



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Magíster en Ciencias con Mención Microbiología

**Caracterización del *cassette* cromosómico
estafilocócico *SCC_{mec}* en aislados de *Staphylococcus
aureus* resistente a la meticilina con fenotipo
comunitario**

Tesis para optar al grado de
Magíster en Ciencias con Mención Microbiología

POR ALEJANDRO IGNACIO AGUAYO REYES
CONCEPCIÓN-CHILE
2020

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

Esta tesis ha sido realizada en el Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dr. Gerardo González Rocha
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

Dra. Helia Bello Toledo
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:



Dr. Andrés Opazo Capurro
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Sergio Mella Montecinos
Facultad de Medicina
Universidad de Concepción

Dr. José Manuel Munita
Facultad de Medicina
Clínica Alemana – Universidad del
Desarrollo

Director de Programa

Dr. Gerardo González Rocha
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

A Eldita, Amelia y Vicente, mis pilares

A Sergio Mella Montecinos, mi maestro

A mis profesores del LIAA, mis guías

A Mario, mi fiel amigo

Al Departamento de Medicina Interna, especialmente al Dr. Patricio Ortiz, por su apoyo incondicional

y por, sobre todo, a mi madre.

Esta tesis se realizó gracias al proyecto VRID-iniciación 218.085.040-1.0IN



TABLA DE CONTENIDOS

TABIA DE CONTENIDOS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
RESUMEN	IX
ABSTRACT	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Género <i>Staphylococcus</i>	1
1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	3
1.3 Elementos genéticos móviles en <i>S. aureus</i>	5
1.4 Resistencia bacteriana a antibióticos.....	9
1.5 Mecanismos de resistencia a antibióticos.....	11
1.6 <i>S. aureus</i> en la era antibiótica	14
1.7 Bases moleculares de la meticilino-resistencia.....	20
1.8 Regulación de la resistencia a meticilina	29
1.9 Movilización de SCCmec.....	32
1.10 Antibióticos de uso clínico con actividad antiestafilocócica	34
1.11 Métodos de genotipificación usados para cepas de <i>S. aureus</i>	37
1.12 <i>S. aureus</i> resistente a la meticilina hospitalarios y comunitarios en el mundo	39
1.13 <i>S. aureus</i> resistente a la meticilina en Chile	47
1.14 Genotipificación de <i>S. aureus</i> resistente a la meticilina en Chile.....	48
1.15 Hipótesis.....	51
1.16 Objetivo General.....	51
1.17 Objetivos Específicos	51
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
2.1 Cepas bacterianas	53
2.2 Identificación bacteriana	53
2.3 Estudio de susceptibilidad antimicrobiana	54
2.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	56

2.5	Detección de los genes <i>mecA</i> , lukS PV-lukF PV y del elemento genético SCC <i>mec</i>	57
2.6	Tipificación molecular de las cepas	61
3.	RESULTADOS	64
3.1	Características generales de las cepas estudiadas	64
3.2	Susceptibilidad de las cepas estudiadas	65
3.3	Determinación del nivel de resistencia a vancomicina, linezolid y daptomicina	67
3.4	Pesquisa del gen <i>mecA</i>	68
3.5	Pesquisa del gen <i>pvl</i>	68
3.6	Determinación del tipo de SCC <i>mec</i>	68
3.7	Determinación de la relación genética de las cepas.....	69
4.	DISCUSIÓN	71
4.1	Características generales de las cepas estudiadas	71
4.2	Perfil de susceptibilidad	72
4.3	Presencia del gen <i>mecA</i>	75
4.4	Presencia del gen <i>pvl</i>	77
4.5	Tipo de SCC <i>mec</i> y relación genética de las cepas.....	80
5.	CONCLUSIONES	92
6.	PROYECCIONES	93
7.	REFERENCIAS	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores de virulencia descritos en <i>Staphylococcus aureus</i>	3
Tabla 2. Determinantes de resistencia codificados en elementos genéticos móviles descritos en <i>S. aureus</i>	7
Tabla 3. Principales diferencias entre SARM-AH y SARM-AC	17
Tabla 5. Tabla 5. Cepas de SARM-AC del programa nacional de vigilancia del ISP incluidas en el estudio.	54
Tabla 6. Partidores utilizados en la caracterización molecular de SARM-AC... ..	59
Tabla 7. Características generales de las cepas estudiadas.....	64
Tabla 8. Estudio de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de SARM-AC del programa nacional de vigilancia del ISP.	66
Tabla 9. Estudio de la concentración mínima inhibitoria para vancomicina, linezolid y daptomicina en cepas de SARM-AC del programa nacional de vigilancia del ISP.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura básica de una isla genómica. Ver texto para mayor detalle. Modificado de Juhas et al., 2009. FEMS Microbiology Reviews; 33(2): 376–93. 9

Figura 2. Mecanismos generales de resistencia a antibióticos. Modificado de Allen et al., 2010. Nature Reviews Microbiology; 8(4): 251–259..... 12

Figura 3. Estructura química de penicilina, meticilina y cloxacilina. Meticilina y cloxacilina son moléculas más voluminosas a expensas del radical R1 y, por lo tanto, resistentes a la acción de la penicilinasas producidas por *Staphylococcus aureus*. Modificado de Aguayo et al., 2018. Rev Chilena Infectol 35(1): 7-14. 16

Figura 4. Mecanismos de resistencia a antibióticos en *S. aureus*..... 19

A: Esquema de resistencia a β -lactámicos; el residuo catalítico serina (elipse negra) del dominio transpeptidasa de PBP2 es más accesible y es inhibido por el β -lactámico. PBP2a se esquematiza con su sitio alostérico (estrella negra) y con su sitio activo menos accesible al antibiótico, manteniendo la transpeptidación; BlaZ corresponde a una serina β -lactamasa que confiere resistencia a penicilina, por su naturaleza lipoproteica se encuentra principalmente localizada en la cara externa de la membrana citoplasmática o también liberada al medio circundante. B: Esquema de resistencia a vancomicina y daptomicina: Las cepas heteroresistentes e intermedias a vancomicina poseen una pared más gruesa a expensas de una gran cantidad de dipéptidos D-alanina-D-alanina, que actúan como falsas dianas moleculares y reducen la difusión del glucopéptido; VRSA adquiere resistencia a vancomicina tras modificar el dipéptido terminal D-alanina-D-alanina (A) por D-alanina-D-lactato (L); La proteína MrpF agrega residuos de serina cargados positivamente al fosfatidilglicerol (FG), lo que genera repulsión del complejo calcio-daptomicina. En forma similar el incremento de las cargas positivas asociadas a la esterificación con D-alanina (triángulos) del ácido teicoico y lipoteicoico repele el antibiótico. Ácidos grasos libres pueden secuestrar el antimicrobiano antes de llegar a la membrana citoplasmática. TG: transglicosilación; TP: transpeptidación. Modificado de Foster, 2017. FEMS Microbiology Reviews; 41(3): 430-449..... 19

Figura 5. Principales mecanismos de resistencia a antibióticos que inhiben la síntesis proteica bacteriana en *S. aureus*. Modificado de Foster, 2017. FEMS Microbiology Reviews; 41(3): 430-449..... 20

Figura 6. Formación del complejo acil-enzima estable entre la serina nucleofílica del sitio activo de la PBP y el β -lactámico. Modificado de Aguayo et al., 2018. Rev Chilena Infectol 35(1): 7-14.....	22
Figura 7. Características estructurales de la PBP2a, destaca su sitio activo estrecho, con el residuo serina inaccesible, y su sitio de regulación alostérica. Modificado de Peacock & Paterson, 2015. Annual Review of Biochemistry; 84: 577–601	24
Figura 8. Estructura del <i>Staphylococcal Cassette Chromosome SCCmec</i> . Modificado de Henry F Chambers & Deleo, 2009. Nature Reviews. Microbiology; 7(9): 629–41.....	26
Figura 9. Represión del complejo de genes <i>mec</i> mediante homodímeros de Mecl. Modificado de Peacock & Paterson, 2015. Annual Review of Biochemistry; 84: 577–601	30
Figura 10. Regulación de la meticilino-resistencia. Modificado de Aguayo et al., 2018. Rev Chilena Infectol 35(1): 7-14.	32
Figura 11. Mecanismo de inserción/escisión de <i>SCCmec</i> . Modificado de Stojanov et al., 2015. BMC Research Notes; 8(1): 828.	34
Figura 12. Distribución clonal de SARM aislados en distintos hospitales Latinoamericanos, Modificado de Arias et al., 2017. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 61(10): 1–12.	46
Figura 13. Relación genética de las cepas de SARM-AC determinada por macrorestricción con Smal y electroforesis en gel de campo pulsado.....	69

RESUMEN

Staphylococcus aureus resistente a la meticilina adquirido en la comunidad (SARM-AC) ha sido descrito en Chile desde el año 2006 y a pesar de la creciente importancia, su genotipificación es aún poco entendida. Esta tesis corresponde a la primera iniciativa que busca caracterizar el *cassette* cromosómico estafilocócico SCC*mec* a un número significativo de cepas aisladas en Chile y busca contribuir en el conocimiento de la epidemiología molecular de este patógeno.

Se caracterizaron 50 cepas de SARM-AC pertenecientes al programa de vigilancia del Instituto de Salud Pública de Chile, para las cuales se determinó el perfil de susceptibilidad a eritromicina, clindamicina, sulfametoxazol-trimetoprim, y rifampicina; adicionalmente se determinó la concentración inhibitoria mínima a vancomicina, daptomicina y linezolid. Mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se determinó la presencia de los genes *mecA*, *pvl* y se identificó el *cassette* cromosómico estafilocócico SCC*mec* que portaban. Finalmente se analizó la relación genética entre las cepas mediante macrorestricción y electroforesis de campo pulsado.

Se documentó resistencia a eritromicina en 10 cepas (20%), de las cuales 1 cepa (2%) era además resistente a tetraciclina y otra presentaba susceptibilidad

intermedia a clindamicina; el resto de las cepas fueron susceptibles a todos los antibióticos ensayados. Se confirmó la presencia del gen *mecA* en todas las cepas y el gen *pvl* en 49 de ellas (98%). Todos los aislados portaban *SCCmec* tipo IV, siendo 34 del subtipo IVc (68%), 15 del subtipo IVa (30%) y 1 del subtipo IVb (2%). En cuanto a la tipificación molecular de las cepas, en 27 de ellas se conocía previamente el secuenciotipo (ST); el análisis de macrorestricción y electroforesis en gel de campo pulsado se logró realizar en 49 de los aislados y permitió la identificación de 4 grupos relacionados genéticamente entre sí: 1) ST8/*SCCmec* IVc/ACME-/PVL+ (22 cepas; 44%) 2) ST8/*SCCmec* IVa/ACME+/PVL+ (12 cepas; 24%) 3) ST30/*SCCmec* IVc/PVL+ (9 cepas; 18%) 4) ST5/*SCCmec* IVa/PVL+ (4 cepas; 8%). Adicionalmente se identificó una cepa (2% del total) perteneciente al ST923 que portaba *SCCmec* IVa y una cepa perteneciente al ST868/*SCCmec* IVb.

En conclusión, se confirmó el fenotipo comunitario clásico, sólo resistente a oxacilina, en la mayoría de los aislados estudiados, además de la presencia del gen *mecA* y el elemento genético *SCCmec* tipo IV en todas las cepas analizadas. En concordancia con lo descrito en la literatura se documentó una distribución en clústeres, relacionados genéticamente entre sí, y que son compatibles con el clon USA300 y presumiblemente su variante Latinoamericana, el clon Oceanía/Pacífico y el clon pediátrico, todos ya descritos en nuestro continente.

ABSTRACT

Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-SARM) has been described since 2006 in Chile, and despite its growing importance, its genotyping is still poorly understood. This thesis is the first initiative that characterizes the *Staphylococcal chromosomal cassette mec* (SCC*mec*) to a substantial number of strains isolated in Chile, contributing to the molecular understanding of the epidemiology of this pathogen.



Fifty strains of CA-SARM were characterized from the Chilean Public Health Institute surveillance program, to assess susceptibility to erythromycin, clindamycin, sulfamethoxazol-trimethoprim, and rifampicin. Additionally, the minimum inhibitory concentration of vancomycin, daptomycin and linezolid was determined. In parallel, the presence of the *mecA*, *pvl* genes was determined by polymerase chain reaction (PCR) and the SCC*mec* staphylococcal chromosomal cassette carried was identified. Finally, macrorestriction and pulsed field electrophoresis was used to assess the genetic relationship between strains.

Erythromycin resistance was documented in 20% of the strains, while 2% was also resistant to tetracycline and 1 strain showed intermediate susceptibility to clindamycin. The remaining strains were susceptible to all antibiotics tested. The *mecA* and *pvl* genes were present in 100 and 98% of strains respectively. The *SCCmec* type IV was carried in all isolates, while subtypes IVc, IVa and IVb was detected in 68, 30 and 2% of the strains respectively.

More than 50% of the strains presented previously known sequenciotype (ST). The analysis of macrorestriction and electrophoresis in pulsed field gel was conducted in 49 of the isolates and 4 genetically related groups were identified; i) ST8 / *SCCmec* IVc / ACME- / PVL + (44%), ii) ST8 / *SCCmec* IVa / ACME + / PVL + (24%), iii) ST30 / *SCCmec* IVc / PVL + (18%) and iv) ST5 / *SCCmec* IVa / PVL + (8%). Additionally, a strain that carried *SCCmec* IVa (ST923) and other *SCCmec* IVb (ST868) were identified.

In conclusion, was confirmed the classical community phenotype only resistant to oxacillin. In addition, all strains carried the *mecA* gene and the *SCCmec* type IV genetic element. Four genetically related clusters were documented, all compatible with the USA300 clone and

presumably its Latin American variant; the Oceania / Pacific clone and the pediatric clone, all already described in our continent.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Género *Staphylococcus*

En este género se incluyen bacterias Gram positivas, inmóviles, de forma esférica, no formadoras de esporas, con un diámetro entre 0,5 y 1,5 μm y que característicamente se observan en grupos a la observación por microscopía (Murray, 2013). Es precisamente la palabra griega “*staphylé*” el origen de su denominación, la cual fue introducida a fines del siglo XIX basándose en su similitud con un racimo de una uva (Ogston, 1883). Poseen una cápsula incompleta o no la poseen y se caracterizan por ser anaerobios facultativos (Yok-Ai & Moreillon, 2016). A diferencia del género *Streptococcus* poseen la enzima catalasa, la que cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Över, Tüç, & Söyletir, 2000).

El género *Staphylococcus* alberga a numerosas especies que clásicamente se han agrupado y diferenciado según la producción de la enzima coagulasa, capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina, característica que es detectable fácilmente en el laboratorio y permiten una clasificación práctica (Madigan, Martinko, Stahl, & Clark, 2012). Es así como se ha descrito la producción de

esta enzima (*Staphylococcus* coagulasa positiva) en las especies *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. saprophyticus* y *S. schleiferi*, siendo las últimas tres especies más relevantes en medicina veterinaria. Por otro lado, el grupo de especies de *Staphylococcus* coagulasa negativo es mucho más numeroso y en general menos virulento, existiendo algunas excepciones tales como *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. lugdunensis* (Yok-Ai & Moreillon, 2016).

Las especies del género *Staphylococcus* son capaces de colonizar una gran cantidad de mamíferos y aves, y los seres humanos no son la excepción (Grice et al., 2009). Es así como *S. epidermidis* forma parte de la microbiota cutánea y dada su menor virulencia habitualmente cobra relevancia como patógeno oportunista en medicina humana en pacientes inmunodeprimidos y en presencia de material protésico, ésto último gracias a su extraordinaria capacidad de adhesión y de síntesis de biopelículas (von Eiff, Peters, & Heilmann, 2002). Por otro lado, *S. aureus* destaca como una especie virulenta y capaz de producir una amplia gama de enfermedades infecciosas en el ser humano y otros animales. En otro aspecto, se estima que aproximadamente un tercio de la población humana es portadora nasal de *S. aureus*, lo que puede variar de acuerdo a la edad y ubicación geográfica (den Heijer et al., 2013; Tsang et al., 2018).

1.2 *Staphylococcus aureus*

Esta es la especie de *Staphylococcus*, coagulasa positiva, más importante en medicina humana y por lo tanto la más estudiada. Es capaz de expresar una gran diversidad de factores de virulencia (tabla 1), lo que le ha permitido ser el agente etiológico en una amplia variedad de cuadros clínicos en el ser humano, tales como infecciones de piel y partes blandas, neumonías, endocarditis, infecciones del torrente sanguíneo, osteomielitis, intoxicaciones alimentarias, entre otros (Lowy, 1998). Su capacidad para evadir la fagocitosis, adherirse a tejidos del hospedero y la síntesis de toxinas y enzimas hidrolíticas le permiten generar una gran diversidad de infecciones no sólo en humanos, sino también en otros mamíferos (Lozano, Gharsa, Ben Slama, Zarazaga, & Torres, n.d.).

Tabla 1. Factores de virulencia descritos en *Staphylococcus aureus*.

Célula diana, factor del hospedero o respuesta	Gen(es)	Proteína o molécula	Función putativa o efecto en el sistema inmune
Factores que interfieren con la muerte bacteriana			
Péptidos antimicrobianos	<i>aur</i>	Metaloproteinasa aureolisina	Degrada LL-37
	Operón <i>dlt</i>	DltABCD	Resistencia a péptidos antimicrobianos catiónicos y fosfolipasa A ₂ grupo IIA
	<i>icaA, icaD, icaB, icaC, icaR</i>	Polisacárido de adhesión intercelular	Resistencia a péptidos antimicrobianos catiónicos
	<i>isdA, isdB</i>	IsdA, IsdB	Resistencia a péptidos antimicrobianos, ácidos grasos cutáneos y especies reactivas del oxígeno de neutrófilos
	<i>mprF</i>	MprF	Promueve resistencia a péptidos antimicrobianos catiónicos

	<i>sak</i>	Estafilocinasa	Inhibe α -defensina
Muerte bacteriana mediada por oxígeno	<i>ahpC, ahpF</i>	Alquil hidroperóxido reductasa	Promueve resistencia a especies reactivas del oxígeno
	<i>crtM, crtN</i>	Pigmento carotenoide estafiloxantina	Promueve resistencia a especies reactivas del oxígeno
	<i>isdA, isdB</i>	IsdA, IsdB	Promueve resistencia a especies reactivas del oxígeno
	<i>sodA, sodM</i>	Superóxido dismutasa, SodA, SodM	Promueve resistencia a especies reactivas del oxígeno
Hemolisinas y factores antiplaquetas			
Eritrocitos	<i>hla, hly</i>	α - hemolisina	Lisis celular (también de células epiteliales, fibroblastos y monocitos)
	<i>hld</i>	Delta-hemolisina	Lisis celular
	<i>hlgA, hlgB, hlgC</i>	Gamma-hemolisina	Lisis celular
Plaquetas	<i>clfA</i>	Factor de agregación, ClfA	Activación plaquetaria
	<i>fnbA, fnbB</i>	Proteínas de unión a fibronectina, FnbA y FnbB	Activación plaquetaria
	<i>katA</i>	Catalasa, KatA	Dismutación del H ₂ O ₂
	<i>sodA, sodM</i>	Superóxido dismutasa, SodA, SodM	Promueve resistencia a especies reactivas del oxígeno

Leucocidinas y factores anti-fagocíticos			
Leucocitos polimorfonucleares	<i>cap5 o cap8</i>	Polisacárido capsular	Inhibe fagocitosis
	<i>clfA</i>	Factor de agregación, ClfA	Inhibe fagocitosis
	<i>eap</i>	Proteína de adherencia extracelular, Eap	Inhibe la adhesión leucocitaria
	<i>hlgA, hlgB, hlgC</i>	Gamma-hemolisina	Lisis celular
	<i>lukD, lukE</i>	LukD y LukE (leucocidina de dos componentes)	Lisis leucocitaria
	<i>lukS-PV, lukF-PV</i>	S-PV y F-PV, PVL (leucocidina de dos componentes)	Lisis del fagocito
	<i>psm</i>	Modulinas solubles en fenol, PSMs	Lisis leucocitaria
	<i>sbi</i>	Proteína de unión a IgG, Sbi	Secuestro IgG del hospedero
	<i>scn</i>	Inhibidor del complemento estafilocócico, SCIN	Inhibe complemento
	<i>ssl5</i>	Superantígeno estafilocócico tipo 5, SSL5	Se une a PSGL-1 e inhibe el rodamiento del neutrófilo
Quimiotaxis	<i>chp</i>	Proteína inhibitoria de	Inhibe quimiotaxis

		la quimiotaxis de <i>S. aureus</i> , CHIPS	
	<i>ecb</i>	Proteína extracelular de unión al complemento, Ecb	Inhibe generación de C5a
	<i>efb</i>	Proteína extracelular de unión al fibrinógeno, Efb	Inhibe generación de C5a
	<i>sbi</i>	Proteína de unión a IgG, Sbi	Secuestro IgG del hospedero
	<i>scn</i>	Inhibidor del complemento estafilocócico, SCIN	Inhibe complemento
	<i>ssl7</i>	Superantígeno estafilocócico tipo 7, SSL7	Une C5a e IgA
Superantígenos			
Células-T	<i>sea, sea, sec, sed, see, seg, seh, sei, sej, sek, sel, sep</i>	Enterotoxinas estafilocócicas	Activa células-T (superantígeno)
	<i>tst</i>	Toxina-1 del síndrome del shock tóxico	Activa células-T (superantígeno)

Fuente: Modificado de Chambers & Deleo, 2009. Nature Reviews. Microbiology; 7(9): 629–41

1.3 Elementos genéticos móviles en *S. aureus*

Los elementos genéticos móviles (EGM) corresponden a fragmentos de ADN que pueden codificar una gran diversidad de factores de virulencia y determinantes de resistencia a antibióticos, como también las enzimas que participan en su movilización e integración (Frost, Leplae, Summers, & Toussaint, 2005). En este grupo se encuentran las secuencias de inserción (IS), transposones, bacteriófagos, plásmidos e islas genómicas. La transferencia de EGM entre células puede ocurrir, lo que se denomina transferencia horizontal de genes (THG) y se ha descrito entre células procariontes, eucariontes y

también procarionte-eucarionte. Todos los EGM dentro de una célula, en este caso bacteriana, han recibido la denominación de mobiloma (del Inglés *mobilome*) y pueden ser transferidos a través de conjugación, transformación o transducción (Siefert, 2009). Es importante hacer notar que el fenómeno de transferencia vertical, es decir, a la progenie bacteriana, también contribuye a la diseminación de los EGM en la naturaleza (Malachowa & Deleo, 2010).

El genoma básico o *core* de una bacteria contiene genes imprescindibles para la supervivencia bacteriana, como los encargados de la replicación y transcripción del ADN, así como del metabolismo. No obstante, en el denominado genoma accesorio se encuentran una gran diversidad de genes, muchos codificados en EGM, que no son indispensables para el procarionte (e.g. factores de virulencia o determinantes de resistencia a antibióticos o metales pesados), pero que le han permitido adaptarse mejor a sus nichos ecológicos y que han guiado su historia evolutiva (Malachowa & Deleo, 2010). En la tabla 2 se describen algunos determinantes de resistencia codificados en EGM descritos en *S. aureus*.

