de biopelículas en presencia de antibióticos y β-CLA (diseño propio).

## **Análisis de microscopía confocal de la biopelícula en placa de acero inoxidable**

Se utilizó el LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este kit funciona en mediante a 2 tinciones en base a los colorantes SYTO®9 de color verde y yoduro de propidio, color rojo. SYTO®9 difunde a través de las membranas celulares bacterianas, indicando así las bacterias vivas, mientras que el yoduro de propidio sólo es capaz de atravesar aquellas membranas fragmentadas; lo cual se toma como indicador de células muertas.

Las muestras tratadas en los ensayos de formación y erradicación de biopelículas en presencia de antibióticos y  $\beta$ -CLA fueron teñidas con 500  $\mu$ L del reactivo e incubadas en oscuridad durante 10 min, envueltas en papel de aluminio. Las muestras fueron analizadas en microscopio láser confocal espectral (LSM 780, ZEISS, Germany), de acuerdo a lo descrito por Sánchez-Sanhueza y col.<sup>136</sup>. Este análisis permite cuantificar tanto el número de bacterias vivas/muertas, así como el espesor de la biopelícula.

## **Ensayos de expresión de genes de virulencia.**

Los efectos de sub-CMI de los antibióticos LZD, VAN, DAP sólo y en combinación con  $\beta$ -CLA, en la expresión de los genes de virulencia *hla*, *hly*, *fnbA*, *fnbB* y *agr*, *psmA*, *psmB* e *icaADBC* se estudiaron mediante *quantitative real-time PCR* (qRT-PCR) con los partidores especificados en la tabla 2. Los partidores utilizados y las condiciones de extracción del ARN desde la biopelícula se realizaron mediante lo descrito por Atshan y col. 2013<sup>137</sup>. Brevemente, las células bacterianas adheridas en cada pocillo y placa de metal, fueron sometidas a extracción de ARN a las 6, 12, 24, 48 y 72 h y desde una



biopelícula madura de 21 días. El procedimiento de extracción se realizó con TRIzol® Max™ Bacterial RNA Isolation Kit (Ambion™) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### **Análisis estadísticos**

Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para evaluar diferencias en la formación de biopelículas en los experimento de microscopía confocal, mediante el software IBM SPSS Statistics versión 23.0 (SPSS Inc. ®, Chicago, IL), estableciendo el nivel de significancia estadística en  $p < 0,05$ .

**Tabla 2:** Partidores para detección de determinantes de virulencia y plásmido pUB110.

<b>Partidor para genes</b>	<b>Secuencia nucleotídica 5'→3'</b>	<b>Tamaño amplicón (pb)</b>	<b>Referencia</b>
<i>fnbA</i>	GCGGAGATCAAAGACAA CCATCTATAGCTGTGTGG	1280	138
<i>fnbB</i>	GGAGAAGGAATTAAGGCG GCCGTCGCCTTGAGCGT	820	138
<b>ACME1</b>	TCTATTACTGAGCCAGAA GTA CG CACGTA ACTTGCTAGAACGAGTA	733	139
<b>ACME2</b>	TCAGCTGCTAACTTCTCAAGGTAAAG CATTTTGCGCAGGTGCTAAG	65	140
<i>cap1</i>	AGGTCTGCTAATTAGTGCAA GAACCCAGTACAGGTATCACCA	550	141
<i>cap2</i>	AGCAATCTTCGGTTATTGCCGGTG ATGACGGTAAGGCATCAAGGTCG	732	141
<i>cap5</i>	ATGACGATGAGGATAGCG CTCGGATAACACCTGTTGC	881	141
<i>cap8</i>	ATGACGATGAGGATAGCG CACCTAACATAAGGCAAG	1148	141
<i>pmsA</i>	CTTTCACATGGGTATCATTGCAGG CAATAGCCATCGTTTTGTCCTCCT	266	142
<i>psmB</i>	TAATAATGACGGCGCAAATTAGG GCAACGATGTCTACGATACTTGTGC	238	142
<i>bap</i>	CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTGCAC GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC	971	143
<i>icaA</i>	CCTAACTAACGAAAGGTAG AAGATATAGCGATAAGTGC	1315	144
<i>icaD</i>	AAACGTAAGAGAGGTGG GGCAATATGATCAAGATAC	381	144
<b>pUB110</b>	CAGGTCTCTTCAGATCTACG GAGCCATAAACACCAATAGCC	381	145
<i>*icaA</i>	GAGGTAAAGCCACGCACTC CCTGTAACCGCACCAAGTTT	151	137
<i>*icaD</i>	ACCCAACGCTAAAATCATCG CGCAAATGCCATACTTTC	211	137
<i>*fnbA</i>	AAATTGGGAGCAGCATCAGT GCAGCTGAATTCCCATTTTC	121	137

<b>*fnbB</b>	ACGCTCAAGGCGACGGCAAAG ACCTTCTGCATGACCTTCTGCACCT	197	137
<b>*gyrB</b>	GGTGGCGACTTTGATCTAGC TTATAACAACGGTGGCTGTGC	170	98
<b>*16S rRNA</b>	GGGACCCGCACAAGCGGTGG GGGTTGCGCTCGTTGCGGGA	191	137
<b>*psmA</b>	GTATCATCGCTGGCATCA AAGACCTCCTTTGTTTGTATG	89	146
<b>*psmB</b>	TGGACTAGCAGAAGCAATC TAGTAAACCCACACCGTTAG	109	146

\*Partidores utilizados en experimentos de qRT-PCR.

### Aspectos bioéticos y de bioseguridad

Para el desarrollo de los experimentos de esta tesis, se utilizó aislados clínicos de SARM aislados en diferentes hospitales de Chile, clasificados con nivel de bioseguridad de tipo 2, los cuales fueron manejadas de acuerdo las recomendaciones descritas en la Guía de Bioseguridad para Laboratorios Clínicos del Instituto de Salud Pública, de 2013 <sup>147</sup>.

En cuanto al tratamiento de los desechos, el Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos (LIAA-UdeC) del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas se rige por los procedimientos establecidos por MAPTEL, de la Universidad de Concepción, y cuenta con instalaciones de un laboratorio BSL tipo 2 apropiadas para el manejo de los patógenos de este estudio. El LIAA, además, cuenta con cámaras de bioseguridad clase II ThermoScientific®, autoclaves, acceso restringido y espacios delimitados para minimizar el riesgo de infección.

Para fines de evaluación bioética, esta tesis no utilizó modelos *in vivo* para sus estudios. Las cepas clínicas que se emplearon no disponen de información sensible asociada (datos clínicos de pacientes) que pueda afectar la ley 20.584, la cual regula los derechos y deberes que tienen las personas en relación con acciones vinculadas a su atención en salud (“Ley de Derechos y Deberes de los Pacientes”).

**Tabla 3:** Información de las cepas de SARM de origen hospitalarios referidas desde el ISP Chile.

<b>N° de aislado</b>	<b>Año de aislamiento</b>	<b>Ciudad</b>	<b>Tipo de muestra</b>	<b>PVL*</b>
21	2012	Puerto Montt	sangre	negativo
23	2012	Región Metropolitana	sangre	negativo
25	2012	Puerto Montt	sangre	negativo
27	2012	Temuco	sangre	negativo
28	2012	Rancagua	sangre	negativo
31	2012	Viña del Mar	sangre	negativo
32	2012	Concepción	sangre	negativo
33	2013	Rancagua	sangre	negativo
35	2013	Región Metropolitana	sangre	negativo
36	2013	Puerto Montt	sangre	negativo
37	2013	Los Angeles	sangre	negativo
38	2013	Valparaíso	sangre	negativo
39	2013	Concepción	sangre	negativo
41	2013	Puerto Montt	sangre	negativo
43	2013	Concepción	sangre	negativo
46	2014	Temuco	sangre	negativo
47	2014	Región Metropolitana	sangre	negativo
48	2014	Concepción	sangre	negativo
50	2014	Región Metropolitana	sangre	negativo

**Tabla 3 (continuación):** Información de las cepas de SARM de origen hospitalarios referidas desde el ISP Chile.

<b>N° Cepario</b>	<b>Año</b>	<b>Localización geográfica</b>	<b>Origen de la muestra</b>	<b>PVL*</b>
51	2014	Región Metropolitana	sangre	negativo
54	2014	Región Metropolitana	sangre	negativo
56	2014	Región Metropolitana	sangre	negativo
58	2014	Puerto Montt	sangre	negativo
62	2015	Región Metropolitana	sangre	negativo
64	2015	Puerto Montt	sangre	negativo
66	2015	Región Metropolitana	sangre	negativo
67	2015	Talca	sangre	negativo
68	2015	Región Metropolitana	sangre	negativo
69	2015	Puerto Montt	sangre	negativo
70	2015	Región Metropolitana	sangre	negativo
71	2015	Región Metropolitana	sangre	negativo
72	2015	Región Metropolitana	sangre	negativo
73	2016	Temuco	sangre	negativo
74	2016	Puerto Montt	sangre	negativo
77	2016	Concepción	sangre	negativo
78	2016	Región Metropolitana	sangre	negativo
79	2016	Región Metropolitana	sangre	negativo
81	2016	Osorno	sangre	negativo
83	2016	Región Metropolitana	sangre	Negativo

**Tabla 3 (continuación):** Información de las cepas de SARM de origen hospitalarios referidas desde el ISP Chile.

<b>N° Cepario</b>	<b>Año</b>	<b>Localización geográfica</b>	<b>Origen de la muestra</b>	<b>PVL*</b>
84	2016	Región Metropolitana	sangre	negativo
86	2016	Región Metropolitana	sangre	negativo
87	2017	Puerto Montt	sangre	negativo
89	2017	Temuco	sangre	negativo
92	2017	Rancagua	sangre	negativo
94	2017	Talca	sangre	negativo
96	2017	Región Metropolitana	sangre	negativo
97	2017	Región Metropolitana	sangre	negativo
98	2017	Región Metropolitana	sangre	negativo
99	2017	Rancagua	sangre	negativo
100	2017	Región Metropolitana	sangre	negativo

\*PVL: Leucocidina Pantón-Valentine

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS

### Confirmación de las cepas

En todas las cepas referidas por el ISP de Chile se confirmó la identificación de la especie y el genotipo de SARM mediante la amplificación por PCR de los genes *nuc*, *coag* y *mecA*, respectivamente. No se encontraron cepas portadoras del gen *mecC*.

### Caracterización de las cepas

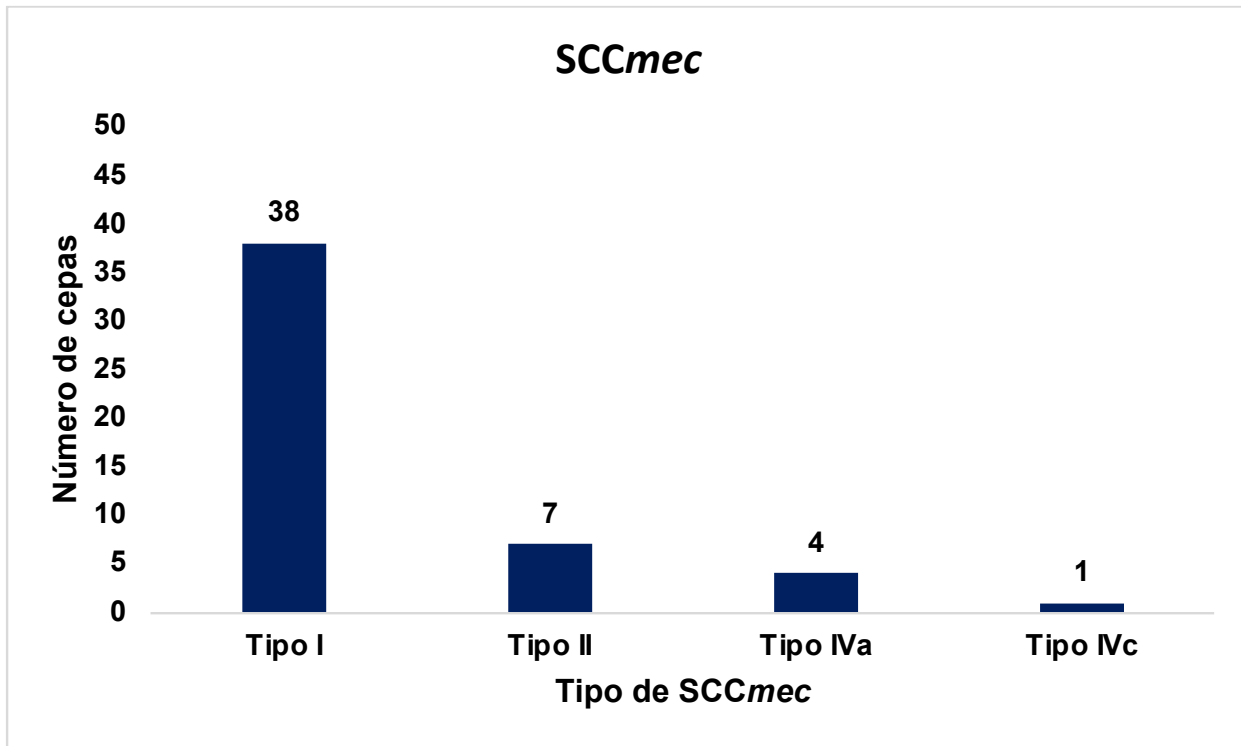
Las cepas fueron inicialmente tipificadas mediante PCR convencional en función de su *SCCmec*, el locus *agr* y el gen *pvl*. De las 50 cepas referidas por el ISP de Chile, 38 cepas (76%) presentaban el *SCCmec* tipo I, 7 cepas (14%) presentaban el *SCCmec* tipo II, 4 cepas (8%) presentaron el *SCCmec* tipo IVa y 1 cepa (2%) presentó el *SCCmec* tipo IVc (figura 9). Sólo 1 de las cepas presentó el gen *pvl*, que codifica la toxina Pantón Valentine (UCOSA-31).

El secuenciotipo (ST) prevalente fue ST5 encontrado en el 76% de las cepas, seguido del ST105 (14%), ST8 (4%) y los ST5575, ST2802, ST72 con 2%, respectivamente (figura 10). Además, se determinó los *spa types* de las cepas referidas, encontrando como *spa type* prevalente el t149 (66%), seguido del t002 (12%). Los detalles de frecuencia de estos se describen en la tabla 3.

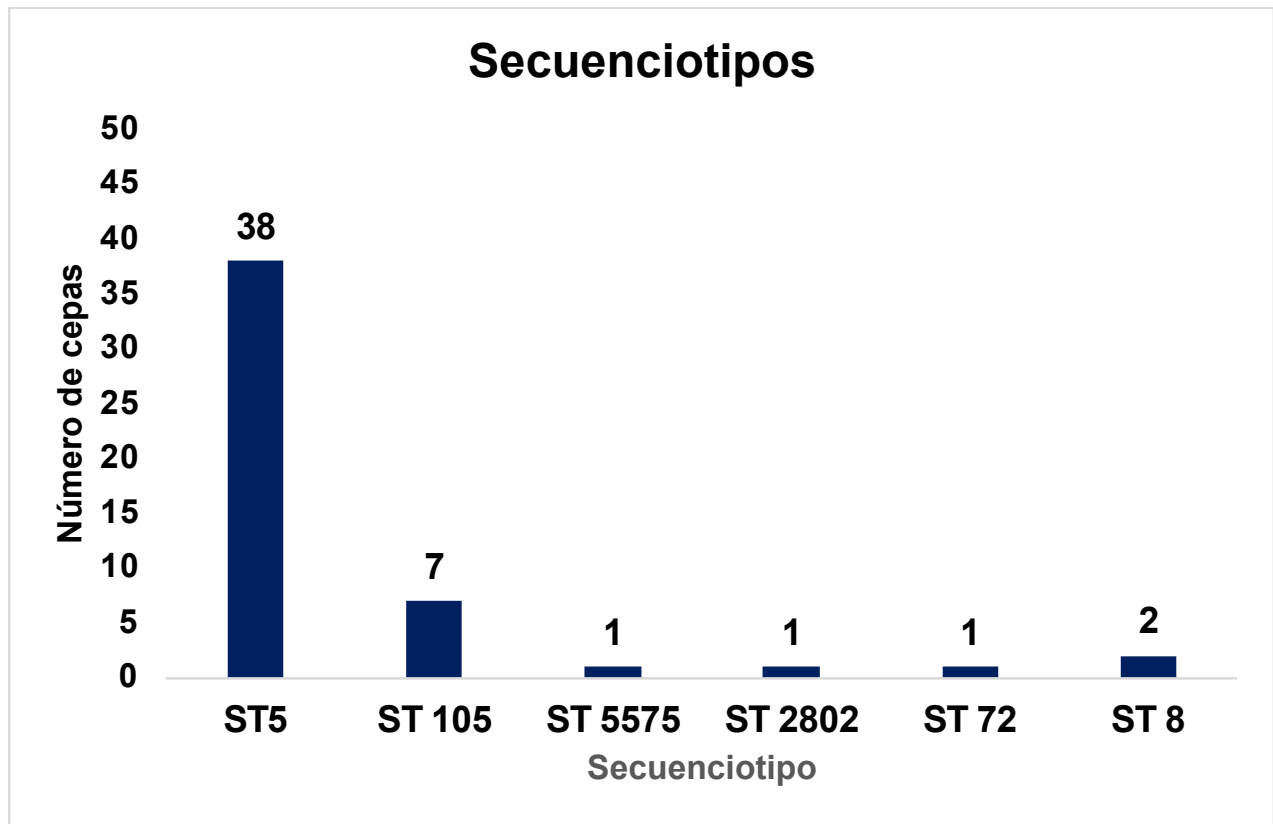
Del total de las 50 cepas analizadas, en sólo 18 se logró determinar el tipo de *agr*, determinándose que 15 de ellas (30%) pertenecen al grupo *agr* tipo II y 3 cepas (6%) al



agr tipo I. En las 32 cepas restantes, no fue posible tipificar por los métodos utilizados. Aquellas cepas que presentaron los SCCmec tipo IVa y SCCmec tipo IVc fueron clasificadas como SARM-AC, y excluidas de los siguientes estudios.



**Figura 9:** Distribución del elemento SCCmec en 50 cepas de SARM aisladas en hospitales de Chile.



**Figura 10:** Tipos de secuencia (ST) encontrados en 50 cepas de SARM-AH aisladas en hospitales de Chile.

**Tabla 3:** Distribución *spa types* en 50 cepas de SARM-AH aisladas en hospitales de Chile

<i>spa type</i>	Frecuencia (N° de cepas)	%
<b>t149</b>	33	66
<b>t002</b>	6	12
<b>t008</b>	1	2
<b>t143</b>	1	2
<b>t2</b>	1	2
<b>t664</b>	1	2
<b>t18</b>	1	2
<b>t1311</b>	1	2
<b>t010</b>	1	2
<b>t1188</b>	1	2
<b>N/A*</b>	1	2
<b>Unknown</b>	2	4
<b>TOTAL</b>	50	100

\*N/A: No asignado; Unknown: desconocido.

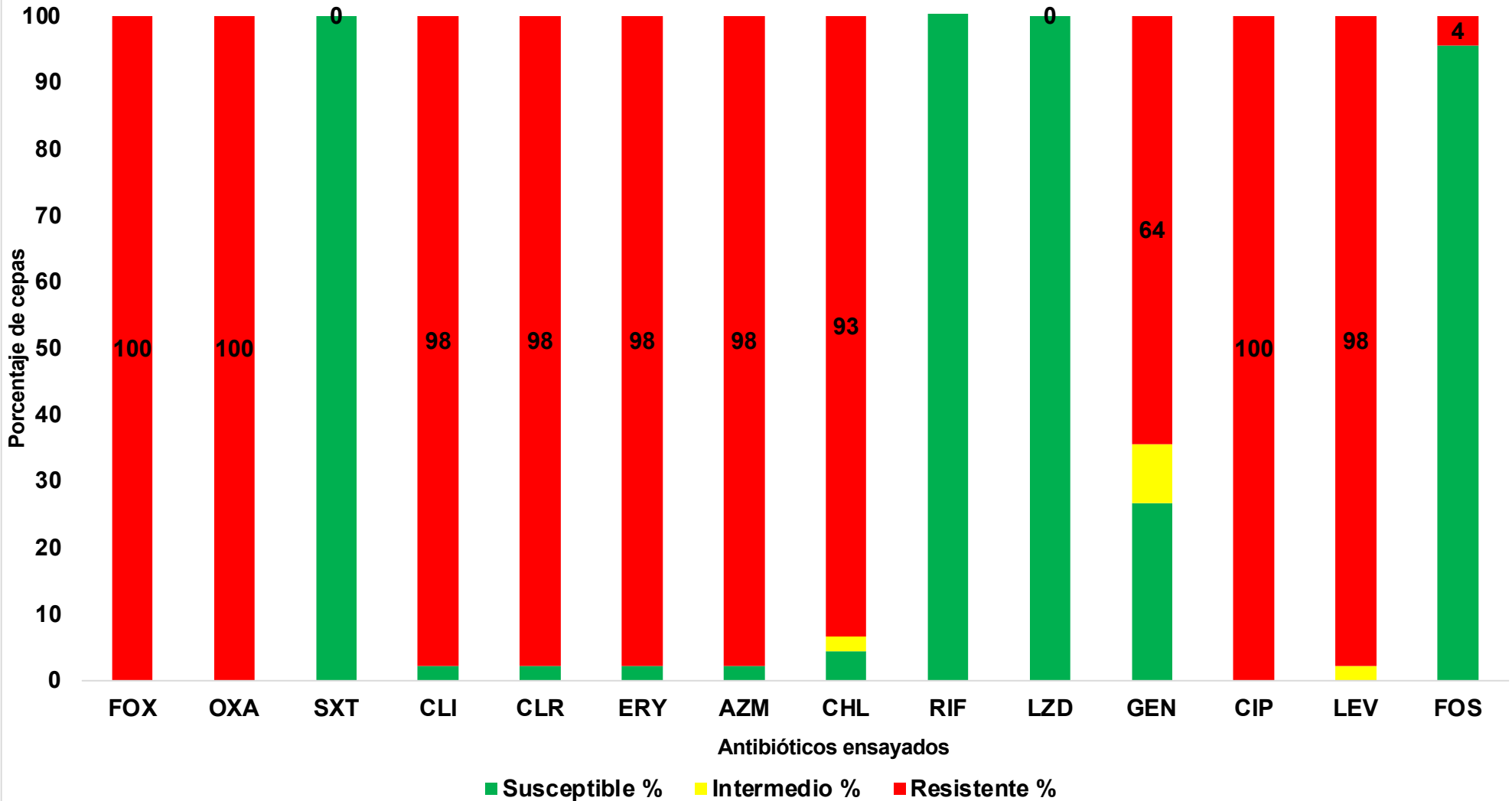
## Estudios de susceptibilidad antimicrobiana

En todas las cepas se encontró resistencia a FOX, confirmando el fenotipo de SARM mediante el *test* de FOX. Adicionalmente, los ensayos de susceptibilidad antibiótica llevados a cabo mediante el método de difusión en placa de agar Müller-Hinton fueron consistentes con el *test* de FOX, ya que el 100% de las cepas fue resistente a OXA.