Las islas genómicas corresponden a un amplio y diverso grupo de EGM con una gran diversidad de tamaños y abundancia en distintos genomas bacterianos (Dobrindt, Hochhut, Hentschel, & Hacker, 2004). Las primeras en describirse fueron las islas de patogenicidad bacteriana que portaban genes de virulencia, pero con el tiempo se describieron algunas que portaban genes que

otorgaban ventajas adaptativas de otro tipo, tales como islas de simbiosis, islas metabólicas e islas de resistencia a metales pesados o antibióticos (Juhas et al., 2009). La mayoría de las islas genómicas comparten algunas características estructurales (Juhas et al., 2009), las que se esquematizan en la figura 1: (1) su tamaño molecular habitualmente oscila entre 10 y 200 kb; (2) poseen un contenido G + C usualmente diferente al resto del cromosoma, lo que traduce su origen evolutivo distinto; (3) generalmente se insertan en genes que codifican para ARNt; (4) se encuentran flanqueadas por repeticiones directas de entre 16-20 pb, las que son reconocidas por las enzimas que participan en su escisión; (5) habitualmente poseen genes funcionales o crípticos que codifican para integrasas o factores que participan en la movilización horizontal de la isla; (6) usualmente portan IS o transposones en su estructura; (7) es usual que porten genes que confieren una ventaja adaptativa a la bacteria que la posee.

Tabla 2. Determinantes de resistencia codificados en elementos genéticos móviles descritos en *S. aureus*.

EGM	Gen resistencia	Antibiótico/metal pesado	Mecanismo de acción
Plásmido	<i>aadD</i>	neomicina, kanamicina, paromomicina y tobramicina	Aminoglucósido adeniltransferasa
	<i>ant4'</i>	Tobramicina	Aminoglucósido nucleotidiltransferasa
	<i>arsRBC</i>	arseniato, antimonioato	Bomba expulsión
	<i>blaZ, blaI, blaR1</i>	penicilina	β -lactamasa
	<i>ble</i>	bleomicina	Proteína de unión a bleomicina
	<i>cadA, B</i>	cadmio y probable a zinc	Bomba expulsión

	<i>cadD, X</i>	cadmio	Expulsión
	<i>cat</i>	cloranfenicol	Cloranfenicol acetiltransferasa
	<i>cfr</i>	cloranfenicol, florfenicol y clindamicina	Metilación 23S
	<i>dfrA, dfrK</i>	trimetoprim	Dihidrofolato reductasa
	<i>ermB, C</i>	resistencia MLS _B	Metilación 23S
	<i>fusB</i>	ácido fusídico	Protección ribosomal
	<i>ileS-2</i>	mupirocina	Isoleucil-ARN sintetasa
	Operón <i>mer</i>	mercurio	Reducción a Hg elemental
	<i>mphBM</i>	macrólidos	Fosforilasa
	<i>msrA</i>	macrólidos	Expulsión
	<i>mupA</i>	mupirocina	nueva isoleucil ARN sintetiza
	<i>qacA,B y smr (qacC/D)</i>	compuestos amonio cuaternario, biocidas	Expulsión
	<i>str</i>	estreptomycina	Estreptomycina adeniltransferasa
	<i>tetK, tetL</i>	tetraciclinas	Expulsión
	<i>vat</i>	estreptograminas grupo A	Acetilación del antibiótico
	<i>vga</i>	estreptograminas grupo A, lincosaminas y pleuromutilinas	Eflujo
	<i>vgb</i>	estreptograminas grupo B	Inactivación por virginiamicina B liasa
Transposón	<i>aacA-aphD</i>	gentamicina, kanamicina, tobramicina	Modificación del antibiótico por acetiltransferasa y fosfotransferasa
	<i>blaZ, blaI, blaR1</i>	penicilina	β-lactamasa
	<i>cadB, cadC</i>	cadmio	Expulsión
	<i>ermA, B</i>	resistencia MLS _B	Metilación 23S
	<i>fexA</i>	florfenicol, cloranfenicol	Expulsión
	<i>merA, B</i>	mercurio inorgánico y orgánico	Transporte iónico
	<i>sat4</i>	estreptotricina	Estreptotricina acetiltransferasa
	<i>spc(ant9)</i>	espectinomicina	Espectinomicina adeniltransferasa
	<i>tetM</i>	tetraciclina, minociclina	Protección ribosomal

	<i>vanRSHXYZ</i>	vancomicina	Modificación sitio blanco
SCC₄₇₆	<i>far1</i>	ácido Fusídico	
SCC_{Hg}	<i>Operón mer</i>	mercurio	Transporte iónico

Fuente: Modificado de Malachowa & Deleo, 2010. Cellular and Molecular Life Sciences; 67(18): 3057–3071.

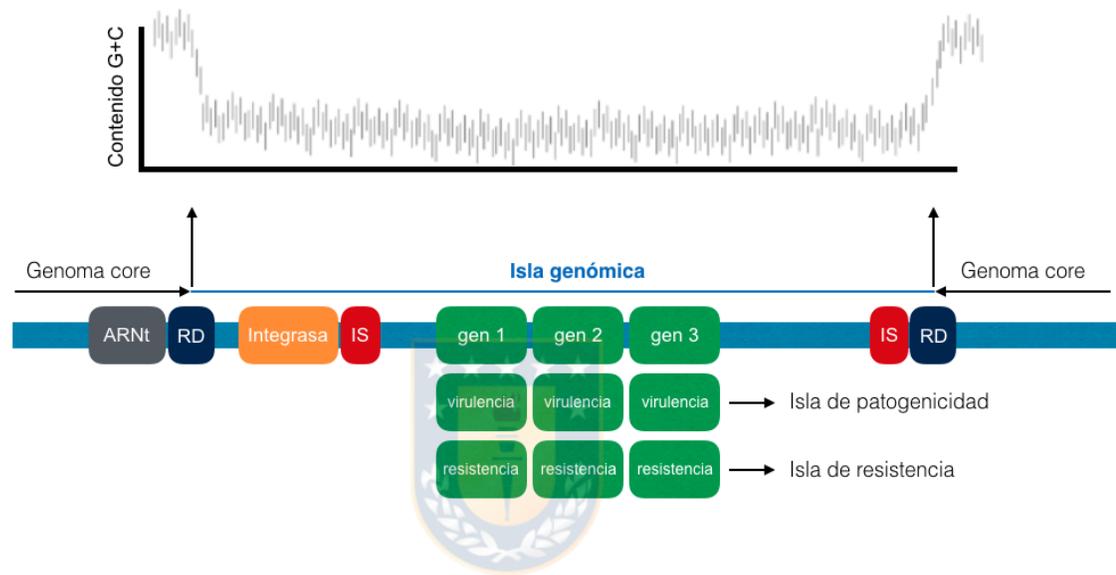


Figura 1. Estructura básica de una isla genómica. Ver texto para mayor detalle. Modificado de Juhas et al., 2009. FEMS Microbiology Reviews; 33(2): 376–93.

1.4 Resistencia bacteriana a antibióticos

La resistencia bacteriana a antibióticos es un fenómeno natural y se encuentra ampliamente diseminado en todo el mundo, pero se concentra en ambientes con mayor densidad de uso de antibióticos, como los hospitales y dentro de éstos las unidades de paciente crítico (Zilahi, Artigas, & Martin-Loeches, 2016).

Con el uso de terapias antimicrobianas se logra la muerte de los microorganismos susceptibles, pero las bacterias resistentes pasan a ser la población predominante, eso es precisamente la presión selectiva ejercida por los antibióticos (Kolár, Urbánek, & Látal, 2001).

Existen dos tipos de resistencia, siendo la primera la insusceptibilidad natural o resistencia intrínseca e incluye a microorganismos que carecen de sitio blanco o que por naturaleza expresan algún mecanismo de resistencia específico (Olivares et al., 2013). Algunos ejemplos son *Stenotrophomonas maltophilia* que expresan metalo- β -lactamasas que hidrolizan carbapenémicos (Sánchez, 2015), *Enterococcus* spp. que son intrínsecamente resistentes a cefalosporinas por baja afinidad del antibiótico al sitio blanco (Cercenado, 2011), o por último *Mycoplasma pneumoniae* que no posee peptidoglicán (PG), y por lo tanto su crecimiento no se ve inhibido por la presencia de β -lactámicos (Parrott, Kinjo, & Fujita, 2016). La otra categoría corresponde a la resistencia adquirida e incluye microorganismos que eran previamente susceptibles y se tornan resistentes por mutación o por fenómenos de transferencia horizontal de genes de resistencia (Cag, Caskurlu, Fan, Cao, & Vahaboglu, 2016). En esta categoría se pueden incluir microorganismos con trascendencia clínica como bacilos Gram negativos productores de β -lactamasas de espectro extendido o carbapenemasas del tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*), *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina y *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) (Boucher et al., 2009).

El fenómeno de la resistencia a antibióticos ha alcanzado límites insospechados y se asocia a una elevada carga de morbimortalidad, sin mencionar además los elevados costos para los sistemas de salud (Cosgrove, 2006). Las tasas de resistencia van categóricamente al alza y los esfuerzos para encontrar soluciones en este tema necesariamente deben incluir a todos los participantes: clínicos, microbiólogos, la población general, empresas privadas, los estados y organizaciones.

La Organización Mundial de la Salud publicó en febrero de 2017 su primera lista de “patógenos prioritarios” resistentes a los antibióticos (WHO, 2017), en donde prioriza a los microorganismos según la distinta necesidad de encontrar nuevas moléculas con actividad frente a éstos. Precisamente en el grupo de prioridad elevada se encuentra *S. aureus* resistente a las penicilinas antiestafilocócicas.

1.5 Mecanismos de resistencia a antibióticos

Existen 4 grandes mecanismos bioquímicos de resistencia a antibióticos (Allen et al., 2010) (figura 2), de los cuales el más relevante en bacterias Gram positivas se relaciona con modificaciones en el sitio blanco. Es así como *E. faecium* cambia el dipéptido terminal D-alanina-D-alanina del PG por D-alanina-D-lactato, modificando su afinidad por los glucopéptidos (Cercenado, 2011).

Como se señalará más adelante, SARM es capaz de expresar una nueva PBP que posee menos afinidad por los β -lactámicos (Lim & Strynadka, 2002).

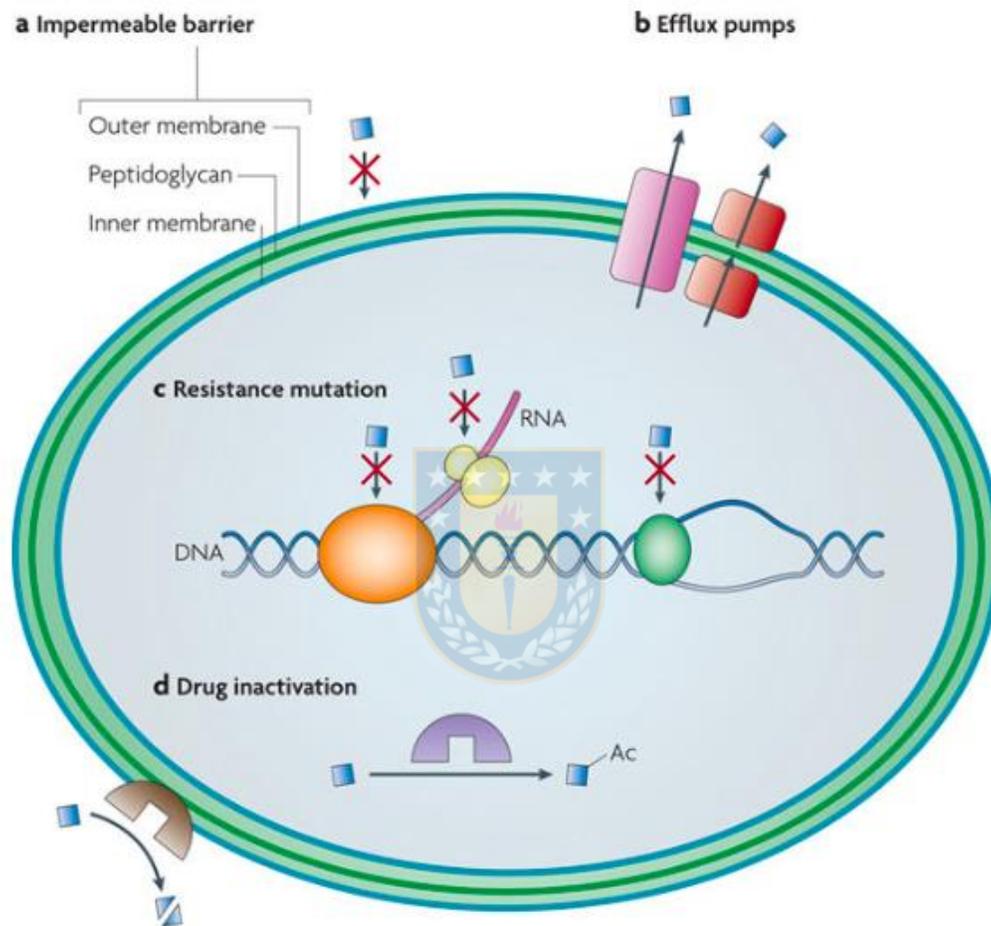


Figura 2. Mecanismos generales de resistencia a antibióticos. Modificado de Allen et al., 2010. *Nature Reviews Microbiology*, 8(4): 251–259.

Otro mecanismo relevante, sobre todo en bacilos Gram negativos, son las enzimas hidrolíticas y las modificantes de antibióticos. El clásico ejemplo de las primeras son las β -lactamasas, de las cuales existen penicilinasas, cefalosporinasas y carbapenemasas, capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico

y con esto inactivar el antibiótico (Frère, Sauvage, & Kerff, 2016). Por otro lado, el arquetipo de las enzimas modificantes son las de aminoglucósidos-

aminociclitoles que agregan grupos químicos al agente antibacteriano y con esto afectan la afinidad de éste por su sitio blanco (Mella et al., 2004).

El mecanismo de impermeabilidad es exclusivo de bacterias Gram negativas y tiene relación con modificaciones en la estructura de las porinas, que son canales proteicos embebidos en la membrana externa que permiten el paso de muchos antibióticos de naturaleza hidrofílica hacia el espacio periplásmico (Delcour, 2009). El último mecanismo de resistencia es el mediado por bombas de expulsión, que tal como lo dice su denominación disminuyen la concentración del antibiótico capaz de unirse a su sitio blanco en el interior de la bacteria, expulsándolo hacia el medio extracelular. Un buen ejemplo es *Acinetobacter baumannii*, capaz de exportar activamente una gran cantidad de antibióticos, a través de sus bombas de expulsión multidrogas (Opazo C, Mella M, Domínguez Y, Bello T, & González R, 2009).

Estos cuatro mecanismos no se encuentran funcionando aislados, al contrario, frecuentemente se asocian y logran resistencias clínicamente más significativas. Es ya clásico el ejemplo de *P. aeruginosa* que combina

mecanismos de impermeabilidad con bombas de expulsión para lograr resistencia a una variedad de carbapenémicos (Cag et al., 2016).

1.6 *S. aureus* en la era antibiótica

Previo a la introducción de la penicilina como arsenal terapéutico las bacteriemias estafilocócicas conferían una elevada mortalidad en humanos, en torno al 80% según distintas series (Kanafani & Fowler, 2006). Lo anterior disminuyó categóricamente en la era antibiótica tras la masificación del uso de los antimicrobianos. No obstante, la presión selectiva generada con el uso, muchas veces indiscriminado, de estos agentes fue gradualmente seleccionando cepas resistentes, como se mencionará a continuación (Lowy, 2003).

Desde la introducción de la bencilpenicilina, y por lo tanto, tras el inicio de la era antibiótica en la década de 1940 se fueron seleccionando gradualmente cepas resistentes a antibióticos con actividad antiestafilocócica (Henry F Chambers & Deleo, 2009). Ya en 1944 se describía un potente inactivador de la penicilina, aislado desde *S. aureus* (Kirby, 1944), que resultó ser una β -lactamasa codificada en un plásmido. Inicialmente este tipo de resistencia estuvo limitada

a los hospitales, no obstante en la década de 1950 ya había evidencia de diseminación global (Henry F Chambers & Deleo, 2009).

En este escenario aparece en 1959 la meticilina, la primera penicilina semisintética, resistente a la penicilinas estafilocócica. Característicamente posee un mayor tamaño molecular que su predecesora, a expensas del grupo dimetoxibenzoil añadido al ácido 6-aminopenicilánico (como radical R1), tal como se muestra en la figura 3. Lo anterior le confiere, por impedimento estérico, resistencia a la acción hidrolítica de la β -lactamasa (Foye, Lemke, Williams, Roche, & Zito, 2008). No obstante, en el año 1960 se describen en Inglaterra los primeros aislados resistentes a meticilina a través de un mecanismo independiente de la hidrólisis enzimática y que confiere resistencia a todos los β -lactámicos (Barber, 1961). Con los años se pudo dilucidar que el gen responsable, *mecA*, codifica para una nueva transpeptidasa denominada PBP2a o PBP2' que característicamente posee baja afinidad por penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos (H F Chambers, 1997).

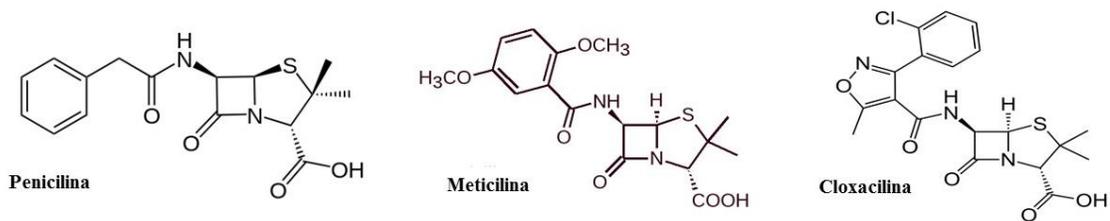


Figura 3. Estructura química de penicilina, meticilina y cloxacilina. Meticilina y cloxacilina son moléculas más voluminosas a expensas del radical R1 y, por lo tanto, resistentes a la acción de la penicilinasa producida por *Staphylococcus aureus*. Modificado de Aguayo et al., 2018. Rev Chilena Infectol 35(1): 7-14.

Esta nueva ventaja evolutiva le permitió a SARM diseminarse por todo el mundo (Ayliffe, 1997), en un principio eminentemente a nivel hospitalario (SARM-AH) y en pacientes con factores de riesgo tales como estadía en cuidados intensivos, cirugía, diálisis o en portadores de dispositivos médicos (Bal et al., 2016), siendo todas estas prácticas asociadas a la atención en salud.

Además su perfil molecular es característico, destacando la presencia del SCCmec I, II o III (Deresinski, 2005), tal como se analizará más adelante.

Aproximadamente 30 años después de la descripción del primer SARM-AH, es decir, a principios de la década de 1990, comienza la descripción de los primeros casos genuinos de infección por SARM de adquisición comunitaria (SARM-AC). Lo anterior se documentó en población aborigen de Australia occidental (Udo, Pearman, & Grubb, 1993), los que no tenían contacto estrecho con centros médicos y vivían en zonas relativamente aisladas. Posteriormente

el *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) de EE.UU comunica la muerte de 4 niños sanos a causa de sepsis o neumonía necrosante por SARM-AC ocurridas en el periodo 1997-99 (Centers for Disease Control and Prevention, 1999). Esto marcó el inicio de la diseminación y descripción del SARM-AC a nivel global (DeLeo, Otto, Kreiswirth, & Chambers, 2010a).

A diferencia de su contraparte hospitalaria, el SARM-AC ha sido asociado al elemento genético móvil SCC*mec* IV o V (Ma et al., 2002) y a la presencia de los genes que codifican para la leucocidina de Pantón-Valentine (PVL) (Ellis, Hospenthal, Dooley, Gray, & Murray, 2004), una citotoxina de dos componentes. Por otro lado es más susceptible a los antibióticos que SARM-AH, siendo habitualmente sólo resistente a β -lactámicos (David & Daum, 2010). Desde el punto de vista clínico se ha caracterizado por infectar diversas poblaciones diferentes a las afectadas por el SARM-AH, tales como la pediátrica, población indígena, reclusos en cárceles, personal militar, hombres que tienen sexo con hombres, entre otros (David & Daum, 2010). En la tabla 3 se resumen las principales diferencias entre SARM-AH y SARM-AC.

Tabla 3. Principales diferencias entre SARM-AH y SARM-AC

SARM-AH		SARM-AC	
Factores de Riesgo			
Hospitalizados	Cirugías y otros procedimientos invasores	Población pediátrica y otros grupos de riesgo	Neonatos
	Pacientes en diálisis		Atletas
	Unidades de		Personal Militar

	paciente crítico		
	Portadores de dispositivos		Reclusos
			Hombre que tienen sexo con hombres
			Población indígena
Tipo de SCCmec			
I - II - III		IV - V	
Leucocidina de Pantón-Valentine			
+ -		+++	
Fenotipo			
Multirresistente (β -lactámicos – Lincosamidas – Macrólidos)		Sólo resistente a β -lactámicos	

Fuente: Elaboración propia

Los siguientes hitos en relación a la resistencia de *S. aureus* son menos relevantes en nuestro país y corresponden a la descripción de *S. aureus* heterorresistente a vancomicina, ya informado el año 2015 (Félix Vega et al., 2015), pero además de otras variedades ausentes en Chile, como *S. aureus* resistente a vancomicina (VRSA, por sus siglas en inglés) (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2002) y los con susceptibilidad disminuida o resistentes a otras familias antibióticas con importancia clínica, como las oxazolidinonas, cefalosporinas de 5^a generación y daptomicina (Molina & Huang, 2016) . En la figura 4 y 5 se resumen los principales mecanismos de resistencia de *S. aureus* a diversas familias de antibióticos.

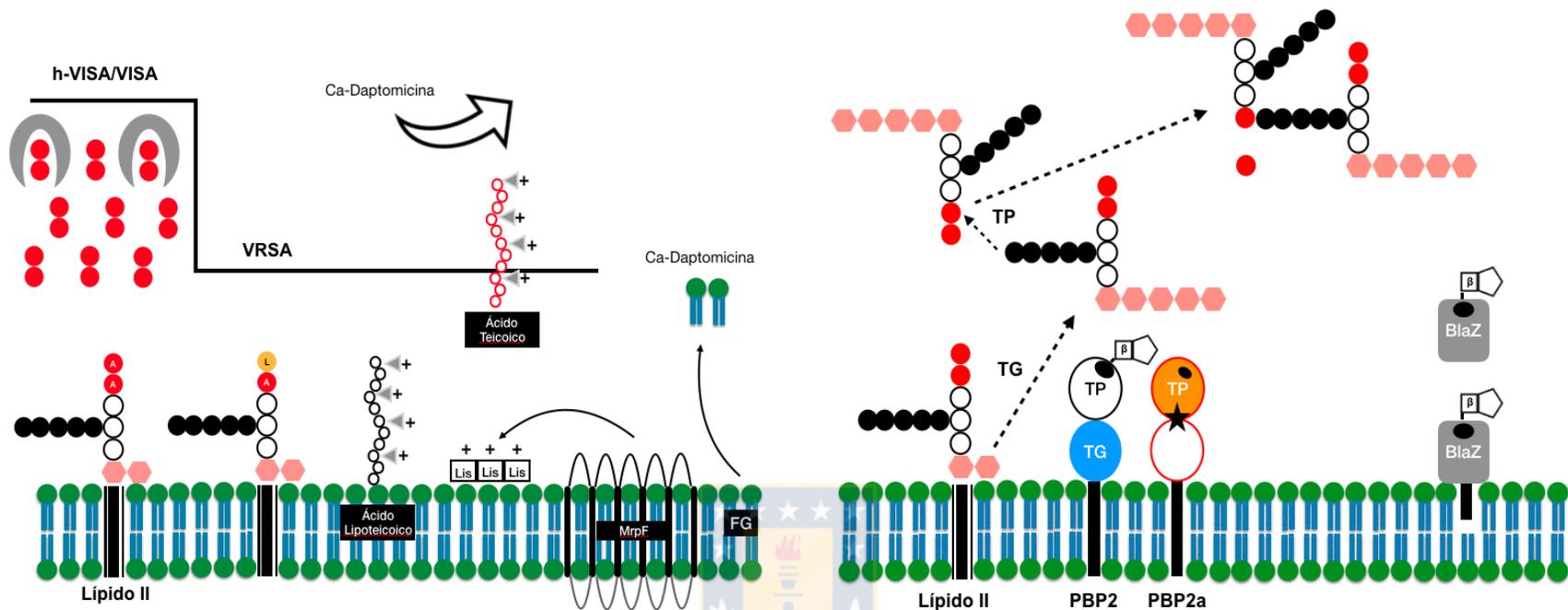


Figura 4. Mecanismos de resistencia a antibióticos en *S. aureus*.

A: Esquema de resistencia a β -lactámicos; el residuo catalítico serina (elipse negra) del dominio transpeptidasa de PBP2 es más accesible y es inhibido por el β -lactámico. PBP2a se esquematiza con su sitio alostérico (estrella negra) y con su sitio activo menos accesible al antibiótico, manteniendo la transpeptidación; BlaZ corresponde a una serina β -lactamasa que confiere resistencia a penicilina, por su naturaleza lipoproteica se encuentra principalmente localizada en la cara externa de la membrana citoplasmática o también liberada al medio circundante. B: Esquema de resistencia a vancomicina y daptomicina: Las cepas heterorresistentes e intermedias a vancomicina poseen una pared más gruesa a expensas de una gran cantidad de dipéptidos D-alanina-D-alanina, que actúan como falsas dianas moleculares y reducen la difusión del glucopéptido; VRSA adquiere resistencia a vancomicina tras modificar el dipéptido terminal D-alanina-D-alanina (A) por D-alanina-D-lactato (L); La proteína MrpF agrega residuos de serina cargados positivamente al fosfatidilglicerol (FG), lo que genera repulsión del complejo calcio-daptomicina. En forma similar el incremento de las cargas positivas asociadas a la esterificación con D-alanina (triángulos) del ácido teicoico y lipoteicoico repele el antibiótico. Ácidos grasos libres pueden secuestrar el antimicrobiano antes de llegar a la membrana citoplasmática. TG: transglicosilación; TP: transpeptidación. Modificado de Foster, 2017. FEMS Microbiology Reviews; 41(3): 430-449.

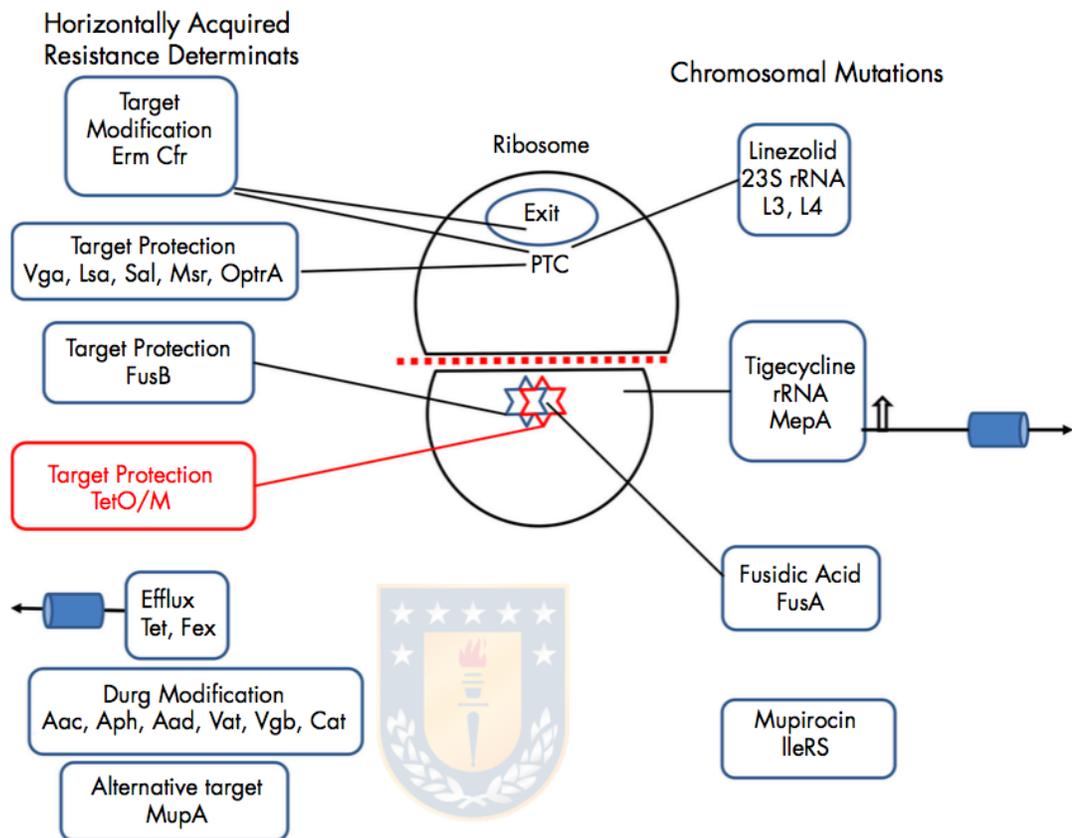


Figura 5. Principales mecanismos de resistencia a antibióticos que inhiben la síntesis proteica bacteriana en *S. aureus*. Modificado de Foster, 2017. FEMS Microbiology Reviews; 41(3): 430-449.

1.7 Bases moleculares de la meticilino-resistencia

PBP (del inglés *penicillin-binding protein*) es como se conoce universalmente a las proteínas blanco de acción de los β -lactámicos y corresponden a enzimas principalmente con función transpeptidasa, que participan en el entrecruzamiento de las hebras de PG, específicamente entre las cadenas

laterales de naturaleza aminoacídica que están unidas al ácido N-acetilmurámico (Giesbrecht, Kersten, Maidhof, & Wecke, 1998), logrando con esto resistencia frente a la lisis osmótica (figura 4A). Es precisamente la etapa extracelular de la biosíntesis de PG la que se interrumpe por el antibiótico β -lactámico, debido a su homología estructural con el sustrato natural de las PBPs, el dipéptido terminal D-alanina-D-alanina (Tipper & Strominger, 1965). En otras palabras, la PBP (transpeptidasa) forma un complejo acil-enzima con el β -lactámico y no con su sustrato natural D-ala-D-ala, intermediario que por lo demás es sumamente estable, lo que determina en la práctica una inhibición irreversible. La estabilidad del complejo acil-enzima entre la PBP y el antibiótico se debe a que el anillo β -lactámico ocupa el sitio activo de la enzima e impide que se acomode en este una molécula aceptora del grupo acilo o una potencial molécula de agua que permita la hidrólisis del complejo (Peacock & Paterson, 2015) (figura 6).

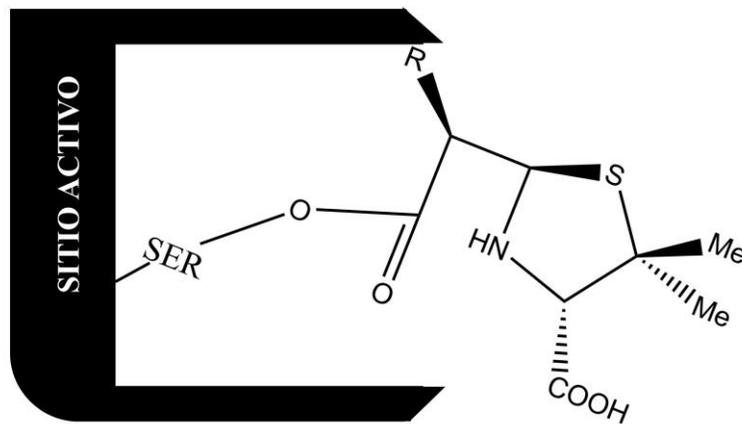


Figura 6. Formación del complejo acil-enzima estable entre la serina nucleofílica del sitio activo de la PBP y el β -lactámico. Modificado de Aguayo et al., 2018. Rev Chilena Infectol 35(1): 7-14.

Todas las cepas de *S. aureus* poseen 4 tipos de PBPs: PBP1, PBP2, PBP3 y PBP4; las primeras tres tienen función transpeptidasa y corresponden a PBPs de alto peso molecular, siendo PBP2 la única bifuncional, es decir, además posee función transglicosilasa. PBP4 es la única de bajo peso molecular y participa en procesos de división, remodelado y reciclado de PG. Ninguna de estas PBPs nativas tiene regulación alostérica (Acebrón, Chang, Mobashery, & Hermoso, 2015).

El mecanismo más importante y frecuente que determina la meticilino-resistencia es la adquisición de una nueva PBP, denominada PBP2a o PBP2'

descrita en la década de 1980 por dos grupos de investigación en forma paralela (Hartman & Tomasz, 1984; Utsui & Yokota, 1985), de la cual resaltan dos propiedades distintivas. La primera es la baja afinidad que tiene esta nueva transpeptidasa por el β -lactámico, lo que está determinado por la configuración de su sitio activo, que es menos accesible al antibiótico al tener la hendidura más estrecha (Lim & Strynadka, 2002) (figura 7). Lo anterior determina que con las concentraciones que alcanza el β -lactámico *in vivo* no se forma el intermediario acil-enzima entre el antibiótico y la PBP2a, por lo que la función de transpeptidación de la enzima no se ve inhibida y mantiene el entrecruzamiento de hebras del PG (Peacock & Paterson, 2015). La segunda característica distintiva de la PBP2a, es su sitio de regulación alostérica al que podría unirse el PG en formación, lo que favorecería la apertura del sitio activo para dejar mejor posicionada la serina nucleofílica que participa en la formación del enlace peptídico. Lo anterior tiene bastante lógica, ya que el sitio activo de la PBP sería más accesible sólo en presencia de PG naciente que debe ser transpeptidado (Acebrón et al., 2015).

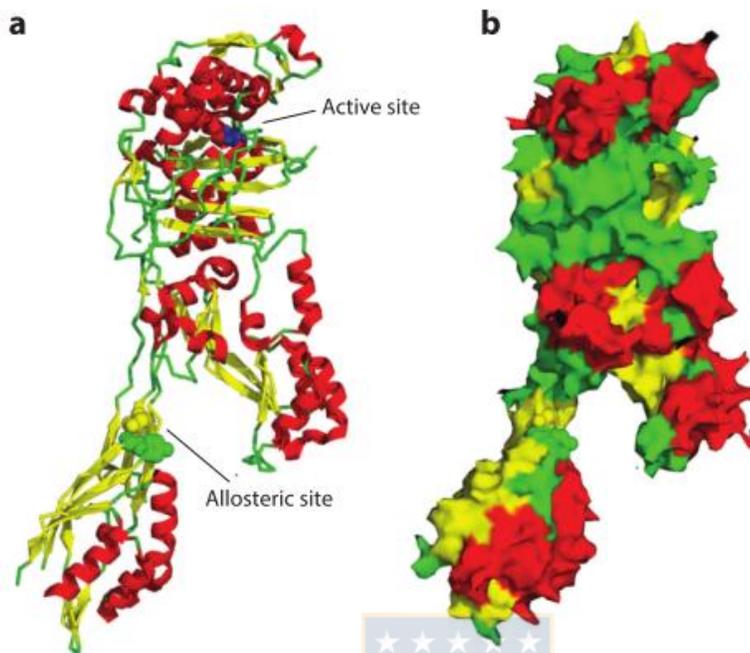


Figura 7. Características estructurales de la PBP2a, destaca su sitio activo estrecho, con el residuo serina inaccesible, y su sitio de regulación alostérica. Modificado de Peacock & Paterson, 2015. Annual Review of Biochemistry; 84: 577–601

En resumen, si una cepa de SARM es expuesto a meticilina, el antibiótico es capaz de inhibir *in vivo* las PBPs nativas del microorganismo, incluyendo la PBP2, pero no logra inhibir la PBP2a, la cual tiene una función transpeptidasa y mantiene el entrecruzamiento del PG en presencia de cualquier β -lactámico (figura 4A), exceptuando las cefalosporinas de 5^a generación (Rodvold & Mcconeghy, 2014).

SARM (hospitalario y comunitario) posee el gen *mecA*, que es el responsable de la resistencia a meticilina, ya que es el que codifica la PBP2a. A su vez este gen se encuentra inserto en una isla genómica, denominada SCC*mec*, del

inglés *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*, un elemento genético móvil (Aires De Sousa & De Lencastre, 2004). Se ha propuesto que el gen podría haber residido inicialmente en especies de *Staphylococcus* coagulasa negativa, como *S. sciuri* o *S. fleuretti* (ambos relacionados con animales) y desde éstos haberse transferido a *S. aureus* (Couto et al., 1996).

Existen varios tipos y subtipos del SCC*mec*, pero todos comparten algunas características (Liu et al., 2016) (figura 8). Estos se integran en el cromosoma en el gen *orfX* (renombrado en algunas publicaciones como *rlmH*), el que codifica para una metiltransferasa ribosomal y todos poseen un complejo de genes *mec*, integrado por *mecA* (que codifica la PBP2a), pero además por los genes *mecI* y *mecR* cuyos productos regulan la expresión de la meticilino-resistencia. Adicionalmente, tienen el complejo de genes *ccr*, compuesto por uno o dos genes que codifican recombinasas sitio específicas y que son las responsables de la movilidad del *cassette* cromosomal. Otra región importante son las denominadas regiones J (del inglés *joining regions*), que corresponden a componentes no esenciales del *cassette* y que pueden tener genes de resistencia para otras familias de antibióticos, como macrólidos, lincosamidas, aminoglucósidos-aminociclitolos y para metales pesados. Finalmente, forman parte de esta estructura genética las secuencias repetidas en los extremos, que son reconocidas por las recombinasas para la inserción/escisión del elemento

genético móvil.

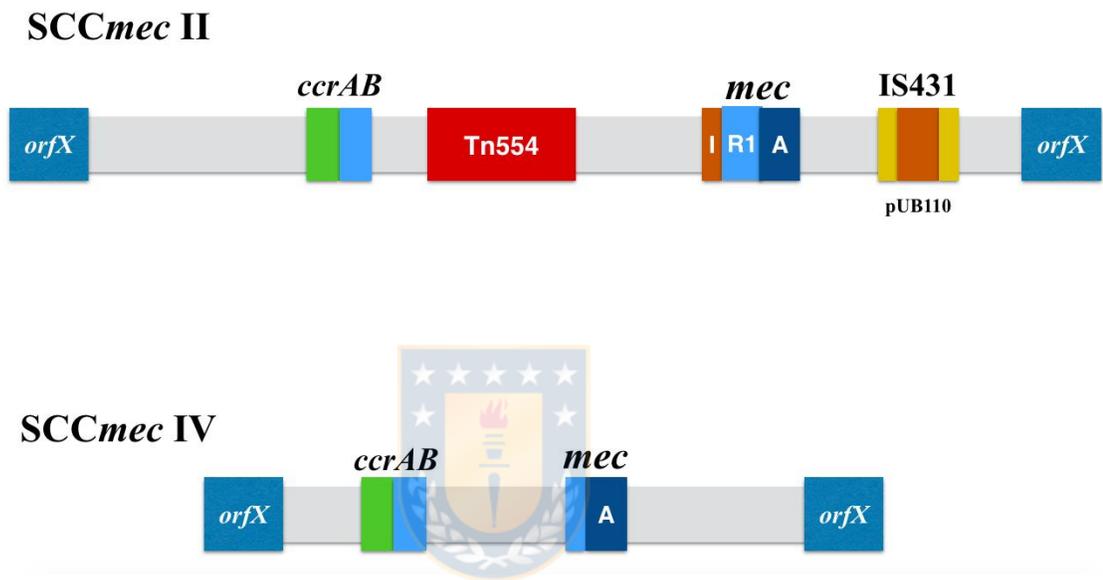


Figura 8. Estructura del *Staphylococcal Cassette Chromosome* SCC*mec*. Modificado de Henry F Chambers & Deleo, 2009. Nature Reviews. Microbiology; 7(9): 629–41

Las distintas estructuras genéticas del complejo de genes *mec* y del complejo de genes *ccr* determinan el tipo de SCC*mec* y, por otro lado, las diferencias en las regiones J determinan los subtipos dentro de un mismo tipo de *cassette* cromosómico (“*International Working Group on the Staphylococcal Cassettes Chromosome elements.*,” 2019). De esta manera SCC*mec* I y IV poseen el complejo de genes *mec* clase B, el que posee la siguiente estructura genética: *IS1272-ΔmecR1-mecA-IS431*. La diferencia entre ambos es en el complejo de

genes *ccr*, siendo del tipo 1 para SCC*mec* I y tipo 2 para el SCC*mec* IV, lo que se basa en la distinta identidad de las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican las recombinasas. A la fecha se han descrito 13 tipos de *cassettes* cromosomales estafilocócicos *mec* (denominados de I a XIII) y a su vez cada tipo puede tener muchos subtipos, los que quedan resumidos en la tabla 4.

Tabla 4. Diferentes tipos de SCC*mec* descritos a la fecha.

SCC <i>mec</i>	Complejo de genes <i>mec</i>	Estructura del complejo de genes <i>mec</i>	Complejo de genes <i>ccr</i>	Genes <i>ccr</i>
I	Clase B	<i>IS1272-ΔmecR1-mecA-IS431</i>	Tipo 1	<i>ccrA1, ccrB₁</i>
II	Clase A	<i>mecl-mecR1-mecA-IS431</i>	Tipo 2	<i>ccrA2, ccrB₂</i>
III	Clase A	<i>mecl-mecR1-mecA-IS431</i>	Tipo 3	<i>ccrA3, ccrB₃</i>
IV	Clase B	<i>IS1272-ΔmecR1-mecA-IS431</i>	Tipo 2	<i>ccrA2, ccrB₂</i>
V	Clase C2	<i>IS431- mecA-ΔmecR1-IS431</i>	Tipo 5	<i>ccrC1</i>
VI	Clase B	<i>IS1272-ΔmecR1-mecA-IS431</i>	Tipo 4	<i>ccrA4, ccrB₄</i>
VII	Clase C1	<i>IS431- mecA-ΔmecR1-IS431</i>	Tipo 5	<i>ccrC1</i>
VIII	Clase A	<i>mecl-mecR1-mecA-IS431</i>	Tipo 4	<i>ccrA4, ccrB₄</i>
IX	Clase C2	<i>IS431- mecA-ΔmecR1-IS431</i>	Tipo 1	<i>ccrA1, ccrB₁</i>
X	Clase C1	<i>IS431- mecA-ΔmecR1-IS431</i>	Tipo 7	<i>ccrA1, ccrB₆</i>
XI	Clase E	<i>blaZ-mecC-mecR1-mecl</i>	Tipo 8	<i>ccrA1, ccrB₃</i>
XII	Clase C2	<i>IS431- mecA-ΔmecR1-IS431</i>	Tipo 9	<i>ccrC2</i>
XIII	Clase A	<i>mecl-mecR1-mecA-IS431</i>	Tipo 9	<i>ccrC2</i>

Fuente: Modificada de Lakhundi & Zhang, 2018. *Clinical Microbiology Reviews*; 31(4): 1–103.

Es interesante analizar las diferencias en las estructuras genéticas de un *cassette* cromosomal estafilocócico clásicamente hospitalario versus uno comunitario (figura 8). El primero cuenta con determinantes adicionales de resistencia a otras familias de antibacterianos, configurando un clásico fenotipo de multirresistencia. Es así como el SCC*mec* II es un *cassette* de mayor tamaño y posee en la región J2 el transposón Tn554, responsable de la resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas del grupo B, además de tener el plásmido integrado pUB110 en la región J3 que determina resistencia a tobramicina (Henry F Chambers & Deleo, 2009). Por otro lado, SCC*mec* IV (clásicamente comunitario) es una estructura más simple y que sólo porta el gen de resistencia *mecA*, por lo que habitualmente sólo codifica resistencia a β -lactámicos (David & Daum, 2010). Es importante mencionar en este punto que la división entre SARM hospitalarios y comunitarios está poco a poco perdiendo validez, al menos en países con alta prevalencia de ambos patógenos. Lo anterior se debe a la creciente descripción de cepas de SARM comunitarias en los hospitales, desplazando a otros clones nosocomiales menos exitosos (Kale & Dhawan, 2016).

1.8 Regulación de la resistencia a meticilina

Esta regulación es homóloga a la descrita para la penicilinasa estafilocócica y se basa eminentemente en un receptor de membrana (sensor del β -lactámico) y un represor de la expresión del gen (Lowy, 2003). El prototipo de SARM posee el complejo de genes *mec*, que incluye a *mecA* y sus genes reguladores: *mecR* y *mecI*, y en este ítem estos últimos cobran relevancia. Tanto *mecA* como sus genes reguladores se encuentran adyacentes, pero se transcriben en forma divergente (Peacock & Paterson, 2015).



En ausencia del β -lactámico, Mecl actúa como homodímero y reconoce una secuencia palindrómica de 30 pb (15 pb en díada simétrica), abarcando las secuencias promotoras -10 de *mecA* y -35 de *mecR1*, lo que interfiere con la unión de la ARN polimerasa y, por lo tanto, con la expresión de la meticilino-resistencia (Peacock & Paterson, 2015) (figura 9).

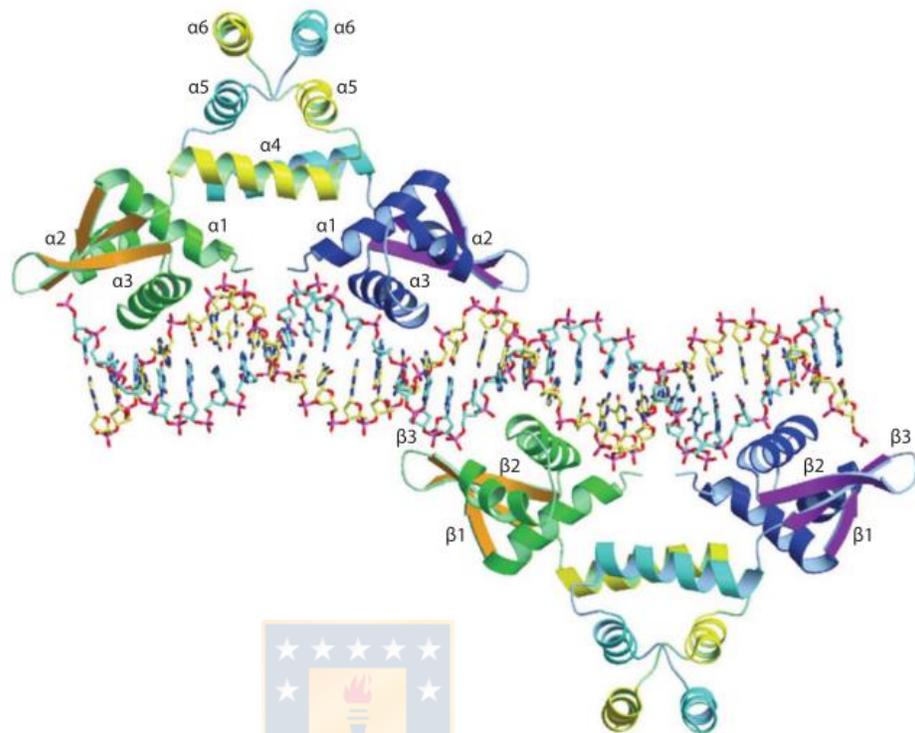


Figura 9. Represión del complejo de genes *mec* mediante homodímeros de MecI. Modificado de Peacock & Paterson, 2015. Annual Review of Biochemistry; 84: 577–601

En presencia del β -lactámico, éste se une al dominio PBP de la proteína de membrana MecR1, lo que desencadena la activación autolítica de su dominio metaloproteínasa. Luego, no se sabe si en forma directa o indirecta, MecR1 rompe el homodímero MecI entre sus residuos asparagina 101 y fenilalanina 102, lo que desestabiliza la dimerización de esta proteína represora y libera la represión del complejo de genes *mec*, favoreciendo por lo tanto la expresión de *mecA* y de la transpeptidasa PBP2a, determinante de la resistencia a meticilina (Arêde & Oliveira, 2013). La desrepresión de los genes regulatorios favorece también la síntesis de la proteína MecR2, con función antirrepresora, ya que es

capaz de unirse a Mecl e impedir que se una al promotor de *mecA*, además de favorecer su degradación por proteasas citoplasmáticas (Arêde, Milheiriço, de Lencastre, Oliveira, & Coll, 2012). En la Figura 10 se resumen los aspectos más relevantes de la regulación de la meticilino-resistencia en *S. aureus*.