Frente a los antibióticos del grupo MLS<sub>B</sub>, 44 cepas (98%) fueron resistentes a CLI, ERY, CLA, AZM, y sólo una cepa (2%) fue susceptible a este grupo (UCO-SA 41). En el caso de las quinolonas, el 100% de las cepas fueron resistentes a CIP, mientras que a LEV 44 cepas (98%) fueron resistentes y 1 cepa (2%) fue catalogada como intermedio.

Para los aminoglucósidos se encontró que 29 cepas (64%) fueron resistentes, 4 cepas (9%) intermedias y 12 cepas (27%) susceptibles a GEN. Frente a RIF y CHL, 2 cepas (4%) fueron resistentes y 43 (96%) fueron susceptibles a estos antibióticos. Los estudios de susceptibilidad a FOS muestran que 43 cepas (96%) son susceptibles y 2 cepas (4%) son resistentes a este antibiótico, de acuerdo con los criterios de EUCAST 2021<sup>148</sup>. El 100% de las cepas fue susceptible a SXT y LZD (figura 11).

### PORCENTAJE DE RESISTENCIA LOS ANTIMICROBIANOS DE LAS CEPAS SARM-AH



**Figura 11:** Porcentaje de susceptibilidad (verde), susceptibilidad intermedia (amarillo) y resistencia (rojo) de 50 cepas de SARM-AC aisladas en Chile entre 2007 y 2017 determinado mediante el método de difusión en agar. Cefoxitina (FOX), oxacilina (OXA), sulfametoxazol-trimetoprim (SXT), clindamicina (CLI), claritromicina (CLR), eritromicina (ERY), azitromicina (AZM), cloranfenicol (CHL), rifampicina (RIF), linezolid (LZD), gentamicina (GEN), ciprofloxacino (CIP), levofloxacino (LEV) y fosfomicina (FOS).

## Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CMI)

Se determinó la CMI a antibióticos LZD, VAN y DAP y a  $\beta$ -CLA mediante el método de microdilución en placa de 96 pocillos, y a CPT mediante el método de epsilometría (E-test®).

Todas las cepas fueron susceptibles a LZD, VAN y DAP mostrando valores de CMI<sub>90</sub> de 2  $\mu$ g/mL, 1  $\mu$ g/mL y 0,25  $\mu$ g/mL, respectivamente. Por otra parte, frente a CPT, 15 cepas (30%) fueron susceptibles y 35 cepas (70%) fueron susceptible dosis dependiente (SSD) a este antibiótico (tabla 4).

Para el caso de  $\beta$ -CLA, se le determinó la CMI a las cepas incluidas en los ensayos de formación y erradicación de biopelículas en presencia de antibióticos y este compuesto (3 cepas). La CMI a este compuesto en las 3 cepas ensayadas fue de 32  $\mu$ g/mL.

**Tabla 4:** Resultados de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> sobre cepas de SARM de origen hospitalario referidas desde el ISP Chile (N=45).

	CMI <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)				CMI <sub>90</sub> ( $\mu$ g/mL)			
	VAN	DAP	LZD	CPT	VAN	DAP	LZD	CPT
<b>SARM-AH</b>	1	0,25	2	1,5	1	0,5	2	1,5

## Genes de resistencia a antibióticos

Mediante la secuenciación del genoma completo se realizó la detección de genes de resistencia a diferentes familias de antibióticos en las 45 cepas de SARM-AH.

Se detectaron los siguientes genes que codifican mecanismos de resistencia a la familia de los aminoglucósidos: *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* en 37 cepas (82%), *aad(6)* y *ant(6)-Ia* en 29 cepas (64%), *aadD* en 7 cepas (16%), *aadE* en 3 cepas (7%), *ant(9)-Ia* en 44 cepas (98%), *ant(4')-Ib* en 7 cepas (16%), *sat4* en 18 cepas (40%) y *aph(3')-IIIa* en 29 cepas (64%). Por otra parte, también fueron detectados genes *ermA* y *ermC* en 44 (98%) y 2 cepas (4%), respectivamente, los cuales codifican resistencia a los antibióticos del grupo MLS<sub>B</sub>.

Adicionalmente, se detectaron los genes *blaZ* (82%), *rphB* (91%), y *dfrC* (1%); que confieren resistencia a penicilina, RIF y trimetoprima; respectivamente. En todas las cepas se detectó el gen *fosB*, que confiere resistencia a fosfomicina, los genes *norA* y *mgrA* que confieren resistencia a fluoroquinolonas y compuestos amonio cuaternario (QACs), *mepA* y *mepR* que confieren resistencia a fluoroquinolonas, tetraciclinas, glicilciclinas y QACs; *sav1866* que confiere resistencia a CIP, *tet38* que confiere resistencia a tetraciclina y el sistema regulador de 2 componentes arIRS (tabla 5).

**Tabla 5:** Distribución porcentual de cepas de SARM con genes de resistencia a diferentes familias de antibióticos (N=45 cepas).

Familia de antibióticos	Genes de resistencia	n (%)
β-lactámicos	<i>blaZ</i>	37 (82)
	<i>mecA</i>	45 (100)
	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	37 (82)
	<i>aad(6)</i>	37 (82)
	<i>ant(6)-Ia_1</i>	37 (82)
	<i>aadD_1</i>	37 (82)
Aminoglucósidos	<i>aadE_1</i>	37 (82)
	<i>ant(9)-Ia</i>	37 (82)
	<i>ant(4')-Ib</i>	37 (82)
	<i>aph(3')-IIIa</i>	37 (82)
	<i>sat-4</i>	18 (44)
	<i>ermA</i>	44 (98)
MLS <sub>B</sub>	<i>ermC</i>	2 (4)
Fosfomicina	<i>fosB</i>	45 (100)
Quinolonas, QACs	<i>norA</i>	45 (100)
	<i>sav1866</i>	45 (100)
	<i>mgrA</i>	45 (100)
Rifamicinas	<i>rphB</i>	41 (91)
	<i>sat-4</i>	18 (40)
Tetracilinas	<i>tet(38)</i>	45 (100)
Cotrimoxazol	<i>dfrC</i>	1 (2)
	<i>arlR</i>	45 (100)
Sistema regulador de bombas de 2 componentes	<i>arlS</i>	44 (98)
	<i>mepA</i>	45 (100)
Fluoroquinolonas, tetracilinas, gliciliclinas y QACs	<i>mepR</i>	45 (100)

**QACs:** Compuestos amonios cuaternarios



## Genes de virulencia

En cuanto a los perfiles de virulencia, las cepas presentaron un amplio perfil de genes codificantes de factores de virulencia implicados en la adherencia, producción de exoenzimas, evasión del sistema inmune, captación del hierro, toxinas y enterotoxinas.

Desde el punto de vista de la producción de biopelículas, y de los genes de interés estudiados en esta tesis, 44 cepas (98%) de las cepas presentaron gen *fnbA* y 20 cepas (26%) el gen *fnbB*; 44 cepas (98%) presentaron el operón *icaABCDR*; 36 cepas (80%) presentaron el gen *hly/hla* y el 100% portaban los genes *hly* y *hld*. No se detectó la presencia del gen *bap*, ni de los operones *pmsA* y *pmsB* en ninguna de las 45 cepas ensayadas.

La distribución de los genes de virulencia se detallan desde la tabla 6 a la 11.

**Tabla 6:** Distribución de genes de virulencia relacionados a la adherencia en 45 cepas de SARM-AH.

<b>Factores de virulencia</b>	<b>Genes relacionados</b>	<b>n (%)</b>
Factor de aglutinación A	<i>clfA</i>	43 (98)
Factor de aglutinación B	<i>clfB</i>	43 (98)
Proteína de unión a elastina	<i>ebp</i>	43 (98)
Proteína de adherencia extracelular/Proteína análoga MHC	<i>eap/map</i>	42 (93)
Proteínas de unión a fibronectina	<i>fnbA</i>	43 (98)
	<i>fnbB</i>	9 (20)
	<i>icaA</i>	43 (98)
	<i>icaB</i>	43 (98)
Adhesina intercelular	<i>icaC</i>	43 (98)
	<i>icaD</i>	43 (98)
	<i>icaR</i>	43 (98)
Proteínas de unión Serina-Aspartato	<i>sdrC</i>	43 (98)
	<i>sdrF</i>	43 (98)
	<i>sdrG</i>	42 (93)

**Tabla 7:** Distribución de genes de virulencia que codifican exoenzimas en 45 cepas de SARM-AH

<b>Factores de virulencia</b>	<b>Genes relacionados</b>	<b>n (%)</b>
Adenosina sintasa A	<i>adsA</i>	45 (100)
Aureolisina	<i>aur</i>	45 (100)
	<i>sspA</i>	43 (96)
Cisteína proteasa	<i>sspB</i>	43 (96)
	<i>sspC</i>	43 (96)
Hialuronato liasa	<i>hysA</i>	45 (100)
	<i>lip</i>	43 (98)
Lipasa	<i>geh</i>	43 (98)
	<i>splA</i>	39 (87)
	<i>splB</i>	38 (85)
Serina proteasa	<i>splE</i>	1 (2)
	<i>coa</i>	43 (98)
Estafiloagulasas	<i>clpP</i>	42 (93)
Estafiloquinasa	<i>sak</i>	43 (98)
Proteína de unión al Factor de von Willebrand	<i>vWbp</i>	43 (96)

**Tabla 8:** Distribución de genes que codifican factores de virulencia implicados en la evasión del sistema inmune del hospedero en 45 cepas de SARM-AH.

<b>Factores de virulencia</b>	<b>Genes relacionados</b>	<b>n (%)</b>
Polisacárido capsular	<i>cap5</i>	8 (18)
	<i>cap8</i>	37 (82)
Proteína de unión de la quimiotaxis de <i>S. aureus</i>	<i>chp</i>	43 (96)
Inhibidor del complemento	<i>scn</i>	45 (100)
Proteína estafilocócica A	<i>spa</i>	45 (100)
Aglutinador de inmunoglobulina	<i>sbi</i>	45 (100)

**Tabla 9:** Distribución de genes que codifican factores de virulencia implicados en la adquisición de hierro en 45 cepas de SARM-AH.

<b>Factores de virulencia</b>	<b>n (%)</b>	
Determinantes de superficie regulados por hierro	<i>isdA</i>	42 (93)
	<i>isdB</i>	43 (98)
	<i>isdC</i>	43 (98)
	<i>isdD</i>	43 (98)
	<i>isdE</i>	43 (98)
	<i>isdF</i>	43 (96)
	<i>isdG</i>	37 (82)
Sortasa B	<i>srtB</i>	41 (91)

**Tabla 10:** Distribución de genes que codifican factores de virulencia implicados en la síntesis de toxinas en 45 cepas de SARM-AH.

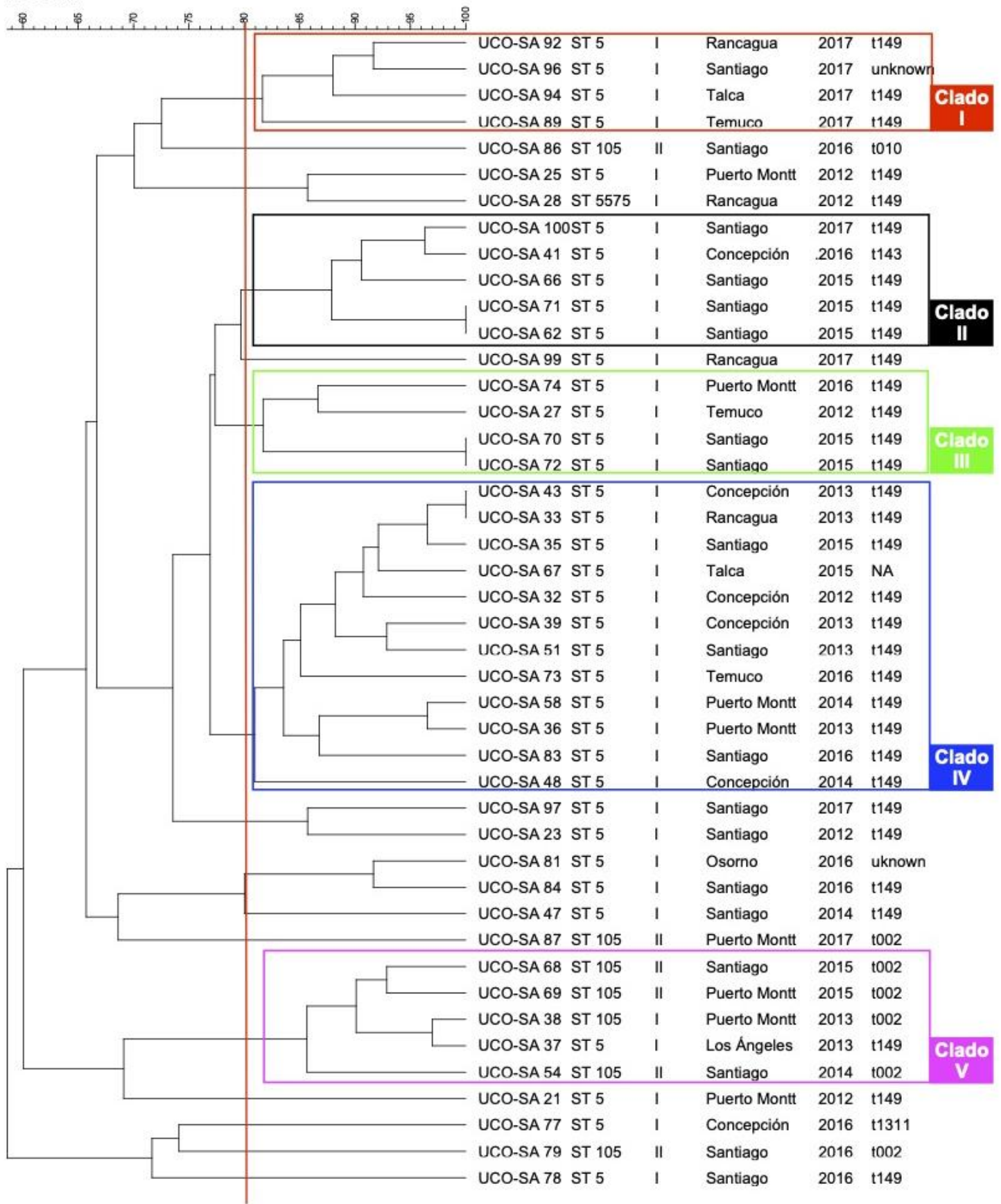
Factores de virulencia		Genes relacionados	n (%)
		<i>esaA</i>	43 (98)
		<i>esaB</i>	43 (98)
		<i>esaC</i>	43 (98)
Sistema de secreción	Sistema de secreción tipo VII (SST7)	<i>essA</i>	43 (98)
		<i>essB</i>	43 (98)
		<i>essC</i>	43 (98)
		<i>esxA</i>	43 (98)
		<i>esxB</i>	43 (98)
Hemolisinas	Hemolisina alfa	<i>hly/hla</i>	36 (80)
	Hemolisina beta	<i>hlyB</i>	45 (100)
	Hemolisina delta	<i>hlyD</i>	45 (100)
		<i>hlyA</i>	43 (98)
	Hemolisina gamma	<i>hlyB</i>	43 (98)
		<i>hlyC</i>	43 (98)
Leucocidinas	Leucocidina Pantone-Valentine	<i>lukF-PV</i>	43 (98)
		<i>lukS-PV</i>	0 (0)

**Tabla 11:** Distribución de genes que codifican factores de virulencia implicados en la evasión del sistema inmune del hospedero en 45 cepas de SARM-AH.

	<b>Factores de virulencia</b>	<b>Genes relacionados</b>	<b>n (%)</b>
	Enterotoxina A	<i>sea</i>	3 (7)
	Enterotoxina B	<i>seb</i>	2 (4)
	Enterotoxina D	<i>sed</i>	5 (11)
	Enterotoxina G	<i>seg</i>	36 (80)
	Enterotoxina I	<i>sei</i>	37 (83)
	Enterotoxina J	<i>sej</i>	5 (11)
Enterotoxinas	Enterotoxina-like K	<i>selk</i>	36 (80)
	Enterotoxina-like M	<i>sem</i>	37 (83)
	Enterotoxina-like N	<i>sen</i>	38 (85)
	Enterotoxina-like O	<i>seo</i>	35 (78)
	Enterotoxina-like Q	<i>selq</i>	3 (7)
	Enterotoxina-like R	<i>ser</i>	5 (11)
	Enterotoxina-like U	<i>seu</i>	35 (78)

## Estudios de relación genética

El análisis de clústeres de las 45 cepas, mediante macrorestricción y PFGE, determinó la presencia de 5 clados de cepas relacionadas ( $\geq 80\%$  de similitud <sup>131</sup>), destacando el clado IV (azul) con 12 cepas, que en su totalidad portaban el SCC*mec* I, ST 5 y 11/12 cepas presentaron el *spatype* t149 y uno no asignado (NA) aún en la base de datos de *Ridom Spa Service* (<http://spaserver.ridom.de>). Estas cepas son clasificadas como clon Chileno/Cordobés y se distribuyen principalmente entre los años 2013 y 2016. Se destaca, además, la presencia de 2 clones dentro del clado: UCO-SA 43 y UCO-SA 33 el año 2013 en Concepción y Rancagua. El clado IV (verde) está compuesto por 7 cepas que en su totalidad portan el SCC*mec* I, pertenecen al ST 5 y 6/7 cepas presentaron el *spatype* t149 y 1 desconocido (*unknown*), clasificadas como clon Chileno/Cordobés y se distribuyen principalmente entre los años 2013 y 2016. Se destaca, además, la presencia de 2 clones dentro del clado: UCO-SA 70 y UCO-SA 72 el año 2015 en Santiago. El clado V (morado) está compuesto por 5 cepas de las cuales 3 portan el SCC*mec* II, pertenecen al ST 105 y *spatype* t002. Por otra parte, las otras 2 cepas que conformaban este clado portaban el SCC*mec* I (UCO-SA 37 Y UCO-SA 38), pertenecen al ST 5 - *spatype* t149 y ST 105 – *spatype* t002, respectivamente. El clado II (en negro) se compone por 5 cepas que en su totalidad portaban el SCC*mec* I, pertenecientes al ST 5 y 3/4 cepas presentaron el *spatype* t149 y 1 *spatype* t143, aisladas entre los años 2015 y 2017. Finalmente, el clado I está compuesto por 4 cepas que en su totalidad portaban el SCC*mec* I, pertenecientes al ST 5. De el total de estas cepas, 3 de ellas presentaron el *spatype* t149 (clasificadas como clon Chileno/Cordobés, y 1 el *spatype* unknown, y todas las cepas de este clado fueron aisladas el año 2017.



**Figura 12:** Relación genética de las cepas de SARM-AH determinada por macrorestricción con *SmaI* y electroforesis en gel de campo pulsado.



## Ensayos de formación y erradicación de biopelículas

### Ensayos de adherencia

Se realizaron ensayos de adherencia con la totalidad de las cepas estudiadas, mediante el método de placa de microtitulación utilizado por Stepanović 2007<sup>149</sup>, y los resultados de estos ensayos evidenciaron que fenotípicamente 12 de las cepas (27 %) son no formadoras de biopelículas (NFBP), 25 cepas (56 %) son débiles formadoras de biopelículas (DFBP) y 8 cepas (18 %) son medianos formadores de biopelículas (MFBP). De estas cepas, se seleccionó 1 de cada fenotipo para los ensayos de formación y erradicación de biopelículas en presencia de antibióticos y  $\beta$ -CLA. A estas cepas se les determinó la CMI de  $\beta$ -CLA (tabla 12) de acuerdo con lo descrito en la metodología y en los resultados antes mencionados, y se calculó la sub-CMI de  $\beta$ -CLA, VAN, DAP y LZD (tabla 13).

**Tabla 12:** CMI de  $\beta$ -CLA en los 3 fenotipos de formación de biopelículas en cepas de SARM hospitalarios seleccionados de los ensayos de adherencia.

Cepa	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )
UCOSA-77 NFBP	32
UCOSA-99 DFBP	32
UCOSA-58 MFBP	32

**NFBP:** no formador de biopelículas; **DFBP:** débil productor de biopelículas; **MFBP:** mediano productor de biopelículas.

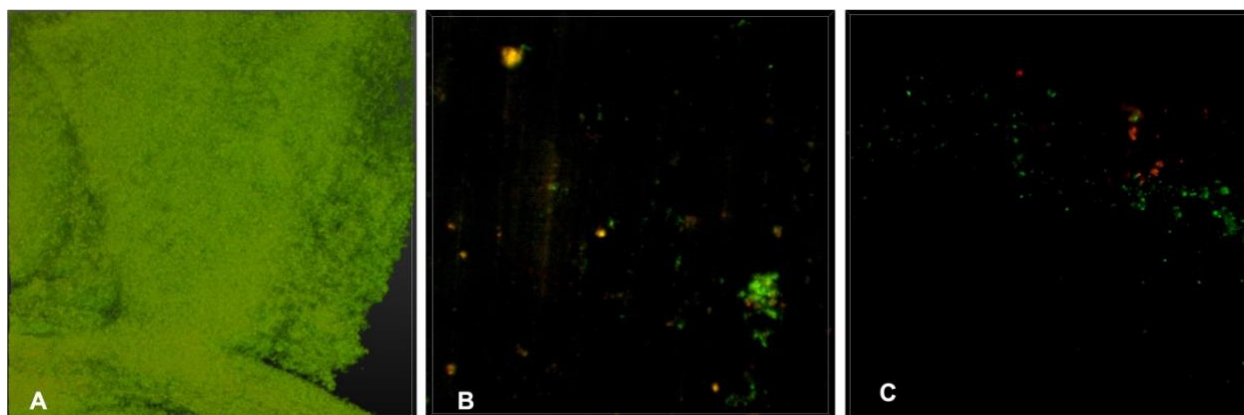
**Tabla 13:** CMI y Sub-CMI de antibacterianos para cepas seleccionadas para los experimentos de microscopía confocal de biopelícula de 21 días.

		CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )				$\frac{1}{2}$ CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	FENOTIPO	VAN	DAP	LZD	$\beta$ -CLA	VAN	DAP	LZD	$\beta$ -CLA
<b>UCOSA-77</b>	<b>NFBP</b>	1	0,25	2	32	0,5	0,125	1	16
<b>UCOSA-99</b>	<b>DFBP</b>	1	0,5	2	32	0,5	0,25	1	16
<b>UCOSA-58</b>	<b>MFBP</b>	0,5	0,25	2	32	0,25	0,125	1	16

**VAN:** vancomicina; **DAP:** daptomicina; **LZD:** linezolid;  **$\beta$ CHLA:** beta-cloro-L-alanina; **NFBP:** no formador de biopelículas; **DFBP:** débil formador de biopelículas; **MFBP:** mediano formador de biopelículas.