Cabe destacar que existen ciertas estructuras del complejo de genes *mec* que no portan de manera intacta los genes regulatorios (clase B, Clase C1, Clase C2), viéndose estos truncados por secuencias de inserción (tabla 4). En este escenario, para la represión/inducción de la meticilino-resistencia, se genera una regulación cruzada con el sistema regulatorio homólogo *bla* (Ford, 2017). De esta forma la expresión de la PBP2a puede variar cepa a cepa dependiendo de la presencia y funcionalidad de los reguladores Mec y Bla (Foster, 2017). Por último, es importante hacer notar que la mayoría de los SARM expresan la meticilino-resistencia de forma heterogénea, es decir, la mayoría de las células de un inóculo lo expresan a un bajo nivel y sólo una minoría (0,01-0,1%) expresan alto nivel de resistencia (Peacock & Paterson, 2015).

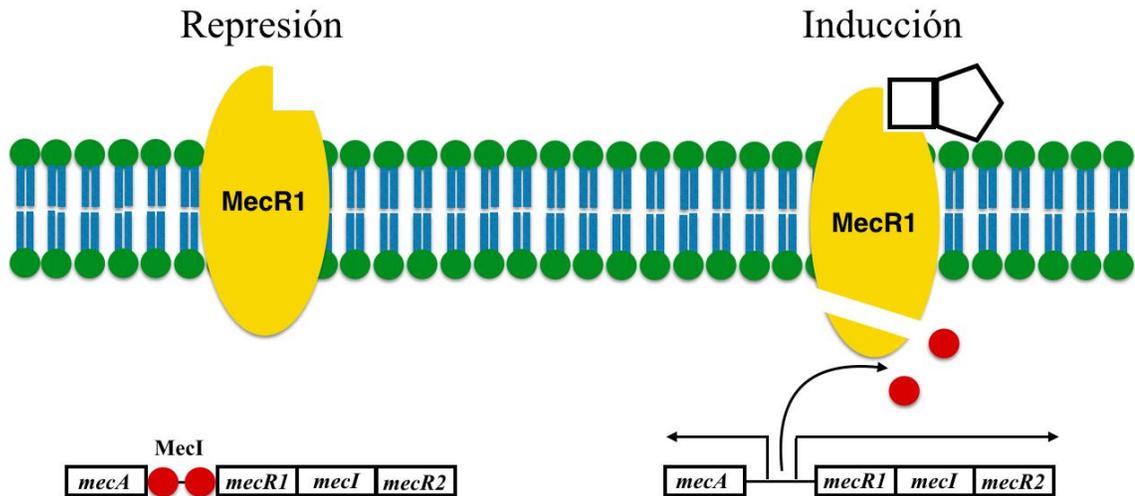


Figura 10. Regulación de la meticilino-resistencia. Modificado de Aguayo et al., 2018. Rev Chilena Infectol 35(1): 7-14.

Existen genes no codificados en el *cassette* cromosomal, es decir, que están localizados en otros lugares del cromosoma bacteriano, pero de igual forma influyen en la meticilino-resistencia. A estos genes se les llamó inicialmente *fem* (del inglés *factors essential for methicillin resistance*) y están asociados a la síntesis del PG (Berger-Bächi & Rohrer, 2002).

1.9 Movilización de SCCmec

A pesar de los más de 50 años que han transcurrido desde la descripción de la meticilino-resistencia y más de 35 años desde la descripción de la PBP2a, aún no hay respuestas absolutas en relación al mecanismo de transferencia de

SCC*mec* y de todos los factores que lo determinan. Es más, el modelo general de inserción/escisión mediado por enzimas del tipo recombinasas, es la principal evidencia a favor de la movilidad de la isla genómica. Sumado a esto, el que se hayan descrito SCC*mec* idénticos en diferentes especies del género *Staphylococcus* y, por otro lado, diferentes SCC*mec* en cepas relacionadas genéticamente soportan la idea de la transferencia horizontal (Shore & Coleman, 2013). Además la amplia descripción de SCC*mec* en especies de *Staphylococcus* coagulasa negativa apoya la idea de que son precisamente estas especies el reservorio de la meticilino-resistencia, y desde estos, se han transferido a *S. aureus* (Wisplinghoff et al., 2003).



SCC*mec* se inserta en el extremo 3' del antiguamente denominado gen *orfX* (ahora *rlmH*), gracias a las serino-recombinasas sitio específicas codificadas en el mismo *cassette* cromosómico. Específicamente la recombinación se realiza entre el sitio *attB* del cromosoma y su secuencia homóloga *attS* del SCC*mec* (en su forma circularizada). Como consecuencia de la integración en el cromosoma se generan dos repeticiones directas, *attL* y *attR*, las que quedan flanqueando el *cassette* (Stojanov, Moreillon, & Sakwinska, 2015). El mecanismo de escisión es la vía inversa y participan las mismas enzimas, en este caso recombinando los sitios *attL* y *attR*, y tras ésto se generan los sitios

attB (en el cromosoma) y *attS* (en el *cassette* circularizado)(Misiura et al., n.d.).

El modelo general de integración/escisión se resume en la figura 11.

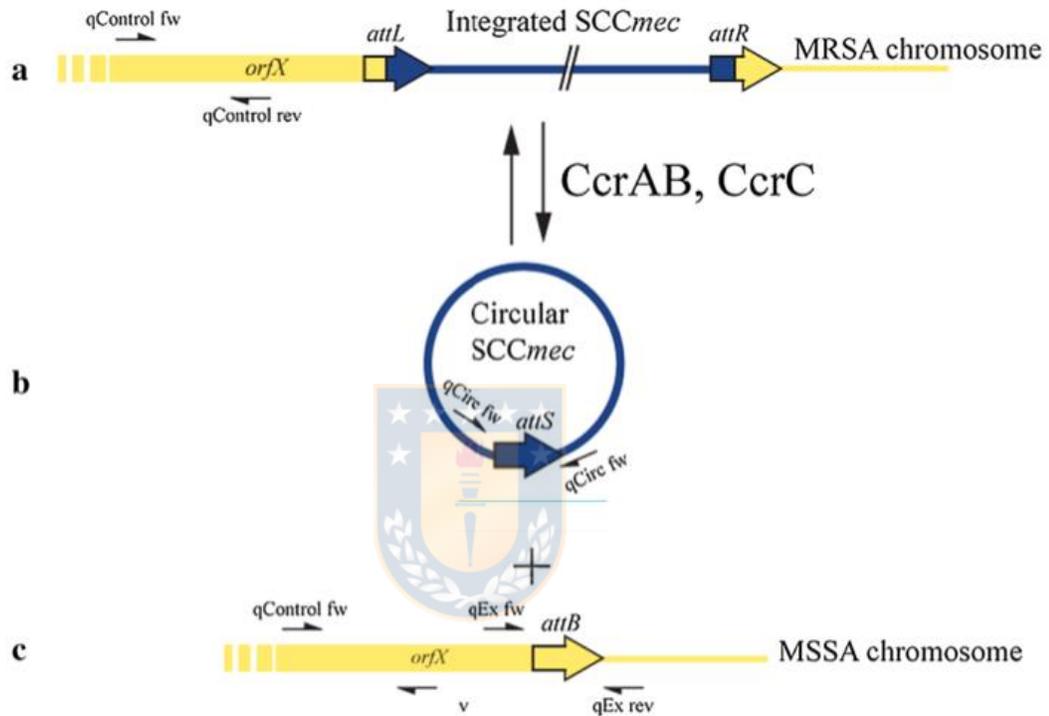


Figura 11. Mecanismo de inserción/escisión de *SCCmec*. Modificado de Stojanov et al., 2015. BMC Research Notes; 8(1): 828.

1.10 Antibióticos de uso clínico con actividad antiestafilocócica

En la actualidad disponemos de una limitada cantidad de antibióticos con actividad antiestafilocócica, los que deben ser utilizados en forma racional por los clínicos. La resistencia a penicilina está descrita en torno al 90-95% de los

aislados, por lo que esta molécula ya no se considera una alternativa terapéutica (Lowy, 1998).

Para las cepas de *S. aureus* susceptibles a la meticilina (SASM), las penicilinas antiestafilocócicas son la terapia de elección. En este aspecto cabe mencionar que la denominación de “meticilino” susceptible o resistente se ha mantenido por su importancia histórica, puesto que este antibiótico ya no se encuentra disponible dentro del arsenal terapéutico y fue reemplazado por otras penicilinas resistentes a la penicilinasasa estafilocócica, destacando en Chile la cloxacilina (figura 3). Otra alternativa terapéutica contra SASM son las cefalosporinas de primera generación, como la cefazolina y el cefadroxilo, de administración endovenosa y oral respectivamente (Lowy, 1998).

La primera línea de tratamiento contra el SARM son los glucopéptidos (Kahne, Leimkuhler, Lu, & Walsh, 2005), es decir, vancomicina y teicoplanina, ambos disponibles en Chile sólo para terapias endovenosas. Vancomicina es por amplio margen la más utilizada por los clínicos en la actualidad. Ambas son moléculas de gran masa molar (aproximadamente 1500 g/mol), cuyo sitio blanco es el dipéptido terminal D-ala-D-ala de la cadena aminoacídica lateral unida al ácido N-acetilmurámico. El mecanismo de acción es el bloqueo de la transpeptidación, pero por impedimento estérico, a diferencia de los β -lactámicos que lo logran por inhibición de la enzima que realiza dicha

función (Kahne et al., 2005).

Otra alternativa terapéutica contra SARM son las oxazolidinonas, cuyo único exponente en Chile es linezolid, un antibiótico bacteriostático que se une al sitio P de la unidad ribosomal 50S y que por lo tanto inhibe la síntesis proteica bacteriana (Aminov, 2017). Existe en formulaciones endovenosas y oral, esta última de gran utilidad para tratamientos ambulatorios.

Por otra parte, daptomicina es un lipopéptido cíclico con un mecanismo de acción bactericida único. Se postula que es capaz de unirse a la membrana citoplasmática de la bacteria a través de su extremo hidrofóbico, para posteriormente polimerizar y formar canales iónicos de potasio que permiten la salida de este ion hacia el medio extracelular, alterando el potencial de membrana bacteriano, conduciendo a la muerte del procarionte, pero sin lisis. Sus usos formales se encuentran limitados a la infección de piel y tejidos blandos y a la bacteriemia y endocarditis derecha por *S. aureus* (Tran, Munita, & Arias, 2015).

Existen otros fármacos con actividad anti SARM, algunos ya disponibles en nuestro país, que vale la pena mencionar. Las cefalosporinas de 5ª generación son los únicos β -lactámicos capaces de unirse con gran afinidad a la PBP2a, y

por lo tanto, con efecto bactericida sobre SARM (Munita, Bayer, & Arias, 2015). Dentro de estas destaca ceftarolina, aprobada por la FDA (*Food and Drug Administration*) para infecciones de piel y partes blandas y para la neumonía comunitaria (Rodvold & Mcconeghy, 2014). Por otro lado, los lipogluco péptidos son moléculas que difieren de los gluco péptidos al poseer una cadena lateral lipofílica que modifica el perfil farmacocinético y/o farmacodinámico del antibiótico. Destaca la prolongada vida media de oritavancina y dalbavancina que permiten intervalos de administraciones muy prolongados que favorecerían la terapia ambulatoria, sobre todo en infecciones de piel y partes blandas (Van Bambeke, 2015).



1.11 Métodos de genotipificación usados para cepas de *S. aureus*

Los métodos fenotípicos (como el antibiograma) no poseen un buen poder de discriminación intraespecie en *S. aureus* (y en las bacterias en general), es por esto que se debe recurrir a métodos de tipificación molecular para poder efectivamente diferenciar entre cepas. Más que usar uno en forma aislada, lo recomendado es la asociación de los métodos que se mencionarán a continuación (Miao et al., 2017):

- Tipificación del *cassette* cromosomal (*SCCmec typing*): habitualmente se realiza mediante la metodología de reacción en cadena de la polimerasa (RCP), para lo cual existen partidores validados por diversos autores. Consiste en determinar el tipo y subtipo del *cassette* cromosómico que portan las cepas estudiadas.
- Determinación de factores de virulencia: mediante RCP se pesquisa la presencia de una variedad de genes de virulencia, entre los que destacan los que codifican para PVL.
- Macrorestricción y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE): esta metodología sigue siendo el estándar de oro en la tipificación molecular y se basa en la digestión de ADN total (protegido en un *plug* de agarosa) mediante enzimas de restricción de corte infrecuente y posterior visualización mediante PFGE. Este método se caracteriza por ser muy laborioso, tener menor reproducibilidad inter-laboratorios y analiza cambios evolutivos de periodos cortos.
- Tipificación del gen que codifica la proteína A (*spa typing*): se basa en determinar las diferencias en longitud y polimorfismos de las secuencias cortas repetidas de la región variable del gen que codifica para la proteína A. Corresponde a un método razonablemente barato y reproducible.
- Tipificación multilocus de secuencias (MLST): su fundamento es la secuenciación de los segmentos internos de siete genes de

mantenimiento o “*housekeeping*” para evaluar las variaciones nucleotídicas entre distintas cepas. Esto permite establecer un perfil alélico o “secuenciotipo” (ST) y establecer complejos clonales (CC) tras compartir cinco de los siete alelos analizados. Este método de tipificación es menos laborioso y más reproducible entre distintos laboratorios que PFGE. Las variaciones en la secuencia de este tipo de genes ocurren en periodos evolutivos prolongados.

- Secuenciación del genoma completo: Corresponde a la técnica más moderna y poderosa disponible en la actualidad. Permite la identificación y comparación de los genomas de las bacterias, convirtiéndose en una herramienta epidemiológica de calidad. Probablemente con el pasar de los años y asociado a la reducción de sus costos se convertirá en una herramienta molecular de rutina en los laboratorios de investigación.

1.12 *S. aureus* resistente a la meticilina hospitalarios y comunitarios en el mundo

En lo que se denomina epidemiología molecular de SARM, se ha podido determinar que en distintas localizaciones geográficas existen predominancias de distintos linajes genéticos de *S. aureus* (Liu et al., 2016), lo que se explica por una sumatoria compleja y no bien comprendida de razones biológicas y asociadas a la actividad humana. SARM ha emergido en múltiples ocasiones

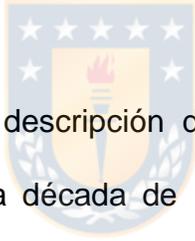
desde la población a partir de distintos linajes de *S. aureus* susceptibles a la meticilina y se ha adaptado a diferentes ambientes y condiciones que los humanos han propiciado, influido además por la presión selectiva ejercida por los antibióticos que habitualmente difiere entre países. Si a lo anterior le sumamos otros factores como las migraciones cada vez más frecuentes en el mundo contemporáneo, condicionan un dinamismo fascinante liderado por los clones más exitosos o aptos desde un punto de vista biológico (Deurenberg & Stobberingh, 2008).

Es así como el primer SARM hospitalario descrito en Inglaterra (clon arcaico) ST250/CC8/SCC*mec* I no es el SARM predominante en los hospitales de Reino Unido en la actualidad. EMRSA-15 (ST22/CC22/SCC*mec* IV) es uno de los clones clásicamente hospitalarios más exitosos a nivel global, se describió por primera vez el año 1991 (asociado a la introducción de las fluorquinolonas en Inglaterra) y se diseminó rápidamente por todo el territorio británico. EMRSA-15 desplazó al EMRSA-16 (ST36/CC30/SCC*mec* II) desde el inicio de la década del 2000, el que a su vez había desplazado al clon arcaico desde la década de 1980. Se cree que una de las ventajas de EMRSA-15 es la de portar SCC*mec* IV, un elemento genético más pequeño y que podría ser favorable desde un punto de vista energético (Bal et al., 2016).

SARM ST5/CC5/SCC*mec* II (USA 100, clon New York/Japón) había sido el predominante en contextos hospitalarios en Estados Unidos (EE.UU), aunque desde el año 2004 un nuevo linaje, biológicamente más apto, comenzó a prevalecer en territorio estadounidense (USA300) (Patel et al., 2008). Otros clones de SARM-AH mundialmente exitosos son el ST239/CC8/SCC*mec* III descrito en hospitales de Australia, Asia y Sudamérica (clon Brasileño) (Bal et al., 2016).

En relación a Sudamérica, el año 2001 se documentó la amplia predominancia del clon Brasileño (o Sudamericano) en un estudio que incluyó cepas hospitalarias de Argentina, Brasil, Chile, Uruguay y México recolectadas entre los años 1996-1998 (Aires De Sousa et al., 2001). No obstante, en Chile en el mismo estudio ya había evidencia de un clon de SARM genéticamente diferente (47% del total de cepas) y que coexistía con el clon Brasileño y se le denominó clon Chileno. Posteriormente se documenta un nuevo clon altamente prevalente en Córdoba (Argentina) que coexistía con el clon Brasileño y que estaba relacionado genéticamente con el clon Chileno (C Sola, Gribaudo, Vindel, Patriito, & Bocco, 2002). Para el año 2006 la misma autora objetiva el claro desplazamiento en Córdoba del clon Brasileño por el clon Cordobés (Claudia Sola et al., 2006), actualmente denominado Chileno/Cordobés (ST5/CC5/SCC*mec* I). En Colombia también existió evidencia del

desplazamiento de un clon previamente predominante (clon Pediátrico) por el clon Chileno (Rodríguez-Noriega et al., 2010), por lo que está claramente establecido que este linaje presentó predominancia y gran relevancia en infecciones hospitalarias de todo el territorio Sudamericano. No obstante, como se mencionará más adelante en publicaciones más recientes de Colombia y Argentina se ha podido documentar el desplazamiento del clon Chileno (hospitalario) por otros clásicamente comunitarios: USA300-LV (en Colombia) y ST5/SCCmec IV/PVL+ (en Argentina). En el caso del país trasandino este fenómeno se ha visto particularmente en población pediátrica.



Como ya se mencionó, la descripción de SARM-AC comenzó en Australia occidental a principios de la década de 1990 en población aborígen que no tenía contacto con centros médicos. El linaje correspondía al ST8/SCCmec IV, a lo que se le ha agregado con el paso de los años las descripciones de ST93, ST30, ST1, ST45, ST78 y ST5, todos portadores de SCCmec IV (Bal et al., 2016).

La circulación del SARM-AC en Europa también data de la década de 1990, con predominio del ST80/SCCmec IV/PVL+ (clon Europeo) que se cree se introdujo desde África subsahariana como resultado de migraciones humanas (Bal et al., 2016).

En EE.UU los primeros casos documentados fueron de fines de la década de 1990 y afectó a niños sanos, con una elevada letalidad a causa de neumonía y sepsis (Centers for Disease Control and Prevention, 1999). El clon se designó USA400 (ST1/CC1/SCC*mec* IV/PVL+); sin embargo, fue reemplazado por el USA300 (ST8/CC8/SCC*mec* IV/PVL+) que actualmente es el más frecuente y causa característicamente infecciones de piel y tejidos blandos (Bal et al., 2016). El clon USA300 porta el gen *speG* en un elemento genético denominado ACME tipo I, que codifica para una enzima capaz de degradar poliaminas en el hospedero y así sobrevivir más tiempo en él (Thurlow, Joshi, & Richardson, 2012). Este clon es sumamente exitoso y se ha expandido a otros territorios sobre todo en el área norte de Sudamérica (Planet et al., 2015). Más aún, existe una creciente descripción del USA300 como SARM asociado a la atención de salud e incluso se ha proyectado la posibilidad de desplazar como principal patógeno nosocomial al USA100. Son precisamente estos fenómenos los que limitan las definiciones clásicas para clasificar las infecciones por SARM en hospitalarias y comunitarias. A pesar de haberse descrito el USA300 en Europa y otros países Sudamericanos, su diseminación en estos territorios ha sido categóricamente menos exitosa (Tenover & Goering, 2009).

En Sudamérica las primeras descripciones de SARM-AC provienen de Uruguay el año 2001, no obstante son caracterizaciones de casos clínicos con epidemiología concordante y cepas con fenotipos sólo resistentes a β -

lactámicos, pero sin estudio molecular (Galiana Villar, 2003). La primera descripción fundamentada de SARM-AC fue en el año 2005, y correspondieron a casos cuyas cepas fueron recolectadas en el periodo 2002-2003 (Ribeiro et al., 2005). En este trabajo 3 cepas fueron adecuadamente caracterizadas como comunitarias (epidemiológica y molecularmente) y fueron definidas como ST30/SCC*mec* IV, clon altamente prevalente en Brasil (Scribel et al., 2009). El año 2005 se describe en Colombia un clon genéticamente relacionado al USA300, pero geográficamente diferenciado, que carece del locus ACME y se le denominó como la variante Latinoamericana, USA300-LV (César A. Arias & Rincón, 2008). Ambos tendrían un ancestro común y la segregación habría ocurrido en la década de 1980, lo que coincidiría con la adquisición de ACME por el USA300 y de COMER por USA300-LV (Planet et al., 2015), siendo este último un elemento genético móvil que codifica resistencia para cobre y mercurio (*copper and mercury resistance*). Como ya se mencionó este clon está ampliamente diseminado en la actualidad por los países del norte de Sudamérica (Colombia, Venezuela y Ecuador), incluso desplazando a nivel hospitalario al clon Chileno que era el predominante (Reyes et al., 2009).

La epidemiología del SARM-AC en Argentina es más relevante para nosotros, al ser el país limítrofe con mejor nivel de conocimiento molecular. En un estudio reciente se documentó una elevada proporción de SARM en infecciones de inicio comunitario, sobre todo en población pediátrica, en aquellos sin factores

de riesgo hospitalario y en infecciones de piel y tejidos blandos (Egea et al., 2014). Además, se logró documentar que más de la mitad de las infecciones por SARM, especialmente a nivel pediátrico, asociadas al hospital fueron causadas por SARM genéticamente definidos como comunitarios. En este contexto en Argentina se estaría generando el mismo proceso de reemplazo del clon Chileno, típicamente hospitalario, por linajes asociados a la comunidad, sobre todo en niños. Los clones de SARM-AC más prevalentes (90% del total) fueron ST5/SCC*mec* IVa/PVL+ y ST30/SCC*mec* IVc-PVL+.



La epidemiología molecular actual de SARM en Latinoamérica queda muy bien reflejada en la figura 12, cuyos datos se obtuvieron de aislados hospitalarios de distintos países de la región. Es importante remarcar la creciente importancia de USA300-LV en los países del norte de Sudamérica, en desmedro del clon Chileno. Por otro lado, Argentina revela gran heterogeneidad en los clones aislados. En Brasil hay clara predominancia de USA100 (clon New York/Japón), mientras que sólo Perú y Chile mantienen estable el clon Chileno.

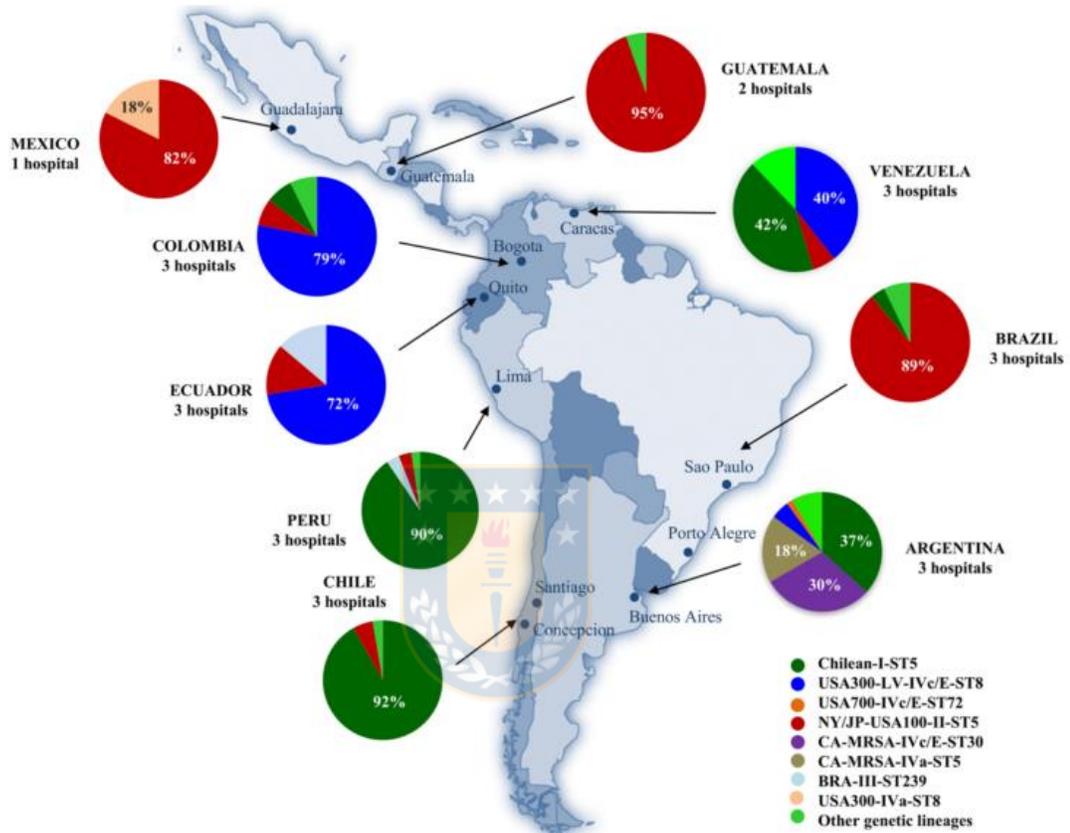


Figura 12. Distribución clonal de SARM aislados en distintos hospitales Latinoamericanos, Modificado de Arias et al., 2017. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 61(10): 1–12.

1.13 *S. aureus* resistente a la meticilina en Chile

En Chile se objetivó la progresiva disminución en la susceptibilidad a meticilina de *S. aureus* en la década de 1960, además de identificar una cepa aislada en 1967 con concentración mínima inhibitoria (CMI) mayor a 6,25 µg/mL, y catalogada como resistente (Ledermann, 1970). Sin embargo, no es hasta la década de 1980 en que realmente SARM comienza a cobrar mayor relevancia en los hospitales de nuestro país (GIL D de M., 2000).

El Ministerio de Salud, en su último informe de vigilancia de infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) del año 2014, cataloga a la etiología estafilocócica como la más frecuente en una diversidad de entidades, tales como infección de sitio quirúrgico (de distintas localizaciones anatómicas), infección del torrente sanguíneo, neumonía asociada a ventilación mecánica, entre otros (Otaíza, Orsini, Pohlenz, & Sepúlveda, 2014). Por otro lado, el Grupo Colaborativo de Resistencia Bacteriana de la Sociedad Chilena de Infectología, en su último informe de susceptibilidad antimicrobiana de nuestro país, informa susceptibilidad a cloxacilina en apenas un 51% de los aislados en población adulta (Cifuentes et al., 2014), lo que convierte a SARM en un microorganismo muy frecuente y relevante en los hospitales de Chile.

Por otro lado SARM, pero de adquisición comunitaria, ya fue descrito en nuestro país el año 2006 (Noriega Ricalde et al., 2008), lo que motivó el inicio de un programa de vigilancia por parte del Instituto de Salud Pública (ISP), en el cual todos los laboratorios del país deben remitir por ley las cepas fenotípicamente sospechosas (Decreto N° 158). Si bien en las infecciones estafilocócicas de adquisición comunitaria siguen predominando las cepas susceptibles a meticilina, existen en forma cada vez más frecuentes reportes clínicos con las variantes resistentes, lo que nos obliga a estar preparados ante un posible aumento significativo en el número de casos.



1.14 Genotipificación de *S. aureus* resistente a la meticilina en Chile

En Chile, un estudio realizado en Valdivia muestra un claro predominio del clon Chileno a nivel hospitalario (Medina et al., 2013). De 100 cepas aisladas en el hospital, 97 portaban SCC*mec* I y tras genotipificar algunos mediante MLST y PFGE se documentó que pertenecían al ST5 y presentaban relación genética con el clon antes mencionado. Esto es compatible con datos obtenidos en el Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos, donde se demostró que de 50 infecciones invasoras producidas por SARM atendidas en el Hospital Regional de Concepción “Dr. Guillermo Grant Benavente” entre los años 2011-2014, 49 portaban SCC*mec* I y ninguna de las cepas codificaba para PVL, lo

que es característico del clon Chileno (Felix Vega, 2015).

Existe mucha menos información respecto a la epidemiología molecular del SARM-AC. Los primeros cinco casos descritos en Chile fueron en su mayoría importados y pertenecían al ST8/SCCmec IVa/PVL+, compatibles con el clon USA300 (Noriega Ricalde et al., 2008). Por otra parte en el año 2015 se publican los primeros cuatro casos pediátricos, de los cuales tres correspondieron al ST8/PVL- (no se determinó el tipo de SCCmec) (Acuña et al., 2015). En el estudio ya citado y realizado en Valdivia, además de objetivar la amplia predominancia del SCCmec I a nivel hospitalario, se documentaron unos pocos aislados portadores de SCCmec IV, de los cuales uno estaba relacionado genéticamente con el clon pediátrico (ST5/SCCmec IV) y otro con el USA300-LV, pero PVL-. Este fenómeno podría corresponder al inicio de un cambio epidemiológico en territorio nacional, con una mayor importancia de otros linajes genéticos, distintos al clon Chileno, tal como se ha descrito en otros países de Sudamérica.

El programa de vigilancia del ISP incluye la detección de los genes *mecA*, *pvl* y su tipificación por metodologías de macrorestricción, *Spa typing* y MLST, pero no incluye la identificación del tipo de *cassette* cromosomal (ISP, 2013), lo que es necesario según los consensos actuales, ya que sin la determinación de

SCC*mec*, la tipificación se considera incompleta.

En suma, SARM-AC ya está presente en Chile y a pesar de la creciente importancia su genotipificación es aún incompleta, siendo absolutamente necesario aumentar el conocimiento actual sobre este patógeno que tiene el potencial de desplazar al clon que predomina en la actualidad y convertirse en un serio problema de salud pública, por su capacidad de afectar además a persona previamente sanas, como la población pediátrica. Lograr una adecuada caracterización molecular de los linajes de SARM-AC en Chile impacta en el diagnóstico clínico y en el tratamiento empírico de las infecciones estafilocócicas. Esta tesis corresponde a la primera iniciativa que busca caracterizar el *cassette* cromosómico de un número significativo de cepas de SARM-AC aisladas en Chile.

1.15 Hipótesis

- 1.- Los SCC*mec* IVa o IVc son prevalentes en los aislados de SARM adquiridos en la comunidad
- 2.- Las cepas de SARM adquiridas en la comunidad, procedentes del programa nacional de vigilancia del ISP de Chile, no están genéticamente relacionadas

1.16 Objetivo General

Identificar el tipo y subtipo de *cassette* cromosómico estafilocócico (SCC*mec*) en los aislados de SARM comunitarios procedentes del programa nacional de vigilancia del ISP de Chile y determinar la relación genética entre los aislados

1.17 Objetivos Específicos

- 1.- Determinar el patrón de susceptibilidad de los aislados de SARM comunitarios procedentes del programa nacional de vigilancia del ISP de Chile a antibióticos de uso frecuente en clínica
- 2.- Confirmar la presencia del gen *mecA* y *pvl* en las cepas de SARM comunitarios procedentes del programa nacional de vigilancia del ISP de Chile

- 3.- Identificar el tipo de SCC*mec* en las cepas de SARM comunitarios procedentes del programa nacional de vigilancia del ISP de Chile
- 4.- Determinar los subtipos de SCC*mec* IV en las cepas portadoras de este *cassette* procedentes del programa nacional de vigilancia del ISP de Chile
- 5.- Determinar la relación genética entre los aislados de SARM adquiridos en la comunidad procedentes del Programa Nacional de Vigilancia del ISP de Chile



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepas bacterianas

Se estudiaron 50 cepas recepcionadas desde el Instituto de Salud Pública y que forman parte del programa de vigilancia nacional de SARM-AC (tabla 5). Las cepas se mantuvieron en cepario a -80°C hasta el momento de su análisis y posteriormente se recuperaron en agar sangre de cordero al 5 %.

2.2 Identificación bacteriana

La determinación de especie bacteriana se realizó en el ISP. Adicionalmente se determinó la presencia de los genes que codifican para la nucleasa y coagulasa (Cantekin et al., 2015; Hait, Tallent, Melka, Keys, & Bennett, 2012).

2.3 Estudio de susceptibilidad antimicrobiana

La detección de resistencia a meticilina se realizó utilizando un disco de cefoxitina (FOX) con una potencia de 30 µg (Wayne, 2015). Además, se estudió la susceptibilidad de las cepas a: eritromicina (ERY), clindamicina (CLI), sulfametoxazol-trimetoprim (SXT), rifampicina (RIF) y tetraciclina (TET). Se utilizó como control de susceptibilidad la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923. Para los ensayos de susceptibilidad se utilizó el método de difusión en agar Müller-Hinton siguiendo las recomendaciones del *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) en su documento M02-A11 (Wayne, 2012b) y los puntos de corte que definen resistencia detallados por el CLSI en su documento M100-S25 (Wayne, 2015).

Tabla 5. Tabla 5. Cepas de SARM-AC del programa nacional de vigilancia del ISP incluidas en el estudio.

Cepa	Año	Procedencia	Origen	<i>mec A</i>	<i>pvl</i>
UCO SA-1	2007	RM	P/PB	+	+
UCO SA-2	2007	RM	P/PB	+	+
UCO SA-3	2007	Calama	P/PB	+	+
UCO SA-4	2007	RM	P/PB	+	+
UCO SA-5	2008	Calama	P/PB	+	+
UCO SA-6	2008	RM	P/PB	+	+
UCO SA-7	2008	RM	P/PB	+	+

UCO SA-8	2008	RM	P/PB	+	+
UCO SA-9	2009	RM	P/PB	+	+
UCO SA-10	2009	RM	P/PB	+	+
UCO SA-11	2009	RM	P/PB	+	+
UCO SA-12	2009	RM	P/PB	+	+
UCO SA-13	2010	RM	P/PB	+	+
UCO SA-14	2010	Coronel	P/PB	+	+
UCO SA-15	2010	RM	P/PB	+	+
UCO SA-16	2010	RM	P/PB	+	+
UCO SA-18	2011	RM	P/PB	+	+
UCO SA-19	2011	RM	P/PB	+	+
UCO SA-20	2011	Linares	P/PB	+	+
UCO SA-22	2012	RM	P/PB	+	+
UCO SA-24	2012	RM	P/PB	+	+
UCO SA-26	2012	RM	P/PB	+	+
UCO SA-29	2012	RM	P/PB	+	+
UCO SA-30	2012	RM	P/PB	+	+
UCO SA-34	2013	RM	P/PB	+	+
UCO SA-40	2013	RM	P/PB	+	+
UCO SA-44	2013	RM	P/PB	+	+
UCO SA-45	2013	RM	P/PB	+	+
UCO SA-49	2014	RM	P/PB	+	+
UCO SA-52	2014	RM	P/PB	+	+
UCO SA-53	2014	RM	P/PB	+	+
UCO SA-55	2014	RM	P/PB	+	+
UCO SA-57	2014	Arica	P/PB	+	+
UCO SA-59	2015	RM	P/PB	+	+
UCO SA-60	2015	RM	P/PB	+	+
UCO SA-61	2015	RM	P/PB	+	+
UCO SA-63	2015	RM	P/PB	+	+
UCO SA-65	2015	RM	P/PB	+	+
UCO SA-75	2016	RM	Bronquial	+	+

UCO SA-76	2016	Viña del Mar	P/PB	+	+
UCO SA-80	2016	RM	P/PB	+	+
UCO SA-82	2016	RM	P/PB	+	+
UCO SA-85	2016	RM	P/PB	+	+
UCO SA-408	2016	Concepción	P/PB	+	+
UCO SA-409	2016	Concepción	P/PB	+	+
UCO SA-411	2016	Concepción	P/PB	+	+
UCO SA-90	2017	RM	P/PB	+	+
UCO SA-91	2017	RM	P/PB	+	+
UCO SA-95	2017	RM	P/PB	+	+
UCO SA-98	2017	RM	P/PB	+	+

Cepa: codificación interna del Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos (LIAA), Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción. Año: año de aislamiento. Procedencia: lugar geográfico del aislamiento. RM: Región Metropolitana. Origen: sitio anatómico de aislamiento. P/PB: Piel/partes blandas. Fuente: elaboración propia

2.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se determinó la CMI de las cepas a vancomicina (VAN), daptomicina (DAP) y linezolid (LZD) mediante microdilución en placa, siguiendo las recomendaciones del CLSI en su documento M07-A9 (Wayne, 2012a) y los puntos de corte detallados por el CLSI en su documento M100-S25 (Wayne, 2015). Se utilizó como cepa control la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213.

2.5 Detección de los genes *mecA*, *lukS* PV-*lukF* PV y del elemento genético *SCCmec*

La obtención de ADN bacteriano se realizó mediante el método de extracción con resina Chelex®100 (Bio-Rad). Brevemente, se sembraron las cepas en agar sangre de cordero al 5% por 18-24 h a 37°C. Luego se tomó una asada y se depositó en un tubo Eppendorf que contenía 200 µL de Chelex®100 y 2,5 µL de proteinasa K (20 mg/mL) (Geneon, Alemania), con posterior homogeneización mediante agitación en un mezclador de vórtice. La suspensión se incubó por 45 min a 56°C y posteriormente fue sometida a ebullición por 8 min. Luego se centrifugó a 14.000 rpm por 2 min. Se utilizó 1 µL del sobrenadante como templado de ADN para la reacción en cadena de la polimerasa (RCP).

La detección de los genes *mecA* y la tipificación del elemento genético *SCCmec* se realizó mediante RCP, utilizando los partidores y metodología propuesta por Kondo et al. (Kondo et al., 2007), con modificaciones, usando los partidores por separado para cada cepa. Brevemente, para la detección de *mecA* y del tipo de recombinasas se utilizó una mezcla de RCP con volumen final de 10 µL: 5 µL de 2X KAPA Taq ReadyMix (KapaBiosystems, Wilmington, MA, Estados Unidos); 3,75 µL de agua libre de nucleasas estéril; 0,125 µL de cada partidor

(25 pmoles/ μL) y 1 μL de templado de ADN. El programa de RCP fue: desnaturalización inicial (94°C, 2 min), 30 ciclos de desnaturalización (94°C, 2 min), alineamiento (57°C, 1 min), extensión (72°C, 2 min) y extensión final (72°C, 2 min).

Para la detección del complejo de genes *mec*, se probó cada partidor por separado, utilizando una mezcla de RCP con volumen final de 10 μL : 5 μL de 2X GoTaq Long PCR Master Mix (Promega, Madison, WI, Estados Unidos); 3,55 μL de agua libre de nucleasas estéril; 0,125 μL de cada partidor (25 pmoles/ μL); 0,2 μL de MgCl_2 (50 mM) y 1 μL de templado de ADN. El programa de RCP fue: desnaturalización inicial (94°C, 1 min), 30 ciclos de desnaturalización (94°C, 1 min), alineamiento (50°C, 1 min), extensión (72°C, 2 min) y extensión final (72°C, 2 min).

La subtipificación del elemento genético *SCCmec* tipo IV se realizó mediante RCP convencional, utilizando los partidores y metodología propuesta por Zhang et al. (Zhang, McClure, & Conly, 2012). La mezcla de RCP fue la misma utilizada para la detección del gen *mecA*, excepto por los partidores. Los ciclos de temperatura para la amplificación fueron: desnaturalización inicial (94°C, 5 min), 30 ciclos de desnaturalización (94°C, 1 min), alineamiento (50°C, 1 min), extensión (72°C, 2 min) y extensión final (72°C, 10 min).

La detección del gen *pvl* se realizó mediante RCP convencional, utilizando los cebadores y metodología propuesta por Lina et al. (Lina et al., 1999). La mezcla de RCP fue la misma utilizada para la detección del gen *mecA*, excepto por los partidores. El programa de RCP fue el siguiente: desnaturalización inicial (94°C, 5 min), 35 ciclos de desnaturalización (94°C, 1 min), alineamiento (56°C, 1 min), extensión (72°C, 1 min) y extensión final (72°C, 10 min). En la tabla 6 se resumen los partidores utilizados en esta tesis.

Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador XP Thermal Cycler TC-XP-A (Bioer technology, Binjiang, China). Los productos de la reacción fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% a 80-100 V por 30-45 min. El gel se confeccionó con adición de GelRed® según prospecto del fabricante, para posteriormente ser visualizado en luz UV en el equipo fotodocumentador UVIdoc HD5 (Uvitec, Cambridge)

Tabla 6. Partidores utilizados en la caracterización molecular de SARM-AC

Partidor	Gen	Secuencia Nucleotídica (5'-3')	Tamaño (pb)	Ref.
mA1 mA2	<i>mecA</i>	TGCTATCCACCCTCAAACAGG AACGTTGTAACCACCCCAAGA	286	Kondo et al. (2007)
$\alpha 1$	<i>ccrA1-ccrB</i> ($\alpha 1$ - βc)	AACCTATATCATCAATCAGTACGT	695	Kondo et al. (2007)
$\alpha 2$	<i>ccrA2-ccrB</i>	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	937	Kondo

	($\alpha 2$ - βc)			et al. (2007)
$\alpha 3$	<i>ccrA3-ccrB</i> ($\alpha 3$ - βc)	AGCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT	1791	Kondo et al. (2007)
βc		ATTGCCTTGATAATAGCCITCT		Kondo et al. (2007)
α 4.2 β 4.2	<i>ccrA-ccrB4</i>	GTATCAATGCACCAGAACTT TTGCGACTCTCTTGCGGTTT	1287	Kondo et al. (2007)
γF γR	<i>ccrC</i>	CGTCTATTACAAGATGTTAAGGAT AAT CCTTTATAGACTGGATTATTCAAA ATAT	518	Kondo et al. (2007)
mA7		ATATACCAAACCCGACAACACTACA		Kondo et al. (2007)
mI6	Clase A (mA7-mI6)	CATAACTTCCCATTCTGCAGATG	1965	Kondo et al. (2007)
IS7	Clase B (mA7-IS7)	ATGCTTAATGATAGCATCCGAATG	2827	Kondo et al. (2007)
IS2(iS-2)	Clase C2 (mA7-IS2 iS-2)	TGAGGTTATTCAGATATTTGATG T	804	Kondo et al. (2007)
iS-1	Clase C1 (mA7-iS-1)	ACATTAGATATTTGGTTGCGT	617	Kondo et al. (2007)
Type IVa- F Type IVa- R	SCC <i>mec</i> IVa	GCCTTATTCGAAGAAACCG CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG	776	Zhang et al. (2012)
Type IVb- F Type IVb-	SCC <i>mec</i> IVb, IVF	TCTGGAATTAATTCAGCTGC AAACAATATTGCTCTCCCTC	493	Zhang et al. (2012)

R				
Type IVc-F2 Type IVc-R2	SCC _{mec} IVc, IVE	CCTGAATCTAAAGAGATACACCG GGTTATTTTCATAGTGAATCGC	200	Zhang et al. (2012)
Type IVd-F5 Type IVd-R6	SCC _{mec} IVd	CTCAAATACGGACCCCAATACA TGCTCCAGTAATTGCTAAAG	881	Zhang et al. (2012)
Type IVE-F3 Type IVE-R4	SCC _{mec} IVE, IVF	CAGATTCATCATTTCAAAGGC AACAACTATTAGATAATTTCCG	175	Zhang et al. (2012)
luk-PV-1 luk-PV-2	<i>pvl</i>	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACA TGATCCA GCATCAASTGTATTGGATAGCAAA AGC	433	Lina et al. (1999)

Fuente: elaboración propia

2.6 Tipificación molecular de las cepas

Se utilizó la metodología de macrorestricción con la endonucleasa *Sma*I y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) basada en el protocolo del CDC de Canadá para SARM (Mcdougal et al., 2003) y descrita por el ISP de Chile, con modificaciones (Pública, 2012). Brevemente, para la preparación de *plugs*, las cepas se cultivaron en agar sangre de cordero 5% a 37°C en aerobiosis por 18-24 h. Se traspasó una asada a 2 mL de solución de suspensión SA, ajustando la densidad óptica entre 2 y 2,5 a 600 nm; de esta suspensión se transfirió 300 µL a un tubo Eppendorf, agregando posteriormente 5 µL de lisostafina (1 mg/mL; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos) y se

incubó a 37°C por 10 min. Se preparó agarosa para campo pulsado 1% en búfer TE 1X, el que se mantuvo a 54°C en baño termostático. Luego se transfirió 300 µL de agarosa a los tubos Eppendorf que contenían la suspensión bacteriana. Tras mezclar se confeccionaron los *plugs* en sus moldes, dejando solidificar por 5 min a temperatura ambiente. Para la lisis bacteriana se utilizaron tubos para centrífuga, con 2 mL de búfer de lisis ST adicionado de 15 µL de lisozima 10 mg/mL (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos). Se transfirieron los *plugs* a los tubos y se incubaron por 2 h a 37°C. Luego se lavó con agua destilada estéril precalentada a 54°C y se agregó 2,5 mL de búfer CLB y 24 µL de proteinasa K, incubando a 54°C por 2 h en agitación constante. Posteriormente, se realizaron 3 lavados sucesivos con agua, en donde se eliminó el búfer de lisis de cada tubo, se agregó 5 mL de agua destilada desionizada precalentada a 54°C y se dejó en agitación constante por 15 min. Luego se procedió a 3 lavados sucesivos adicionales, retirando el agua y agregando 5 mL de búfer TE 1X precalentado a 54°C e incubando con agitación por 15 min. Finalmente se transfirieron los *plugs* a un criotubo conteniendo 1 mL de búfer TE 1X, conservándose a 4°C.

Para la digestión enzimática se incubó 1/3 del *plug* en 100 µL de búfer de ambientación (búfer de enzima diluido 1:10) por 15 min a 25°C. Posteriormente se eliminó el búfer y se agregó 100 µL del búfer con la enzima de restricción *Sma*I (Promega, Madison, WI, Estados Unidos) a cada tubo, dejando esto en

incubación por 4 h a 25°C. Luego se eliminó el mix de digestión y se agregó 100 µL de búfer TE, y se almacenó a 4°C.