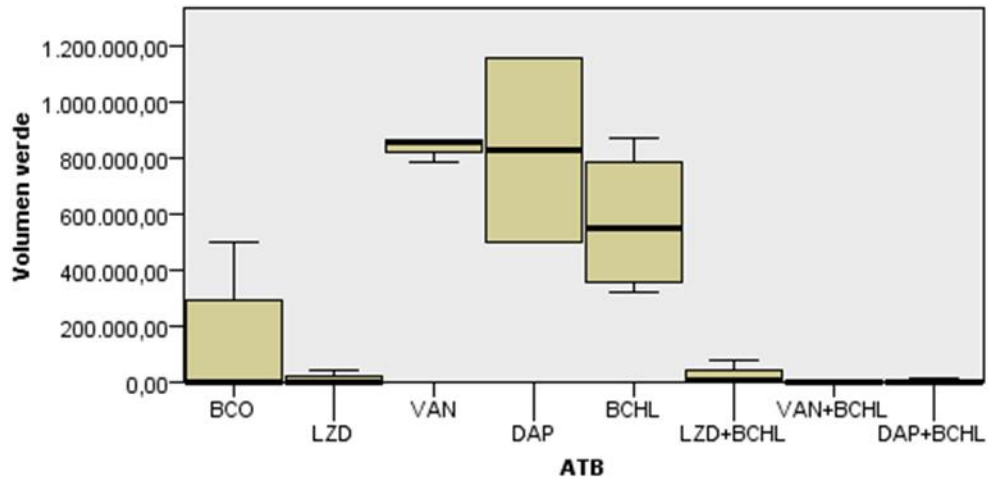
## Ensayos de formación y erradicación de biopelículas en presencia de antibióticos y $\beta$ -CLA

En los ensayos de formación y erradicación de una biopelícula madura, que se realizaron en presencia de concentraciones sub-CMI de antibióticos y  $\beta$ -CLA, la cepa UCOSA-77, de fenotipo NFBP, mostró un aumento de la lectura en el espectro verde de la luz. Esto es que fenotípicamente hay aumento en la biomasa viva de la biopelícula madura, en presencia de concentraciones sub-CMI de VAN, DAP y  $\beta$ -CLA; en comparación con el control blanco (sin la presencia de antibióticos, ni  $\beta$ -CLA). Por otra parte, esta cepa mostró una disminución significativa de la biomasa viva en el espectro de la luz verde (figura 13) en presencia de LZD, y de las combinaciones LZD +  $\beta$ -CLA, VAN +  $\beta$ -CLA y DAP +  $\beta$ -CLA ( $p= 0,019$ ) (figura 14).



**Figura 13:** Imagen de microscopía confocal. (A) Biopelícula madura de 21 días de la cepa UCOSA-77 (NFBP), sin antibióticos. (B) Biopelícula madura de 21 días de la cepa UCOSA-77 (NFBP), en presencia de vancomicina 0,125  $\mu$ g/mL +  $\beta$ CHLA 16  $\mu$ g/mL. (C) Biopelícula madura de 21 días de la cepa UCOSA-77 (NFBP), en presencia de daptomicina 0,125  $\mu$ g/mL +  $\beta$ CHLA 16  $\mu$ g/mL.

### Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes

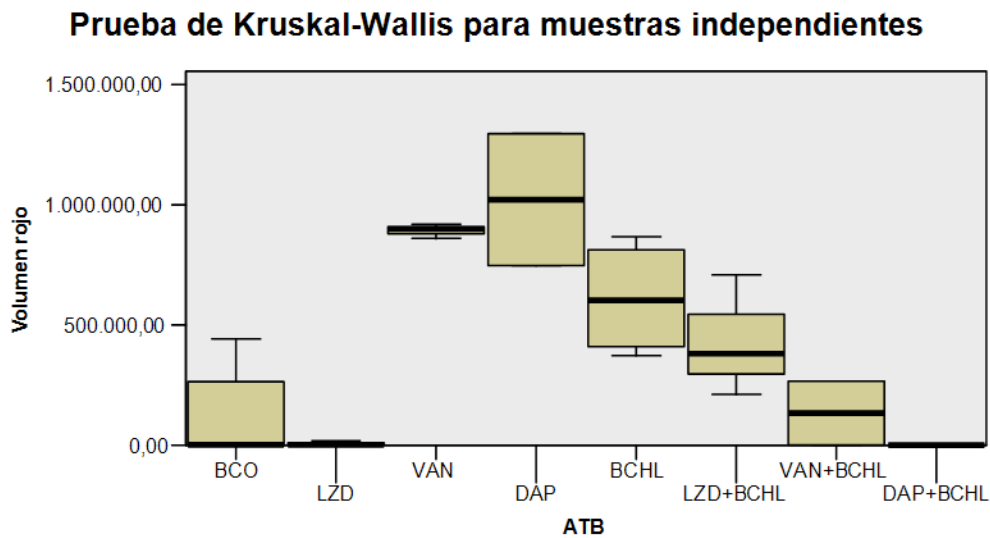


<b>N total</b>	27
<b>Estadístico de contraste</b>	16,830
<b>Grados de libertad</b>	7
<b>Sig. asintótica (prueba bilateral)</b>	,019

1. Las estadísticas de prueba se ajustan para empates.

**Figura 14:** Comparación de volumen de biopelículas vivas entre los distintos antibióticos y combinaciones con BCLA en la cepa UCOSA-77.

Por otra parte, cuando se analizó dentro del espectro rojo (fenotípicamente, la biomasa muerta), esta cepa mostró un aumento significativo de la lectura sub-CMI de VAN, DAP,  $\beta$ -CLA, LZD +  $\beta$ -CLA y VAN +  $\beta$ -CLA; en comparación con el control blanco (sin la adición de antibióticos, ni  $\beta$ -CLA) ( $p=0,009$ ) (figura 14).

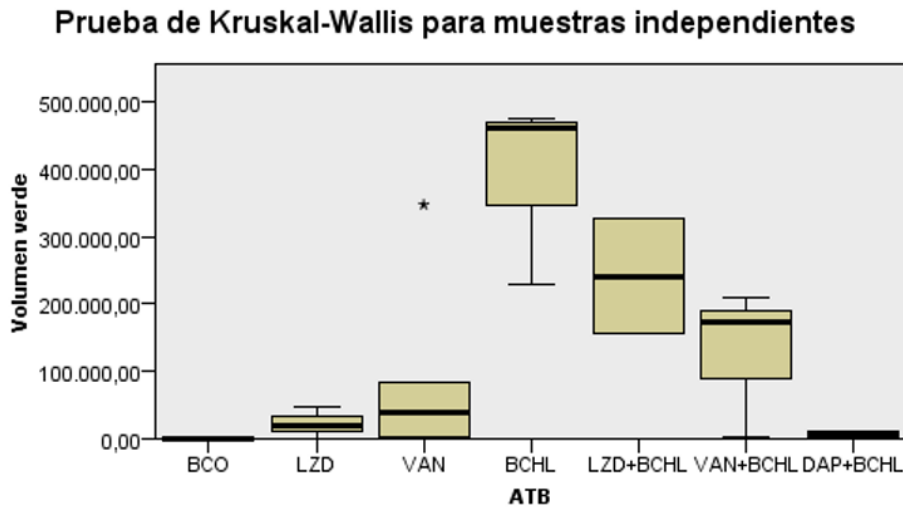


<b>N total</b>	27
<b>Estadístico de contraste</b>	18,833
<b>Grados de libertad</b>	7
<b>Sig. asintótica (prueba bilateral)</b>	,009

1. Las estadísticas de prueba se ajustan para empates.

**Figura 15:** Comparación de volumen de biopelículas muertas entre los distintos antibióticos y combinaciones con BCLA en la cepa UCOSA-77.

La cepa UCOSA-99, de fenotipo DFBP, no mostró un cambio estadísticamente significativo ( $p=0,079$ ) de la lectura en el espectro de la luz verde o roja en presencia de concentraciones sub-CMI de ninguno de los compuestos ensayados en comparación con el blanco (figura 16).

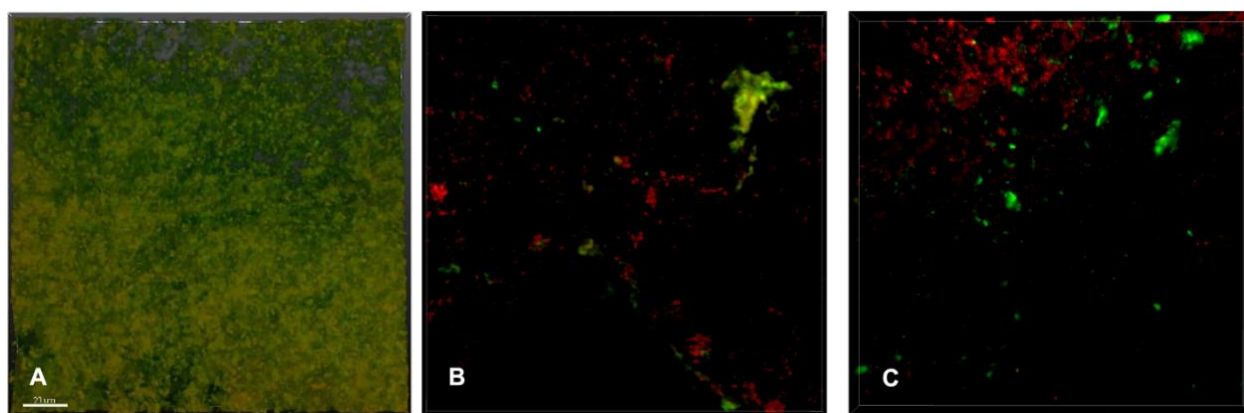


<b>N total</b>	20
<b>Estadístico de prueba</b>	11,305
<b>Grados de libertad</b>	6
<b>Significación asintótica (prueba bilateral)</b>	,079

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

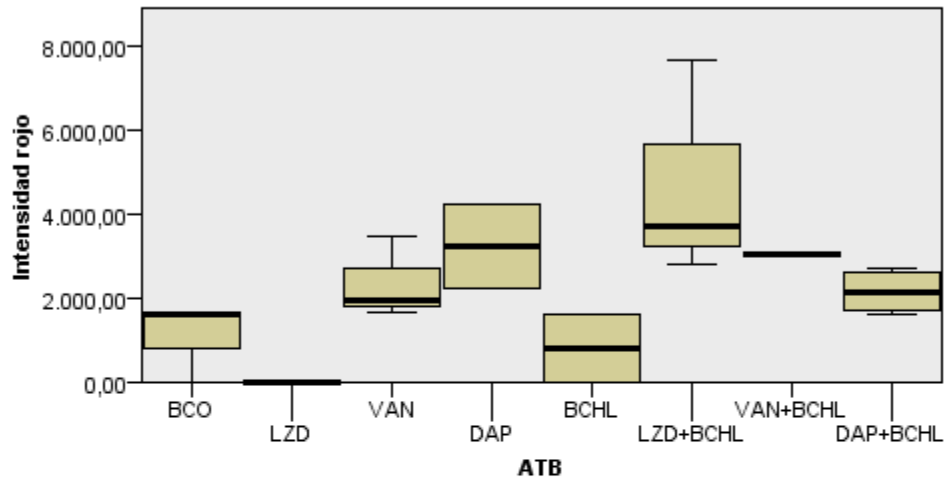
**Figura 16:** Comparación de volumen de biopelículas muertas entre los distintos antibióticos y combinaciones con BCLA en la cepa UCOSA-77.

La cepa UCOSA-58, de fenotipo MFBP no mostró un cambio estadísticamente significativo de la lectura en el espectro de la luz verde; en comparación con el control blanco. Sin embargo, cuando se analizó dentro del espectro rojo, esta cepa mostró un aumento significativo de la lectura en concentraciones sub-CMI de VAN,DAP,  $\beta$ -CLA, LZD +  $\beta$ -CLA, VAN +  $\beta$ -CLA y DAP+  $\beta$ -CLA; en comparación con el control blanco (figura 17), lo que indica que en concentraciones sub-CMI de estos compuestos existe un aumento de células muertas dentro de la biopelícula madura ( $p=0,037$ ) (figura 18).



**Figura 17:** Imagen de microscopía confocal. **(A)** Biopelícula madura de 21 días de la cepa UCOSA-58 (MFBP), sin antibióticos. **(B)** Biopelícula madura de 21 días de la cepa UCOSA-58 (MFBP), en presencia de vancomicina 0,125  $\mu$ g/mL +  $\beta$ CHLA 16  $\mu$ g/mL. **(C)** Biopelícula madura de 21 días de la cepa UCOSA-58 (MFBP), en presencia de daptomicina 0,125  $\mu$ g/mL +  $\beta$ CHLA 16  $\mu$ g/mL.

### Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



<b>N total</b>	20
<b>Estadístico de contraste</b>	14,902
<b>Grados de libertad</b>	7
<b>Sig. asintótica (prueba bilateral)</b>	,037

1. Las estadísticas de prueba se ajustan para empates.

**Figura 18:** Comparación de volumen de biopelículas muertas entre los distintos antibióticos y combinaciones con BCLA en la cepa UCOSA-58.



## **Ensayos de expresión de genes de virulencia**

Los ensayos de expresión de genes de virulencia no mostraron resultados concluyentes con la metodología ensayada. Se replicaron más de una vez en distintos termocicladores con las condiciones descritas en la metodología, sin lograr resultados concluyentes ni reproducibles. Las posibles causas de este fenómeno, se abordan con mayor de detalle en el capítulo de discusión.

## CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

Actualmente, SARM es un importante patógeno involucrado en las IAAS en centros de salud de nuestro país. Representa, además, una de las especies de bacterias que se incluyen en el listado de patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS, en la categoría prioridad alta <sup>150</sup>. En esta tesis, se investigó la caracterización molecular, lo cual incluyó la presencia de genes de resistencia a los antibióticos y genes de virulencia en cepas hospitalarias de SARM, aislados entre los años 2007 y 2017.

Esta tesis se centró en el estudio de cepas de SARM-AH, por lo cual las 5 cepas que presentaron el elemento *SCCmec* tipo IV, fueron clasificadas como SARM-AC de acuerdo a lo descrito en la literatura <sup>9</sup> y excluidas de los siguientes análisis.

Los resultados de la caracterización molecular, confirmaron la presencia del gen *mecA* en todas las cepas y evidenciaron que el la mayoría (84%) de las cepas referidas por el ISP de Chile eran portadoras del *SCCmec* tipo I y el 14% presentaban el *SCCmec* tipo II. Estos resultados son concordantes con los de Arias et al. 2017 y Medina et al. 2013, en donde el 92% y el 97% de las cepas fueron portadoras del elemento *SCCmec* I, respectivamente <sup>151,152</sup>. Por otra parte, los resultados de la clasificación en base al MLST y spaType de las cepas indican que el 76% de las cepas pertenece al ST5 y el 66% al *spatype* t-149, cuyos valores son menores a los informados por estos mismos autores, lo que evidencia el recambio en la clonalidad descrita en Latinoamérica para SARM <sup>151,152</sup>.

En este estudio, además se logró dilucidar algunos de los grupos *agr* de las cepas, mediante WGS. Del total de las 45 cepas analizadas, 14 de ellas (31%) pertenecen al grupo *agr* tipo II, y 2 cepas (4,4%) al *agr* tipo I, lo que es concordante con los resultados publicados para cepas de Chile <sup>152</sup>. En el resto de las cepas, no fue posible tipificar el grupo *agr* por el método utilizado.

Los estudios de susceptibilidad antimicrobiana indicaron que todas las cepas fueron resistentes a FOX y OXA, confirmando así el fenotipo de meticilino resistencia, lo que es concordante con la presencia del gen *mecA* detectado en los estudios de caracterización molecular de las cepas. Como era de esperar, las cepas de SARM-AH presentaron un amplio perfil de multirresistencia. Esto, concordantemente a lo descrito en la literatura, se debe a que clásicamente los SCC*mec* característicos de estas cepas (I, II y III) poseen una estructura de mayor tamaño que las cepas de SARM-AC; lo que permitiría la inserción de determinantes genéticos de resistencia a otros antibióticos además de los  $\beta$ -lactámicos <sup>153</sup>.

Frente a otros antibióticos no  $\beta$ -lactámicos, las cepas presentaron un perfil de resistencia a familias de antibióticos como las quinolonas, aminoglucósidos y del grupo MLS<sub>B</sub>. Así, de acuerdo con lo analizado, el 98% de las cepas fue resistente a CLI, CLR, ERY y AZM; el 64% a GEN, el 100% a CIP y el 98% LEV. Estos resultados son concordantes con otros estudios publicados en Chile <sup>151,152</sup>; sin embargo, los porcentajes de resistencia son más elevados en comparación a los presentados en cepas aisladas en Latinoamérica <sup>151,154–159</sup>. Con respecto a los aminoglucósidos, en un estudio realizado en Chile el año 2008 <sup>160</sup> se informó que la tasa de resistencia a GEN en SARM-AH fue de 31%, lo cual

es inferior al 64% encontrado en esta tesis. No obstante, posteriormente en 2015, se describió que en cepas chilenas de SARM-AH, la resistencia a GEN alcanzó hasta un 68,5% <sup>161</sup>. Sin embargo, estos valores son inferiores al 92% de resistencia informado en el estudio de Medina et al. en 2013 <sup>152</sup>. Además, de forma similar en otras regiones del mundo se señala la existencia de un elevado porcentaje de resistencia a GEN <sup>162,163</sup>

La totalidad de las cepas analizadas en este estudio fueron susceptibles a VAN, LZD, DAP, SXT, y sólo 2 cepas fueron resistentes a RIF; manteniéndose estos antibióticos como una alternativa de tratamiento dentro del arsenal terapéutico disponible en Chile, lo cual concuerda con informes previos para Chile y Latinoamérica <sup>151,164</sup>.

Concordantemente con los altos niveles de resistencia a diversas familias de antibióticos presentados por las cepas de este estudio, estas además exhibieron un amplio perfil de genes codificantes de distintos mecanismos de resistencia. Así, el mecanismo de resistencia a los antibióticos del grupo MLS<sub>B</sub> detectado en este grupo de cepas fue mediante metilasas ribosomales. Esto está mediado principalmente por el gen *ermA* (98%), además del hallazgo de *ermC* en 2 de las 45 cepas (4%). Estas enzimas actúan metilando el sitio blanco del antibiótico correspondiente a la adenina en la posición 2058 situada en la subunidad 23S del ARNr, generando alteración estérica del ribosoma, lo que reduce la afinidad de este grupos de antibióticos. Estos genes se encuentran distribuidos en plásmidos y transposones<sup>165</sup>. Se ha descrito que en *S. aureus* el gen *ermA* es de ubicación cromosómica y se encuentra inserto en el transposón Tn554, mientras que el gen *ermC* se localiza en el plásmido pMS97 <sup>166</sup>.

En el caso de los aminoglucósidos, y concordantemente con el perfil de resistencia de las cepas a estos antibióticos; el 82% portaba los genes codificantes de enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMA's) *aac(6')-Ie/aph(2'')-Ia*, *aad(6)*, *ant(6)-Ia1*, *aadD1*, *aadE1*, *ant(9)-Ia* (también descrito como *spc*), *ant(4')-Ib*, *aph(3')-IIIa* y *sat4*. Estos resultados son similares a lo publicado hasta la fecha en Latinoamérica por Arias et al. 2017. Sin embargo, la prevalencia y diversidad de enzimas encontradas en esta tesis son mayores a lo descrito por estos autores <sup>151</sup>. Si comparamos la prevalencia fuera de la región, los porcentajes de EMAs de nuestras cepas también son superiores a lo publicado por otros autores <sup>167-169</sup>. En *S. aureus* las EMA's que tienen mayor importancia clínica son AAC(6')/APH(2''), APH(3)-III y ANT(4), que son codificadas por los genes *aac(6')-Ie/aph(2'')*, *aph(3)-IIIa*, y *ant(4)-Ia*, respectivamente <sup>168</sup>. La primera de ellas es la enzima bifuncional AAC(6')-IE/APH(2'') que confiere resistencia de alto nivel a GEN, además de resistencia a tobramicina, netilmicina, amikacina y kanamicina. Está codificada por un gen transportado en el transposón Tn4001, que a su vez se encuentra en diversos plásmidos y en el cromosoma <sup>170</sup>. La enzima ANT(4')-Ia genera resistencia a tobramicina, amikacina, kanamicina y neomicina, y es codificada por gen *ant(4')-Ia* de localización en el plásmido pUB110 <sup>171</sup>. Por último, la enzima APH(3')-IIIa, que media resistencia a kanamicina y neomicina, y que suele presentar susceptibilidad intermedia a amikacina., es codificada por el gen *aph(3')-IIIa*, y está inserto en el transposón Tn5405, y es de localización plasmídica o cromosómica <sup>169</sup>.

Adicionalmente, se detectaron los genes *blaZ* (82%), *rphB* (91%) y *dfrC* (1%); que codifican una penicilinasasa, una rifampina fosfotransferasa y una dihidrofolato reductasa, y que confieren resistencia a penicilina, RIF y SXT; respectivamente <sup>171</sup>.

Los elevados niveles de resistencia a las fluoroquinolonas se vieron respaldados por la presencia de los genes *norA* y su regulador *mgrA* que confieren resistencia a esta familia de antibióticos y a compuestos de amonio cuaternario (QACs), además de la presencia de los genes *mepA* y *mepR* que confieren resistencia a fluoroquinolonas, tetraciclinas, glicilciclinas y QACs. Otros determinantes genéticos de resistencia que contribuyen a este fenómeno son el gen *sav1866*, el cual confiere resistencia a CIP y el sistema regulador de 2 componentes *arIRS* <sup>171</sup>. Las cepas de esta tesis, nuevamente muestran una marcada diferencia en prevalencia y diversidad de genes de resistencia, y en mayores porcentajes de resistencia a esta familia de antibióticos <sup>151</sup>.

En todas las cepas se encontró los genes *fosB* que confiere resistencia a fosfomicina y *tet38* que confiere resistencia a tetraciclina. Sin embargo, el 96% de las cepas fue susceptible a FOS. Otros autores han descrito resultados poco concordantes asociados a la metodología en presencia de genes *fos* <sup>172</sup>. Estos resultados pueden tener base a una deficiencia metodológica, ya que *fosB* codifica una tioltransferasa dependiente de  $Mg^{2+}$  y la falta de suplementación de este catión puede ser un factor a considerar a la hora de tener resultados discordantes <sup>173</sup>.

La formación de biopelículas es un rasgo que está estrechamente asociado con la persistencia y virulencia bacteriana <sup>174</sup>, y se estima que muchas infecciones bacterianas crónicas están vinculadas a la producción de biopelículas <sup>175</sup>. Por otro lado, SARM ha surgido en las últimas décadas como uno de los principales causantes de infecciones hospitalarias y comunitarias <sup>176</sup>, y la formación de biopelículas se considera uno de sus principales factores de virulencia <sup>175,177</sup>. Así, su capacidad para formar biopelículas en superficies bióticas o abióticas permite que las cepas de *S. aureus* colonicen eficazmente el organismo huésped o dispositivos médicos, lo que conlleva a que las infecciones sean más difíciles de tratar, requiriendo cuidados más intensivos y la sustitución de dispositivos médicos, en comparación con las infecciones por biopelículas de *Staphylococcus epidermidis*, por ejemplo <sup>178,179</sup>.