La electroforesis se realizó en un equipo CHEF DR II (Bio-Rad), previa preparación de un gel de agarosa 1% en TBE 0,5X con 3 µL de GelRed® en el cual se depositaron los *plugs*. La corrida electroforética se realizó 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. El gel se visualizó en luz UV en el equipo fotodocumentador UVIdoc HD5 (Uvitec, Cambridge). Los dendrogramas se confeccionaron con el software BioNumerics 6.6®; el índice de similitud se calculó utilizando el coeficiente DICE, una tolerancia de posición de banda del 1% y una optimización del 0,5%. Se utilizó un valor de corte de un 80% para considerar a las cepas relacionadas genéticamente entre sí (Murchan et al., 2003).

3. RESULTADOS

3.1 Características generales de las cepas estudiadas

Se estudiaron cepas aisladas entre los años 2007 y 2017, de las cuales 41 (82%) procedían de la Región Metropolitana. La segunda localidad más representada corresponde al Gran Concepción con 4 cepas (8%), a lo que sigue Calama con 2 (4%). Arica, Viña del Mar y Linares fueron representadas con 1 cepa cada una.

En relación al sitio de aislamiento, 49 cepas (98%), se recuperaron desde piel y partes blandas. Por otro parte, sólo 1 cepa se aisló desde un aspirado bronquial.

Tabla 7. Características generales de las cepas estudiadas

Característica		Nº de cepas	%
Año	2007	4	8
	2008	4	8
	2009	4	8
	2010	4	8
	2011	3	6
	2012	5	10
	2013	4	8
	2014	5	10
	2015	5	10
	2016	8	16
	2017	4	8
Procedencia	Arica	1	2
	Calama	2	4

	Viña del Mar	1	2
	Región Metropolitana	41	82
	Linares	1	2
	Gran Concepción	4	8
Origen	Piel y partes blandas	49	98
	Bronquial	1	2

Fuente: elaboración propia

3.2 Susceptibilidad de las cepas estudiadas

Se documentó resistencia a FOX en todas las cepas. Diez cepas fueron resistentes a eritromicina y una de éstas además se catalogó con susceptibilidad intermedia a clindamicina (UCO SA-11). Los 50 aislados incluidos en esta tesis resultaron susceptibles a rifampicina y sulfametoxazol-trimetoprim. Respecto a tetraciclina, sólo una cepa fue resistente a éste antibiótico (UCO SA-24). El estudio de susceptibilidad se resume en la tabla 8

Tabla 8. Estudio de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de SARM-AC del programa nacional de vigilancia del ISP.

Nº CEPARIO UCO SA	ANTIBIÓTICOS					
	FOX	ERY	CLI	RIF	SXT	TET
1	R	S	S	S	S	S
2	R	S	S	S	S	S
3	R	S	S	S	S	S
4	R	S	S	S	S	S
5	R	S	S	S	S	S
6	R	S	S	S	S	S
7	R	R	S	S	S	S
8	R	S	S	S	S	S
9	R	S	S	S	S	S
10	R	S	S	S	S	S
11	R	R	I	S	S	S
12	R	R	S	S	S	S
13	R	S	S	S	S	S
14	R	S	S	S	S	S
15	R	R	S	S	S	S
16	R	S	S	S	S	S
18	R	R	S	S	S	S
19	R	R	S	S	S	S
20	R	S	S	S	S	S
22	R	R	S	S	S	S
24	R	R	S	S	S	R
26	R	R	S	S	S	S
29	R	S	S	S	S	S
30	R	R	S	S	S	S
34	R	S	S	S	S	S
40	R	S	S	S	S	S
44	R	S	S	S	S	S
45	R	S	S	S	S	S
49	R	S	S	S	S	S
52	R	S	S	S	S	S
53	R	S	S	S	S	S
55	R	S	S	S	S	S
57	R	S	S	S	S	S
59	R	S	S	S	S	S
60	R	S	S	S	S	S
61	R	S	S	S	S	S
63	R	S	S	S	S	S
65	R	S	S	S	S	S
75	R	S	S	S	S	S
76	R	S	S	S	S	S

	FOX	ERY	CLI	RIF	SXT	TET
80	R	S	S	S	S	S
82	R	S	S	S	S	S
85	R	S	S	S	S	S
90	R	S	S	S	S	S
91	R	S	S	S	S	S
95	R	S	S	S	S	S
98	R	S	S	S	S	S
408	R	S	S	S	S	S
409	R	S	S	S	S	S
411	R	S	S	S	S	S

FOX: cefoxitina; ERY:eritromicina; CLI: clindamicina; RIF: rifampicina; SXT: sulfametoxazol-trimetoprim; TET: tetraciclina.

Fuente: elaboración propia

3.3 Determinación del nivel de resistencia a vancomicina, linezolid y daptomicina



La CMI₅₀ y CMI₉₀ para vancomicina fue $\leq 0,125$ $\mu\text{g/mL}$ y $0,25$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Para daptomicina el valor de la CMI₅₀ y CMI₉₀ fue $0,25$ $\mu\text{g/mL}$, mientras que para linezolid se determinó una CMI₅₀ de 1 $\mu\text{g/mL}$ y CMI₉₀ de 2 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados mencionados se resumen en la tabla 9

Tabla 9. Estudio de la concentración mínima inhibitoria para vancomicina, linezolid y daptomicina en cepas de SARM-AC del programa nacional de vigilancia del ISP

CMI ₅₀ *			CMI ₉₀ *		
VAN	DAP	LZD	VAN	DAP	LZD
$\leq 0,125$	$0,25$	1	$0,25$	$0,25$	2

*: $\mu\text{g/mL}$, VAN: vancomicina, DAP: daptomicina, LZD: linezolid

Fuente: elaboración propia

3.4 Pesquisa del gen *mecA*

Las 50 cepas incluidas en el estudio portan el gen *mecA*, determinante de la resistencia a β -lactámicos.

3.5 Pesquisa del gen *pvl*

Se logró determinar la presencia del gen que codifica para la leucocidina de Panton-Valentine en 49 cepas, lo que corresponde a un 98% del total. Sólo 1 cepa fue discordante con la información recibida desde el laboratorio de referencia y no amplificó el gen *pvl* (UCO SA-90).

3.6 Determinación del tipo de *SCCmec*

Las 50 cepas analizadas portaban el complejo *ccr* (recombinasas) tipo 2 y el complejo de genes *mec* clase B y, en consecuencia, *SCCmec* tipo IV según la clasificación internacional. De éstas, 34 cepas poseen el subtipo IVc, 15 el IVa y en una cepa se documentó *SCCmec* IVb.

3.7 Determinación de la relación genética de las cepas

Se logró tipificar por PFGE 49 de las 50 cepas incluidas en el estudio (UCO SA 53 no pudo tipificarse), además en 27 de ellas se conocía previamente el ST. Se identificaron 4 grupos claramente diferenciados (figura 13).

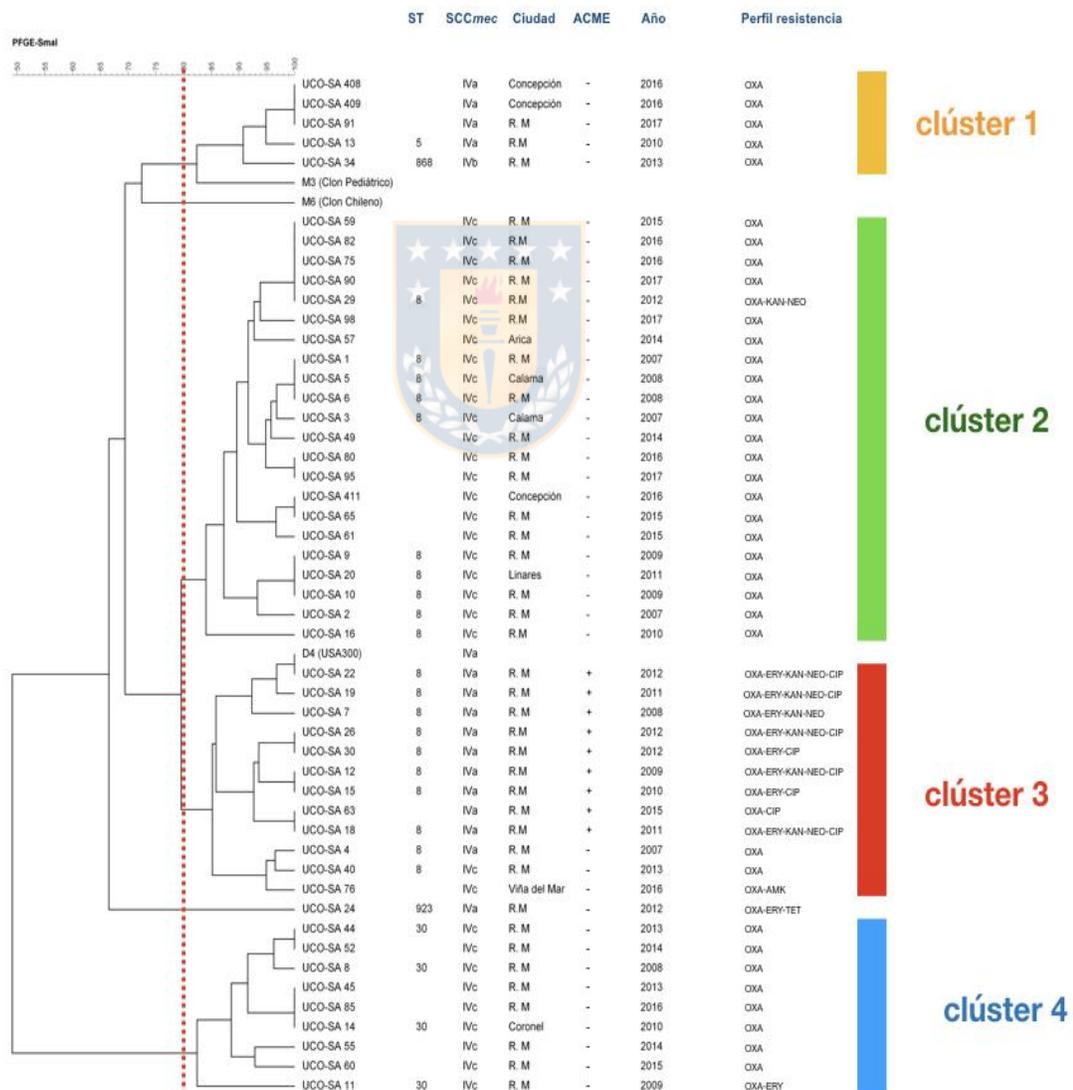


Figura 13. Relación genética de las cepas de SARM-AC determinada por macrorestricción con *SmaI* y electroforesis en gel de campo pulsado.

El más numeroso (clúster 2, 22 cepas) incluye al linaje ST8/*SCCmec* IVc/PVL +/ACME -.

El segundo clúster con mayor número de cepas corresponde a 12 aislados (clúster 3) relacionados genéticamente con el clon USA300, mayoritariamente ST8/*SCCmec* IVa/ACME+/PVL+. El clúster 4 incluye 9 cepas que contienen al ST30/*SCCmec* IVc/PVL+. Finalmente, el menos numeroso (clúster 1) incluye 5 cepas que se encuentran relacionadas genéticamente con el clon pediátrico.

Todos los grupos poseen cepas aisladas en distintas ciudades y en distintos años, algunas de ellas con un 100% de relación genética. A modo de ejemplo UCO SA-408 y UCO SA-91 son clones, siendo la primera aislada en Concepción y la segunda en la RM o UCO SA-14 y UCO SA-85, recuperadas con 6 años de diferencia en Coronel y la RM, respectivamente.

Se documentó además que la cepa UCO SA-34 se encuentra relacionada genéticamente con el clon pediátrico, pero pertenece al ST868 y posee *SCCmec* IVb. Finalmente, la cepa UCO SA-24, aislada el año 2012 en la RM, pertenece al ST 923/*SCCmec* IVa y no se encuentra relacionada genéticamente con ninguna de las otras cepas analizadas en este estudio.

4. DISCUSIÓN

4.1 Características generales de las cepas estudiadas

El número de aislados por cada uno de los años incluidos en el estudio es un valor sujeto a sesgo, determinado básicamente por el criterio arbitrario utilizado por el ISP para el envío de cepas al LIAA. En ningún caso representan una mayor o menor incidencia de infecciones por SARM-AC. Asimismo, que el 82% de los aislados estudiados hayan sido recuperados de infecciones documentadas en la Región Metropolitana, no necesariamente implica que la incidencia en este lugar sea mayor al resto del país. El criterio de envío de las cepas de SARM desde los laboratorios de microbiología al ISP, se encuentra sujeto al accionar de una diversidad de profesionales, tanto de sectores públicos como privados, lo que inherentemente crea un sesgo en el programa de vigilancia.

Lo que no parece estar sujeto a sesgo es la categórica predominancia de infecciones de piel/partes blandas, con un 98% de aislados que fueron recuperados de heridas y abscesos. Precisamente esta es la localización más descrita en las infecciones por SARM-AC, y en muchas series su frecuencia se ubica en torno (incluso supera) el 90% de los casos totales (DeLeo, Otto,

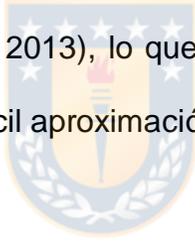
Kreiswirth, & Chambers, 2010b). Lo anterior guarda relación con la forma de transmisión de todas las cepas de *S. aureus*, es decir, el contacto directo con un individuo colonizado o infectado, características particularmente concentradas en algunos grupos de riesgo tales como: hacinamiento, deportes de contacto, falta de indemnidad en la piel y falta de higiene (Kazakova et al., 2005).

En concreto la irrupción del clon USA300 en Norteamérica durante el primer decenio del siglo XXI no solo reemplazó a otras cepas de *S. aureus* como principal agente causante de infecciones de piel y partes blandas, sino que aparentemente aumentó la carga global de esta infección (Edelsberg et al., 2009). Esto resalta que debemos estar atentos en Chile ante un posible aumento en el número de casos, dada la circulación de este y otros clones con genotipo comunitario.

4.2 Perfil de susceptibilidad

El fenotipo comunitario, sólo resistente a β -lactámicos, es una de las características esenciales del ingreso de cepas al programa nacional de vigilancia del ISP, y es a lo que el microbiólogo clínico está atento en su práctica diaria. En ese marco no debe sorprender la concordancia que hubo

entre los resultados de esta tesis con lo informado por el laboratorio de referencia. Esto tiene fundamento en la susceptibilidad típica que ha presentado SARM-AC desde el inicio de su descripción (Deresinski, 2005), la que se explica en la estructura de su *SCCmec*, usualmente tipo IV, que es más pequeño y sólo transporta el gen responsable de resistencia a β -lactámicos (Liu et al., 2016). Por el contrario, SARM-AH es resistente a un mayor número de agentes antibacterianos, adquiriendo un perfil de multirresistencia (Cifuentes et al., 2014). El clon de SARM hospitalario predominante en Chile posee un fenotipo clásico de resistencia a β -lactámicos, pero además a macrólidos y lincosamidas (Medina et al., 2013), lo que sin ser absolutamente definitorio de su presencia, permite una fácil aproximación a ésta.



Si bien el fenotipo comunitario ya descrito es lo habitual en SARM-AC, existen informes de cepas comunitarias multirresistentes que han adquirido determinantes de resistencia a antibióticos no β -lactámicos, como macrólidos, clindamicina y tetraciclina (Diep et al., 2008), por lo que la susceptibilidad en estas circunstancias no permite su diferenciación. Si bien en esta tesis se documentaron cepas resistentes a antibióticos no β -lactámicos (eritromicina), en general mantuvieron una amplia susceptibilidad a lincosamidas, lo que probablemente fue la razón del microbiólogo para remitirlas al programa de vigilancia del ISP.

En la actualidad hay evidencia en distintos países de cepas comunitarias que han desplazado a clones hospitalarios menos exitosos (Cesar A Arias et al., 2017), convirtiéndose en agentes etiológicos de infecciones asociadas a la atención de salud (IAAS). Lo anterior difumina la línea que establecía las diferencias, al menos clásicas, entre los aislados comunitarios de los adquiridos en el hospital, ya que SARM-AC no siempre es identificable por su fenotipo y no siempre está restringido a las infecciones comunitarias. Bajo este argumento los programas de vigilancia nacional de las infecciones estafilocócicas deben necesariamente unificarse, no separar de acuerdo al fenotipo bacteriano, genotipificar de acuerdo a los estándares actuales e incluir información epidemiológica de los pacientes.



Respecto a la vancomicina, las cepas incluidas en el estudio resultaron altamente susceptibles a este antibiótico. En este punto es necesario enfatizar que dicho glucopéptido sigue siendo terapia de primera línea contra las infecciones por SARM, y continúa siendo extremadamente útil en nuestro país. Lo mismo ocurre para daptomicina y linezolid, ambos aprobados por la FDA para el tratamiento de infecciones estafilocócicas y extremadamente útiles en algunos nichos específicos (Turner et al., 2019). No obstante, en países con alta presencia hospitalaria de genotipos típicamente comunitarios (causando IAAS) existe la preocupación que la alta presión selectiva a la que están constantemente sometidos en los ambientes nosocomiales, genere variedades

comunitarias, pero multirresistentes a drogas (Lakhundi & Zhang, 2018a), tal como se ha descrito con el clon USA300, para el que se ha comunicado susceptibilidad reducida a vancomicina y daptomicina (Graber et al., 2007).

4.3 Presencia del gen *mecA*

La resistencia a meticilina mediada por *mecA*, cuyo producto es la PBP2a o PBP2', es la predominante en ambientes hospitalarios humanos en todo el mundo (H F Chambers, 1997). Esta enzima con función transpeptidasa posee menor afinidad por los β -lactámicos que las PBP nativas, debido a que su sitio de unión a estos antibióticos es estructuralmente más estrecho y por lo tanto de más difícil acceso. Es precisamente esta propiedad la que permite que el SARM mantenga el entrecruzamiento del peptidoglicán en presencia de meticilina, cloxacilina o algún antibiótico estructuralmente relacionado, ya que la función de transpeptidación de la PBP2a no se ve inhibida con las concentraciones que el β -lactámico alcanza *in vivo* (Peacock & Paterson, 2015). Como era de esperar todas las cepas analizadas en este estudio son portadoras del gen *mecA*, y por lo tanto la resistencia a meticilina es mediada por la expresión del nuevo sitio blanco ya analizado. Si bien se han descrito mecanismos alternativos de resistencia a esta clase de antibióticos, éstos son categóricamente menos frecuentes. Tal es el caso de las cepas BORSA (del inglés *borderline oxacillin-*

resistance S. aureus) cuyo mecanismo de resistencia se asocia a un aumento en la actividad β -lactamasa, logrando CMI de oxacilina cercanas al punto de corte, es decir, un bajo nivel de resistencia (McDougal & Thornsberry, 1986). Otra variedad *mec* independiente son las cepas MOD-SA (del inglés *modified S. aureus*) que expresan bajo nivel de resistencia a meticilina tras adquirir modificaciones en las PBPs nativas, presumiblemente por acumulación de mutaciones en los dominios transpeptidasa (Tomasz et al., 1989).

Análisis especial requiere la meticilino-resistencia mediada por el gen *mecC*, sobre todo por la iniciativa interdisciplinaria actual que trabaja bajo el lema de “una salud” (*one health*), enfatizando la interconexión que existe entre las enfermedades en medicina humana, medicina veterinaria y el medio ambiente, lo que cobra trascendental importancia en términos de resistencia bacteriana a antibióticos (Capps & Lederman, 2015). El año 2011 fue informado en la cepa de *S. aureus* LGA251 uno de los últimos *cassettes* cromosómicos descritos, SCC*mec* XI (García-Álvarez et al., 2011), cuyo gen *mecA*_{LGA251} tiene una homología de sólo un 70% en la secuencia nucleotídica con el gen *mecA*, por lo que posteriormente fue renombrado como *mecC* (Ito et al., 2012). Por esto la PBP que se sintetiza a partir de este gen, si bien es la responsable de la meticilino-resistencia, sólo tiene un 63% de homología con la PBP2a. Las cepas portadoras de este determinante genético de resistencia se han asociado, principalmente, a la actividad veterinaria, no obstante, también ha sido descrito

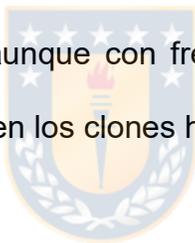
en cepas aisladas de seres humanos. En algunos países como Dinamarca, cepas de *S. aureus* portadoras de *mecC* pueden ser responsables de hasta 2% de los casos de infecciones por cepas meticilino-resistentes en humanos (Petersen et al., 2013). En Chile ya se describió este mecanismo de resistencia en una clínica veterinaria de equinos (Soza, Rivera, Toledo, Tardone, & Moreno-Switt, 2017), por lo que hay que mantener un alto índice de sospecha en medicina humana y conocer las particularidades de su detección fenotípica y genotípica (Ford, 2017), sobre todo en cepas meticilino-resistentes en las cuales no se haya determinado el gen *mecA*.



4.4 Presencia del gen *pvl*

La toxina de Pantón-Valentine es una leucocidina que ejerce su citotoxicidad a través de la formación de poros en la superficie del neutrófilo tras la acción sinérgica de 2 proteínas secretadas y posteriormente ensambladas, denominadas LukS-PV y LukF-PV. Dichas proteínas se codifican en dos genes adyacentes de un profago integrado en el cromosoma de *S. aureus* (Adler, Temper, Block, Abramson, & Moses, 2006). Se describió por primera vez en 1894, pero Pantón la asoció a infecciones estafilocócicas de piel y partes blandas casi cuarenta años después, en 1932 (David & Daum, 2010).

La asociación epidemiológica que existió desde las primeras descripciones entre SARM-AC y PVL aumentó notablemente el interés sobre este factor de virulencia (Vandenesch et al., 2003). Es justamente esta perspectiva histórica la que nos permite entender la importancia que le brindó el ISP a esta citotoxina en los inicios del programa nacional de vigilancia. Sin embargo, en la actualidad sabemos que si bien la mayoría de los aislados comunitarios portan los genes *lukSF* (David & Daum, 2010), en ningún caso debe considerarse como marcador definitorio y menos único de cepas comunitarias. En este aspecto no hay que olvidar que se han descrito cepas susceptibles a meticilina capaces de expresar esta leucocidina, aunque con frecuencias menores. Por último, PVL está prácticamente ausente en los clones hospitalarios clásicos (Otto, 2013).



Se documentó una gran correlación con la información enviada por el ISP, ya que, en 49 cepas, es decir, 98% del total se pesquisó la presencia de PVL, considerando que todas venían informadas como tal. Al respecto cabe analizar que, si bien en esta investigación prácticamente la totalidad de las cepas portaban los genes *lukSF*, existe una amplia descripción de cepas de SARM-AC que no los portan (O'Brien et al., 2004; Rossney et al., 2007). Siguiendo la misma línea, según el boletín del ISP (ISP, 2013) que analiza la vigilancia del SARM con fenotipo comunitario entre los años 2007-2012 la mayoría de las cepas analizadas precisamente no expresan PVL y no fueron seleccionadas para su posterior análisis por PFGE, *Spa typing*, MLST y tampoco se

consideraron en esta tesis. Con el objetivo de aumentar el conocimiento epidemiológico de las infecciones estafilocócicas en nuestro país se deben incluir en futuras investigaciones la totalidad de los aislados.

Desde el inicio de su descripción, se le atribuyó a SARM-AC una mayor virulencia, sobre todo por afectar a población pediátrica y otros grupos que compartían la característica de ser previamente sanos, con contacto físico prolongado y cercano y no poseer los clásicos factores de riesgo de infecciones por clones hospitalarios (David & Daum, 2010). En ese contexto, PVL adquirió protagonismo y se le atribuyó ser la principal causa de esta particularidad. No obstante, con el tiempo se ha generado una significativa cantidad de conocimiento, muchas veces contradictorio, y no se ha podido certificar fehacientemente que la expresión de los genes *lukSF* hagan a SARM-AC más virulento. En tiempos actuales se considera ciertamente a PVL como un factor de virulencia que en algunos tipos de infecciones y contextos clínicos, y sólo en algunas cepas podría contribuir significativamente a la severidad de una enfermedad causada por SARM-AC, pero no es una característica generalizable a todas las cepas que son capaces de expresar esta toxina (Otto, 2013).

En lo que si se ha encontrado una correlación fuerte es entre expresión de PVL e infecciones de piel y partes blandas, lo que es independiente del tipo de cepa

e incluso de la susceptibilidad a meticilina (Shallcross MBBS et al., 2013). En ese aspecto el 98% de las cepas incluidas en este estudio fueron recuperadas precisamente de ese origen, lo que es compatible con lo descrito hasta el momento en la literatura.

4.5 Tipo de SCCmec y relación genética de las cepas

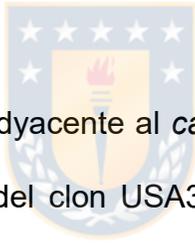
Ya se ha descrito que la naturaleza de diseminación de SARM es clonal, con diferencias regionales y muy dinámica, y Chile no es la excepción. La tipificación molecular de las cepas de *S. aureus* con fenotipo comunitario incluidas en este estudio las agrupó y relacionó con clones ya descritos en otras partes del mundo: USA300 (ST8/SCCmec IVa/ACME+), ST8/SCCmec IVc/ACME- (relacionado con USA300-LV), clon Oceanía/Pacífico (ST30/SCCmec IVc) y el clon pediátrico (ST5/SCCmec IVa).

El clon comunitario más reconocido a nivel mundial corresponde sin duda alguna al USA300 (ST8/SCCmec IVa/PVL+/ACME+). En los inicios de la década del 2000 en EE.UU comenzaron a describirse en forma progresiva y simultánea infecciones adquiridas en la comunidad causadas por un clon de *S. aureus* resistente a la meticilina que afectaba principalmente a personas que vivían o tenían contacto estrecho con otras, tales como reclusos, deportistas o

militares (Planet, 2017). Sin embargo, rápidamente este patógeno logró diseminarse en la población general y ya el año 2005 se convertía en la principal etiología de las infecciones de piel y partes blandas en aquel país norteamericano (Talan et al., 2011). Notablemente, USA300 con el pasar de los años no sólo se convertía en SARM más aislado en EE.UU, sino también contribuía al aumento de la severidad de las infecciones cutáneas y al incremento de la incidencia de éstas (Planet, 2017). No existe certeza absoluta respecto a la causa que explique el éxito de este clon; sin embargo, existe consenso en que la adquisición de un *cassette* cromosómico más pequeño, con un menor costo en términos de *fitness* fue un paso determinante. A esto se le agregaría una óptima relación entre expresión de la meticilino resistencia, característicamente menor que la de un clon clásicamente hospitalario, y mayor variedad y nivel de expresión de factores de virulencia, como PVL, ACME, entre otros (Otto, 2013).

A pesar que USA300 se ha aislado en una gran cantidad de países en todo el mundo (Nimmo, 2012), su importancia no ha sido la misma y este clon no se ha podido establecer de la misma forma que en EE.UU. Esa es precisamente la realidad de nuestro país, ya que en los más de 10 años que han pasado desde su primera descripción las infecciones por este clon son, en general, excepcionales y los casos reportados en la literatura son escasos (Acuña et al., 2015; Medina et al., 2013; Noriega Ricalde et al., 2008), sugiriendo algún tipo

de barrera a la diseminación de este patógeno, al igual que en Europa. Teniendo esto en consideración, en esta investigación se logró documentar que una fracción relevante de las cepas incluidas en el programa de vigilancia de SARM-AC PVL+ corresponden al clon USA300. Los cada vez más numerosos viajes internacionales hacia y desde nuestro país pueden facilitar la diseminación de este clon. A pesar de su baja frecuencia en términos absolutos, se debe mantener una vigilancia estrecha de las infecciones causadas por este patógeno, y los clínicos deben estar atentos en infecciones que no responden al tratamiento habitual o en algunos contextos epidemiológicos determinados.



El locus ACME se localiza adyacente al *cassette* cromosómico y representa un elemento genético símbolo del clon USA300. Codifica genes cuyos productos participan en el metabolismo de la arginina, generando amonio, lo que representaría una ventaja al favorecer la supervivencia de la bacteria en ambientes ácidos como la piel (Planet, 2017). La mayoría de las cepas encontradas en este estudio, relacionadas genéticamente con el clon USA300 poseían el locus ACME. No obstante, la variabilidad de este linaje puede involucrar genes de resistencia, factores de virulencia, presencia o no del elemento ACME o distintos subtipos del *SCCmec* IV (Planet, 2017). En este marco, en Chile ya hay evidencia de cepas relacionadas al clon USA300, pero portadoras de *SCCmec* IVc y carentes del locus ACME, tal como se documentó en 2 cepas incluidas en este trabajo y aisladas en 2 ciudades, Santiago y Viña

del Mar. Este hecho viene a reafirmar la movilidad de dichos elementos genéticos.

El clon USA300-LV fue descrito por primera vez el año 2005 y ha tenido un rol protagónico en la epidemiología molecular del SARM en nuestro continente, especialmente en los países del norte de Sudamérica (Alvarez et al., 2006). La irrupción de este linaje en dichos países es comparable a lo causado por el clon USA300 en Norteamérica y ambos producen un espectro similar de enfermedades en los humanos (Reyes et al., 2009).



Al igual que su contraparte norteamericana, el clon USA300-LV no sólo infecta a hospederos en la comunidad, sino que actualmente ha invadido los hospitales y es un clon ampliamente descrito en ambientes nosocomiales, especialmente en países como Colombia, Venezuela y Ecuador (Cesar A Arias et al., 2017).

Se ha podido documentar que tanto el clon USA300 como el clon USA300-LV tienen un ancestro común y que ambos linajes han cursado como una epidemia simultánea (Planet et al., 2015), por lo que el linaje Sudamericano no es una extensión del Norteamericano como se pensó inicialmente. Desde el punto de vista genético, las características clásicas del clon USA300-LV es la presencia del SCC*mec* IV, además de pertenecer al ST8 y expresar PVL. La principal diferencia con el clon USA300 es que a diferencia de éste último, el linaje

latinoamericano carece del elemento ACME, pero posee el elemento genético COMER (*cooper and mercury resistance*), involucradas en el metabolismo del cobre y mercurio (César A. Arias & Rincón, 2008).

En las cepas incluidas en este estudio, la agrupación más numerosa corresponde a 22 cepas que poseen el *cassette* SCC*mec* IVc/PVL+/ACME -, de las cuales 10 corresponden al ST8, de acuerdo a información otorgada por el ISP. Si bien falta por precisar la presencia del elemento genético COMER, el resto del perfil genético documentado en las cepas de este clúster es concordante con el clon USA300-LV. Estos aislados han sido recolectados en ciudades del norte, centro y centrosur de nuestro país, desde el 2007 al 2017. En este punto es necesario recalcar que si bien las infecciones por SARM-AC no son muy frecuentes aún en Chile, aparentemente el clon USA300-LV tendría un rol importante en este pequeño grupo de infecciones.

No existe una respuesta universal a la pregunta de por qué el clon USA300-LV ha tenido un rotundo éxito en los países del norte de Sudamérica y por el contrario no ha podido desplazar al estable clon chileno en nuestro territorio. Tal como se ha descrito para otros clones, los fenómenos migratorios explican en parte la diseminación mundial de estos linajes, y en este marco, los cada vez más accesibles viajes internacionales y los fenómenos de migración de los que Chile no ha estado ajeno (desde países con alta prevalencia del clon USA300-

LV) en parte pueden explicar la circulación de este clon por el territorio nacional.

El clon Oceanía/Pacífico, ST30/CC30/SCC*mec* IV (también denominado USA1100 o *West Samoan Phage Pattern*) corresponde a uno de los linajes comunitarios clásicos y su nombre se debe a la región geográfica en donde fue originalmente aislado (Vandenesch et al., 2003). Específicamente se documentó en un paciente de una comunidad en Auckland (Nueva Zelanda) que había tenido estrecho contacto con el oeste de Samoa (Mitchell, MacCulloch, & Morris, 1996). Se caracteriza por expresar PVL y se ha asociado a infecciones de piel y partes blandas en individuos previamente sanos (Williamson, Coombs, & Nimmo, 2014). Como ha ocurrido con otros clones comunitarios, su diseminación no ha respetado fronteras, y desde la segunda mitad de la década de 1990 se ha descrito en un creciente número de países y distintos continentes. Es así como este clon se ha identificado en Australia, Alemania, Suiza, Reino Unido, Irlanda, Japón y en algunos países del Sudeste asiático (Monecke et al., 2011). Se ha planteado que este linaje podría haber evolucionado a partir del clon epidémico de *S. aureus* susceptible a la meticilina ST30-fagotipo 80/81, luego de haber adquirido PVL y posteriormente SCC*mec* IV (Robinson et al., 2005). Este clon susceptible se describió por primera vez en 1953 en Australia (Rountree & Beard, 1958) y produjo brotes gracias a su resistencia a la bencilpenicilina. No obstante, con la aparición de las penicilinas antiestafilocócicas prácticamente desapareció de circulación en la década

siguiente (Robinson et al., 2005).

A nivel Latinoamericano, en Uruguay desde principios de la década del 2000 ya hubo evidencia de infecciones por cepas de SARM comunitarias (Galiana Villar, 2003) y estudios que incluyeron cepas recolectadas los años 2002-2003 a propósito de un brote en Montevideo ya describían cepas relacionadas con el clon Oceanía/Pacífico, tanto a nivel comunitario como nosocomial (Benoit et al., 2008). En Buenos Aires (Argentina) en un estudio realizado con cepas recolectadas entre los años 2004-2006 (Gardella et al., 2008) se demostró la presencia de este clon en dicho territorio, aunque con baja predominancia. No deja de sorprender que en un estudio (aunque metodológicamente distinto) realizado con cepas recolectadas apenas 10 años después (Cesar A Arias et al., 2017), en 3 hospitales de la misma ciudad, un 30% de las infecciones del torrente sanguíneo producidas por SARM, correspondían al clon ST30/SCC*mec* IV. Esto permite inferir que la importancia relativa de este clon aparentemente va al alza en el país transandino. El clon Oceanía/Pacífico también ha sido descrito en Brasil y ha demostrado ser frecuente entre cepas de SARM que expresan PVL (Chamon, Iorio, da Silva Ribeiro, Cavalcante, & dos Santos, 2015).

En este marco y a pesar de no ser preponderante, no debe sorprender la presencia del clon ST30/SCC*mec* IVc/PVL + en territorio chileno. En el informe

de vigilancia de SARM comunitario del ISP, de 66 cepas PVL+ analizadas por MLST, 11,4% pertenecían al ST30 (ISP, 2013). En esta investigación se incluyeron 4 cepas que se sabía pertenecían al ST30, pero en el dendograma obtenido a partir del experimento de macrorestricción y electroforesis en gel de campo pulsado se agruparon un total 9 cepas relacionadas genéticamente entre si y todas portan el *cassette* SCCmec IVc. Además, las cepas han sido persistentemente aisladas a partir del año 2008, principalmente en la Región Metropolitana y la única identificada fuera de la capital ocurrió en Coronel y corresponde a un clon de dos cepas aisladas en Santiago 3 años después. No obstante de no estar absolutamente claras todas las razones que otorgan dinamismo a la epidemiología de SARM, uno de los factores sociales contribuyentes a ésta es el turismo y la globalización. Si consideramos que sólo en el 2016 ingresaron más de 3 millones de turistas argentinos a nuestro país y casi medio millón de brasileños (“Turismo en Chile, principales indicadores,” 2016), que como se comentó son países en los que ya se ha descrito circulación del clon Oceanía/Pacífico, no parece sorprendente su presencia en territorio chileno. Sólo una vigilancia epidemiológica estrecha permitirá evaluar el éxito de este linaje en territorio nacional, tanto a nivel comunitario como nosocomial.

El clon pediátrico fue inicialmente descrito en estudios epidemiológicos realizados en la década de 1990 en un hospital pediátrico de Lisboa (Portugal) y

destacaba por coexistir con el clon Ibérico. Se caracterizaba además por expresar un bajo nivel de resistencia a meticilina y ser sólo resistente a β -lactámicos. Al momento de sus primeras descripciones ya había evidencia de diseminación en otros países de Europa y además en Sudamérica, específicamente Colombia, Argentina y posteriormente Brasil (Sá-Leao et al., 1999). A pesar de haber sido descrito en sus inicios como un patógeno menos resistente y que afectaba a población pediátrica, con los años se describieron infecciones por cepas relacionadas genéticamente con este clon, pero fenotípicamente multirresistentes y capaz de afectar también a población adulta (Rodríguez-Noriega et al., 2010). Fue precisamente este el caso de Colombia, que en su primer estudio publicado de vigilancia epidemiológica documentó una amplia predominancia de este clon en dos hospitales de aquel país (Gomes, Santos Sanches, Aires de Sousa, Castañeda, & de Lencastre, 2001). Sin embargo, cabe mencionar que este fue un único reporte, ya que otro estudio que analizó cepas recolectadas entre los años 1996-2003, principalmente en Bogotá y Cali, ya objetivaban la predominancia, en ese momento, del clon chileno (Cruz et al., 2005). En el caso de nuestro país limítrofe, Argentina, el clon pediátrico se ha descrito como agente causal de infecciones comunitarias y nosocomiales desde fines de la década de 1990, pero nunca como clon predominante (Rodríguez-Noriega et al., 2010).

En Chile existen pocas publicaciones que describen la epidemiología molecular

de infecciones estafilocócicas. Una de ellas fue realizada en un hospital de Valdivia (Medina et al., 2013) y analizaron un total de 100 cepas de SARM, de las cuales se escogieron aleatoriamente 29 para ser subtipificadas por PFGE. Dos cepas, es decir, un 2% del total estaban relacionadas genéticamente con el clon pediátrico; el 97% restante correspondía al clon chileno. Por otro lado, en los escasos reportes nacionales de infecciones por SARM-AC, no se han descrito casos atribuidos al clon pediátrico.

De las cepas analizadas en esta investigación 5 aislados estaban relacionados genéticamente con el clon pediátrico, de las cuales 4 portaban el *cassette* SCC*mec* IVa y en una de ellas se conocía el secuenciotipo (ST5). Llama la atención la cepa UCO-SA-34, que porta el *cassette* SCC*mec* IVb y pertenece al ST868. Sólo una cepa perteneciente a este ST ha sido reportada en un hospital en el Norte de Israel, pero portadora de SCC*mec* II (Eghbaria, Schnitser, Danial-Farran, Keness, & Bisharat, 2014). Los cinco aislados sólo presentan resistencia a β -lactámicos. No obstante, tal como se mencionó previamente, se han descrito cepas relacionadas al clon pediátrico que han adquirido genes de resistencia y presentan un fenotipo de multirresistencia, lo que difiere de la cepa clásica descrita en Portugal en la década de 1990 y que lo homologa, en el caso de nuestro país, al fenotipo del clon chileno. Esto obliga a mantener una vigilancia continua de las infecciones por SARM, complementando información clínica con una caracterización molecular completa, para que de esta forma se

pueda conocer real y profundamente la dinámica de las infecciones estafilocócicas en nuestro país, que, a la luz de la evidencia actual, no se encuentran limitadas exclusivamente al clon chileno.

Una de las cepas incluidas en el estudio pertenece al ST923 y posee el *cassette* SCCmec IVa (UCO SA-24), linaje que ha sido descrito en Colombia como un nuevo genotipo comunitario emergente, no relacionado con el clon USA300 mediante PFGE, y carente del elemento genético ACME (Escobar-Perez et al., 2017). Además, este clon ha causado infecciones comunitarias, principalmente en edad pediátrica, a sujetos en varias localidades del país caribeño lo que sugiere que se encuentra circulando en distintas regiones del país. La cepa trabajada en esta investigación fue aislada el año 2012 a partir de una infección de piel y partes blandas, en un paciente de la Región Metropolitana de nuestro país. Si bien este aislado representa una minoría del total de cepas incluidas en esta tesis, no se puede predecir cómo será el comportamiento futuro de este clon en territorio nacional.

Una vigilancia epidemiológica estrecha y permanente es la única herramienta que nos permitirá conocer la dinámica de las infecciones por SARM en Chile, sobre todo considerando que en la actualidad existen fenómenos sociales que, en teoría, fomentan la introducción y diseminación de nuevos clones en nuestro territorio. Si las infecciones por SARM-AC van o no en aumento o si la

estabilidad del clon chileno está o no amenazada son preguntas que se deben responder con estudios de incidencia, y abarcando una gran cantidad de hospitales a lo largo del país, y no acotarse a pocos centros como ha sido lo habitual hasta ahora.



5. CONCLUSIONES

A pesar de la conocida estabilidad del clon chileno en nuestro país, existe creciente evidencia que documenta la circulación de clones de SARM fenotípica y genéticamente distintos. En esta investigación tras analizar 50 cepas provenientes del programa de vigilancia de SARM-AC del ISP, que expresan PVL, se objetivó la circulación de 4 linajes distintos al clon chileno: 1) relacionados al clon USA300-LV; 2) clon USA300; 3) clon Oceanía/Pacífico y 4) clon pediátrico. Todos se caracterizan por ser, en general, susceptibles a antibióticos no β -lactámicos, poseer el gen *mecA* que codifica resistencia a la metilina y poseer el *cassette* SCC*mec* tipo IV.

6. PROYECCIONES

Cohorte nacional multicéntrica de infecciones estafilocócicas que incluya variables demográficas, características de la infección y un análisis genotípico completo de las cepas.



7. REFERENCIAS

- Acebrón, I., Chang, M., Mobashery, S., & Hermoso, J. A. (2015). The Allosteric Site for the Nascent Cell Wall in Penicillin-Binding Protein 2a: An Achilles' Heel of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Current Medicinal Chemistry*; 22(14): 1678–86.
- Acuña, M., Benadof, D., Jadue, C., Hormazábal, J. C., Alarcón, P., Contreras, J., ... Araya, P. (2015). *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina asociado a la comunidad (SARM-AC): comunicación de los primeros cuatro casos pediátricos descritos en Hospital de Niños Roberto del Río. *Revista Chilena de Infectología*; 32(3): 350–356.
- Adler, A., Temper, V., Block, C. S., Abramson, N., & Moses, A. E. (2006). Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases*; 12(11): 1789–90.
- Aires De Sousa, M., & De Lencastre, H. (2004). Bridges from hospitals to the laboratory: Genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*; 40(2): 101–111.
- Aires De Sousa, M., Miragaia, M., Santos Sanchez, I., Ávila, S., Adamson, I., & Casagrande, S. (2001). Three-Year Assessment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones in Latin America from 1996 to 1998. *Journal of Clinical Microbiology*; 39(6): 2197–2205.

- Allen, H. K., Donato, J., Huimi Wang, H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., & Handelsman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*; 8(4): 251–259.
- Alvarez, C. A., Barrientes, O. J., Leal, A. L., Contreras, G. A., Barrero, L., Rincón, S., ... Arias, C. A. (2006). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Colombia. *Emerging Infectious Diseases*; 12(12), 2000–1.
- Aminov, R. (2017). History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochemical Pharmacology*; 133: 4–19.
- Arêde, P., Milheiriço, C., de Lencastre, H., Oliveira, D. C., & Coll, M. (2012). The Anti-Repressor MecR2 Promotes the Proteolysis of the *mecA* Repressor and Enables Optimal Expression of β -lactam Resistance in MRSA. *PLoS Pathogens*; 8(7): e1002816.
- Arêde, P., & Oliveira, D. C. (2013). Proteolysis of *mecA* repressor is essential for expression of methicillin resistance by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 57(4): 2001–2.
- Arias, C. A., Reyes, J., Carvajal, P., Rincon, S., Diaz, L., Panesso, D., ... Seas, C. (2017). A Prospective Cohort Multicenter Study of Molecular Epidemiology and Phylogenomics of *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Nine Latin American Countries. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 61(10): 1–12.
- Arias, C. A., & Rincón, S. (2008). MRSA USA300 Clone and VREF — A U . S .—

- Colombian Connection ? The New England Journal of Medicine; 359: 2177–2179.
- Ayliffe, G. A. (1997). The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clinical Infectious Diseases; 24 Suppl 1: S74-9.
- Bal, A. M., Coombs, G. W., Holden, M. T. G., Lindsay, J. A., Nimmo, G. R., Tattevin, P., & Skov, R. L. (2016). Genomic insights into the emergence and spread of international clones of healthcare-, community- and livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Blurring of the traditional definitions. Journal of Global Antimicrobial Resistance; 6: 95–101.
- Barber, M. (1961). Methicillin-resistant staphylococci. J Clin Pathol; 14: 385–93.
- Benoit, S. R., Estivariz, C., Mogdasy, C., Pedreira, W., Galiana, A., Galiana, A., ... Jernigan, D. (2008). Community strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as potential cause of healthcare-associated infections, Uruguay, 2002-2004. Emerging Infectious Diseases; 14(8): 1216–1223.
- Berger-Bächli, B., & Rohrer, S. (2002). Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. Archives of Microbiology; 178(3): 165–171.
- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., ... Bartlett, J. (2009). Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE!. Clinical Infectious Diseases; 48(1): 1–12.

- Cag, Y., Caskurlu, H., Fan, Y., Cao, B., & Vahaboglu, H. (2016). Resistance mechanisms. *Annals of Translational Medicine*; 4(17): 326.
- Cantekin, Z., Ergun, Y., Solmaz, H., Özmen, G. Ö., Demir, M., & Saidi, R. (2015). PCR Assay With Host Specific Internal Control for *Staphylococcus aureus* From Bovine Milk Samples. *Macedonian Veterinary Review*; 38(1): 97–100.
- Capps, B., & Lederman, Z. (2015). One Health and paradigms of public biobanking. *J Med Ethics*; 41: 258–262.
- Centers for Disease Control and Prevention. (1999). Four Pediatric Deaths From Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*—Minnesota and North Dakota, 1997-1999. *JAMA*; 282(12): 1123.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2002). *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*; 51(26): 565–7.
- Cercenado, E. (2011). Enterococcus: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica*; 29(SUPPL. 5): 59–65.
- Chambers, H. F. (1997). Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews*; 10(4): 781–791.
- Chambers, H. F., & Deleo, F. R. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews. Microbiology*; 7(9): 629–41.

- Chamon, R. C., Iorio, N. L. P., da Silva Ribeiro, S., Cavalcante, F. S., & dos Santos, K. R. N. (2015). Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates carrying the Panton-Valentine leukocidin genes from Rio de Janeiro hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*; 83(4): 331–334.
- Cifuentes, M., Silva, F., García, P., Bello, H., Briceño, I., Calvo, M., & Labarca, J. (2014). Susceptibilidad Antimicrobiana en Chile 2012. *Revista Chilena de Infectología*; 31(2): 123–130.
- Cosgrove, S. E. (2006). The Relationship between Antimicrobial Resistance and Patient Outcomes: Mortality, Length of Hospital Stay, and Health Care Costs. *Clinical Infectious Diseases*; 42(Supplement 2): S82–S89.
- Couto, I., de Lencastre, H., Severina, E., Kloos, W., Webster, J. A., Hubner, R. J., ... Tomasz, A. (1996). Ubiquitous presence of a *mecA* homologue in natural isolates of *Staphylococcus sciuri*. *Microbial Drug Resistance*; 2(4): 377–391.
- Cruz, C., Moreno, J., Renzoni, A., Hidalgo, M., Reyes, J., Schrenzel, J., ... Arias, C. A. (2005). Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Colombian hospitals over 7 years (1996-2003): Emergence of a new dominant clone. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 26(6): 457–462.
- David, M. Z., & Daum, R. S. (2010). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and clinical consequences of an

- emerging epidemic. *Clinical Microbiology Reviews*; 23(3): 616–687.
- Delcour, A. H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*; 1794(5): 808–816.
- DeLeo, F. R., Otto, M., Kreiswirth, B. N., & Chambers, H. F. (2010b). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*; 375(9725): 1557–1568.
- den Heijer, C. D. J., van Bijnen, E. M. E., Paget, W. J., Pringle, M., Goossens, H., Bruggeman, C. A., ... APRES Study Team. (2013). Prevalence and resistance of commensal *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *S. aureus*, in nine European countries: a cross-sectional study. *The Lancet. Infectious Diseases*; 13(5): 409–15.
- Deresinski, S. (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. *Clinical Infectious Diseases*; 40(4): 562–573.
- Deurenberg, R. H., & Stobberingh, E. E. (2008). The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*; 8(6): 747–763.
- Diep, B. A., Chambers, H. F., Graber, C. J., Szumowski, J. D., Miller, L. G., Han, L. L., ... Perdreau-Remington, F. (2008). Emergence of multidrug-resistant, community-associated, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone USA300 in men who have sex with men. *Annals of Internal Medicine*; 148(4): 249–57.

- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., & Hacker, J. (2004). Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*; 2(5): 414–424.
- Edelsberg, J., Taneja, C., Zervos, M., Haque, N., Moore, C., Reyes, K., ... Oster, G. (2009). Trends in US hospital admissions for skin and soft tissue infections. *Emerging Infectious Diseases*; 15(9): 1516–8.
- Egea, A. L., Gagetti, P., Lamberghini, R., Faccone, D., Lucero, C., Vindel, A., ... Sola, C. (2014). 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*; 304(8): 1086–1099.
- Eghbaria, S., Schnitser, K., Danial-Farran, N., Keness, Y., & Bisharat, N. (2014). Molecular Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Patients with Hospital Readmissions. *Journal of Clinical Microbiology*; 52(4): 1256-8.
- Ellis, M. W., Hospenthal, D. R., Dooley, D. P., Gray, P. J., & Murray, C. K. (2004). Natural history of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection in soldiers. *Clinical Infectious Diseases*; 39(7): 971–9.
- Escobar-Perez, J., Reyes, N., Marquez-Ortiz, R. A., Rebollo, J., Pinzón, H., Tovar, C., ... Vanegas, N. (2017). Emergence and spread of a new community-genotype methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in

- Colombia. *BMC Infectious Diseases*; 17(1): 108.
- Ford, B. A. (2017). *mecC*-MRSA: Hiding in Plain Sight. *Journal of Clinical Microbiology*; 57(1): e01549-17.
- Foster, T. J. (2017). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiology Reviews*; 41(3): 430–449.
- Foye, W. O., Lemke, T. L., Williams, D. A., Roche, V. F., & Zito, W. S. (2008). Foyes's principles of medicinal chemistry. Pharmacodynamic Agents: Diuretics.
- Frère, J.-M., Sauvage, E., & Kerff, F. (2016). From "An Enzyme Able to Destroy Penicillin to Carbapenemases: 70 Years of Beta-lactamase Misbehaviour. *Current Drug Targets*; 17(9): 974–82.
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., & Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*; 3(9): 722–732.
- Galiana Villar, Á. (2003). Infección por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad. *Arch. Pediatr. Urug*; 74(1): 26–29.
- García-Álvarez, L., Holden, M. T., Lindsay, H., Webb, C. R., Brown, D. F., Curran, M. D., ... Holmes, M. A. (2011). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases*; 11(8): 595–603.
- Gardella, N., von Specht, M., Cuirolo, A., Rosato, A., Gutkind, G., & Mollerach,

- M. (2008). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, eastern Argentina. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*; 62 (3): 343-47.
- Giesbrecht, P., Kersten, T., Maidhof, H., & Wecke, J. (1998). Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*; 62(4): 1371–414.
- Gil D de M., M. (2000). *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. *Revista Chilena de Infectología*; 17(2): 145–152.
- Gomes, A. R., Santos Sanches, I., Aires de Sousa, M., Castañeda, E., & de Lencastre, H. (2001). Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Colombian Hospitals: Dominance of a Single Unique Multidrug-Resistant Clone. *Microbial Drug Resistance*; 7(1): 23–32.
- Graber, C. J., Wong, M. K., Carleton, H. A., Perdreau-Remington, F., Haller, B. L., & Chambers, H. F. (2007). Intermediate vancomycin susceptibility in a community-associated MRSA clone. *Emerging Infectious Diseases*; 13(3): 491–3.
- Grice, E. A., Kong, H. H., Conlan, S., Deming, C. B., Davis, J., Young, A. C., ... Segre, J. A. (2009). Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. *Science*; 324(5931): 1190-92
- Hait, J., Tallent, S., Melka, D., Keys, C., & Bennett, R. (2012). *Staphylococcus aureus* Outbreak Investigation of an Illinois Bakery. *Journal of Food Safety*;

32(4): 435–444.

Hartman, B. J., & Tomasz, A. (1984). Low-Affinity Penicillin-Binding Protein Associated with B-Lactam Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*; 158(2): 513–516.

International Working Group on the Staphylococcal Cassettes Chromosome elements. (n.d.). Retrieved November 7, 2016, from http://www.sccmec.org/Pages/SCC_HomeEN.html

ISP. (2013.). Vigilancia de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente adquirido en la comunidad. Chile, 2007 – 2012. Retrieved February 8, 2018, from http://www.ispch.cl/sites/default/files/S_aureus_comunitario19-07-2013_final.pdf

Ito, T., Hiramatsu, K., Tomasz, A., de Lencastre, H., Perreten, V., Holden, M. T. G., ... International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC), G. (2012). Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 56(10): 4997–9.

Juhas, M., Van Der Meer, J. R., Gaillard, M., Harding, R. M., Hood, D. W., & Crook, D. W. (2009). Genomic islands: Tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiology Reviews*; 33(2): 376–393.

Kahne, D., Leimkuhler, C., Lu, W., & Walsh, C. (2005). Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Chemical Reviews*; 105(2): 425–448.

Kale, P., & Dhawan, B. (2016). The changing face of community-acquired

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Indian Journal of Medical Microbiology; 34(3): 275–85.
- Kanafani, Z. A., & Fowler, V. G. (2006). *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica; 24(3): 182–93.
- Kazakova, S. V., Hageman, J. C., Matava, M., Srinivasan, A., Phelan, L., Garfinkel, B., ... Jernigan, D. B. (2005). A Clone of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* among Professional Football Players. New England Journal of Medicine; 352(5): 468–475.
- Kirby, W. M. M. (1944). Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. Science; 99(2579): 452–453.
- Kolár, M., Urbánek, K., & Látal, T. (2001). Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. International Journal of Antimicrobial Agents; 17(5): 357–63.
- Kondo, Y., Ito, T., Ma, X. X., Watanabe, S., Kreiswirth, B. N., Etienne, J., & Hiramatsu, K. (2007). 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; 51(1): 264–274.
- Lakhundi, S., & Zhang, K. (2018). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. Clinical Microbiology Reviews; 31(4): 1–103.

- Ledermann, G. W. (1970). Sensibilidad *in vitro* del *S. aureus* a meticilina y cloxacilina en los últimos ocho años (1961-1968). *Revista Chilena de Pediatría*; 41: 213–215.
- Lim, D., & Strynadka, N. C. J. (2002). Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Structural Biology*; 9(11): 870–6.
- Lina, G., Piémont, Y., Godail-Gamot, F., Bes, M., Peter, M.-O., Gauduchon, V., ... Etienne, J. (1999). Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*; 29(5): 1128–1132.
- Liu, J., Chen, D., Peters, B. M., Li, L., Li, B., Xu, Z., & Shirliff, M. E. (2016). Staphylococcal chromosomal cassettes *mec* (SCC*mec*): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis*; 101: 56–67.
- Lowy, F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *The New England Journal of Medicine*; 339: 520–532.
- Lowy, F. D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation*; 111(9): 1265–73.
- Lozano, C., Gharsa, H., Ben Slama, K., Zarazaga, M., & Torres, C. (2016). *Staphylococcus aureus* in Animals and Food: Methicillin Resistance, Prevalence and Population Structure. A Review in the African Continent. *Microorganisms*; 4(1): 12-30

- Ma, X. X., Ito, T., Tiensasitorn, C., Jamklang, M., Chongtrakool, P., Boyle-Vavra, S., ... Hiramatsu, K. (2002). Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 46(4): 1147–52.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., & Clark, D. P. (2012). *Brock. Biology of microorganisms (13th Pears)*.
- Malachowa, N., & Deleo, F. R. (2010). Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cellular and Molecular Life Sciences*; 67(18): 3057–3071.
- Mcdougal, L. K., Steward, C. D., George, E., Chaitram, J. M., Mcallister, S. K., Tenover, C., ... Tenover, F. C. (2003). Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a National Database Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the. *Journal of Clinical Microbiology*; 41(11): 5113–5120.
- McDougal, L. K., & Thornsberry, C. (1986). The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. *Journal of Clinical Microbiology*; 23(5): 832–9.
- Medina, G., Egea, a L., Otth, C., Otth, L., Fernández, H., Bocco, J. L., ... Sola, C. (2013). Molecular epidemiology of hospital-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Southern Chile. *Eur J Clin Microbiol*

Dis; 32(12): 1533–1540.

Mella, S., Sepúlveda, M., González, G., Bello, H., Domínguez, M., Zemelman, R., & Ramírez, C. (2004). Aminoglucósidos-aminociclitolos: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Revista Chilena de Infectología*; 21(4): 330–338.

Miao, J., Chen, L., Wang, J., Wang, W., Chen, D., Li, L., ... Xu, Z. (2017). Current methodologies on genotyping for nosocomial pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbial Pathogenesis*; 107: 17–28.

Misiura, A., Pigli, Y. Z., Boyle-Vavra, S., Daum, R. S., Boocock, M. R., & Rice, P. A. (2013). Roles of two large serine recombinases in mobilizing the methicillin-resistance cassette *SCCmec*. *Molecular Microbiology*; 88(6): 1218-29

Mitchell, J. M., MacCulloch, D., & Morris, A. J. (1996). MRSA in the community. *The New Zealand Medical Journal*; 109(1032): 411.

Molina, K. C., & Huang, V. (2016). Resistance to Non-glycopeptide Agents in Serious *Staphylococcus aureus* Infections. *Current Infectious Disease Reports*; 18(12): 16–21.

Monecke, S., Coombs, G., Shore, A. C., Coleman, D. C., Akpaka, P., Borg, M., ... Ehricht, R. (2011). A Field Guide to Pandemic, Epidemic and Sporadic Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE*; 6(4): e17936.

- Munita, J. M., Bayer, A. S., & Arias, C. A. (2015). Evolving Resistance among Gram-positive Pathogens. *Clinical Infectious Diseases*; 61(Suppl 2): S48–S57.
- Murchan, S., Kaufmann, M. E., Deplano, A., Ryck, R. De, Struelens, M., Zinn, C. E., ... Cookson, B. (2003). 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 and Spain (and from the wider HARMONY collection in Portugal, Slovenia, and Sweden). Strains from the United Kingdom (EMRSA-15 and-16) have been identified in several other. *Journal of Clinical Microbiology*; 41(4): 1574–1585.
- Murray, P. (2013). *Microbiología médica*. Elsevier. Barcelona; 2013. 174p.
- Nimmo, G. R. (2012). USA300 abroad: global spread of a virulent strain of community- associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*; 18: 725–734.
- Noriega Ricalde, L. M., González, P., Hormazábal, J. C., Pinto, C., Canals, M., Munita, J. M., ... Vial, P. (2008). *Staphylococcus aureus* comunitario resistente a cloxacilina: Comunicación de los primeros cinco casos descritos en Chile. *Revista Medica de Chile*; 136(7): 886–891.
- O'Brien, F. G., Lim, T. T., Chong, F. N., Coombs, G. W., Enright, M. C., Robinson, D. A., ... Grubb, W. B. (2004). Diversity among community

- isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Australia. *Journal of Clinical Microbiology*; 42(7): 3185–90.
- Ogston, A. (1883). Micrococcus poisoning. *Anat Physiol (London)*; 17: 24–58.
- Olivares, J., Bernardini, A., Garcia-Leon, G., Corona, F., B. Sanchez, M., & Martinez, J. L. (2013). The intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*; 4: 103.
- Opazo C, A., Mella M, S., Domínguez Y, M., Bello T, H., & González R, G. (2009). Bombas de expulsión multidrogas en *Acinetobacter baumannii* y resistencia a antimicrobianos. *Revista Chilena de Infectología*; 26(6): 499–503.
- Otaíza, F., Orsini, M., Pohlenz, M., & Sepúlveda, D. (2017). Informe de Vigilancia de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud 2017. Ministerio de Salud, Departamento de Calidad Y Formación, Programa de Control de IAAS. Retrieved from: <https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2015/09/informe-vigilancia-2017.pdf>
- Otto, M. (2013). Community-associated MRSA: What makes them special? *International Journal of Medical Microbiology*; 303(6–7): 324–330.
- Över, U., Tüç, Y., & Söyletir, G. (2000). Catalase-negative *Staphylococcus aureus*: a rare isolate of human infection. *European Society of Clinical Infectious Diseases*; 6(2): 681-82
- Parrott, G. L., Kinjo, T., & Fujita, J. (2016). A Compendium for *Mycoplasma pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*; 7: 513.

- Patel, M., Waites, K. B., Hoesley, C. J., Stamm, A. M., Canupp, K. C., & Moser, S. A. (2008). Emergence of USA300 MRSA in a tertiary medical centre: implications for epidemiological studies. *Journal of Hospital Infection*; 68(3): 208–213.
- Peacock, S. J., & Paterson, G. K. (2015). Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annual Review of Biochemistry*; 84: 577–601.
- Petersen, A., Stegger, M., Heltberg, O., Christensen, J., Zeuthen, A., Knudsen, L. K., ... Larsen, A. R. (2013). Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel *mecC* gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans. *Clinical Microbiology and Infection*; 19(1): E16–E22.
- Planet, P. J. (2017). Life After USA300: The Rise and Fall of a Superbug. *The Journal of Infectious Diseases*; 215(suppl_1): S71–S77.
- Planet, P. J., Diaz, L., Kolokotronis, S. O., Narechania, A., Reyes, J., Xing, G., ... Arias, C. A. (2015). Parallel epidemics of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 infection in North and South America. *Journal of Infectious Diseases*; 212(12): 1874–1882.
- Pública, I. de S. (2012). Procedimiento Subtipificación Molecular de *Staphylococcus aureus* mediante PFGE. PR-250.01-005.
- Reyes, J., Rincón, S., Díaz, L., Panesso, D., Contreras, G. A., Zurita, J., ... Arias, C. A. (2009). Dissemination of Methicillin - Resistant *Staphylococcus aureus* USA300 Sequence Type 8 Lineage in Latin America. *Clinical*

- Infectious Diseases; 49(12): 1861–1867.
- Ribeiro, A., Dias, C., Cícera Silva-Carvalho, M., Berquó, L., Ferreira, F. A., Neves, R., ... Figueiredo, A. M. (2005). First Report of Infection with Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *Journal of Clinical Microbiology*; 43(4): 1985–1988.
- Robinson, D. A., Kearns, A. M., Holmes, A., Morrison, D., Grundmann, H., Edwards, G., ... Enright, M. C. (2005). Re-emergence of early pandemic *Staphylococcus aureus* as a community-acquired methicillin-resistant clone. *The Lancet*; 365(9466): 1256–1258.
- Rodríguez-Noriega, E., Seas, C., Guzmán-Blanco, M., Mejía, C., Alvarez, C., Bavestrello, L., ... Gotuzzo, E. (2010). Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. *International Journal of Infectious Diseases*; 14(7),: e560–e566.
- Rodvold, K. A., & Mcconeghy, K. W. (2014). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* therapy: Past, present, and future. *Clinical Infectious Diseases*; 58(SUPPL. 1): 20–27.
- Rossney, A. S., Shore, A. C., Morgan, P. M., Fitzgibbon, M. M., O'Connell, B., & Coleman, D. C. (2007). The emergence and importation of diverse genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) harboring the Panton-Valentine leukocidin gene (*pvl*) reveal that *pvl* is a poor marker for community-acquired MRSA strains in Ireland. *Journal of Clinical Microbiology*; 45(8): 2554–63.

- Rountree, P., & Beard, M. (1958). Further observations on infection with phage type 80 staphylococci in Australia. *Med J Aust*; 2: 789–95.
- Sá-Leao, R., Santos Sanches, I., Dias, D., Peres, I., Barros, R. M., & De Lencastre, H. (1999). Detection of an archaic clone of *Staphylococcus aureus* with low-level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and in international samples: Relics of a formerly widely disseminated strain? *Journal of Clinical Microbiology*; 37(6): 1913–1920.
- Sánchez, M. B. (2015). Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Frontiers in Microbiology*; 6: 658.
- Scribel, L. V., Silva-Carvalho, M. C., Souza, R. R., Superti, S. V., Kvitko, C. H. C., Figueiredo, A. M. S., & Zavascki, A. P. (2009). Clinical and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmec IV in a university hospital in Porto Alegre, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*; 65(4): 457–461.
- Shallcross MBBS, L. J., Johnson, A. M., Fragaszy, E., Hayward, A. C., Shallcross, L. J., Fragaszy, E., ... Hayward, A. C. (2013). The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*; 13(13): 43–54.
- Shore, A. C., & Coleman, D. C. (2013). Staphylococcal cassette chromosome *mec*: Recent advances and new insights. *International Journal of Medical Microbiology*; 303: 350–359.
- Siefert, J. L. (2009). Defining the mobilome. *Methods in Molecular Biology*

(Clifton, N.J.); 532: 13–27.

Sola, C., Cortes, P., Saka, H. a, Vindel, A., Bocco, J. L., Mrsa, C., ... Bocco, L. (2006). Evolution and Molecular Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Epidemic and Sporadic Clones in Evolution and Molecular Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Epidemic and Sporadic Clones in Cordoba , Argentina. *Journal of Clinical Microbiology*; 44(1): 192–200.

Sola, C., Gribaudo, G., Vindel, A., Patrino, L., & Bocco, J. L. (2002). Identification of a novel methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic clone in Cordoba, Argentina, involved in nosocomial infections. *Journal of Clinical Microbiology*; 40(4): 1427–1435.

Soza, P., Rivera, D., Toledo, V., Tardone, R., & Moreno-Switt, A. (2017). ALARMANTE PRESENCIA DEL GEN *mecA* y *mecC* en cepas de *Staphylococcus aureus* AISLADAS DE UNA CLÍNICA VETERINARIA DE EQUINOS EN LA REGIÓN METROPOLITANA: ¿HORA DE PENSAR FUERA DE LA CAJA? In XIII Jornadas Científicas - Instituto de Salud Pública (p. 94). Santiago de Chile.

Stojanov, M., Moreillon, P., & Sakwinska, O. (2015). Excision of staphylococcal cassette chromosome *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* assessed by quantitative PCR. *BMC Research Notes*; 8(1): 828.

Talan, D. A., Krishnadasan, A., Gorwitz, R. J., Fosheim, G. E., Limbago, B., Albrecht, V., & Moran, G. J. (2011). Comparison of *Staphylococcus aureus*

- From Skin and Soft-Tissue Infections in US Emergency Department Patients, 2004 and 2008. *Clinical Infectious Diseases*; 53(2): 144–149.
- Tenover, F. C., & Goering, R. V. (2009). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: Origin and epidemiology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 64(3): 441–446.
- Thurlow, L. R., Joshi, G. S., & Richardson, A. R. (2012). Virulence strategies of the dominant USA300 lineage of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *FEMS Immunology and Medical Microbiology*; 65(1): 5–22.
- Tipper, D. J., & Strominger, J. L. (1965). Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 54(4): 1133–41.
- Tomasz, A., Drugeon, H. B., de Lencastre, H. M., Jabes, D., McDougall, L., & Bille, J. (1989). New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 33(11): 1869–74.
- Tran, T. T., Munita, J. M., & Arias, C. A. (2015). Mechanisms of drug resistance: daptomycin resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 1354: 32–53.
- Tsang, S. T. J., McHugh, M. P., Guerendiain, D., Gwynne, P. J., Boyd, J.,

- Simpson, A. H. R. W., ... Templeton, K. E. (2018). Underestimation of *Staphylococcus aureus* (MRSA and MSSA) carriage associated with standard culturing techniques: One third of carriers missed. *Bone & Joint Research*; 7(1): 79–84.
- Turismo en Chile, principales indicadores. (2016). Retrieved from https://www.sernatur.cl/wp-content/uploads/2018/09/Infografia-Anual-2016_julio.pdf
- Turner, N. A., Sharma-Kuinkel, B. K., Maskarinec, S. A., Eichenberger, E. M., Shah, P. P., Carugati, M., ... Fowler, V. G. (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nature Reviews Microbiology*; 17(4): 203-218.
- Udo, E. E., Pearman, J. W., & Grubb, W. B. (1993). Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *The Journal of Hospital Infection*; 25(2): 97–108.
- Utsui, Y., & Yokota, T. (1985). Role of an Altered Penicillin-Binding Protein in Methicillin-and Cephem-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 28(3): 397–403.
- Van Bambeke, F. (2015). Lipoglycopeptide Antibacterial Agents in Gram-Positive Infections: A Comparative Review. *Drugs*; 75(18): 2073–2095.
- Vandenesch, F., Naimi, T., Enright, M. C., Lina, G., Nimmo, G. R., Heffernan, H., ... Etienne, J. (2003). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes:

- worldwide emergence. *Emerging Infectious Diseases*; 9(8): 978–84.
- Vega, F. (2015). Caracterización fenotípica y molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) aisladas en el Hospital “Dr. Guillermo Grant Benavente” de Concepción. Universidad de Concepción.
- Vega, F., Alarcón, P., Domínguez, M., Bello, H., Riedel, G., Mella, S., ... González-Rocha, G. (2015). Aislamiento de *Staphylococcus aureus* hetero-resistente a vancomicina en Hospital Clínico Regional de Concepción, Chile. *Revista Chilena de Infectología*; 32(5): 588–590.
- von Eiff, C., Peters, G., & Heilmann, C. (2002). Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *The Lancet Infectious Diseases*; 2(11): 677–85.
- Wayne, P. C. and L. S. I. (2012a). CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. CLSI document M07-A9.
- Wayne, P. C. and L. S. I. (2012b). CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition*. CLSI document M02-A11.
- Wayne, P. C. and L. S. I. (2015). CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement*. CLSI document M100-S25.
- WHO. (2017). *Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria To Guide*

Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. Retrieved from http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1

Williamson, D. A., Coombs, G. W., & Nimmo, G. R. (2014). *Staphylococcus aureus* “Down Under”: contemporary epidemiology of *S. aureus* in Australia, New Zealand, and the South West Pacific. *Clinical Microbiology and Infection*; 20(7): 597–604.

Wisplinghoff, H., Rosato, A. E., Enright, M. C., Noto, M., Craig, W., & Archer, G. L. (2003). Related Clones Containing SCC mec Type IV Predominate among Clinically Significant *Staphylococcus epidermidis* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 47(11): 3574-3579.

Yok-Ai, Q., & Moreillon, P. (2016). Mandell, Douglas y Bennet. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica.

Zhang, K., McClure, J. A., & Conly, J. M. (2012). Enhanced multiplex PCR assay for typing of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecular and Cellular Probes*; 26(5): 218–221.

Zilahi, G., Artigas, A., & Martin-Loeches, I. (2016). What’s new in multidrug-resistant pathogens in the ICU? *Annals of Intensive Care*; 6(1): 96.