En esta tesis, se investigó principalmente la presencia de los genes *icaA*, *icaD*, *hla*, *hly*, *fnbA*, *fnbB* y *bap*, así como la determinación de la capacidad productora de biopelículas en aislados de SARM-AH. La pesquisa de los genes antes mencionados reveló que el 98% de las cepas de SARM-AH estudiadas presentan el operón *icaADBCR*, lo que es consistente a lo informado por Serray et al.<sup>175</sup>, en cuyo estudio este operón estuvo presente en el 100% de las cepas analizadas. Estos hallazgos también son similares a otros estudios previos, como el de da Fonseca et al. <sup>180</sup>, Pereira-Franchi et al.<sup>181</sup>, Gowrishankar et al.<sup>182</sup> en el cual se obtuvo una prevalencia del 100%, 95% y 84%, respectivamente.

Con respecto al gen *bap*, no fue detectado en ninguna de las cepas, lo que concuerda con lo informado por otros investigadores, como Serray et al.<sup>175</sup>, Khoramian et al.<sup>183</sup> y da Fonseca et al.<sup>180</sup>, los cuales no han reportado la presencia de este gen en ningún aislado de *S. aureus* de origen humano. Es probable que esto se deba a que el gen *bap* se encuentra presente en una isla de patogenicidad que no está ampliamente distribuida entre las cepas de *S. aureus*, por lo que, hasta el momento, sólo se ha informado su presencia en aislados de mastitis bovina<sup>183,184</sup>.

Está documentado en la literatura que SARM tiene una distribución clonal, asociada a zonas geográficas específicas; lo cual tiene un comportamiento muy marcado en Chile. Los estudios de tipificación molecular incluidos en esta tesis muestran un claro predominio del clon Chileno/Cordobés distribuido a lo largo de las ciudades representadas en esta investigación, con un predominio de este en todos los clados (*SCCmec* I - ST 5 - t149). Esto es consistente con lo descrito por otros autores<sup>151,152</sup>, y reafirma la tesis del dominio del clon Chileno/Cordobés en nuestro ambiente hospitalario, lo cual es sostenido en el tiempo (2012-2017) y transversalmente en todas las ciudades estudiadas. Sin embargo, la distribución clonal de SARM no es un fenómeno estático sino dinámico. Prueba de ello, al observar el clado V podemos notar la aparición de otro clon (*SCCmec* II - ST 105 – t002, cercano al clon USA-100), descrito recientemente como clon Río de Janeiro por su prevalencia en esta zona geográfica, en la cual ha ido generando un recambio progresivo en la epidemiología de esa zona, el cual ya había sido reportado en 2017 por Arias et al.<sup>151,185</sup>.



Los ensayos de formación de biopelículas realizados con las cepas de SARM, permitieron determinar que un 74% de las cepas estudiadas corresponden a aislados formadores de biopelículas. Esta prevalencia es menor a los resultados obtenidos por Sugimoto et al <sup>186</sup> y Dakheel et al <sup>187</sup> en sus investigaciones, en los que se reportó que el 87% y el 100% de las cepas de SARM estudiadas eran formadoras de biopelículas, respectivamente. No obstante que genóticamente la totalidad de los aislados de SARM poseen los genes *icaA* e *icaD*, los cuales están asociados con la producción del polisacárido de adhesión intercelular (PIA), existe una discrepancia con los resultados obtenidos en la determinación fenotípica de la capacidad productora de biopelículas para el caso de las 12 cepas NFBP. En la misma línea, la gran mayoría de las cepas estudiadas se encuentran clasificadas en la categoría DFBP. Ambos casos podrían ser explicados por lo propuesto por O'Neill et al. <sup>188</sup>, quien postula que la adquisición de la resistencia a meticilina parece reprimir en cierta medida la formación de biopelículas por PIA, mientras que, a su vez, promueve la formación de biopelículas basadas en proteínas, lo que fue igualmente descrito en los estudios de Singh et al. <sup>189</sup> y McCarthy et al. <sup>190</sup>. Sin embargo, las cepas presentaron un amplio perfil de genes de virulencia codificantes de factores de virulencia implicados en la adherencia, producción de exoenzimas, evasión del sistema inmune, captación del hierro, toxinas y enterotoxinas (tabla 6 a la 11). La presencia de los genes *hla*, *hlb* fue del 80% y 100%, respectivamente; y estos porcentajes, junto a otros genes de virulencia, son mayores a los reportados por otros autores <sup>191,192</sup>.

A pesar del amplio perfil de genes de virulencia presentado por estas cepas, se hacen necesarios estudios de metabolómica para entender el comportamiento frente a la formación de biopelículas; ya que la regulación de la expresión génica en *S. aureus* responde a una serie de complejos procesos regulatorios que dependen tanto de factores ambientales dependientes tanto del hospedero, la disponibilidad de nutrientes y condiciones óptimas para el desarrollo, así como también de la interacción con otros factores de virulencia <sup>193</sup>. Por otra parte, se postula que la expresión de determinantes de virulencia asociados a la formación de biopelículas genera un costo energético alto en *S. aureus* y que esto debe equilibrarse (mediante la represión del locus *agr*) con la expresión de resistencia a los antibióticos en cepas multirresistentes, lo que podría explicarse en gran medida en las cepas de este estudio; las cuales exhibieron amplios perfiles de resistencia versus bajo porcentaje de formación de biopelículas <sup>194</sup>. Sin embargo, cuando el sistema *agr* se mantiene en estado de represión, este mantiene la expresión de factores de virulencia implicados en la adherencia al hospedero, lo que podría explicar el éxito del clon Chileno/Cordobés en la colonización y el mantenimiento en el tiempo como clon dominante dentro de los hospitales chilenos; puesto que el primer paso para el establecimiento de la infección es la colonización del hospedero <sup>193-195</sup>.

*S. aureus* ha demostrado una gran versatilidad para el rápido desarrollo de resistencia a los antibióticos, lo que se ve agravado, en las infecciones en las cuales esta bacteria forma biopelículas; por lo cual, actualmente el tratamiento de estas infecciones es un desafío en la práctica clínica diaria. Esto ha llevado a la búsqueda de compuestos que en conjunto con los antibióticos de uso habitual en este patógeno, contribuyan a desagregar

la biopelícula bacteriana. Previamente, otros autores han estudiado el uso de concentraciones de L-aás y D-aás sobre biopelículas bacterianas en combinación con otros compuestos antibacterianos <sup>107,118,196</sup>. En esta misma línea, se realizaron experimentos de formación y erradicación de biopelícula madura de 21 días en una placa metálica, en presencia de concentraciones sub-CMI de los antibióticos LZD, VAN, DAP y del compuesto  $\beta$ -CLA. Para ello, se incluyeron cepas de los 3 fenotipos en base a la clasificación de formación de biopelículas (FBP) UCO SA-77 NFNP, UCO SA-99 DFBO y UCO SA-58 MFBP. Al analizar los resultados, cuando se induce el experimento de formación de biopelículas la cepa UCO SA- 77 NFNP, en presencia de concentraciones sub-CMI de 0,5  $\mu$ g/mL de VAN, 0,125  $\mu$ g/mL de DAP y 16  $\mu$ g/mL de  $\beta$ -CLA; mostró un aumento en la biomasa viva de la biopelícula madura, en comparación con el control sin antibióticos, ni  $\beta$ -CLA ( $p= 0,019$ ). Esto indica que, fenotípicamente, el uso de sub-CMI VAN, DAP y  $\beta$ -CLA, por sí solos, genera un aumento en la producción de biopelículas incluso en una cepa tipificada como NFNP. Para el caso de LZD, esta cepa presentó una disminución crítica en la FBP, lo cual es consistente con lo reportado por otros estudios<sup>91</sup>. Se ha comprobado que LZD disminuye la formación de biopelículas mediante la interacción con las proteínas *IcaA* e *IcaB*, afectando incluso la morfología celular mediante la invaginación de la superficie bacteriana a nivel de la pared celular y de la membrana citoplasmática <sup>197</sup>. Los genes *icaA* e *icaB* son parte del operón *icaADBC*, el cual está ampliamente presente en las cepas analizadas en este estudio. El operón *icaADBC* está integrado por 4 genes que permiten la biosíntesis de polisacárido de adhesión intercelular. El gen *icaA* codifica una N-acetilglucosaminil transferasa que sintetiza oligómeros de PIA a partir de UDP-N-acetilglucosamina. El gen *icaD*, codifica

una proteína transmembrana, cuya presencia otorga eficiencia óptima a *icaA*, por su parte *icaB* codifica una N-deacetilasa responsable de la desacetilación parcial de PIA; e *icaC*, codifica una proteína O-succiniltransferasa involucrada además en la externalización del polisacárido nascente. Por último, el gen *icaR* actúa como un regulador transcripcional de este operón <sup>66,67</sup>. Debido a esto, la unión de LZD a las proteínas IcaA e IcaB es un punto crítico dentro de la formación de la biopelícula, que podría explicar en gran parte el fenotipo y el comportamiento de estas. Además, se ha descrito que el uso de LZD en sub-CMIs afecta la expresión de genes que codifican la síntesis de hemolisinas, bloqueando la producción de estos factores de virulencia <sup>198</sup>.

En cuanto a los resultados referentes al efecto de VAN, la cepa UCOSA-77 mostró un aumento en la producción de biopelículas, lo cual es contrario a los resultados de Douthit y cols. 2019. Sin embargo, estos autores ensayaron a una concentración de VAN de 1 µg/mL versus 0,5 µg/mL en este estudio. Además, sus ensayos se llevaron a cabo en combinación con RIF, lo cual contribuyó en gran medida a sus resultados <sup>199</sup>. Otros estudios, sugieren que la dosis de VAN necesarias para la erradicación de una biopelícula madura es de 200 µg/mL, requiriendo 28 días para la erradicación de ésta; valores por mucho sobre nuestros resultados <sup>200</sup>. Estudios *in vitro* y *ex vivo* confirman que las hemolisinas desempeñan un papel crucial en el establecimiento de una biopelícula tanto en superficies bióticas como abióticas, y que jugarían un papel crucial en las interacciones célula a célula durante la formación de esta <sup>201,202</sup>. Por otra parte, como se discute más adelante, a pesar del aumento de la biopelícula en esta cepa, también se observó un efecto bactericida sobre esta cepa en las capas más externas

de la biopelícula. Esto es concordante con estudios que reportan que el uso de VAN no influye en la erradicación de la estructura de la biopelícula <sup>203</sup>. La nula actividad de VAN sobre una biopelícula madura podría estar asociada a la difusión limitada de este antibiótico, debido a su característica de glicopéptido de alto peso molecular, lo cual implicaría su secuestro por la parte más externa de la biopelícula, además de su poca interacción con compuestos claves dentro del establecimiento de la biopelícula, como PIA <sup>204-206</sup>. Por otra parte, nuestros resultados indican que los experimentos de FBP en esta cepa en presencia de sub-CMI de 1 µg/mL LZD, y de las combinaciones de 1 µg/mL LZD + 16 µg/mL β-CLA, 0,5 µg/mL VAN + 16 µg/mL β-CLA y 0,125 µg/mL de DAP + 16 µg/mL β-CLA, provocan una disminución de la FBP y de la biomasa viva en esta, comparada con el control (p= 0,019). Esto es concordante con lo discutido anteriormente para el caso de sub-CMI de LZD y para el efecto de las combinaciones con β-CLA, se discute más adelante sobre la actividad dispersiva que tendrían algunos aminoácidos y su análogos en combinación con antibióticos <sup>207</sup>.

Las cepas UCO SA-99 DFBO y UCO SA-58 MFBP no mostraron un incremento significativo en la producción de biopelículas, en comparación con el control, bajo ninguna de las condiciones experimentales utilizadas en esta tesis. Algunos autores describen que este fenómeno es dependiente del ST de la cepa, y que los resultados deben interpretarse de manera particular <sup>100</sup>. Sin embargo, a pesar del aumento de la biomasa viva, las cepas UCOSA-77 NFBP y UCOSA-58 MFBP mostraron que al ser sometidas a concentraciones sub-CMI de 0,5 µg/mL VAN, 0,125 µg/mL DAP, β-CLA, 1 µg/mL LZD + 16 µg/mL β-CLA y VAN + β-CLA en la cepa UCOSA-77 NFBP y en la cepa

UCOSA-58 MFBP 0,5 µg/mL VAN, 0,125 µg/mL DAP, 16 µg/mL β-CLA, 1 µg/mL LZD + 16 µg/mL β-CLA, 0,25 µg/mL VAN + 16 µg/mL β-CLA y 0,125 µg/mL DAP + 16 µg/mL β-CLA; ambas mostraron un aumento en la señal del espectro rojo en la lectura del microscopio electrónico confocal, lo cual indica un aumento comparativo de células muertas en esta biopelícula,  $p=0,009$  y  $p=0,037$ , respectivamente. En el caso de DAP, existen estudios que han reportado el efecto bactericida de este antibiótico sobre una biopelículas establecidas, comparando 4 antibióticos distintos (LZD, CLI, VAN y tigeciclina), informando que DAP fue la molécula más efectiva para eliminar *S. aureus* de una biopelícula ya formada, al atacar de manera efectiva las biopelículas con concentraciones 4 veces menores a la de esos antibióticos <sup>208</sup>. En estudios destinados a evaluar los efectos bactericidas en modelos de comparación de supervivencia celular asociados con biopelículas en cepas de SARM, DAP mostró un efecto bactericida rápido y un mejor rendimiento en comparación con otros fármacos, como tigeciclina, pudiendo eliminar en promedio el 96% de las células de las películas formadas, y la proporción de células sobrevivientes fue menor en caso de exposición a DAP en comparación con el caso de todos los otros antibióticos utilizados <sup>209–211</sup>.

Como se mencionó anteriormente, el uso de compuestos aminoacídicos ha demostrado un efecto dispersor de la biopelícula, lo cual se logra mediante la inhibición del crecimiento bacteriano y la expresión de genes involucrados en la producción de biopelículas <sup>101</sup>, disminución de la expresión de la superficie de las fibras amiloides involucradas en la formación de la estructura de la biopelículas mediante la incorporación de D-aás en la pared celular bacteriana <sup>102</sup>. Es este mismo efecto, el que podría indicar la formación de

canales que favorezcan la permeabilidad de la biopelícula, favoreciendo la entrada y distribución del antibiótico y otras moléculas al interior de la biopelícula, utilizando además otras porosidades existentes en el caso de los antibióticos de menor peso molecular <sup>199</sup>. Otros autores han reportado resultados similares a los de esta tesis ensayando la molécula de  $\beta$ -CLA con FOS, donde se reporta una drástica reducción de la biopelícula cuando se combina ambos compuestos <sup>118</sup>. Esto nos indica que el uso de sub CMI de estos compuestos aumenta la producción de biopelícula únicamente en la cepa NFBP, no afectando la síntesis de biopelículas en aquellas cepas con fenotipo productor. Sin embargo, a pesar de la síntesis de biopelículas, estos compuestos logran tener actividad bactericida una vez que se produce la estructura.

Durante el desarrollo de esta tesis, no se pudo llevar a cabo los experimentos de expresión de genes que se detallan en la metodología. De acuerdo a la literatura, podemos identificar diversos factores que pudieron haber contribuido a resultados erróneos o falta de amplificación.

Primero, es fundamental destacar la calidad del ADN/ARN. De acuerdo a lo descrito por Wilson <sup>212</sup>, contaminantes o la degradación de los ácidos nucleicos pueden prevenir la amplificación. Es imperativo garantizar que las muestras estén libres de contaminantes y que el material genético no esté degradado. Esto pudo ser en gran medida debido al proceso de extracción, que pudo no ser el adecuado para este tipo de ensayos

Otro factor que podría contribuir a este fenómeno, es el diseño inadecuado de los partidores utilizados en la metodología, a pesar de que estos fueron tomados de la

literatura para su confección<sup>137</sup>. Cuando los partidores forman estructuras secundarias, dímeros o se dirigen a secuencias inespecíficas, la amplificación puede verse obstaculizada, arrojando falsos negativos o problemas en el proceso de amplificación<sup>213</sup>. La configuración del ciclado térmico es otro punto gravitante del proceso. Cualquier desviación en las temperaturas de desnaturalización, alineación y extensión podría prevenir la amplificación<sup>214</sup>. Esta configuración, también fue realizada de acuerdo a lo descrito en la literatura<sup>137</sup>.

Finalmente, y quizás uno de los factores más desafiantes, es la presencia de inhibidores de la reacción de PCR. Estos compuestos interfieren con la PCR y reducen la eficiencia de los procesos enzimáticos, conduciendo a resultados débiles o incluso falsos negativos. Al-Soud y Rådström<sup>215</sup> indican que algunas sustancias que incluyen compuestos orgánicos, proteínas, polisacáridos complejos, tintes y iones metálicos, actúan como inhibidores de la reacción. Dentro de estos compuestos, podemos encontrar reactivos como fenol y etanol, que son remanentes de los procesos de extracción de ácidos nucleicos que podrían inhibir la reacción, junto a proteinasa K, e incluso, algunos iones metálicos propios de reactivos utilizados en este proceso<sup>215</sup>.

Este es un factor que se sugiere revisar en la proyección de esta tesis, con miras a dilucidar este fenómeno, con el fin de complementar los resultados obtenidos en esta investigación.



En resumen, los resultados de esta tesis contribuyen al conocimiento de la epidemiología molecular de SARM-AH entre los años 2012 al 2017 en hospitales chilenos, así como a sus perfiles de susceptibilidad a los antibióticos, mecanismos resistencia a los antibióticos de uso clínico en Chile, y de los genes implicados en la producción de factores de virulencia de estas cepas. Además, entrega datos de la capacidad de producción de biopelículas y una aproximación de la contribución de concentraciones sub inhibitorias en la producción de biopelículas, y en el conocimiento del aporte de la molécula de  $\beta$ -CLA, en combinación con antibióticos de uso clínico en el tratamiento de infecciones por SARM utilizados en Chile, en la erradicación de una biopelícula establecida.

## CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

1. Las cepas de SARM-AH referidas por el ISP de Chile analizadas en esta tesis, presentan prevalentemente, tanto a nivel fenotípico como genotípico, el perfil clásico del clon Chileno/Cordobés. Esto es, a nivel molecular, *SCCmec I-ST5-t149*.
2. Desde el punto de vista fenotípico, presentan el perfil de susceptibilidad a SXT, RIF, LZD, DAP y VAN; y un perfil de multirresistencia marcado a los antibióticos del grupo MLS<sub>B</sub>, quinolonas y aminoglucósidos.
3. Poseen un amplio arsenal de genes virulencia, principalmente codificantes de factores de adherencia, exoenzimas, toxinas y hemolisinas.
4. El uso de concentraciones sub-CMI β-CLA, VAN y DAP contribuyen a la formación de biopelículas en una cepa con fenotipo no productor; sin embargo, el uso de combinaciones a concentraciones sub-CMI de 1 µg/mL LZD, y de las combinaciones de 1 µg/mL LZD + 16 µg/mL β-CLA, 0,5 µg/mL VAN + 16 µg/mL β-CLA y 0,125 µg/mL de DAP + 16 µg/mL β-CLA, provocan una disminución de la formación de esta biopelícula, favoreciendo su erradicación.

Por lo anterior, se acepta la hipótesis 1 de esta investigación.

En el caso de la segunda hipótesis no fue posible comprobarla a pesar de los ajustes en la metodología planteada, por lo cual, se necesitan realizar otros ensayos para llegar a resultados más concluyentes.

## PROYECCIONES

En este trabajo se evidencia el efecto de la molécula de  $\beta$ -cloro-L-alanina en combinación con antibióticos de uso clínico en Chile, para el tratamiento por infecciones de SARM; en la formación y desagregación de biopelículas bacterianas causadas por este patógeno. Se sugiere ensayar estos resultados con un número mayor de cepas, e incorporar el efecto en la expresión de un mayor número de genes de virulencia implicados en la formación de biopelículas, así como también, de sus reguladores transcripcionales.

Sería ideal, incorporar técnicas de metabolómica dentro de la metodología, que por su costo, dificultan su realización.

Además, se hacen necesarios estudios de citotoxicidad para evaluar el uso de esta molécula en aplicaciones clínicas, como el uso de apósitos en el tratamiento de heridas producidas por este patógeno, y la erradicación de biopelículas de prótesis infectadas.

Finalmente, se recomienda ensayar el efecto de esta molécula en otros patógenos prevalentes de relevancia clínica, formadores de biopelículas, como lo es *Pseudomonas aeruginosa*.

## REFERENCIAS

1. Foster TJ. The remarkably multifunctional fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases [Internet]. 2016 Dec 7 [cited 2017 Jan 22];35(12):1923–31. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-016-2763-0>
2. Carfora V, Giacinti G, Sagrafoli D, Marri N, Giangolini G, Alba P, et al. Methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in dairy sheep and in-contact humans: An intra-farm study. J Dairy Sci. 2016;99(6):4251–8.
3. Bayer MG, Heinrichs JH, Cheung AL. The molecular architecture of the *sar* locus in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol [Internet]. 1996 Aug [cited 2017 Jan 22];178(15):4563–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8755885>
4. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect Dis. 2005;5(12):751–62.
5. Locatelli C, Cremonesi P, Caprioli A, Carfora V, Ianzano A, Barberio A, et al. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy cattle herds, related swine farms, and humans in contact with herds. J Dairy Sci. 2016;
6. Peacock SJ, Paterson GK. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. Annu Rev Biochem. 2015;84:577–601.
7. Rammelkamp CH, Maxon T. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the Action of Penicillin. Exp Biol Med. 1942 Dec 1;51(3):386–9.
8. Bondi A, Dietz CC. Penicillin Resistant Staphylococci. Exp Biol Med. 1945 Oct 1;60(1):55–8.
9. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2009;7(9):629–41. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2871281&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
10. Uehara Y. Current Status of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*). Antibiotics 2022, Vol 11, Page 86 [Internet]. 2022 Jan 11 [cited 2022 Dec 6];11(1):86. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-6382/11/1/86/htm>
11. Lozano C, Aspiroz C, Ezpeleta AI, Gómez-Sanz E, Zarazaga M, Torres C. Empyema caused by MRSA ST398 with Atypical Resistance Profile, Spain. Emerg Infect Dis. 2011 Jan;17(1):138–40.
12. Graveland H, Wagenaar JA, Bergs K, Heesterbeek H, Heederik D. Persistence of Livestock Associated MRSA CC398 in Humans Is Dependent on Intensity of Animal Contact. Boni M, editor. PLoS One [Internet]. 2011 Feb 9 [cited 2018 Jan 25];6(2):e16830. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0016830>
13. Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, et al. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrob Agents Chemother. 2002 Apr;46(4):1147–52.

14. Bryers JD. Medical biofilms. *Biotechnol Bioeng* [Internet]. 2008 May 1 [cited 2018 Jan 25];100(1):1–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18366134>
15. Römling U, Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Intern Med* [Internet]. 2012 Dec [cited 2018 Jan 25];272(6):541–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23025745>
16. McConoughey SJ, Howlin R, Granger JF, Manning MM, Calhoun JH, Shirtliff M, et al. Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future Microbiol* [Internet]. 2014 Aug [cited 2018 Nov 25];9(8):987–1007. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25302955>
17. Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials* [Internet]. 2012 Sep [cited 2018 Nov 25];33(26):5967–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22695065>
18. Moran E, Byren I, Atkins BL. The diagnosis and management of prosthetic joint infections. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2010 Nov 1 [cited 2018 Nov 26];65(Supplement 3):iii45–iii54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20876628>. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [Internet]. 2010 Nov 1 [cited 2018 Nov 25];65(Supplement 3):iii45–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20876628>
19. Parvizi J, Pawasarat IM, Azzam KA, Joshi A, Hansen EN, Bozic KJ. Periprosthetic Joint Infection. *J Arthroplasty* [Internet]. 2010 Sep [cited 2018 Jan 25];25(6):103–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20570103>
20. Song X, Perencevich E, Campos J, Short BL, Singh N. Clinical and Economic Impact of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Colonization or Infection on Neonates in Intensive Care Units. *Infect Control Hosp Epidemiol* [Internet]. 2010 Feb 2 [cited 2018 Jan 25];31(02):177–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20001732>
21. Contreras JJ, Sepúlveda M. Bases moleculares de la infección asociada a implantes ortopédicos. *Revista chilena de infectología* [Internet]. 2014 Jun [cited 2018 Aug 9];31(3):309–22. Available from: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182014000300010&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182014000300010&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
22. Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials* [Internet]. 2006 Apr 1 [cited 2018 Aug 9];27(11):2331–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961205010938?via%3Dihub>
23. Montanaro L, Speziale P, Campoccia D, Ravaioli S, Cangini I, Pietrocola G, et al. Scenery of *Staphylococcus* implant infections in orthopedics. *Future Microbiol* [Internet]. 2011 Nov [cited 2018 Aug 9];6(11):1329–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22082292>
24. Kurtz SM, Lau E, Watson H, Schmier JK, Parvizi J. Economic Burden of Periprosthetic Joint Infection in the United States. *J Arthroplasty* [Internet]. 2012 Sep 1 [cited 2018 Aug 9];27(8):61–65.e1. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0883540312001325>

25. Iribarren B O, Álvarez C A, Rodríguez C C, Ferrada M M, Hernández V H, Dorn H L. Costo y desenlace de la infección de artroplastia de cadera: Estudio de caso y control. Revista chilena de infectología [Internet]. 2007 Apr [cited 2018 Aug 9];24(2):125–30. Available from: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182007000200006&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182007000200006&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
26. Burmølle M, Thomsen TR, Fazli M, Dige I, Christensen L, Homøe P, et al. Biofilms in chronic infections – a matter of opportunity – monospecies biofilms in multispecies infections. FEMS Immunol Med Microbiol [Internet]. 2010 Aug [cited 2018 Nov 25];59(3):324–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20602635>
27. Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. APMIS [Internet]. 2013 May [cited 2018 Nov 25];121(136):1–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23635385>
28. Thomsen TR, Aasholm MS, Rudkj bing VB, Saunders AM, Bjarnsholt T, Givskov M, et al. The bacteriology of chronic venous leg ulcer examined by culture-independent molecular methods. Wound Repair and Regeneration [Internet]. 2010 Jan [cited 2018 Nov 25];18(1):38–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20082680>
29. Percival SL, Thomas JG, Williams DW. Biofilms and bacterial imbalances in chronic wounds: anti-Koch. Int Wound J [Internet]. 2010 Jun [cited 2018 Nov 25];7(3):169–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20602647>
30. Otaíza Fernando, Orsini Mauro, Pohlenz Mónica. Informe de Vigilancia de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud 2016 [Internet]. Santiago de Chile; 2016 [cited 2018 Nov 25]. Available from: <https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2018/05/informe-con-indice-y-ord-2016.pdf>
31. Werdan K, Dietz S, L ffler B, Niemann S, Bushnaq H, Silber RE, et al. Mechanisms of infective endocarditis: pathogen–host interaction and risk states. Nat Rev Cardiol [Internet]. 2014 Jan 19 [cited 2018 Nov 25];11(1):35–50. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrcardio.2013.174>
32. Flores P, González N, Betancourt P, Berho J, Astudillo C, García C, et al. Endocarditis Infecciosa: caracterización clínica de la enfermedad. Revisión de casos de los últimos 5 años. Revista chilena de cardiología [Internet]. 2017 [cited 2018 Nov 25];36(1):34–40. Available from: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-85602017000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-85602017000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
33. Fowler VG, Miro JM, Hoen B, Cabell CH, Abrutyn E, Rubinstein E, et al. *Staphylococcus aureus* Endocarditis. JAMA [Internet]. 2005 Jun 22 [cited 2018 Nov 25];293(24):3012. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972563>
34. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* Infections. New England Journal of Medicine [Internet]. 1998 Aug 20 [cited 2017 Jan 22];339(8):520–32. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199808203390806>
35. Holmes A, Ganner M, McGuane S, Pitt TL, Cookson BD, Kearns AM. *Staphylococcus aureus* isolates carrying Panton-Valentine leucocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. J Clin Microbiol [Internet]. 2005 May [cited 2018 Jan 25];43(5):2384–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15872271>

36. Beenken KE, Dunman PM, McAleese F, Macapagal D, Murphy E, Projan SJ, et al. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol.* 2004 Jul;186(14):4665–84.
37. Gilot P, Lina G, Cochard T, Poutrel B. Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. *J Clin Microbiol.* 2002 Nov;40(11):4060–7.
38. Robinson DA, Monk AB, Cooper JE, Feil EJ, Enright MC. Evolutionary genetics of the accessory gene regulator (*agr*) locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2005 Dec;187(24):8312–21.
39. Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering RC, Wennersten C, Venkataraman L, Novick RP, et al. Accessory gene regulator (*agr*) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 May;46(5):1492–502.
40. Wright JS, Traber KE, Corrigan R, Benson SA, Musser JM, Novick RP, et al. The *agr* radiation: an early event in the evolution of staphylococci. *J Bacteriol.* 2005 Aug;187(16):5585–94.
41. Speziale P, Pietrocola G, Rindi S, Provenzano M, Provenza G, Di Poto A, et al. Structural and functional role of *Staphylococcus aureus* surface components recognizing adhesive matrix molecules of the host. *Future Microbiol* [Internet]. 2009 Dec [cited 2018 Jan 25];4(10):1337–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19995192>
42. Marraffini LA, DeDent AC, Schneewind O. Sortases and the Art of Anchoring Proteins to the Envelopes of Gram-Positive Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [Internet]. 2006 Mar 1 [cited 2018 Jan 25];70(1):192–221. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16524923>
43. Maresso AW, Schneewind O. Sortase as a target of anti-infective therapy. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2008 Mar 1 [cited 2018 Jan 25];60(1):128–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18321961>
44. Flock JI, Fröman G, Jönsson K, Guss B, Signäs C, Nilsson B, et al. Cloning and expression of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*. *EMBO J* [Internet]. 1987 Aug 1 [cited 2018 Jan 25];6(8):2351–7. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02511.x/abstract>
45. Kreis Thomas, Vale Ronald. Guidebook to the extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins [Internet]. Oxford University Press; 1999 [cited 2018 Jan 25]. 568 p. Available from: <https://global.oup.com/academic/product/guidebook-to-the-extracellular-matrix-anchor-and-adhesion-proteins-9780198599586?cc=cl&lang=en&>
46. Cheung AL, Projan SJ, Gresham H. The Genomic Aspect of Virulence, Sepsis, and Resistance to Killing Mechanisms in *Staphylococcus aureus*. *Curr Infect Dis Rep* [Internet]. 2002 Oct [cited 2018 Jan 25];4(5):400–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12228026>
47. Foster TJ, Höök M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* [Internet]. 1998 Dec 1 [cited 2018 Jan 25];6(12):484–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10036727>
48. Tran Van Nhieu G, Isberg RR. Bacterial internalization mediated by beta 1 chain integrins is determined by ligand affinity and receptor density. *EMBO J* [Internet]. 1993 May [cited

- 2018 Jan 25];12(5):1887–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8491181>
49. Sinha B, François PP, Nüsse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, et al. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. *Cell Microbiol* [Internet]. 1999 Sep [cited 2018 Jan 25];1(2):101–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11207545>
  50. Fowler T, Wann ER, Joh D, Johansson S, Foster TJ, Höök M. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Eur J Cell Biol* [Internet]. 2000 Oct [cited 2018 Jan 25];79(10):672–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11089915>
  51. Grundmeier M, Hussain M, Becker P, Heilmann C, Peters G, Sinha B. Truncation of Fibronectin-Binding Proteins in *Staphylococcus aureus* Strain Newman Leads to Deficient Adherence and Host Cell Invasion Due to Loss of the Cell Wall Anchor Function. *Infect Immun* [Internet]. 2004 Dec 1 [cited 2018 Jan 25];72(12):7155–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15557640>
  52. Shinji H, Yosizawa Y, Tajima A, Iwase T, Sugimoto S, Seki K, et al. Role of fibronectin-binding proteins A and B in in vitro cellular infections and in vivo septic infections by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* [Internet]. 2011 Jun [cited 2018 Jan 25];79(6):2215–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21422173>
  53. Greene C, McDevitt D, Francois P, Vaudaux PE, Lew DP, Foster TJ. Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes. *Mol Microbiol* [Internet]. 1995 Sep [cited 2018 Jan 25];17(6):1143–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8594333>
  54. Vaudaux P, Pittet D, Haeberli A, Lerch PG, Morgenthaler JJ, Proctor RA, et al. Fibronectin is more active than fibrin or fibrinogen in promoting *Staphylococcus aureus* adherence to inserted intravascular catheters. *J Infect Dis* [Internet]. 1993 Mar [cited 2018 Jan 25];167(3):633–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8440934>
  55. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* [Internet]. 1999 May 21 [cited 2018 Jan 25];284(5418):1318–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10334980>
  56. Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song Z, Moser C, Jensen PØ, et al. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci* [Internet]. 2011 Apr [cited 2018 Jan 25];3(2):55–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21485309>
  57. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2004 Feb [cited 2018 Jan 25];2(2):95–108. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15040259>
  58. Pozzi C, Waters EM, Rudkin JK, Schaeffer CR, Lohan AJ, Tong P, et al. Methicillin Resistance Alters the Biofilm Phenotype and Attenuates Virulence in *Staphylococcus aureus* Device-Associated Infections. Sullam PM, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. 2012 Apr 5 [cited 2018 Jan 25];8(4):e1002626. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22496652>
  59. Rochford ETJ, Richards RG, Moriarty TF. Influence of material on the development of device-associated infections. *Clinical Microbiology and Infection* [Internet]. 2012 Dec [cited



- 2018 Jan 25];18(12):1162–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22925523>
60. Weidenmaier C, Lee JC. Structure and Function of Surface Polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. In Springer, Cham; 2015 [cited 2018 Jan 25]. p. 57–93. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/82\\_2015\\_5018](http://link.springer.com/10.1007/82_2015_5018)
  61. Jones C. Revised structures for the capsular polysaccharides from *Staphylococcus aureus* Types 5 and 8, components of novel glycoconjugate vaccines. Carbohydr Res [Internet]. 2005 May 2 [cited 2018 Jan 25];340(6):1097–106. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15797125>
  62. Sau S, Bhasin N, Wann ER, Lee JC, Foster TJ, Lee CY. The *Staphylococcus aureus* allelic genetic loci for serotype 5 and 8 capsule expression contain the type-specific genes flanked by common genes. Microbiology (N Y) [Internet]. 1997 Jul 1 [cited 2018 Jan 25];143(7):2395–405. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9245821>
  63. Maira-Litran T, Kropec A, Goldmann D, Pier GB. Biologic properties and vaccine potential of the staphylococcal poly-N-acetyl glucosamine surface polysaccharide. Vaccine [Internet]. 2004 Feb 17 [cited 2018 Jan 25];22(7):872–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X03008302?via%3Dihub>
  64. Mann EE, Rice KC, Boles BR, Endres JL, Ranjit D, Chandramohan L, et al. Modulation of eDNA Release and Degradation Affects *Staphylococcus aureus* Biofilm Maturation. Ratner AJ, editor. PLoS One [Internet]. 2009 Jun 9 [cited 2018 Jan 25];4(6):e5822. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19513119>
  65. Geoghegan JA, Corrigan RM, Gruszka DT, Speziale P, O’Gara JP, Potts JR, et al. Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol [Internet]. 2010 Nov 1 [cited 2018 Jan 25];192(21):5663–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20817770>
  66. Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Götz F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. Mol Microbiol [Internet]. 1996 Jun [cited 2018 Jan 25];20(5):1083–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8809760>
  67. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. Infect Immun [Internet]. 1999 Oct [cited 2018 Jan 25];67(10):5427–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10496925>
  68. Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. Mol Microbiol [Internet]. 2002 Mar [cited 2018 Jan 25];43(6):1367–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11952892>
  69. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penades JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. J Bacteriol [Internet]. 2001 May 1 [cited 2018 Jan 25];183(9):2888–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11292810>
  70. Lasa I, Penadés JR. Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. Res Microbiol [Internet]. 2006 Mar [cited 2018 Jan 25];157(2):99–107. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16427771>
  71. Mehlin C, Headley CM, Klebanoff SJ. An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: isolation and characterization. J Exp Med [Internet]. 1999 Mar

- 15 [cited 2018 Feb 26];189(6):907–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10075974>
72. Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach THL, Queck SY, Li M, et al. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med* [Internet]. 2007 Dec 11 [cited 2018 Jan 25];13(12):1510–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17994102>
73. Yarwood JM, Schlievert PM. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J Clin Invest* [Internet]. 2003 Dec [cited 2017 Jan 22];112(11):1620–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14660735>
74. Periasamy S, Chatterjee SS, Cheung GYC, Otto M. Phenol-soluble modulins in staphylococci. *Commun Integr Biol* [Internet]. 2012 May 5 [cited 2018 Jan 25];5(3):275–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22896791>
75. Wang R, Khan BA, Cheung GYC, Bach THL, Jameson-Lee M, Kong KF, et al. *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. *Journal of Clinical Investigation* [Internet]. 2011 Jan 4 [cited 2018 Jan 25];121(1):238–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21135501>
76. Periasamy S, Chatterjee SS, Cheung GYC, Otto M. Phenol-soluble modulins in staphylococci. *Commun Integr Biol* [Internet]. 2012 May 5 [cited 2018 Jan 25];5(3):275–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22896791>
77. Kretschmer D, Gleske AK, Rautenberg M, Wang R, Köberle M, Bohn E, et al. Human Formyl Peptide Receptor 2 Senses Highly Pathogenic *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2010 Jun 25 [cited 2018 Jan 25];7(6):463–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20542250>
78. Löffler B, Hussain M, Grundmeier M, Brück M, Holzinger D, Varga G, et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin Is a Very Potent Cytotoxic Factor for Human Neutrophils. Cheung A, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. 2010 Jan 8 [cited 2018 Jan 25];6(1):e1000715. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20072612>
79. Schreiner J, Kretschmer D, Klenk J, Otto M, Buhning HJ, Stevanovic S, et al. *Staphylococcus aureus* Phenol-Soluble Modulin Peptides Modulate Dendritic Cell Functions and Increase In Vitro Priming of Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2013 Apr 1 [cited 2018 Jan 25];190(7):3417–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23460735>
80. Howlin RP, Brayford MJ, Webb JS, Cooper JJ, Aiken SS, Stoodley P. Antibiotic-Loaded Synthetic Calcium Sulfate Beads for Prevention of Bacterial Colonization and Biofilm Formation in Periprosthetic Infections. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2015 Jan [cited 2018 Jan 25];59(1):111–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25313221>
81. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Adults and Children. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2011 Feb 1 [cited 2018 Jan 25];52(3):e18–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21208910>

82. Howden BP, Davies JK, Johnson PDR, Stinear TP, Grayson ML. Reduced Vancomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus*, Including Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Strains: Resistance Mechanisms, Laboratory Detection, and Clinical Implications. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2018 Jan 25];23(1):99–139. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20065327>
83. Salem AH, Elkhatib WF, Noreddin AM. Pharmacodynamic assessment of vancomycin-rifampicin combination against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* biofilm: a parametric response surface analysis. Journal of Pharmacy and Pharmacology [Internet]. 2011 Jan [cited 2018 Jan 25];63(1):73–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21155818>
84. Vergidis P, Rouse MS, Euba G, Karau MJ, Schmidt SM, Mandrekar JN, et al. Treatment with Linezolid or Vancomycin in Combination with Rifampin Is Effective in an Animal Model of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Foreign Body Osteomyelitis. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 2011 Mar [cited 2018 Jan 25];55(3):1182–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21189340>
85. Kiedrowski MR, Horswill AR. New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. Ann N Y Acad Sci [Internet]. 2011 Dec [cited 2018 Jan 25];1241(1):104–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22191529>
86. Olson ME, Slater SR, Rupp ME, Fey PD. Rifampicin enhances activity of daptomycin and vancomycin against both a polysaccharide intercellular adhesin (PIA)-dependent and -independent *Staphylococcus epidermidis* biofilm. Journal of Antimicrobial Chemotherapy [Internet]. 2010 Oct 1 [cited 2018 Jan 25];65(10):2164–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20719763>
87. Zimmerli W. Clinical presentation and treatment of orthopaedic implant-associated infection. J Intern Med [Internet]. 2014 Aug [cited 2018 Jan 25];276(2):111–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24605880>
88. Baltz RH, Miao V, Wrigley SK. Natural products to drugs: daptomycin and related lipopeptide antibiotics. Nat Prod Rep [Internet]. 2005 Dec [cited 2018 Jan 25];22(6):717. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16311632>
89. Smith K, Perez A, Ramage G, Gemmell CG, Lang S. Comparison of biofilm-associated cell survival following in vitro exposure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms to the antibiotics clindamycin, daptomycin, linezolid, tigecycline and vancomycin. Int J Antimicrob Agents [Internet]. 2009 Apr [cited 2018 Jan 25];33(4):374–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19101124>
90. Fischer A, Yang SJ, Bayer AS, Vaezzadeh AR, Herzig S, Stenz L, et al. Daptomycin resistance mechanisms in clinically derived *Staphylococcus aureus* strains assessed by a combined transcriptomics and proteomics approach. Journal of Antimicrobial Chemotherapy [Internet]. 2011 Aug [cited 2018 Jan 25];66(8):1696–711. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21622973>
91. Chai D, Liu X, Wang R, Bai Y, Cai Y. Efficacy of Linezolid and Fosfomycin in Catheter-Related Biofilm Infection Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Biomed Res Int [Internet]. 2016 Jun 5 [cited 2018 Jan 25];2016:1–7. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/6413982/>

92. Yamaki J, Synold T, Wong-Beringer A. Tigecycline induction of phenol-soluble modulins by invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2013 Sep 1 [cited 2018 Jan 25];57(9):4562–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23817369>
93. Turner CE, Sriskandan S. Panton–Valentine leucocidin expression by *Staphylococcus aureus* exposed to common antibiotics. *Journal of Infection* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2018 Jan 25];71(3):338–46. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016344531500170X>
94. Gemmell CG, Ford CW. Virulence factor expression by Gram-positive cocci exposed to subinhibitory concentrations of linezolid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [Internet]. 2002 Nov 1 [cited 2018 Jan 25];50(5):665–72. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkf192>
95. Bernardo K, Pakulat N, Fleer S, Schnaith A, Utermöhlen O, Krut O, et al. Subinhibitory concentrations of linezolid reduce *Staphylococcus aureus* virulence factor expression. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2004 Feb 1 [cited 2018 Jan 25];48(2):546–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14742208>
96. Stevens DL, Wallace RJ, Hamilton SM, Bryant AE. Successful Treatment of Staphylococcal Toxic Shock Syndrome with Linezolid: A Case Report and In Vitro Evaluation of the Production of Toxic Shock Syndrome Toxin Type 1 in the Presence of Antibiotics. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2006 Mar 1 [cited 2018 Jan 25];42(5):729–30. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/500265>
97. Otto MP, Martin E, Badiou C, Lebrun S, Bes M, Vandenesch F, et al. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [Internet]. 2013 Jul 1 [cited 2018 Jan 25];68(7):1524–32. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkt073>
98. Rasigade J, Moulay A, Lhoste Y, Tristan A, Bes M, Vandenesch F, et al. Impact of sub-inhibitory antibiotics on fibronectin-mediated host cell adhesion and invasion by *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol* [Internet]. 2011 Dec 14 [cited 2018 Jan 25];11(1):263. Available from: <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-11-263>
99. Cázares-Domínguez V, Ochoa SA, Cruz-Córdova A, Rodea GE, Escalona G, Olivares AL, et al. Vancomycin modifies the expression of the agr system in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Front Microbiol* [Internet]. 2015 [cited 2018 Nov 25];6:369. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25999924>
100. Lázaro-Díez M, Remuzgo-Martínez S, Rodríguez-Mirones C, Acosta F, Icardo JM, Martínez-Martínez L, et al. Effects of Subinhibitory Concentrations of Ceftaroline on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Biofilms. *PLoS One* [Internet]. 2016 [cited 2018 Nov 25];11(1):e0147569. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26800524>
101. Leiman SA, May JM, Lebar MD, Kahne D, Kolter R, Losick R. D-amino acids indirectly inhibit biofilm formation in *Bacillus subtilis* by interfering with protein synthesis. *J Bacteriol*

- [Internet]. 2013 Dec [cited 2018 Aug 9];195(23):5391–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24097941>
102. Cava F, Lam H, de Pedro MA, Waldor MK. Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2011 Mar [cited 2018 Aug 9];68(5):817–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21161322>
  103. Kolodkin-Gal I, Romero D, Cao S, Clardy J, Kolter R, Losick R. D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science* [Internet]. 2010 Apr 30 [cited 2018 Aug 9];328(5978):627–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20431016>
  104. Hochbaum AI, Kolodkin-Gal I, Foulston L, Kolter R, Aizenberg J, Losick R. Inhibitory effects of D-amino acids on *Staphylococcus aureus* biofilm development. *J Bacteriol* [Internet]. 2011 Oct [cited 2018 Aug 9];193(20):5616–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21856845>
  105. Sanchez CJ, Prieto EM, Krueger CA, Zienkiewicz KJ, Romano DR, Ward CL, et al. Effects of local delivery of d-amino acids from biofilm-dispersive scaffolds on infection in contaminated rat segmental defects. *Biomaterials* [Internet]. 2013 Oct [cited 2018 Aug 9];34(30):7533–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23831189>
  106. Arfin SM, Koziell DA. Inhibition of Growth of *Salmonella typhimurium* and of Threonine Deaminase and Transaminase B by 3-Chloroalanine. *J Bacteriol* [Internet]. 1971 [cited 2018 Jun 8];105(2):519–22. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC248412/pdf/jbacter00374-0081.pdf>
  107. Manning JM, Merrifield NE, Jones WM, Gotschlich EC. Inhibition of bacterial growth by beta-chloro-D-alanine. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1974 Feb [cited 2018 Sep 24];71(2):417–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4150023>
  108. Whalen WA, Wang MD, Berg CM. beta-Chloro-L-alanine inhibition of the *Escherichia coli* alanine-valine transaminase. *J Bacteriol* [Internet]. 1985 Dec [cited 2018 Aug 9];164(3):1350–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3934143>
  109. El Zoeiby A, Sanschagrin F, Levesque RC. Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Mol Microbiol* [Internet]. 2002 Dec 18 [cited 2018 Jun 8];47(1):1–12. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2003.03289.x>
  110. Wei Y, Qiu W, Zhou XD, Zheng X, Zhang KK, Wang SD, et al. Alanine racemase is essential for the growth and interspecies competitiveness of *Streptococcus mutans*. *Int J Oral Sci* [Internet]. 2016 [cited 2018 Aug 9];8(4):231–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27740612>
  111. Sieradzki K, Tomasz A. Suppression of beta-lactam antibiotic resistance in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* through synergic action of early cell wall inhibitors and some other antibiotics. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 1997 May [cited 2018 Aug 9];39 Suppl A:47–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9511062>
  112. Azam MA, Jayaram U. Inhibitors of alanine racemase enzyme: a review. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2016 Jul 3;31(4):517–26.
  113. Andes D, Craig WA. Pharmacodynamics of a new cephalosporin, PPI-0903 (TAK-599), active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in murine thigh and lung infection models: identification of an in vivo pharmacokinetic-pharmacodynamic target. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Apr;50(4):1376–83.

114. Ge Y, Maynard D, Rickert DE. Comparative pharmacokinetics of ceftaroline in rats, rabbits, and monkeys following a single intravenous or intramuscular injection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Feb;54(2):912–4.
115. Kadurugamuwa JL, Sin L V, Yu J, Francis KP, Kimura R, Purchio T, et al. Rapid direct method for monitoring antibiotics in a mouse model of bacterial biofilm infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Oct;47(10):3130–7.
116. Bertoldi M, Cellini B, Paiardini A, Montioli R, Borri Voltattorni C. Reactions of human liver peroxisomal alanine: glyoxylate aminotransferase with  $\beta$ -chloro-L-alanine and L-cysteine: Spectroscopic and kinetic analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* [Internet]. 2008 Sep [cited 2018 Nov 25];1784(9):1356–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18492492>
117. Beuster G, Zarse K, Kaleta C, Thierbach R, Kiehntopf M, Steinberg P, et al. Inhibition of alanine aminotransferase in silico and in vivo promotes mitochondrial metabolism to impair malignant growth. *J Biol Chem* [Internet]. 2011 Jun 24 [cited 2018 Jun 8];286(25):22323–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21540181>
118. Akbari-Ayezloy E, Hosseini-Jazani N, Yousefi S, Habibi N. Eradication of methicillin resistant *S. aureus* biofilm by the combined use of fosfomycin and  $\beta$ -chloro-L-alanine. *Iran J Microbiol* [Internet]. 2017 Feb [cited 2018 Jan 25];9(1):1–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28775817>
119. Hait J, Tallent S, Melka D, Keys C, Bennett R. *Staphylococcus aureus* Outbreak Investigation of an Illinois Bakery. *J Food Saf* [Internet]. 2012 Nov 1 [cited 2018 Jan 25];32(4):435–44. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jfs.12002>
120. Cantekin Z, Ergun Y, Solmaz H, Özmen GÖ, Demir M, Saidi R. PCR Assay With Host Specific Internal Control for *Staphylococcus aureus* From Bovine Milk Samples. *Maced Vet Rev* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2018 Mar 12];38(1):97–100. Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/macvetrev.2015.38.issue-1/j.macvetrev.2015.01.038/j.macvetrev.2015.01.038.xml>
121. Cuny C, Layer F, Strommenger B, Witte W. Rare occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a novel *mecA* homologue in humans in Germany. *PLoS One*. 2011;6(9):e24360.
122. Zhang K, McClure JA, Conly JM. Enhanced multiplex PCR assay for typing of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Mol Cell Probes*. 2012;26(5):218–21.
123. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing A CLSI supplement for global application [Internet]. [cited 2018 Dec 5]. Available from: [www.clsi.org](http://www.clsi.org).
124. Wayne PC and LSI. CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. CLSI document M07-A9. 11th ed. Pennsylvania; 2018.
125. Wayne PC and LSI. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement*. CLSI document M100. 30th ed. Pennsylvania; 2020.
126. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, et al. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: Rapid

- identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(1):264–74.
127. Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L, Mackie K, et al. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* [Internet]. 2002 Sep [cited 2018 Apr 21];70(9):4987–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12183545>
  128. Campbell SJ, Deshmukh HS, Nelson CL, Bae IG, Stryjewski ME, Federspiel JJ, et al. Genotypic Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from a Multinational Trial of Complicated Skin and Skin Structure Infections. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2008 Feb 1 [cited 2018 Apr 21];46(2):678–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18077636>
  129. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis*. 1999;29(5):1128–32.
  130. Pública I de S. Procedimiento Subtipificación Molecular de *Staphylococcus aureus* mediante PFGE. PR-250.01-005. 2012.
  131. Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn CE, et al. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2003 Apr [cited 2018 Aug 25];41(4):1574–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12682148>
  132. BCL Convert.
  133. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* [Internet]. 2014 Jul 15 [cited 2023 Jan 23];30(14):2068–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24642063/>
  134. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Bonaventura G Di, Djukić S, Ćirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* [Internet]. 2007 Aug [cited 2018 Jan 25];115(8):891–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17696944>
  135. Atshan SS, Shamsudin MN, Lung LTT, Sekawi Z, Ghaznavi-Rad E, Pei CP. Comparative characterisation of genotypically different clones of MRSA in the production of biofilms. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2012 [cited 2018 Sep 23];2012:417247. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22529705>
  136. Sánchez-Sanhueza G, Rebolledo S, López J, Encalada M, Bello-Toledo H, Rojas D, et al. Synthesis of Copper Nanowires and Their Antimicrobial Activity on Strains Isolated Persistent Endodontic Infections. *J Nanosci Nanotechnol* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2018 Aug 9];18(7):4507–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29442626>
  137. Atshan SS, Shamsudin MN, Karunanidhi A, van Belkum A, Lung LTT, Sekawi Z, et al. Quantitative PCR analysis of genes expressed during biofilm development of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Infection, Genetics and Evolution* [Internet]. 2013 Aug [cited 2018 Jan 25];18:106–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23669446>

138. Booth MC, Pence LM, Mahasreshti P, Callegan MC, Gilmore MS. Clonal associations among *Staphylococcus aureus* isolates from various sites of infection. *Infect Immun*. 2001 Jan;69(1):345–52.
139. Sola C, Paganini H, Egea AL, Moyano AJ, Garnero A, Kevric I, et al. Spread of epidemic MRSA-ST5-IV clone encoding PVL as a major cause of community onset staphylococcal infections in Argentinean children. *PLoS One*. 2012;7(1).
140. 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* [Internet]. 2011 May [cited 2018 Apr 21];79(5):1927–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21402769>
141. Gogoi-Tiwari J, Babra Waryah C, Sunagar R, Veeresh H, Nuthanalakshmi V, Preethirani P, et al. Typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in Australia and India. *Aust Vet J* [Internet]. 2015 Aug [cited 2018 Apr 21];93(8):278–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26220320>
142. Fursova KK, Shchannikova MP, Loskutova I V, Shepelyakovskaya AO, Laman AG, Boutanaev AM, et al. Exotoxin diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with subclinical mastitis in Central Russia. *J Dairy Sci* [Internet]. 2018 Feb 21 [cited 2018 Mar 26];0(0). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29477514>
143. Cucarella C, Tormo MA, Ubeda C, Trotonda MP, Monzón M, Peris C, et al. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2004 Apr;72(4):2177–85.
144. Vasudevan P, Nair MKM, Annamalai T, Venkitanarayanan KS. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol*. 2003 Mar 20;92(1–2):179–85.
145. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Jul;46(7):2155–61.
146. Jiang Q, Jin Z, Sun B. MgrA Negatively Regulates Biofilm Formation and Detachment by Repressing the Expression of psm Operons in *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2018 Aug 15 [cited 2019 Mar 31];84(16). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29884758>
147. Sección Rabia Subdepartamento Enfermedades Virales J, Manuel Jiménez Salgado Sección Histocompatibilidad T, Celmira Martínez Aguilar D, Berta Olivares Vicencio T, Verónica Ramírez Muñoz D, Micobacterias S, et al. Guia De Bioseguridad Para Laboratorios Clínicos Autores MV. Miriam Favi Cortés. Revisores Instituto De Salud Pública TM Maria Isabel Jercic Lara. [Internet]. [cited 2018 Dec 22]. Available from: <http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2013/08/Manual%20Bio-30082013B.pdf>
148. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Version 11.0 2021. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters [Internet]. 2021 [cited 2021 Aug 14]. Available from: <http://www.eucast.org>
149. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Ćirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* [Internet].



- 2007 [cited 2021 Nov 7];115(8):891–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17696944/>
150. Shrivastava SR, Shrivastava PS, Ramasamy J. World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *Journal of Medical Society* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2023 Jan 22];32(1):76. Available from: <https://www.jmedsoc.org/article.asp?issn=0972-4958;year=2018;volume=32;issue=1;spage=76;epage=77;aualast=Shrivastava>
  151. 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).
  152. Gustavo M, AL E, C O, L O, H F, JL B, et al. Molecular epidemiology of hospital-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Southern Chile. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2013 Dec 1 [cited 2021 Oct 31];32(12):1533–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23765159/>
  153. Liu J, Chen D, Peters BM, Li L, Li B, Xu Z, et al. Staphylococcal chromosomal cassettes mec (SCCmec): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog* [Internet]. 2016;101:56–67. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401016301760>
  154. Pereira JN da P, Rabelo MA, Lima JL da C, Neto AMB, Lopes AC de S, Maciel MAV. Phenotypic and molecular characterization of resistance to macrolides, lincosamides and type B streptogramin of clinical isolates of *Staphylococcus* spp. of a university hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2016 May 1;20(3):276–81.
  155. Instituto de Salud Pública de Chile. Vigilancia de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente adquirido en la comunidad. Vol. 7. Santiago de Chile; 2017 Oct.
  156. Pardo L, Machado V, Cuello D, Aguerrebere P, Seija V, Braga V, et al. Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes and their associated genotypes in *Staphylococcus aureus* isolates from a tertiary level public hospital of Uruguay. *Rev Argent Microbiol*. 2020 Jul 1;52(3):202–10.
  157. Reyes J, Hidalgo M, Díaz L, Rincón S, Moreno J, Vanegas N, et al. Characterization of macrolide resistance in Gram-positive cocci from Colombian hospitals: a countrywide surveillance. *International Journal of Infectious Diseases*. 2007 Jul 1;11(4):329–36.
  158. Reyes J, Rincón S, Díaz L, Panesso D, Contreras GA, Zurita J, et al. Dissemination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), USA300 Sequence Type 8 Lineage in Latin-America. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2009 Dec [cited 2021 Nov 3];49(12):1861. Available from: [/pmc/articles/PMC2787674/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19444444/)
  159. Egea AL, Gagetti P, Lamberghini R, Faccone D, Lucero C, Vindel A, et al. New patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones, community-associated MRSA genotypes behave like healthcare-associated MRSA genotypes within hospitals, Argentina. *International Journal of Medical Microbiology*. 2014 Nov 1;304(8):1086–99.
  160. Otth Rademacher L, Wilson Sch. M, Bustamante H. N, Fernández J. H, Otth L. C. Susceptibilidad antimicrobiana y patrones de resistencia de *Staphylococcus aureus*

- aislados de pacientes y portadores en la ciudad de Valdivia, Chile. Revista chilena de infectología [Internet]. 2008 Jun [cited 2023 Jan 16];25(3):175–8.
161. Instituto de Salud Pública de Chile. Vigilancia de resistencia a antimicrobianos en bacterias que pueden producir Infecciones Asociadas a la Atención en Salud. 5, [Internet]. Santiago; 2015 Apr [cited 2023 Jan 16]. Available from: [https://www.ispch.cl/sites/default/files/ResistenciaAntibacterianosV2-06072015A\\_0.pdf](https://www.ispch.cl/sites/default/files/ResistenciaAntibacterianosV2-06072015A_0.pdf)
  162. Havaei SA, Ghanbari F, Rastegari AA, Azimian A, Khademi F, Hosseini N, et al. Molecular Typing of Hospital-Acquired *Staphylococcus aureus* Isolated from Isfahan, Iran . Int Sch Res Notices. 2014 Nov 9;2014:1–6.
  163. Wang WY, Chiueh TS, Sun JR, Tsao SM, Lu JJ. Molecular Typing and Phenotype Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Blood in Taiwan. PLoS One [Internet]. 2012 Jan 23 [cited 2023 Jan 16];7(1):e30394. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0030394>
  164. Otaíza F, Orsini M, Pohlenz M, Tarride T. Informe de Vigilancia de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud [Internet]. www.minsal.cl. 2017 [cited 2020 Sep 13]. Available from: <https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2015/09/informe-vigilancia-2017.pdf>
  165. Quezada-Aguiluz M, Aguayo-Reyes A, Carrasco C, Mejías D, Saavedra P, Mella-Montecinos S, et al. Phenotypic and Genotypic Characterization of Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B Resistance among Clinical Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates in Chile. Antibiotics [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2023 Jan 22];11(8):1000. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-6382/11/8/1000/htm>
  166. Haaber J, Penadés JR, Ingmer H. Transfer of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2023 Jan 17];25(11):893–905. Available from: <http://www.cell.com/article/S0966842X17301257/fulltext>
  167. OS D, C L, EV N, CG T, T V, LS I. Detection of Aminoglycoside and Macrolide Resistance Mechanisms in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi. 2016 Oct 1;120(4):886–91.
  168. Oyeboode ATA, David OO, Kunle PB, Aderayo AA, Adeolu O. Distribution of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes amongst methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* isolates from Nigerian hospitals. Afr J Microbiol Res. 2015 Feb 4;9(5):318–25.
  169. Schmitz Franz-Josef, Fluit Ad C., Gondolf Mechthild, Beyrau Ralf, Lindenlauf Elke, Verhoef Jan, Heinz Hans-Peter JME. The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding resistance genes in clinical isolates of staphylococci from 19 European hospitals. Journal of Antimicrobial Chemotherapy [Internet]. 1999;43(2):253–9. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article/43/2/253/849165>
  170. Foster TJ. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. FEMS Microbiol Rev [Internet]. 2017 May 1 [cited 2023 Jan 22];41(3):430–49. Available from: <https://academic.oup.com/femsre/article/41/3/430/3608758>
  171. Lade H, Joo HS, Kim JS. Molecular Basis of Non- $\beta$ -Lactam Antibiotics Resistance in *Staphylococcus aureus*. Antibiotics 2022, Vol 11, Page 1378 [Internet]. 2022 Oct 8 [cited 2023 Jan 22];11(10):1378. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-6382/11/10/1378/htm>

172. Elliott ZS, Barry KE, Cox HL, Stoesser N, Carroll J, Vegesana K, et al. The Role of fosA in Challenges with Fosfomycin Susceptibility Testing of Multispecies Klebsiella pneumoniae Carbapenemase-Producing Clinical Isolates. J Clin Microbiol [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2023 Jan 22];57(10). Available from: /pmc/articles/PMC6760957/
173. Song Z, Wang X, Zhou X, Jiang S, Li Y, Ahmad O, et al. Taxonomic distribution of FosB in human-microbiota and activity comparison of fosfomycin resistance. Front Microbiol. 2019 Feb 13;10(FEB):200.
174. Mahmoudi H, Pourhajibagher M, Alikhani MY, Bahador A. The effect of antimicrobial photodynamic therapy on the expression of biofilm associated genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from wound infections in burn patients. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2019 Mar 1;25:406–13.
175. Serray B, Oufriid S, Hannaoui I, Bourjilate F, Soraia N, Mliji M, et al. Genes encoding adhesion factors and biofilm formation in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Morocco. The Journal of Infection in Developing Countries [Internet]. 2016 Aug 31 [cited 2022 Dec 27];10(08):863–9. Available from: <https://jidc.org/index.php/journal/article/view/8361>
176. Haddad O, Merghni A, Elargoubi A, Rhim H, Kadri Y, Mastouri M. Comparative study of virulence factors among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. BMC Infect Dis [Internet]. 2018 Nov 13 [cited 2022 Dec 27];18(1):1–8. Available from: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-018-3457-2>
177. Yoshii Y, Okuda KI, Yamada S, Nagakura M, Sugimoto S, Nagano T, et al. Norgestimate inhibits staphylococcal biofilm formation and resensitizes methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to  $\beta$ -lactam antibiotics. NPJ Biofilms Microbiomes [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2022 Dec 27];3(1):18. Available from: /pmc/articles/PMC5522392/
178. Reffuveille F, Josse J, Vallé Q, Mongaret C, Gangloff SC. *Staphylococcus aureus* Biofilms and their Impact on the Medical Field. In: The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* [Internet]. InTech; 2017 [cited 2018 Jun 23]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/the-rise-of-virulence-and-antibiotic-resistance-in-staphylococcus-aureus-i-staphylococcus-aureus-biofilms-and-their-impact-on-the-medical-field>
179. Kot B, Sytykiewicz H, Sprawka I. Expression of the Biofilm-Associated Genes in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Biofilm and Planktonic Conditions. Int J Mol Sci [Internet]. 2018 Nov 6 [cited 2022 Dec 27];19(11). Available from: /pmc/articles/PMC6274806/
180. Da Fonseca Batista DW, de Campos PA, Camilo NC, Royer S, Araújo BF, Naves KSC, et al. Biofilm formation of Brazilian methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: Prevalence of Biofilm determinants and clonal profiles. J Med Microbiol [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2022 Dec 27];65(4):286–97. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.000228>
181. Pereira-Franchi EPL, Barreira MRN, da Costa N de SLM, Riboli DFM, Abraão LM, Martins KB, et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Brazilian primary health care system. Trop Med Int Health [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2022 Dec 27];24(3):339–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30549385/>

182. Gowrishankar S, Kamaladevi A, Balamurugan K, Pandian SK. In Vitro and in Vivo Biofilm Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Patients Associated with Pharyngitis Infection. *Biomed Res Int*. 2016;2016.
183. Khoramian B, Jabalameli F, Niasari-Naslaji A, Taherikalani M, Emaneini M. Comparison of virulence factors and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from human and bovine infections. *Microb Pathog*. 2015 Nov 1;88:73–7.
184. Grant G, Bhunia AK, Cabrera R, Manandhar S, Shrivastava N, Singh A, et al. Biofilm Producing Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates Augmented Prevalence of Antibiotic Resistant Cases in Tertiary Care Hospitals of Nepal. 2018 [cited 2022 Dec 27]; Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
185. Viana AS, Botelho AMN, Moustafa AM, Boge CLK, Ferreira ALP, da Silva Carvalho MC, et al. Multidrug-Resistant Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Associated with Bacteremia and Monocyte Evasion, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2023 Aug 9];27(11):2825. Available from: [/pmc/articles/PMC8544994/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35444994/)
186. Sugimoto S, Sato F, Miyakawa R, Chiba A, Onodera S, Hori S, et al. Broad impact of extracellular DNA on biofilm formation by clinically isolated Methicillin-resistant and -sensitive strains of *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports* 2018 8:1 [Internet]. 2018 Feb 2 [cited 2022 Dec 27];8(1):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-20485-z>
187. Dakheel KH, Abdul Rahim R, Neela VK, Al-Obaidi JR, Hun TG, Yusoff K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilms and Their Influence on Bacterial Adhesion and Cohesion. *Biomed Res Int*. 2016;2016.
188. O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Smyth D, Humphreys H, Robinson DA, et al. Association between Methicillin Susceptibility and Biofilm Regulation in *Staphylococcus aureus* Isolates from Device-Related Infections. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2007 May [cited 2022 Dec 27];45(5):1379. Available from: [/pmc/articles/PMC1865887/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1865887/)
189. Singh A, Prakash P, Achra A, Singh G, Das A, Singh R. Standardization and Classification of In vitro Biofilm Formation by Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Glob Infect Dis* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2022 Dec 27];9(3):93. Available from: [/pmc/articles/PMC5572203/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25572203/)
190. McCarthy H, Rudkin JK, Black NS, Gallagher L, O'Neill E, O'Gara JP. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2022 Dec 27];5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25674541/>
191. de Carvalho SP, de Almeida JB, de Freitas LM, Guimarães AMS, Do Nascimento NC, Dos Santos AP, et al. Genomic profile of Brazilian methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resembles clones dispersed worldwide. *J Med Microbiol* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2023 Jan 22];68(5):693–702. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.000956>
192. Li X, Huang T, Xu K, Li C, Li Y. Molecular characteristics and virulence gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolates in Hainan, China. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2019 Oct 22 [cited 2023 Jan 22];19(1):1–12. Available from: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-019-4547-5>

193. Archer NK, Mazaitis MJ, William Costerton J, Leid JG, Powers ME, Shirliff ME. Staphylococcus aureus biofilms: Properties, regulation and roles in human disease. Vol. 2, Virulence. Taylor and Francis Inc.; 2011. p. 445–59.
194. Huillet E, Le Loir Y, Otto M, Le KY. Quorum-sensing regulation in staphylococci—an overview. 2015 [cited 2018 Jun 27];6. Available from: [https://com-mendeley-prod-publicsharing-pdfstore.s3.eu-west-1.amazonaws.com/8305-PUBMED/10.3389/fmicb.2015.01174/fmicb\\_06\\_01174\\_pdf.pdf?X-Amz-Security-Token=FQoDYXdzEN7%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2FwEaDDRaXeQSA mMgnldJECK2A0mV8wLcCIN2cHOeYWARW3eb0KVqvZUVt0fDw6dV0PLH2pbLnVZ%2Fc3wUxCWp0SevOzR9bfNshqEa229KNbk53oe9B%2BOXENUGCg%2BhiBo3o239WQ%2FivID8UETqBd%2Fp5iqASKmPXKt6x5yK6IDFzmT8wwwVVN8%2F4cU8DtT0rwFBFkff%2B1y%2BXwmPgUAU0r1Ckfpbhg2v0dV71hn%2FggRx3njNZUWJWCmnj5zb8n0nXlcP%2BcCYGXcEWYpUOyhNLVZTPKDJ50%2FZAQTgSVTn4VU8FzNWd%2BqnywiWPQmK65iNxdOILZrnaQljw8%2FHPdf3h9%2F2VdinpJSi7C3EelaqQsMFWYYa4CP6J7jSONq%2BNlqOwLyw5S7XPlt5QViCipqNMKrVJ%2FCcWc5e0udvc7Cqy%2BXPqsZleNUreBj02gBMsiaUPr7WRpWu7i%2FLeRBVACKjWiry80j2OWOwhkxmWqpe6Jy2YhtHNxZSE D5KgpkHKJcUS5qNGGn%2FIHsCEpbQ0Xlqc8jcmxx9yS3V5oGdMjtlIqmcQTxZ2SpkwSOE4V4yNMktQwaEte93mteoLzYNyZc58XYZQapMjqEE%2FrCjemtXZBQ%3D%3D&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Date=20180628T225600Z&X-Amz-SignedHeaders=host&X-Amz-Expires=299&X-Amz-Credential=ASIAIRN5DYLOSQCMUHSQ%2F20180628%2Feu-west-1%2Fs3%2Faws4\\_request&X-Amz-Signature=588daec90d6dc0c747ca06d4f54a5a72494b65d68087d050b49ef8523957bd11](https://com-mendeley-prod-publicsharing-pdfstore.s3.eu-west-1.amazonaws.com/8305-PUBMED/10.3389/fmicb.2015.01174/fmicb_06_01174_pdf.pdf?X-Amz-Security-Token=FQoDYXdzEN7%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2FwEaDDRaXeQSA mMgnldJECK2A0mV8wLcCIN2cHOeYWARW3eb0KVqvZUVt0fDw6dV0PLH2pbLnVZ%2Fc3wUxCWp0SevOzR9bfNshqEa229KNbk53oe9B%2BOXENUGCg%2BhiBo3o239WQ%2FivID8UETqBd%2Fp5iqASKmPXKt6x5yK6IDFzmT8wwwVVN8%2F4cU8DtT0rwFBFkff%2B1y%2BXwmPgUAU0r1Ckfpbhg2v0dV71hn%2FggRx3njNZUWJWCmnj5zb8n0nXlcP%2BcCYGXcEWYpUOyhNLVZTPKDJ50%2FZAQTgSVTn4VU8FzNWd%2BqnywiWPQmK65iNxdOILZrnaQljw8%2FHPdf3h9%2F2VdinpJSi7C3EelaqQsMFWYYa4CP6J7jSONq%2BNlqOwLyw5S7XPlt5QViCipqNMKrVJ%2FCcWc5e0udvc7Cqy%2BXPqsZleNUreBj02gBMsiaUPr7WRpWu7i%2FLeRBVACKjWiry80j2OWOwhkxmWqpe6Jy2YhtHNxZSE D5KgpkHKJcUS5qNGGn%2FIHsCEpbQ0Xlqc8jcmxx9yS3V5oGdMjtlIqmcQTxZ2SpkwSOE4V4yNMktQwaEte93mteoLzYNyZc58XYZQapMjqEE%2FrCjemtXZBQ%3D%3D&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Date=20180628T225600Z&X-Amz-SignedHeaders=host&X-Amz-Expires=299&X-Amz-Credential=ASIAIRN5DYLOSQCMUHSQ%2F20180628%2Feu-west-1%2Fs3%2Faws4_request&X-Amz-Signature=588daec90d6dc0c747ca06d4f54a5a72494b65d68087d050b49ef8523957bd11)
195. Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh S. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. EMBO J [Internet]. 1993 Oct [cited 2018 Jan 25];12(10):3967–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7691599>
196. Whalen WA, Wang MD, Berg CM. -Chloro-L-Alanine Inhibition of the *Escherichia coli* Alanine-Valine Transaminase [Internet]. Vol. 164, JOURNAL OF BACTERIOLOGY. 1985 [cited 2018 Sep 24]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC219336/pdf/jbacter00217-0384.pdf>
197. Bi H, Deng R, Liu Y. Linezolid decreases *Staphylococcus aureus* biofilm formation by affecting the IcaA and IcaB proteins. Acta Microbiol Immunol Hung [Internet]. 2022 May 17 [cited 2023 Jan 23];69(2):109–17. Available from: <https://akjournals.com/view/journals/030/69/2/article-p109.xml>
198. Hodille E, Beraud L, Périan S, Berti V, Bes M, Tristan A, et al. Sub-Inhibitory Concentrations of Oxacillin, but Not Clindamycin, Linezolid, or Tigecycline, Decrease Staphylococcal Phenol-Soluble Modulin Expression in Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Microbiol Spectr [Internet]. 2022 Feb 23 [cited 2023 Jan 24];10(1). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.00808-21>
199. Douthit C, Gudenkauf B, Hamood A, Mudaliar N, Caroom C, Jenkins M. Effects of powdered rifampin and vancomycin solutions on biofilm production of *Staphylococcus*

- aureus* on orthopedic implants. J Clin Orthop Trauma [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2023 Jan 23];11(Suppl 1):S113–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31992930/>
200. Post V, Wahl P, Richards RG, Moriarty TF. Vancomycin displays time-dependent eradication of mature *Staphylococcus aureus* biofilms. J Orthop Res [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2023 Jan 23];35(2):381–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27175462/>
  201. Caiazza NC, O’Toole GA. Alpha-toxin is required for biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol [Internet]. 2003 May [cited 2023 Jan 24];185(10):3214–7. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JB.185.10.3214-3217.2003>
  202. Anderson MJ, Schaaf E, Breshears LM, Wallis HW, Johnson JR, Tkaczyk C, et al. Alpha-Toxin Contributes to Biofilm Formation among *Staphylococcus aureus* Wound Isolates. Toxins 2018, Vol 10, Page 157 [Internet]. 2018 Apr 16 [cited 2023 Jan 24];10(4):157. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6651/10/4/157/htm>
  203. Reiter KC, Sant’Anna FH, D’Azevedo PA. Upregulation of *icaA*, *atlE* and *aap* genes by linezolid but not vancomycin in *Staphylococcus epidermidis* RP62A biofilms. Int J Antimicrob Agents. 2014 Mar 1;43(3):248–53.
  204. Mah TFC, O’Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol. 2001 Jan 1;9(1):34–9.
  205. Van Bambeke F, Van Laethem Y, Courvalin P, Tulkens PM. Glycopeptide Antibiotics. Drugs 2004 64:9 [Internet]. 2012 Sep 17 [cited 2023 Jan 24];64(9):913–36. Available from: <https://link.springer.com/article/10.2165/00003495-200464090-00001>
  206. Rosman CWK, van der Mei HC, Sjollemma J. Influence of sub-inhibitory concentrations of antimicrobials on micrococcal nuclease and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. Scientific Reports 2021 11:1 [Internet]. 2021 Jun 24 [cited 2023 Jan 24];11(1):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-92619-9>
  207. Sanchez CJ, Akers KS, Romano DR, Woodbury RL, Hardy SK, Murray CK, et al. D-amino acids enhance the activity of antimicrobials against biofilms of clinical wound isolates of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 2014 [cited 2023 Jan 24];58(8):4353–61. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.02468-14>
  208. Abbasian S, Farahani NN, Mir Z, Alinejad F, Haeili M, Dahmardehei M, et al. Genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from a burn centre by using *agr*, *spa* and SCCmec typing methods. New Microbes New Infect [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2023 Jan 24];26:15. Available from: [/pmc/articles/PMC6141672/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31992930/)
  209. Smith K, Perez A, Ramage G, Gemmell CG, Lang S. Comparison of biofilm-associated cell survival following in vitro exposure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms to the antibiotics clindamycin, daptomycin, linezolid, tigecycline and vancomycin. Int J Antimicrob Agents. 2009 Apr 1;33(4):374–8.
  210. Cha JO, Park YK, Lee YS, Chung GT. In vitro biofilm formation and bactericidal activities of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones prevalent in Korea. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011 May 1;70(1):112–8.
  211. Cafiso V, Bertuccio T, Spina D, Purrello S, Stefani S. Tigecycline inhibition of a mature biofilm in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*: comparison with other drugs. FEMS

- Immunol Med Microbiol [Internet]. 2010 Aug 1 [cited 2023 Jan 24];59(3):466–9. Available from: <https://academic.oup.com/femspd/article/59/3/466/497244>
212. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1997 [cited 2023 Oct 26];63(10):3741. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168683/>
  213. SantaLucia J. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1998 Feb 17 [cited 2023 Oct 26];95(4):1460–5. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.95.4.1460>
  214. Innis MA, Gelfand DH. 1 - OPTIMIZATION OF PCRs BT - PCR Protocols. *PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS* [Internet]. 1990 [cited 2023 Oct 26];3–12. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123721808500056>
  215. Al-Soud WA, Rådström P. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2001 [cited 2023 Oct 26];39(2):485. Available from: [/pmc/articles/PMC87763/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC87763/)
  216. Foster TJ. The remarkably multifunctional fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016;
  217. Malachowa N, Deleo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2010;67(18):3057–71.
  218. Zou H, Li G. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. Vol. 10, *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*. Oxford Academic; 2010. p. 81–4.
  219. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, et al. Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the vanA Resistance Gene. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2003 Apr 3 [cited 2020 May 14];348(14):1342–7. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa025025>
  220. Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. Vol. 17, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group; 2019. p. 203–18.
  221. Sarrou S, Malli E, Tsilipounidaki K, Florou Z, Medvecky M, Skoulakis A, et al. MLSB-Resistant *Staphylococcus aureus* in central Greece: Rate of resistance and molecular characterization. *Microbial Drug Resistance*. 2019 May 1;25(4):543–50.
  222. Steward CD, Raney PM, Morrell AK, Williams PP, McDougal LK, Jevitt L, et al. Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2005 Apr;43(4):1716–21.
  223. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification [Internet]. Vol. 39, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology; 1995 [cited 2020 Aug 19]. p. 577–85. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC162587/>
  224. Miklasí M, Kostoulias X. Mechanisms of Resistance to Macrolide Antibiotics among *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics* 2021, Vol 10, Page 1406 [Internet]. 2021 Nov 17 [cited

- 2022 Apr 10];10(11):1406. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-6382/10/11/1406/htm>
225. Reynolds E, Ross JI, Cove JH. Msr(A) and related macrolide/streptogramin resistance determinants: Incomplete transporters? *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2003 Sep 1 [cited 2020 Aug 19];22(3):228–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13678826/>
  226. Drinkovic D, Fuller ER, Shore KP, Holland DJ, Ellis-Pegler R. Clindamycin treatment of *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance [1] [Internet]. Vol. 48, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford Academic; 2001 [cited 2020 Aug 17]. p. 315–6. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article/48/2/315/882330>
  227. Feßler AT, Wang Y, Wu C, Schwarz S. Mobile macrolide resistance genes in staphylococci. Vol. 99, *Plasmid*. Academic Press Inc.; 2018. p. 2–10.
  228. Pardo L, Machado V, Cuello D, Aguerrebere P, Seija V, Braga V, et al. Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes and their associated genotypes in *Staphylococcus aureus* isolates from a tertiary level public hospital of Uruguay. *Rev Argent Microbiol*. 2020 Jul 1;52(3):202–10.
  229. Egea AL, Galletti P, Lamberghini R, Faccone D, Lucero C, Vindel A, et al. New patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones, community-associated MRSA genotypes behave like healthcare-associated MRSA genotypes within hospitals, Argentina. *International Journal of Medical Microbiology*. 2014 Nov 1;304(8):1086–99.
  230. Planet PJ, Diaz L, Kolokotronis SO, Narechania A, Reyes J, Xing G, et al. Parallel epidemics of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 infection in North and South America. *Journal of Infectious Diseases*. 2015;212(12):1874–82.
  231. Vega F, Alarcón P, Domínguez M, Bello H, Riedel G, Mella S, et al. Aislamiento de *Staphylococcus aureus* hetero-resistente a vancomicina en Hospital Clínico Regional de Concepción, Chile. *Revista chilena de infectología* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2022 May 8];32(5):588–90. Available from: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182015000600017&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182015000600017&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
  232. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard. Vol. 23, *Nccls*. 2003. 1–58 p.
  233. Opazo-Capurro A, Higgins PG, Wille J, Seifert H, Cigarroa C, González-Muñoz P, et al. Genetic Features of Antarctic *Acinetobacter radioresistens* Strain A154 Harboring Multiple Antibiotic-Resistance Genes. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019 Sep 13;9:328.
  234. Jara D, Bello-Toledo H, Domínguez M, Cigarroa C, Fernández P, Vergara L, et al. Antibiotic resistance in bacterial isolates from freshwater samples in Fildes Peninsula, King George Island, Antarctica. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Feb 21 [cited 2021 Mar 23];10(1):3145. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60035-0>



**Phenotypic and Genotypic Characterization of Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B Resistance Among Clinical Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates in Chile**

Manuscrito publicado en: *Antibiotics* 2022, 11, 1000

**Mario Quezada-Aguiluz<sup>1,2,5,8</sup>, Alejandro Aguayo-Reyes<sup>1,2,3,4</sup>, Cinthia Carrasco<sup>1</sup>, Daniela Mejías<sup>1</sup>, Pamela Saavedra<sup>1</sup>, Sergio Mella-Montecinos<sup>2,3,4</sup>, Andrés Opazo-Capurro<sup>1,5,\*</sup>, Helia Bello-Toledo<sup>1,5</sup>, José M. Munita<sup>5,6</sup>, Juan C. Hormazábal<sup>7</sup>, Gerardo González-Rocha<sup>1,5,\*</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile.

<sup>2</sup>Departamento de Medicina Interna. Facultad de Medicina. Universidad de Concepción, Chile.

<sup>3</sup>Unidad de Medicina Interna, Hospital Traumatológico de Concepción; Concepción, Chile.

<sup>4</sup>Unidad de Infectología, Hospital Regional “Dr. Guillermo Grant B.”, Concepción, Chile.

<sup>5</sup>Millennium Initiative for Collaborative Research on Bacterial Resistance (MICROB-R), Chile.

<sup>6</sup>Genomics and Resistant Microbes (GeRM) Group; Facultad de Medicina Clínica Alemana Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile.

<sup>7</sup>Subdepartamento de Enfermedades Infecciosas, Instituto de Salud Pública de Chile, Santiago, Chile; [jchormazabal@ispch.cl](mailto:jchormazabal@ispch.cl).

<sup>8</sup>Centro Regional de Telemedicina y Telesalud del Biobío (CRT Biobío).

\*Correspondence: ggonzal@udec.cl (G. G-R.) andopazo@udec.cl (A. O-C.).

Received: 21 June 2022; Accepted: 20 July 2022; Published: 25 July 2022

**Abstract:** Macrolides, lincosamides and type B streptogramins (MLS<sub>B</sub>) are important therapeutic options to treat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections; however, resistance to these antibiotics has been emerging. In Chile, there are scarce data about the MLS<sub>B</sub> resistance phenotypes in both community- (CA) and hospital-acquired (HA) MRSA isolates. Antimicrobial susceptibility to MLS<sub>B</sub> was determined for sixty-eight non-repetitive isolates of each HA- (32) and CA-MRSA (36). Detection of SCC*mec* elements, *ermA*, *ermB*, *ermC*, and *msrA* genes was performed by PCR. The predominant clones were SCC*mec* I-ST5 (HA-MRSA) and type IVc-ST8 (CA-MRSA). Most of the HA-MRSA isolates (97%) showed resistance to clindamycin, erythromycin, azithromycin, and clarithromycin. Among CA-MRSA isolates, 28% were resistant to erythromycin, azithromycin, and 25% to clarithromycin. All isolates were susceptible to linezolid, vancomycin, daptomycin and trimethoprim/sulfamethoxazole and over 97% to rifampicin. The *ermA* gene was amplified in 88% of HA-MRSA and 17% of CA-MRSA isolates (p <0.001). The *ermC* gene was detected in 6% of HA-SARM and none of CA-SARM isolates, whereas the *msrA* gene was only amplified in 22% of CA-MRSA (p <0.005). Our results demonstrate the prevalence of the cMLS<sub>B</sub> resistance phenotype in all HA-MRSA isolates in Chile, with the *ermA* being the predominant gene identified among these isolates.

**Keywords:** MRSA; MLS<sub>B</sub> phenotype; antibiotics resistant

## 1. Introduction

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is an important pathogen involved in both human and animal infections <sup>2,216</sup>. Although MRSA was initially described producing healthcare-associated infections (HA-MRSA), the appearance of community-associated MRSA infections (CA-MRSA) has been documented since the 1990s <sup>9</sup>. MRSA has shown a remarkable ability to develop resistance to a myriad of antibiotics, as well as to different disinfectants and heavy metals <sup>217</sup>. Vancomycin (VAN), a member of the glycopeptides, has been used as an important option to treat MRSA infections <sup>218</sup>. However, the risk of dissemination of vancomycin-resistant or non-fully susceptible strains suggests that this antibiotic should be used sparingly <sup>219</sup>. For this reason, macrolides (erythromycin [ERY]), lincosamides (clindamycin [CLI]), and streptogramins B (MLS<sub>B</sub>) have emerged as an important therapeutic options to tackle CA-MRSA infections <sup>193,220</sup>. However, the increased use of these antimicrobial has favored the emergence of resistance to these drugs <sup>151,154,221</sup>. To date, there are three main MLS<sub>B</sub> resistance mechanisms described: i) changes in the ribosomal target site, which confers cross-resistance to the entire MLS<sub>B</sub> group <sup>222</sup>. This mechanism is conferred by ribosomal mutations or methylation of the 23S rRNA target site, which are mediated by the *erm* genes (mainly *ermA*, *ermB* and *ermC*) <sup>223,224</sup>. Another mechanism corresponds to ii) an efflux-pump encoded by *msrA*, which can drive out 14- and 15-membered macrolides and streptogramin B, producing the MS<sub>B</sub> phenotype <sup>225</sup>. Finally, another mechanism iii) relies

on drug inactivation and it only confers resistance to lincosamides due to an enzyme encoded by the *Inu* gene <sup>221</sup>.

Significantly, the MLS<sub>B</sub> phenotype can be either constitutive (cMLS<sub>B</sub>) or inducible (iMLS<sub>B</sub>) <sup>154</sup>. Specifically, CLI, which is the MLS<sub>B</sub> agent used for the treatment of *S. aureus* infections, is a weak MLS<sub>B</sub>-resistance inducer and may lead to treatment failure due to false susceptibility results displayed in *in vitro* antimicrobial susceptibility tests <sup>226</sup>. Therefore, it is necessary to perform the CLI susceptibility test in the presence of a strong inducer, such as ERY <sup>222</sup>. Another key point is that antibiotic resistance genes that mediate the MLS<sub>B</sub>-resistance phenotype are found in mobile-genetic elements (MGEs) and, in consequence, may be horizontally transferred to susceptible strains <sup>227</sup>. In Latin America, the resistance rates to MLS<sub>B</sub> antibiotics have been reported to be 74% and 81% to ERY and CLI, respectively, among HA-MRSA isolates <sup>151</sup>.

In Chile, *S. aureus* is one of the main etiological agents in health care-associated infections (HAIs) <sup>164</sup>. Specifically, it is the main cause of surgical wound infections (27%) and the second cause of pneumonia associated to invasive mechanical ventilation (21%). Likewise, it is involved in bloodstream infections (18%) and infections of the central nervous system (18%) <sup>164</sup>. Despite these data, the MLS<sub>B</sub>-resistance phenotype among HA- and CA-MRSA is still unknown among Chilean isolates. Therefore, the aim of our study was to detect and characterize the MLS<sub>B</sub>- and MS<sub>B</sub>-resistance phenotypes among HA-MRSA and CA-MRSA isolates collected between 2007 and 2017 from the *S. aureus* surveillance program of the National Institute of Public Health of Chile (ISP).

## 2. Results

### 2.1. Molecular characterization of MRSA isolates

All HA-MRSA (32) and CA-MRSA (36) isolates were resistant to FOX and *mecA* positive. For HA-MRSA, the Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SSC*mec*) analysis revealed the presence of the Type I and Type II elements in 27 (84.4%) and 5 (15.6%) isolates, respectively. In addition, in all isolates classified as HA-MRSA, the absence of the *pvl* gene was confirmed. On the other hand, in all CA-MRSA (36) the *pvl* gene and the type IV SSC*mec* cassette were detected. Of these, 24 (66.7%) harbored the cassette subtype SSC*mec* IVc, whereas 11 (30.5%), and 1 (2.8%) amplified for the subtypes IVa, and IVb, respectively; therefore, they were confirmed as CA-MRSA.

The MLST analyses of HA-MRSA showed that 27 (84.4%) isolates belonged to ST5 and 5 (15.6%) to ST105, whereas most CA-MRSA isolates belonged to the ST8 (27/36) (Table 1).

**Table 1.** Sequence types (ST) of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in Chile.

	ST 5	ST 8	ST 30	ST 105	ST 868	ST 923	ST 2802	Total
<b>HA-MRSA</b>	27	0	0	5	0	0	0	32
<b>CA-MRSA</b>	1	28	4	0	1	1	1	36

## *2.2. Antimicrobial susceptibility testing*

Thirty-one isolates (31/32) of HA-MRSA (97%) were resistant to macrolides and to CLI. Moreover, 2 isolates (2/32) (6%) were resistant to CHL and 1 isolate (1/32) (3%) to RIF. In the case of CA-MRSA, 10 isolates (10/36) (28%) were resistant to ERY, AZM and CLR, but all were susceptible to CLI, CHL, and RIF (Table 2). All HA-MRSA and CA-MRSA isolates were susceptible to LZD, VAN, DAP and SXT (Table 4). Furthermore, in none of the two groups of MRSA isolates was detected the iMLS mechanism.

The antibiotic resistance profiles were determined for both HA-MRSA and CA-MRSA isolates (Table 2). The HA-MRSA group showed more extended resistance profiles than CA-MRSA. Among the HA-MRSA, the most prevalent resistance profile was CLI-ERY-AZM-CLR with a 29% of isolates. On the other hand, in CA-MRSA group the most prevalent antibiotic resistance profiles was ERY, AZM, CLR with a of 25% of isolates.

**Table 2:** Antibiotic resistance profiles among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in Chile.

Resistance profiles	HA-MRSA*	CA-MRSA*
CLI ERY AZM CLR CHL	2 (6.3)	0
CLI ERY AZM CLR	29 (90.6)	0
CLI ERY AZM CLR RIF	1 (3.1)	0
ERY AZM CLR	0	9 (25.0)
ERY AZM	0	1 (2.8)
All susceptible	0	26 (72.2)

\*No of isolates (percentage), **CLI:** clindamycin, **ERY:** erythromycin, **AZM:** azithromycin, **CLR:** clarithromycin, **CHL:** chloramphenicol, **RIF:** rifampicin; **HA-MRSA:** Hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; **CA-MRSA:** Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

**Table 3.** Minimum-inhibitory concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ) of some antimicrobials against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in Chile.

Antimicrobials	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
Linezolid	2	2
Vancomycin	1	1

**Daptomycin**

0.25

0.25

---

### 2.3. Prevalence of *msrA* and *erm* genes

The *ermA* gene was amplified in 28 (88%) of HA-MRSA isolates compared to 6 (17%) in CA-MRSA ( $p < 0.001$ ). Additionally, the *ermC* gene was found in 2 (6%) of HA-MRSA and in none of CA-MRSA isolates ( $p > 0.05$ ), and the *ermB* gene was detected in none of the isolates. On the other hand, *msrA* was detected in 11 (31%) of the CA-MRSA isolates but in none of the HA-MRSA ( $p < 0.005$ ).

**Table 4.** Antibiotic resistance, and presence of resistance genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in Chile.

	Percentage of resistant isolates to:						Percentage of resistance genes:			
	CLI	ERY	AZM	CLR	CHL	RIF	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>msrA</i>
HA-MRSA	97	97	97	97	6	3	88	0	0	0
CA-MRSA	0	28	28	25	0	0	17	0	6	31

**CLI:** clindamycin, **ERY:** erythromycin, **AZM:** azithromycin, **CLR:** clarithromycin, **CHL:** chloramphenicol, **RIF:** rifampicin; **HA-MRSA:** Hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; **CA-MRSA:** Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.



### 3. Discussion

In recent years we have observed an increased resistance to antibiotics, especially in those used for the treatment of serious infections associated with health care. MLS<sub>B</sub> group are antibiotics commonly used to treat skin and soft tissue infections caused by CA-MRSA<sup>221</sup>. The present study reports percentages of resistance to antibiotics in the MLS<sub>B</sub> group  $\geq 90\%$  in HA-MRSA. This finding agrees with the results of previous studies carried out with strains collected in Chile<sup>151,152</sup>. On the other hand, 20% of strains of CA-MRSA were resistant to MLS<sub>B</sub> group. These results show lower rates of resistance to these antibiotics in comparison to the official reports of the National Institute of Public Health of Chile (20% v/s 29%, respectively). On the other, our results showed higher values than previous reports that included strains isolated in Latin America, among both HA-MRSA (81% for ERY and 74% for CLI) and CA-MRSA<sup>151,154,155,157,158,228,229</sup>.

Among the isolates included in this work, the predominant phenotype was the cMLS<sub>B</sub> phenotype. Molecular characterization of 68 MLS<sub>B</sub>-resistant MRSA revealed that among HA-MRSA, 88% were positive for *ermA*. While, in the CA-MRSA strains, 17% were positive for *ermA*, 6% for *ermC*, and 31% for *msrA*. The main mechanism of resistance to macrolides in CA-MRSA is mediated by the presence of the *msrA* gene, which results agree with previously published data<sup>230</sup>.

Our results are in agreement with previous reports about the predominance of SCC*mec* type I-ST5 in HA-MRSA in Chile with classic resistance profiles of the Chilean/Cordobes clone that has a marked presence in hospitals of our country<sup>151,231</sup> and isolates of type IV-ST8 in CA-MRSA in Latin America, related to USA-300 clone<sup>151,152</sup>. On the other hand, the dichotomy regarding the presence of MLS<sub>B</sub> or MS<sub>B</sub> resistance among HA-MRSA

isolates highlights compared with CA-MRSA (97% vs approximately 25%, reaching statistical significance,  $p < 0.005$ ). However, it is important to emphasize that these findings, which are consistent with the classic concept that hospital isolates of MRSA are multi-resistant and the community-based multi-susceptible and only resistant to  $\beta$ -lactams, should be monitored, since 20% of the isolates of CA-MRSA were resistant to antibiotics in this group, that is, 1 over 5 isolates were not widely susceptible. Accordingly, it is important to perform the proper laboratory detection of these phenotypes to analyze these isolates, since if the criterion of resistance to methicillin and broad susceptibility is the method of choice, other families, including those of the  $MLS_B$  group, could obtain biased results.

All the strains analyzed are susceptible to VAN, LZD, DAP and SXT, keeping these antibiotics as an alternative treatment within the therapeutic arsenal available in Chile, which is consistent with previous reports <sup>151,164</sup>.

In summary, despite the higher frequency of the  $cMLS_B$  phenotype than  $iMLS_B$  in this study, we recommend performing the D test to identify clindamycin-induced resistance and guide therapeutic procedures in both HA-MRSA and CA-MRSA. Likewise, it is not recommended ruling out the submission of suspected CA-MRSA strains in surveillance programs based exclusively on the criterion of resistance only to  $\beta$ -lactams.

## **4. Materials and Methods**

### *4.1. MRSA isolates*

In this study were included thirty-two non-repetitive HA-MRSA isolates recovered from eight Chilean cities between 2007 and 2017 (Table 5) and thirty-six CA-MRSA isolates

collected in ten Chilean cities between 2012 and 2017 (Table 6). All isolates were selected from the biorepository maintained by the National Institute of Public Health of Chile (ISP, Santiago, Chile]. All isolates were cryo-preserved at -80°C in glycerol (50% v/v) and trypticase broth (2:1). The ISP criteria were used to define HA-MRSA and CA-MRSA <sup>155</sup>.

**Table 5.** Hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from different Chilean cities.

City	Number of isolates
Santiago	15
Rancagua	2
Talca	1
Concepción	2
Los Ángeles	1
Temuco	3
Osorno	1
Puerto Montt	7
<b>Total</b>	<b>32</b>

**Table 6.** Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from various Chilean cities.

City	Number of isolates
Valparaíso	1
Viña del Mar	1
Santiago	14
Rancagua	2

<b>Talca</b>	1
<b>Concepción</b>	5
<b>Osorno</b>	1
<b>Los Ángeles</b>	1
<b>Temuco</b>	3
<b>Puerto Montt</b>	7
<b>Total</b>	<b>36</b>

#### 4.2. Antimicrobial susceptibility testing

The cefoxitin test (FOX, 30 µg) for methicillin resistance detection, D-test, iMLS<sub>B</sub>, cMLS<sub>B</sub> and MS phenotypes detection and antibiotics susceptibility determination, were performed by disk diffusion method on Mueller-Hinton Agar following the CLSI recommendations and suggested breakpoints (2018) <sup>124,125,232</sup>. The antibiotics tested were erythromycin (ERY, 15 µg), clarithromycin (CLR, 15 µg), azithromycin (AZM, 15 µg), clindamycin (CLI, 2 µg), chloramphenicol (CHL, 30 µg), rifampicin (RIF, 5 µg), and trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT, 25 µg).

The minimal inhibitory concentrations (MICs) of linezolid (LZD), vancomycin (VAN), and daptomycin (DAP) were determined using the broth microdilution method, according to CLSI guidelines and recommended breakpoints <sup>124,125</sup>.

#### 4.3. Characterization of MRSA isolates

The presence of *mecA*, *pvl* in MRSA isolates, and the detection and characterization of the SCC*mec* element were performed by PCR-based protocols as previously described <sup>122,126,129</sup>. Sequence types (ST) were obtained according to Opazo-Capurro et al. 2019, using the Pasteur's scheme STs employing the bioinformatic tools available at the Center for Genomic Epidemiology (CGE) server (<http://www.genomicepidemiology.org/>). <sup>233</sup>.

#### 4.4. Molecular detection of antibiotic resistance genes

The detection of genes involved in the MLS<sub>B</sub> (*ermA*, *ermB* and *ermC*) and MS<sub>B</sub> (*msrA*) phenotypes were screened by conventional PCR according to protocols and primers previously described <sup>167</sup> (supplementary material 1).

#### 4.5. Statistical analyses

Pearson's Chi square test was used to determine associations between antibiotic resistance profiles, MLS<sub>B</sub> resistance genes and MRSA types (CA or HA-MRSA). This was achieved utilizing the IBM SPSS Statistics version 23.0 software (SPSS Inc, Chicago, IL), establishing statistical significance at  $p < 0.05$ <sup>234</sup>.

### 5. Conclusions

In Chile, in isolates of HA-MRSA, there is an evident predominance of ST5-SCC*mec* I, a Chilean/Cordobes clone, characteristically multiresistant, which includes resistance to antibiotics from the MLS<sub>B</sub> group; and susceptible to SXT and RIF. On the other hand, at the community level (CA-MRSA) there is an emergency of ST8-SCC*mec* IV, related to clone USA 300. Thus, microbiological surveillance of these isolates at the nosocomial level is required to verify whether the Chilean/Cordobes clone, will be replaced by this community clone in Chile, and to monitor whether the latter will continue to increase its resistance to non-beta-lactam antibiotics, such as those of the MLS<sub>B</sub> group.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: [www.mdpi.com/xxx/s1](http://www.mdpi.com/xxx/s1), Table S1: Primers used in this study.

<b>Gene target</b>	<b>Primer sequence (5'-3')</b>	<b>Product size (bp)</b>
<i>ermA</i>	F-TATCTTATCGTTGAGAAGGGAT	139
	R-CTACACTTGGCTTAGGATGAAA	
<i>ermB</i>	F- GAAAAGGTACTCAACCAAATA	163
	R- AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	
<i>ermC</i>	F-CTTGTTGATCACGATAATTTCC	190
	R-ATCTTTTAGCAAACCCGTATTC	
<i>msrA</i>	F-TCCAATCATAGCACAAAATC	163
	R-AATTCCCTCTATTTGGTGGT	
<i>pvl</i>	F-	433
	ATCATAGGTAAAATGTCTGACATGATCCA	
<i>mecA</i>	R-GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC	147
	F-GTGAAGATATAACCAAGTGATT	
SCC <i>mecI</i>	R-ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT	613
	F-GCTTTAAAGAGTGTCGTTACAGG	
SCC <i>mecII</i>	R-GTTCTCTCATAGTATGACGTCC	398
	F-CGTTGAAGATGATGAAGCG	
	R-CGAAATCAATGGTTAATGGACC	



SCC <i>meclI</i> , VIII	F-TAGCTTATGGTGCTTATGCG R-GTGCATGATTTTCATTTGTGGC	128
<i>Mercury</i> <i>elemnt of</i> SCC <i>meclIII</i>	F-CCATATTGTGTACGATGCG R-CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG	280
SCC <i>mec III</i> <i>and IIIA</i>	F-TTCTCATTGATGCTGAAGCC R-GTGTAATTTCTTTTGAAAGATATGG	257
SCC <i>mec</i> IVa	F-GCCTTATTCGAAGAAACCG R-CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG	776
SCC <i>mec</i> IVb, IVF	F-TCTGGAATTACTIONCAGCTGC R-AAACAATATTGCTCTCCCTC	493
SCC <i>mec</i> IVc, IVE	F-CCTGAATCTAAAGAGATACACCG R-GGTTATTTTCATAGTGAATCGC	200
SCC <i>mec</i> IVd	F-CTCAAATACGGACCCCAATACA R-TGCTCCAGTAATTGCTAAAG	881
SCC <i>mec</i> IVE, IVF	F-CAGATTCATCATTTCAAAGGC R-AACAACACTATTAGATAATTTCCG	175
SCC <i>mec V</i>	F-GAACATTGTTACTTAAATGAGCG R-TGAAAGTTGTACCCTTGACACC	325
SCC <i>mec</i> VI, VIII	F-ATCGCTCATTATGGATACYGC R5-CCATTTTTTGATAACCTGAACG R6- CTATTTTTTTATAGCCTGAACG	106

---

**Author Contributions:** Conceptualization: M.Q.-A.; A.A.-R.; S.M.-M.; A.O.-C.; H.B.-T.; G.G.R.; methodology; software: M.Q.-A.; A.A.-R.; C.C.; D.M.; P.S.; validation: formal analysis: M.Q.-A.; data curation, M.Q.-A.; A.A.-R.; A.O.-C.; writing—original draft preparation: M.Q.-A.; writing-review and editing: M.Q.-A.; A.A.-R.; A.O.-C ; S.M.-M; H.B.-T.; J.M.M.; J.C.H.; G.G.-R.; visualization: M.Q.-A., A.O.-C; G.G.-R.; supervision: G.G.-R.; project administration: A.A.-R.; G.G.-R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was supported by Universidad de Concepción, Grant VRID N° 218.085.040-1.0IN (A.A.-R.; G.G.-R.; H.B.-T.; S.M.-M.), the National Agency for Research and Development (ANID)/Scholarship Program/DOCTORADO NACIONAL/2017 21171278 (M.Q.-A.) and by FONDECYT 1171805, the National Fund for Scientific and Technological Development (FONDECYT) of Chile (J.M.M.).

**Acknowledgments:** We want to thank the microbiologists of the Chilean Hospitals and the National Institute of Public Health of Chile (ISP), who kindly provided the isolates for this study.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that there are no conflicts of interest.

## References

- [1] Foster TJ. The remarkably multifunctional fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016.
- [2] Carfora V, Giacinti G, Sagrafoli D, Marri N, Giangolini G, Alba P, et al. Methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in dairy sheep and in-contact humans: An intra-farm study. *Journal of Dairy Science* 2016;99:4251–8.
- [3] Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:629–41.
- [4] Malachowa N, Deleo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2010;67:3057–71..
- [5] Zou H, Li G. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy* 2010;10:81–4.
- [6] Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, et al. Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the *vanA* Resistance Gene. *New England Journal of Medicine* 2003;348:1342–7..
- [7] Archer NK, Mazaitis MJ, William Costerton J, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation and roles in human disease. *Virulence* 2011;2:445–59.
- [8] Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nature Reviews Microbiology* 2019;17:203–18.

- [9] Pereira JN da P, Rabelo MA, Lima JL da C, Neto AMB, Lopes AC de S, Maciel MAV. Phenotypic and molecular characterization of resistance to macrolides, lincosamides and type B streptogramin of clinical isolates of *Staphylococcus* spp. of a university hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2016;20:276–81.
- [10] 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2017;61.
- [11] Sarrou S, Malli E, Tsilipounidaki K, Florou Z, Medvecky M, Skoulakis A, et al. MLS B -Resistant *Staphylococcus aureus* in Central Greece: Rate of Resistance and Molecular Characterization. *Microbial Drug Resistance* 2019;25:543–50.
- [12] Steward CD, Raney PM, Morrell AK, Williams PP, McDougal LK, Jevitt L, et al. Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43:1716–21.
- [13] Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1995;39:577–85.
- [14] Miklasí M, Kostoulis X. Mechanisms of Resistance to Macrolide Antibiotics among *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics* 2021, Vol 10, Page 1406 2021;10:1406.
- [15] Reynolds E, Ross JI, Cove JH. Msr(A) and related macrolide/streptogramin resistance determinants: Incomplete transporters? *International Journal of Antimicrobial Agents* 2003;22:228–36.

- [16] Drinkovic D, Fuller ER, Shore KP, Holland DJ, Ellis-Pegler R. Clindamycin treatment of *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance [1]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2001;48:315–6.
- [17] Feßler AT, Wang Y, Wu C, Schwarz S. Mobile macrolide resistance genes in staphylococci. *Plasmid* 2018;99:2–10.
- [18] Otaíza F, Orsini M, Pohlenz M, Tarride T. Informe de Vigilancia de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud. 2017. <https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2015/09/informe-vigilancia-2017.pdf>
- [19] Instituto de Salud Pública de Chile. Vigilancia de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente adquirido en la comunidad. vol. 7. Santiago de Chile: 2017. [https://www.ispch.cl/sites/default/files/BoletinStahylococcusResistente-20062018A%20\(1\).pdf](https://www.ispch.cl/sites/default/files/BoletinStahylococcusResistente-20062018A%20(1).pdf)
- [20] Wayne PC and LSI. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. 13th ed. Pennsylvania: 2018.
- [21] Wayne PC and LSI. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. 11th ed. Pennsylvania: 2018.
- [22] Wayne PC and LSI. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100. 30th ed. Pennsylvania: 2020.

- [23] Zhang K, McClure JA, Conly JM. Enhanced multiplex PCR assay for typing of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecular and Cellular Probes* 2012;26:218–21.
- [24] Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, et al. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: Rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007;51:264–74.
- [25] Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter M-O, Gauduchon V, et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* 1999;29:1128–32.
- [26] Opazo-Capurro A, Higgins PG, Wille J, Seifert H, Cigarroa C, González-Muñoz P, et al. Genetic Features of Antarctic *Acinetobacter radioresistens* Strain A154 Harboring Multiple Antibiotic-Resistance Genes. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2019;9.
- [27] OS D, C L, EV N, CG T, T V, LS I. Detection of Aminoglycoside and Macrolide Resistance Mechanisms in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Revista Medico-Chirurgicala a Societatii de Medici Si Naturalisti Din Iasi* 2016;120:886–91.
- [28] Jara D, Bello-Toledo H, Domínguez M, Cigarroa C, Fernández P, Vergara L, et al. Antibiotic resistance in bacterial isolates from freshwater samples in Fildes Peninsula, King George Island, Antarctica. *Sci Rep* 2020;10:3145.
- [29] G M, AL E, C O, L O, H F, JL B, et al. Molecular epidemiology of hospital-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Southern Chile. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013;32:1533–40.

- [30] Pardo L, Machado V, Cuello D, Aguerrebere P, Seija V, Braga V, et al. Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes and their associated genotypes in *Staphylococcus aureus* isolates from a tertiary level public hospital of Uruguay. *Revista Argentina de Microbiología* 2020;52:202–10.
- [31] Reyes J, Hidalgo M, Díaz L, Rincón S, Moreno J, Vanegas N, et al. Characterization of macrolide resistance in Gram-positive cocci from Colombian hospitals: a countrywide surveillance. *International Journal of Infectious Diseases* 2007;11:329–36.
- [32] Reyes J, Rincón S, Díaz L, Panesso D, Contreras GA, Zurita J, et al. Dissemination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), USA300 Sequence Type 8 Lineage in Latin-America. *Clin Infect Dis* 2009;49:1861.
- [33] Egea AL, Gagetti P, Lamberghini R, Faccone D, Lucero C, Vindel A, et al. New patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones, community-associated MRSA genotypes behave like healthcare-associated MRSA genotypes within hospitals, Argentina. *International Journal of Medical Microbiology* 2014;304:1086–99.
- [34] Planet PJ, Diaz L, Kolokotronis SO, Narechania A, Reyes J, Xing G, et al. Parallel epidemics of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 infection in North and South America. *Journal of Infectious Diseases* 2015;212:1874–82.
- [35] Vega F, Alarcón P, Domínguez M, Bello H, Riedel G, Mella S, et al. Aislamiento de *Staphylococcus aureus* hetero-resistente a vancomicina en Hospital Clínico Regional de Concepción, Chile. *Revista Chilena de Infectología* 2015;32:588–90.

## ANEXO I

**Tabla 14:** Lecturas de los experimentos de microscopía confocal a biopelícula madura, utilizadas para la confección de los gráficos.

<b>Muestra</b>	<b>Volumen verde (um3)</b>	<b>Volumen rojo (um3)</b>	<b>Intensidad media verde</b>	<b>Intensidad media rojo</b>
BLANCO UCOSA-58	0	0	0	0
BLANCO UCOSA-77	0	71	1166	1501
SIN ATB ATCC 29213	475210	415	1738	1194
SIN ATB UCOSA-58	11844	1514	1979	1604
SIN ATB UCOSA-58	518921	369284	4048	1637
SIN ATB UCOSA-77	464783	442468	5843	3757
SIN ATB UCOSA-77	500058	437439	4060	2564
SIN ATB UCOSA-77	124461	90781	3577	1953
SIN ATB UCOSA-99	10	0	1185	0
BCHL ATCC 29213	56395	54646	1877	1945
BCHL ATCC 29213	219471	167325	2276	2071
BCHL ATCC 29213	23646	22238	1861	1859
BCHL UCOSA-58	852425	676600	2663	1616
BCHL UCOSA-58	701935	758012	3363	3419
BCHL UCOSA-77	874815	867257	3747	3471
BCHL UCOSA-77	393317	447703	2603	2656
BCHL UCOSA-77	323776	372534	2258	2325
BCHL UCOSA-99	462737	468990	2074	2182
BCHL UCOSA-99	475914	461169	2091	2039
BCHL UCOSA-99	228581	247654	1605	1665
DAP UCOSA-58	736923	908708	2788	4222
DAP UCOSA-58	338928	576286	1620	2240
DAP UCOSA-77	1157080	1295790	2224	2677
DAP UCOSA-77	501010	747351	2046	2889
DAP BCHL ATCC 29213	17153	59667	2043	3389
DAP BCHL ATCC 29213	42931	112728	2339	4153
DAP BCHL UCOSA-58	3651	4738	1547	1629
DAP BCHL UCOSA-58	13953	40270	2493	2701
DAP BCHL UCOSA-58	129566	200982	1889	1774
DAP BCHL UCOSA-58	13703	6386	2566	2504
DAP BCHL UCOSA-77	12382	3118	1808	1861
DAP BCHL UCOSA-77	845	168	1730	2247
DAP BCHL UCOSA-77	112	599	1303	2011
DAP BCHL UCOSA-99	1969	9615	2021	3052
DAP BCHL UCOSA-99	9879	22463	1961	2559
LZD ATCC 29213	20383	18687	2195	1907
LZD ATCC 29213	10395	7483	2075	2145



LZD ATCC 29213	14610	10785	2185	2012
LZD UCOSA-58	0	0	0	0
LZD UCOSA-77	305	352	1912	2237
LZD UCOSA-77	40764	18430	1249	1285
LZD UCOSA-77	0	1136	0	1700
LZD UCOSA-99	545	1609	2391	2849
LZD UCOSA-99	47301	53391	3832	2532
LZD UCOSA-99	18913	26543	1965	2157
LZD BCHL ATCC 29213	54004	301536	1948	3657
LZD BCHL ATCC 29213	28334	476859	6008	2077
LZD BCHL ATCC 29213	20529	123866	1840	2142
LZD BCHL UCOSA-57	646054	638615	2357	2801
LZD BCHL UCOSA-57	289609	517634	2271	7679
LZD BCHL UCOSA-57	200155	295874	2525	3708
LZD BCHL UCOSA-77	4436	211546	1121	2406
LZD BCHL UCOSA-77	1262	380795	1338	2825
LZD BCHL UCOSA-77	79928	708267	1295	3883
LZD BCHL UCOSA-99	325605	495731	1966	2849
LZD BCHL UCOSA-99	155812	274329	1737	2541
VAN ATCC 29213	214473	251776	1918	2211
VAN ATCC 29213	270398	397394	2200	3496
VAN ATCC 29213	295626	335470	1854	2118
VAN ATCC 29213	159373	202049	1771	2097
VAN ATCC 29213	214296	240724	1759	1791
VAN ATCC 29213	112696	431665	1658	4667
VAN UCOSA-58	659825	760053	1551	1964
VAN UCOSA-58	440893	645609	1359	1683
VAN UCOSA-58	621495	676089	2855	3459
VAN UCOSA-77	854919	860245	7682	9404
VAN UCOSA-77	862383	899219	4658	4610
VAN UCOSA-77	785132	918504	3212	7588
VAN UCOSA-99	381	189095	12857	1722
VAN UCOSA-99	84478	216518	1394	1916
VAN UCOSA-99	2942	8378	2076	1791
VAN UCOSA-99	347423	782434	1873	4935
VAN UCOSA-99	71647	230015	1783	3099
VAN UCOSA-99	5685	386796	1420	4151
VAN BCHL ATCC 29213	26995	366837	1313	2748
VAN BCHL ATCC 29213	32582	371646	1549	2582
VAN BCHL ATCC 29213	378383	575843	3804	15615
VAN BCHL UCOSA-58	48358	243463	2421	3054
VAN BCHL UCOSA-58	30580	188685	2235	3031
VAN BCHL UCOSA-77	1262	266311	1265	1403
VAN BCHL UCOSA-77	0	1182	1299	1478
VAN BCHL UCOSA-99	2367	32393	1215	1442

VAN BCHL UCOSA-99	208353	384726	2111	14492
VAN BCHL UCOSA-99	173655	479692	2000	8316